



La D-alanylation des acides (lipo-)téichoïques comme nouvelle cible thérapeutique chez des bactéries à Gram positif d'intérêt clinique

Delphine Coupri

► To cite this version:

Delphine Coupri. La D-alanylation des acides (lipo-)téichoïques comme nouvelle cible thérapeutique chez des bactéries à Gram positif d'intérêt clinique. Microbiologie et Parasitologie. Normandie Université, 2021. Français. NNT : 2021NORMC217 . tel-04090736

HAL Id: tel-04090736

<https://theses.hal.science/tel-04090736>

Submitted on 6 May 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.

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

La D-alanylation des acides (lipo-)téichoïques comme nouvelle cible thérapeutique chez des bactéries à Gram positif d'intérêt clinique

**Présentée et soutenue par
Delphine COUPRI**

**Thèse soutenue le 05/05/2021
devant le jury composé de**

M. THOMAS CANDELA	Maître de conférences, Université Paris-Saclay	Rapporteur du jury
M. OLIVIER DUSSURGET	Professeur des universités, Institut Pasteur	Rapporteur du jury
Mme AURELIE BUDIN-VERNEUIL	Ingénieur de recherche, Université Caen Normandie	Membre du jury
Mme ISABELLE MARTIN-VERSTRAETE	Professeur des universités, Institut Pasteur	Membre du jury
M. NICOLAS VERNEUIL	Maître de conférences, Université Caen Normandie	Membre du jury
Mme MARIE-PIERRE CHAPOT-CHARTIER	Directeur de recherche à l'INRA, INRA de JOUY en JOSAS	Président du jury
M. AXEL HARTKE	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par AXEL HARTKE, UR risques microbiens (Caen)

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma très grande gratitude aux membres de mon jury, le Docteur Thomas Candela, le Professeur Olivier Dussurget, le Docteur Marie-Pierre Chapot-Chartier et le Professeur Isabelle Martin-Verstraete de m'avoir fait l'honneur d'examiner et d'évaluer ce travail.

Je remercie l'École Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement et le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche d'avoir financé mon doctorat.

Mes remerciements vont également en premier lieu au Professeur Axel Hartke pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour avoir dirigé ce travail de thèse, ainsi qu'au Docteur Nicolas Verneuil pour m'avoir encadrée. Votre esprit critique et vos impressionnantes connaissances scientifiques me laissent toujours aussi admirative. Votre patience, votre écoute et votre bienveillance sont autant de qualités dont j'ai grandement bénéficié. Infiniment merci !

Ce travail de thèse n'aurait pu être possible sans le Docteur Aurélie Budin-Verneuil, qui m'a encadrée dès mon stage de Master 2. Merci pour ton soutien, ta patience, ton engagement, ta disponibilité, ta rigueur, ta gentillesse, ton andragogie et tes encouragements, essentiels pour regonfler son estime de soi. Du fond du cœur, merci !

J'aimerais également exprimer ma reconnaissance aux Docteurs Alexis Bazire et Thomas Knigge, au Professeur Vianney Pichereau, et au Docteur Melyssa Cambroneil d'avoir accepté de participer chaque année à mon comité de suivi individuel et d'avoir veillé au bon déroulement de ma thèse. Votre sympathie et votre démarche constructive ont effacé toute l'appréhension que j'ai pu avoir avant notre première réunion.

Je tiens à remercier le Professeur Thierry Lequeux et le Docteur Emmanuel Pfund pour leur indéfectible capacité à produire toujours plus de molécules ainsi que pour nos échanges et leur bonne humeur lors de nos réunions.

Un grand merci à Isabelle Rincé, Anne-Cécile Appourchaux et Sabrina Gueulle pour leur investissement dans ce projet, la qualité de leur travail et pour leur tolérance face à la multitude de questions que j'ai pu leur poser. Travailler avec elles fût un très grand plaisir.

Je souhaite également de nouveau remercier le Professeur Isabelle Martin-Verstraete pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour m'avoir montré le travail en anaérobie sur *Clostridium*. Même si les résultats n'ont pas été à la hauteur de nos espérances, j'ai énormément apprécié ce stage au sein de votre institut.

J'aimerais aussi remercier Diane Soussan pour son aide durant son stage de Licence et sa curiosité sur mon travail de thèse, et Axelle Liébaut pour son efficacité et son sérieux pendant ses stages de Licence et de 2^{ème} année de Master ayant permis d'obtenir de très bons résultats. Votre capacité à devenir chercheur ne fait aucun doute. Je vous souhaite le meilleur pour la suite.

Merci aux personnels des plateformes de l'Université de Caen-Normandie dont le professionnalisme et la gentillesse sont indéniables. Merci aux Docteurs Gilbert Pigree et Stéphane Lemaître de la plateforme Imogere, au Docteur Didier Goux du CMAbio3, et au Docteur Benoît Bernay de la plateforme Proteogen.

Je souhaite également remercier tous les membres de l'Unité de Recherche Risques Microbiens, pour leur altruisme et leurs conseils, tant sur le plan scientifique, qu'administratif et personnel. Malgré mes kilos pris avec tous ces gâteaux en salle de pause, ces moments partagés furent un réel plaisir. Je tiens à remercier particulièrement mes collègues de bureau, doctorants et aussi jeunes docteurs, l'abondance de post-it de notre « door of fame/shame » n'est rien comparée aux plaisirs d'avoir travaillé à vos côtés.

Enfin, je ne peux terminer ces remerciements sans citer mes parents qui m'ont soutenue, aidée, et permis de me ressourcer durant toutes mes études, ma sœur pour son soutien, son écoute et nos soirées téléphoniques à rallonge, et Adèle pour son incroyable patience et sa joie de vivre durant toutes ces années. Merci.

Table des Matières

LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	8
LISTE DES FIGURES.....	11
LISTE DES TABLEAUX.....	12
 ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	 13
CONTEXTE.....	14
CHAPITRE I : MODÈLES D'ÉTUDES	16
I.1 Le genre <i>Enterococcus</i>	16
I.1.1 Caractéristiques générales des entérocoques	16
I.1.2 Pathogénicité des entérocoques.....	18
I.1.3 Infections à entérocoques et antibiorésistance	18
I.1.4 Traitements des infections à entérocoques : vers une impasse thérapeutique.....	22
I.2 L'espèce <i>Staphylococcus aureus</i>	23
I.2.1 Caractères généraux de <i>S. aureus</i>	23
I.2.2 Pathogénicité et infections à <i>S. aureus</i>	24
I.2.3 Résistances aux antibiotiques et traitements de <i>S. aureus</i>	25
 CHAPITRE II : LA RÉSISTANCE AUX BÊTA-LACTAMINES CHEZ LES BACTÉRIES À GRAM POSITIF.....	 29
II.1 Structure et classification des β -lactamines	29
II.2 Les PBPs : cibles des β -lactamines	32
II.2.1 Nature et rôles des PBPs.....	32
II.2.2 Diversité des PBPs.....	33
II.3 Mode d'action des β -lactamines.....	35
II.4 Mécanismes de résistance aux β -lactamines	37
II.4.1 La résistance enzymatique.....	37
II.4.2 La résistance par modification de cible.....	38
 CHAPITRE III : LA D-ALANYLATION DES ACIDES TÉICHOÏQUES COMME CIBLE THÉRAPEUTIQUE	 41
III.1 Les acides téichoïques.....	41
III.1.1 Les acides téichoïques liés à la paroi (WTA).....	42
III.1.2 Les acides lipotéichoïques (LTA).....	43

III.1.3	La modification des acides téichoïques	43
III.2	La D-alanylation des acides téichoïques	44
III.2.1	Mécanisme de la D-alanylation : l'opéron <i>dlt</i>	44
III.2.2	Importance de la D-alanylation chez les bactéries à Gram positif.....	47
III.2.2.1	Conservation et distribution de l'opéron <i>dlt</i>	47
III.2.2.2	Effets pléiotropes de la D-alanylation	49
III.3	La D-alanylation : une cible prometteuse	53
III.3.1	Lien entre la D-alanylation des TAs et la résistance aux molécules antimicrobiennes	53
III.3.2	Les inhibiteurs de la D-alanylation des TAs.....	55
OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THÈSE.....		57
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....		60
CHAPITRE I : MATÉRIELS BIOLOGIQUES ET CHIMIQUES UTILISÉS		61
I.1	Souches bactériennes et plasmides.....	61
I.2	Milieux de culture	63
I.3	Réactifs.....	64
CHAPITRE II : TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET DE BIOCHIMIE.....		66
II.1	Transformation par électroporation.....	66
II.1.1	Préparation de cellules électrocompétentes et transformation d' <i>E. coli</i>	66
II.1.2	Préparation de cellules électrocompétentes et transformation d'entérocoques.....	66
II.1.3	Préparation de cellules électrocompétentes et transformation de <i>S. aureus</i>	68
II.2	Solubilisation du pMAD Δ <i>dltA</i> et extraction de plasmides.....	69
II.3	Réactions de polymérisation en chaîne (PCR)	69
II.4	Construction des mutants <i>dltA</i> chez <i>S. aureus</i>	70
II.5	Séquençages	71
II.6	Trans-complémentation par le plasmide pRB473- <i>dlt</i>	72
II.7	Quantification des esters de D-alanine des acides téichoïques	72
CHAPITRE III : TECHNIQUES D'ANALYSES PHYSIOLOGIQUES		73
III.1	Détermination et analyse des concentrations minimales inhibitrices	73
III.1.1	Détermination de la concentration minimale inhibitrice	73
III.1.2	Analyse statistique	74
III.2	Détermination de la survie bactérienne	74
III.3	Étude de l'inhibition et de l'éradication de biofilm par la méthode du cristal violet ..	75

III.3.1	Préparation des biofilms	75
III.3.2	Coloration du biofilm par le cristal violet.....	76
III.3.3	Quantification du biofilm.....	76
CHAPITRE IV : ÉTUDES DANS L'HÔTE <i>GALLERIA MELLONELLA</i>		78
IV.1	Infection et traitement dans le modèle <i>G. mellonella</i>	78
IV.1.1	Préparation de l'inoculum.....	78
IV.1.2	Infection bactérienne	78
IV.1.3	Traitement post-infection.....	79
IV.2	Analyse statistique	79
RÉSULTATS ET DISCUSSIONS.....		80
CHAPITRE I : INACTIVER LA D-ALANYLATION DES ACIDES TÉICHOÏQUES POUR SENSIBILISER LES ENTÉROCOQUES D'INTÉRÊT CLINIQUE AUX β-LACTAMINES		81
I.1	Résumé de la publication	81
I.2	Publication publiée au Journal of Antimicrobial Chemotherapy	82
I.3	Données supplémentaires de la publication.....	91
CHAPITRE II : UN INHIBITEUR DE LA D-ALANYLATION DES ACIDES TÉICHOÏQUES COMME ADJUVANT ANTI-RÉSISTANCE ET ANTI-BIOFILM POUR POTENTIALISER L'EFFET DES BÊTA-LACTAMINES CONTRE <i>S. AUREUS</i> RÉSISTANT À LA MÉTICILLINE.....		94
II.1	Résumé de la publication	94
II.2	Publication en cours de préparation	95
II.3	Données supplémentaires de la publication	119
CHAPITRE III : DISCUSSION GÉNÉRALE.....		124
CONCLUSION ET PERSPECTIVES		127
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES		131
ANNEXE.....		148

Liste des abréviations

aaRS	amino-acyl-ARNt-synthétases
AcpS	Acyl carrier protein synthase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGISAR	Groupe consultatif sur la surveillance intégrée de l'antibiorésistance (<i>Advisory group on integrated surveillance of antimicrobial resistance</i>)
Agr	Régulateur de gènes accessoires (<i>Accessory gene regulator</i>)
AMP	Ampicilline
AMX	Amoxicilline
Aps	Senseur de peptides antimicrobiens (<i>Antimicrobial peptide-sensing</i>)
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
BE	Éradication de biofilm (<i>Biofilm eradication</i>)
BHI	Infusion cœur-cerveau (<i>Brain heart infusion</i>)
BHI-G	Milieu BHI supplémenté par 2% de glucose
BI	Inhibition de biofilm (<i>Biofilm inhibition</i>)
BLSE	β -lactamases à spectre étendu
BMR	Bactéries multi-résistantes
CA-	Communautaire (<i>Community associated</i>)
CAZ	Ceftazidime
Ccr	Recombinase de cassette chromosomique (<i>Cassette chromosome recombinase</i>)
CDC	Centre de contrôle et de prévention des infections (Etats-Unis) (<i>Centers for disease control and prevention (U.S.)</i>)
CEF	Céfalotine
CHL	Chloramphénicol
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CTX	Céfotaxime
CXM	Céfuroxime
DAP	Daptomycine
DO_{570nm}	Densité optique à 570 nm
DO_{600nm}	Densité optique à 600 nm
EARS-Net	Réseau de surveillance européen de l'antibiorésistance (<i>European antimicrobial resistance surveillance network</i>)

EB	Tampon d'électroporation
ECDC	Centre européen de prévention et de contrôle des infections (<i>European center for disease prevention and control</i>)
ERY	Érythromycine
FAO	Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (<i>Food and agriculture organization</i>)
FDA	Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (<i>Food and drug administration</i>)
fem	Facteur essentiel dans la résistance à la méticilline (<i>Factor essential for methicillin resistance</i>)
FEP	Céfipime
FUS	Acide fusidique
GEN	Gentamicine
Glc2-DAG	β -glycosyl(1–6)- β -glucosyl(1–3)-diacylglycérol
GM17	Milieu M17 dans lequel le lactose est remplacé par 0,5% de glucose
Gro-P	Glycérol-3-phosphate
HA-	Associés aux soins (<i>Health-care associated</i>)
hmt	Haute résistance à la méticilline (<i>High methicillin resistance</i>)
HMW	Haute masse moléculaire (<i>High-Molecular-Weight</i>)
IACG	Groupe de coordination interagences (<i>Interagency coordination group</i>)
IAS	Infections associées aux soins
IPM	Imipenème
KAN	Kanamycine
LA-	Liés aux élevages d'animaux (<i>Livestock associated</i>)
LB	Milieu Luria-Bertani
LMW	Faible masse moléculaire (<i>Low-Molecular-Weight</i>)
LTA	Acides lipotéichoïques (<i>Lipoteichoic acids</i>)
MBEC₉₀	Concentration minimale éradiquant 90% du biofilm (<i>Minimum biofilm eradication concentration</i>)
MBIC₉₀	Concentration minimale inhibant 90% du biofilm (<i>Minimum biofilm inhibition concentration</i>)
MBOATs	O-acyltransférases liées à la membrane (<i>Membrane-bound-O-acyltransferases</i>)
MGEs	Éléments génétiques mobiles (<i>Mobile genetic elements</i>)
MH	Milieu Mueller-Hinton
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline (<i>Methicillin-resistant S. aureus</i>)

NAG	N-acétylglucosamine
NAM	N-acétylmuramique
NCBI	Centre américain pour les informations biotechnologiques (<i>National center for biotechnology information</i>)
NMR	Résonance magnétique nucléaire (<i>Nuclear magnetic resonance</i>)
OIE	Organisation mondiale de la santé animale (<i>World organization for animal health</i>)
OMS	Organisation mondiale de la santé
ORF	Phase ouverte de lecture (<i>Open reading frame</i>)
OX	Oxacilline
PBP	Protéine liant la pénicilline (<i>Penicillin binding protein</i>)
PCR	Réactions de polymérisation en chaîne (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PEN	Pénicilline G
Rbo-P	Ribitol-5-phosphate
Régions J	Régions jointes
RIF	Rifampicine
SCC_{mec}	Cassette chromosomique de staphylocoques porteuse des gènes <i>mec</i> (<i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i>)
SDS-PAGE	Électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SGHN-like	Famille des Sérine-Glycine-Asparagine-Histidine hydrolases
SMC	Site multiple de clonage
TAs	Acides téichoïques (<i>Teichoic acids</i>)
TE	Tampon d'élution
TEC	Téicoplanine
UFC	Unité formant colonie
VAN	Vancomycine
VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> à résistance intermédiaire à la vancomycine (<i>Vancomycin-intermediate S. aureus</i>)
VRE	Entérocoques résistants à la vancomycine (<i>Vancomycin-resistant enterococci</i>)
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la vancomycine (<i>Vancomycin-resistant S. aureus</i>)
WTA	Acides téichoïques liés à la paroi (<i>Wall teichoic acids</i>)
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactopyranoside

Liste des figures

Figure 1 : Liste des agents pathogènes prioritaires pour la recherche, la découverte et le développement de nouveaux antibiotiques.....	15
Figure 2 : Photographies au microscope électronique à balayage d' <i>E. faecalis</i> JH2-2.....	17
Figure 3 : Classement et répartition des 8 pathogènes les plus fréquemment signalés en Europe et aux Etats-Unis.....	19
Figure 4 : Pourcentage d'isolats d' <i>E. faecium</i> résistants à la vancomycine à travers l'Europe en 2019	20
Figure 5 : Pourcentage d'isolats de <i>S. aureus</i> résistants aux β -lactamines à travers l'Europe en 2019	27
Figure 6 : Structures chimiques centrales des sous-familles de β -lactamines.....	31
Figure 7 : Structure et composition de la paroi des bactéries d'étude.....	33
Figure 8 : Mécanisme d'action des β -lactamines	35
Figure 9 : Affinités préférentielles des β -lactamines vis-à-vis des PBPs de <i>S. aureus</i>	36
Figure 10 : Organisation des acides téichoïques au sein de la paroi des bactéries à Gram positif.....	41
Figure 11 : Composition structurale des acides téichoïques liés à la paroi (WTA) chez les bactéries à Gram positif	42
Figure 12 : Composition structurale des acides lipotéichoïques (LTA) de type I chez les bactéries à Gram positif	43
Figure 13 : Modèles du mécanisme de la D-alanylation des TAs.....	45
Figure 14 : Diversité de l'organisation génétique de l'opéron <i>dlt</i> et organisation dans les bactéries d'intérêt	48
Figure 15 : Structure de l'amsacrine et de l'o-AMSA et effets sur la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la néomycine et de la gentamicine chez <i>S. aureus</i>	55
Figure 16 : Structure de l'inhibiteur de DltA et effet sur la croissance de <i>B. subtilis</i> en présence de vancomycine	56
Figure 17: Schéma de synthèse de l'inhibiteur de DltA.....	65
Figure 18 : Carte du plasmide pMAD <i>dltA</i> comprenant les régions homologues aval et amont du gène <i>dltA</i> de <i>S. aureus</i> MW2.....	71
Figure 19 : La D-alanylation des TAs : une cible thérapeutique prometteuse	128

Liste des tableaux

Tableau 1 : Résistances des entérocoques.....	21
Tableau 2 : Résistances de <i>S. aureus</i> et éléments génétiques mobiles.....	26
Tableau 3 : Liste des antibiotiques d'importance critique pour la médecine humaine	30
Tableau 4 : Classification des PBP's présentes chez <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> et <i>E. faecium</i> et les gènes impliqués	34
Tableau 5 : Résumé des effets de la mutation d'un gène de l'opéron <i>dlt</i> sur des phénotypes généraux (A.), la pathogénicité (B.), et la résistance aux molécules antimicrobiennes (C.) chez différentes bactéries à Gram positif.....	50
Tableau 6: Souches bactériennes étudiées	61
Tableau 7 : Plasmides utilisés	62
Tableau 8 : Compositions des milieux	63
Tableau 9 : Antibiotiques utilisés.....	64
Tableau 10 : Compositions des solutions pour la transformation d'entérocoques.....	67
Tableau 11 : Compositions de la solution tampon pour la transformation de <i>S. aureus</i>	68
Tableau 12 : Oligonucléotides utilisés et leurs applications	70

Analyse bibliographique

Analyse bibliographique

CONTEXTE

La découverte et l'utilisation des antibiotiques ont largement contribué à l'essor de la médecine moderne durant le dernier siècle. En effet, cette révolution médicale a sauvé des millions de vies en permettant le traitement d'infections bactériennes qui étaient jusqu'alors mortelles. Néanmoins ce succès est entaché par l'émergence rapide de bactéries résistantes aux antibiotiques. La résistance aux antibiotiques, ou antibiorésistance, désigne la capacité d'un micro-organisme à ne pas être affecté par un antibiotique, le rendant ainsi inefficace pour traiter l'infection. Lorsque la résistance du germe concerne plusieurs antibiotiques, on parle alors de bactéries multi-résistantes (BMR). Les infections aux BMR réduisent drastiquement les possibilités de traitements menant de plus en plus fréquemment à des impasses thérapeutiques (Lehtinen *et al.*, 2019).

En Europe, le nombre d'infections liées à des bactéries résistantes aux antibiotiques a été estimé à plus de 670 000 cas durant l'année 2015, conduisant à plus de 33 000 décès (Cassini *et al.*, 2019). En 2019 aux États-Unis, le nombre de cas s'est élevé à 2.8 millions avec plus de 35 000 décès (CDC (U.S.), 2019). En 2014, le rapport d'O'Neill fait état de 700 000 décès par an à travers le monde et d'une prévision alarmante de 10 millions de morts si aucune action n'est entreprise pour lutter contre la résistance aux antibiotiques (O'Neill, 2014). À la suite du sommet des Nations Unies portant sur la résistance aux antimicrobiens en 2016, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO) et l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE) créent un Groupe de Coordination Interagences (IACG). Le rapport final de l'IAGC publié en 2019 souligne l'enjeu mondial de la résistance aux antibiotiques et l'urgence de cette menace risquant de rendre obsolète un siècle de progrès en médecine en moins d'une génération (IAGC, 2019).

Pour lutter contre l'antibiorésistance, le plan d'action mondial de l'OMS définit plusieurs axes stratégiques, dont celui de favoriser la recherche et le développement de nouvelles approches thérapeutiques (OMS, 2016). Afin de guider la recherche sur cet axe, l'OMS a dressé en 2017 une liste des pathogènes résistants aux antibiotiques prioritaires (Figure 1) (Tacconelli

et al., 2018). Elle inclut deux bactéries à Gram positif : *Enterococcus faecium* résistant à la vancomycine (VRE) et *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (MRSA), résistant à la vancomycine (VRSA) ou intermédiaire à la vancomycine (VISA), dans la catégorie « priorité élevée » pour la recherche et le développement de nouveaux traitements.

Priorité 1 : CRITIQUE[#]

Acinetobacter baumannii, résistant aux carbapénèmes

Pseudomonas aeruginosa, résistant aux carbapénèmes

*Enterobacteriaceae**, résistant aux carbapénèmes, producteur de BLSE

Priorité 2 : ÉLEVÉE

→ *Enterococcus faecium*, résistant à la vancomycine

→ *Staphylococcus aureus*, résistant à la méticilline, résistant intermédiaire ou complète à la vancomycine

Helicobacter pylori, résistant à la clarithromycine

Campylobacter spp., résistant aux fluoroquinolones

Salmonellae spp., résistant aux fluoroquinolones

Neisseria gonorrhoeae, résistant aux céphalosporines, résistant aux fluoroquinolones

Priorité 3 : MOYENNE

Streptococcus pneumoniae, insensible à la pénicilline

Haemophilus influenzae, résistant à l'ampicilline

Shigella spp., résistant aux fluoroquinolones

Figure 1 : Liste des agents pathogènes prioritaires pour la recherche, la découverte et le développement de nouveaux antibiotiques (adaptée de OMS, 2017).

[#] Le genre *Mycobacterium* (dont *Mycobacterium tuberculosis*, responsable de la tuberculose humaine) n'était pas soumis à étude dans ce rapport car il est déjà considéré comme prioritaire pour la recherche de nouveaux traitements innovants.

* Les Enterobacteriaceae comprennent : *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp., et *Morganella* spp.

BLSE : β -lactamases à spectre étendu

CHAPITRE I : MODÈLES D'ÉTUDES

I.1 Le genre *Enterococcus*

Le premier entérocoque a été observé de manière informelle par Escherich en 1886. Il nomme alors cette bactérie *Micrococcus ovalis* (Flahaut *et al.*, 1997). En 1989, deux équipes réalisent les premières descriptions des entérocoques. Thiercelin décrit une bactérie d'origine intestinale qu'il nomme *Enterococcus*, tandis que McCallum et Hasting isolent une bactérie d'une endocardite infectieuse, qu'ils identifient initialement comme *Micrococcus zymogenes*. Cette dernière sera renommée ultérieurement *Enterococcus faecalis* (Arias and Murray, 2012; Flahaut *et al.*, 1997). La classification et la phylogénie des entérocoques ont été fortement modifiées par l'évolution des techniques d'identification et de nombreux arrangements taxonomiques se sont produits pour distinguer ce genre. À l'exception de quelques espèces, les entérocoques sont classés dans le groupe D des streptocoques de Lancefield (Foulquié Moreno *et al.*, 2006). Néanmoins, des études basées sur l'hybridation ADN-ADN et ADN-ARNr, sur l'analyse des ARN ribosomiques et sur l'analyse immunologique de certaines enzymes, comme l'aldolase, ont permis de différencier le genre *Enterococcus* du genre *Streptococcus*, avec lequel il a été confondu jusqu'en 1984, ainsi que des lactocoques et autres coques à Gram positif (Devriese *et al.*, 2006; Flahaut *et al.*, 1997; Schleifer and Kilpper-Balz, 1984; Selleck *et al.*, 2019). Le genre *Enterococcus* comprend 49 espèces partageant de nombreux caractères communs (Selleck *et al.*, 2019; Zhong *et al.*, 2017).

I.1.1 Caractéristiques générales des entérocoques

Les entérocoques sont des coques à Gram-positif de forme sphérique ou ovoïde d'une taille comprise entre 0,6 à 2,5 μm (Figure 2). Ils sont aéro-anaérobie facultatifs, chimio-organotrophes, non-mobiles, à catalase négative et oxydase négative, non-sporulants, et forment des chaînettes de taille variable (Arias and Murray, 2012; Devriese *et al.*, 2006; Flahaut *et al.*, 1997; Foulquié Moreno *et al.*, 2006). Ils possèdent un ADN avec un pourcentage en GC faible, entre 37 à 45%, et riche en éléments mobiles (Devriese *et al.*, 2006; Flahaut *et al.*, 1997). Ils se caractérisent notamment par leur faculté à croître dans des conditions hostiles et ainsi se développent en présence de 6,5% de chlorure de sodium, de 40% de sels biliaries, à des pH de 4,1 à 9,6, ou encore sur une grande gamme de température de 10°C à 45°C, avec une

température optimale de croissance à 35°C (Arias and Murray, 2012; Deibel *et al.*, 1963; Devriese *et al.*, 2006; Foulquié Moreno *et al.*, 2006; Selleck *et al.*, 2019). La majorité des entérocoques peut résister à une congélation prolongée et à une pasteurisation basse de 30 min à 60°C (Flahaut *et al.*, 1997; Foulquié Moreno *et al.*, 2006).

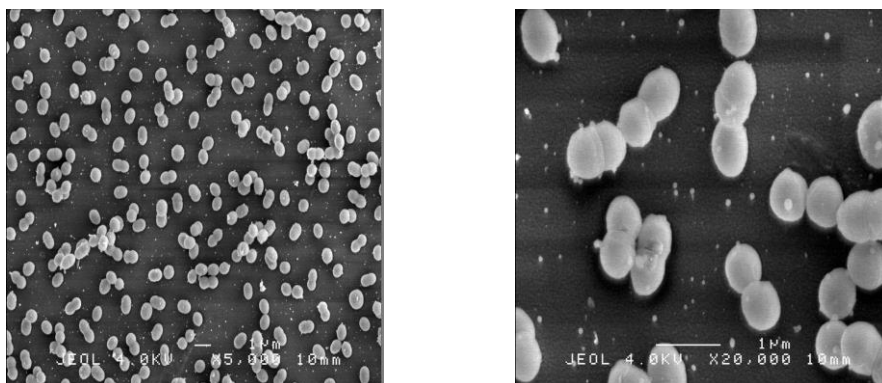


Figure 2 : Photographies au microscope électronique à balayage d'*E. faecalis* JH2-2 (source : plateforme CMABio3, Université de Caen-Normandie).

Les entérocoques sont des micro-organismes ubiquitaires de l'environnement et de la flore intestinale de nombreux animaux, en particulier de l'homme et autres mammifères (Devriese *et al.*, 2006; Flahaut *et al.*, 1997). La présence de certaines espèces dans l'environnement, comme *E. faecalis* et *E. faecium*, est considérée comme le signe d'une contamination fécale (Devriese *et al.*, 2006; Wheeler *et al.*, 2002). L'abondance et la nature des espèces d'entérocoques présentes au sein du tractus gastro-intestinal diffèrent en fonction des animaux (Devriese *et al.*, 2006). Chez l'homme, *E. faecalis* et *E. faecium* sont les entérocoques majoritairement présents et leurs proportions dans l'intestin varient en fonction de nombreux facteurs, tels que le compartiment intestinal, l'âge et l'alimentation (Devriese *et al.*, 2006; Flahaut *et al.*, 1997). Chez un individu sain, ils représentent une petite portion du microbiote intestinal (<0,1%) (Arias and Murray, 2012; Devriese *et al.*, 2006; Lebreton *et al.*, 2014). Enfin, certaines souches sont utilisées comme probiotiques ou dans l'élaboration de produits alimentaires, mais le potentiel pathogène des entérocoques remet en cause leurs applications pharmaceutiques et industrielles (Foulquié Moreno *et al.*, 2006; Franz *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2020).

I.1.2 Pathogénicité des entérocoques

Bien que les entérocoques soient des organismes commensaux de l'homme, ils s'avèrent également être des pathogènes opportunistes hors du compartiment intestinal, touchant principalement des personnes sensibles, comme les nourrissons, les personnes immunodéprimées et les porteurs de matériels médicaux invasifs comme les cathéters (Devriese *et al.*, 2006; Flahaut *et al.*, 1997; Murray, 1990). Ainsi, en sus de leur faculté à traverser la barrière intestinale (Wells *et al.*, 1990), les entérocoques possèdent différents facteurs de pathogénicité leur permettant notamment d'adhérer aux cellules de l'hôte et aux matériels inertes, de résister aux protocoles de désinfections et de coloniser efficacement de nouveaux hôtes. De plus, ils peuvent former des biofilms augmentant ainsi leur résistance, notamment aux antibiotiques et à la phagocytose (Arias and Murray, 2012; García-Solache and Rice, 2019; Van Tyne and Gilmore, 2014). Une des clés de leur pouvoir infectieux repose sur une impressionnante adaptabilité à leur environnement, leur permettant de survivre dans des conditions hostiles, notamment dans le milieu hospitalier. Cette persistance dans l'environnement leur permet de se hisser comme pathogène de première envergure dans les infections associées aux soins liées également en grande partie à leurs résistances intrinsèques et acquises à de nombreux antibiotiques fréquemment utilisés en clinique (Arias and Murray, 2012; Devriese *et al.*, 2006; García-Solache and Rice, 2019; Gilmore *et al.*, 2013; Jett *et al.*, 1994; Selleck *et al.*, 2019).

I.1.3 Infections à entérocoques et antibiorésistance

Le genre *Enterococcus* représente le 2^{ème} genre pathogène le plus recensé dans les infections associées aux soins (IAS) entre 2015 et 2017 aux Etats-Unis (14,8% des IAS) (Figure 3). Les espèces majoritairement responsables sont *E. faecalis* (7,9% des IAS) et *E. faecium* (3,8% des IAS) (Weiner-Lastinger *et al.*, 2019). En Europe, *E. faecalis* et *E. faecium* représentent respectivement les 4^{ème} (6,8%) et 7^{ème} (4,5%) espèces bactériennes les plus fréquemment signalées au EARS-Net (ECDC, 2020). En effet, ces deux espèces représentent à elles seules 90 à 95% des infections à entérocoques (Arias and Murray, 2012; Gordon *et al.*, 1992; Jones *et al.*, 1997). Ces pathologies se manifestent principalement par des infections intra-abdominales et du tractus urinaire, des endocardites et des bactériémies (Devriese *et al.*, 2006; Flahaut *et al.*, 1997; Murray, 1990). Deux facteurs de risque principaux sont à l'origine de ces infections. D'une part, le port de matériels médicaux invasifs est à risque car ceux-ci

peuvent être colonisés par des microorganismes. D'autre part, un traitement antibiotique, en particulier pour les antibiotiques inefficaces sur les entérocoques, favorise la sélection de ces pathogènes opportunistes et prédispose donc à ces infections (Devriese *et al.*, 2006; Murray, 1990).

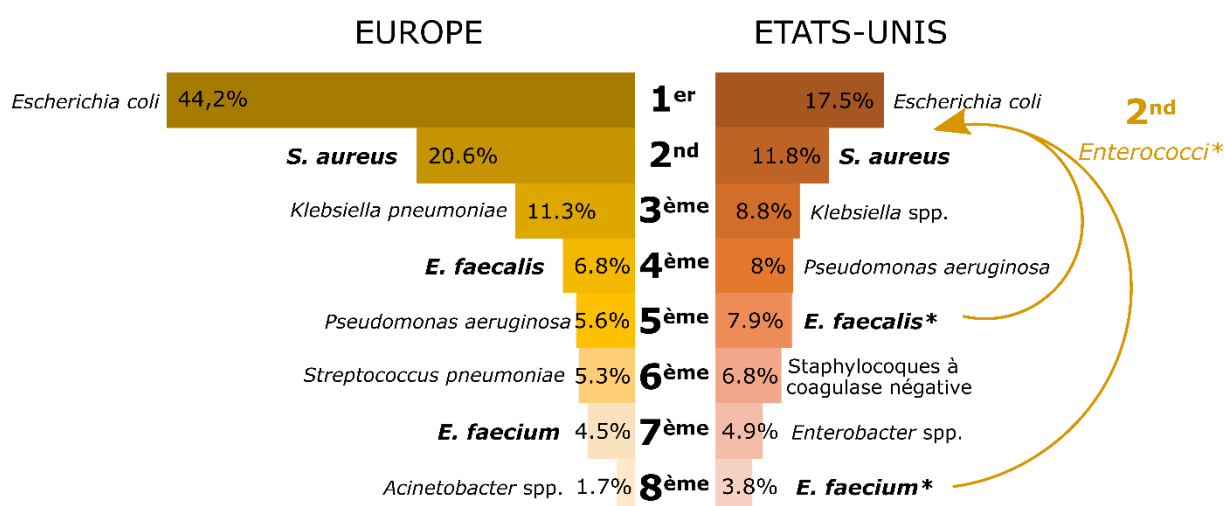


Figure 3 : Classement et répartition des 8 pathogènes les plus fréquemment signalés en Europe et aux Etats-Unis (d'après ECDC, 2020; Weiner-Lastinger *et al.*, 2019).

Le classement est issu des données collectées sur 30 pays par le réseau européen de surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques (EARS-Net) en 2019. Les données des États-Unis représentent les infections associées aux soins chez l'adulte entre 2015 et 2017 rapportées au réseau national de sécurité des soins de santé (NHSN) du centre de contrôle et de prévention des maladies (CDC).

*Lors d'une analyse par genre bactérien, les entérocoques se classent au 2nd rang des pathogènes les plus fréquemment reportés aux Etats-Unis (proportions des autres entérocoques : 3,1 %).

Les entérocoques ne sont pas des pathogènes hautement virulents (Miller *et al.*, 2020). Ainsi, au-delà de la prévalence des infections à entérocoques, l'enjeu mondial de ces infections concerne leurs résistances aux antibiotiques, notamment à la vancomycine. La majorité des entérocoques résistants à la vancomycine (VRE) recensés en clinique appartient à l'espèce *E. faecium*, expliquant son signalement comme pathogène prioritaire pour la recherche et le développement de nouvelles approches thérapeutiques (Ayobami *et al.*, 2020; Cattoir and Leclercq, 2013; Tacconelli *et al.*, 2018; Weiner-Lastinger *et al.*, 2019). Le taux de VRE chez *E. faecium* n'a cessé d'augmenter durant la dernière décennie, passant d'un taux de 8,1% des isolats sanguins en Europe en 2012 à 18,3% en 2019 (Ayobami *et al.*, 2020; ECDC, 2020). Ce taux de prévalence dépend du pays étudié, en particulier en Europe où ils varient de 0% (Finlande) à 50% (Chypre) (Figure 4) (ECDC, 2020). Ces taux s'avèrent encore plus critiques en Australie (47%) et aux Etats-Unis (entre 55,6 et 93,2% des IAS entre 2015 et 2017)

(Ayobami *et al.*, 2020; Weiner *et al.*, 2016; Weiner-Lastinger *et al.*, 2019). En plus de la résistance à la vancomycine, leur émergence comme pathogène de premier plan repose sur leur résistance à de multiples antibiotiques appartenant à des classes diverses (Tableau 1). Ces résistances sont de deux types : une résistance naturelle et une résistance acquise transférable entre bactéries par des éléments génétiques mobiles (MGEs) (Foulquié Moreno *et al.*, 2006; Leclercq, 1997).

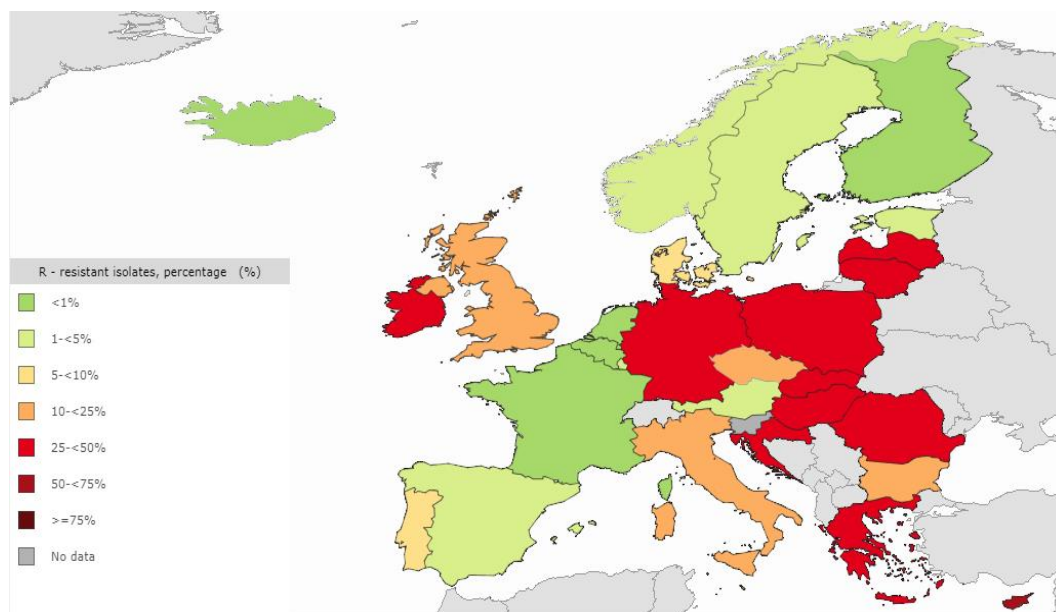


Figure 4 : Pourcentage d'isolats d'*E. faecium* résistants à la vancomycine à travers l'Europe en 2019 (source : <https://atlas.ecdc.europa.eu/> ; ECDC, 2020).

Les bactéries du genre *Enterococcus* sont intrinsèquement résistantes à de nombreux antibiotiques appartenant à différentes classes comme les β -lactamines, les aminoglycosides et les lincosamides mais aussi à des inhibiteurs de la voie métabolique des folates (le Sulfaméthoxazol-triméthoprine) (Tableau 1). (Flahaut *et al.*, 1997; Leblanc, 2006; Leclercq, 1997). La résistance aux β -lactamines touche les différentes sous-familles de cette classe, comme les isoxazolpénicillines et les monobactames, avec une résistance généralement de bas niveau (Foulquié Moreno *et al.*, 2006; Leblanc, 2006; Murray, 1990). Pour les céphalosporines, à l'exception de celles de dernières générations (céftaroline et céftobiprole), la résistance intrinsèque des entérocoques est très forte, rendant ces antibiotiques totalement inefficaces contre les entérocoques (Pericás *et al.*, 2015).

Tableau 1 : Résistances des entérocoques (d'après Devriese et al., 2006; Falagas et al., 2019; Leblanc, 2006; Pericás et al., 2015; Rand et al., 2007; Rosselli Del Turco et al., 2020).

Mécanisme de résistance		Espèces concernées
Résistances intrinsèques (résistances faibles)		
Inhibiteurs de l'enveloppe bactérienne		
β-lactamines*	Présence de PBPs de faible affinité	Enterococcus spp.
Inhibiteurs de la synthèse protéique		
Macrolides et apparentés		
Lincosamides	Imperméabilité à l'antibiotique	Enterococcus spp.
Aminoglycosides	Imperméabilité à l'antibiotique	Enterococcus spp.
Inhibiteurs de la synthèse de l'acide folique		
Sulfamides	Utilisation de folates exogènes	Enterococcus spp.
Résistances acquises (résistances fortes)		
Inhibiteurs de l'enveloppe bactérienne		
β-lactamines	Production de β-lactamases (blaZ)	E. faecalis E. faecium (rare)
	Surproduction de PBPs de faible affinité (pbp5)	E. faecium
Fosfomycine	Enzymes de détoxification (fosB)	Enterococcus spp.
Lipopeptides		
Daptomycine	Altération de la fluidité et de la charge membranaire (liaFSR, gdpD, cls, yycFG ou yycHIJ)	E. faecalis E. faecium
Glycopeptides	Modification du précurseur du peptidoglycane cible (opérons van)	E. faecalis (rare)
		E. faecium
Inhibiteurs de la synthèse protéique		
Aminoglycosides	Enzymes de détoxification (ant ou aph)	Enterococcus spp.
	Altération du site ribosomique	
Macrolides et apparentés	Méthylation d'une adénosine de l'ARN23S (erm)	Enterococcus spp.
	Pompes à efflux (mef)	
Phénicolés		
Chloramphénicol	Enzymes de détoxification (gène cat)	Enterococcus spp.
Cyclines	Efflux actifs (tetK ou tetL)	Enterococcus spp.
	Protection du ribosomes (tetN ou tetM)	
Oxazolidones	Réduction de l'affinité de l'ARNr23S par mutation ou par méthylation (rplC/rplD, cfr)	E. faecalis E. faecium
	ou ABC-transporteur (optrA)	
Inhibiteur de la synthèse d'acides nucléiques		
Quinolones	Altération des sous-unités de la gyrase ou de la topoisomérase (gyrA, gyrB ou parC)	E. faecalis
	Pompes à efflux ou protection de la gyrase (gènes qnr-like)	E. faecalis E. faecium
Rifampicine	Mutation de l'ARN polymérase (rpoβ)	Enterococcus spp.

*Pour les céphalosporines, la résistance acquise est forte (Exception : sensibilité à la céfobiprole et à la ceftaroline pour *E. faecalis* et *E. faecium* (études *in vitro*))

Par ailleurs, de nombreuses résistances acquises ont été décrites chez les entérocoques, en particulier ceux d'intérêt clinique, leur conférant une résistance à des antibiotiques largement utilisés en médecine humaine (Tableau 1). Ces résistances concernent notamment les lipopeptides (daptomycine), les aminoglycosides (gentamicine), les glycopeptides

(vancomycine et téicoplanine), les macrolides, les phénicolés, les cyclines (tigécycline) et les oxazolidones (linézolide) (Foulquié Moreno *et al.*, 2006; Leblanc, 2006; Miller *et al.*, 2020; Pericás *et al.*, 2015; Rosselli Del Turco *et al.*, 2020). De plus, les entérocoques peuvent acquérir une résistance aux β -lactamines plus forte que celle d'origine intrinsèque (Flahaut *et al.*, 1997; Leblanc, 2006). Les mécanismes impliqués sont détaillés dans la partie II.4. Les résistances aux différentes classes d'antibiotiques peuvent exister indépendamment, mais certaines souches d'entérocoques peuvent en cumuler plusieurs (Ayobami *et al.*, 2020; Leclercq, 1997). La multiplicité des résistances est corrélée à une augmentation de la morbidité et de la mortalité dues aux infections (Ahmed and Baptiste, 2018). Ainsi, face à la sévérité et la chronicité des infections à entérocoques et à l'émergence croissante de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques les plus courants et ceux de derniers recours, les options de traitement se réduisent drastiquement.

I.1.4 Traitements des infections à entérocoques : vers une impasse thérapeutique

La majorité des infections à entérocoques est traitée initialement par monothérapie (Devriese *et al.*, 2006). La pierre angulaire de ces traitements est l'ampicilline. Néanmoins, la tolérance d'*E. faecalis* et la forte résistance d'*E. faecium* pour les β -lactamines conduisent très régulièrement à des échecs thérapeutiques, notamment pour les infections sévères à entérocoques comme les bactériémies et les endocardites (Munita *et al.*, 2012). Le défi principal pour le traitement des entérocoques est dû aux profils de résistances intrinsèques et acquises de ces bactéries (Lebreton *et al.*, 2017). Ainsi, bien qu'*E. faecalis* et *E. faecium* appartiennent au même genre bactérien, les infections à ces deux pathogènes nécessitent souvent des approches thérapeutiques différentes (Munita *et al.*, 2012).

Pour des infections sans complication à *E. faecium*, l'utilisation de vancomycine est préconisée à condition que la prévalence locale des VRE soit faible. Dans le cas contraire, ou en cas d'une infection par un VRE, le linézolide ou la daptomycine peuvent constituer une solution thérapeutique (Rosselli Del Turco *et al.*, 2020). Pour les infections sévères à entérocoques, les combinaisons d'antibiotiques en fortes doses s'avèrent nécessaires (Beganovic *et al.*, 2018; Rosselli Del Turco *et al.*, 2020). Les premières combinaisons utilisées, et approuvées cliniquement, associent une β -lactamine et un aminoglycoside, comme l'ampicilline et la gentamicine (Devriese *et al.*, 2006; Leblanc, 2006). Cependant, les résistances acquises contre les aminoglycosides ont rendu de moins en moins efficace cette

combinaison synergique (Leblanc, 2006). Désormais, pour les infections sévères à *E. faecalis*, la combinaison la plus recommandée est l'association de deux β -lactamines, l'ampicilline et la ceftriaxone. Pour les infections sévères à *E. faecium*, l'addition de gentamicine et de vancomycine est favorisée. En cas d'infections sévères aux VRE, le traitement initial de daptomycine ou de linézolide peut-être complété par un second antibiotique synergique, comme une β -lactamine ou de la gentamicine (Munita *et al.*, 2012; Rosselli Del Turco *et al.*, 2020).

Malgré les dernières avancées scientifiques, les options de traitements des infections à entérocoques se réduisent considérablement face à l'émergence rapide de résistances aux antibiotiques y compris ceux de dernier recours (Ahmed and Baptiste, 2018). De plus, les thérapies utilisées pour les infections à entérocoques nécessitent des traitements de longue durée et de fortes concentrations d'antibiotiques. Ces traitements de choc favorisent l'apparition de résistances de la part des entérocoques mais également d'autres bactéries présentes chez le patient. En effet, les déterminants génétiques de la résistance à la vancomycine des VRE (opéron *vanA*) ont pu être retrouvés dans plusieurs isolats cliniques de *S. aureus*. Cette transmission est dramatique car, à l'instar des entérocoques, les traitements des infections *S. aureus* sont également de plus en plus limités et la vancomycine reste un antibiotique de dernière intention face à ces infections. Néanmoins, chaque cas de *S. aureus* résistant à la vancomycine semble encore isolé, et aucun cas de dissémination entre patients n'a pu être identifié (Van Tyne and Gilmore, 2014).

I.2 L'espèce *Staphylococcus aureus*

I.2.1 Caractères généraux de *S. aureus*

Le genre *Staphylococcus* appartient à la famille des Micrococcaceae et compte 52 espèces et 28 sous-espèces (Lee *et al.*, 2018). Parmi ces espèces, différents staphylocoques sont des pathogènes opportunistes chez les animaux et l'homme. L'espèce la plus étudiée est *S. aureus* car elle possède un plus fort pouvoir pathogène et soulève des inquiétudes d'ordre mondial pour les traitements de ses infections. Notons que des staphylocoques blancs, tels que l'espèce *S. epidermidis*, sont également responsables d'infections chez les personnes immunodéprimées ou porteuses de matériels médicaux invasifs (Lee *et al.*, 2018; Lindsay, 2019).

Les staphylocoques sont des bactéries à Gram positif, en forme de coques, d'un diamètre compris entre 0,5 et 1,5 μm , isolés ou organisés en grappe. Ils sont aéro-anaérobies facultatifs, non-sporulants, à catalase positive et oxydase négative. Ils s'avèrent également hautement tolérants à de nombreux stress comme des concentrations élevées en sel et de fortes températures. Les staphylocoques peuvent se différencier entre eux par leur capacité à produire une coagulase (Guo *et al.*, 2020; Harris *et al.*, 2002). Seules 3 espèces sont coagulase positives : *S. intermedius* et *S. hyicus*, deux pathogènes affectant des animaux, et *S. aureus*, un pathogène humain (Harris *et al.*, 2002). De plus, *S. aureus* est très reconnaissable en isolement de par sa production d'un pigment caroténoïde, conférant une couleur dorée (*aureus* en latin) aux colonies (Liu *et al.*, 2005).

Les humains représentent un réservoir naturel de *S. aureus*, bien qu'il puisse également coloniser d'autres mammifères et des oiseaux (Lindsay, 2019; Lowy, 1998). *S. aureus* est une bactérie commensale de la flore humaine, colonisant principalement le nez, la gorge, les aisselles et l'aîne d'une personne en bonne santé. Le portage est en moyenne de 25% de la population mais fluctue de 20 à 40% en fonction de la zone géographique, des caractéristiques de la population et de ses facteurs de risques. Ce portage constitue un facteur aggravant pour le risque de développer une infection à *S. aureus*, en prime de favoriser la dissémination de ce pathogène opportuniste entre les individus (Lee *et al.*, 2018; Lindsay, 2019).

I.2.2 Pathogénicité et infections à *S. aureus*

La pathogénicité de *S. aureus* repose sur la présence de nombreux facteurs de virulence impliqués dans la production de toxines, l'attachement cellulaire, la colonisation, les interactions cellule-cellule ou encore dans l'évasion du système immunitaire (Holden *et al.*, 2004; Lowy, 1998; Turner *et al.*, 2019). *S. aureus* peut provoquer de nombreuses infections diverses chez l'homme, touchant le plus couramment la peau et les tissus mous. Néanmoins, *S. aureus* peut également provoquer des infections plus graves comme des bactériémies, des ostéomyélites, des pneumonies et des endocardites (Lee *et al.*, 2018; Peacock and Paterson, 2015; Turner *et al.*, 2019). Cette bactérie a également été considérée comme responsable de vagues d'intoxications alimentaires (Peacock and Paterson, 2015). Les types d'infections et les facteurs de risques associés varient en fonction de l'origine de la contamination. Trois types d'épidémiologies ont été recensés : les infections associées aux soins (HA, Health-care

Associated), les infections communautaires (CA, Community Associated) et les infections liées aux élevages d'animaux (LA, Livestock Associated) (Lee *et al.*, 2018).

S. aureus possède une capacité extraordinaire d'acquisition de nouveaux traits évolutifs portés par des MGEs, principalement des îlots de pathogénicité, des bactériophages, des cassettes chromosomiques, des transposons et des plasmides, acquis par des transferts horizontaux. Ces MGEs sont à l'origine de nombreux phénotypes, comme un gain ou une perte de virulence, et représentent une source de gènes favorisant l'impressionnante adaptabilité de *S. aureus* à son environnement mais également une source majeure de facteurs de virulence. Ces caractéristiques ont participé à son émergence comme pathogène de premier rang au niveau mondial (Holden *et al.*, 2004; Turner *et al.*, 2019).

I.2.3 Résistances aux antibiotiques et traitements de *S. aureus*

En plus d'être la 2^{ème} espèce pathogène la plus fréquemment reportée par l'EARS-Net en Europe et dans les IAS aux États-Unis (Figure 3), l'émergence de souches multi-résistantes pose un réel problème de santé publique. Le développement de traitements thérapeutiques efficaces constitue donc un véritable défi (ECDC, 2020; Turner *et al.*, 2019; Weiner-Lastinger *et al.*, 2019). En effet, l'acquisition successive de gènes de résistance a grandement influencé et compliqué l'évolution des traitements des infections à *S. aureus* (Foster, 2019; Turner *et al.*, 2019). Cette problématique concerne notamment l'émergence de *S. aureus* résistant à la méticilline (MRSA) et de *S. aureus* résistant à la vancomycine de manière intermédiaire (VISA) ou complète (VRSA), classés en priorité élevée par l'OMS (Figure 1) (Foster, 2019; Tacconelli *et al.*, 2018). Cependant, *S. aureus* a également acquis des résistances à d'autres classes d'antibiotiques, portées majoritairement par des MGEs (Tableau 2) (Foster, 2017; Monaco *et al.*, 2016; Pantosti *et al.*, 2007; Turner *et al.*, 2019).

Les premières souches résistantes aux β -lactamines ont été recensées après l'introduction de la méticilline dans le secteur médical dans les années 1960, puis se sont rapidement répandues mondialement dans les années 1980 et 1990 (Lee *et al.*, 2018; Lindsay, 2019). Le terme de MRSA est toujours employé pour désigner ce phénotype de résistance aux β -lactamines, bien que la méticilline ne soit plus utilisée en santé humaine, remplacée par des pénicillines plus stables et moins toxiques, telle l'oxacilline (Lee *et al.*, 2018).

Tableau 2 : Résistances de *S. aureus* et éléments génétiques mobiles (d'après Foster, 2017; Goldstein, 2014; Monaco et al., 2016; Muylaert and Mainil, 2013; Pantosti et al., 2007; Turner et al., 2019).

Mécanismes (déterminants)		Localisation
Inhibiteurs de l'enveloppe bactérienne		
β-lactamines		
β-lactamines sauf isoxazoles stables	Production de β-lactamase (<i>blaZ</i>)	Tn / P _L
β-lactamines (dont oxacilline) [MRSA]	Modification de la cible (PBP2a ; <i>mecA</i> , <i>mecB</i> ou <i>mecC</i>)	SCC _{mec}
Glycopeptides		
[VRSA]	Modification structurelle du peptidoglycane (opéron <i>vanA</i>)	Tn (issu des VRE)
[VISA]	Mutation de gènes liés à la structure du peptidoglycane (GraSR, WalKR, VraSR, etc.)	Chr
Lipopeptides		
Daptomycine	Mutations de gènes liés à la protection de l'enveloppe (<i>mprF</i> , <i>agr</i> , <i>ycy</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoC</i> , etc.)	Chr
Inhibiteurs de la synthèse protéique		
Aminoglycosides	Enzymes de détoxification (<i>aacA-aphD</i> , <i>aadD</i> , <i>ant(4')</i> ou <i>ant(9)</i>)	Tn / P _L / SCC _{mecII}
Acide fusidique	Mutation des EF-G (<i>FusB</i> , <i>FusC</i> , <i>FusA</i>)	P _L / SCC _{mec} / Chr
Macrolides et apparentés		
Macrolides vrais	ARN méthyltransférase (<i>ermA</i> / <i>ermC</i>) ; Protection du ribosome (<i>msr</i>)	Tn / P _L
Streptogramines A	ARN méthyltransférase (<i>Cfr</i>) ; Protection du ribosome (<i>Vga</i> , <i>Lsa</i> , <i>Sal</i>) ; Modification de l'antibiotique (<i>Vat</i>)	P _L / Chr
Streptogramines B	ARN méthyltransférase (<i>Erm</i>) ; Protection du ribosome (<i>Msr</i>) ; Modification de l'antibiotique (<i>Vgb</i>)	Tn / P _L
Lincosamides	ARN méthyltransférase (<i>Erm</i> , <i>Cfr</i>) ; Protection du ribosome (<i>Vga</i> , <i>Lsa</i> , <i>Sal</i>)	Tn / P _L / Chr
Phénicolés		
Florfenicol	ARN méthyltransférase (<i>Cfr</i>) ; Protection du ribosome (<i>OptrA</i>) ; Transporteur (efflux) (<i>Fex</i>)	Tn / P _L
Chloramphénicol	Acétyltransférase (<i>cat</i>)	P _L
Cyclines		
Tétracycline	Transporteur (efflux) (<i>tetA(K)</i> , <i>tetA(L)</i>) ; Protection du ribosome (<i>tetO/M</i>)	P _L / SCC _{mecIII} / Tn
Tigécycline	Mutation de gènes répresseurs (<i>MepA</i>) ; Mutation de l'ARNr10S (<i>rpsJ</i>)	Chr
Oxazolidones		
Linézolide	ARN méthyltransférase (<i>Cfr</i>) ; Protection du ribosome (<i>OptrA</i>) ; Mutation de l'ARNr23S (Protéine L3, L4)	P _L / Chr
Mupirocine	Mutation de la cible (faible résistance) (<i>IleS</i>) ; Acquisition enzyme non-sensible (<i>MupA</i>)	P _L
Inhibiteurs de la synthèse d'acides nucléiques		
Quinolones		
Fluoroquinolones	Mutation des topoisomérases et la gyrase (<i>ParC</i> , <i>GyrB</i>) ; Transporteurs (Forte résistance) (<i>NorA</i> , <i>NorB</i> , <i>NorC</i>)	Chr
Rifampicine	Mutation de l'ARN polymérase (<i>rpoβ</i>)	Chr
Antibiotiques cytostatiques		
Bléomycine	Protéine liant la bléomycine (<i>bleO</i>)	P _L / SCC _{mec}
Inhibiteurs de la synthèse de l'acide folique		
Sulfonamides	Mutation de la cible (DHPS)	Chr
Triméthoprim	Mutation de la cible (<i>dhfrB</i>) ; Acquisition d'enzyme non-sensible (<i>dhfrA</i> , <i>dhfrAK</i>)	Chr / Tn / P _L

Tn : transposon ; P_L : plasmide ; Chr : chromosome

Les MRSA ont représenté de 40,5% à 77,6% des IAS à *S. aureus* entre 2015 et 2017 aux Etats-Unis (Weiner-Lastinger *et al.*, 2019). En Europe, le taux d'isolats identifiés comme des MRSA est compris entre 1,1% (Norvège) et 46,7% (Roumanie) (Figure 5) (ECDC, 2020). Deux phénotypes sont caractérisés dans la résistance aux β -lactamines chez *S. aureus*. Leurs mécanismes sont détaillés en partie II.4. Les MRSA sont souvent résistants à de multiples classes d'antibiotiques, compliquant considérablement les possibilités de traitements (Lee *et al.*, 2018).

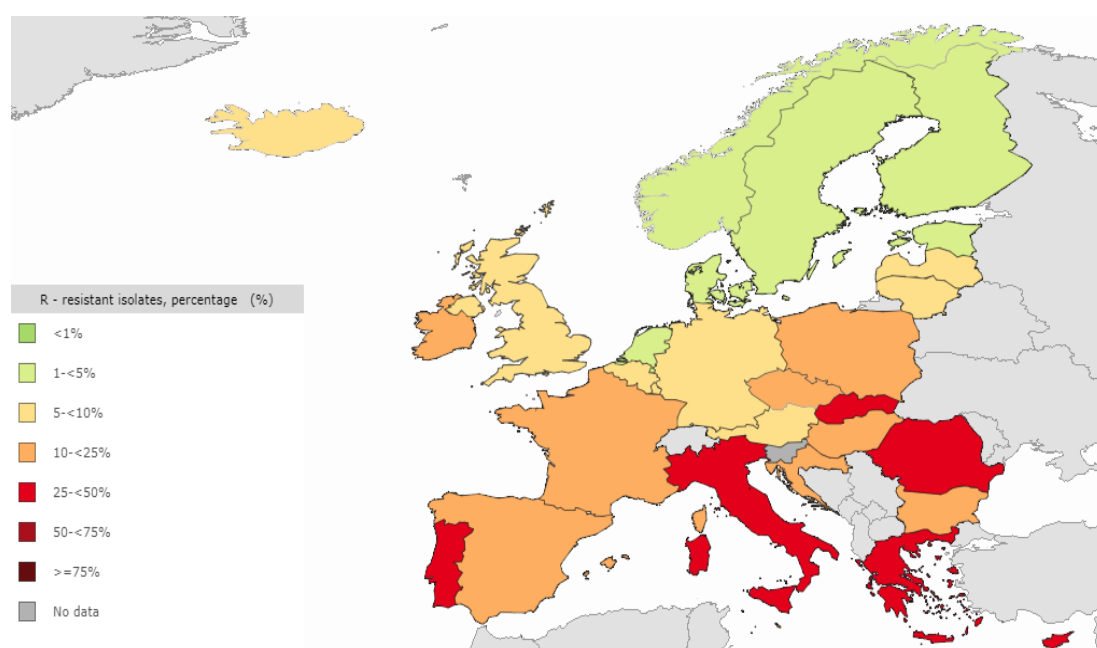


Figure 5 : Pourcentage d'isolats de *S. aureus* résistants aux β -lactamines à travers l'Europe en 2019 (source : <https://atlas.ecdc.europa.eu/> ; ECDC, 2020).

La résistance aux glycopeptides concerne principalement la vancomycine, largement utilisée aux USA, mais également la téicoplanine, utilisée en Europe (Lee *et al.*, 2018; Turner *et al.*, 2019). Ces résistances reposent sur un transfert des déterminants génétiques de résistances des entérocoques (VRSA) ou sur l'acquisition de mutations dans des gènes impliqués dans la structure du peptidoglycane (VISA) (Lee *et al.*, 2018; Pantosti *et al.*, 2007; Tacconelli *et al.*, 2018; Turner *et al.*, 2019). De plus, les MRSA avec un seuil de résistance très élevé s'avèrent également tolérants à la vancomycine (Lee *et al.*, 2018; Turner *et al.*, 2019).

La majorité des experts s'accorde sur le fait que les β -lactamines constituent le traitement optimal des infections staphylococciques, y compris celles invasives (David and Daum, 2017; Farha *et al.*, 2013; Fisher and Mobashery, 2020; Lee *et al.*, 2018). Ainsi, les MRSA, pour lesquels les β -lactamines sont inefficaces, sont traités à l'aide de thérapies moins efficaces, plus chères ou toxiques (Liu *et al.*, 2011; Molina *et al.*, 2020; Turner *et al.*, 2019). Les antibiotiques de première ligne pour lutter contre les MRSA sont la vancomycine et la daptomycine (Molina *et al.*, 2020; Turner *et al.*, 2019). Cependant, face aux échecs thérapeutiques de plus en plus courants avec ces traitements, liés notamment aux VISA et à une résistance croisée entre la vancomycine et la daptomycine, de nouvelles stratégies sont nécessaires (Molina *et al.*, 2020).

De nouvelles molécules ont été approuvées par l'agence américaine des produits alimentaire et médicamenteux (FDA) pour tenter de traiter ces infections réfractaires, comme la tigécycline, la télavancine ou la ceftaroline (David and Daum, 2017; Lee *et al.*, 2018; Rodvold and McConeghy, 2014; Turner *et al.*, 2019). Néanmoins, des résistances à ces antibiotiques ont d'ores et déjà été observées dans des souches de MRSA, VRSA ou VISA (Foster, 2017; Karlowsky *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2018; Pantosti *et al.*, 2007; Turner *et al.*, 2019). Face à ces difficultés de thérapies, la combinaison de molécules létales, ciblant différents composés de la paroi bactérienne, semble représenter une nouvelle approche (Santa Maria *et al.*, 2014). Plusieurs traitements sont envisagés comme l'association d'une β -lactamine (oxacilline, nafcilline, ceftaroline ou flucloxacilline) et de vancomycine ou de daptomycine mais également la combinaison de vancomycine et de rifampicine ou de gentamicine (Lee *et al.*, 2018; Molina *et al.*, 2020; Turner *et al.*, 2019). Ces thérapies combinatoires ont pour but d'outrepasser les résistances en augmentant l'effet bactéricide du traitement (Lee *et al.*, 2018). Les effets synergiques *in vitro* sont très prometteurs, notamment ceux issus de la combinaison β -lactamine/vancomycine provoquant une défaillance de la synthèse de la paroi conduisant à la mort bactérienne face aux MRSA, VRSA et VISA (Cattoir and Leclercq, 2013; Tran and Rybak, 2018). Cependant, le manque de preuves cliniques de l'efficacité de ces combinaisons rend difficile la justification de leur utilisation, en particulier pour les combinaisons ayant de forts effets néphrotoxiques (Lee *et al.*, 2018; Molina *et al.*, 2020).

CHAPITRE II : LA RÉSISTANCE AUX BÊTA-LACTAMINES

CHEZ LES BACTÉRIES À GRAM POSITIF

L'activité des antibiotiques peut être divisée en 5 catégories : l'inhibition de la synthèse de la paroi, l'altération de la membrane plasmique, l'inhibition de la synthèse protéique, l'inhibition de la synthèse d'acides nucléiques, et l'action antagoniste contre un autre métabolisme (Fernandes *et al.*, 2013). Les β -lactamines, ciblant la synthèse de la paroi bactérienne, sont des antibiotiques majeurs et indispensables à notre arsenal thérapeutique. Ils sont considérés comme des antimicrobiens d'importance critique en médecine humaine, notamment les céphalosporines de 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} générations, ou d'importance élevée pour les céphalosporines de 1^{ère} et 2^{ème} générations et les pénicillines anti-staphylococciques (Tableau 3) (AGISAR, 2019). Cependant leur utilisation intensive, et parfois excessive, a permis la sélection de nombreuses bactéries résistantes à ces antibiotiques. L'émergence de ces souches résistantes est un problème de santé mondiale majeur. En effet, selon la liste des pathogènes multirésistants prioritaires pour la recherche de l'OMS, plus de 50% des résistances ciblées concernent des β -lactamines (Figure 1) (Tacconelli *et al.*, 2018).

II.1 Structure et classification des β -lactamines

Depuis la découverte du premier antibiotique, la pénicilline, par Alexander Fleming en 1928, de nombreuses β -lactamines d'origine naturelle ou issues de la synthèse chimique ont été décrites (Fernandes *et al.*, 2013; Koch, 2003). Cette famille d'antibiotiques s'est étoffée et un classement basé sur leur structure a été établi. Les β -lactamines sont dotées d'un noyau central commun (Figure 6), constitué d'un cycle amide de 4 atomes nommé anneau β -lactame. En fonction des molécules qui y sont associées, on distingue 5 sous-familles de β -lactamines : les pénames, les céphèmes, les carbapénèmes, les pénèmes et les monobactames (Cavallo *et al.*, 2004; Fernandes *et al.*, 2013; Lima *et al.*, 2020).

Les pénames constituent la plus grande sous-famille de β -lactamines, incluant les pénicillines et leurs dérivés tels que la méticilline et l'oxacilline. La méticilline a été la première molécule antibiotique semi-synthétique, avec l'ajout de groupements méthoxy au noyau β -lactame. Ces substitutions engendrent un encombrement stérique, gênant l'accès à l'anneau β -lactame limitant son hydrolyse par des β -lactamases. L'oxacilline possède également des

modifications permettant d'augmenter la stabilité de l'antibiotique contre l'hydrolyse. Néanmoins, ce gain de stabilité entraîne généralement une diminution de l'efficacité des β -lactamines comparativement à leurs molécules parentes (Cavallo *et al.*, 2004; Fernandes *et al.*, 2013; Kong *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2020).

Tableau 3 : Liste des antibiotiques d'importance critique pour la médecine humaine (source : flyer de la 6^{ème} révision (2018) du rapport du comité d'experts de la surveillance intégrée de la résistance aux antibiotiques ; AGISAR, 2019).

Résumé de la catégorisation et du niveau de priorité des antibiotiques considérés comme étant d'importance critique, hautement importants ou importants.

Antimicrobiens médicalement importants

D'importance critique

Classe d'antimicrobiens		Critères / Facteur de priorité (Oui=●)				
ANTIMICROBIENS D'IMPORTANCE CRITIQUE		C1	C2	P1	P2	P3
Les plus prioritaires						
Les plus prioritaires	Céphalosporines (3 ^e , 4 ^e et 5 ^e générations)	●	●	●	●	●
	Glycopeptides	●	●	●	●	●
	Macrolides et kétolides	●	●	●	●	●
	Polymyxins	●	●	●	●	●
	Quinolones	●	●	●	●	●
Hautement prioritaires						
	Aminosides	●	●		●	●
	Ansamycines	●	●	●	●	
	Carbapénèmes et autres pénèmes	●	●	●	●	
	Glycylcyclines	●	●	●		
	Lipopeptides	●	●			
	Monobactames	●	●			
	Oxazolidinones	●	●	●		
	Pénicillines (anti-Pseudomonas)	●	●		●	
	Pénicillines (aminopénicillines)	●	●		●	●
	Pénicillines (aminopénicillines avec inhibiteurs de β-lactamases)	●	●		●	●
	Dérivés d'acide phosphonique	●	●	●	●	
	Médicaments antituberculeux / autre infections mycobactériennes	●	●	●	●	

Hautement importants

ANTIMICROBIENS HAUTEMENT IMPORTANTS		C1	C2	P1	P2	P3
	Phénicols		●	NA		
	Céphalosporines (1 ^e et 2 ^e générations) et céphamycines		●			
	Lincosamides		●			
	Pénicillines (amidinopénicillines)		●			
	Pénicillines (antistaphylococciques)		●			
	Pénicillines (spectre étroit)		●			
	Acides pseudomoniques		●			
	Riminofenazines	●				
	Stéroïdes antibactériens		●			
	Streptogramines		●			
	Sulfamidés, inhibiteurs de la dihydrofolate réductase et associations		●			
	Sulfones	●				
	Tétracyclines	●				

Importants

ANTIMICROBIENS IMPORTANTS		C1	C2	P1	P2	P3
	Aminocyclitols			NA		
	Peptides cycliques					
	Dérivés du nitrofurane					
	Nitroimidazoles					
	Pleuromutilines					

C1

Critère 1

Classe d'antibiotique qui est la seule, ou quasiment la seule, à permettre de traiter des infections humaines graves.

C2

Critère 2

Classe d'antibiotiques utilisée pour traiter des infections humaines dues 1) à des bactéries qui sont d'origine non-humaine mais peuvent être transmises à l'homme, ou 2) à des bactéries qui peuvent acquérir des gènes de résistance d'une source non-humaine.

P1

Facteur de priorité 1

Classe d'antibiotique qui est la seule ou une des rares permettant de traiter des infections humaines sévères, soit présentes chez un grand nombre de patients, soit de façon fréquente chez des patients hospitalisés.

P2

Facteur de priorité 2

Utilisation très fréquente de la classe d'antimicrobiens pour une indication quelconque en médecine humaine ou dans certains groupes à haut risque (par exemple, patients atteints d'infections graves dans les établissements de soins), leur usage risquant de favoriser la sélection de résistance.

P3

Facteur de priorité 3

Classe d'antimicrobiens utilisée dans le traitement d'infections humaines pour lesquelles il existe déjà de nombreuses preuves d'une transmission de bactéries résistantes (par exemple, *Salmonella* non typhoïdique spp. et *Campylobacter* spp.) ou de gènes de résistance (élevée pour *E. coli* et *Enterococcus* spp.) à partir de sources non humaines.

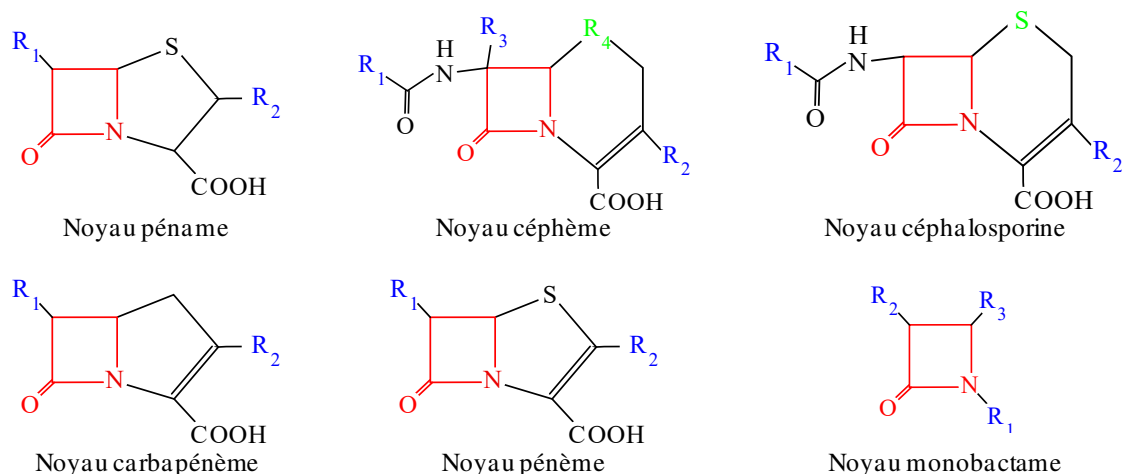


Figure 6 : Structures chimiques centrales des sous-familles de β -lactamines (d'après Cavallo *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2020).

L'anneau central β -lactame est représenté en rouge.

Les céphalosporines sont les antibiotiques les plus importants dans le groupe des céphèmes. Elles sont généralement classées par génération différant par l'étendue de leur spectre antimicrobien, leur stabilité, notamment face aux β -lactamases, leur absorption et leurs effets secondaires (Cavallo *et al.*, 2004; Fernandes *et al.*, 2013; Lima *et al.*, 2020). Depuis les années 1970, les céphalosporines représentent les agents anti-infectieux les plus puissants et les plus utilisés. Les trois dernières générations, de la 3^{ème} à la 5^{ème}, sont même considérées comme des antibiotiques d'importance critique en médecine humaine (Tableau 3) (AGISAR, 2019; Fernandes *et al.*, 2013).

Les carbapénèmes telles que l'imipénème possèdent un large spectre d'activité contre des bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Elles présentent généralement une résistance plus élevée à la majorité des β -lactamases mais sont inactivées par les déshydropeptidases rénales chez l'homme. Ainsi, leur utilisation nécessite la co-administration d'un inhibiteur de peptidases, comme la cilastine.

Les pénèmes, ou thiopénèmes, comme le méropénème, sont des antibiotiques non-naturels issus de l'innovation chimique. Elles possèdent une structure et des activités antimicrobiennes très similaires aux carbapénèmes. Leur principale différence repose sur leur résistance aux dipeptidases des mammifères (Cavallo *et al.*, 2004; Fernandes *et al.*, 2013; Lima *et al.*, 2020).

Les monobactames sont généralement efficaces sur les bacilles à Gram négatif et inefficaces contre les bactéries à Gram positif ou anaérobies (Fernandes *et al.*, 2013; Lima *et al.*, 2020). Actuellement, le seul antibiotique prescrit de cette sous-famille est l'aztréonam, ayant un spectre d'activité contre *Pseudomonas aeruginosa* (Cavallo *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2020). Cependant, l'utilisation de monobactames a été montrée comme facteur de risque pour le développement de surinfections à entérocoques et staphylocoques (Fernandes *et al.*, 2013).

II.2 Les PBPs : cibles des β -lactamines

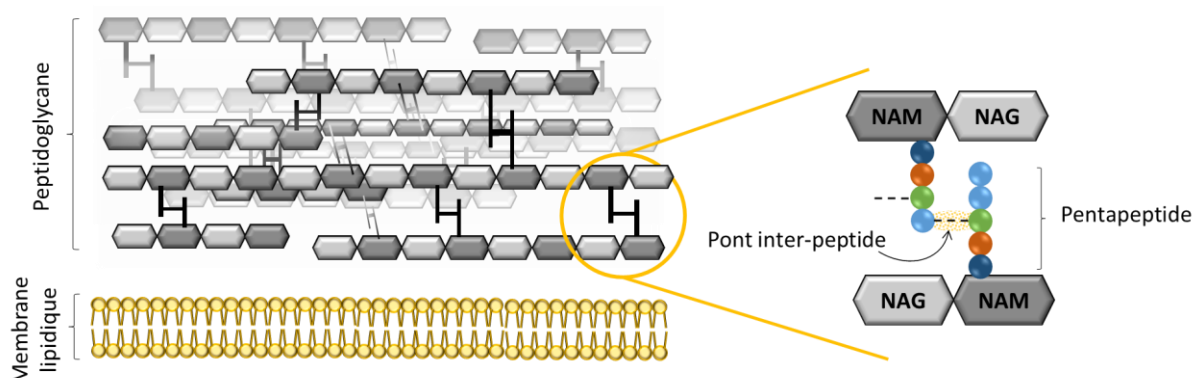
II.2.1 Nature et rôles des PBPs

Les β -lactamines ciblent les protéines impliquées dans la synthèse de la paroi bactérienne (Cavallo *et al.*, 2004). Chez les bactéries à Gram positif, la paroi est une structure complexe et épaisse hautement réticulée reposant sur la membrane lipidique (Moyes *et al.*, 2009; Rohde, 2019). Le peptidoglycane, ou muréine, représente la principale structure de cette paroi. Son maillage est composé d'unités répétées de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM) réticulées par des tiges pentapeptidiques (Figure 7). Ces tiges sont reliées entre elles par une liaison covalente, nommée pont inter-peptide dont le type varie en fonction des micro-organismes. La synthèse du peptidoglycane fait appel à un mécanisme dynamique et complexe géré par de nombreuses enzymes. Lors de cette synthèse, la réticulation est une étape clé nécessitant des activités transglycosylase, transpeptidase et carboxypeptidase, assurées par des protéines liant la pénicilline (PBPs, pour Penicillin Binding Proteins) (Miyachiro *et al.*, 2019; Rohde, 2019; Scheffers and Pinho, 2005).

Les PBPs sont des protéines appartenant à la famille des acyl-sérine transférases. La majorité des PBPs est orientée vers la surface extérieure et ancrée dans la membrane par un signal peptide en N-terminal non clivable (Miyachiro *et al.*, 2019). Elles sont classées en deux groupes en fonction de leur masse moléculaire. Les PBPs de faible masse moléculaire (LMW, pour Low-Molecular-Weight) sont des DD-peptidases monofonctionnelles contrôlant ainsi le degré de réticulation du peptidoglycane. Ce sont des endopeptidases, rompant les ponts inter-peptides, ou plus majoritairement des carboxypeptidases limitant la formation de ces ponts (Scheffers and Pinho, 2005). Les PBPs de haute masse moléculaire (HMW, pour High-Molecular-Weight) sont composées de deux modules. Le module en C-terminal constitue le domaine transpeptidase reconnu par les pénicillines. En fonction de l'activité et de la structure

du module en N-terminal, on distingue les HMW-PBPs de classe A avec un domaine catalysant des réactions de transglycosylation, et celles de classe B, dont la fonction du second module n'est pas élucidée. Les HMW-PBPs de classe A sont les seules PBPs bifonctionnelles, ayant ainsi une activité transglycosylase en plus de l'activité transpeptidase commune des PBPs (Miyachiro *et al.*, 2019; Scheffers and Pinho, 2005).

A. Structure globale du peptidoglycane



B. Composition du pentapeptide et du pont inter-peptide

	Pentapeptide	Pont inter-peptide
<i>S. aureus</i>	- L-Ala	(Gly) ₅
	- D-Glu	
<i>E. faecium</i>	- L-Lys	D-Asp
	- D-ala	
<i>E. faecalis</i>	- D-ala	(L-ala) _{2 ou 3}

Figure 7 : Structure et composition de la paroi des bactéries d'étude (d'après Hancock *et al.*, 2014; Navarre and Schneewind, 1999; Pazos and Peters, 2019; Rohde, 2019).

NAG : N-acétylglucosamine ; NAM : acide N-acétylmuramique ; L-Ala : L-alanine ; D-Glu : D-glutamate ; L-Lys : L-lysine ; D-ala : D-alanine ; Gly : Glycine ; D-Asp : D-aspartate.

II.2.2 Diversité des PBPs

La nature et le nombre de PBP présentes, ainsi que leur masse moléculaire, leur concentration dans la cellule et leur sensibilité au β -lactamines, varient au sein des espèces bactériennes (Kong *et al.*, 2010; Scheffers and Pinho, 2005). Le rôle spécifique de chaque PBP n'est pas clairement établi, d'autant que des PBPs avec des fonctions biochimiques redondantes

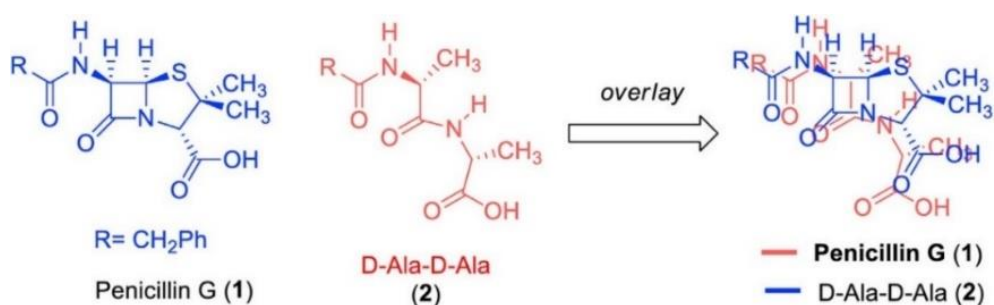
sont observées (Scheffers and Pinho, 2005). Les premières études sur les PBPs ont été réalisées chez la bactérie à Gram négatif *E. coli*. Celle-ci possède 13 PBPs dont au moins 8 sont non-essentiels à sa viabilité (Scheffers and Pinho, 2005). Les PBPs ont été nommées selon leur migration sur un gel SDS-PAGE, conduisant à une nomenclature différente en fonction des micro-organismes (Kong *et al.*, 2010). Les entérocoques possèdent entre 4 et 8 HMW-PBPs et généralement une seule LMW-PBP. Chez *E. faecalis* et *E. faecium*, on recense 3 HMW-PBPs de classe A, 3 HMW-PBPs de classe B et une seule LMW-PBP (Tableau 4) (Hancock *et al.*, 2014; Williamson *et al.*, 1986). *S. aureus* possède une seule HMW-PBP de classe A bifonctionnelle, 2 HMW-PBPs de classe B et une LMW-PBP. Outre ces 4 PBPs natives, *S. aureus* peut acquérir une HMW-PBP optionnelle de classe B (PBP2a) (Scheffers and Pinho, 2005; Sobral and Tomasz, 2019) (voir la partie II.4.2 pour le rôle clé de certaines PBPs dans la résistance aux β -lactamines).

		Activité transpeptidase						
		Activité transglycosylase						
		HMW-PBPs de classe A			HMW-PBPs de classe B			LMW-PBP
<i>S. aureus</i>	Protéines	PBP2			PBP1	PBP3	PBP2a (PBP2')	PBP4
	Gènes	<i>pbp2</i> (<i>pbpB</i>)			<i>pbpA</i>	<i>pbpC</i>	<i>mecA</i> [<i>mecB</i> ou <i>mecC</i>]	<i>pbpD</i> (<i>pbp4</i>)
<i>E. faecalis</i> & <i>E. faecalis</i>	Protéines	PBP1 (PBP1a)	PBP2 (PBP1b)	PBP3 (PBP2a)	PBP(2) (PBPC(B))	PBP2b (PBPA ; PBPA(2b))	PBP5 [PBP4*]	PBP6
	Gènes	<i>ponA</i>	<i>pbpZ</i>	<i>pbpF</i>	<i>pbpB</i>	<i>pbpA</i>	<i>pbp5</i> [<i>pbp4</i> *]	<i>dcaF</i>

II.3 Mode d'action des β -lactamines

Malgré la diversité structurale des β -lactamines, ces antibiotiques possèdent tous le même mode d'action, à savoir l'inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne par l'inactivation des PBP's essentielles à cette biosynthèse. Cette inactivation nécessite le passage de l'antibiotique à travers la paroi afin d'atteindre la PBP cible. Le mécanisme d'action des β -lactamines repose sur l'analogie structurale, géométrique et stéréochimique, entre le noyau β -lactame et l'extrémité D-alanine-D-alanine des pentapeptides précurseurs de la réticulation de la paroi (Figure 8A) (Cavallo *et al.*, 2004; Kong *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2020; Zapun *et al.*, 2008).

A. Chevauchement de la pénicilline G et du dipeptide D-ala-D-ala



B. Mécanisme réactionnel d'acylation d'une PBP par l'anneau β -lactame

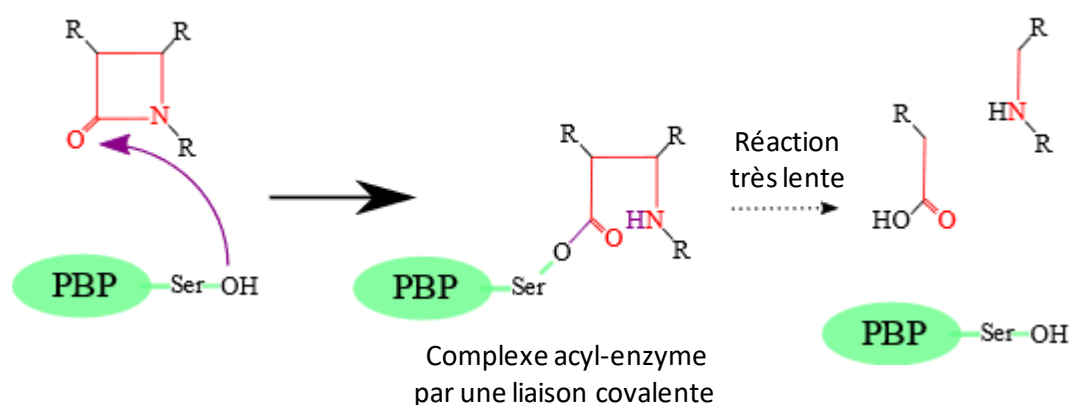


Figure 8 : Mécanisme d'action des β -lactamines (A. source : Lima *et al.*, 2020; B. d'après Cavallo *et al.*, 2004).

La liaison CO-N hautement réactive du noyau β -lactame emprunte la même position au sein du domaine transpeptidase des PBP's que la liaison CO-N du dipeptide D-alanine-D-

alanine. Cette fixation entraîne la rupture du noyau β -lactame, engendrant la formation d'une liaison covalente antibiotique-enzyme (Figure 8B) (Cavallo *et al.*, 2004; Kong *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2020). Le complexe formé est alors hydrolysé très lentement, prévenant ainsi les futures réactions potentielles de la PBP (Zapun *et al.*, 2008). Les β -lactamines agiraient alors comme un inhibiteur suicide, bloquant la synthèse pariétale provoquant l'arrêt de la croissance cellulaire (Cavallo *et al.*, 2004; Kong *et al.*, 2010). De plus, ces antibiotiques peuvent avoir un effet bactéricide en provoquant l'intervention du système autolytique de la bactérie, induisant la lyse du peptidoglycane et la mort de la bactérie (Cavallo *et al.*, 2004).

En faible concentration, les β -lactamines possèdent une affinité préférentielle pour certaines PBPs d'une bactérie (Figure 9) (Cavallo *et al.*, 2004; Farha *et al.*, 2013). Leur action antimicrobienne résulte généralement de l'inhibition simultanée de plusieurs PBPs. L'augmentation de la concentration en antibiotique peut modifier l'activité de certaines β -lactamines, en permettant une meilleure fixation sur des PBPs ayant de plus faibles affinités. Néanmoins, cette augmentation de concentration, au-delà de celle nécessaire pour saturer les PBPs, n'accroît pas l'effet bactéricide du traitement. En effet, la bactéricidie des β -lactamines dépend principalement du temps d'exposition des bactéries à l'antibiotique (Cavallo *et al.*, 2004).

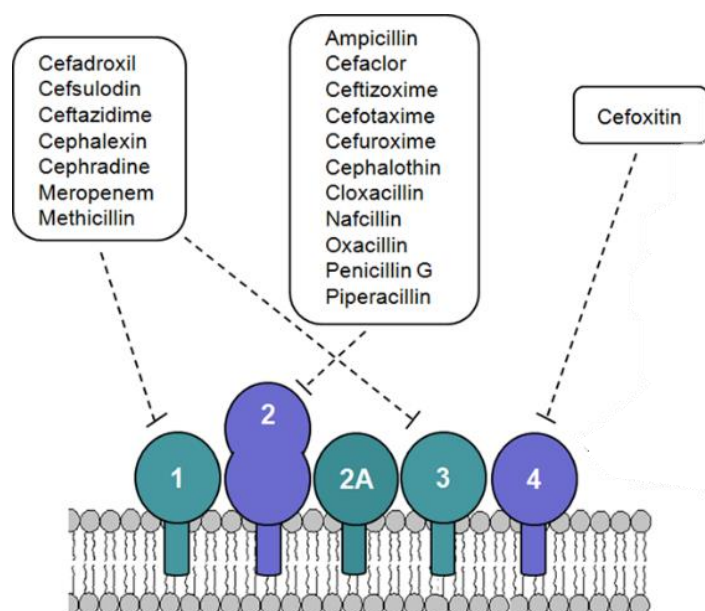


Figure 9 : Affinités préférentielles des β -lactamines vis-à-vis des PBPs de *S. aureus* (modifiée de Farha *et al.*, 2013).

II.4 Mécanismes de résistance aux β -lactamines

Différents types de mécanismes peuvent être mis en place par les bactéries pour lutter contre les β -lactamines. Les résistances par diminution de la quantité d'antibiotiques entrant dans la bactérie sont liées à une altération ou à la perte de porines réduisant la perméabilité de la membrane externe ainsi qu'à la présence de pompes à efflux. Ces 2 types de résistances face aux β -lactamines n'ont été décrits que chez des bactéries à Gram négatif (Cavallo *et al.*, 2004). Un mécanisme de résistance reposant sur une voie métabolique secondaire a pu être observé chez *E. faecium*. Cette résistance s'appuie sur une réticulation différente du peptidoglycane catalysée par des LD-transpeptidases non associées à des PBPs (Leblanc, 2006). Néanmoins, les résistances les plus courantes chez les bactéries à Gram positif sont la résistance enzymatique et la modification de la cible de l'antibiotique (Cavallo *et al.*, 2004; Fernandes *et al.*, 2013).

II.4.1 La résistance enzymatique

La résistance la plus courante aux β -lactamines développée par les bactéries est liée à des enzymes spécifiques appelées β -lactamases. Ces enzymes sont capables de fixer et d'inhiber un antibiotique par hydrolyse du noyau β -lactame. Les β -lactamases peuvent s'avérer plus ou moins spécifiques d'une sous-famille de β -lactamines, comme les céphalosporinases ou les pénicillinases. Ce mode de résistance est surtout fréquent pour les bactéries à Gram négatif capables de produire de nombreuses variétés de ces hydrolases, dont les β -lactamases à spectre étendu (BLSE). Cependant, des souches productrices de β -lactamases ont également été retrouvées chez des bactéries à Gram positif (Cavallo *et al.*, 2004; Fernandes *et al.*, 2013; Lima *et al.*, 2020). En effet, la première β -lactamase a été découverte dans les années 1940 dans des souches de *S. aureus* (Lima *et al.*, 2020). Ainsi, les premières résistances aux β -lactamines observées pour les staphylocoques sont dues à des β -lactamases, codées par le gène plasmidique *blaZ* (Foster, 2019; Koch, 2003). Ce type de résistance est très commun chez *S. aureus* et concernent 80 à 90% des souches isolées (Cavallo *et al.*, 2004). Néanmoins, les pénicillinases des staphylocoques n'affectent pas la méticilline et l'oxacilline et ne sont pas à l'origine de l'émergence mondiale des MRSA (Peacock and Paterson, 2015).

La production de β -lactamases est peu commune chez les entérocoques mais a pu être identifiée dans des souches cliniques d'*E. faecalis* et très rarement dans des souches

d'*E. faecium* (Devriese *et al.*, 2006; Gordon *et al.*, 1992; Leclercq, 1997). Le gène d'origine plasmidique de la pénicillinase des entérocoques est hautement homologue au gène *blaZ* de *S. aureus*. Cette forte homologie laisse suspecter un transfert horizontal du gène entre ces bactéries, même si contrairement à l'enzyme de *S. aureus*, la pénicillinase d'*E. faecalis* est produite constitutivement, probablement dû à l'absence de système de répression (Cavallo *et al.*, 2004; Leclercq, 1997).

La recherche a permis d'atténuer l'impact des souches productrices de pénicillinases par la découverte de composés tels que l'acide clavulanique, le tazobactame et le sulbactame, pouvant lier de manière irréversible les β -lactamases et les inactiver. Des traitements combinant des pénicillines avec ces inhibiteurs ont alors été mis en place en associant notamment une β -lactamine à spectre large, comme l'ampicilline ou l'amoxicilline, et l'acide clavulanique, permettant alors de contrer la résistance enzymatique des bactéries (Cavallo *et al.*, 2004; Fernandes *et al.*, 2013).

II.4.2 La résistance par modification de cible

La modification des PBPs est le mécanisme principal de résistance aux β -lactamines chez les bactéries à Gram positif (Lima *et al.*, 2020). Cette résistance peut faire appel à deux phénomènes. Le premier concerne la modification des PBPs naturelles par l'acquisition d'une mutation dans leur gène. Ce type de mécanisme est la seule cause de résistance aux β -lactamines chez les streptocoques commensaux de la cavité buccale. Une modification des PBP1 et PBP2 chez *S. aureus* a pu être recensée mais n'entraîne qu'une résistance de bas niveau à l'oxacilline. Ce mécanisme de résistance est très rare chez les staphylocoques. Chez ces bactéries et chez les entérocoques, le phénomène de résistance le plus répandu est dû à l'acquisition de gènes codant pour des PBPs supplémentaires présentant une faible affinité pour les β -lactamines (Cavallo *et al.*, 2004).

Chez les entérocoques, la résistance intrinsèque de bas niveau pour les β -lactamines est due à la présence de HMW-PBPs de classe B de faible affinité, capables de prendre le relai de la fonction transpeptidase quand les autres PBPs sont inhibées par un antibiotique (Leclercq, 1997; Zapun *et al.*, 2008). Les résistances plus fortes, en particulier aux céphalosporines, sont liées à la production d'une HMW-PBP de classe B, possédant la plus faible affinité aux β -lactamines (Leclercq, 1997; Sakoulas *et al.*, 2015; Zapun *et al.*, 2008). Cette PBP est nommée

PBP5 chez *E. faecium* et PBP4 chez *E. faecalis*, bien que le terme PBP5 ait également été utilisé chez *E. faecalis* (Moon *et al.*, 2018; Rice *et al.*, 2018; Zapun *et al.*, 2008). Malgré leur caractère essentiel à l'établissement de la résistance, diverses études ont montré qu'elles ne sont pas les seules PBP impliquées mais agiraient en coopération avec d'autres HMW-PBPs de classe A ou B. Cette résistance fait appel à un mécanisme complexe encore méconnu (Arbeloa *et al.*, 2004; Djorić *et al.*, 2020; Rice *et al.*, 2009). Chez des souches cliniques d'*E. faecium*, une surexpression de la PBP5 induit une résistance intermédiaire aux β -lactamines plus élevée que celle intrinsèque. Une très forte résistance implique des substitutions d'acides aminés dans le site de liaison à l'antibiotique de la PBP5, diminuant davantage son affinité vis-à-vis des β -lactamines (Cavallo *et al.*, 2004; Leblanc, 2006; Zapun *et al.*, 2008). Chez *E. faecalis*, la résistance élevée est plus rare. Elle peut être acquise après un traitement prolongé aux β -lactamines et est souvent due à des modifications au sein de la PBP4 (Cavallo *et al.*, 2004; Moon *et al.*, 2018; Rice *et al.*, 2018).

Chez *S. aureus*, l'émergence de souches MRSA est marquée par l'acquisition d'une PBP exogène par les bactéries. Cette PBP, nommée PBP2a ou PBP2', est une HMW-PBP de classe B possédant un site actif peu accessible aux β -lactamines et une résistance à l'acylation par ces antibiotiques. Ces caractères lui confèrent une très faible affinité pour la majorité des β -lactamines (da Costa *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2018; Lindsay, 2019; Peacock and Paterson, 2015). Ainsi, en présence d'antibiotiques bloquant l'activité des autres PBPs natives, la PBP2a est capable de prendre en charge la fonction transpeptidase permettant alors la synthèse de la paroi bactérienne (Cavallo *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2018; Peacock and Paterson, 2015).

L'acquisition de la PBP2a est due à un transfert horizontal d'un MGE, la cassette SCC*mec* (Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*). Cette cassette contient le gène *mecA* codant la PBP2a ainsi que les gènes impliqués dans sa régulation, *mecR1* et *mecR2*. L'ensemble de ces gènes sont nommés le complexe *mec*. La cassette contient également la recombinaise Ccr (Cassette chromosome recombinaise), assurant le transfert de la cassette, et des régions Jointes (régions J) comprenant de nombreux pseudogènes, des copies tronquées de transposons et des gènes pouvant coder d'autres fonctions importantes telles que la résistance à d'autres classes d'antibiotiques ou aux métaux, ainsi que les séquences inversées répétées reconnues par la recombinaise Ccr (Liu *et al.*, 2016; Peacock and Paterson, 2015). Différents variants du gène *mecA*, historiquement nommé *mecR*, ont été identifiés comme *mecC* et *mecB*. Ces variants permettent la synthèse d'autres PBP2a possédant des affinités différentielles aux β -lactamines, offrant généralement une résistance moins élevée que la PBP2a de *mecA* (Lee *et al.*, 2018).

A contrario, des mutations dans le gène *mecA* peuvent induire la production de PBP2a avec une résistance accrue aux β -lactamines (Katayama *et al.*, 2004). En fonction du type de recombinaison et de complexe *mec*, douze types majeurs de SCC*mec* ont été identifiés et classés de I à XII. Ces différents types ont des incidences préférentielles dans les HA-MRSA ou les CA-MRSA (Lee *et al.*, 2018).

La résistance élevée aux β -lactamines chez *S. aureus* est souvent considérée comme imputable à la présence de la PBP2a. Cependant, les PBPs natives ont tout de même un rôle essentiel dans ce phénotype, telles que la PBP1 ou la PBP2 bifonctionnelle, assurant la transglycosylation du peptidoglycane (Fuda *et al.*, 2005; Shalaby *et al.*, 2020). La LMW-PBP, nommé PBP4, semble également être impliquée dans l'établissement de cette résistance dans de nombreuses souches de MRSA. Le rôle de la PBP4 est encore méconnu mais consisterait à achever la synthèse du peptidoglycane imparfait avec la PBP2a (da Costa *et al.*, 2018; Farha *et al.*, 2013; Srisuknimit *et al.*, 2017). Cependant, son rôle ne semble pas se limiter à cette fonction. En effet, la PBP4 pourrait induire une forte résistance aux β -lactamines, dont des céphalosporines de dernières générations, dans des isolats cliniques (da Costa *et al.*, 2018). Outre ceux codant pour les PBPs, de nombreux autres gènes ont également une influence sur le phénotype de résistance, tels que les gènes *fem* (Factor Essential for Methicillin resistance, pour facteur essentiel dans la résistance à la méticilline), les facteurs auxiliaires *aux*, les gènes *hmt* (High methicillin resistance, pour haute résistance à la méticilline) ou encore des gènes impliqués dans la synthèse des acides téichoïques liés à la paroi (WTA) tels *tarS* et *tarM* (Brown *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2018; Peacock and Paterson, 2015; Shalaby *et al.*, 2020).

CHAPITRE III : LA D-ALANYLATION DES ACIDES TÉICHOÏQUES COMME CIBLE THÉRAPEUTIQUE

III.1 Les acides téichoïques

La paroi des bactéries à Gram positif est composée d'une variété de polysaccharides et de protéines reliés au peptidoglycane par des liaisons covalentes ou ancrés directement dans la membrane lipidique (Hancock *et al.*, 2014). Parmi ces polymères, les acides téichoïques (TAs) sont des constituants majeurs retrouvés dans la plupart des bactéries à Gram positif, telles que les entérocoques et les staphylocoques. Les TAs sont des glycopolymères de surface contenant des unités répétées de polyols reliées par des phosphates (Brown *et al.*, 2013). Les TAs forment avec le peptidoglycane une matrice poly-anionique jouant un rôle dans l'élasticité, la porosité, la résistance mécanique et le guidage électrostatique de l'enveloppe (Neuhaus and Baddiley, 2003). Les TAs regroupent deux types de polymères : les acides téichoïques liés au peptidoglycane (WTA, pour Wall Teichoic Acid) et les acides lipotéichoïques (LTA, pour LipoTeichoic Acid) ancrés à la membrane (Figure 10) (Neuhaus and Baddiley, 2003; Rohde, 2019). La majorité des bactéries à Gram positif produisent les deux types de TAs. La raison de cette double production et la fonction précise de ces TAs ne sont pas totalement élucidées. Les TAs sont impliqués dans trois grandes fonctions : la protection contre des molécules nocives et les stress environnementaux, le contrôle d'activités enzymatiques et la concentration en ions de l'enveloppe, et l'attachement à des récepteurs et des surfaces. Ils participent notamment à la pathogénicité des bactéries (Brown *et al.*, 2013; Miyachiro *et al.*, 2019; Neuhaus and Baddiley, 2003; Rohde, 2019; Xia *et al.*, 2010).

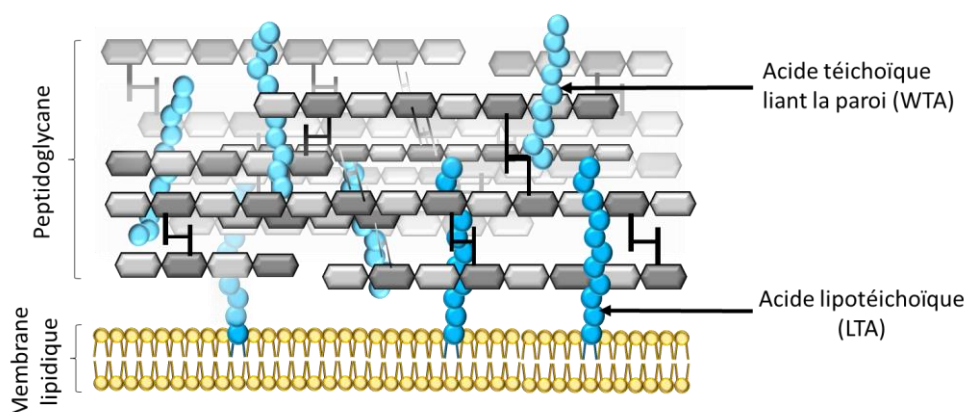


Figure 10 : Organisation des acides téichoïques au sein de la paroi des bactéries à Gram positif (d'après Brown *et al.*, 2013; Neuhaus and Baddiley, 2003; Rohde, 2019).

III.1.1 Les acides téichoïques liés à la paroi (WTA)

Les WTA sont des glycopolymères très abondants présents dans la paroi des bactéries à Gram positif (Brown *et al.*, 2013; Neuhaus and Baddiley, 2003; Rohde, 2019). Les WTA ont une structure basique commune, constituée d'une unité de liaison disaccharidique et d'une chaîne principale d'unités de polyols liés par des liaisons phosphodiester (Figure 11) (Brown *et al.*, 2013; Neuhaus and Baddiley, 2003). L'unité de liaison, très conservée, est constituée d'un *N*-acétylmannosamine et d'un NAG relié à une molécule de glycérol-3-phosphate (Gro-P). Cette unité se lie de manière covalente à une unité NAM d'un disaccharide du peptidoglycane. La chaîne principale de polyols s'étend à partir du Gro-P de l'unité de liaison *via* un pont phosphodiester. Différents types de WTA sont décrits en fonction de la nature et du nombre de monomères de polyol. Les types de WTA au sein d'une bactérie varient au sein des espèces et des souches (Brown *et al.*, 2013). La majorité des souches de *S. aureus* ont des WTA formés de 11 à 40 unités de ribitol-5-phosphate (Rbo-P), mais certaines souches possèdent des WTA de type Gro-P (Neuhaus and Baddiley, 2003; Xia *et al.*, 2010). Chez les entérocoques, la structure des WTA a été élucidée par NMR pour *E. faecalis* et *E. faecium*. L'unité répétée des WTA d'*E. faecium* est un Gro-P avec deux NAG, tandis que chez *E. faecalis*, la structure est plus complexe car l'unité répétée est composée de glucose, de galactose, de *N*-acétylgalactosamine, de NAG et de Rbo-P (Bychowska *et al.*, 2011; Hancock *et al.*, 2014; Theilacker *et al.*, 2012).

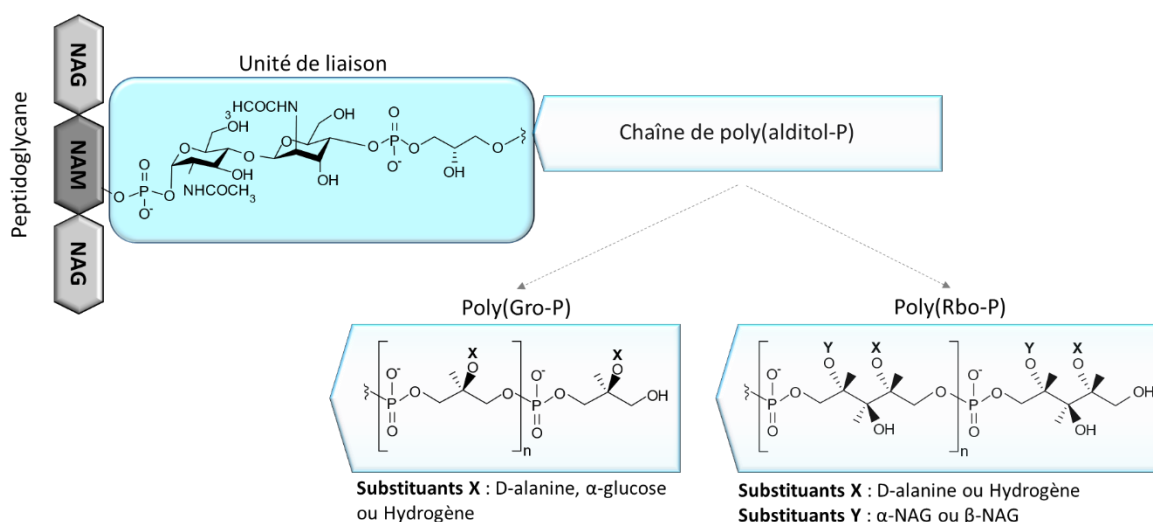


Figure 11 : Composition structurale des acides téichoïques liés à la paroi (WTA) chez les bactéries à Gram positif (d'après Brown *et al.*, 2013; Neuhaus and Baddiley, 2003; Rohde, 2019).

NAG : N-acétylglucosamide ; NAM : N-acétylmannosamine ; P : groupement phosphate ; Gro-P : Glycérol-3-phosphate ; Rbo-P : Ribitol-5-phosphate.

III.1.2 Les acides lipotéichoïques (LTA)

Les LTA sont également des polymères très abondants dans la cellule bactérienne présentant de faibles différences de structure au sein des bactéries à Gram positif (Figure 12) (Neuhaus and Baddiley, 2003; Percy and Gründling, 2014; Rohde, 2019). Les LTA sont des polymères macro-amphiphiles ayant une ancre glycolipidique insérée dans la membrane et une chaîne de poly(alditol phosphate) ou de poly(glycosyl phosphate) s'étendant dans la paroi. Les LTA sont classés selon leur structure chimique précise en au moins 5 types. Les LTA de type I sont les mieux caractérisés et retrouvés dans de nombreuses bactéries à Gram positif, notamment chez les entérocoques et staphylocoques. Ces LTA sont composés d'une chaîne de Gro-P (liés en 1-3) reliée à l'ancre glycolipidique. Cette chaîne a une longueur variable, d'une moyenne de 25 unités Gro-P chez *S. aureus* et 14 à 33 unités chez *E. faecalis* (Neuhaus and Baddiley, 2003; Percy and Gründling, 2014). La nature de l'ancre glycolipidique est variable selon les espèces. Elle est constituée d'un β -glycosyl(1-6)- β -glucosyl(1-3)-diacylglycérol (Glc2-DAG) chez *S. aureus* et d'un disaccharide de glucose en liaison 1-2 chez *E. faecalis* 12030 (Hancock *et al.*, 2014; Percy and Gründling, 2014; Xia *et al.*, 2010).

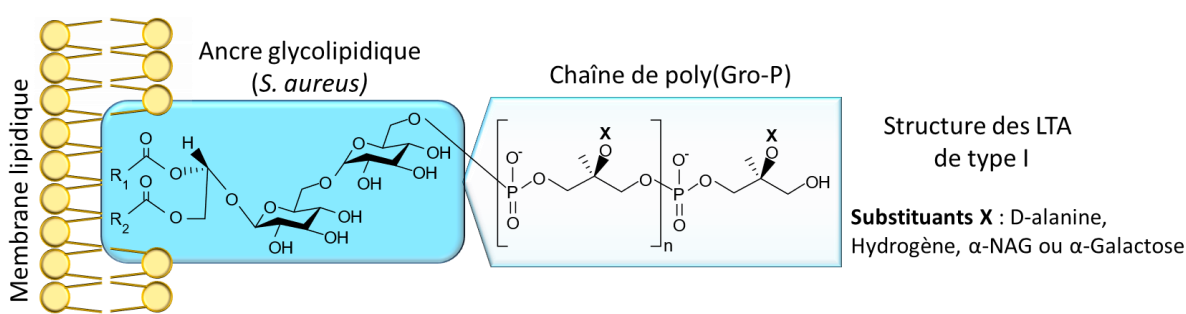


Figure 12 : Composition structurale des acides lipotéichoïques (LTA) de type I chez les bactéries à Gram positif (d'après Neuhaus and Baddiley, 2003; Rohde, 2019).

NAG : N-acétylglucosamide ; P : groupement phosphate ; Gro-P : Glycérol-3-phosphate.

III.1.3 La modification des acides téichoïques

Les WTA et les LTA peuvent subir des modifications le long de leur chaîne de polyols au niveau de leurs groupements hydroxyles. Ces modifications se regroupent en deux types pouvant co-exister au sein d'un même polymère (Brown *et al.*, 2013; Neuhaus and Baddiley, 2003).

La glycosylation intervient après la synthèse complète des TAs, dans le milieu intracellulaire pour les WTA et après export dans la paroi pour les LTA. La glycosylation

entraîne l'addition d'une variété de mono- ou disaccharides, notamment des molécules de glucose et des NAG. Le taux de substitution pour la glycosylation est généralement très élevé, mais ne semble pas être influencé par des changements environnementaux (Brown *et al.*, 2013; Neuhaus and Baddiley, 2003; Xia *et al.*, 2010).

La D-alanylation consiste en l'estérification des monomères de la chaîne polyols des TAs par une alanine toujours dans la conformation D. Cette modification est courante chez les bactéries à Gram positif, en particulier sur les WTA et les LTA de type I. Néanmoins, le taux de D-alanylation dans ces polymères est hautement variable en fonction des espèces bactériennes et des conditions de culture (Neuhaus and Baddiley, 2003). La D-alanylation est une modification agissant sur la charge des TAs. Comme dit précédemment, les TAs sont des polymères anioniques, dû à la présence des groupements phosphates. Cependant, l'ajout d'acides aminés positifs comme les D-alanines permet une modulation de leur charge, diminuant l'électronégativité des TAs (Neuhaus and Baddiley, 2003; Rohde, 2019). De par cette modulation, la fonction de protection contre les molécules nocives associée aux TAs, en particulier les peptides antimicrobiens et les antibiotiques cationiques, semble due à cette modification de charge apportée par la D-alanylation (Neuhaus and Baddiley, 2003; Peschel *et al.*, 2000).

III.2 La D-alanylation des acides téichoïques

III.2.1 Mécanisme de la D-alanylation : l'opéron *dlt*

Contrairement aux voies de synthèse des WTA et des LTA qui sont distinctes, la machinerie responsable de la D-alanylation est régie par un seul et unique opéron, nommé l'opéron *dlt* (Collins *et al.*, 2002; Neuhaus and Baddiley, 2003; Wecke *et al.*, 1996). Cet opéron, essentiel au mécanisme de D-alanylation, contient au minimum 4 gènes : *dltA*, *dltB*, *dltC* et *dltD* (Abachin *et al.*, 2002; McKay Wood *et al.*, 2018; Neuhaus and Baddiley, 2003). Chacun de ces gènes est requis pour l'établissement de la D-alanylation des TAs (McKay Wood *et al.*, 2018).

La première étape du mécanisme de D-alanylation des TAs consiste en l'activation d'une D-alanine et son transfert sur un groupement 4'-phosphopantéthéine (Ppant) de la protéine porteuse DltC. Ces deux étapes sont catalysées par une seule enzyme, la ligase DltA, nécessitant le clivage du pyrophosphoryle d'un ATP (Neuhaus and Baddiley, 2003). Avant de servir de

protéine porteuse, DltC doit être modifiée par un groupe 4'-Ppant sur sa sérine 35. Cette modification nécessite d'être catalysée, possiblement par la protéine AcpS (acyl carrier protein synthase). Le Ppant de DltC peut alors être modifié par l'ajout d'une D-alanine par DltA *via* un pont thioester (Ma *et al.*, 2018). Différents modèles existent pour expliciter la suite du mécanisme de D-alanylation (Figure 13). Ces modèles se confrontent sur le mécanisme permettant de transférer la D-alanine vers l'extérieur de la membrane et le rôle de DltB et DltD.

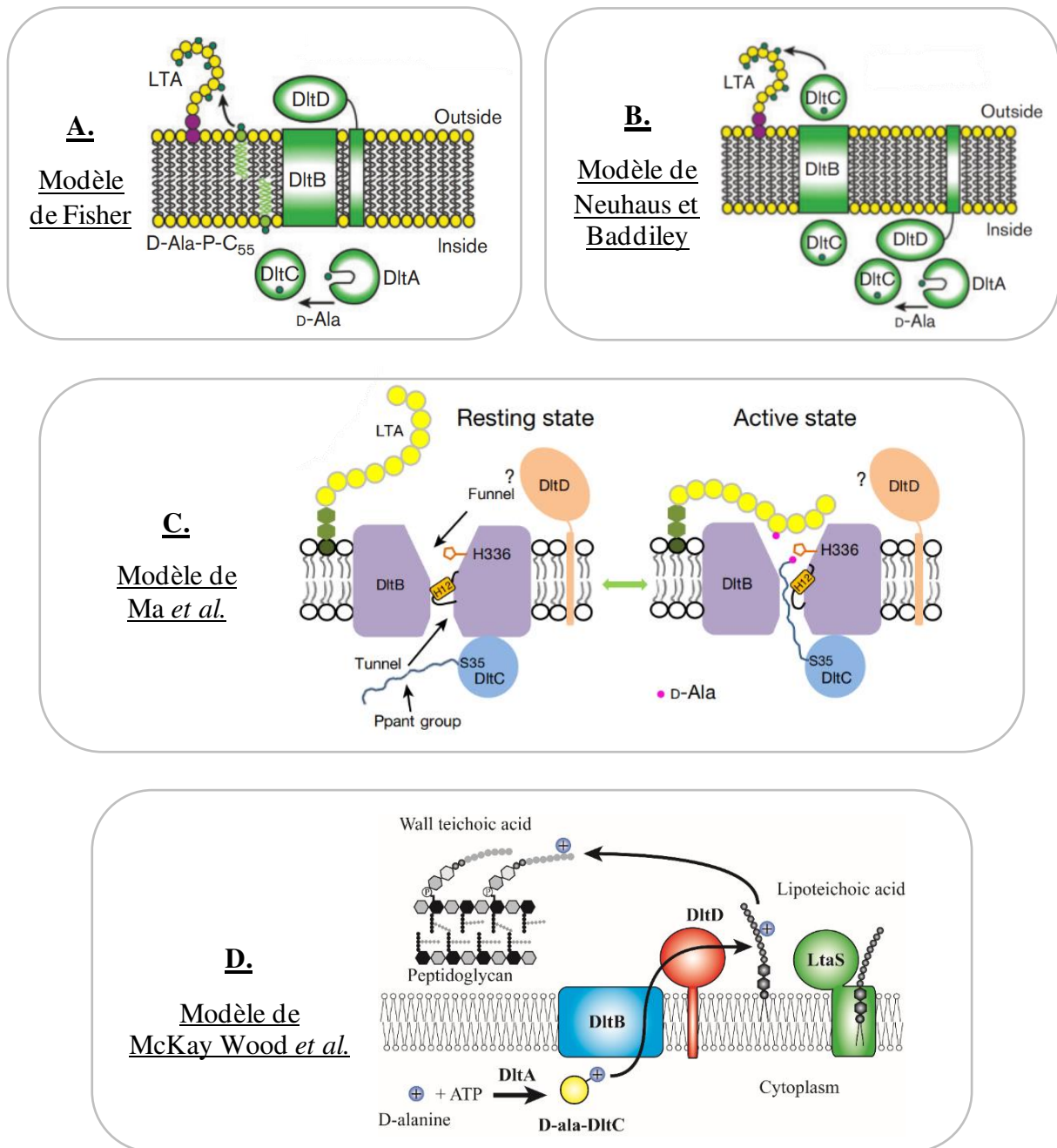


Figure 13 : Modèles du mécanisme de la D-alanylation des TAs (A. et B. source : Reichmann *et al.*, 2013 ; C. source : Ma *et al.*, 2018; D. source : McKay Wood *et al.*, 2018).

Le modèle de Fisher fait intervenir un undecaprényl-phosphate comme intermédiaire membranaire pour transférer la D-alanine de DltC vers l'extérieur de la membrane, catalysé potentiellement par DltB (Figure 13A). Ce modèle a été remis en cause par Neuhaus et Baddiley au vu d'une incapacité à mettre en évidence un polyprényl-phosphate-D-alanyl. Dans leur modèle, le passage de l'acide aminé D-alanine vers l'extérieur de la membrane serait réalisé par le transfert direct de la protéine DltC chargée de la D-alanine à travers un tunnel membranaire formé par DltB (Figure 13B) (Neuhaus and Baddiley, 2003; Reichmann *et al.*, 2013). Des analyses de cristallographie menées chez *Streptococcus thermophilus*, *S. aureus*, et *B. subtilis* ont permis de montrer que la partie extracellulaire de la protéine DltB a une forme d'entonnoir (Ma *et al.*, 2018). De plus, l'homologie entre DltB et les protéines MBOATs (Membrane-bound-O-acyltransferases) a permis à Ma *et al.* de dresser leur modèle selon lequel DltB catalyserait le transfert de la D-alanine à travers la membrane en laissant passer à travers son tunnel le bras P_{pent} de DltC portant le thioester de D-alanine (Figure 13C) (Ma *et al.*, 2018). Cette hypothèse serait en accord avec les résultats obtenus par Reichmann *et al.* montrant que, chez *S. aureus*, la protéine DltC est détectée uniquement dans la fraction cellulaire signifiant que la protéine ne traverse pas la membrane (Reichmann *et al.*, 2013).

Le rôle de DltD est également sujet à controverse. Dans le modèle de Neuhaus et Baddiley, DltD a une orientation cytosolique et faciliterait l'interaction entre DltA et DltC en augmentant l'efficacité de transfert de D-alanine sur DltC (Neuhaus and Baddiley, 2003; Reichmann *et al.*, 2013). Cette hypothèse a été renforcée par les résultats de Debabov *et al.*, indiquant que le taux de ligation de D-alanine de DltA vers DltC est multiplié par 2 en présence de DltD. De plus, en absence de DltD, DltA peut attacher une D-alanine à DltC mais également à une molécule d'ACP (impliqué dans la biosynthèse des acides gras), suggérant un rôle de DltD dans la discrimination entre DltC et ACP (Debabov *et al.*, 2000; Reichmann *et al.*, 2013). Cependant les résultats de Reichmann *et al.*, chez *S. aureus*, montrent que la protéine DltD est orientée vers l'extérieur de la cellule (Reichmann *et al.*, 2013). Dans le modèle de Fisher, DltD est orientée vers la paroi et participerait au transfert de la D-alanine de l'undecaprényl-phosphate à un LTA (Neuhaus and Baddiley, 2003; Reichmann *et al.*, 2013). En 2018, McKay Wood et ses collaborateurs ont identifié le site catalytique de DltD. Ce site en triade est similaire aux hydrolases de la famille Ser-Gly-Asn-His hydrolases (protéines SGHN-like). Or, de nombreuses protéines MBOATs nécessitent des homologues de ces hydrolases afin de transférer un acyl, présent dans le milieu intracellulaire, sur différents polymères de la paroi. Les homologies entre DltB et les MBOATs, et entre DltD et les protéines SGHN-like, laissent

suspecter une activité conjointe des protéines DltB et DltD. Ainsi, McKay Wood *et al.* suggèrent que DltB faciliterait le transfert de la D-alanine à travers la membrane, *via* le thioester lié au bras de Ppant de DltC ou *via* un intermédiaire lipidique, permettant alors à DltD de transférer cette D-alanine sur un LTA (Figure 13D) (McKay Wood *et al.*, 2018).

Le mécanisme de D-alanylation permet l'ajout d'une D-alanine sur un LTA. Des expériences de pulse-chase avec des D-alanines radio-marquées ainsi qu'une quantification des esters de D-alanine des WTA dans un mutant privé de LTA ont montré que les esters de D-alanine des LTA servent de précurseurs à ceux intégrés dans les WTA (Haas *et al.*, 1984; Neuhaus and Baddiley, 2003; Reichmann *et al.*, 2013). Néanmoins, le mécanisme de transfert des D-alanines des LTA vers les WTA n'est pas élucidé. Différentes pistes sont explorées, notamment l'implication de l'estérase FmtA chez *S. aureus* qui semble capable d'ôter les esters de D-alanine des TAs, pouvant alors participer à la régulation spatiale et temporelle de la charge de la surface bactérienne (Dalal *et al.*, 2019; Rahman *et al.*, 2016).

III.2.2 Importance de la D-alanylation chez les bactéries à Gram positif

III.2.2.1 Conservation et distribution de l'opéron *dlt*

La caractérisation de l'opéron *dlt* chez 12 bactéries à Gram positif a permis de conclure que celui-ci contient au minimum les 4 gènes *dltA*, *dltB*, *dltC* et *dltD* (Neuhaus and Baddiley, 2003). Son organisation génétique est hautement conservée chez les bactéries à Gram positif, en particulier entre les espèces phylogénétiquement proches. *A contrario*, les régions adjacentes de l'opéron sont souvent divergentes (Figure 14). De plus, des éléments suggérant une possible mobilité (tRNA, séquence d'insertion, ou de gènes d'intégrase) sont présents dans l'environnement de l'opéron *dlt* (Abi Khattar *et al.*, 2009).

Un ORF supplémentaire, nommé *dltX*, est retrouvé chez 809 espèces dont 805 Firmicutes, incluant les entérocoques et les staphylocoques (Kamar *et al.*, 2017; Neuhaus and Baddiley, 2003). Cet ORF, présent en amont de l'opéron *dlt*, a été décrit comme co-transcrit avec *dltA* chez *S. aureus* (Koprivnjak *et al.*, 2006; Neuhaus and Baddiley, 2003). L'ORF *dltX* semble coder pour une protéine transmembranaire sans peptide signal et ne serait donc pas exportée. Le rôle de cet ORF n'est pas élucidé. De nombreuses hypothèses ont mis en avant une fonction dans la régulation de l'opéron. Néanmoins, une étude réalisée chez *Bacillus thuringiensis* montre que l'absence de *dltX* n'affecte pas l'expression de l'opéron *dlt*, mais que ce gène

semble nécessaire au mécanisme de D-alanylation (Kamar *et al.*, 2017). Chez *B. subtilis*, *Clostridium difficile* et *Streptococcus pyogenes*, l'opéron *dlt* a été annoté comme contenant un gène additionnel nommé *dltE* codant pour une oxydoréductase. Néanmoins ce gène n'est pas impliqué dans l'incorporation des D-alanines dans les TAs (McBride and Sonenshein, 2011; Perego *et al.*, 1995).

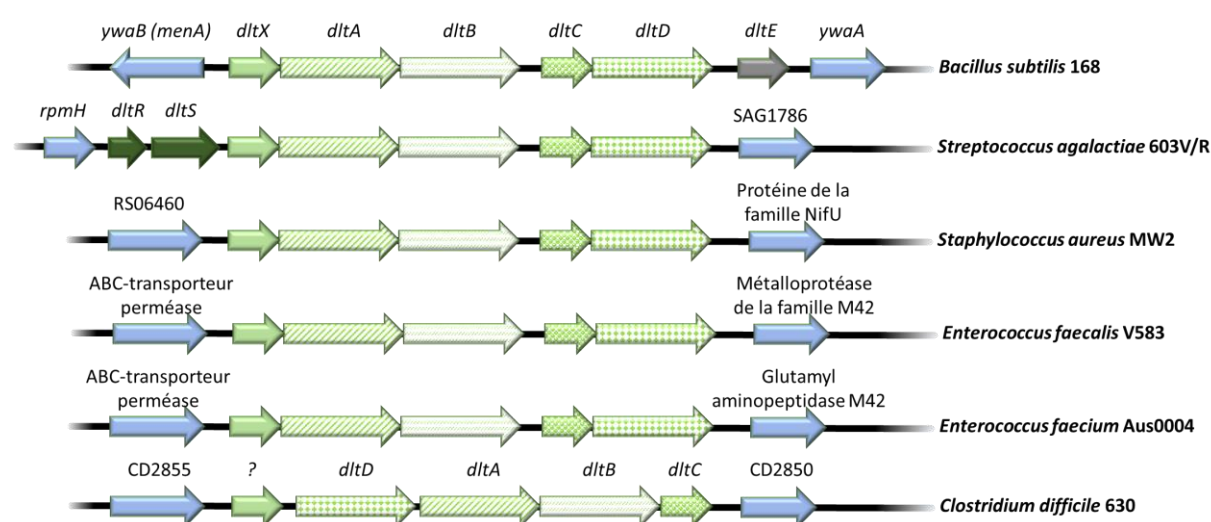


Figure 14 : Diversité de l'organisation génétique de l'opéron *dlt* et organisation dans les bactéries d'intérêt (d'après *Abi Khattar et al.*, 2009; *McBride and Sonenshein*, 2011).

L'organisation chez *S. aureus* et les entérocoques est issue de GenBank (NCBI ; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)

Notons qu'une organisation génétique différentielle de l'opéron *dlt* a pu être identifiée chez différents genres bactériens. Par exemple, chez *C. difficile* et *Clostridium butyricum*, les gènes de l'opéron sont dans l'ordre *dltDABC* (Figure 14) (McBride and Sonenshein, 2011; Wydaudematteis *et al.*, 2015). Il a été montré, pour *C. difficile*, que ces gènes sont homologues à ceux de *B. subtilis*. De plus, malgré l'absence d'un ORF homologue à *dltX* de *B. subtilis*, l'opéron *dlt* de *C. difficile* présente aussi un petit ORF de même taille en amont de *dltD* (McBride and Sonenshein, 2011).

De manière très surprenante, des opérons *dlt* ont été annotés chez des bactéries ne possédant pas de TAs, cibles spécifiques de la D-alanylation de cet opéron. En effet, *Streptococcus pneumoniae* ne possède pas de TAs mais des polymères de phosphorylcholine qui présentent également des modifications par ajout d'esters de D-alanine. L'opéron *dlt* a été montré comme transcrit en condition de laboratoire, néanmoins sa fonction et sa cible n'ont pas été déterminées

(Neuhaus and Baddiley, 2003). Quatre gènes ont été identifiés comme formant un opéron *dlt* chez 3 genres de bactéries à Gram négatif : *Dickeya* (*Erwina*), *Bordetella*, et *Photorhabdus*. Au vu du pourcentage en GC de ces gènes, il semble que cet opéron soit issu d'un transfert horizontal. De plus, les protéines codées par ces gènes présentent une forte homologie de séquence (21 à 34%) avec les protéines Dlt de *B. subtilis*. Néanmoins, cet opéron *dlt* ne semble pas être impliqué dans une fonction de D-alanylation, mais a été montré comme participant à la résistance à certains peptides antimicrobiens cationiques (Abi Khattar *et al.*, 2009; Pandin *et al.*, 2016; Taneja *et al.*, 2013).

Chez *Streptococcus agalactiae*, l'environnement génétique proche de l'opéron *dlt* contient deux gènes nommés *dltR* et *dltS*. Ces deux gènes situés en amont de l'opéron codent pour un système à deux composants captant un signal externe lié à une absence d'ester de D-alanine dans les LTA puis modulant l'expression de l'opéron *dlt* (Neuhaus and Baddiley, 2003). Cependant, chez *Listeria monocytogenes*, des analyses d'expression de l'opéron chez des mutants dépourvus de D-alanylation ont montré que les taux d'esters de D-alanine n'affectent pas l'expression de l'opéron *dlt* (Abachin *et al.*, 2002). Les connaissances sur la régulation de l'opéron *dlt* sont très partielles et souvent contradictoires entre les différents genres bactériens. De plus, de nombreux facteurs environnementaux, comme des traitements antibiotiques ou le pH, influent sur le degré de D-alanylation des TAs, et semblent donc impliqués dans la régulation de l'opéron *dlt* (Bayer *et al.*, 2016; Koprivnjak *et al.*, 2006; Mechler *et al.*, 2016; Neuhaus and Baddiley, 2003). Parmi les nombreux régulateurs potentiels de la D-alanylation, on peut noter le système à deux composants CiaX₂ chez *Streptococcus mutans*, et les systèmes Agr (régulateur de gènes accessoires) et Aps (senseur de peptides antimicrobiens) chez *S. aureus* (Matsuo *et al.*, 2011; Mazda *et al.*, 2012). Ces régulateurs sont impliqués dans de nombreuses fonctions bactériennes notamment la virulence. La multiplicité des éléments de régulation reflète une adaptation de chaque espèce à son environnement pour la D-alanylation, dévoilant les potentiels rôles clés de la D-alanylation.

III.2.2.2 Effets pléiotropes de la D-alanylation

Malgré la forte conservation de l'opéron *dlt* chez les bactéries à Gram positif, les rôles précis de la D-alanylation des TAs ne sont pas clairement établis. En absence de WTA, l'absence de D-alanylation est létale pour *S. aureus* (Pasquina *et al.*, 2016; Santa Maria *et al.*, 2014). Cependant, en présence de l'ensemble des TAs, la D-alanylation n'est pas un mécanisme

essentiel à la viabilité bactérienne. Des mutants affectés dans les gènes l'opéron *dlt* ont pu être construits dans de nombreux genres bactériens. L'étude de ces mutants a permis de montrer que la D-alanylation jouait un rôle dans de nombreux phénomènes, dont la croissance, l'homéostasie, la pathogénicité des bactéries et la protection contre des molécules antimicrobiennes (Tableau 5 ; Annexe) (McKay Wood *et al.*, 2018; Neuhaus and Baddiley, 2003). Cependant, les phénotypes observés divergent en fonction du genre et de l'espèce bactérienne et au sein même des souches étudiées.

Tableau 5 : Résumé des effets de la mutation d'un gène de l'opéron *dlt* sur des phénotypes généraux (A.), la pathogénicité (B.), et la résistance aux molécules antimicrobiennes (C.) chez différentes bactéries à Gram positif (les publications citées sont listées en annexe ; inspirée de McKay Wood *et al.*, 2018).

S : altération délétère pour la bactérie du phénotype observé (ex : sensibilité accrue)

R : renforcement du phénotype observé (ex : résistance accrue, surproduction de protéines)

N : absence d'effet

A. Phénotypes généraux

	Sau	Ef	Bs	Bc	Bl	Bt	Sg	Sm	Sag	Spn	Spy	Ss	SGA	SGB	Lrh	Lre	Lc	Lp	Li	Lg	Cd	Ch	Lm
Morphologie		N ¹	N ^{2,3}	S ⁴	N ⁵	S ⁶	S ⁷	N ⁸	S ⁹	N ¹⁰	N ¹¹	N ¹²		N ¹³	S ^{14,15}	N ¹⁶	S ^{8,17-19}	S ²⁰	N ^{21,22}	N ²³	N ²⁴	S ²⁵	N ²⁶
Croissance		N ^{1,26}	N ^{3,27}		S ^{5,29}		S ⁷ N ³⁰	S ⁸		N ¹⁰						N ¹⁶		S ^{20,30} N ²²	N ²³				N ²⁶
Résistance aux stress								S ⁸	S ⁹				S ³²		S ¹⁴	S ¹⁶	S ³³		N ²³				
Mobilité			S ²	S ³⁴																			
Autolyse	S ³⁵	N ^{1,26}	S ^{3,28}	N ⁴	S ⁵					S ¹⁰			S ³²		S ¹⁴	S ¹⁶	N ¹⁹	S ²⁰	S ²¹ N ²²	N ²³		N ²⁵	
Co-agrégation							S ⁷																
Production de protéines			R ³⁶⁻³⁸		S ⁵ R ^{5,29}		R ³⁹	S ⁴⁰			S ¹¹								S ²²				
Fixation d'ions et de molécules	R ^{41,42}		R ²⁸				R ³⁰													R ²³			
Perméabilité aux protons								R ⁸						R ¹³									
Résistance au stress mécanique																R ^{15,43}							N ²⁶
Résistance aux UVs																			S ³¹				
Hydrophobicité de la paroi		R ⁴⁴					R ⁴⁴															R ²⁵	

B. Pathogénicité

	Sau	Ef	Bs	Bc	Bt	Sg	Sm	Sag	Spn	Ss	SGA	Lrh	Lre	Lp	Lg	Cd	Lm
Virulence	S ⁴⁵⁻⁴⁷	N ²⁷		S ⁴	S ⁶		S ⁴⁸	S ⁹	S ⁴⁹	S ⁵⁰	N ³²				S ²³	R ²⁴	S ²⁶
Adhérence		S ¹ R ⁵¹				S ^{7,30}		N ⁹		S ⁵⁰	S ³²	N ¹⁴	N ¹⁶				S ²⁶
Reconnaissance du système immunitaire	N ⁵²																
Résistance aux cellules immunitaires	S ^{45,53} N ^{45,54}		N ²⁸					S ⁹	S ⁴⁹	S ^{12,50}	S ³²						
Induction du système immunitaire	S ⁵⁵ R ^{47,55} N ⁵⁵					S ³⁰	S ⁴⁸			S ¹²		S ¹⁴ N ¹⁴		S ^{56,57} R ⁵⁵ N ⁵⁶			
Formation de biofilm	S ⁵⁸	N ⁵⁹ S ¹		S ³⁴			S ⁶⁰					N ¹⁴	S ¹⁶				
Propagation des colonies	S ⁶¹																
Colonisation		R ⁵¹				N ³⁰	N ⁴⁸						S ¹⁶				S ⁶²
Persistance dans l'hôte	S ⁵²																
Reconnaissance des phages	N ⁴⁵																
Invasion cellulaire										S ⁵⁰ R ¹²							N ⁶²

C. Résistances aux molécules antimicrobiennes

	Sau	Ef	Bs	Bc	Sg	Ss	SGA	Lrh	Lre	Lc	Lg	Cd	Cb	Lm
Peptides antimicrobiens*	S ^{41,52,63-67} N ⁶³	S ^{1,27,44} N ⁴⁴	S ^{68,69}	S ⁴	S ^{30,44} N ⁴⁴	S ⁵⁰	S ³²	S ¹⁴	S ¹⁶ N ¹⁶	S ⁷⁰	S ²³	S ^{24,71}	S ²⁵ N ²⁵	S ²⁶
Antibiotiques	S ^{41,66,72-75} R ³⁵		S ^{3,27}			N ⁵⁰	N ³²			S ⁷⁰ N ¹⁹	N ²³	S ⁷¹	S ²⁵	N ²⁶
Lysostaphine ou lysozyme	S ^{67,72}	S ²⁷	S ⁷⁶	S ⁴		N ⁵⁰					N ²³	S ²⁴	S ²⁵	
Phospholipase A2	S ^{53,77}													
Extrait de peaux	S ⁶⁵													
Détergents ou antiseptiques								R ¹⁴		S ¹⁷	N ²³			

* Une plus grande sensibilité (S) aux peptides antimicrobiens est également observé pour : **Sx**⁴¹, **Bt**⁶, **Sag**⁹, **Sm**⁷⁸, **Spn**^{10,48}, **SGB**¹³ et **Lf**²².

Sau : *Staphylococcus aureus* ; **Sx** : *Staphylococcus xylosus* ; **Ef** : *Enterococcus faecalis* ; **Bs** : *Bacillus subtilis* ; **Bc** : *Bacillus cereus* ; **Bl** : *Bacillus licheniformis* ; **Bt** : *Bacillus thuringiensis* ; **Sg** : *Streptococcus gordonii* ; **Sm** : *Streptococcus mutans* ; **Sag** : *Streptococcus agalactiae* ; **Spn** : *Streptococcus pneumoniae* ; **Spn** : *Streptococcus pyogenes* ; **Ss** : *Streptococcus suis* ; **SGA** : Streptocoques du groupe A ; **SGB** : Streptocoques du groupe B ; **Lrh** : *Lactobacillus rhamnosus* (ou *Lactocaseibacillus rhamnosus*) ; **Lre** : *Lactobacillus reuteri* ; **Lc** : *Lactobacillus casei* ; **Lp** : *Lactobacillus plantarum* ; **Ll** : *Lactococcus lactis* ; **Lg** : *Lactococcus garvieae* ; **Cd** : *Clostridium difficile* ; **Cb** : *Clostridium butyricum* ; **Lm** : *Listeria monocytogenes*

Chez les entérocoques, les études sur la D-alanylation se sont concentrées sur *E. faecalis*. Selon Fabretti *et al.*, *E. faecalis* n'est pas affectée dans sa morphologie, sa croissance et son autolyse à la suite d'une mutation du gène *dltA* (Tableau 5A). Celle-ci entraîne un défaut dans la formation de biofilms et dans l'adhérence aux cellules épithéliales comparativement à la souche parentale (Fabretti *et al.*, 2006). Cependant, d'autres travaux indiquent au contraire que la mutation du gène *dltA* n'affecte pas la formation de biofilms et augmente l'adhérence aux cellules uro-épithéliales (Tableau 5B) (Mohamed *et al.*, 2004; Wobser *et al.*, 2014). En outre, un mutant *dltA* d'*E. faecalis* posséderait une meilleure capacité à coloniser le foie des souris (Wobser *et al.*, 2014). Bien que les résultats de ces études s'opposent, elles mettent en évidence un lien entre la D-alanylation et la pathogénicité des entérocoques.

Une corrélation entre la quantité d'esters de D-alanine présents dans la paroi et la capacité de *S. aureus* à fixer les ions magnésium a été montrée, suggérant un rôle de la D-alanylation dans la fixation des cations (Archibald *et al.*, 1973; Lambert *et al.*, 1975; Neuhaus and Baddiley, 2003). L'absence de ce mécanisme semble également entraîner une plus forte sensibilité à l'autolyse chez *S. aureus* (Nakao *et al.*, 2000). Neuhaus et Baddiley suggèrent que la présence de D-alanine dans la paroi permet une expansion de la paroi cellulaire. Ce changement de volume résulterait d'une répulsion charge-charge désignée comme une interaction électromécanique au sein de la paroi. Ainsi, les esters de D-alanine participeraient à la densité ou à la taille de la paroi. De plus, ils supposent également que l'absence ou la présence d'esters de D-alanine à un endroit spécifique de la paroi pourrait permettre la formation d'un microenvironnement avec des charges ioniques spécifiques. Ce microenvironnement favoriserait la mise en place d'un mécanisme ciblé pour des protéines régulées par des charges ioniques, telles que les autolysines (Neuhaus and Baddiley, 2003). Diverses études menées sur des mutants *dltA* de *S. aureus* relient la D-alanylation à la pathogénicité de cette bactérie (Tableau 5B). En effet, l'absence de D-alanylation des TAs diminuerait la virulence et la formation de biofilms mais affecterait également la propagation des colonies sur gélose, pouvant faire écho à la dispersion des biofilms bactériens (Collins *et al.*, 2002; Gross *et al.*, 2001; Kaito and Sekimizu, 2007; Weidenmaier *et al.*, 2010). De plus, bien qu'un mutant dépourvu de D-alanylation des TAs soit phagocyté de la même manière qu'une souche sauvage, il serait mieux éliminé par les neutrophiles, suggérant une plus grande sensibilité du mutant aux composants intracellulaires des neutrophiles tels que les produits oxydants et halogénants toxiques (Collins *et al.*, 2002; Hunt *et al.*, 2006).

Ainsi, au-delà des rôles suspectés dans la structure et la charge de la paroi, la D-alanylation semble affecter des fonctions clés dans la pathogénicité des bactéries en ayant notamment un effet sur leur résistance vis-à-vis de molécules antibactériennes.

III.3 La D-alanylation : une cible prometteuse

III.3.1 Lien entre la D-alanylation des TAs et la résistance aux molécules antimicrobiennes

Les conséquences d'une absence de D-alanylation ont fréquemment été étudiées sur l'efficacité de peptides antimicrobiens chez de nombreux genres bactériens. Dans la majorité des cas, une mutation dans le gène *dltA* entraîne une sensibilité à ces peptides (Tableau 5C ; Annexe). Les peptides antimicrobiens étudiés sont principalement cationiques. Une hypothèse a émergé pour expliquer cette plus grande sensibilité en absence de D-alanylation des TAs. La D-alanylation permettrait de diminuer l'électronégativité des TAs, induisant une baisse de la charge globale de la paroi. Ainsi, l'attractivité électrostatique entre les peptides antimicrobiens cationiques et la paroi bactérienne s'en trouverait réduite (Neuhaus and Baddiley, 2003; Peschel *et al.*, 1999). Cependant, on peut noter qu'un mutant *dltA* chez *S. aureus* s'avère plus sensible à la dermcidine, un peptide antimicrobien anionique. Les dérivés de ce peptide, chargés négativement ou positivement, ont également une activité accrue sur le mutant, suggérant que ce phénotype n'est pas lié aux charges du peptide (Steffen *et al.*, 2006). Les concentrations minimales inhibitrices de peptides antimicrobiens ayant différentes charges cationiques sont diminuées chez un mutant *dltA* de *S. agalactiae* comparativement à sa souche parentale. Cette diminution semble ne dépendre ni de la charge des peptides, ni de leur caractéristique d'hydrophobicité, mais plutôt de leur taille (Saar-Dover *et al.*, 2012). L'absence de D-alanylation entraînerait une instabilité dans la paroi ou dans l'enveloppe lipidique des bactéries favorisant l'action des peptides antimicrobiens (Koprivnjak *et al.*, 2006; Saar-Dover *et al.*, 2012). Ainsi, l'absence de D-alanylation des TAs pourrait engendrer une diminution de la densité du peptidoglycane ou une modification de la conformation des TAs, permettant de favoriser la pénétration des peptides à travers la paroi (Saar-Dover *et al.*, 2012).

Par ailleurs, la D-alanylation des TAs semble également contribuer à la résistance aux antibiotiques. Des mutants *dlt* chez *C. difficile*, *C. butyricum* et *Lactobacillus casei* sont plus sensibles à la vancomycine que leurs souches parentales (McBride and Sonenshein, 2011;

Revilla-Guarinos *et al.*, 2014; Wydau-Dematteis *et al.*, 2015). De même, une légère sensibilisation de tels mutants a également été observée pour la méticilline et la gentamicine, respectivement chez *B. subtilis* et *S. mutans* (Nilsson *et al.*, 2016; Wecke *et al.*, 1997). Néanmoins, aucune augmentation de sensibilité n'a pu être décrite chez *Listeria monocytogenes* pour la pénicilline, la vancomycine, la téicoplanine et la bacitracine, et chez des streptocoques du groupe A pour la pénicilline et la gentamicine (Tableau 5C ; Annexe) (Abachin *et al.*, 2002; Kristian *et al.*, 2005).

Chez *S. aureus*, des mutants *dltA* sont plus sensibles à plusieurs antibiotiques notamment la vancomycine (Blake and O'Neill, 2013; Mechler *et al.*, 2016; Pasquina *et al.*, 2016; Peschel *et al.*, 2000; Santa Maria *et al.*, 2014). Une mutation du gène *dltA* a permis une légère sensibilisation à la méticilline dans une souche MSSA et une souche MRSA (Brown *et al.*, 2012; Peschel *et al.*, 2000). *A contrario*, Nakao *et al.* ont montré qu'une inactivation de l'opéron *dlt* par transposition dans *dltA* d'une souche MRSA permet une résistance accrue à la méticilline pour cette bactérie (Nakao *et al.*, 2000). Des phénotypes contradictoires ont également été constatés en fonction des souches étudiées vis-à-vis de la daptomycine. D'une part, Mechler *et al.* rapportent qu'une mutation dans le gène *dltA* sensibilise *S. aureus* à la daptomycine (Mechler *et al.*, 2016). D'autre part, les variations du taux d'expression du gène *dltA* chez des souches résistantes à la daptomycine semblent être souches-dépendantes, allant de sur-exprimé à réprimé (Cafiso *et al.*, 2014; Kang *et al.*, 2017; Mishra *et al.*, 2014). Cependant, une étude comparative révèle que des souches MRSA résistantes à la daptomycine possèdent un taux de D-alanylation des WTA plus important comparativement à leurs souches dérivées sensibles à la daptomycine (Mishra *et al.*, 2014).

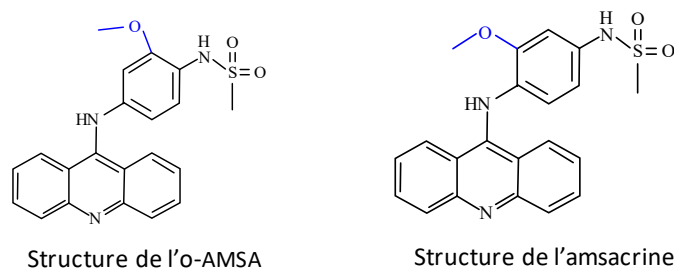
Chez les entérocoques, le taux de D-alanylation des LTA a été mesuré dans une souche d'*E. faecium* résistante à la vancomycine et une souche dérivée tolérante à la pénicilline. Les LTA de la souche dérivée possèdent un taux d'esters de D-alanine deux fois supérieur à la souche parentale (Gutmann *et al.*, 1996), laissant suspecter un rôle de la D-alanylation dans la tolérance aux β -lactamines.

Au regard des différents effets pléiotropes de la D-alanylation dans la pathogénicité des bactéries et dans la protection contre des molécules antimicrobiennes, en particulier vis-à-vis des antibiotiques, ce mécanisme semble pouvoir représenter une cible thérapeutique d'intérêt pour lutter contre des bactéries de plus en plus complexes à traiter.

III.3.2 Les inhibiteurs de la D-alanylation des TAs

Dès 1974, des premiers inhibiteurs de la D-alanylation ont été décrits, notamment la D-alanine hydroxamate, l'acide D- α -amino-*n*-butyrique, et leurs analogues, la β -fluoro-D-alanine et l'acide hydroxamate D- α -amino-*n*-butyrique. Cependant, ces molécules n'ont qu'un très faible effet sur la D-alanylation (Neuhaus and Baddiley, 2003; Neuhaus *et al.*, 1974).

Pour identifier de nouvelles molécules inhibitrices de la synthèse de protéines non-essentiels à la croissance de *S. aureus*, Pasquina et ses collègues ont mis en place une stratégie d'identification novatrice exploitant les relations létales entre certains mécanismes non-essentiels. Ces relations concernent notamment l'absence de D-alanylation des TAs qui s'avère létale lors de l'inhibition de la synthèse des WTA. Un criblage de molécules sur un mutant privé de WTA leur a permis d'identifier l'amsacrine, une molécule toxique anticancéreuse inhibant les topoisomérases eucaryotes. L'o-AMSA est un analogue de l'amsacrine ayant une activité réduite contre les topoisomérases. La cible de ces inhibiteurs a été identifiée comme étant la protéine DltB. L'utilisation d'amsacrine ou d'o-AMSA permet de sensibiliser *S. aureus* à la néomycine et à la gentamicine de manière similaire à une mutation dans le gène *dltA* (Figure 15).



		CMI (en $\mu\text{g/ml}$)			
		Néomycine		Gentamicine	
			+ o-AMSA		+Amsacrine
<i>S. aureus</i>	Souche sauvage	5-10	0.63	5	0.63
Newman	Souche mutante <i>ΔdltA</i>	0.63-1.25	0.63	0.63	0.63
<i>S. aureus</i> HG003		20	1.25	5	1.25

Figure 15 : Structure de l'amsacrine et de l'o-AMSA et effets sur la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la néomycine et de la gentamicine chez *S. aureus* (d'après Pasquina *et al.*, 2016).

En 2005, May et ses collaborateurs ont conçu une nouvelle molécule inhibitrice de DltA en s'inspirant des inhibiteurs des amino-acyl-ARNt-synthétases (aaRS). Ces molécules sont des analogues des substrats de ces enzymes mais ne sont pas hydrolysables. May *et al.* synthétisent

alors la 5'-O-[N-(D-alanyl)-sulfamoyl]-adénosine ayant une forte affinité et spécificité pour la protéine DltA (K_i de 232 nM chez *B. subtilis*). La cible DltA étant intracellulaire, le passage de l'inhibiteur à travers la membrane lipidique est essentiel et semble plausible du fait de l'analogie structurale entre cet inhibiteur et l'ascamycine, un antibiotique nucléosidique (Figure 16). De plus, l'inhibition de croissance de *B. subtilis* en présence de vancomycine et d'inhibiteur de DltA est similaire à celle observée pour un mutant $\Delta dltA$ traité avec de la vancomycine seule. Cette similitude de phénotypes semble confirmer l'inhibition de la D-alanylation des TAs dans la bactérie (May *et al.*, 2005).

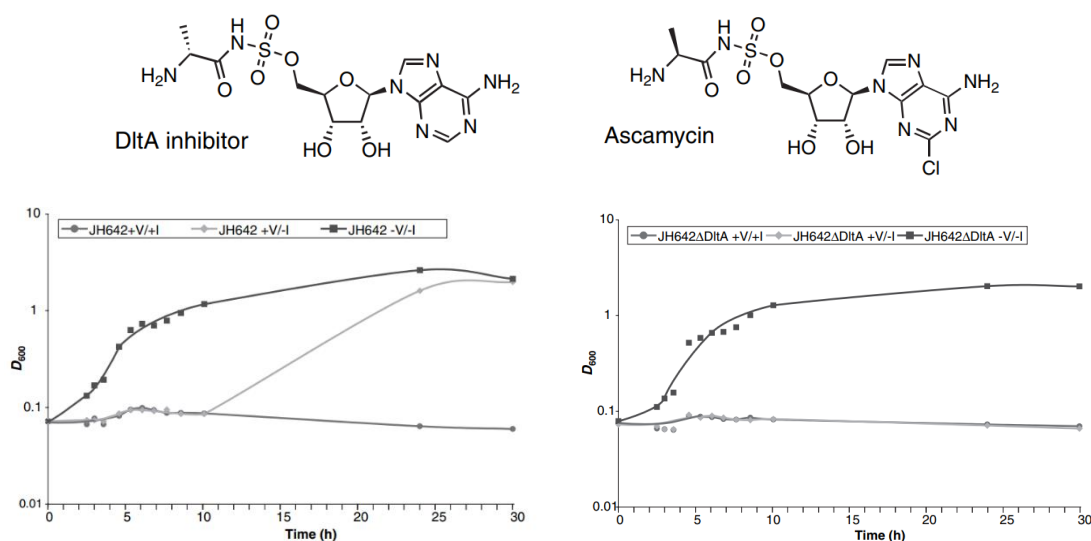


Figure 16 : Structure de l'inhibiteur de DltA et effet sur la croissance de *B. subtilis* en présence de vancomycine (source : May *et al.*, 2005)

JH642 : souche sauvage ; JH642 $\Delta dltA$: souche mutante du gène *dltA* ; V : Vancomycine ; I : Inhibiteur de DltA ; + : en présence ; - : en absence.

Les effets de l'amsacrine sur la gentamicine et la néomycine et ceux de l'inhibiteur de DltA sur la vancomycine soulèvent de nouveau le lien entre la D-alanylation et les antibiotiques ainsi que la potentialité de cibler les protéines Dlt comme cibles thérapeutiques. Néanmoins, notons que l'amsacrine est un composé toxique pour les cellules eucaryotes, limitant son application médicale. De plus, le phénotype observé avec l'inhibiteur de DltA décrit par May *et al.* nécessite une forte dose de molécules (1 mM) sur une bactérie non pathogène dont la résistance à la vancomycine n'est pas indiquée. Les auteurs n'évoquent pas non plus la toxicité potentielle de leur inhibiteur pour les cellules eucaryotes. Des recherches supplémentaires sont donc nécessaires pour caractériser l'intérêt clinique de cette molécule. Cependant, cet inhibiteur semble d'ores et déjà représenter un outil précieux de recherche en laboratoire pour explorer la D-alanylation comme une cible thérapeutique.

Objectifs des travaux de thèse

Objectifs des travaux de thèse

Malgré les avancées scientifiques récentes, les traitements des infections à entérocoques et *S. aureus* continuent de représenter un enjeu mondial de santé publique. Le défi considérable concerne particulièrement la lutte contre leur multirésistance aux antibiotiques. Dans la course de vitesse opposant l'émergence de nouvelles résistances par les bactéries et le développement de nouvelles approches médicales innovantes, l'avantage tourne actuellement au génie bactérien, engendrant des coûts humains et économiques de plus en plus élevés (Cavallo et al., 2004; O'Neill, 2014; Trémolières, 2010). Ainsi, la découverte de nouvelles stratégies de traitement est plus que jamais d'actualité afin de ne pas aboutir à des impasses thérapeutiques. Une approche intuitive consiste en la découverte de nouvelles molécules antibactériennes efficaces sur les BMR. Cependant, cette démarche est coûteuse et hasardeuse (Stephens et al., 2020; Trémolières, 2010). Par exemple, selon les données de l'organisation non-gouvernementale Pew Charitable Trusts, en février 2014, au moins 41 composés étaient en phase d'essai clinique. En juin 2020, seules 9 de ces molécules ont été approuvées pour leur utilisation en clinique, et seulement 3 d'entre elles font appel à de nouveaux types d'actions, laissant supposer un développement rapide des résistances bactériennes contre ces nouveaux composés (Stephens et al., 2020).

Une stratégie intéressante consiste à réhabiliter l'efficacité d'antibiotiques devenus obsolètes face à la multirésistance des bactéries. Cette méthode repose sur l'utilisation d'un adjuvant capable de resensibiliser les BMR aux antibiotiques. Cet adjuvant doit alors cibler un élément clé de la bactérie qui renforce l'activité de l'antibiotique ou annule la résistance de la bactérie. Des cibles très prometteuses pour un tel adjuvant sont les protéines Dlt impliquées dans la D-alanylation des TAs. L'objectif de ce travail de thèse a été de déterminer si l'absence de D-alanylation des TAs permettrait de sensibiliser aux antibiotiques des bactéries résistantes. Nous nous sommes intéressés à des pathogènes d'intérêt clinique particulièrement tolérantes ou résistantes à la majorité des β -lactamines : *E. faecalis*, *E. faecium* et *S. aureus*.

L'étude de la D-alanylation a été réalisée grâce à deux approches complémentaires : par inactivation génétique (mutagenèse ciblée du gène *dltA*) et par inhibition pharmacologique à l'aide d'un inhibiteur de DltA (May et al., 2005). Après la détermination des effets anti-résistance *in vivo* et anti-virulence de l'absence de D-alanylation des TAs via ces deux

méthodes, nous avons mis en place un traitement des infections à entérocoques et *S. aureus* dans le modèle animal *Galleria mellonella* pour déterminer les effets anti-résistance dans l'hôte (in host). Enfin, les derniers travaux de ce manuscrit ont concerné l'étude du biofilm de *S. aureus*, un mode de vie de cette bactérie fréquemment rencontré lors d'infections sévères. Nous avons alors déterminé les effets anti-biofilm d'une altération de la D-alanylation, génétiquement et pharmacologiquement. À la suite de cette introduction, le manuscrit détaille les matériels et les méthodes employés durant cette étude, puis expose les résultats obtenus. Ces résultats se composent d'un article scientifique publié sur les entérocoques et d'un article en préparation consacré à *S. aureus*. Une discussion générale est ensuite réalisée avant de conclure sur les perspectives découlant de ces travaux.

Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

CHAPITRE I : MATÉRIELS BIOLOGIQUES ET CHIMIQUES UTILISÉS

I.1 Souches bactériennes et plasmides

Les souches bactériennes et les plasmides utilisés sont listés dans les Tableaux 6 et 7.

Tableau 6: Souches bactériennes étudiées

Souches bactériennes	Caractéristiques	Référence
<i>Enterococcus faecalis</i>		
JH2-2	Dérivée d'une souche clinique, FUS ^R , RIF ^R	Jacob <i>et al.</i> , 1974
JH2-2pRB	JH2-2 portant le plasmide pRB473, CHL ^R	Coupri <i>et al.</i> , 2019
$\Delta dltA$	JH2-2 mutée dans le gène <i>dltA</i>	Le jeune <i>et al.</i> , 2010
$\Delta dltA$ pRB	Mutant $\Delta dltA$ portant le plasmide pRB473, CHL ^R	Coupri <i>et al.</i> , 2019
$\Delta dltA$ comp	Mutant $\Delta dltA$ complété avec le plasmide pRB473- <i>dlt</i> , CHL ^R	Coupri <i>et al.</i> , 2019
OG1RF	Dérivée d'une souche clinique, FUS ^R , RIF ^R	Murray <i>et al.</i> , 1993
V583	Souche clinique, VAN ^R	Sahm <i>et al.</i> , 1989
<i>Enterococcus faecium</i>		
Aus0004	Isolat clinique, AMP ^R , ERY ^R , KAN ^R , TEC ^R , VAN ^R	Lam <i>et al.</i> , 2012
BI18	Isolat clinique, référence 1230933, VAN ^R	Collection du Broad Institute
BI22	Isolat clinique, référence 1231410, VAN ^R	Collection du Broad Institute
<i>Staphylococcus aureus</i>		
MW2	CA-MRSA, souche sauvage	Baba <i>et al.</i> , 2002
MW2 $\Delta dltA$	MW2 mutée dans le gène <i>dltA</i>	Cette étude
CHU1	HA-MRSA, isolat T-SAR-01	Centre hospitalier et universitaire de Caen
CHU17	HA-MRSA, isolat T-SAR-17	Centre hospitalier et universitaire de Caen
CNRI	HA-MRSA, SCCmec de type I, référence HT20020269	Centre national de référence de Lyon
CNRI $\Delta dltA$	CNRI mutée dans le gène <i>dltA</i>	Cette étude
CNRII	HA-MRSA, SCCmec de type II, référence HT20020599	Centre national de référence de Lyon

CNRIII	HA-MRSA, SCCmec de type III, référence HT20020272	Centre national de référence de Lyon
CNRIV	HA-MRSA, SCCmec de type IV, référence HT20040100	Centre national de référence de Lyon
CNRV	HA-MRSA, SCCmec de type V, référence ST20050087	Centre national de référence de Lyon
CNRVI	HA-MRSA, SCCmec de type VI, référence HT20020274	Centre national de référence de Lyon
CNRVII	HA-MRSA, SCCmec de type VII, référence ST20141090	Centre national de référence de Lyon
CNRVIII	HA-MRSA, SCCmec de type VIII, référence ST20112957	Centre national de référence de Lyon
CNRIX	HA-MRSA, SCCmec de type IX, référence ST20112958	Centre national de référence de Lyon
CNRX	HA-MRSA, SCCmec de type X, référence ST20112959	Centre national de référence de Lyon
RN4220	Souche intermédiaire de clonage, mutée dans les gènes <i>sauI</i> et <i>hsdR</i> (déficiency dans ses enzymes de restriction)	Kreiswirth <i>et al.</i> , 1983
<i>Escherichia coli</i>		
EC101-pRB473	Porteur du plasmide pRB473, AMP ^R	Cette étude
DH5α-pRB473- <i>dlt</i>	Porteur du plasmide pRB473- <i>dlt</i> , AMP ^R	Cette étude
EC1000	RepA ⁺ , KAN ^R	Leenhouts <i>et al.</i> , 1996
EC1000-pMADΔ <i>dltA</i>	EC1000 porteur du pMADΔ <i>dltA</i> , AMP ^R	Cette étude

CA-MRSA : MRSA d'origine communautaire

HA-MRSA : MRSA d'origine hospitalière

SCCmec : cassette chromosomique de staphylocoque mec

^R : résistant ; FUS : acide fusidique ; RIF : rifampicine ; CHL : chloramphénicol ; AMP : ampicilline ; ERY : érythromycine ; KAN : kanamycine ; TEC : téicoplanine ; VAN : vancomycine.

Tableau 7 : Plasmides utilisés

Plasmides	Caractéristiques	Référence
pRB473	Contrôle négatif de complémentation, CHL ^R	Brückner, 1992
PRB473- <i>dlt</i>	pRB473 portant l'opéron entier <i>dlt</i> issu de <i>Staphylococcus xylosus</i> , CHL ^R	Peschel <i>et al.</i> , 1999
pMADΔ <i>dltA</i>	pMAD portant une version tronquée du gène <i>dltA</i> de <i>S. aureus</i> , ERY ^R	Brown <i>et al.</i> , 2012

^R : résistant ; CHL : chloramphénicol ; ERY : érythromycine

I.2 Milieux de culture

Escherichia coli a été cultivé en milieu Luria-Bertani (LB) (Miller, 1972). La mutagenèse chez *S. aureus* a nécessité l'utilisation du milieu Mueller-Hinton (MH) (Mueller and Hinton, 1941). Les expériences de physiologie bactérienne ont été réalisées en MH ou dans le milieu M17 (Terzaghi et Sandine, 1975) dans lequel le lactose est remplacé par 0.5% de glucose (GM17) (Glucose anhydre, Merck) pour les entérocoques, ou dans le milieu d'infusion cœur-cerveau (BHI) pour *S. aureus*. Les milieux gélosés ont été préparés à l'aide de 15 g/L d'agar (Biokar diagnostics). L'eau physiologique utilisée est composée de 0.9% de chlorure de sodium (Carlo Erba Reagents) dans de l'eau ultrapure. Les compositions précises du LB, du MH, du M17 et du BHI sont présentées dans le Tableau 8. La stérilisation des milieux est réalisée par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

Tableau 8 : Compositions des milieux

Milieux	Compositions	Concentrations	Fournisseurs
Luria-Bertani (LB)			
	Tryptone universelle	10 g/L	Biokar diagnostics
	Extrait de levure	5 g/L	Biokar diagnostics
	Chlorure de sodium	5 g/L	Carlo Erba Reagents
	pH7,1 ± 0,2		
Mueller-Hinton (MH)			
	Infusion de viande	2 g/L	} <i>Milieu déshydraté</i> Biokar diagnostics
	Hydrolysate de caséine	17,5 g/L	
	Amidon de maïs	1,5 g/L	
	Ca ²⁺	20 à 25 mg/L	
	Mg ²⁺	10 à 12,5 mg/L	
	pH7,3 ± 0,1		
Infusion cœur-cerveau (BHI)			
	Extrait cœur-cerveau	17,5 g/L	} <i>Milieu déshydraté</i> Biokar diagnostics
	Peptone pancréatique de gélatine	10 g/L	
	Chlorure de sodium	5 g/L	
	Glucose	2 g/L	
	Phosphate disodique	2,5 g/L	
	pH7,4 ± 0,2		

Milieu M17

Tryptone universelle	5 g/L	Biokar diagnostics
Peptone de farine de soja	5 g/L	Biokar diagnostics
Extrait de viande	5 g/L	Biokar diagnostics
Extrait de levure	2,5 g/L	Biokar diagnostics
Acide ascorbique	0,5 g/L	Sigma-Aldrich
β -Glycérophosphate de sodium	19 g/L	VWR
MgSO ₄	0,25 g/L	Sigma-Aldrich
pH7,15 $\pm$ 0,2		

I.3 Réactifs

Les antibiotiques utilisés (Tableau 9) ont été fournis par Sigma-Aldrich, à l'exception de l'oxacilline provenant de VWR. Après resuspension dans de l'eau ultrapure, les antibiotiques sont conservés en aliquots à -80°C. Chaque aliquot n'a été décongelé qu'une seule fois et ne sert que pour une expérimentation.

Tableau 9 : Antibiotiques utilisés

Antibiotiques		Abréviations
Aminoglycosides	Gentamicine	GEN
β-lactamines		
	<i>Pénames</i>	
	Amoxicilline	AMX
	Oxacilline	OX
	Pénicilline G	PEN
	<i>Céphalosporines</i>	
	Céfalotine	CEF
	Céfépime	FEP
	Céfotaxime	CTX
	Céftazidime	CAZ
	Céfuroxime	CXM
	<i>Carbapénème</i>	
	Imipénème	IPM
Glycopeptide	Vancomycine	VAN
Lipopeptide	Daptomycine	DAP
Macrolide	Erythromycine	ERY
Phénicolé	Chloramphénicol	CHL

L'inhibiteur de DltA a été synthétisé par l'équipe du Pr. LEQUEUX au LCMT (ENSICAEN). Le protocole de synthèse employé suit celui détaillé par May et ses collaborateurs en 2005 (Figure 17). L'inhibiteur lyophilisé obtenu est resuspendu dans de l'eau ultrapure et conservé en aliquots à -20°C.

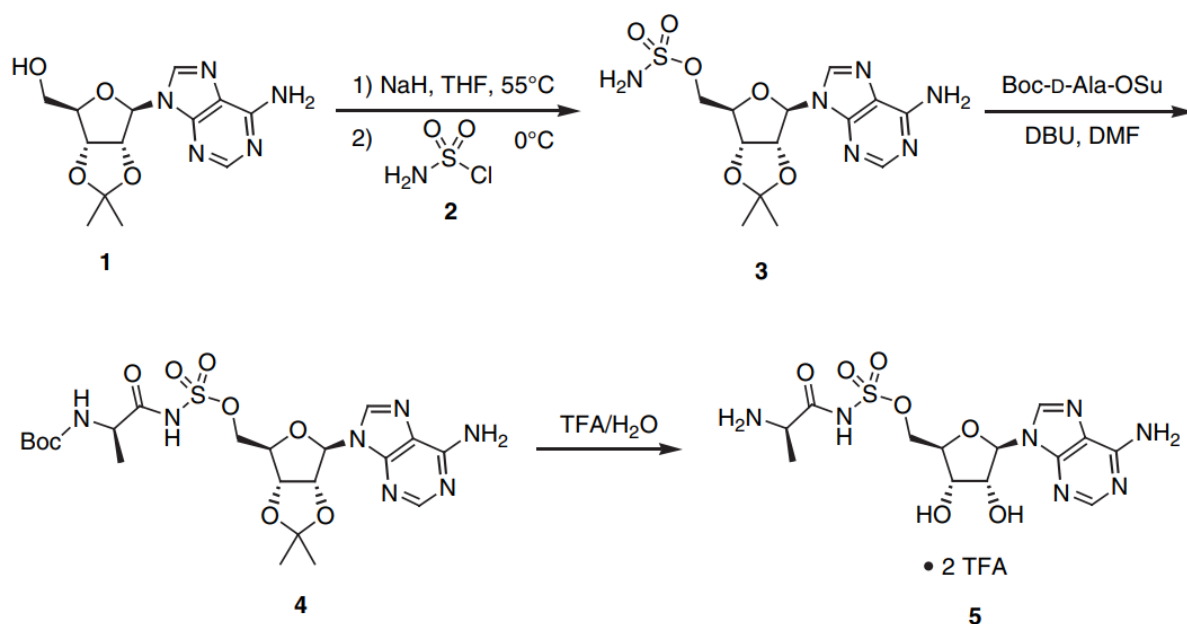


Figure 17: Schéma de synthèse de l'inhibiteur de DltA (source : May et al., 2005).

1 : 2',3'-O-Isopropylidène-adenosine; NaH : Hydrure de sodium ; THF : Tétrahydrofurane ;

2 : sulfamoyl-chlorure ;

3 : 2',3'-O-Isopropylidène-5'-O-sulfamoyl-adenosine ; Boc-D-Ala-OSu : ester de *N*-tert-Butoxycarbonyl-D-alanine-*N*-hydroxysuccinimide ; DBU : 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène ; DMF : diméthylformamide ; Boc : tert-Butoxycarbonyle ;

4 : 2',3'-O-Isopropylidène-5'-O-[*N*-(*N*-tert-butoxycarbonyl-D-alanyl)-sulfamoyl]-adenosine ; TFA : Acide trifluoroacétique ;

5 : 5'-O-[*N*-(D-alanyl)-sulfamoyl]- adénosine (nommé inhibiteur de DltA)

CHAPITRE II : TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET DE BIOCHIMIE

II.1 Transformation par électroporation

II.1.1 Préparation de cellules électrocompétentes et transformation d'*E. coli*

À partir d'une culture de nuit dans du milieu MH à 37°C sous agitation linéaire (120 coups/min), 500 mL de LB sontensemencés à 2% puis incubé à 37°C sous agitation circulaire (120 rpm) jusqu'à une DO_{600nm} de 0,8. La culture bactérienne est lavée avec 500 mL puis 250 mL d'eau ultrapure à 4°C et enfin avec 125 mL puis 62,5 mL de glycérol à 10%, pH7 et 4°C (Fisher BioReagents). Les centrifugations sont réalisées pendant 10 min à 5 000 rpm à 4°C. Après lavages, les cellules centrifugées sont reprises dans 500 µL de glycérol à 10%, pH7 et 4°C, et aliquotées par 50 µL. Les aliquots sont idéalement utilisés immédiatement pour la transformation ou conservés à -80°C.

Un aliquot d'*E. coli* électrocompétente est mélangé avec 2 à 10 ng d'ADN à transformer puis transféré dans une cuvette d'électroporation de 2 mm (Biorad) préalablement refroidie. L'électroporation est ensuite réalisée à l'aide d'un appareil Gene Pulser (Biorad) paramétré à une tension de 2,5 kV, une résistance de 200 Ω et une capacitance de 25 µF. Après le choc électrique, les cellules sont reprises immédiatement dans 1 mL de milieu LB et incubées pendant 30 min à 37°C sous agitation linéaire (120 coups/min). Les cellules sont alors étalées sur des boîtes de LB gélosé contenant la pression de sélection pour l'ADN transformé et incubées à 37°C jusqu'à apparition de colonies (de 24 à 48 h).

II.1.2 Préparation de cellules électrocompétentes et transformation d'entérocoques

À partir d'une culture de nuit dans du milieu GM17 à 37°C en condition statique, 100 mL de GM17 sontensemencés à 2 % et incubés à 37°C jusqu'à une DO_{600nm} de 0,5. La culture est alors refroidie sur glace pendant 15 min. Après centrifugation à 6 000 rpm à 4°C pendant 10 min, le culot bactérien est repris dans 1 mL de glycérol à 10 % stérile à pH4 à 4°C, puis centrifugé à 12 500 rpm pendant 90 sec à température ambiante. Le culot est repris dans 500 µL d'une solution de traitements aux muramidases-lysozyme-mutanolysine (Tableau 10). Après une incubation de 15 min à 37°C, 4 lavages successifs sont réalisés avec 1 mL de tampon

d'électroporation (EB) à 4°C et des centrifugations à 12 500 rpm pendant 90 sec à température ambiante. Les cellules sont ensuite centrifugées à 12 500 rpm pendant 3 min et repris avec 200 µL de tampon EB à 4°C. La solution dense de bactéries est alors aliquotée par 50 µL. Les aliquots sont préférentiellement utilisés immédiatement pour l'électroporation ou conservés à -80°C.

Tableau 10 : Compositions des solutions pour la transformation d'entérocoques

Solutions	Compositions	Concentrations	Fournisseurs
Solution de traitements aux muramidases-lysozyme-mutanolysine			
	Tris pH8,0	10 mM	Fisher Bioreagents
	Saccharose	20%	VWR
	Acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA)	10 mM	Sigma-Aldrich
	Chlorure de sodium	50 mM	Carlo Erba Reagents
	<i>Extemporément</i> : lysozyme	10 µg/mL	Sigma-Aldrich
	<i>Extemporément</i> : mutanolysine	10 U/mL	Sigma-Aldrich
Tampon d'électroporation (EB)			
	Saccharose	0,5 M	VWR
	Glycérol	10%	Fisher Bioreagents
Milieu de régénération			
	GM17	q.s.p.	
	Saccharose	0,5 M	VWR
	MgCl ₂	20 mM	Merck
	CaCl ₂	2 mM	Merck

Un mélange d'un aliquot de cellules électrocompétentes et de 2 à 10 ng d'ADN à transformer est réalisé, transféré dans une cuvette d'électroporation de 2 mm (Biorad) préalablement refroidie, et conservé au maximum 5 min sur glace. L'électroporation est ensuite réalisée à l'aide d'un appareil Gene Pulser (Biorad) paramétré à une tension de 2,5 kV, une résistance de 400 Ω et une capacitance de 25 µF. Après le choc électrique, les cellules sont reprises immédiatement dans 1 mL du milieu de régénération et incubées pendant deux générations à une température permissive pour le plasmide transformé. Les cellules sont alors étalées sur des boîtes de GM17 gélosé contenant la pression de sélection pour l'ADN transformé et incubées à température permissive jusqu'à apparition de colonies (de 48 à 96 h).

II.1.3 Préparation de cellules électrocompétentes et transformation de *S. aureus*

À partir d'une culture de nuit en milieu MH à 37°C avec une agitation linéaire de 120 coups/min, 100 mL de MH sontensemencés à 1% dans un erlenmeyer de 1 L avec ergot et incubés à 37°C sous agitation circulaire de 120 rpm. Lorsque la culture atteint une DO_{600nm} de 0,3, de la pénicilline G (0,12 µg/mL final) est ajoutée puis la culture est réincubée dans les mêmes conditions jusqu'à atteindre une DO_{600nm} de 0,7. La culture est alors lavée 2 fois avec une solution de sucrose à 4°C (100 mL puis 66 mL) et des centrifugations de 10 000 rpm à 4°C pendant 10 min (Tableau 11). Le culot obtenu après le dernier lavage est resuspendu dans 1 mL de solution de sucrose, puis aliquoté par 70 µL. Les aliquots sont congelés immédiatement et conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

Tableau 11 : Compositions de la solution tampon pour la transformation de *S. aureus*

Solution	Composition	Concentrations	Fournisseurs
Solution de sucrose			
	Saccharose	279,3 g/L	PanReac AppliChem ITW Reagents
	MgCl ₂	0,203 g/L	Merck

Après au minimum 1 h à -80°C, les aliquots sont décongelés 5 min à température ambiante. L'ADN à transformer (1 à 2 µg pour les plasmides) est ajouté aux cellules électrocompétentes. Le mélange est incubé à 4°C pendant 30 min puis transféré dans une cuvette d'électroporation de 2 mm (Biorad) préalablement refroidie. L'électroporation est réalisée dans un appareil Gene Pulser (Biorad) réglé à une tension de 2,3 kV, une capacitance de 25 µF et une résistance de 100 Ω. Après électroporation, les bactéries sont reprises immédiatement dans 1 mL de milieu MH à température ambiante et transférées dans un tube de 15 mL stérile. Le tube est alors placé dans un bain-marie (Grant) avec une légère agitation (mouvement orbital, 120 coups/min) à une température permissive pour l'ADN transformé pendant deux générations bactériennes. Pour une incubation à 30°C (transformation avec le pMAD*AdltA*), les bactéries sont incubées pendant 2 h. Après régénération des cellules, celles-ci sont étalées sur MH gélosé contenant l'antibiotique de sélection et incubées à température permissive jusqu'à apparition de colonies (48 h).

II.2 Solubilisation du pMAD Δ dltA et extraction de plasmides

1 μ g de plasmide pMAD Δ dltA, reçu par voie postale sur papier Whatman, a été solubilisé selon la méthode décrite par Thomson and Thilmony (Thomson and Thilmony, 2008) par transfert du papier dans un tube contenant 100 μ L de tampon d'élution (TE, 10 mM de Tris (Fisher Bioreagents), 1 mM d'EDTA (Sigma-Aldrich), pH8). Après 10 min à température ambiante, la solution est centrifugée à 14 500 rpm pendant 2 min. Le surnageant est alors utilisé comme matrice d'ADN pour la transformation d'*E. coli* EC1000. L'étalement après transformation est réalisé sur milieu LB gélosé complété par 100 μ g/mL d'ampicilline et 80 μ g/mL de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactopyranoside (X-Gal ; ThermoScientific). Les colonies bleues sont alors réisolées et testées par PCR avec les oligonucléotides pMAD_1F et pMAD_2R. Deux colonies positives aux tests sont alors ensemencées en milieu LB additionné de 100 μ g/mL d'ampicilline à 37°C sous agitation linéaire (120 coups/min) pendant une nuit. Une partie des cultures bactériennes est alors additionnée (v/v) avec du glycérol 30% et conservée à -20°C. La seconde partie des cultures est utilisée pour une extraction plasmidique. Les plasmides obtenus sont vérifiés par séquençage.

Les extractions plasmidiques ont été réalisées à l'aide du kit « NucleoSpin® Plasmid » (Macherey-Nagel). Les plasmides provenant des souches d'*E. coli* ont été extraits en suivant le protocole « Isolation of high-copy plasmid DNA from *E. coli* ». Les extractions chez *S. aureus* ont été réalisées selon le protocole « Isolation of low-copy plasmids, P1 constructs, or cosmids » en ajoutant 6 μ L d'une solution à 1 mg/mL de lysostaphine (Sigma-Aldrich) au tampon A1 suivi d'une incubation à 37°C pendant 20 min.

II.3 Réactions de polymérisation en chaîne (PCR)

Les réactions de polymérisation en chaîne (PCR) ont été réalisées avec l'enzyme ADN polymérase Q5 HF® (NEB) pour les fragments dépassant 2 kpb (vérification du pRB473-dlt et des mutants dltA chez *S. aureus*) et avec l'enzyme GoTaq® (Promega) pour les fragments inférieurs à 2 kpb (vérification du pRB473 et du pMAD Δ dltA). Les oligonucléotides utilisés et leurs applications sont listés dans le Tableau 12. Pour les vérifications à partir de colonies, la matrice d'ADN est constituée d'1 μ L de lysat cellulaire obtenu après broyage (Broyeur Retsch, 5 min à 30 coups/sec) d'une colonie dans 100 μ L d'eau ultrapure avec des billes de silice de

0,1 mm (Retsch). Les réactions de PCR ont été réalisées dans un thermocycleur Mastercycler Personal (Eppendorf).

Tableau 12 : Oligonucléotides utilisés et leurs applications

Oligo-nucléotides	Séquence (5'→3')	Applications	Tm	Taille théorique du fragment selon l'ADN testé
pRBfor_bis	TGTTTCAGAACGCTCGGTTG	Amont du SMC de pRB473	55°C	pRB473 : 0,2 kpb pRB473-dltA : 6 kpb
pRBrev_bis	TTAAGGGCACCAATAACTGCC	Aval du SMC de pRB473		
pMAD_1F	TCTAGCTAATGTTACGTTACAC	Amont du SMC du pMAD	56°C	pMADΔdltA : 2,5 kpb
pMAD_2R	TCATAATGGGGAAGGCCATC	Aval du SMC du pMAD		
MW01	GCAAGAAGGTTGCAAGGG	Amont du gène <i>dltA</i> de <i>S. aureus</i> MW2	60°C	Sauvage : 4 kpb Mutant ΔdltA : 2 kpb
MW02	TGTAATACACTTCGATACCATGCC	Aval du gène <i>dltA</i> de <i>S. aureus</i> MW2		

SMC : site multiple de clonage

II.4 Construction des mutants *dltA* chez *S. aureus*

Une mutagenèse dirigée contre le gène *dltA* a été réalisée dans les souches parentales *S. aureus* MW2 et CNRI à l'aide du plasmide pMAD Δ dltA (Figure 18) contenant notamment des fragments successifs d'environ 1 kpb homologues à l'amont et l'aval du gène *dltA*. Le plasmide pMAD Δ dltA a été transformé dans un premier temps dans la souche intermédiaire de clonage *S. aureus* RN4220 puis extrait (Grosser and Richardson, 2014). Le plasmide modifié par les enzymes de modification de *S. aureus* RN4220 est alors transformé dans les souches d'intérêt MW2 ou CNRI.

Les événements de double recombinaison homologue ont suivi la méthode décrite par Hébert et collaborateurs avec quelques modifications (Hébert *et al.*, 2007). Le milieu utilisé pour la mutagenèse a été le MH supplémenté avec 10 µg/mL d'érythromycine, 1 mg/mL de X-gal ou d'agar quand nécessaire. L'intégration du plasmide pMAD Δ dltA dans le génome bactérien est réalisée par le passage d'une culture à 30°C en présence d'érythromycine en début de phase exponentielle de croissance (trouble visible à l'œil) à une température de 42°C jusqu'à la phase stationnaire. La culture est alors réensemencée dans un milieu frais avec antibiotique pour un deuxième passage. Trois passages successifs sont réalisés. Les cellules sont ensuite étalées sur MH gélosé supplémenté d'érythromycine et de X-gal et incubées à 42°C pendant 48 h. Après

repiquage à 42°C, les colonies ayant une coloration bleutée sont ensemencées dans du milieu MH sans antibiotique à 42°C. Afin d'exciser le plasmide du chromosome, ces cultures subissent de 1 à 3 passages successifs de 30°C à 42°C, avec un étalement des bactéries après chaque passage sur MH gélosé supplémenté de X-gal. Les colonies non bleutées sont repiquées sur milieu MH avec du X-gal et sur milieu MH avec de l'érythromycine et du X-gal et incubées à 37°C pendant 24 h. Les colonies non bleutées et sensibles à l'érythromycine sont alors testées par PCR avec les oligonucléotides MW01 et MW02, afin de déterminer l'excision du plasmide et la présence du gène tronqué de *dltA*. Les mutants obtenus sont ensuite vérifiés par séquençage du génome.

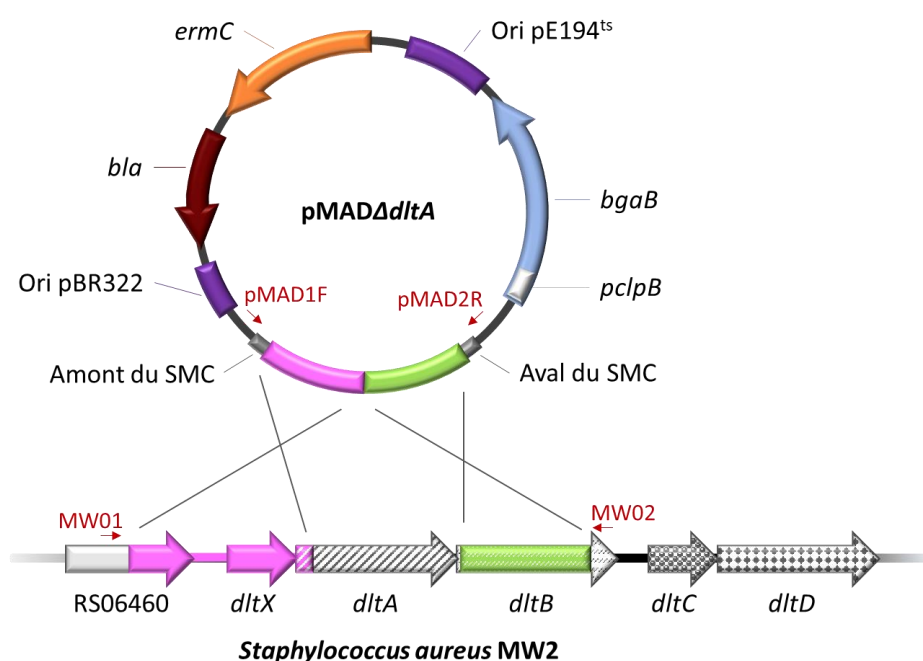


Figure 18 : Carte du plasmide pMADΔdltA comprenant les régions homologues aval et amont du gène *dltA* de *S. aureus* MW2 (d'après Arnaud et al., 2004; Brown et al., 2012).

SMC : site multiple de clonage ; *plcpB* : promoteur constitutif du gène *clpB* de *S. aureus* ; *bgaB* : gène de la β-galactosidase thermostable sous la dépendance du promoteur *plcpB* ; *Ori pE194^{ts}* : origine de réplication thermosensible chez *S. aureus* ; *ermC* : gène codant une ARNr méthylase (résistance à l'érythromycine) ; *bla* : gène codant une β-lactamase (résistance à l'ampicilline chez *E. coli*) ; *Ori pBR322* : origine de réplication chez *E. coli* ; Les flèches rouges désignent les oligonucléotides dont les séquences sont disponibles dans le tableau 12.

II.5 Séquencages

L'extraction de l'ADN total des bactéries a été réalisée à l'aide du kit « NucleoSpin® Microbial DNA » (Macherey-Nagel) en suivant les recommandations du fournisseur. La lyse

cellulaire a été réalisée par broyage mécanique avec des billes de verre (type B, MP Biomedicals) à l'aide de l'appareil FastPrep (Biomedicals) en utilisant les paramètres suivants : 6 m/s, pause de 300 s (3 cycles). La vérification de la quantité et de la qualité de l'extraction génomique a été effectuée par un dosage au spectrophotomètre à microvolume Nanodrop® (Thermofisher) et par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8%.

Les séquençages de vérification du plasmide pMAD Δ dltA ont été réalisées avec les oligonucléotides pMAD_1F et pMAD_2R par la société Eurofins Genomics. L'assemblage et l'alignements des séquences ont été réalisées à l'aide du logiciels Vector NTi 10.

Les séquençages des génomes par la méthode Illumina ont été réalisés par le LMSM Genomics pour les mutants et la souche parentale *S. aureus* MW2 et par CliniScience pour les souches issues de *S. aureus* CNRI. L'analyse des séquences a nécessité l'utilisation du logiciel « CLC Genomics Workbench version 10 » (Qiagen). Les génomes de référence utilisés ont été extraits de la base de données du NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>).

II.6 Trans-complémentation par le plasmide pRB473-dlt

Une complémentation hétérologue des mutants *dltA* a été réalisée avec le plasmide pRB473 contenant le gène de résistance pour le chloramphénicol et l'opéron entier *dlt* de *Staphylococcus xylosus* dans son site multiple de clonage (Figure 18). Ce plasmide a été transformé dans la souche *E. faecalis* JH2-2 et son mutants *dltA*. Après transformation, les cellules ont été étalées sur GM17 gélosé additionné de 10 µg/mL de chloramphénicol. La présence du plasmide dans les bactéries a été vérifiée par PCR avec les oligonucléotides pRBfor_bis et pRBrev_bis. Les témoins contenant uniquement le plasmide vide pRB473 ont également été réalisés.

II.7 Quantification des esters de D-alanine des acides téichoïques

La teneur en esters de D-alanine des acides téichoïques a été déterminée comme décrit par McBride et Sonenshein (McBride and Sonenshein, 2011), avec les modifications suivantes : les souches d'intérêt ont été cultivées dans 5 mL de BHI à 37°C et sous agitation circulaire à 120 rpm, en présence de l'inhibiteur de DltA à 1 mM quand nécessaire. Après 24 h d'incubation, les culots cellulaires sont récupérés par centrifugation puis congelés à -80°C pendant une nuit.

CHAPITRE III : TECHNIQUES D'ANALYSES PHYSIOLOGIQUES

III.1 Détermination et analyse des concentrations minimales inhibitrices

III.1.1 Détermination de la concentration minimale inhibitrice

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été déterminées par une méthode de micro-dilution en microplaque de 96 puits à fond plat (Starlab). Le protocole entre les CMI sur les entérocoques et les staphylocoques divergent par le milieu utilisé et les conditions de préculture. Le protocole est détaillé pour les entérocoques, les changements effectués pour l'étude des staphylocoques sont présentés ensuite.

Une culture de jour en condition statique estensemencée à une DO_{600nm} de 0,02 à partir d'une culture de nuit dans du milieu frais de GM17 ou MH, puis incubée à 37° jusqu'au début d'une phase exponentielle de croissance correspondant à une DO_{600nm} d'environ 0,2. Durant cette incubation, 100 μ L de milieu frais sont répartis dans chaque puits d'une microplaque 96 puits. Les solutions d'antibiotiques concentrées, conservées à -80°C, sont alors diluées dans du milieu frais jusqu'à une concentration de 4X. Cette solution est utilisée comme point de départ pour une dilution en série au demi directement dans la microplaque. La culture de jour, ajustée à une DO_{600nm} de 0,2, est diluée au 1/100ième puis distribuée par 100 μ L dans les puits correspondants. Les puits servant de témoins négatifs, contrôlant l'absence de contamination du milieu, sont complétés avec 100 μ L de milieu. La taille de l'inoculum, compris entre 5.10^5 et 5.10^6 UFC/mL par puits, est vérifiée par dénombrement en surface sur milieu gélosé. La microplaque est scellée de parafilm et incubée à 37°C pendant 24 h. La détermination de la valeur de la CMI est réalisée visuellement à la concentration d'antibiotique la plus faible pour laquelle le milieu n'est pas trouble, indiquant une inhibition de la croissance bactérienne.

Les changements réalisés pour la détermination des CMI chez les staphylocoques sont les suivants. Le milieu utilisé est le BHI. Les cultures de nuit et de jour sont incubées avec une agitation à 120 rpm. La culture de jour estensemencée à une DO_{600nm} de 0,05 jusqu'à une DO_{600nm} d'environ 0,5. Après dilution des antibiotiques dans la microplaque, 20 μ L d'une solution d'inhibiteur de DltA à 10 mM, diluée dans de l'eau ultra pure, sont ajoutés pour obtenir une concentration finale de 1mM dans les puits correspondants. Les puits sans inhibiteur sont complétés par 20 μ L d'eau ultrapure. L'ensemencement bactérien est réalisé avec 80 μ L de la

culture de jour ajustée à une DO_{600nm} de 0,5 puis diluée au 1/10^{ième} ou au 1/100^{ème} en fonction de la souche pour obtenir un inoculum d'une taille comprise entre 5.10^5 et 5.10^6 UFC/mL par puits.

III.1.2 Analyse statistique

Les données de CMI retenues sont la moyenne de 3 réplicats biologiques indépendants. Pour les résultats chez *S. aureus*, des analyses statistiques de l'ensemble des souches étudiées pour chaque antibiotique ont été réalisées sur le logiciel GraphPad Prism 7.00. Les CMI sans inhibiteur et avec inhibiteur ont été comparées par un test de Student à deux échantillons indépendants. Les variances de ces échantillons étant inégales, une correction de Welsh a été appliquée. Des données avec une pvalue inférieure à 0,05 sont considérées comme statistiquement différentes.

III.2 Détermination de la survie bactérienne

Les expériences de survie bactérienne ont été réalisées en microplaque 96 puits à fond plat (Starlab). Comme précédemment, le protocole est détaillé pour les entérocoques et les modifications effectuées pour l'étude des staphylocoques sont indiquées ensuite.

Comme pour les CMI, une culture de nuit statique a été diluée à une DO_{600nm} de 0,02 dans du milieu GM17 frais. La culture de jour a été incubée à 37°C jusqu'à atteindre une DO_{600nm} d'environ 0,2. Pendant cette incubation, les antibiotiques dilués à une concentration de 10X seuls ou en combinaison dans du milieu frais et l'inhibiteur de DltA dilué dans de l'eau ultrapure à une concentration de 10X sont ajoutés dans les puits correspondants. La dose d'inhibiteur est fixée à 0,5 mM dans la microplaque. Les puits témoins sans antibiotique et sans inhibiteur sont complétés respectivement de milieu et d'eau ultrapure. La culture de jour est alors ajustée à une DO_{600nm} de 0,2 puis distribuée dans la microplaque, correspondant à un ensemencement d'environ 5.10^8 UFC/mL dans chaque puits. Des puits contenant du milieu seul sont également réalisés. La taille de l'inoculum est alors vérifiée immédiatement par dénombrement en surface sur GM17 gélosé, identifié comme le T_0 . La microplaque est ensuite scellée de parafilm et incubée à 37°C. Après 24 h d'incubation, un dénombrement en surface est réalisé sur chacun

des puits (T_{24}). La survie bactérienne relative est alors calculée en divisant les dénombrements du T_{24} par le T_0 .

Pour les survies de staphylocoques, les milieux utilisés sont le BHI et le BHI gélosé quand nécessaire. La culture de jour a été préparée similairement à la CMI, c'est-à-dire ensemencée à une DO_{600nm} de 0,05 jusqu'à une DO_{600nm} d'environ 0,5 sous agitation à 120 rpm, puis ajustée à DO_{600nm} précise de 0,5. L'ensemencement de la microplaque à T_0 correspond à une concentration d'environ 2.10^8 UFC/mL dans les puits. La concentration finale d'inhibiteur de DltA dans les puits est de 1 mM.

III.3 Étude de l'inhibition et de l'éradication de biofilm par la méthode du cristal violet

III.3.1 Préparation des biofilms

Les études sur l'inhibition de biofilm (BI) et l'éradication de biofilm (BE) ont été réalisées sur *S. aureus* MW2 et son mutant *ΔdltA* en se basant sur les recommandations de Allkja et collaborateurs (Allkja et al., 2020). Les microplaques 96 puits utilisées sont en polystyrène à fond plat (Starlab). Le milieu utilisé est le BHI supplémenté par 2% de glucose (BHI-G). Des cultures de jour ont été réalisées en diluant des cultures de nuit à une DO_{600nm} de 0,05 et incubées 2h30 à 37°C sous agitation à 120 rpm. Les cultures de jour ont ensuite été lavées dans du milieu frais et ajustées pour un ensemencement final dans la microplaque à une DO_{600nm} de 0,1.

Pour les études de BI, les antibiotiques et l'inhibiteur de DltA ont été préparés et ajoutés dans la microplaque comme décrit précédemment pour les CMI. Une fois ensemencées, les microplaques sont scellées par du parafilm et incubées à 37°C. Après 24 h, la quantité de biofilm est déterminée par la méthode du cristal violet.

Pour les expériences de BE, les microplaques ont été ensemencées de la même manière que précédemment et incubées à 37°C. Après 24 h d'incubation et formation de biofilm, chaque puits est lavé délicatement à la pipette 2 fois avec de l'eau physiologique pour éliminer les cellules en suspension tout en conservant le biofilm. Les microplaques sont ensuite laissées 45 min sous PSM sans couvercle afin d'évaporer l'eau de lavage et minimiser une potentielle dilution des antibiotiques ajoutés ensuite. Du milieu frais est ajouté délicatement sur le biofilm de chaque puits. Ce milieu contient les antibiotiques et/ou l'inhibiteur de DltA à 1 mM. Les

microplaques sont alors de nouveau scellées de parafilm et incubées à 37°C. Après 24 h, la visualisation du biofilm ainsi que sa quantification ont été déterminées par la méthode du cristal violet décrite ci-après.

III.3.2 Coloration du biofilm par le cristal violet

Le principe de la visualisation du biofilm consiste à colorer le biofilm présent dans les puits par du cristal violet, d'ôter l'excédent de colorant, puis de dissoudre ce colorant dans un solvant et de mesurer sa densité optique.

Dans un premier temps, le biofilm de chaque puits est lavé 2 fois délicatement à la pipette à l'aide d'eau physiologique. Après évaporation de l'eau restante sous PSM pendant 45 min, une solution à 0,1% de cristal violet, repris dans de l'eau ultrapure, est ajoutée dans chaque puits. Le cristal violet est ensuite ôté délicatement et le biofilm est lavé 3 fois à l'aide d'eau physiologique afin d'enlever l'excédent de colorant non absorbé par le biofilm. Après un nouveau séchage de 45 min, chaque puits est traité avec une solution d'acide acétique glacial (VWR) dilué à 30% dans de l'eau ultrapure. Après 15 min de contact, le biofilm est resuspendu par un pipetage vigoureux puis une agitation orbitale à une amplitude de 3 mm (218,3 rpm) de 10 min au lecteur de microplaque (TECAN). La densité optique est alors mesurée à 570nm pour chaque puits par le lecteur de microplaque. L'homogénéité des suspensions de biofilm est vérifiée par des mesures multiples dans chaque puits (9 mesures par puits).

III.3.3 Quantification du biofilm

Chaque microplaque contient 8 réplicats internes de contrôle négatif sans bactérie, 4 réplicats de contrôle positif contenant uniquement les bactéries sans antibiotique ni inhibiteur et 4 réplicats d'échantillons (3 pour les expériences avec inhibiteur). Les données ont été analysées intraplaque.

Les données brutes d'absorbance (échantillons et contrôles positifs) ont été corrigées en soustrayant la moyenne des absorbances des contrôles négatifs. Puis, les données corrigées de chaque échantillon ont été divisées par la moyenne des contrôles positifs, permettant alors de calculer l'absorbance relative de chaque échantillon.

Les données finales comprennent les résultats de 3 réplicats biologiques (2 pour les expériences avec inhibiteurs). Les données de l'ensemble des expériences sont compilées dans un graphique de boîtes de Tukey, appelées également boîtes à moustache. Cette représentation graphique permet de prendre en compte la variabilité des valeurs mesurées par la méthode du cristal violet (Allkja *et al.*, 2020).

La concentration minimum inhibitrice de biofilm (MBIC₉₀) et la concentration minimum d'éradication du biofilm (MBEC₉₀) ont été définies comme les concentrations d'antibiotiques les plus faibles capables d'inhiber, ou d'éradiquer, 90% du biofilm comparé aux conditions sans antibiotiques (100%) (Zhou *et al.*, 2020), c'est-à-dire lorsque les données d'absorbance relative à ces concentrations d'antibiotique étaient inférieures à 10%.

CHAPITRE IV : ÉTUDES DANS L'HÔTE *GALLERIA MELLONELLA*

Les larves d'insectes de *Galleria mellonella* sont élevées au sein du laboratoire. Leur élevage, leur sélection et les injections intra-hémolytiques ont été réalisés en suivant les recommandations décrites par Ramarao (Ramarao, 2012). Ces travaux de thèse ont été l'occasion de mettre au point un protocole de traitement des infections à entérocoques et à *S. aureus* dans ce modèle animal.

IV.1 Infection et traitement dans le modèle *G. mellonella*

IV.1.1 Préparation de l'inoculum

La première étape consiste à réaliser une culture de jour des souches d'intérêt jusqu'au milieu de la phase exponentielle de croissance. La culture est ensuite lavée deux fois dans l'eau physiologique puis ajustée à une DO_{600nm} dépendante de la souche testée correspondant à environ 10^6 UFC/mL.

Pour les entérocoques, la culture de jour estensemencée à DO_{600nm} 0,02 en GM17 en condition statique et incubée à 37°C, jusqu'à une DO_{600nm} proche de celle souhaitée après ajustement. L'ajustement de la densité optique après lavage pour *E. faecalis* JH2-2, du mutant $\Delta dltA$ correspondant ainsi que la souche V583 est fixé à 0,6, pour *E. faecalis* OG1RF à 0,3 et pour *E. faecium* à 1,5. Ces DO_{600nm} ont été choisies afin d'obtenir une virulence similaire des différentes souches dans les larves et permettre un traitement potentiel de leurs infections.

Pour les staphylocoques, les cultures bactériennes ont été réalisées en BHI sous agitation à 120 rpm, en partant d'une DO_{600nm} de 0,05. Après incubation jusqu'à une DO_{600nm} d'environ 2, les suspensions bactériennes sont lavées et ajustées à une DO_{600nm} précise de 2.

IV.1.2 Infection bactérienne

Les suspensions bactériennes sont injectées par voie intra-hémolytique à chaque animal. Cette injection est réalisée à l'aide d'une aiguille 26G (Terumo) et d'une pompe à seringue

(Fisher Scientific) délivrant 10 µL de solution à 10 mL/h. Pour les entérocoques comme pour les staphylocoques, les concentrations bactériennes injectées dans les chenilles sont proches de 10⁶ UFC/animal et ont été vérifiées par dénombrement en surface. Les larves infectées sont alors réparties par lot de 5 dans des boîtes de Petri et incubées à 37°C durant 2 h.

IV.1.3 Traitement post-infection

Après 2 h d'infection, une seconde injection de traitement est administrée aux chenilles. Les différents traitements, dilués dans de l'eau physiologique, correspondent aux antibiotiques seuls ou en combinaison en présence ou en absence de l'inhibiteur de DltA. Un contrôle négatif de traitement contenant uniquement de l'eau physiologique est également réalisé. Les combinaisons de molécules sont réalisées en amont de l'injection. Les doses administrées sont de 0,3 ou 0,6 mg/kg d'amoxicilline, 1 mg/kg de céfotaxime, 1 ou 2 mg/kg d'oxacilline, 0,06 mg/kg d'imipénème et de 48,5 mg/kg d'inhibiteur de DltA. Les doses dépendent du genre bactérien et de la souche étudiée. Après traitement, les larves sont de nouveau incubées à 37°C et le nombre de chenilles vivantes est alors déterminé toutes les 4 h entre 12 h et 48 h post-infection. Les expériences ont été réalisées de 3 à 4 fois en fonction des souches étudiées afin d'obtenir un total de 45 à 60 chenilles par condition.

IV.2 Analyse statistique

Les données de survies ont été traitées via le logiciel de statistique « R » (<http://www.R-project.org/>) avec les librairies « survival » et « survminer ». Les données ont été représentées par des courbes de survie de Kaplan-Meier. Afin de déterminer si une des courbes est statistiquement différente de l'ensemble des autres, une comparaison multiple est nécessaire. Cette comparaison s'appuie sur le test du log-rank et un ajustement par la méthode de Bonferroni (Tripathi and Pandey, 2017). Des courbes avec une pvalue inférieure à 0,05 ont été considérées comme statistiquement différentes.

Résultats et Discussions

Résultats et Discussions

CHAPITRE I : INACTIVER LA D-ALANYLATION DES ACIDES TÉCHOÏQUES POUR SENSIBILISER LES ENTÉROCOQUES D'INTÉRÊT CLINIQUE AUX β -LACTAMINES

I.1 Résumé de la publication

Depuis plusieurs décennies, les entérocoques, *E. faecalis* et *E. faecium* en tête, font partie des principaux pathogènes associés aux soins. L'émergence des infections qu'ils provoquent est notamment due à leur haute capacité de résistance vis-à-vis des β -lactamines, antibiotiques couramment utilisés en milieu clinique, particulièrement les pénicillines et les céphalosporines. Ainsi, ces résistances limitent de plus en plus les options thérapeutiques à mettre en place pour contrer ces infections. Les entérocoques possèdent dans leur paroi des acides téchoïques (TAs), polymères anioniques dont la charge négative peut être modifiée par l'ajout de résidus D-alanine, plus connu sous le nom de D-alanylation. Cette modification nécessite l'activité de 4 protéines, nommées DltA, DltB, DltC et DltD, codées par l'opéron *dlt*. Notre objectif est de montrer que l'inhibition du mécanisme de D-alanylation des TAs resensibilise les entérocoques à certains antibiotiques pour lesquels ils sont résistants.

Les analyses physiologiques d'un mutant *dltA* chez *E. faecalis* JH2-2 montrent une légère sensibilisation de cette souche à plusieurs céphalosporines. Ce phénotype de sensibilité est renforcé par l'association de ces céphalosporines avec une faible quantité d'amoxicilline, l'effet le plus marquant étant observé pour la combinaison d'amoxicilline et de céfotaxime. De plus, l'inactivation pharmacologique de la D-alanylation des TAs, à l'aide d'un inhibiteur de DltA, sensibilise la souche sauvage JH2-2 à cette combinaison de β -lactamines de manière similaire à l'inactivation génétique de *dltA*. A noter que des résultats similaires ont été observés chez deux autres isolats cliniques d'*E. faecalis*.

Une preuve de concept importante pour montrer qu'un inhibiteur de la D-alanylation des TAs pourrait constituer un adjuvant de choix lors d'un traitement par une β -lactamine est de montrer son efficacité et son absence de toxicité dans un modèle animal. *Galleria mellonella*

est un insecte possédant un système immunitaire inné complexe proche de celui des mammifères, représentant ainsi un modèle de choix dans l'étude des infections bactériennes. Des analyses de virulence chez les entérocoques sont régulièrement conduites dans cet hôte au sein de l'U2RM et, se basant sur ce savoir-faire, nous avons mis au point un protocole de traitement des infections à entérocoques dans ce modèle animal. Après avoir déterminé l'absence de toxicité des antibiotiques et de l'inhibiteur de DltA pour les chenilles *G. mellonella*, nous avons défini la dose bactérienne nécessaire pour établir une infection, le moment critique d'administration du traitement (2 h post-infection) ainsi que les doses d'antibiotiques et d'inhibiteurs à administrer (0,3 ou 0,6 mg/kg d'amoxicilline, 1 mg/kg de céfotaxime et 48,5 mg/kg d'inhibiteur de DltA). Les points de mesures les plus pertinents pour la survie des chenilles ont été fixés à toutes les 4 h durant 48 h d'expérimentation.

Les expériences d'infections et de traitements ont été réalisées dans un premier temps avec la souche sauvage et la souche mutante *dltA* d'*E. faecalis* JH2-2. Les résultats obtenus montrent que le traitement amoxicilline/céfotaxime est plus efficace contre une infection provoquée par le mutant *dltA* que contre une infection due à la souche sauvage. De manière identique, un traitement avec l'inhibiteur de DltA et la combinaison d'antibiotiques améliore nettement la survie des chenilles infectées par la souche sauvage. Une telle observation est également obtenue pour des infections dues à deux autres isolats clinique d'*E. faecalis* mais également celles provoquées par des isolats cliniques d'*E. faecium* résistants à la vancomycine.

L'ensemble de ces résultats montre l'intérêt du mécanisme de D-alanylation des TAs comme cible thérapeutique servant alors comme base de traitements pour lutter contre les infections à entérocoques multirésistants.

I.2 Publication publiée au Journal of Antimicrobial Chemotherapy

Les résultats mentionnés ci-avant font l'objet de la publication suivante :

Genetic and pharmacological inactivation of D-alanylation of teichoic acids sensitizes pathogenic enterococci to β -lactams.

Coupri, D., Budin-Verneuil, A., Hartke, A., Benachour, A., Léger, L., Lequeux, T., Pfund, E., and Verneuil, N. (2019).

Journal of Antimicrobial Chemotherapy 74, 3162–3169. doi:10.1093/jac/dkz322

Genetic and pharmacological inactivation of D-alanylation of teichoic acids sensitizes pathogenic enterococci to β -lactams

Delphine Coupri¹, Aurélie Budin-Verneuil¹, Axel Hartke¹, Abdellah Benachour¹, Loïc Léger¹, Thierry Lequeux², Emmanuel Pfund² and Nicolas Verneuil^{1*}

¹Normandie Université, UNICAEN, U2RM, 14000, Caen, France; ²Normandie Université, Laboratoire de Chimie Moléculaire et Thioorganique UMR 6507, ENSICAEN, UNICAEN, CNRS, 6 Bd du Maréchal Juin, 14050, Caen, France

*Corresponding author. E-mail: nicolas.verneuil@unicaen.fr

Received 26 March 2019; returned 29 May 2019; revised 20 June 2019; accepted 28 June 2019

Background: Enterococci intrinsically resistant to cephalosporins represent a major cause of healthcare-associated infections, and the emergence of MDR makes therapeutic approaches particularly challenging.

Objectives: Teichoic acids are cell wall glycopolymers present in Gram-positive bacteria. Teichoic acids can be modified by D-alanylation, which requires four proteins encoded by the *dltABCD* operon. Our objective was to evaluate the Dlt system as a druggable target to treat enterococcal infections.

Methods: The susceptibility of a D-alanylation-deficient strain of *Enterococcus faecalis* to β -lactam antibiotics individually and/or in combination was analysed. Moreover, a DltA inhibitor was synthesized to test pharmacological inhibition of D-alanylation *in vivo* and in host using the animal model *Galleria mellonella* with different clinical isolates of *E. faecalis* and *Enterococcus faecium*.

Results: Most cephalosporins used as mono treatment had no impact on survival of the parental strain, but were slightly lethal for the *dltA* mutant of *E. faecalis*. Addition of a very low concentration of amoxicillin significantly increased killing of the *dltA* mutant under these conditions. The most spectacular effect was obtained with a combination of cefotaxime (1 mg/L) and amoxicillin (0.03 mg/L). In the presence of the inhibitor, the WT strain was as susceptible to this combination treatment as the *dltA* mutant. This molecule associated with the antibiotics was also effective in killing other *E. faecalis* clinical isolates and successfully prevented death of *Galleria* infected with either *E. faecalis* or *E. faecium*.

Conclusions: The combined results support the potential usefulness of the Dlt system as a target to potentiate antibiotic combination therapies for the treatment of drug-resistant enterococci.

Introduction

Enterococci are Gram-positive facultative anaerobic ubiquitous inhabitants of the gastrointestinal tract of humans. Initially considered as non-virulent commensal organisms with a low clinical impact, enterococci have emerged in recent decades as major healthcare-associated pathogens.^{1–3} Common enterococcal diseases are mainly due to *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*, and include infective endocarditis (IE; 97% due to *E. faecalis*), urinary tract infections, bacteraemia, and intra-abdominal, pelvic and soft tissue infections.^{4,5} Due to various intrinsic or acquired mechanisms, enterococci (especially *E. faecium*) exhibit remarkable resistance to the most important therapeutic antibiotics.⁶ Thus, treatment of infections by these emergent MDR bacteria is increasingly challenging.⁷

Enterococci are also highly tolerant to the bactericidal activities of cell wall-targeting drugs.^{8,9} Therefore, combination therapies were investigated for increased bactericidal effects. One of the favoured options recommended by the 2015 national IE guideline to treat high-density enterococcal infections is a combination therapy of two β -lactam antibiotics.⁵ These drugs are inhibitors of PBPs involved in cell wall biosynthesis. Currently, amoxicillin/ceftriaxone treatment of infective *E. faecalis* endocarditis is the only combination for which supportive clinical data are available.¹⁰ However, ceftriaxone treatment represents a risk factor for *Clostridioides* (*Clostridium*) *difficile* infections¹¹ and overgrowth of vancomycin-resistant *E. faecium* strains.¹⁰ While active against *E. faecalis*, no antimicrobial cooperation has been observed against *E. faecium* for such a drug combination.¹² Therefore, studies investigating al-

ternative treatments are critical to maintain therapeutic efficiency against these pathogens.

Along with the discovery of new antibiotics, the use of specific target-inhibiting adjuvants in combination with clinically relevant antibiotics could be an effective treatment against enterococcal infections.¹³ We show in this article that D-alanylation of teichoic acids (TAs) might represent such a promising target.

TAs are known to be anionic polymers composed of alditol phosphate repeats, which correspond to one of the important components of the cell wall of many Gram-positive bacteria. These polymers are composed of wall TAs covalently linked to peptidoglycan and lipoteichoic acids attached to the cytoplasmic membrane via a glycolipid anchor.¹⁴ These negatively charged polymers can be modified by the attachment of D-alanyl residues, reducing the overall negative charge of these molecules.¹⁵ D-Alanylation of TAs requires four proteins encoded by the D-alanyl lipoteichoic acid operon *dltABCD*.^{14,16} The degree of D-alanylation varies with environmental conditions.¹⁵ Several studies carried out in various Gram-positive bacteria have shown that D-alanylation plays a key role in different processes including cell morphology and division, defence against antibiotics and/or cationic antimicrobial peptides, virulence and even in the host commensal bacteria molecular dialogue occurring in the intestine.^{17–19} Moreover, in an MRSA strain, a *dltA* mutant exhibited decreased resistance to methicillin and imipenem compared with the MW2 WT strain.²⁰

In the present study, we analysed susceptibility of *E. faecalis* and *E. faecium* strains defective in D-alanylation of TAs to antibiotics individually and in combination. First, we show that genetic or pharmacological inactivation of D-alanylation of TAs strongly increased the susceptibility of *E. faecalis* strains to some of these drug treatments. In addition, we present results demonstrating that these treatments are also efficient in an animal model of

infection with *E. faecalis* and *E. faecium*, arguing that D-alanylation inhibition could be an interesting new strategy to treat infections with MDR enterococci.

Materials and methods

Bacterial strains and growth medium

Bacterial strains used in this study are listed in Table 1. *E. faecalis* and *E. faecium* were cultivated at 37°C in M17²¹ medium supplemented with 0.5% glucose (GM17 medium). *Escherichia coli* and *E. faecalis* harbouring the pRB473 plasmid were cultured in the presence of 10 and 15 mg/L chloramphenicol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), respectively. Amoxicillin, penicillin G, cefotaxime, vancomycin, gentamicin, daptomycin, cefalotin, cefuroxime, ceftazidime and cefepime were purchased from Sigma-Aldrich. When needed, the antibiotics were diluted in GM17 medium. Lyophilized DltA inhibitor was solubilized in sterilized pure water to obtain a final concentration of 10 mM. When needed, this stock solution was appropriately diluted in GM17 medium.

Construction of the trans-complemented *dltA*comp strain

All DNA manipulations were performed using standard techniques of molecular biology.²² Heterologous complementation of the *dltA* mutant was realized using the vector pRB473 carrying the entire WT *dlt* operon of *Staphylococcus xylosus*²³ (Table 1) and then verified by PCR and sequenced using the pRB473-specific primers 5'TGTTTCAGAACGCTCGGTTG3' and 5'TTAAGGGCACCAATAACTGCC3'. As a control, the *dltA* mutant was also electroporated with the empty vector.²⁴

Chemical synthesis of the DltA inhibitor

The DltA inhibitor {5'-O-[N-(D-alanyl)-sulfamoyl]-adenosine} was chemically synthesized as described by May et al.²⁵

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

	Characteristics	Reference
Bacterial strains		
<i>E. faecalis</i>		
JH2-2	derived from clinical isolate, FUS ^R , RIF ^R	31
JH2-2pRB	JH2-2 strain carrying pRB473	this study
Δ dltA	JH2-2 strain mutated in the <i>dltA</i> gene	32
Δ dltApRB	Δ dltA carrying pRB473, CHL ^R	this study
Δ dltAcomp	Δ dltA complemented with pRB473- <i>dlt</i> , CHL ^R	this study
OG1RF	derived from clinical isolate, FUS ^R , RIF ^R	33
V583	clinical isolate, VAN ^R	34
<i>E. faecium</i>		
BI18	1230933 clinical isolate, VAN ^R	Broad Institute Collection
BI22	1231410 clinical isolate, VAN ^R	Broad Institute Collection
Aus0004	clinical isolate, AMP ^R , ERY ^R , KAN ^R , TEC ^R , VAN ^R	35
Plasmids		
pRB473	CHL ^R	24
pRB473- <i>dlt</i>	pRB473 harbouring the <i>dlt</i> operon from <i>S. xylosus</i>	23

AMP, ampicillin; CHL, chloramphenicol; ERY, erythromycin; FUS, fusidic acid; KAN, kanamycin; RIF, rifampicin; TEC, teicoplanin; VAN, vancomycin; ^R, resistant.

MIC determination

An overnight culture was diluted to obtain a final OD₆₀₀ of 0.02 in fresh GM17 or Mueller–Hinton (MH) medium and incubated at 37°C until early log phase (OD₆₀₀ of ~0.2). An aliquot of 100 μ L of GM17 or MH broth was distributed in a 96-well microplate (Bio-Rad, CA, USA). An aliquot of 100 μ L of a 4 $\times$ antibiotic solution was added into the first well and then serially diluted to half. The cultures with an OD₆₀₀ of ~0.2 were diluted 100 times, and 100 μ L was distributed to obtain between 5 $\times$ 10⁵ and 5 $\times$ 10⁶ cfu/mL per well and the plates were then incubated for 24 h at 37°C. The inoculum size was controlled by plate counting on GM17 agar plates. The MIC was visually determined as the lowest antibiotic concentration that inhibited bacterial growth.

Bacterial survival

As described above, an overnight culture was diluted to an OD₆₀₀ of 0.02 in fresh GM17 medium and incubated at 37°C until an OD₆₀₀ of ~0.2 was reached. Cells were distributed on a 96-well microplate (Bio-Rad) to obtain ~5 $\times$ 10⁸ cfu/mL per well. When necessary, antibiotics diluted in GM17 were added alone or in combination. In the same way, DltA inhibitor was added when required. Samples were collected immediately (*T*₀) to confirm the inoculum size and after 24 h of incubation at 37°C to determine the survival of the different strains by plate counting on GM17 agar.

Infection and drug treatment of *Galleria mellonella*

Bacterial strains of enterococci were cultured as previously described in GM17 broth at 37°C, harvested at mid-log phase and washed twice in saline solution (0.9% NaCl). Cultures were adjusted to reach a density of ~5 $\times$ 10⁶ cfu/animal and injected into the last proleg of *G. mellonella* larvae of ~0.215 g each, using a 26 G needle (Terumo, Belgium) and a syringe pump (ThermoFisher, MA, USA). The bacterial inoculum size was verified by plate counting on GM17 agar. Saline solution, amoxicillin at 0.3 or 0.6 mg/kg, cefotaxime at 1 mg/kg and/or DltA inhibitor at 48.5 mg/kg were administered alone or in combination, when appropriate, 2 h post-infection. Larvae were injected and then housed five per Petri dish and incubated at 37°C for 48 h. Live and dead larvae were counted every 4 h, from 12 to 48 h post-infection. Three or four independent experiments were performed to treat a total of 45–60 animals per condition.

Statistical analysis

In host data are represented as Kaplan–Meier curves. Results were analysed with the statistical software 'R' (<http://www.R-project.org/>, Vienna, Austria), using log-rank test. For multiple comparisons, a Bonferroni adjustment was applied.²⁶ Curves were considered as statistically different if *P* values were <0.05.

Results

Genetic inactivation of α -alaninylation of TAs sensitizes *E. faecalis* to antibiotic combinations

We started our investigation by comparing the resistance of the *E. faecalis* JH2-2 WT strain and its isogenic mutant, harbouring an inactivated *dltA* gene leading to the inhibition of the TA α -alaninylation process, to several clinically relevant antibiotics targeting the cell wall as well as membrane or ribosomal proteins. The MIC of ceftazidime in GM17 medium was slightly lower for the *dltA* mutant, whereas the MICs of the other tested antibiotics were similar to those for the *E. faecalis* parent strain (Table 2). Of note, no differences in MICs were observed in MH medium (Table S1, available as [Supplementary data](#) at JAC Online). Moreover, after 24 h of

exposure to cephalosporins, a difference in survival of the two strains was only observed with cefotaxime, a third-generation cephalosporin. This treatment was bacteriostatic for the WT, but lethal for the *dltA* mutant, with a drop in survival of nearly 1 log₁₀ (Figure 1a).

Combination therapies are increasingly seen as attractive options to fight the inexorable spread of antibiotic resistance. Therefore, we explored the effects of combinations of the antibiotics previously tested alone on the survival of *E. faecalis* JH2-2 WT and *dltA* mutant strains. Survival curves showed that the *dltA* mutant was greatly more susceptible to killing than the WT strain by some of these drug combinations (Figure 1a). The strongest killing effect was observed for the combination of cefotaxime (1 mg/L; 1/1000 MIC) with a very low concentration of amoxicillin (0.03 mg/L; 1/16 MIC), leading to decreased survival of the *dltA* mutant by nearly 3 log₁₀ after 24 h relative to the WT strain (Figure 1a). A similar result was obtained with a combination of cefotaxime with daptomycin, whereas cefotaxime combination with penicillin G or vancomycin was less efficient than amoxicillin/cefotaxime (Figure 1a). To make sure that the absence of *dltA* was responsible for the reduced survival during the amoxicillin/cefotaxime combination treatment, the *dltA* mutant was trans-complemented with a replicative plasmid carrying a WT copy of the *S. xyloso* *dlt* operon. As shown in Figure 1(b), a complete restoration of the WT phenotype was observed in the complemented strain, while no complementation was observed with the empty vector. As the survival of the *dltA* mutant is already slightly reduced during treatment with cefotaxime alone and strongly affected with the amoxicillin/cefotaxime combination, we wondered if other cephalosporins to which *E. faecalis* is intrinsically highly resistant would also be bactericidal for the *dltA* mutant. We thus determined the survival of *E. faecalis* JH2-2 WT and *dltA* mutant strains after 24 h of treatment with cephalosporins from four different generations, used alone or in combination with amoxicillin. Results showed that, apart from cefotaxime, only cefuroxime (second generation) affected the survival of the *dltA* mutant at 1 mg/L (Figure 2 and Table S2). At 4 mg/L, cefuroxime was significantly more bactericidal for the *dltA* mutant than cefotaxime. However, the combination of a low concentration of amoxicillin with cefotaxime is more efficient than amoxicillin/cefuroxime. Using the same concentration of amoxicillin as above, a 4-fold higher concentration of ceftazidime (third generation) or cefepime (fourth generation) (Figure 2 and Table S2) or a 16-fold higher concentration of cefalotin (first generation) (data not shown) were needed to observe similar effects. The combined results showed that at the lowest cephalosporin concentration (1 mg/L), cefotaxime and amoxicillin (0.03 mg/L) was the most effective antibiotic combination for killing the *dltA* mutant.

Pharmacological inactivation of α -alaninylation phenocopies *dltA* knockout mutants

To extend our analysis concerning α -alaninylation as a promising target, we synthesized a DltA inhibitor previously described and tested in *Bacillus subtilis*.²⁵ In the absence of antibiotics, the inhibitor (0.5 mM) had no impact on growth of *E. faecalis* WT strain (Figure 3). In the presence of the inhibitor (0.5 mM) and the antibiotic combination (0.03 mg/L amoxicillin and 1 mg/L cefotaxime),

the WT strain of *E. faecalis* was as susceptible as its corresponding *dltA* mutant, showing that the inhibitor is effective in this strain and phenocopies *dltA* knockout mutants (Figure 3). Since no significant changes in survival were observed in the presence or absence of the inhibitor in the *dltA* mutant (Figure 3), the inhibitor seems to selectively target DltA of *E. faecalis* in agreement with previous work on *B. subtilis*.²⁵ This trait appears to be common to *E. faecalis* species since increased susceptibility in the presence of the inhibitor was also observed with other clinically relevant strains of *E. faecalis* (V583 and OG1RF) although a twice higher concentration of amoxicillin was necessary for the *E. faecalis* V583 strain (Figure S1). These results not only show that killing in the presence of the DltA inhibitor and the amoxicillin/cefotaxime combination is likely to be a common trait of *E. faecalis* species, but also strongly suggest that the D-alanylation of TAs is a promising target for therapy against enterococcal infections.

Table 2. D-Alanylation deficiency does not significantly impact the MICs of various antibiotics for *E. faecalis*

	MIC (mg/L)									
	AMX ^a	CTX ^a	PEN ^a	CXM ^a	CAZ ^a	CEF ^a	FEP ^a	VAN	GEN	DAP
JH2-2	0.5	1024	2	512	1024	32	64	2	256	4
$\Delta dltA$	0.5	1024	2	256	256	32	32	2	128	2

AMX, amoxicillin; CAZ, ceftazidime; CEF, cefalotin; CTX, cefotaxime; CXM, cefuroxime; DAP, daptomycin; FEP, cefepime; GEN, gentamicin; PEN, penicillin G; VAN, vancomycin.

^aAntibiotic belonging to the β -lactam family.

G. mellonella larvae are protected against enterococcal infections in the presence of amoxicillin/cefotaxime and a D-alanylation inhibitor

Our combined results indicate that D-alanylation inhibitors could be of pharmacological relevance to counteract antibiotic resistance. An important test to progress towards a potential application of this kind of drug is the proof of concept of both the efficiency and the absence of toxicity in animal models. Therefore, we used in this study an insect model (*G. mellonella*) to conduct these analyses. First, the larvae of *G. mellonella* were infected by a lethal dose (10^6 cfu/larva) of *E. faecalis* JH2-2 WT or *dltA* mutant strains. This high-density infection was fatal at 36 h for WT-infected larvae while 5% of mutant-infected insects were still alive 48 h post-infection, indicating that the mutation in the *dltA* gene slightly attenuates the virulence of *E. faecalis* JH2-2 (Figure 4a and c). Then, a second injection with amoxicillin (0.3 mg/kg) and/or cefotaxime (1 mg/kg) was administered 2 h post-infection with *E. faecalis* JH2-2 WT or *dltA* mutant. The amoxicillin/cefotaxime combination significantly rescued the larvae infected with the JH2-2 WT strain. The median overall survival increased to 36 h with the combination compared with 20 h without antibiotic treatment (Figure 4a). The larvae infected with the *dltA* mutant and treated with the amoxicillin/cefotaxime combination were rescued even more efficiently, with a median overall survival beyond 48 h (Figure 4c). These results clearly demonstrate that D-alanylation failure sensitizes *E. faecalis* to the amoxicillin/cefotaxime combination not only under laboratory conditions but also inside the host. Next, we tested if the chemical inhibition of D-alanylation would protect the larvae after infection with *E. faecalis*. In the presence of

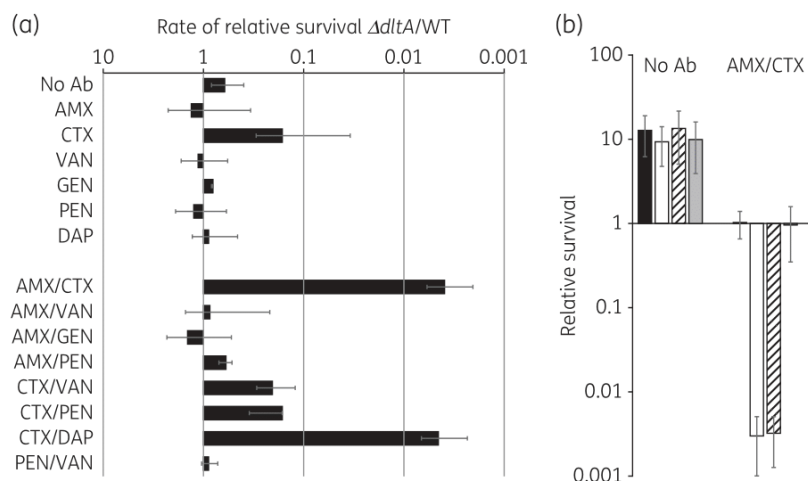


Figure 1. D-Alanylation inactivation sensitizes *E. faecalis* JH2-2 to antibiotic combinations, especially amoxicillin/cefotaxime. (a) Survival assays were performed on *E. faecalis* JH2-2 WT and its isogenic $\Delta dltA$ mutant treated at time 0 (T_0) with 0.03 mg/L amoxicillin, 1 mg/L cefotaxime, 1 mg/L vancomycin, 4 mg/L gentamicin, 1 mg/L penicillin G or 10 mg/L daptomycin, alone or in combination. Survival was determined after 24 h of incubation (T_{24}) and divided by inoculum at T_0 to calculate the relative survival (T_{24}/T_0). The rate of relative survival $\Delta dltA/WT$ is the ratio between T_{24}/T_0 of the $\Delta dltA$ mutant and T_{24}/T_0 of the WT. Results are reported as the mean $\pm$ SD from at least three independent experiments. (b) Similar survival assays were carried out with JH2-2 WT carrying or not the pRB473 plasmid (black bars), the $\Delta dltA$ mutant (white bars), the $\Delta dltA$ mutant carrying pRB473 (hatched bars) and the complemented strain (grey bars) with 0.03 mg/L amoxicillin and 1 mg/L cefotaxime. Results are reported as the mean $\pm$ SD from at least three independent experiments. Ab, antibiotic; AMX, amoxicillin; CTX, cefotaxime; DAP, daptomycin; GEN, gentamicin; PEN, penicillin G; VAN, vancomycin.

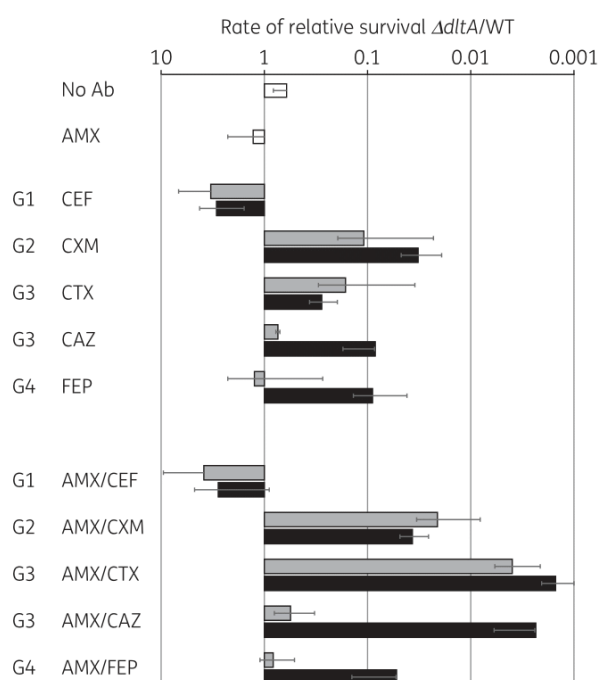


Figure 2. Amoxicillin/cephalosporin susceptibility of the $\Delta dltA$ mutant is independent of cephalosporin generation, but most efficient with the amoxicillin/cefotaxime combination. Survival assays were performed on *E. faecalis* JH2-2 WT and the $\Delta dltA$ mutant treated at time 0 (T_0) with 0.03 mg/L amoxicillin and/or different generations of cephalosporins (G1 to G4): cefalotin, cefuroxime, cefotaxime, ceftazidime or cefepime. Cephalosporins were used at 1 mg/L (grey bars) or 4 mg/L (black bars). Survival was determined after 24 h of incubation (T_{24}) and divided by inoculum at T_0 to calculate the relative survival (T_{24}/T_0). The rate of relative survival $\Delta dltA/WT$ is the ratio between T_{24}/T_0 of the $\Delta dltA$ mutant and T_{24}/T_0 of the WT. Results are reported as the mean $\pm$ SD from at least three independent experiments. Ab, antibiotic; AMX, amoxicillin; CAZ, ceftazidime; CEF, cefalotin; CTX, cefotaxime; CXM, cefuroxime; FEP, cefepime.

the DltA inhibitor (48.5 mg/kg) and the amoxicillin/cefotaxime combination, the median overall survival of WT-infected larvae was highly improved (from 36 up to 48 h; see Figure 4a and b) and was similar to that of the *dltA* mutant-infected insects under this condition (Figure 4b and c). Moreover, as observed with bacterial cultures, the presence of the inhibitor had no effect on survival of larvae infected with the *dltA* mutant in the presence of the amoxicillin/cefotaxime combination, suggesting once again that it seems to be specific for its target DltA (Figure 4c and d). Of note, injection of only the inhibitor into the larvae using concentrations between 2 and 200 mg/kg had no toxic effects on the insects over 48 h. Similar results to those described above for the JH2-2 strain were obtained with *E. faecalis* strains V583 and OG1RF after amoxicillin/cefotaxime combination in the presence of the inhibitor (Figure 5a and Figure S2A and B). We concluded that inhibition of D-alanylation of TAs significantly potentiates β -lactam treatment, efficiently protecting the animals from a lethal challenge with *E. faecalis*, and that the inhibitor is not toxic to the larvae of *G. mellonella*.

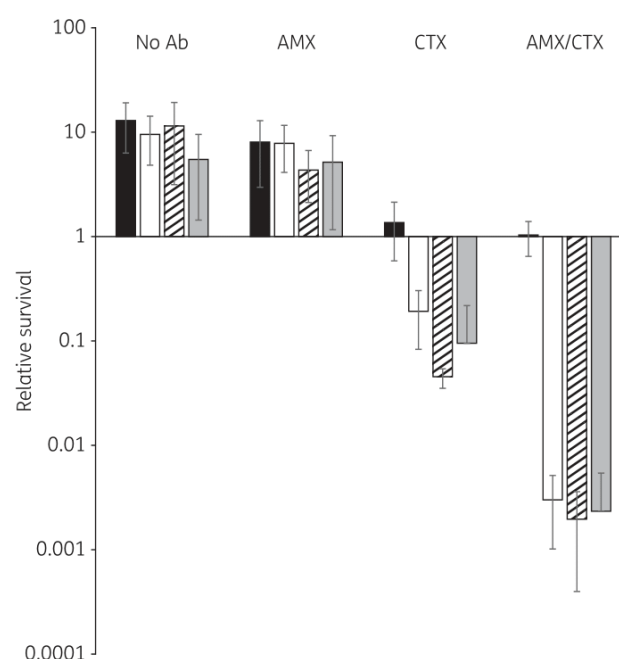


Figure 3. Pharmacological inhibition of D-alanylation sensitizes *E. faecalis* JH2-2 to the amoxicillin/cefotaxime combination. The strain JH2-2 WT (black and hatched bars) and the $\Delta dltA$ mutant (white and grey bars) were treated at time 0 (T_0) with 0.03 mg/L amoxicillin and/or 1 mg/L cefotaxime in the absence (black and white bars) or the presence (hatched and grey bars) of 0.5 mM DltA inhibitor. Survival was determined after 24 h of incubation (T_{24}). Relative survival was calculated as the ratio between survival at T_{24} and T_0 . Results are reported as the mean $\pm$ SD from at least three independent experiments. Ab, antibiotic; AMX, amoxicillin; CTX, cefotaxime.

Among clinically relevant enterococci, *E. faecium* infections are the most challenging to treat due to a greater prevalence of antibiotic resistance. Since the inhibitor proved highly efficient in *E. faecalis*, we extended our analysis to clinical vancomycin-resistant *E. faecium* isolates. We used the same procedure as for *E. faecalis*. As shown in Figure 5(b) and Figure S2(C and E), after infection of larvae with a lethal dose (10^6 cfu/larva) of *E. faecium* strains BI18, BI22 and Aus0004, only 1.6%, 10% and 0% of animals were still alive 48 h post-infection, respectively. Next, the effect of amoxicillin (0.6 mg/kg) and/or cefotaxime (1 mg/kg) and/or the DltA inhibitor (48.5 mg/kg) injected 2 h post-infection was evaluated. As for *E. faecalis*, *E. faecium*-infected larvae could not be rescued by the sole injection of the DltA inhibitor (Figure S2D and F). The β -lactam combination did not have a significant impact on the survival of BI18- and BI22-infected larvae, but slightly protected the animals against infection by the strain Aus0004 (Figure 5b). As previously observed with *E. faecalis*, the DltA inhibitor potentiates the effect of the amoxicillin/cefotaxime combination, increasing the survival of *E. faecium* BI18-, BI22- and Aus0004-infected larvae by 9.6-, 4.3- and 8.4-fold, respectively (Figure 5b and Figure S2C-F). We concluded that intrinsic antibiotic resistance of *E. faecium* could also be overcome with a drug combination and inhibition of D-alanylation of TAs.

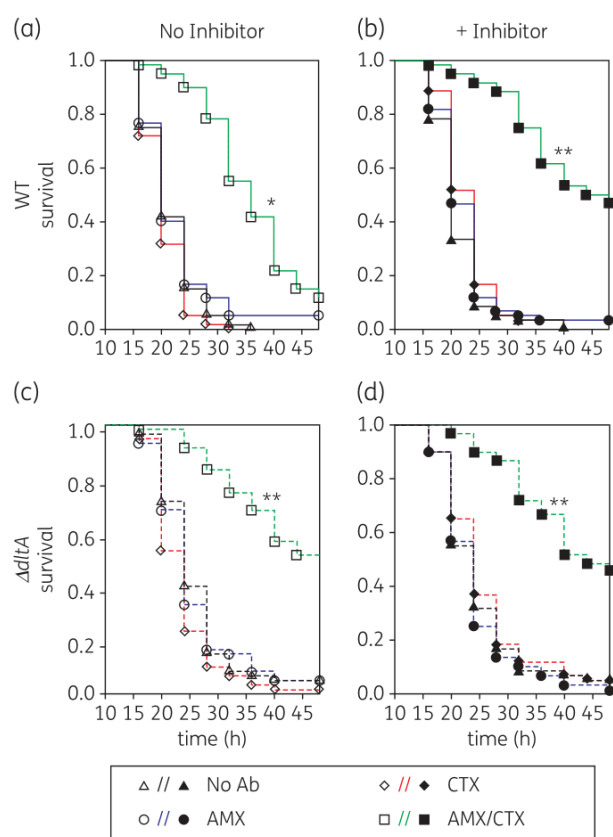


Figure 4. Genetic and pharmacological inactivation of D -alanylation combined with amoxicillin/cefotaxime treatment increases the rescue of *E. faecalis* JH2-2-infected larvae. *G. mellonella* larvae were infected with *E. faecalis* JH2-2 (continuous lines; a and b) or its isogenic ΔdltA mutant (broken lines; c and d). A second injection was administered 2 h post-infection with saline solution (triangles; black lines), amoxicillin at 0.3 mg/kg (circles; blue lines), cefotaxime at 1 mg/kg (diamonds; red lines) or the amoxicillin/cefotaxime combination (squares; green lines), in the absence (No Inhibitor; open symbols; a and c) or in the presence (+ Inhibitor; filled symbols; b and d) of DltA inhibitor at 48.5 mg/kg. Living and dead larvae were counted every 4 h, from 12 to 48 h post-infection. Four independent experiments were performed to treat a total of 60 animals per condition. For clarity, results are separated into four Kaplan-Meier graphs, but all conditions are compared with multiple comparison using log-rank test and a Bonferroni adjustment. A single asterisk indicates a curve with a significant difference ($P < 0.01$) compared with all other conditions. A double asterisk indicates a group of curves not significantly different from each other in this group, but with a significant difference ($P < 0.01$) compared with all other conditions. Ab, antibiotic; AMX, amoxicillin; CTX, cefotaxime. This figure appears in colour in the online version of *JAC* and in black and white in the print version of *JAC*.

Discussion

We present in this study the proof of concept that inhibition of D -alanylation might be a promising therapeutic strategy for the treatment of drug-resistant enterococcal infections. In contrast to pathogenic streptococci, which are rapidly killed by β -lactams,

these treatments are bacteriostatic rather than bactericidal against enterococci.⁵ Therefore, combinations of two antibiotics were tested to obtain substantial killing of these pathogens.^{5,12} Initially a combination of a β -lactam with an aminoglycoside was recommended, but the rise of high-level resistance to the latter drug prompted the research of alternative treatments.^{27,28} This led to the recommendation of 4–6 weeks medication with amoxicillin and ceftriaxone to treat *E. faecalis* IE. However, this β -lactam combination is ineffective against *E. faecium*, and, for the treatment of *E. faecium* IE, although uncommon, linezolid or daptomycin for >6 weeks may be useful.^{5,12} Our results demonstrate that the bactericidal activity of a β -lactam combination therapy based mainly on a cephalosporin in combination with a low amoxicillin concentration could be substantially increased, *in vivo* and in an animal host, by genetic or pharmacological inactivation of D -alanylation of TAs. The strongest killing effect was obtained with the combination amoxicillin/cefotaxime. The advantage of cefotaxime compared with ceftriaxone, recommended by the American Heart Association, is that cefotaxime is mainly eliminated by the kidneys (70%),²⁹ avoiding the risk of *C. difficile* infections or colonization by vancomycin-resistant *E. faecium*.¹⁰ Interestingly, this treatment is also efficient against high-density *E. faecium* infections in our animal model. This might pave the way for the introduction of a therapeutic alternative to the current options to treat *E. faecium* IE and, more generally, decrease the time of treatments to eradicate infections by pathogenic enterococci.

The molecular reasons why these drug combinations are more bactericidal in the absence of D -alanylation remain unknown. D -Alanylation neutralizes the negative charges of TAs, which is probably the basis for the decreased susceptibility to positively charged defensins, antimicrobial peptides and antibiotics.¹⁴ However, amoxicillin and the cephalosporins used in this study are rather neutral molecules, arguing that modification of the cell surface charge by D -alanylation does not seem to be the basis of the increased killing of enterococci with D -alanine-deficient TAs by the drug combination treatment. The inhibitor used in our study was synthesized by May et al.,²⁵ and tested *in vitro* and in *B. subtilis*. The authors showed that it is able to block the D -alanine adenylation by DltA, that it had high affinity for its purified target DltA (K_i 60-fold lower than K_m for its natural substrate D -alanine) and that growth of *B. subtilis* was blocked in the presence of vancomycin and the inhibitor. However, despite the fact that the inhibitor has high affinity for DltA of *B. subtilis*, we confirm the results of May et al.²⁵ that relatively high concentrations are necessary to sensitize bacteria to the antibiotic treatments *in vivo* (0.5 mM) and in the animal host (48.5 mg/kg). This is probably due to limited penetration of the inhibitor into the bacterial cells or its enzymatic degradation within the cells. A recent synthetic lethal approach allowed identification of amsacrine as a DltB inhibitor in *Staphylococcus aureus*, resulting in a decrease in D -alanine incorporation into lipoteichoic acids. Moreover, this study revealed that amsacrine sensitized *S. aureus* to the cationic antibiotics neomycin and gentamicin.³⁰ However, amsacrine is highly toxic to eukaryotes due to inhibition of eukaryotic topoisomerases. This excludes its application as a therapeutic to treat bacterial infections.³⁰ Therefore, inhibitors targeting proteins of the Dlt system with improved *in vivo* and in host performances have to be identified in order to use D -alanylation as a therapeutic target.

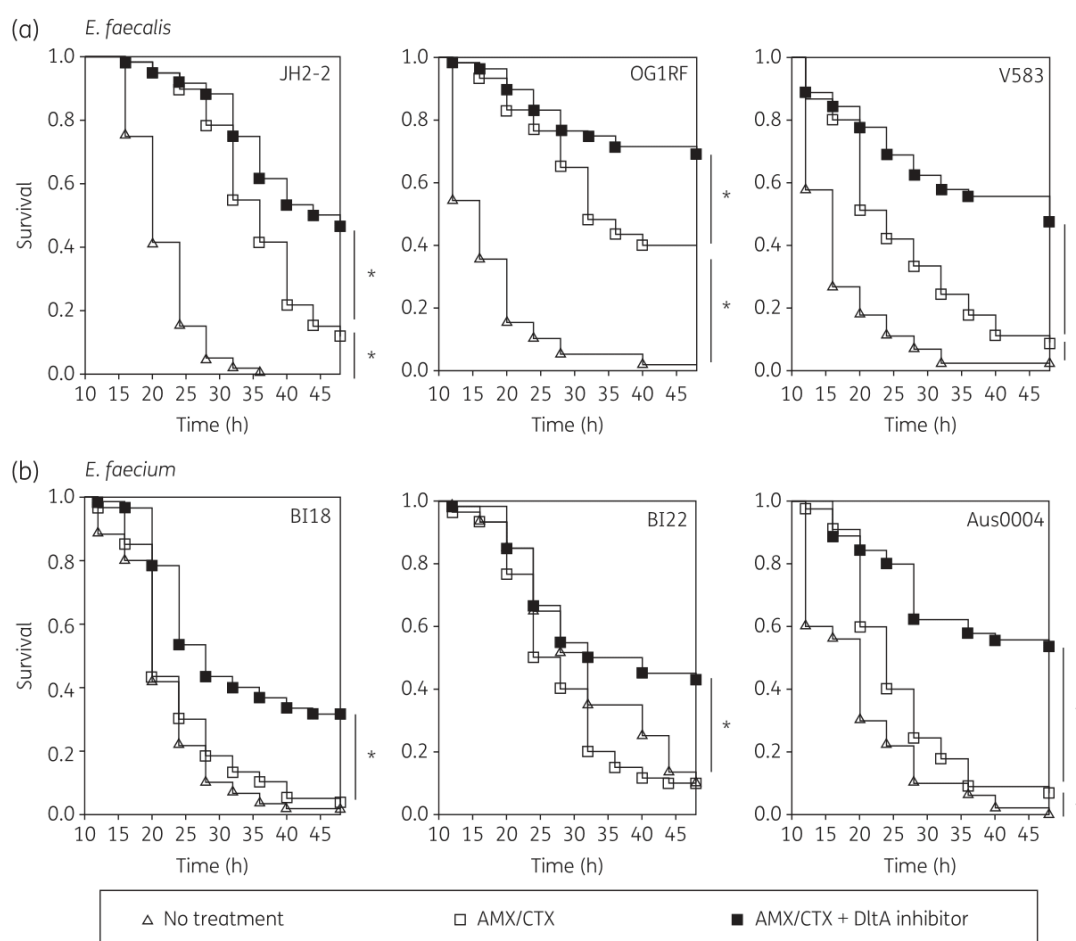


Figure 5. Increased efficiency of amoxicillin/cefotaxime treatment in the presence of the DltA inhibitor is confirmed for larvae infected with clinical enterococcal strains. Enterococcal infections were performed in *G. mellonella* larvae with WT strains of *E. faecalis* JH2-2, OG1RF or V583 (a) and *E. faecium* BI18, BI22 or Aus0004 (b). Two hours post-infection, larvae were treated with saline solution (No treatment; open triangles), amoxicillin/cefotaxime (open squares) or a combination of amoxicillin/cefotaxime and DltA inhibitor (filled squares). Control conditions are represented in Figure S2 for OG1RF, BI18 and BI22 strains. Survival of the animals was evaluated every 4 h, from 12 to 48 h post-infection. Data represent three or four experiments each using 45 or 60 animals. A single asterisk indicates a curve with a significant difference ($P < 0.01$) compared with all other conditions. AMX, amoxicillin; CTX, cefotaxime.

Acknowledgements

We are especially grateful to M. S. Gilmore for providing *E. faecium* strains BI18 and BI22, R. Brückner for providing pRB473 and A. Peschel for providing pRB473-*dlt* for complementation studies. We greatly appreciate I. Rincé and A. C. Appourchaux (Normandie Université, UNICAEN, U2RM, 14000, Caen, France) for their expert technical assistance.

Funding

This work as well as the doctoral fellowship of Delphine Coupri was funded by the French Ministry of Education and Science.

Transparency declarations

None to declare.

Supplementary data

Tables S1 and S2 and Figures S1 and S2 are available as [Supplementary data](#) at JAC Online.

References

- Gilmore MS, Lebreton F, van Schaik W. Genomic transition of enterococci from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. *Curr Opin Microbiol* 2013; **16**: 10–6.
- Weiner LM, Webb AK, Limbago B *et al.* Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011–2014. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2016; **37**: 1288–301.
- Zarb P, Coignard B, Griskeviciene J *et al.* The European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) pilot point prevalence survey of

- healthcare-associated infections and antimicrobial use. *Euro Surveill* 2012; **17**: pii=20316.
- 4 Agudelo Higuera NI, Huycke MM. Enterococcal disease, epidemiology, and implications for treatment. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y et al., eds. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Boston, MA, USA: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190429/>.
- 5 Baddour LM, Wilson WR, Bayer AS et al. Infective endocarditis in adults: diagnosis, antimicrobial therapy, and management of complications: a scientific statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation* 2015; **132**: 1435–86.
- 6 Hollenbeck BL, Rice LB. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence* 2012; **3**: 421–569.
- 7 Miller WR, Murray BE, Rice LB et al. Vancomycin-resistant enterococci. *Infect Dis Clin North Am* 2016; **30**: 415–39.
- 8 Bizzini A, Zhao C, Auffray Y et al. The *Enterococcus faecalis* superoxide dismutase is essential for its tolerance to vancomycin and penicillin. *J Antimicrob Chemother* 2009; **64**: 1196–202.
- 9 Ladjouzi R, Bizzini A, Lebreton F et al. Analysis of the tolerance of pathogenic enterococci and *Staphylococcus aureus* to cell wall active antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 2083–91.
- 10 Beganovic M, Luther MK, Rice LB et al. A review of combination antimicrobial therapy for *Enterococcus faecalis* bloodstream infections and infective endocarditis. *Clin Infect Dis* 2018; **67**: 303–9.
- 11 Owens RC Jr, Donskey CJ, Gaynes RP et al. Antimicrobial-associated risk factors for *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis* 2008; **46** Suppl 1: S19–31.
- 12 Mainardi JL, Gutmann L, Acar JF et al. Synergistic effect of amoxicillin and cefotaxime against *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39**: 1984–7.
- 13 Kellogg SL, Little JL, Hoff JS et al. Requirement of the CroRS two-component system for resistance to cell wall-targeting antimicrobials in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; **61**: e02461–16.
- 14 Neuhaus FC, Baddiley J. A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in Gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003; **67**: 686–723.
- 15 Reichmann NT, Cassona CP, Grundling A. Revised mechanism of D-alanine incorporation into cell wall polymers in Gram-positive bacteria. *Microbiology (Reading, Engl)* 2013; **159**: 1868–77.
- 16 Wood BM, Santa-Maria JP Jr, Matano LM et al. A partial reconstitution implicates DltD in catalyzing lipoteichoic acid D-alanylation. *J Biol Chem* 2018; **293**: 17985–96.
- 17 Brown S, Santa Maria JP Jr, Walker S. Wall teichoic acids of Gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2013; **67**: 313–36.
- 18 Percy MG, Grundling A. Lipoteichoic acid synthesis and function in Gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2014; **68**: 81–100.
- 19 Matos RC, Schwarzer M, Gervais H et al. D-Alanylation of teichoic acids contributes to *Lactobacillus plantarum*-mediated *Drosophila* growth during chronic undernutrition. *Nat Microbiol* 2017; **2**: 1635–47.
- 20 Brown S, Xia G, Luhachack LG et al. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* requires glycosylated wall teichoic acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; **109**: 18909–14.
- 21 Terzaghi BE, Sandine WE. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl Microbiol* 1975; **29**: 807–13.
- 22 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- 23 Peschel A, Otto M, Jack RW et al. Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem* 1999; **274**: 8405–10.
- 24 Brückner R. A series of shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Gene* 1992; **122**: 187–92.
- 25 May JJ, Finking R, Wiegshoff F et al. Inhibition of the D-alanine:D-alanyl carrier protein ligase from *Bacillus subtilis* increases the bacterium's susceptibility to antibiotics that target the cell wall: characterization and inhibition of the Dlt system. *FEBS J* 2005; **272**: 2993–3003.
- 26 Tripathi A, Pandey A. Post-hoc comparison in survival analysis: an easy approach. *J Biosci Med* 2017; **5**: 112–9.
- 27 Gavalda J, Torres C, Tenorio C et al. Efficacy of ampicillin plus ceftriaxone in treatment of experimental endocarditis due to *Enterococcus faecalis* strains highly resistant to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43**: 639–46.
- 28 Gavalda J, Len O, Miró JM et al. Brief communication: treatment of *Enterococcus faecalis* endocarditis with ampicillin plus ceftriaxone. *Ann Intern Med* 2007; **146**: 574–9.
- 29 Kearns GL, Young RA. Pharmacokinetics of cefotaxime and desacetylcefotaxime in the young. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1995; **22**: 97–104.
- 30 Pasquina L, Maria JPS, Wood BM et al. A synthetic lethal approach for compound and target identification in *Staphylococcus aureus*. *Nat Chem Biol* 2016; **12**: 40–5.
- 31 Jacob AE, Hobbs SJ. Conjugal transfer of plasmid-borne multiple antibiotic resistance in *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes*. *J Bacteriol* 1974; **117**: 360–72.
- 32 Le Jeune A, Torelli R, Sanguinetti M et al. The extracytoplasmic function sigma factor SigV plays a key role in the original model of lysozyme resistance and virulence of *Enterococcus faecalis*. *PLoS One* 2010; **5**: e9658.
- 33 Murray BE, Singh KV, Ross RP et al. Generation of restriction map of *Enterococcus faecalis* OG1 and investigation of growth requirements and regions encoding biosynthetic function. *J Bacteriol* 1993; **175**: 5216–23.
- 34 Sahm DF, Kissinger J, Gilmore MS et al. In vitro susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; **33**: 1588–91.
- 35 Lam MMC, Seemann T, Bulach DM et al. Comparative analysis of the first complete *Enterococcus faecium* genome. *J Bacteriol* 2012; **194**: 2334–41.

I.3 Données supplémentaires de la publication

Table S1. MICs of antibiotics used in Table 2 obtained in Mueller-Hinton

	MIC (mg/L)									
	AMX*	CTX*	PEN*	CXM*	CAZ*	CEF*	FEP*	VAN	GEN	DAP
JH2-2	1	1024	4	1024	2048	64	128	2	64	1
<i>ΔdltA</i>	1	1024	4	1024	1024	64	128	1	64	1

AMX, amoxicillin; CTX, cefotaxime; PEN, penicillin G; CXM, cefuroxime; CAZ, ceftazidime; CEF, cefalotin; FEP, cefepime; VAN, vancomycin; GEN, gentamycin, DAP, daptomycin. The symbol * indicates antibiotics belonging to the β -lactams family.

Table S2. Mean fold change values of the data shown in Figure 2

*Mean of fold change <i>ΔdltA</i> / WT (standard deviation)		
No Ab	0.615 (0.217)	
AMX	1.298 (0.955)	
Concentration of cephalosporin (mg/L)	1	4
CEF	3.364 (3.411)	2.900 (1.302)
CXM	0.109 (0.085)	0.033 (0.014)
CTX	0.166 (0.132)	0.278 (0.085)
CAZ	0.743 (0.032)	0.086 (0.089)
FEP	1.249 (0.976)	0.090 (0.049)
AMX/CEF	3.869 (5.447)	2.794 (1.891)
AMX/CXM	0.021 (0.013)	0.037 (0.011)
AMX/CTX	0.004 (0.002)	0.002 (0.001)
AMX/CAZ	0.565 (0.241)	0.002 (0.004)
AMX/FEP	0.808 (0.292)	0.053 (0.089)

*The rate of relative survival *ΔdltA*/WT is the ratio between T_{24}/T_0 of *ΔdltA* mutant and T_{24}/T_0 of wild-type. Results are reported as the means and standard deviations from at least three independent experiments.

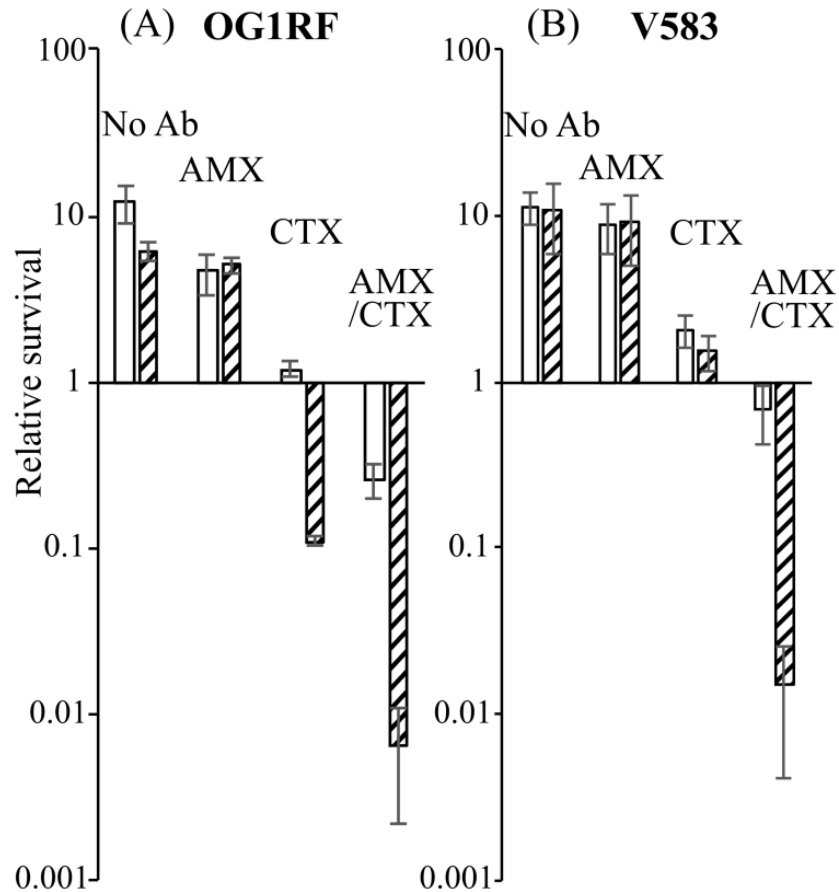


Figure S1. Inhibition of the D-alanylation sensitizes *E. faecalis* V583 and OG1RF to a combinatory treatment of AMX/CTX.

The strains OG1RF (A) or V583 (B) were treated at time 0 (T_0) with amoxicillin (AMX) at 0.03 $\mu\text{g/mL}$ or 0.06 $\mu\text{g/mL}$ respectively, and/or 1 $\mu\text{g/mL}$ of cefotaxime (CTX) in the presence (hatched bars) or absence (white bars) of DltA inhibitor at 0.5 mM. Survival was determined after 24 h of incubation (T_{24}). Relative survival was calculated as the ratio between survival at T_{24} and T_0 . Results are reported as the means and standard deviations from at least three independent experiments.

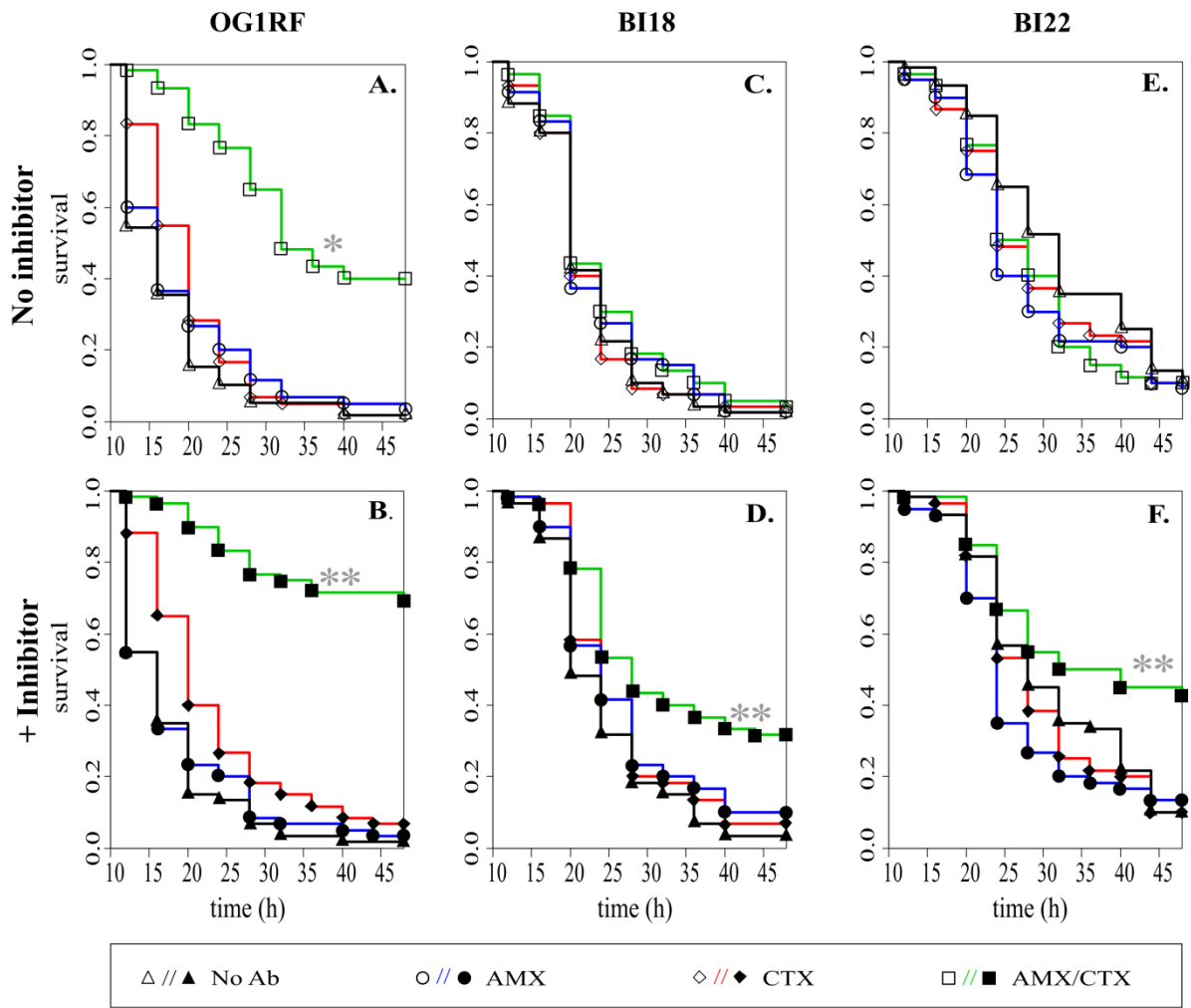


Figure S2. Combined DltA inhibitor and AMX/CTX injection protects larvae against enterococcal infections.

Infection of *G. mellonella* larvae was realized with *E. faecalis* OG1RF (A. and B.), *E. faecium* BI18 (C. and D.), or *E. faecium* BI22 (E. and F.). A second injection was administered 2 hours post-infection with saline solution (No Ab; triangle, black line), amoxicillin at 0.3 mg/kg for *E. faecalis* OG1RF or 0.6 mg/kg for the two strains of *E. faecium* (AMX; circle, blue line), cefotaxime at 1 mg/kg (CTX; diamond, red line), or amoxicillin/cefotaxime combination (AMX/CTX; square, green line), in absence (No inhibitor; open symbols; A., C. and E.) or in presence of 48.5 mg/kg of DltA inhibitor (+Inhibitor; filled symbols; B., D. and F.). For each condition, three experiments were performed for each strain using 60 animals per conditions. From 12 to 48 hours and every 4 hours, living and dead larvae were counted. Survival data are divided into two Kaplan-Meier graphs for each strain, but a multiple comparison using a log-rank test and a Bonferroni adjustment are applied on all conditions for each background. Thus, single and double asterisks show a condition statistically different ($p_{\text{value}} < 0.01$) of all other conditions in the same background strain. As shown in Figure S2C and S2E, unlike *E. faecalis*, treatments with antibiotics (even in combinations) in absence of inhibitor do not rescue *E. faecium* infected larvae.

CHAPITRE II : UN INHIBITEUR DE LA D-ALANYLATION DES ACIDES TÉICHOÏQUES COMME ADJUVANT ANTI-RÉSISTANCE ET ANTI-BIOFILM POUR POTENTIALISER L'EFFET DES BÊTA-LACTAMINES CONTRE *S. AUREUS* RÉSISTANT À LA MÉTICILLINE

II.1 Résumé de la publication

Dans la lutte contre les pathogènes responsables de la crise mondiale de l'antibiorésistance, le développement de nouvelles stratégies anti-infectieuses contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (MRSA) et à la vancomycine (VRSA) représente une priorité élevée. Ainsi, à l'instar des entérocoques, l'émergence des souches de *S. aureus* résistantes aux antibiotiques, en particulier à la méticilline, limite de plus en plus les options thérapeutiques envisageables. Les staphylocoques possèdent une paroi constituée notamment d'acides téichoïques présentant des esters de D-alanine le long de leur structure. Notre objectif est de montrer qu'une altération du mécanisme de D-alanylation permet de resensibiliser des MRSA à des antibiotiques pour lesquels ils sont résistants.

Dans notre étude, nous avons utilisé un panel de souches MRSA, dont une communautaire (MW2) et 12 isolats cliniques. Tout d'abord, nous avons comparé leur CMI vis-à-vis de 4 antibiotiques majeurs, l'amoxicilline, la céfotaxime, l'imipénème et l'oxacilline, dans un contexte de D-alanylation fonctionnelle ou non (par mutagenèse du gène *dltA* ou en présence de l'inhibiteur DltA). Ces résultats mettent en évidence une sensibilisation des souches résistantes face à certaines β -lactamines lors de l'inactivation de la fonction de D-alanylation des TAs. Les effets les plus remarquables concernent l'imipénème. De plus, nous avons montré par des analyses de survie que l'inhibiteur de DltA permet de renforcer l'activité bactéricide de l'imipénème chez certaines souches, confirmant ainsi l'efficacité de cette association.

Nos études d'infections et de traitements dans le modèle *G. mellonella* montrent une meilleure efficacité de l'oxacilline ou de l'imipénème lorsque la D-alanylation est inactivée. Ainsi, l'inhibiteur DltA apparaît comme un adjuvant prometteur afin de « ressusciter » des antibiotiques devenus obsolètes pour lutter contre les MRSA.

Enfin, nous avons évalué l'effet de l'inhibition de la D-alanylation des TAs sur la capacité de *S. aureus* à produire du biofilm. Nos résultats obtenus chez la souche MW2 et son mutant *AdltA* mettent en évidence qu'une inactivation génétique de la D-alanylation des TAs permet de renforcer l'activité anti-biofilm de l'imipénème, tant sur l'inhibition que sur l'éradication. De plus, cette étude montre que l'inhibiteur de DltA potentialise l'effet inhibiteur de biofilm de l'imipénème sur la souche sauvage MW2.

L'ensemble des résultats présentés dans cette publication mettent en exergue la D-alanylation des TAs comme une cible thérapeutique prometteuse avec une activité anti-résistance *in vivo* et *in host* ainsi qu'une activité anti-biofilm permettant de renforcer l'efficacité d'antibiotiques pour lutter contre les infections à des *S. aureus* multi-résistants aux antibiotiques.

II.2 Publication en cours de préparation

Les résultats mentionnés ci-avant font l'objet de la publication suivante :

Inhibition of D-alanylation of teichoic acids overcomes resistance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*

Short Running Title: Targeting DltA to fight MRSA

Delphine Coupri¹, Nicolas Verneuil¹, Axel Hartke¹, Axelle Liébaut¹, Thierry Lequeux², Emmanuel Pfund², Aurélie Budin-Verneuil^{1*}

Affiliations:

¹Normandie Univ, UNICAEN, U2RM, 14000 Caen, France.

²Normandie Université, Laboratoire de Chimie Moléculaire et Thioorganique UMR 6507, ENSICAEN, UNICAEN, CNRS, 6 Bd. du Maréchal Juin, 14050 Caen, France.

*Correspondence to: aurelie.verneuil@unicaen.fr; Tel: +33 2 31 56 53 85

Abstract

Background: Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) are high-priority multidrug-resistant pathogens. Although some 5th generation cephalosporins are active against MRSA, continuous efforts for the research of new antibiotics and treatment strategies are needed because resistance to these new drugs have been already communicated.

Objectives: In this communication we explore if D-alanylation of teichoic acids mediated by the *dlt* operon gene products might be a potential new druggable target to overcome β -lactam-resistance of MRSA.

Methods: Minimal inhibition concentrations (MIC) and bactericidal effects of several β -lactam antibiotics were monitored in a panel of clinical MRSA strains with genetic or chemical-induced deficiency in D-alanylation of teichoic acids. Efficiency of the chemical inhibitor to rescue MRSA-infected larvae of *Galleria mellonella* as well as its ability to inhibit or eradicate biofilms of *S. aureus* was analyzed.

Results: Our results show that genetic inactivation of the Dlt-system or its chemical inhibition re-sensitizes MRSA strains to β -lactams. The most spectacular effect was obtained with the inhibitor/imipenem combination which restored β -lactam clinical susceptibility to this antibiotic in all tested strains. This combination was also bactericidal in some strains and significantly protected *G. mellonella* larvae from lethal MRSA-infections. A similar efficiency to rescue the larvae was obtained with the inhibitor/oxacillin combination. Finally, genetic-inactivation of D-alanylation potentiated the effect of imipenem on both inhibition and eradication of biofilm whereas chemical inhibition only decreased biofilm formation.

Conclusion: Our combined results showed that highly efficient inhibitors of D-alanylation of teichoic acids targeting enzymes of the Dlt system should be promising therapeutic adjuvants

especially in combination with carbapenems for restoring the therapeutic efficacy of this important class of antibiotics against methicillin-resistant staphylococci.

Keywords

Staphylococcus aureus, Methicillin-resistance, D-alanylation, teichoic acids, D-alanylation inhibition, anti-resistance, anti-virulence, anti-biofilm.

Introduction

Antibiotic resistance is a major global health problem increasing the number of deaths and the societal costs of infections (Pacios *et al.*, 2020). To counteract this crisis, the World Health Organization (WHO) has published a priority list of multidrug-resistant microorganisms for which research and development of new antibiotics or therapeutic strategies is urgently needed (Tacconelli *et al.*, 2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) are classified to be of high priority among the listed drug resistant pathogens. Initially, MRSA was predominantly responsible for health-care associated infections but are now increasingly isolated from community acquired infections as well (Lee *et al.*, 2018; Tong *et al.*, 2015). Treatment options are limited due to resistance to almost all β -lactams, except for some last generation cephalosporins. However, resistance to these last drugs in clinical MRSA isolates from patients has already been communicated (Lee *et al.*, 2018). β -lactams target Penicillin-Binding Proteins (PBPs) by inhibiting their transpeptidase activity thereby blocking the cell wall biosynthesis leading finally to cell death (Fisher and Mobashery, 2020; Turner *et al.*, 2019; Wilke *et al.*, 2005). In most clinical isolates, resistance to β -lactams is due to a unique, inducible, acquired penicillin-binding protein, PBP2a. This protein is encoded by the *mecA* gene or *mecA* homologues (*mecB*, *mecC*, and *mecD*) (Lakhundi and Zhang, 2018). The corresponding genes are carried on genetically diverse but related SCCmec elements

(Staphylococcal Cassette Chromosome elements) (Lakhundi and Zhang, 2018). PBP2a has low affinity for β -lactams and therefore can substitute the transpeptidase activities of the native staphylococcal PBPs allowing cell wall synthesis in the presence of the drugs. However, many other *S. aureus* core genes are necessary for PBP2a-mediated resistance (Lee *et al.*, 2018). For example, inactivation of teichoic acid (TA) biosynthesis rendered MRSA highly susceptible to β -lactam antibiotics *in vitro* and *in vivo* (Lee *et al.*, 2016). TAs are abundant cell wall polymers of Gram + bacteria (Neuhaus and Baddiley, 2003). There are two different types of TAs, lipoteichoic acid (LTA) and wall teichoic acid (WTA). These polymers are tagged with D-alanine esters, which confer a positive charge on the negative TAs (Neuhaus and Baddiley, 2003). D-alanine incorporation into TAs requires four proteins encoded by the *dltABCD* operon which are all essential for the process (McKay Wood *et al.*, 2018). Dlt-mutants demonstrated an increase in the susceptibility of bacteria to cationic antimicrobial peptides (Neuhaus and Baddiley, 2003) as well as cationic antibiotics (Pasquina *et al.*, 2016). However, the Minimal Inhibition Concentrations (MICs) of different β -lactam antibiotics, which are neutral or negatively charged molecules, were only marginally affected in a D-alanylation-deficient MRSA strains, ranging from slightly increased or decreased MICs (Brown *et al.*, 2012; Pasquina *et al.*, 2016). We recently showed that genetic inactivation or pharmacological inhibition of D-alanylation increased the bactericidal activity of β -lactam combinatorial treatments against pathogenic enterococci (Coupri *et al.*, 2019). Therefore, the initial objective of the present work was to study if D-alanylation-deficient strains of MRSA would also be more sensitive to killing by β -lactam antibiotics. This was indeed the case but we found also that D-alanylation deficient strains demonstrated highly decreased MICs when treated with β -lactams in monotherapy. These treatments also affected biofilm formation but only genetic inactivation showed an effect on biofilm eradication. Finally, we show that inhibition of D-alanylation increased survival of infected insect larvae of *Galleria mellonella* treated with β -lactam

antibiotics, arguing that inhibition of D-alanylation is a realistic, highly promising target to overcome MRSA β -lactam resistance.

Materials and methods

Bacterial strains, media and reagents

Bacterial strains used in this study were listed in Table 1. Cultures were realized in Brain Heart Infusion (BHI) (Biokar diagnostics, France) for physiological assays or in Mueller-Hinton (MH) (Biokar diagnostics, France) for mutagenesis assays. Antibiotics amoxicillin, cefotaxime, imipenem, penicillin G and chloramphenicol were purchased from Sigma-Aldrich (MO, USA) and oxacillin was purchased from VWR (PA, USA). Lyophilized DltA inhibitor (5'-O-[N-(D-alanyl)-sulfamoyl]-adenosine) was synthesized as described by May *et al.* (2005) and then solubilized at 10 mM in sterilized pure water.

Mutagenesis of *dltA* gene

Construction of $\Delta dltA$ mutants in the parental strains MW2 and CNRI of *S. aureus* was performed with plasmid pMAD $\Delta dltA$ (Brown *et al.*, 2012) (Table 1). After an intermediated cloning into *S. aureus* RN4220 as described by Grosser Richardson (2014) (Grosser and Richardson, 2014), the pMAD $\Delta dltA$ was isolated and introduced in *S. aureus* MW2 or CNRI by electroporation. Deletion was done essentially as previously described by Hébert *et al.* with the following modifications (Hébert *et al.*, 2007). The medium used for mutagenesis was MH supplemented with 10 μ g/mL of chloramphenicol and/or 1 mg/mL of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactopyranoside (X-Gal) when needed. Three temperature shifts from 30 to 42°C for the plasmid integration into the chromosome, followed by one to three shifts from 42 to 30°C for plasmid excision were performed to obtain $\Delta dltA$ mutants. The truncation of *dltA* gene was confirmed by PCR and sequenced using the specific primers upstream (MW01

“GCAAGAAGGTTGCAAGGG”) and downstream (MW02 “TGTAATACACTTCGATACCATGCC”) of the *dltA* gene.

Table 1: *Staphylococcus aureus* strains and plasmids used in this study.

Common name	Characteristics	Origin/Reference
Strains		
MW2	*CA-MRSA, wild-type strain	Baba <i>et al.</i> , 2002
MW2 Δ <i>dltA</i>	MW2 strain deficient in <i>dltA</i> gene	This study
CHU1	§HA-MRSA, T-SAR-01	University Hospital Center of Caen
CHU17	HA-MRSA, T-SAR-17	University Hospital Center of Caen
CNRI	HA-MRSA, SCCmec type I, HT20020269	Reference National Center of Lyon
CNRI Δ <i>dltA</i>	CNRI strain deficient in <i>dltA</i> gene	This study
CNRII	HA-MRSA, SCCmec type II, HT20020599	Reference National Center of Lyon
CNRIII	HA-MRSA, SCCmec type III, HT20020272	Reference National Center of Lyon
CNRIV	HA-MRSA, SCCmec type IV, HT20040100	Reference National Center of Lyon
CNRV	HA-MRSA, SCCmec type V, ST20050087	Reference National Center of Lyon
CNRVI	HA-MRSA, SCCmec type VI, HT20020274	Reference National Center of Lyon
CNRVII	HA-MRSA, SCCmec type VII, ST20141090	Reference National Center of Lyon
CNRVIII	HA-MRSA, SCCmec type VIII, ST20112957	Reference National Center of Lyon
CNRIX	HA-MRSA, SCCmec type IX, ST20112958	Reference National Center of Lyon
CNRX	HA-MRSA, SCCmec type X, ST20112959	Reference National Center of Lyon
RN4220	Deficient restriction strain used as intermediate cloning	Kreiswirth <i>et al.</i> , 1983
Plasmid		
pMAD Δ <i>dltA</i>	Plasmid pMAD carrying the truncated <i>dltA</i> gene	Brown <i>et al.</i> , 2012
pRB473- <i>dlt</i>	pRB473 harboring <i>dlt</i> operon from <i>Staphylococcus xylosus</i> ; CHL ^R	Peschel <i>et al.</i> , 1999

*CA: Community Acquired; §HA: Hospital Associated

Growth kinetic

96-well microplates (Starlab) were inoculated with overnight cultures diluted in fresh BHI to an OD₆₀₀ of 0.02 and incubated at 37°C with shaking (orbital amplitude of 3 mm) in a Tecan microplate reader (Infinite M Nano). OD₆₀₀ was measured every 10 minutes for 24 hours.

MIC determination

The minimal inhibition concentration (MIC) was determined by micro broth dilution assays. Cultures in early-log phase prepared in fresh BHI from an overnight culture were diluted to an OD₆₀₀ of 0.05 and incubated at 37°C with shaking (120 rpm) until an OD₆₀₀ of 0.5. Concurrently, two-fold serial dilutions of antibiotic were realized in BHI in a 96-well microplate (Bio-Rad, CA, USA), as described by Coupri *et al.* (Coupri *et al.*, 2019). The DltA inhibitor was added when necessary to a final concentration of 1 mM or replaced by sterilized pure water for the controls. Then, microplates were inoculated with 10-times dilutions of early log-phase cultures. Inoculum size was between 5×10^5 and 5×10^6 CFU/mL and controlled by plate counting on BHI agar. Microplates were incubated for 24 hours at 37°C before reading. The MIC was determined as the lowest antibiotic concentration to which no growth was observed. MIC values indicated in Table 2 and Fig. S1 were the average of three independent replicates.

Bacterial survival

As described above, cultures in early log-phase were prepared in fresh BHI to an OD₆₀₀ of 0.5. Cells were distributed in 96-well microplates (Bio-Rad, CA, USA) to generate around 2×10^8 CFU/mL. When required, antibiotic diluted in BHI was added. In the same way, the DltA inhibitor was added when appropriate to a final concentration of 1mM. Plates counting on BHI agar were realized immediately after inoculation (T₀) and after 24 hours of incubation at 37°C

(T₂₄). The rate of survival was determined as the ratio of T₂₄ on T₀ for each condition. The final rate value was the average of three independent experiments.

Biofilm Inhibition and Eradication

The biofilm inhibition (BI) and biofilm eradication (BE) experiments were performed by micro broth dilution assays in 96-well polystyrene plates (Bio-Rad, CA, USA). Assays were realized in BHI media supplemented with 2% of glucose (BHI-G). For each medium, cultures in log phase in fresh medium were obtained from an overnight culture diluted to an OD₆₀₀ of 0.05 and cultivated for 2h30. Cultures were washed with fresh media and adjusted to a final OD₆₀₀ of 0.1 for inoculating microplates. For BI assays, antibiotics and the DltA inhibitor were added when needed at the same time as inoculum, as described above for the MIC assays. After 24 hours at 37°C, the amount of biofilm was determined in each well by crystal violet (CV) staining. Briefly, the wells were gently washed 2 times with saline solution, air-dried for 45min in under laminar flow at room temperature and stained with 0.1% CV. CV was removed carefully, and biofilms were washed 3 times in saline solution, air-dried 45min before adding 30% acetic acid to extract CV. Biofilm was resuspended vigorously after 15min in contact with acetic acid and the optical density was measured at 570nm. For BE assays, microplates were inoculated with washed cultures and incubated at 37°C. After 24 hours, biofilms formed were washed gently 2 times in saline solution to remove suspended cells and dried for 45 min at room temperature before adding antibiotics, inhibitor or medium in corresponding wells. Microplates were incubated 24 hours at 37°C before determining the amount of biofilm by CV staining. Experiments were performed with 8 technical replicates of negative controls (medium only) and 4 or 3 technical replicates of samples and positive controls (samples without antibiotic). Data of all the different samples were corrected by subtracting the mean of negative controls. Then, OD of each samples were divided by the mean of positive controls to calculate the relative

absorbance. Data of relative absorbance from 3 experiments (2 experiments with inhibitor) were represented in box plots, providing the distribution, outliers and paired data relations (Allkja *et al.*, 2020). The Minimum Biofilm Inhibition Concentration (MBIC₉₀) and Eradication Concentration (MBEC₉₀) are the lowest concentration which inhibits or eradicates 90% of biofilm of positive control (Relative absorbance $\leq 10\%$).

In host infection and antibiotic/adjuvant treatment

Virulence and drugs effect in animal model were determined in *Galleria mellonella*. Rearing larvae, insect selection and intra-haemocoelic injections were realized as described by Ramarao (2012). Injections were performed with a 26G needle (Terumo, Belgium) and a syringe pump (Thermofisher, MA, USA). Bacterial cultures in early log-phase were obtained from dilution of overnight culture to an OD₆₀₀ of 0.05 and incubated 3 hours at 37°C with shaking (120 rpm). Cells were harvested, washed twice in saline solution (0.9% NaCl) and adjusted to an OD₆₀₀ of 2 that corresponds to a bacterial infection of roughly 10⁶ CFU/animal. Two hours post-infection, a second injection was realized with saline water, antibiotic and/or DltA inhibitor at 48.5 mg/kg, as described in Coupri *et al.* (2019). Antibiotics diluted in saline water were administered at 2 mg/kg for oxacillin (except for *S. aureus* CHU1-infected larvae treated with 1 mg/kg of oxacillin), 1 mg/kg for cefotaxime and 0.06 mg/kg for imipenem. Larvae were housed per 5 in Petri dish at 37°C for 48 hours. Survival rate was determined by counting live and dead larvae every four hours from 12 hours to 48 hours post-infection. A total of 60 larvae per condition were treated through three independent experiments.

Quantification of D-alanine ester content in teichoic acids.

Ester-linked D-alanine content was determined as described previously (McBride and Sonenshein, 2011) with following modifications: Cultures were grown in 5 mL of BHI for 24

hours at 37 °C with shaking (120 rpm) and the DltA inhibitor was added when appropriate to a final concentration of 1mM. Results represent the average of three independent experiments, each experiment tested in duplicate samples.

Statistical analysis

Tests of statistical significance for MIC data were performed by two-tailed unpaired *t* test (Lee *et al.*, 2016), with GraphPad Prism 7.00. Pvalues <0.05 were considered statistically significant. Data in host were represented in Kaplan-Meier curves. Analysis was performed with statistical software “R” (<http://www.R-project.org/>, Vienna, Austria). A log-rank test with a Bonferroni adjustment was performed for multiple comparison between all different conditions used (Tripathi and Pandey, 2017). Curves with Pvalues < 0.05 were considered as statistically different.

Results

D-alanylation deficiency of TAs re-sensitizes MRSA to oxacillin and imipenem.

We started our investigations by the determination of the MICs of four β -lactams belonging to the sub-families of penicillin A (amoxicillin), penicillin M (oxacillin), cephalosporine (cefotaxime) and carbapenem (imipenem) against 13 MRSA strains (12 HA-MRSA and 1 CA-MRSA, Table 2). As shown in table 2, these strains have different levels of resistance to the tested β -lactams, ranging from weak to high resistant. The median minimum inhibitory concentrations of this panel of MRSA strains are 16 μ g/mL for imipenem, 64 μ g/mL for oxacillin, 128 μ g/mL for both amoxicillin and cefotaxime (Fig. S1). Next, we tested the effect of D-alanylation deficiency on β -lactam resistance. Therefore, we initiated constructions of *dltA* mutants which was successful for two strains (MW2 and CNRI). Compared to the corresponding wild-type strains, no difference in growth on BHI was observed with the

MW2 Δ *dltA* mutant whereas the CNRI Δ *dltA* mutant showed a slightly longer lag phase than the parental strain (Fig. S2). The MICs of oxacillin, amoxicillin, cefotaxime, and imipenem decreased in the *dltA* mutants (Table 2). All strains were also treated with a previously described inhibitor with high affinity for DltA of *Bacillus subtilis* *in vitro* (May *et al.*, 2005). This inhibitor proved efficient in *S. aureus* strains since it decreased D-alanylation of teichoic acid by 60% to 100% (Table 3). Except for the low-level resistant strain CNRVIII, presence of the DltA inhibitor during the antibiotic treatment led to a significant reduction (≥ 4 -fold) in the MIC of oxacillin across the other MRSA strains tested, independent of the degree of resistance and the SCCmec type (Table 1). The median MIC of this panel of MRSA strains was 8 μ g/mL (Fig. S1). Under the same conditions, a decrease in MICs ≥ 4 -fold was observed in only 38 % and 31 % of the strains for amoxicillin and cefotaxime with median MICs of 128 μ g/mL and 64 μ g/mL, respectively (Table 2; Fig. S1). Inhibition of D-alanylation decreased the MIC of imipenem across all tested strains resistant to the antibiotic by 8-fold to 256-fold resulting in MIC values between 0.03 μ g/mL and 1 μ g/mL (Table 2). The median MIC of the tested strains was 0.25 μ g/mL (Fig. S1). The MIC of strain CNRVIII did not decrease in the presence of the inhibitor likely due to the already high intrinsic sensitivity to imipenem of this strain. The comparison with the results obtained with the *dltA* mutants of strains CNRI and MW2 shows that pharmacological inhibition decreased the MICs of imipenem to the same extent as genetic inactivation (Table 2). We concluded that the DltA inhibitor acts as an anti-resistance drug and its combination with imipenem restored β -lactam clinical susceptibility as determined by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) standard (<4 μ g/mL for imipenem).

Table 2: Inhibition of D-alanylation of lipo-teichoic acids reduces MIC ($\mu\text{g/mL}$) of various β -lactams against MRSA-clinical isolates of *S. aureus*.

	CTX		IPM		AMX		OX	
INH	-	+	-	+	-	+	-	+
CHU1*	1024	8	32	0.25	64	4	256	2
CHU17	2048	1024	32	0.25	32	32	256	32
CNRI	2048	1024	16	0.25	32	32	256	64
CNRIΔDLTA	128	Nd	0.25	Nd	16	Nd	32	Nd
CNRII	64	256	16	1	1024	128	32	8
CNRIII*	512	128	64	1	1024	128	256	16
CNRIV*	512	256	64	1	1024	128	128	16
CNRV	64	16	4	0.06	1024	128	4	1
CNRVI	32	16	0.5	0.03	64	64	4	1
CNRVII	64	64	16	0.25	128	128	32	8
CNRVIII	8	8	0.12	0.12	2	2	2	1
CNRIX	128	64	128	0.5	256	128	64	16
CNRX	2048	256	64	0.25	512	512	128	16
MW2	32	16	0.25	0.03	64	32	8	2
MW2ΔDLTA	8	Nd	0.03	Nd	8	Nd	0.5	Nd

CTX, cefotaxime; IPM, imipenem; AMX, amoxicillin; OX, oxacillin

INH: DltA inhibitor

*HA-MRSA used for in host experiments

Nd: not determined

-/+ : absence/presence

Table 3: % Reduction of D-alanine ester content of teichoic acids in *S. aureus*

Bacterial isolates	CNRI		MW2		CNRIII	CNRVII	CNRIX
	Inh	$\Delta dltA$	Inh	$\Delta dltA$	Inh	Inh	Inh
% Reduction of D-alanine* (standard deviation)	88.4 (12.13)	101.5 (3.84)	62.5 (7.09)	101.5 (1.99)	87.2 (8.41)	85.7 (31.82)	92.2 (4.94)

*Ester-linked D-alanine were quantified from 24 hours cultures of *S. aureus* wild-type strains cultivated in absence or presence of DltA inhibitor (Inh; 1 mM) or their isogenic mutants $\Delta dltA$. The % reduction was determined as the ratio of D-alanine content after pharmacological or genetic inactivation of D-alanylation and that of wild-type strain without treatment. Results represent the average of three independent experiments, each experiment tested in duplicate samples.

The DltA inhibitor potentiates the bactericidal effect of imipenem in *S. aureus*.

Next, we evaluated the bactericidal impact of the antibiotics on the survival of WT and of genetically- or chemically- based D-alanylation deficient MRSA strains. Viable counts of wild-type strain MW2 and its isogenic $\Delta dltA$ mutant (MW2 $\Delta dltA$) were determined after 24 hours in the absence or presence of imipenem (Fig. 1), oxacillin, cefotaxime, or amoxicillin (Fig. S3). In the absence of antibiotic, plate counts after 24 hours were comparable for the WT and MW2 $\Delta dltA$ mutant strains (Fig. 1 and S3). Survival of the wild-type strain treated with the selected antibiotics remained close to 100%. Survival of the MW2 $\Delta dltA$ mutant was slightly reduced (<1 log) in presence of different amoxicillin concentrations (10 to 50 $\mu\text{g/mL}$) (Fig. S3A). In the case of oxacillin or cefotaxime, significant mortality of 2 to 5 log of the $\Delta dltA$ mutant was observed only with clinically irrelevant concentrations ($\geq 30 \mu\text{g/mL}$) (Fig. S3B and C). In contrast, imipenem was highly bactericidal for the MW2 $\Delta dltA$ mutant. Compared to the WT strain, the survival after 24 hours of treatment of the mutant dropped by around 3 log at 0.1 $\mu\text{g/mL}$ and 6 log at 0.5 $\mu\text{g/mL}$ and 1 $\mu\text{g/mL}$ of imipenem (Fig. 1). Then we analyzed the effect of pharmacological inhibition of D-alanylation on survival. In absence of imipenem, survival after 24 hours in the presence of the DltA inhibitor of all strains was comparable (Fig. 1 and S3). Similar to the results obtained with the MW2 $\Delta dltA$ mutant, the pharmacological inhibition

of D-alanylation strongly reduced the survival of the wild-type strain MW2 to imipenem by around 3 log at 0.1 $\mu\text{g/mL}$ and 5 log at 1 $\mu\text{g/mL}$ of the antibiotic (Fig. 1). We concluded that in this strain the DltA inhibitor significantly potentiated the bactericidal effect of imipenem. However, killing by the drug was less efficient for the other three strains tested. Survival of CHU1 and CNRIII dropped by around 1 log and 1.5 log, respectively (Fig. S4A and B), whereas the difference in killing of the CNRIV clinical isolate in the absence or presence of the inhibitor seems to be statistically not significant (Fig. S4C).

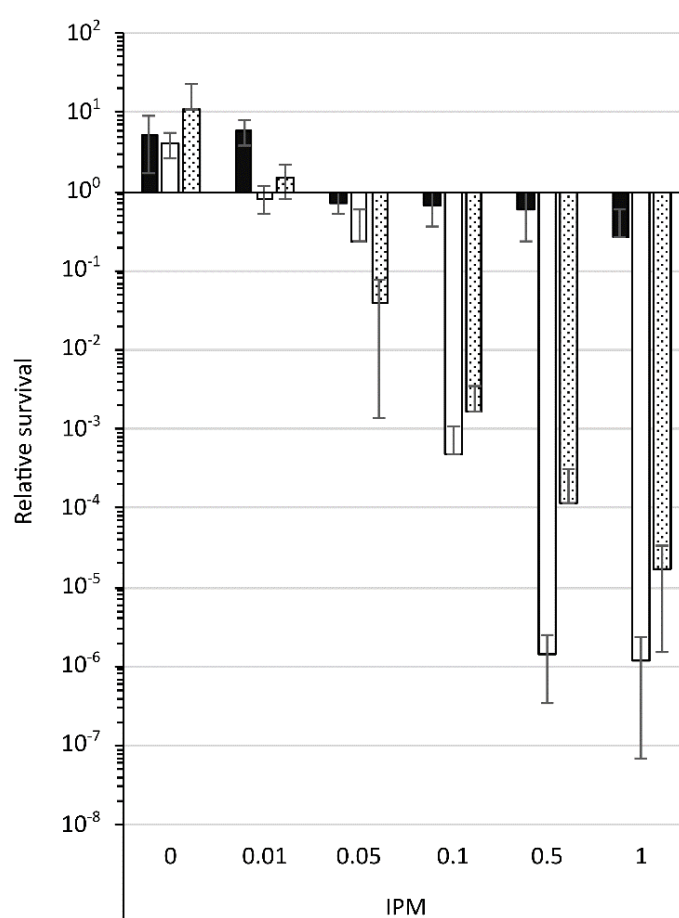


Figure 1: D-alanylation deficiency potentiates the bactericidal effect of imipenem in *S. aureus*.

Early log-phase cultures of *S. aureus* MW2 (wild-type strain, black bars) in which D-alanylation was genetically inactivated (MW2 Δ dltA, white bars) or pharmacologically inhibited (dotted bars) were treated with a range of imipenem (IPM, from 0.01 to 1 $\mu\text{g/mL}$) in the absence (unmarked bars) or presence (hatched bars) of DltA inhibitor (1 mM). Enumeration by plate counting was realized before addition of imipenem (T_0) and after 24 hours treatment with the drug at 37°C (T_{24}). The relative survival was determined as the ratio of T_{24} on T_0 . The results shown are the averages of three independent experiments.

Imipenem/DltA inhibitor combination decreases killing of insect larvae by MRSA.

To evaluate the ability of inhibition of D-alanylation to overcome the antibiotic resistance of MRSA in a host organism, we used the animal model *Galleria mellonella*. Larvae were infected with high doses (around 10^6 CFU/larvae) of HA-MRSA and their survival was determined every four hours from 12 to 48 hours post-infection. Without any treatment, the *S. aureus* CNR IV strain seems slightly less virulent than the clinical isolates CHUI and CNRIII in this model ($p\text{value} < 2 \times 10^{-11}$) although all strains killed the larvae and the survival rates were 17.5%, 5.33%, and 1.71% after 48 hours, respectively (Fig. 2). In experiments with treatments, the antibiotics or/and the DltA inhibitor were injected into the larvae two hours post-infection. Of note, we recently showed that the DltA inhibitor has no toxicity in the *Galleria mellonella* model (Coupri *et al.*, 2019). As shown in Fig. 2, antibiotics alone did not cure larvae from infection. Treatment with the DltA inhibitor alone had no effect on the survival of the infected larvae (Fig. 2). The combination of DltA inhibitor and cefotaxime improved around 6-fold the survival rate of CHU1 infected-larvae at 48 hours post-infection compared to the antibiotic alone and control conditions ($p\text{value} < 5.6 \times 10^{-5}$, Table S1) whereas this combination was less effective for CNR III and CNR IV infected-larvae (Fig. 2 and Table S1). Combination therapy with the DltA inhibitor and either oxacillin or imipenem significantly increased survival of the infected larvae in all strains tested (Fig. 2 and Table S1). This shows that pharmacological inhibition of DltA in combination with some β -lactams re-sensitizes MRSA strains to these antibiotics in a host organism.

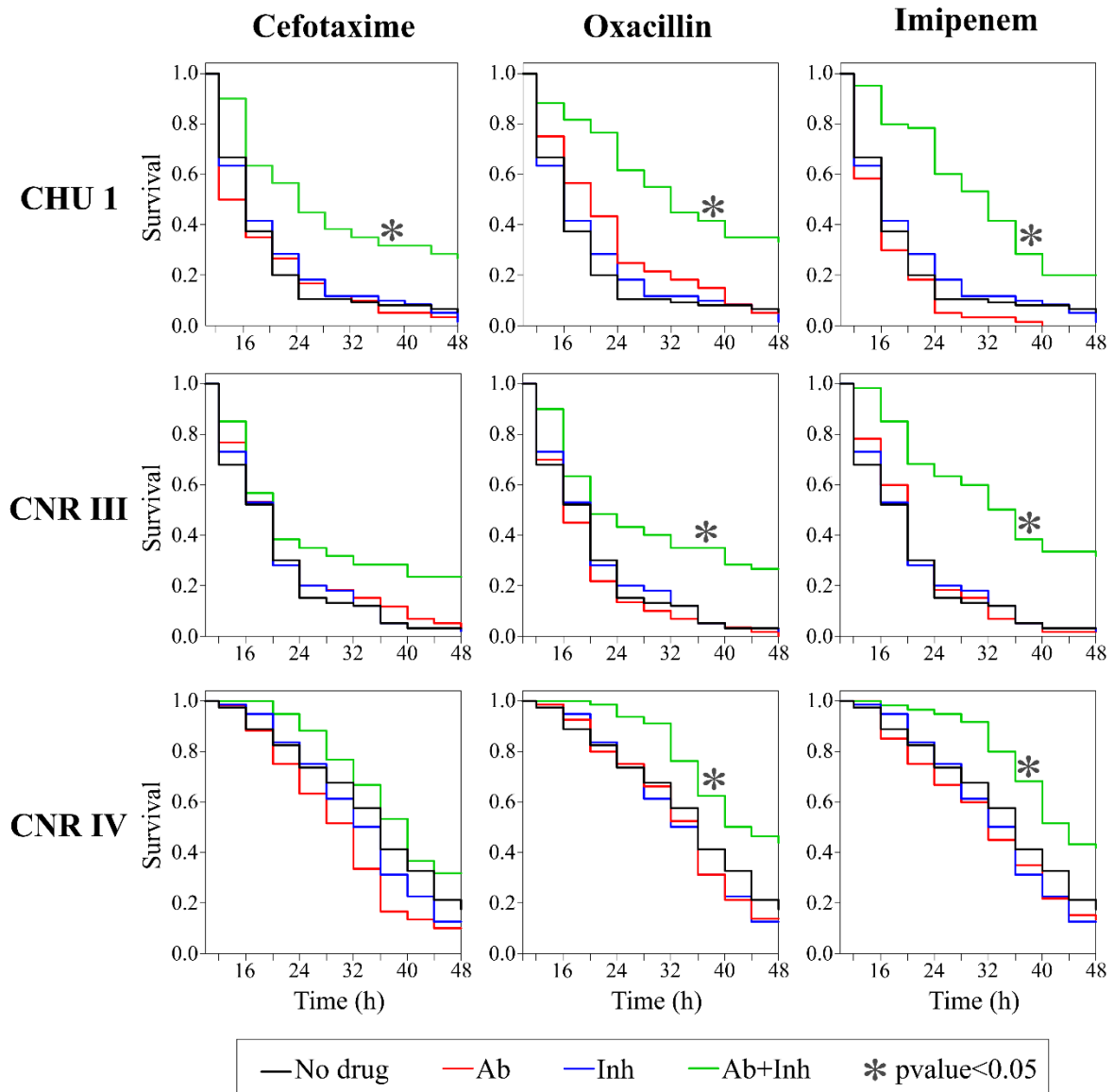


Figure 2: Effect of combination of the DltA inhibitor with β -lactams on the survival of MRSA-infected insect larvae.

G. mellonella larvae were infected with HA-MRSA followed 2 hours post-infection by injections of 10 μ L saline solution (No drug; black line) or 10 μ L of oxacillin at 2 mg/kg (CNR III and CNR IV) or 1 mg/kg (CHU 1), of cefotaxime at 1 mg/kg, of imipenem at 0.06 mg/kg (Ab; red line), of the DltA inhibitor at 48.5 mg/kg (Inh; blue line) or of antibiotic/inhibitor combinations (Ab+Inh; green line). Living and dead larvae were counted every 4 hours, from 12 to 48 hours post-infection. Three independent experiments were performed to treat a total of 60 animals per condition.

Effect of imipenem and D-alanylation deficiency on biofilm formation and eradication

A main virulence factor of *S. aureus* is the ability to form biofilms on abiotic (including medical devices) and biotic surfaces (heart valves, bones). It is well known that antibiotics are less efficient on bacteria in biofilms and new therapeutic strategies to overcome these limitations are urgently needed (Pinto *et al.*, 2019). Therefore, we wondered if D-alanylation deficiency combined to imipenem treatment would be efficient to inhibit biofilm formation and/or to eradicate existing biofilms. The biofilm inhibition (BI) and eradication (BE) experiments were realized in BHI supplemented with 2% of glucose (BHI-G), since glucose promotes biofilm formation (Waldrop *et al.*, 2014). It has been previously shown that a *dltA* mutant of *S. aureus* strain ATCC 35556 was strongly affected in adherence on polar and apolar surfaces (Gross *et al.*, 2001). Under our experimental conditions and using strain MW2 and the corresponding *dltA* mutant, we found that in the absence of imipenem biofilm formation of the wild type and mutant strains are comparable (Fig. 3). Increasing concentrations of imipenem increased biofilm formation of the wild type but strongly inhibited it in the MW2 Δ *dltA* mutant (Fig. 3A). Interestingly, a comparable decrease in biofilm formation was observed in the wild type strain in the presence of the DltA inhibitor. The MBIC₉₀ of imipenem for the WT strain is around 1 μ g/mL whereas it is 0.125 μ g/mL and 0.0625 μ g/mL for the wild type strain in the presence of the DltA-inhibitor and the Δ *dltA* mutant, respectively (Fig. 3A and Table S2). This shows that pharmacological inhibition of D-alanylation efficiently blocks biofilm formation.

In the case of biofilm eradication, no measurable decrease of imipenem was observed with the wild type strain even with the highest concentrations tested whereas low concentrations of the antibiotic destroyed the biofilm of the Δ *dltA* mutant strain (Fig. 3B). The MBEC₉₀ of imipenem for the last strain was 0.25 μ g/mL (Fig. 3B and Table S2). However, treatments of wild type biofilms with imipenem and the DltA inhibitor had no effect on biofilm eradication.

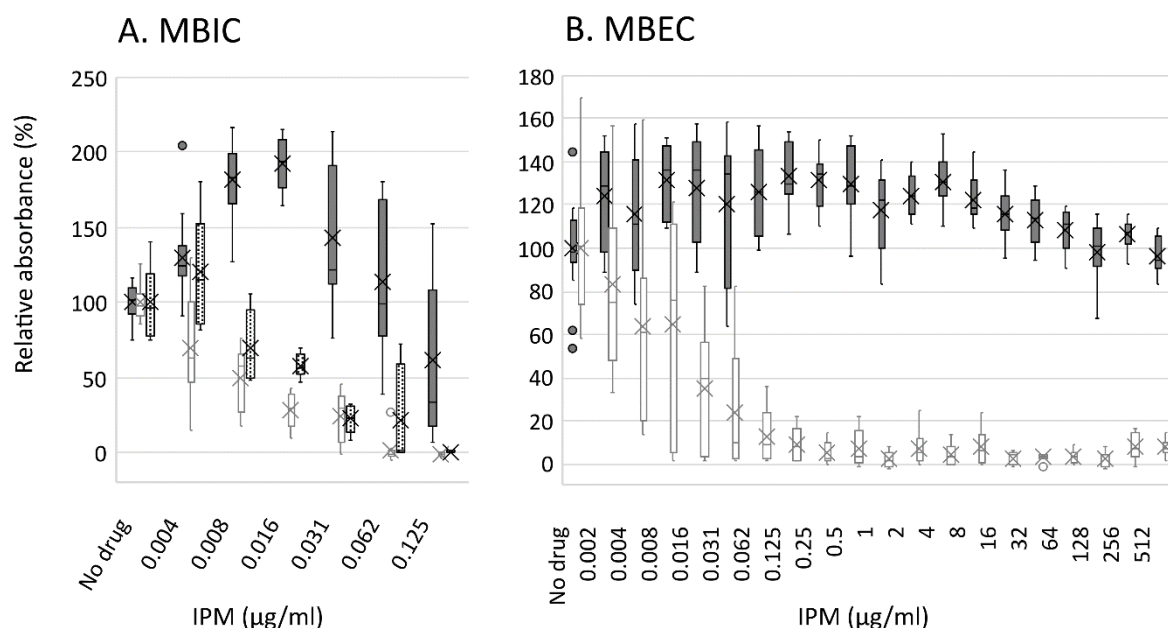


Figure 3: Anti-biofilm effect of imipenem on wild-type and $\Delta dltA$ mutant strain

Minimum Biofilm Inhibition (A) and Eradication (B) Concentrations of imipenem (IPM) against *S. aureus* MW2 (dark boxes), its $\Delta dltA$ mutant (white boxes), and the wild type strain in presence of 1mM of DltA inhibitor (dotted boxes) are shown. Assays were performed in BHI supplemented with 2% of glucose (BHI-G). For the determination of MBIC₉₀ of the wild type strain, a wider range of imipenem concentrations as shown in (B) were used. Values of MBIC₉₀ and MBEC₉₀ are summarized in Table S2.

Discussion

As emphasized by the WHO report in 2017 (Tacconelli *et al.*, 2018), continuous efforts for the research and development of new antibiotics and treatment strategies against MRSA infections remains necessary. In this communication we explored D-alanylation as a potential new Achilles heel of drug resistant *S. aureus*. Such a comprehensive analysis including numerous clinical MRSA isolates has not been done before in *S. aureus*. This analysis was necessary because of conflicting data in the literature. Some reports showed that inactivation of the *dlt* operon increased resistance to β -lactams in *S. aureus* (Nakao *et al.*, 2000; Pasquina *et al.*, 2016) whereas other studies considered the D-alanylation system of pharmacological relevance for

infection-control of MRSA (Brown *et al.*, 2012). Our results show that the D-alanylation system is a druggable target in *S. aureus* since a DltA inhibitor, which has strong affinity for the DltA protein of *B. subtilis* (May *et al.*, 2005), significantly decrease D-alanylation of teichoic acids in *S. aureus*. This inhibitor displays synergy with β -lactams, especially with imipenem. Indeed, imipenem in combination of the DltA inhibitor decreased MICs under the clinical breakpoint in all high-level resistant MRSA strains tested. Although our results are very promising, lead optimization is necessary since relatively high concentrations of the current inhibitor, although high affinity for its target *in vitro* (May *et al.*, 2005), are necessary to significantly potentiate β -lactam action.

We previously conducted a comparable work in enterococci (Coupri *et al.*, 2019). In contrast to the results shown here, genetic or chemical inhibition of D-alanylation did not modify the CMI of the enterococcal strains and only combinations of some antibiotics considerably increased their killing. This demonstrates that D-alanylation deficiency differently affects antibiotic resistance in different species.

A fundamental question is why does D-alanylation deficiency decrease β -lactam resistance of MRSA strains despite the presence of PBP2a. Previous works of other groups showed that presence of PBP2a is not sufficient for resistance to β -lactams of MRSA but is also dependent on several auxiliary genes, most of them were shown to be implicated in peptidoglycan precursor synthesis and turnover (Berger-Bächi and Rohrer, 2002; Gardete *et al.*, 2004; Huber *et al.*, 2009; Sobral *et al.*, 2003). Furthermore, it has been shown that PBP2a directly bind WTAs *in vitro* (Qamar and Golemi-Kotra, 2012). WTAs are important in regulating cell division in *S. aureus* and are also involved in maintaining resistance to β -lactams in MRSA strains (Campbell *et al.*, 2011). Assuming that in order to be active, PBP2a has to be recruited by WTAs and that binding to the polymers needs D-alanine decoration, their absence or reduced number by genetic or chemical inhibition of the Dlt-system might explain re-sensitisation to β -

lactams. However, in that case one would expect that overall the MICs of the tested strains should decrease to the level of MSSA strains. This is observed with imipenem but, with some exceptions, not for the two penicillins and the cephalosporin tested.

The most effective drug combined to the DltA inhibitor in our study was imipenem followed by oxacillin and then cefotaxime and amoxicillin. It has been shown that β -lactams have different affinities for the PBPs of *S. aureus in vitro* (Ferrer-González *et al.*, 2017). The carbapenem has high affinity for three PBPs (PBP1, PBP2 and PBP3). Oxacillin also binds to these PBPs but with reduced affinity compared to imipenem. Cefotaxime targets efficiently only PBP2 and amoxicillin has not been tested in this study. If this also applies *in vivo*, then it would mean that potentiation of β -lactams in D-alanylation deficient MRSA strains is the more efficient the more transpeptidase activities of the native PBPs are blocked by the antibiotic.

In conclusion, DltA inhibition should be of promising therapeutic utility especially in combination with carbapenems for restoring the therapeutic efficacy of this important class of antibiotics against methicillin-resistant staphylococci. The current inhibitor used in this study is a useful scaffold in order to develop compounds with improved *in vivo* efficiencies to inhibit DltA. However, a critical point which may limit clinical utility is spontaneous development of resistance to these compounds. Once DltA inhibitors with improved *in vivo* activity are available, the frequency of resistance has to be determined. An advantage of the Dlt-system is that the four proteins, DltA to DltD, are essential for D-alanylation of teichoic acids. Therefore, the risk of resistance development can be counteracted by inhibitors targeting other Dlt proteins than DltA. Interestingly, an inhibitor of DltB of *S. aureus* has been recently identified in a synthetic lethal approach but this compound is unfortunately toxic to eukaryotic cells due to inhibition of eukaryotic topoisomerases (Pasquina *et al.*, 2016). Our results advertise greater efforts to screen or rationally design new highly efficient drugs targeting the Dlt-system which

are of utmost pharmacological interest to overcome MRSA and likely other infections due to Gram-positive pathogens such as enterococci and *Clostridium difficile*.

Supplementary data

Tables S1-S2

Fig. S1-S2-S3-S4

Acknowledgments

We are especially grateful to the University Hospital Center of Caen (France) for providing *S. aureus* strains CHU and RN4220, to the National Reference Center for Staphylococci (Hospices Civils of Lyon, University of Lyon, France) for providing strains CNR and MW2, to S. Walker for providing the pMAD*ΔdltA*, and A. Peschel for providing the pRB473-*dlt* for complementation studies. The expert technical assistance of I. Rincé, A.C. Appourchaux and S. Gueulle (Normandie Univ, UNICAEN, U2RM, 14000 Caen, France) was greatly appreciated.

Fundings

This work was funded by the Agency of National Research and the French Ministry of Education and Science funded the doctoral fellowship of Delphine Coupri.

Transparency declarations

There is no conflict of interest concerning this work.

References

- Allkja, J., Bjarnsholt, T., Coenye, T., Cos, P., Fallarero, A., Harrison, J.J., Lopes, S.P., Oliver, A., Pereira, M.O., Ramage, G., *et al.* (2020). Minimum information guideline for spectrophotometric and fluorometric methods to assess biofilm formation in microplates. *Biofilm* 2, 100010.
- Berger-Bächi, B., and Rohrer, S. (2002). Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. *Archives of Microbiology* 178, 165–171.
- Brown, S., Xia, G., Luhachack, L.G., Campbell, J., Meredith, T.C., Chen, C., Winstel, V., Gekeler, C., Irazoqui, J.E., Peschel, A., *et al.* (2012). Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* requires glycosylated wall teichoic acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 18909–18914.
- Campbell, J., Singh, A.K., Santa Maria, J.P., Kim, Y., Brown, S., Swoboda, J.G., Mylonakis, E., Wilkinson, B.J., and Walker, S. (2011). Synthetic Lethal Compound Combinations Reveal a Fundamental Connection between Wall Teichoic Acid and Peptidoglycan Biosyntheses in *Staphylococcus aureus*. *ACS Chem. Biol.* 6, 106–116.
- Coupri, D., Budin-Verneuil, A., Hartke, A., Benachour, A., Léger, L., Lequeux, T., Pfund, E., and Verneuil, N. (2019). Genetic and pharmacological inactivation of d-alanylation of teichoic acids sensitizes pathogenic enterococci to β -lactams. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 74, 3162–3169.
- Ferrer-González, E., Kaul, M., Parhi, A.K., LaVoie, E.J., and Pilch, D.S. (2017). β -Lactam Antibiotics with a High Affinity for PBP2 Act Synergistically with the FtsZ-Targeting Agent TXA707 against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 61, e00863-17, e00863-17.
- Fisher, J.F., and Mobashery, S. (2020). Constructing and deconstructing the bacterial cell wall. *Protein Science* 29, 629–646.
- Gardete, S., Ludovice, A.M., Sobral, R.G., Filipe, S.R., de Lencastre, H., and Tomasz, A. (2004). Role of murE in the Expression of β -Lactam Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. *JB* 186, 1705–1713.
- Gross, M., Cramton, S.E., Götz, F., and Peschel, A. (2001). Key Role of Teichoic Acid Net Charge in *Staphylococcus aureus* Colonization of Artificial Surfaces. *Infect. Immun.* 69, 3423–3426.
- Grosser, M.R., and Richardson, A.R. (2014). Method for Preparation and Electroporation of *S. aureus* and *S. epidermidis*. In *The Genetic Manipulation of Staphylococci*, J.L. Bose, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 51–57.
- Hébert, L., Courtin, P., Torelli, R., Sanguinetti, M., Chapot-Chartier, M.-P., Auffray, Y., and Benachour, A. (2007). *Enterococcus faecalis* Constitutes an Unusual Bacterial Model in Lysozyme Resistance. *IAI* 75, 5390–5398.

- Huber, J., Donald, R.G.K., Lee, S.H., Jarantow, L.W., Salvatore, M.J., Meng, X., Painter, R., Onishi, R.H., Occi, J., Dorso, K., *et al.* (2009). Chemical Genetic Identification of Peptidoglycan Inhibitors Potentiating Carbapenem Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Chemistry & Biology* 16, 837–848.
- Lakhundi, S., and Zhang, K. (2018). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clin Microbiol Reviews* 31, e00020-18, /cmr/31/4/e00020-18.atom.
- Lee, A.S., de Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-Kumar, S., Peschel, A., and Harbarth, S. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Primers* 4, 18033.
- Lee, S.H., Wang, H., Labroli, M., Koseoglu, S., Zuck, P., Mayhood, T., Gill, C., Mann, P., Sher, X., Ha, S., *et al.* (2016). TarO-specific inhibitors of wall teichoic acid biosynthesis restore β -lactam efficacy against methicillin-resistant staphylococci. *Sci. Transl. Med.* 8, 329ra32-329ra32.
- May, J.J., Finking, R., Wiegeshoff, F., Weber, T.T., Bandur, N., Koert, U., and Marahiel, M.A. (2005). Inhibition of the D-alanine:D-alanyl carrier protein ligase from *Bacillus subtilis* increases the bacterium's susceptibility to antibiotics that target the cell wall: Characterization and inhibition of the Dlt system. *FEBS Journal* 272, 2993–3003.
- McBride, S.M., and Sonenshein, A.L. (2011). The *dlt* operon confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Clostridium difficile*. *Microbiology* 157, 1457–1465.
- McKay Wood, B., Santa Maria, J.P., Matano, L.M., Vickery, C.R., and Walker, S. (2018). A partial reconstitution implicates DltD in catalyzing lipoteichoic acid D-alanylation. *J. Biol. Chem.* 293, 17985–17996.
- Nakao, A., Imai, S., and Takano, T. (2000). Transposon-mediated insertional mutagenesis of the D-alanyl-lipoteichoic acid (*dlt*) operon raises methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Research in Microbiology* 151, 823–829.
- Neuhaus, F.C., and Baddiley, J. (2003). A Continuum of Anionic Charge: Structures and Functions of D-Alanyl-Teichoic Acids in Gram-Positive Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67, 686–723.
- Pacios, O., Blasco, L., Bleriot, I., Fernandez-Garcia, L., González Bardanca, M., Ambroa, A., López, M., Bou, G., and Tomás, M. (2020). Strategies to Combat Multidrug-Resistant and Persistent Infectious Diseases. *Antibiotics* 9, 65.
- Pasquina, L., Santa Maria, J.P., McKay Wood, B., Moussa, S.H., Matano, L.M., Santiago, M., Martin, S.E.S., Lee, W., Meredith, T.C., and Walker, S. (2016). A synthetic lethal approach for compound and target identification in *Staphylococcus aureus*. *Nat Chem Biol* 12, 40–45.
- Pinto, R.M., Lopes-de-Campos, D., Martins, M.C.L., Van Dijck, P., Nunes, C., and Reis, S. (2019). Impact of nanosystems in *Staphylococcus aureus* biofilms treatment. *FEMS Microbiology Reviews* fuz021.

- Qamar, A., and Golemi-Kotra, D. (2012). Dual Roles of FmtA in *Staphylococcus aureus* Cell Wall Biosynthesis and Autolysis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 3797–3805.
- Ramarao, N., Nielsen-Leroux, C., and Lereclus, D. (2012). The Insect *Galleria mellonella* as a Powerful Infection Model to Investigate Bacterial Pathogenesis. *JoVE* 4392.
- Sobral, R.G., Ludovice, A.M., Gardete, S., Tabei, K., de Lencastre, H., and Tomasz, A. (2003). Normally Functioning *murF* Is Essential for the Optimal Expression of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Microbial Drug Resistance* 9, 231–241.
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D.L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., *et al.* (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases* 18, 318–327.
- Tong, S.Y.C., Davis, J.S., Eichenberger, E., Holland, T.L., and Fowler, V.G. (2015). *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 603–661.
- Tripathi, A., and Pandey, A. (2017). Post-Hoc Comparison in Survival Analysis: An Easy Approach. *JBM* 05, 112–119.
- Turner, N.A., Sharma-Kuinkel, B.K., Maskarinec, S.A., Eichenberger, E.M., Shah, P.P., Carugati, M., Holland, T.L., and Fowler, V.G. (2019). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nat Rev Microbiol* 17, 203–218.
- Waldrop, R., McLaren, A., Calara, F., and McLemore, R. (2014). Biofilm Growth Has a Threshold Response to Glucose *in vitro*. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 472, 3305–3310.
- Wilke, M.S., Lovering, A.L., and Strynadka, N.C. (2005). β -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Current Opinion in Microbiology* 8, 525–533.

II.3 Données supplémentaires de la publication

Table S1: Pvalues obtained by the Log-rank test of Fig. 2

		Cefotaxime (CTX)				Oxacillin (OX)				Imipenem (IPM)		
		No drug	Inh	CTX		No drug	Inh	OX		No drug	Inh	IPM
CHUI	Inh	1.00			Inh	1.00			Inh	1.00		
	CTX	1.00	1.00		OX	0.41	0.86		IPM	0.77	0.23	
	CTX +Inh	2.8e-05	5.6e-05	1.5e-05	OX +Inh	5.7e-09	2.0e-08	2.7e-05	IPM +Inh	1.1e-07	8.3e-07	4.5e-13
CNRH	Inh	1.00			Inh	1.00			Inh	1.00		
	CTX	1.00	1.00		OX	1.00	1.00		IPM	1.00	1.00	
	CTX +Inh	7.2e-03	6.6e-3	0.0777	OX +Inh	8.3e-05	7.4e-05	1.8e-05	IPM +Inh	9.2e-10	6.3e-10	1.5e-08
CNRV	Inh	1.00			Inh	1.00			Inh	1.00		
	CTX	0.0691	0.5488		OX	1.00	1.00		IPM	1.00	1.00	
	CTX +Inh	0.3434	0.02	2.0e-4	OX +Inh	6e-04	3.0e-06	8.8e-06	IPM +Inh	2.2e-3	1.8e-05	5.7e-05

Pvalues < 0.05 were considered as statistically different.

Table S2. Summary of MBIC₉₀ and MBEC₉₀ (µg/mL)

	MBIC ₉₀	MBEC ₉₀
MW2	1	>512
MW2Δ<i>dhA</i>	0.0625	0.25
MW2 + Inhibitor	0.125	>32

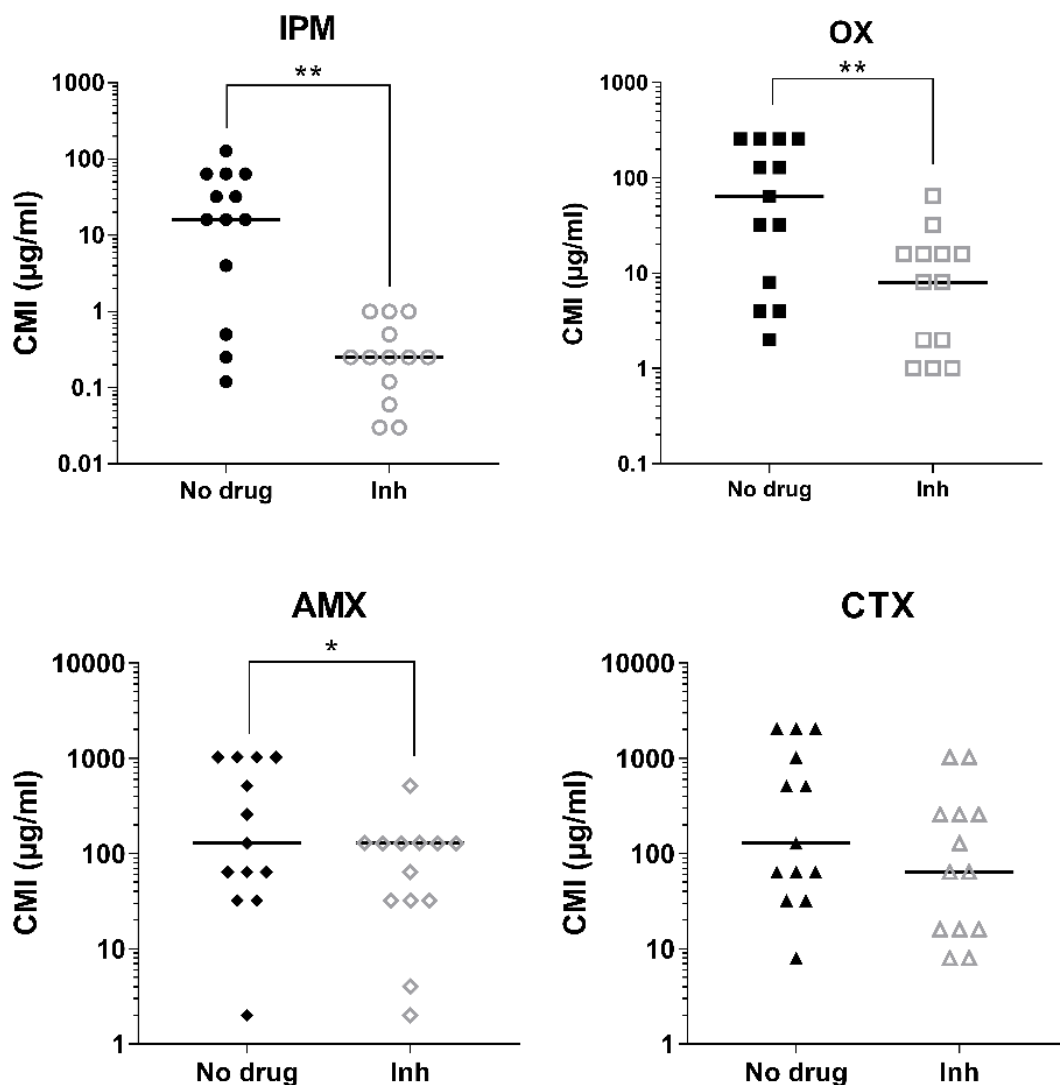


Figure S1: Inhibition of D-alanylation of teichoic acids reduces MICs to various β -lactams of MRSA-clinical isolates.

β -lactams susceptibility coverage of MRSA-clinical isolates of *S. aureus* ($n = 13$) with imipenem (IPM), oxacillin (OX), amoxicillin (AMX), and cefotaxime (CTX) in absence or presence of 1 mM of DltA inhibitor (Inh). Horizontal line corresponds to median MIC. * and ** indicate P values, obtained with two-tailed unpaired t test, less than 0.05 and 0.01, respectively.

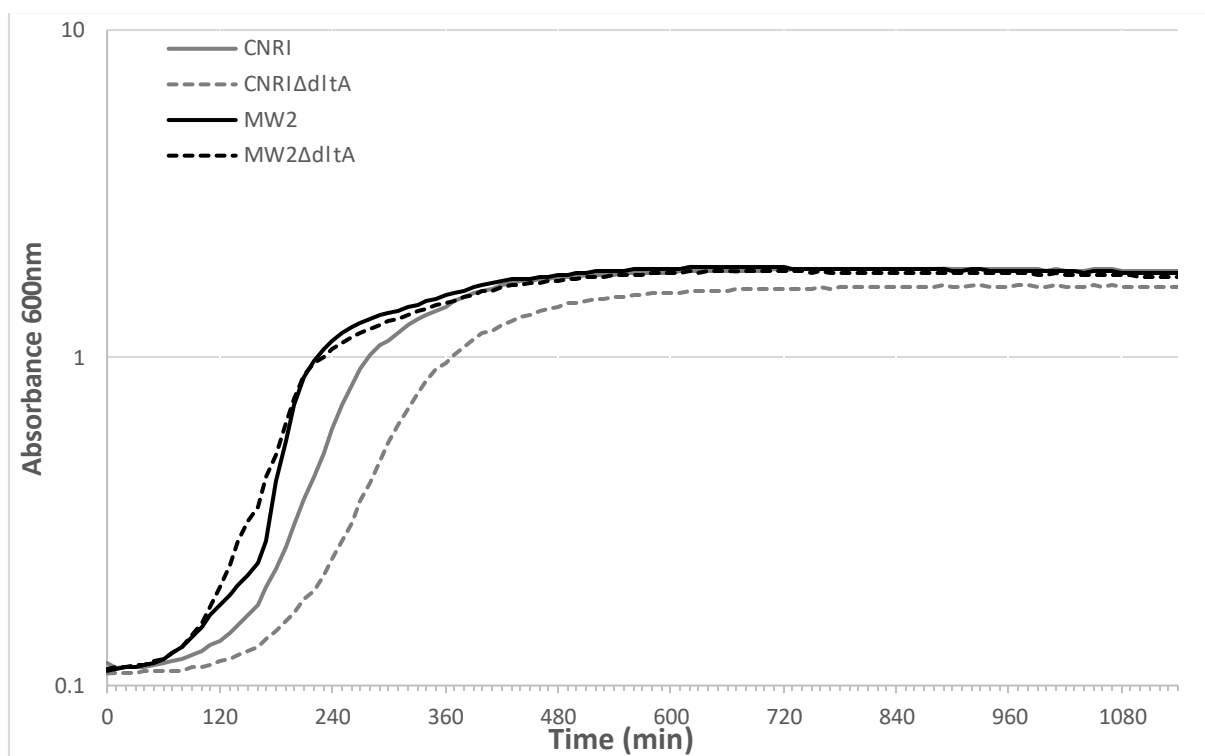


Figure S2: Growth kinetics of wild-type and $\Delta dltA$ mutants of *S. aureus* strains MW2 and CNRI.

Growths of $\Delta dltA$ mutants (dotted lines) and corresponding parental strains (solid lines) of *S. aureus* MW2 (black lines) and CNRI (grey lines) were realized in BHI at 37°C with shaking. Absorbance was measured every 10 minutes for 24 hours. Two biological independent experiments and technical duplicates were realized and a representative result is shown.

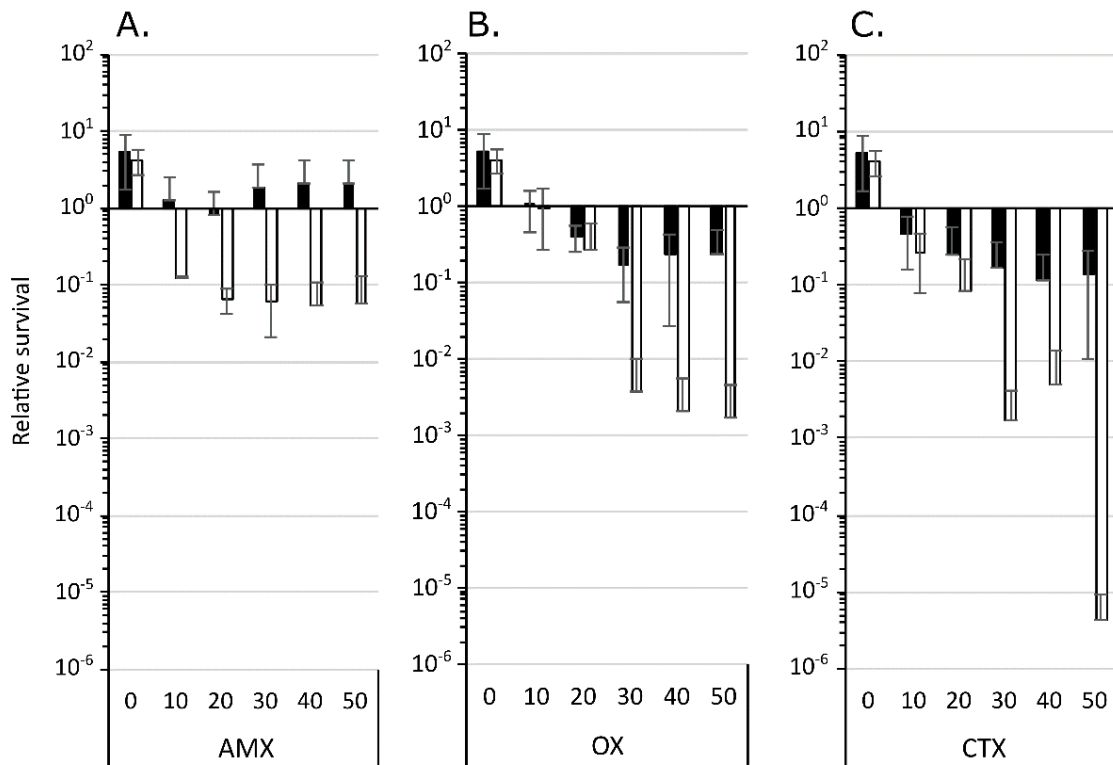


Figure S3: Effect of genetic-induced D-alanylation deficiency on bactericidal activity of amoxicillin, oxacillin, and cefotaxime.

Early log-phase cultures of *S. aureus* MW2 (wild-type strain, black bars) and its isogenic mutant MW2 Δ dltA (white bars) were treated with increasing concentrations (from 10 to 50 μ g/mL) of amoxicillin (AMX), oxacillin (OX) and cefotaxime (CTX). Enumeration by plate counting was realized before onset of the treatment (T_0) and after 24 hours of incubation after treatment with the antibiotics at 37°C (T_{24}). The relative survival was determined as the ratio of T_{24} on T_0 . The rate value was the average of three independent experiments.

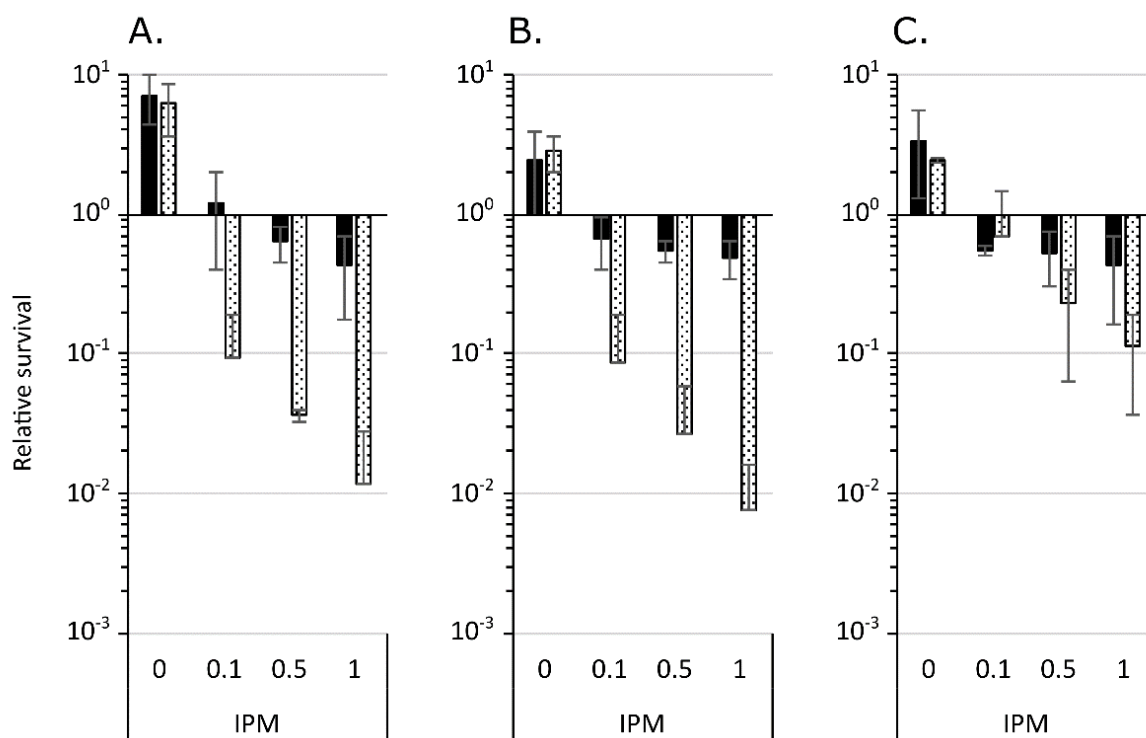


Figure S4: Sensitization of MRSA to imipenem by inhibition of D-alanylation is strain-dependent.

Early log-phase cultures of MRSA CHU1 (A), CNRIII (B) or CNR IV (C) adjusted to 2×10^8 CFU/mL were treated with a range of imipenem (IPM, from 0.1 to 1 μ g/mL) in the absence (black bars) or presence (hatched bars) of DltA inhibitor (1 mM). Enumeration by plates counting was realized at time 0 (T_0) and after 24 hours of incubation at 37°C (T_{24}). The relative survival was determined as the ratio of T_{24} on T_0 . The rate value was the average of three independent experiments.

CHAPITRE III : DISCUSSION GÉNÉRALE

La D-alanylation des TAs a pu être reliée à de nombreuses fonctions dans diverses bactéries, notamment dans la protection contre des molécules antimicrobiennes (Tableau 5 ; Annexe). Plusieurs publications soulignent le lien entre la D-alanylation des TAs et les effets de certains antibiotiques dans de nombreuses bactéries, dont *S. aureus*. La majorité de ces études montre une plus grande sensibilité de *S. aureus* à certains antibiotiques lors de l'absence de D-alanylation (Blake and O'Neill, 2013; Mechler *et al.*, 2016; Peschel *et al.*, 2000; Santa Maria *et al.*, 2014). Nos résultats s'inscrivent dans cette même idée, montrant qu'une perte de D-alanylation a un effet anti-résistance à certaines β -lactamines dans nos modèles d'étude. L'effet observé diverge entre *S. aureus* et les entérocoques. L'absence de D-alanylation ne modifie pas les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des antibiotiques testés chez *E. faecalis* JH2-2, mais permet une réduction des CMI des 4 β -lactamines étudiées pour la majorité des souches de *S. aureus*. La raison de cette différence constatée entre ces deux genres bactériens est inexpliquée. L'effet sur la CMI pourrait trouver sa source dans une inhibition plus efficace des PBPs chez *S. aureus* lors de l'inactivation de la D-alanylation des TAs, lié à une plus grande saturation de celles-ci ou à une perturbation plus importante de leur organisation pouvant induire une perte de leur fonction.

L'effet bactéricide des antibiotiques peut être renforcé lors de l'absence de D-alanylation chez les bactéries, mais ce phénomène dépend également de l'espèce, de la souche et de l'antibiotique étudiés. Ainsi, *E. faecalis* JH2-2 s'avère plus sensible à la combinaison d'amoxicilline et de céphalosporines en faible concentration lors de l'inactivation de la D-alanylation des TAs. Cette inactivation permet également d'augmenter l'activité bactéricide de l'imipénème à faible concentration pour 3 souches de *S. aureus*, et celle de l'oxacilline et de la céfotaxime à fortes concentrations chez *S. aureus* MW2. Nous avons déterminé que les sensibilisations les plus marquées par l'absence de D-alanylation concernent la combinaison amoxicilline/céfotaxime chez les entérocoques et l'imipénème chez *S. aureus*.

Les raisons moléculaires de cette sensibilisation aux antibiotiques lors de l'inactivation des TAs ne sont pas connues. L'hypothèse étayant que l'attractivité électrostatique entre les molécules antimicrobiennes cationiques et la paroi bactérienne serait augmentée lors de l'absence de D-alanylation des TAs (Neuhaus and Baddiley, 2003; Peschel *et al.*, 1999) ne peut s'appliquer à l'amoxicilline, la céfotaxime et l'imipénème, étant des molécules neutres. Une

seconde hypothèse soutient que l'absence de D-alanylation des TAs modifierait la conformation des TAs, diminuant la densité du peptidoglycane qui serait alors plus perméable aux molécules antimicrobiennes (Saar-Dover *et al.*, 2012). Ainsi, lors de l'absence de D-alanylation des TAs, le maillage de la paroi serait plus lâche, permettant une plus grande concentration de β -lactamines au contact de leurs cibles moléculaires. Cette plus forte concentration favoriserait la saturation des PBPs et entraînerait la mort bactérienne. Outre la densité de la paroi, les TAs participent à de nombreuses fonctions cellulaires dont la protection contre des molécules antimicrobiennes. Par exemple les WTA sont suspectés d'interagir avec la PBP2a chez *S. aureus* et participeraient ainsi à la résistance aux β -lactamines (Campbell *et al.*, 2011; Qamar and Golemi-Kotra, 2012). L'absence de D-alanylation pourrait engendrer une perturbation de cette interaction et permettre une sensibilisation aux antibiotiques.

Au vu des effets anti-résistance d'une inactivation de la D-alanylation des TAs observés *in vivo* sur *E. faecalis* et *S. aureus*, nous avons mis en place un protocole de traitements des infections létales à entérocoques et *S. aureus* dans le modèle animal *G. mellonella*. Nos résultats montrent qu'un traitement antibiotique amoxicilline/céfotaxime est encore plus efficace sur les infections à *E. faecalis* et à *E. faecium* résistant à la vancomycine lorsque la D-alanylation des TAs est inactivée génétiquement ou pharmacologiquement. Un résultat similaire est observé avec l'imipénème chez *S. aureus* avec des souches MRSA. Ainsi, les effets anti-résistances induits par une absence de D-alanylation permettent d'envisager de nouveaux traitements efficaces contre les bactéries multi-résistantes, *S. aureus*, *E. faecalis* et *E. faecium*.

En plus des effets anti-résistance de l'absence de D-alanylation des TAs *in vivo* et *in host*, nous avons montré que l'inactivation de la D-alanylation des TAs permet de renforcer l'activité anti-biofilm de l'imipénème chez *S. aureus*. En effet, en présence d'imipénème, la formation de biofilm est inhibée lorsque le système Dlt est déficient, que ce soit de manière génétique ou pharmacologique. De plus, un biofilm formé par un mutant *dltA* est plus sensible à une éradication par l'imipénème. Bien que cette dernière observation n'ait pu être observée par l'addition d'inhibiteur de DltA, ces résultats constituent néanmoins un argument fort pour l'étude de la relation entre le biofilm, la D-alanylation et les antibiotiques. Sous forme de biofilm, les bactéries présentent de plus fortes résistances aux antibiotiques et conduisent souvent à des échecs thérapeutiques (Tremblay *et al.*, 2014; Wille and Coenye, 2020). Wille et Coenye soulignent qu'une dispersion du biofilm semble être une clé pour lutter contre ces infections (Wille and Coenye, 2020). Cependant, cette dispersion peut provoquer des effets délétères pour l'hôte libérant des cellules pouvant avoir une virulence accrue, et pouvant

conduire à des bactériémies. Néanmoins, un traitement antibiotique a permis de prévenir cette septicémie face à la dispersion de biofilm de *S. aureus* dans un modèle murin (Wille and Coenye, 2020). La combinaison imipénème/inhibiteur de DltA, permettant d'améliorer l'efficacité de l'antibiotique face au biofilm produit par *S. aureus*, constitue un argument supplémentaire pour l'utilisation de cette combinaison. Un travail plus approfondi est nécessaire, notamment basé sur la microscopie confocale, pour appréhender plus précisément l'impact d'une absence de D-alanylation sur la structure du biofilm et l'action de l'inhibiteur de DltA sur celui-ci.

Différents inhibiteurs de la D-alanylation des TAs ont pu être décrits dans la littérature (Neuhaus and Baddiley, 2003) montrant que ce mécanisme est une cible thérapeutique envisageable. Par exemple, l'amsacrine et son analogue l'o-AMSA inhibent la protéine DltB, sensibilisant *S. aureus* à la néomycine et à la gentamicine (Pasquina *et al.*, 2016). Cependant, l'amsacrine est connue pour sa toxicité vis-à-vis des cellules eucaryotes. L'inhibiteur utilisé dans notre étude, créé par May et ses collaborateurs, cible la ligase DltA (May *et al.*, 2005). Son utilisation permet d'obtenir une inhibition pharmacologique de la D-alanylation des TAs, semblable à l'inactivation génétique de *dltA*, mais son efficacité n'est observable que pour des doses relativement élevées. En effet, malgré la forte affinité de l'inhibiteur pour la protéine DltA de *B. subtilis* ($K_i = 232$ nM), une dose de 1 mM est nécessaire pour obtenir un effet sur cette bactérie (May *et al.*, 2005). Dans nos travaux, cette concentration s'élève à 0,5 mM pour les entérocoques et 1 mM pour *S. aureus* dans des conditions *in vivo*, et à 48,5 mg/kg dans le modèle insecte *G. mellonella*. La nécessité d'utiliser de telles doses peut être le reflet d'un manque de stabilité de l'inhibiteur ou encore de sa faible pénétration à travers la paroi ou la membrane bactérienne, de par son caractère hydrophile. Néanmoins, cette molécule semble être un candidat prometteur en vue d'une utilisation clinique puisque nos tests *in host* montrent qu'elle est non toxique dans notre modèle animal.

Conclusion et Perspectives

Conclusion et Perspectives

L'antibiorésistance des bactéries est un problème mondial de santé publique provoquant des pertes humaines et économiques désastreuses (IAGC, 2019). Parmi les pathogènes impliqués, *E. faecalis*, *E. faecium* et *S. aureus* se classent dans les 8 espèces les plus fréquemment rencontrées dans les infections liées aux bactéries résistantes en Europe en 2019 (ECDC, 2020) et dans les infections associées aux soins aux Etats-Unis entre 2015 et 2017 (Weiner-Lastinger *et al.*, 2019). En 2017, l'OMS a classé en « priorité élevée » la recherche et le développement de nouveaux traitements contre *E. faecium* résistant à la vancomycine et *S. aureus* résistant à la méticilline ou la vancomycine (Tacconelli *et al.*, 2018). Différentes stratégies sont envisageables pour lutter contre l'antibiorésistance. Dans ces travaux de thèse, la stratégie explorée est l'utilisation d'un adjuvant permettant une re-sensibilisation d'entérocoques et de staphylocoques à certains antibiotiques pour lesquels elles sont résistantes. La cible étudiée ici est la protéine DltA du système Dlt, essentielle dans la D-alanylation des TAs.

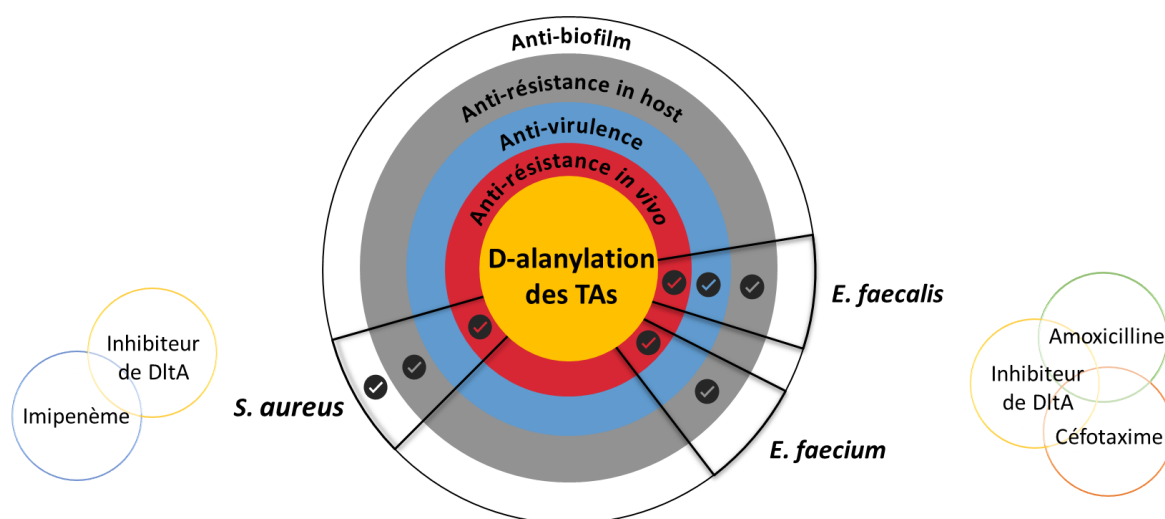


Figure 19 : La D-alanylation des TAs : une cible thérapeutique prometteuse

Notre objectif a donc été de déterminer l'impact d'une absence de D-alanylation, par une inactivation génétique ou pharmacologique, sur la résistance aux β -lactamines de nos modèles d'études. Nos résultats mettent en évidence les effets anti-résistances *in vivo* et *in host*,

anti-virulence et anti-biofilm d'une absence de D-alanylation chez les entérocoques ou *S. aureus* (Figure 19). Nous avons alors pu identifier des traitements plus efficaces contre ces pathogènes en associant un inhibiteur de la D-alanylation des TAs avec de l'imipénème pour *S. aureus* et avec de l'amoxicilline/céfotaxime pour les entérocoques. Ces résultats dressent la preuve de concept que la D-alanylation des TAs est une cible thérapeutique prometteuse pour lutter contre les infections dues à des bactéries résistantes aux antibiotiques comme les entérocoques et *S. aureus*.

Les premiers résultats de ce travail de thèse ont constitué les données préliminaires pour mettre en place un projet plus ambitieux visant à combattre l'antibiorésistance chez plusieurs pathogènes à Gram positif d'envergure mondiale. Ce projet, financé par l'Agence National de la Recherche (ANR-19-CE18- 0008), est nommé Dalatar en référence à la D-alanylation comme cible (target) thérapeutique. Le projet Dalatar est piloté par l'Unité de Recherche Risques Microbiens (U2RM, Université de Caen-Normandie) et fait appel à un consortium de chercheurs impliquant le laboratoire de Chimie Moléculaire et Thio-organique (LCMT, Université de Caen-Normandie), le laboratoire de Pathogenèse des Bactéries Anaérobies (LPBA, Institut Pasteur) et l'Unité Bactéries Pathogènes et Santé (UBaPS, Université de Paris-Sud). L'objectif de ce projet est de développer de nouveaux adjuvants capables de potentialiser l'action d'antibiotiques de la famille des β -lactamines, permettant alors d'établir de nouvelles options thérapeutiques pour lutter contre des pathogènes de plus en plus complexes à traiter. Le travail de thèse décrit dans ce manuscrit s'est intéressé aux pathogènes *E. faecalis*, *E. faecium* et *S. aureus*, et s'inscrit pleinement dans ce projet ANR. Le projet Dalatar s'étend également à d'autres Firmicutes multirésistants de première envergure en santé humaine, *Staphylococcus epidermidis* et *Clostridium difficile*. Les infections liées à ces 5 pathogènes engendrent des coûts économiques, sociétaux et humains dramatiques. La découverte de nouvelles stratégies thérapeutiques contre ces bactéries est aujourd'hui devenue cruciale.

L'inhibiteur de DltA utilisé dans le cadre de cette recherche doctorale nécessite des concentrations élevées chez l'hôte pour être applicable dans un contexte médical. Des modifications structurales de cet inhibiteur pourraient permettre d'optimiser son efficacité chez l'hôte. Diverses modifications sont actuellement en développement, notamment l'ajout d'atome(s) de Fluor connu pour améliorer la stabilité métabolique du composé ainsi que son caractère lipophile, pouvant favoriser sa pénétration dans la bactérie. En plus de la ligase DltA, les autres protéines du système *dlt* s'avèrent également essentielles au mécanisme de D-alanylation des TAs. Ainsi, la synthèse d'un inhibiteur de DltC, en cours au sein du LCMT,

pourrait également permettre le développement d'un autre adjuvant. Une étude de l'efficacité de ces nouveaux inhibiteurs *in vitro*, *in vivo* et enfin *in host*, permettront de sélectionner les molécules novatrices les plus performantes et susceptibles de constituer de bons adjuvants aux antibiotiques utilisés en médecine humaine.

Un des aspects de ce projet est de déterminer quels antibiotiques ont une action renforcée en absence de D-alanylation chez les différentes bactéries étudiées. La stratégie employée sur les entérocoques et *S. aureus*, décrite dans ce manuscrit, sera appliquée à *S. epidermidis* et *C. difficile*. Après la détermination des associations antibiotiques/inhibiteurs de D-alanylation les plus efficaces *in vivo* et *in host* dans le modèle *G. mellonella*, ces nouveaux traitements seront testés dans un modèle murin. Ces expériences permettront d'étudier les effets des inhibiteurs de la D-alanylation sur des mammifères tant sur leur innocuité que par leur impact sur le microbiote. Cette étude permettra ainsi de faire la passerelle entre les résultats obtenus dans ce manuscrit dans un modèle insecte à un modèle mammifère.

Pour conclure, mes travaux de thèse ont permis de positionner les premiers pavés d'une route conduisant au développement de nouvelles approches thérapeutiques pour lutter contre des pathogènes de plus en plus menaçants. La poursuite de ce travail fait appel au projet interdisciplinaire Dalatar dans lequel j'aurai l'immense plaisir d'apporter ma contribution en contrat postdoctoral.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abachin, E., Poyart, C., Pellegrini, E., Milohanic, E., Fiedler, F., Berche, P., and Trieu-Cuot, P. (2002). Formation of D-alanyl-lipoteichoic acid is required for adhesion and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* 43, 1–14. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02723.x
- Abi Khattar, Z., Rejasse, A., Destoumieux-Garzon, D., Escoubas, J.M., Sanchis, V., Lereclus, D., Givaudan, A., Kallassy, M., Nielsen-Leroux, C., and Gaudriault, S. (2009). The *dlt* operon of *Bacillus cereus* is required for resistance to cationic antimicrobial peptides and for virulence in insects. *Journal of Bacteriology* 191, 7063–7073. doi: 10.1128/JB.00892-09
- AGISAR (2019). Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance - Critically important antimicrobials for human medicine, 6th revision. Geneva: World Health Organization. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. ISSN: 978-92-4-151552-8
- Ahmed, M.O., and Baptiste, K.E. (2018). Vancomycin-Resistant Enterococci: A review of antimicrobial resistance mechanisms and perspectives of human and animal health. *Microbial Drug Resistance* 24, 590–606. doi: 10.1089/mdr.2017.0147
- Allkja, J., Bjarnsholt, T., Coenye, T., Cos, P., Fallarero, A., Harrison, J.J., Lopes, S.P., Oliver, A., Pereira, M.O., Ramage, G., *et al.* (2020). Minimum information guideline for spectrophotometric and fluorometric methods to assess biofilm formation in microplates. *Biofilm* 2, 100010. doi: 10.1016/j.bioflm.2019.100010
- Arbeloa, A., Segal, H., Hugonnet, J.-E., Josseume, N., Dubost, L., Brouard, J.-P., Gutmann, L., Mengin-Lecreux, D., and Arthur, M. (2004). Role of class A Penicillin-Binding Proteins in PBP5-mediated β -Lactam resistance in *Enterococcus faecalis*. *JB* 186, 1221–1228. doi: 10.1128/JB.186.5.1221-1228.2004
- Archibald, A.R., Baddiley, J., and Heptinstall, S. (1973). The alanine ester content and magnesium binding capacity of walls of *Staphylococcus aureus* H grown at different pH values. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 291, 629–634. ISSN: 0021-9193
- Arias, C.A., and Murray, B.E. (2012). The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology* 10, 266–278. doi: 10.1038/nrmicro2761
- Arnaud, M., Chastanet, A., and Debarbouille, M. (2004). New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, Gram-positive bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 6887–6891. doi: 10.1128/AEM.70.11.6887-6891.2004
- Ayobami, O., Willrich, N., Reuss, A., Eckmanns, T., and Markwart, R. (2020). The ongoing challenge of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* in Europe: an epidemiological analysis of bloodstream infections. *Emerging Microbes & Infections* 9, 1180–1193. doi: 10.1080/22221751.2020.1769500

- Baba, T., Takeuchi, F., Kuroda, M., Yuzawa, H., Aoki, K., Oguchi, A., Nagai, Y., Iwama, N., Asano, K., Naimi, T., et al. (2002). Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *The Lancet* 359, 1819–1827. doi: 10.1016/S0140-6736(02)08713-5
- Bayer, A.S., Mishra, N.N., Cheung, A.L., Rubio, A., and Yang, S.-J. (2016). Dysregulation of *mprF* and *dltABCD* expression among daptomycin-non-susceptible MRSA clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 2100–2104. doi: 10.1093/jac/dkw142
- Beganovic, M., Luther, M.K., Rice, L.B., Arias, C.A., Rybak, M.J., and LaPlante, K.L. (2018). A review of combination antimicrobial therapy for *Enterococcus faecalis* bloodstream infections and infective endocarditis. *Clinical Infectious Diseases* 67, 303–309. doi: 10.1093/cid/ciy064
- Blake, K.L., and O'Neill, A.J. (2013). Transposon library screening for identification of genetic loci participating in intrinsic susceptibility and acquired resistance to antistaphylococcal agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68, 12–16. doi: 10.1093/jac/dks373
- Brown, S., Xia, G., Luhachack, L.G., Campbell, J., Meredith, T.C., Chen, C., Winstel, V., Gekeler, C., Irazoqui, J.E., Peschel, A., et al. (2012). Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* requires glycosylated wall teichoic acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 18909–18914. doi: 10.1073/pnas.1209126109
- Brown, S., Santa Maria, J.P., and Walker, S. (2013). Wall teichoic acids of Gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 67, 313–336. doi: 10.1146/annurev-micro-092412-155620
- Brückner, R. (1992). A series of shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Gene* 122, 187–192. doi: 10.1016/0378-1119(92)90048-t
- Bychowska, A., Theilacker, C., Czerwicka, M., Marszewska, K., Huebner, J., Holst, O., Stepnowski, P., and Kaczyński, Z. (2011). Chemical structure of wall teichoic acid isolated from *Enterococcus faecium* strain U0317. *Carbohydrate Research* 346, 2816–2819. doi: 10.1016/j.carres.2011.09.026
- Cafiso, V., Bertuccio, T., Purrello, S., Campanile, F., Mammina, C., Sartor, A., Raglio, A., and Stefani, S. (2014). *dltA* overexpression: A strain-independent keystone of daptomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 43, 26–31. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2013.10.001
- Campbell, J., Singh, A.K., Santa Maria, J.P., Kim, Y., Brown, S., Swoboda, J.G., Mylonakis, E., Wilkinson, B.J., and Walker, S. (2011). Synthetic lethal compound combinations reveal a fundamental connection between wall teichoic acid and peptidoglycan biosyntheses in *Staphylococcus aureus*. *ACS Chem. Biol.* 6, 106–116. doi: 10.1021/cb100269f
- Cassini, A., Högberg, L.D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G.S., Colomb-Cotinat, M., Kretzschmar, M.E., Devleeschauwer, B., Cecchini, M., et al. (2019). Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level

modelling analysis. *The Lancet Infectious Diseases* 19, 56–66. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30605-4

Cattoir, V., and Leclercq, R. (2013). Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68, 731–742. doi: 10.1093/jac/dks469

Cavallo, J.-D., Fabre, R., Jehl, F., Rapp, C., and Garrabé, E. (2004). Bêta-lactamines. *EMC - Maladies Infectieuses I*, 129–202. doi: 10.1016/j.emcmi.2004.03.003

CDC (U.S.) (2019). Centers for Disease Control and Prevention (U.S.) - Antibiotic resistance threats in the United States, 2019, Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services. doi: 10.15620/cdc:82532

Collins, L.V., Kristian, S.A., Weidenmaier, C., Faigle, M., van Kessel, K.P.M., van Strijp, J.A.G., Götz, F., Neumeister, B., and Peschel, A. (2002). *Staphylococcus aureus* strains lacking D-Alanine modifications of teichoic acids are highly susceptible to human neutrophil killing and are virulence attenuated in mice. *J INFECT DIS* 186, 214–219. doi: 10.1086/341454

Coupri, D., Budin-Verneuil, A., Hartke, A., Benachour, A., Léger, L., Lequeux, T., Pfund, E., and Verneuil, N. (2019). Genetic and pharmacological inactivation of d-alanylation of teichoic acids sensitizes pathogenic enterococci to β -lactams. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 74, 3162–3169. doi: 10.1093/jac/dkz322

da Costa, T., de Oliveira, C., Chambers, H., and Chatterjee, S. (2018). PBP4: A new perspective on *Staphylococcus aureus* β -Lactam resistance. *Microorganisms* 6, 57. doi: 10.3390/microorganisms6030057

Dalal, V., Kumar, P., Rakhaminov, G., Qamar, A., Fan, X., Hunter, H., Tomar, S., Golemi-Kotra, D., and Kumar, P. (2019). Repurposing an ancient protein core structure: Structural studies on FmtA, a novel esterase of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Molecular Biology* 431, 3107–3123. doi: 10.1016/j.jmb.2019.06.019

David, M.Z., and Daum, R.S. (2017). Treatment of *Staphylococcus aureus* infections. In *Staphylococcus aureus*, F. Bagnoli, R. Rappuoli, and G. Grandi, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 325–383. ISBN:978-3-319-72061-6 978-3-319-72063-0

Debabov, D.V., Kiriukhin, M.Y., and Neuhaus, F.C. (2000). Biosynthesis of lipoteichoic acid in *Lactobacillus rhamnosus*: Role of DltD in D-alanylation. *Journal of Bacteriology* 182, 2855–2864. doi: 10.1128/JB.182.10.2855-2864.2000

Deibel, R.H., Lake, D.E., and Niven, C.F. (1963). Physiology of the Enterococci as related to their taxonomy. *Journal of Bacteriology* 86, 1275–1282. doi: 10.1128/JB.86.6.1275-1282.1963

Devriese, L., Baele, M., and Butaye, P. (2006). The genus *Enterococcus*. In *The Prokaryotes*, M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt, eds. (New York, NY: Springer US), pp. 163–174. ISBN:978-0-387-25494-4 978-0-387-30744-2

- Djorić, D., Little, J.L., and Kristich, C.J. (2020). Multiple low-reactivity class B Penicillin-Binding Proteins are required for cephalosporin resistance in Enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 64, e02273-19, /aac/64/4/AAC.02273-19.atom. doi: 10.1128/AAC.02273-19
- ECDC (2020). European Centre for Disease Prevention and Control - Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report 2019. Stockholm. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2019>
- Fabretti, F., Theilacker, C., Baldassarri, L., Kaczynski, Z., Kropec, A., Holst, O., and Huebner, J. (2006). Alanine esters of enterococcal lipoteichoic acid play a role in biofilm formation and resistance to antimicrobial peptides. *Infection and Immunity* 74, 4164–4171. doi: 10.1128/IAI.00111-06
- Falagas, M.E., Athanasiaki, F., Voulgaris, G.L., Triarides, N.A., and Vardakas, K.Z. (2019). Resistance to fosfomycin: Mechanisms, frequency and clinical consequences. *International Journal of Antimicrobial Agents* 53, 22–28. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2018.09.013
- Farha, M.A., Leung, A., Sewell, E.W., D’Elia, M.A., Allison, S.E., Ejim, L., Pereira, P.M., Pinho, M.G., Wright, G.D., and Brown, E.D. (2013). Inhibition of WTA synthesis blocks the cooperative action of PBPs and sensitizes MRSA to β -Lactams. *ACS Chem. Biol.* 8, 226–233. doi: 10.1021/cb300413m
- Fernandes, R., Amador, P., and Prudêncio, C. (2013). β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Reviews in Medical Microbiology* 24, 7–17. doi: 10.1097/MRM.0b013e3283587727
- Fisher, J.F., and Mobashery, S. (2020). Constructing and deconstructing the bacterial cell wall. *Protein Science* 29, 629–646. doi: 10.1002/pro.3737
- Flahaut, S., Auffray, Y., and Boutibonnes, P. (1997). Les entérocoques dans l’environnement proche de l’homme. *Can. J. Microbiol.* 43, 699–708. doi: 10.1139/m97-101
- Foster, T.J. (2017). Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiology Reviews* 41, 430–449. doi: 10.1093/femsre/fux007
- Foster, T.J. (2019). Can β -Lactam antibiotics be resurrected to combat MRSA? *Trends in Microbiology* 27, 26–38. doi: 10.1016/j.tim.2018.06.005
- Foulquié Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., and De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology* 106, 1–24. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.026
- Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., and Holzapfel, W.H. (2003). Enterococci in foods—a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology* 88, 105–122. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00174-0

- Fuda, C.C.S., Fisher, J.F., and Mobashery, S. (2005). β -Lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: the adaptive resistance of a plastic genome. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 2617–2633. doi: 10.1007/s00018-005-5148-6
- García-Solache, M., and Rice, L.B. (2019). The *Enterococcus*: a model of adaptability to its environment. *Clin Microbiol Reviews* 32, e00058-18, /cmr/32/2/CMR.00058-18.atom. doi: 10.1128/CMR.00058-18
- Gilmore, M.S., Lebreton, F., and van Schaik, W. (2013). Genomic transition of enterococci from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. *Current Opinion in Microbiology* 16, 10–16. doi: 10.1016/j.mib.2013.01.006
- Goldstein, B.P. (2014). Resistance to rifampicin: a review. *J Antibiot* 67, 625–630. doi: 10.1038/ja.2014.107
- Gordon, S., Swenson, J.M., Hill, B.C., Pigott, N.E., Facklam, R.R., Cooksey, R.C., Thornsberry, C., Jarvis, W.R., and Tenover, F.C. (1992). Antimicrobial susceptibility patterns of common and unusual species of enterococci causing infections in the United States. Enterococcal Study Group. *Journal of Clinical Microbiology* 30, 2373–2378. doi: 10.1128/JCM.30.9.2373-2378.1992
- Gross, M., Cramton, S.E., Götz, F., and Peschel, A. (2001). Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect. Immun.* 69, 3423–3426. doi: 10.1128/IAI.69.5.3423-3426.2001
- Grosser, M.R., and Richardson, A.R. (2014). Method for preparation and electroporation of *S. aureus* and *S. epidermidis*. In *The Genetic Manipulation of Staphylococci*, J.L. Bose, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 51–57. ISBN: 978-1-4939-3157-6 978-1-4939-3158-3
- Guo, Y., Song, G., Sun, M., Wang, J., and Wang, Y. (2020). Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 107. doi: 10.3389/fcimb.2020.00107
- Gutmann, L., Al-Obeid, S., Billot-Klein, D., Ebnet, E., and Fischer, W. (1996). Penicillin tolerance and modification of lipoteichoic acid associated with expression of vancomycin resistance in VanB-type *Enterococcus faecium* D366. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 257–259. doi: 10.1128/AAC.40.1.257
- Haas, R., Koch, H.U., and Fischer, W. (1984). Alanine turnover from lipoteichoic acid to teichoic acid in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters* 21, 27–31. doi: 10.1111/j.1574-6968.1984.tb00180.x
- Hancock, L.E., Murray, B.E., and Sillanpää, J. (2014). Enterococcal cell wall components and structures. In *Enterococci: From commensals to leading causes of drug resistant infection*, M.S. Gilmore, D.B. Clewell, Y. Ike, and N. Shankar, eds. (Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary). PMID: 24649506

- Harris, L.G., Foster, S.J., and Richards, R.G. (2002). An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. *Eur Cell Mater* 4, 39–60. doi: 10.22203/ecm.v004a04
- Hébert, L., Courtin, P., Torelli, R., Sanguinetti, M., Chapot-Chartier, M.-P., Auffray, Y., and Benachour, A. (2007). *Enterococcus faecalis* constitutes an unusual bacterial model in lysozyme resistance. *IAI* 75, 5390–5398. doi: 10.1128/IAI.00571-07
- Holden, M.T.G., Feil, E.J., Lindsay, J.A., Peacock, S.J., Day, N.P.J., Enright, M.C., Foster, T.J., Moore, C.E., Hurst, L., Atkin, R., *et al.* (2004). Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: Evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 9786–9791. doi: 10.1073/pnas.0402521101
- Hunt, C.L., Nauseef, W.M., and Weiss, J.P. (2006). Effect of D-Alanylation of (lipo)teichoic acids of *Staphylococcus aureus* on host secretory phospholipase A₂ action before and after phagocytosis by human neutrophils. *J Immunol* 176, 4987–4994. doi: 10.4049/jimmunol.176.8.4987
- IAGC (2019). Interagency coordination group - No time to wait: securing the future from drug-resistant infections - report to the secretary-general of the united nations. <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/final-report/en/>
- Jacob, A.E., and Hobbs, S.J. (1974). Conjugal transfer of plasmid-borne multiple antibiotic resistance in *Streptococcus faecalis* var. zymogenes. *J. Bacteriol.* 117, 360–372. doi: 10.1128/JB.117.2.360-372.1974
- Jett, B.D., Huycke, M.M., and Gilmore, M.S. (1994). Virulence of enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 7, 462–478. doi: 10.1128/CMR.7.4.462
- Jones, R.N., Marshall, S.A., Pfaller, M.A., Wilke, W.W., Hollis, R.J., Erwin, M.E., Edmond, M.B., and Wenzel, R.P. (1997). Nosocomial enterococcal blood stream infections in the SCOPE program: Antimicrobial resistance, species occurrence, molecular testing results, and laboratory testing accuracy. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 29, 95–102. doi: 10.1016/S0732-8893(97)00115-6
- Kaito, C., and Sekimizu, K. (2007). Colony Spreading in *Staphylococcus aureus*. *JB* 189, 2553–2557. doi: 10.1128/JB.01635-06
- Kamar, R., Réjasse, A., Jéhanho, I., Attieh, Z., Courtin, P., Chapot-Chartier, M.-P., Nielsen-Leroux, C., Lereclus, D., el Chamy, L., Kallassy, M., *et al.* (2017). DltX of *Bacillus thuringiensis* is essential for D-alanylation of teichoic acids and resistance to antimicrobial response in insects. *Front. Microbiol.* 8, 1437. doi: 10.3389/fmicb.2017.01437
- Kang, K.-M., Mishra, N.N., Park, K.T., Lee, G.-Y., Park, Y.H., Bayer, A.S., and Yang, S.-J. (2017). Phenotypic and genotypic correlates of daptomycin-resistant methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J Microbiol.* 55, 153–159. doi: 10.1007/s12275-017-6509-1

- Karlowsky, J.A., Nichol, K., and Zhanel, G.G. (2015). Telavancin: Mechanisms of action, *in vitro* activity, and mechanisms of resistance. *Clin Infect Dis.* 61, S58–S68. doi: 10.1093/cid/civ534
- Katayama, Y., Zhang, H.-Z., and Chambers, H.F. (2004). PBP 2a mutations producing very-high-level resistance to beta-lactams. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 453–459. doi: 10.1128/aac.48.2.453-459.2004
- Koch, A.L. (2003). Bacterial wall as target for attack. *CMR* 16, 673–687. doi: 10.1128/CMR.16.4.673-687.2003
- Kong, K.-F., Schneper, L., and Mathee, K. (2010). Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology: BETA-LACTAM RESISTANCE. *APMIS* 118, 1–36. doi: 10.1111/j.1600-0463.2009.02563.x
- Koprivnjak, T., Mlakar, V., Swanson, L., Fournier, B., Peschel, A., and Weiss, J.P. (2006). Cation-induced transcriptional regulation of the *dlt* operon of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 188, 3622–3630. doi: 10.1128/JB.188.10.3622-3630.2006
- Kreiswirth, B.N., Löfdahl, S., Betley, M.J., O'Reilly, M., Schlievert, P.M., Bergdoll, M.S., and Novick, R.P. (1983). The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. *Nature* 305, 709–712. doi: 10.1038/305709a0
- Kristian, S.A., Datta, V., Weidenmaier, C., Kansal, R., Fedtke, I., Peschel, A., Gallo, R.L., and Nizet, V. (2005). D-Alanylation of teichoic acids promotes group A *Streptococcus* antimicrobial peptide resistance, neutrophil survival, and epithelial cell invasion. *Journal of Bacteriology* 187, 6719–6725. doi: 10.1128/JB.187.19.6719-6725.2005
- Lam, M.M.C., Seemann, T., Bulach, D.M., Gladman, S.L., Chen, H., Haring, V., Moore, R.J., Ballard, S., Grayson, M.L., Johnson, P.D.R., et al. (2012). Comparative analysis of the first complete *Enterococcus faecium* genome. *Journal of Bacteriology* 194, 2334–2341. doi: 10.1128/JB.00259-12
- Lambert, P.A., Hancock, I.C., and Baddiley, J. (1975). Influence of alanyl ester residues on the binding of magnesium ions to teichoic acids. *Biochemical Journal* 151, 671–676. doi: 10.1042/bj1510671
- Le Jeune, A., Torelli, R., Sanguinetti, M., Giard, J.-C., Hartke, A., Auffray, Y., and Benachour, A. (2010). The extracytoplasmic function sigma factor SigV plays a key role in the original model of lysozyme resistance and virulence of *Enterococcus faecalis*. *PLoS ONE* 5, e9658. doi: 10.1371/journal.pone.0009658
- Leblanc, D.J. (2006). *Enterococcus*. In *The Prokaryotes*, M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt, eds. (New York, NY: Springer US), pp. 175–204. ISBN: 978-0-387-25494-4 978-0-387-30744-2

- Lebreton, F., Willems, R.J.L., and Gilmore, M.S. (2014). *Enterococcus* diversity, origins in nature, and gut colonization. 59. In: M.S. Gilmore, D.B. Clewell, Y. Ike, and N. Shankar, eds. (Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary). PMID: 24649513
- Lebreton, F., Manson, A.L., Saavedra, J.T., Straub, T.J., Earl, A.M., and Gilmore, M.S. (2017). Tracing the Enterococci from paleozoic origins to the hospital. *Cell* 169, 849-861.e13. doi: 10.1016/j.cell.2017.04.027
- Leclercq, R. (1997). Enterococci acquire new kinds of resistance. *Clinical Infectious Diseases* 24, S80–S84. doi: 10.1093/clinids/24.Supplement_1.S80
- Lee, A.S., de Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-Kumar, S., Peschel, A., and Harbarth, S. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Primers* 4, 18033. doi: 10.1038/nrdp.2018.33
- Leenhouts, K., Buist, G., Bolhuis, A., ten Berge, A., Kiel, J., Mierau, I., Dabrowska, M., Venema, G., and Kok, J. (1996). A general system for generating unlabelled gene replacements in bacterial chromosomes. *Mol Gen Genet* 253, 217–224. doi: 10.1007/s004380050315
- Lehtinen, S., Blanquart, F., Lipsitch, M., Fraser, C., and with the Maela Pneumococcal Collaboration (2019). On the evolutionary ecology of multidrug resistance in bacteria. *PLoS Pathog* 15, e1007763. doi: 10.1371/journal.ppat.1007763
- Lima, L.M., Silva, B.N.M. da, Barbosa, G., and Barreiro, E.J. (2020). β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry* 208, 112829. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112829
- Lindsay, J.A. (2019). Staphylococci: evolving genomes. *Microbiology Spectrum* 7. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0071-2019
- Liu, C., Bayer, A., Cosgrove, S.E., Daum, R.S., Fridkin, S.K., Gorwitz, R.J., Kaplan, S.L., Karchmer, A.W., Levine, D.P., Murray, B.E., *et al.* (2011). Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. *Clinical Infectious Diseases* 52, e18–e55. doi: 10.1093/cid/ciq146
- Liu, G.Y., Essex, A., Buchanan, J.T., Datta, V., Hoffman, H.M., Bastian, J.F., Fierer, J., and Nizet, V. (2005). *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *Journal of Experimental Medicine* 202, 209–215. doi: 10.1084/jem.20050846
- Liu, J., Chen, D., Peters, B.M., Li, L., Li, B., Xu, Z., and Shirliff, M.E. (2016). Staphylococcal chromosomal cassettes *mec* (SCC*mec*): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbial Pathogenesis* 101, 56–67. doi: 10.1016/j.micpath.2016.10.028
- Lowy, F.D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 339, 520–532. doi: 10.1056/NEJM199808203390806

- Ma, D., Wang, Z., Merrikh, C.N., Lang, K.S., Lu, P., Li, X., Merrikh, H., Rao, Z., and Xu, W. (2018). Crystal structure of a membrane-bound O-acyltransferase. *Nature* 562, 286–290. doi: 10.1038/s41586-018-0568-2
- Matsuo, M., Oogai, Y., Kato, F., Sugai, M., and Komatsuzawa, H. (2011). Growth-phase dependence of susceptibility to antimicrobial peptides in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 157, 1786–1797. doi: 10.1093/jac/dkq141
- May, J.J., Finking, R., Wiegeshoff, F., Weber, T.T., Bandur, N., Koert, U., and Marahiel, M.A. (2005). Inhibition of the D-alanine:D-alanyl carrier protein ligase from *Bacillus subtilis* increases the bacterium's susceptibility to antibiotics that target the cell wall: Characterization and inhibition of the Dlt system. *FEBS Journal* 272, 2993–3003. doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.04700.x
- Mazda, Y., Kawada-Matsuo, M., Kanbara, K., Oogai, Y., Shibata, Y., Yamashita, Y., Miyawaki, S., and Komatsuzawa, H. (2012). Association of CiaRH with resistance of *Streptococcus mutans* to antimicrobial peptides in biofilms: dlt-ciaRH interaction in *S. mutans*. *Molecular Oral Microbiology* 27, 124–135. doi: 10.1111/j.2041-1014.2012.00637.x
- McBride, S.M., and Sonenshein, A.L. (2011). The dlt operon confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Clostridium difficile*. *Microbiology* 157, 1457–1465. doi: 10.1099/mic.0.045997-0
- McKay Wood, B., Santa Maria, J.P., Matano, L.M., Vickery, C.R., and Walker, S. (2018). A partial reconstitution implicates DltD in catalyzing lipoteichoic acid d-alanylation. *J. Biol. Chem.* 293, 17985–17996. doi: 10.1074/jbc.RA118.004561
- Mechler, L., Bonetti, E.-J., Reichert, S., Flötenmeyer, M., Schrenzel, J., Bertram, R., François, P., and Götz, F. (2016). Daptomycin tolerance in the *Staphylococcus aureus* pitA6 mutant is due to upregulation of the dlt operon. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 2684–2691. doi: 10.1128/AAC.03022-15
- Miller, J.H. (1972). *Experiments in molecular genetics* (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory). ISBN:978-0-87969-106-6
- Miller, W.R., Murray, B.E., Rice, L.B., and Arias, C.A. (2020). Resistance in vancomycin-resistant Enterococci. *Infectious Disease Clinics of North America* 34, 751–771. doi: 10.1016/j.idc.2020.08.004
- Mishra, N.N., Bayer, A.S., Weidenmaier, C., Grau, T., Wanner, S., Stefani, S., Cafiso, V., Bertuccio, T., Yeaman, M.R., Nast, C.C., *et al.* (2014). Phenotypic and genotypic characterization of daptomycin-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: Relative roles of *mprF* and *dlt* operons. *PLoS ONE* 9, e107426. doi: 10.1371/journal.pone.0107426
- Miyachiro, M.M., Contreras-Martel, C., and Dessen, A. (2019). Penicillin-Binding Proteins (PBPs) and bacterial cell wall elongation complexes. In *macromolecular protein complexes II*:

Structure and function, J.R. Harris, and J. Marles-Wright, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 273–289. ISBN:978-3-030-28150-2 978-3-030-28151-9

Mohamed, J.A., Huang, W., Nallapareddy, S.R., Teng, F., and Murray, B.E. (2004). Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infection and Immunity* 72, 3658–3663. doi: 10.1128/IAI.72.6.3658-3663.2004

Molina, K.C., Morrisette, T., Miller, M.A., Huang, V., and Fish, D.N. (2020). The Emerging Role of β -lactams in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother* AAC.00468-20, aac;AAC.00468-20v1. doi: 10.1128/AAC.00468-20

Monaco, M., Pimentel de Araujo, F., Cruciani, M., Coccia, E.M., and Pantosti, A. (2016). Worldwide epidemiology and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus*. In *Staphylococcus aureus*, F. Bagnoli, R. Rappuoli, and G. Grandi, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 21–56. ISBN:978-3-319-72061-6 978-3-319-72063-0

Moon, T.M., D’Andréa, É.D., Lee, C.W., Soares, A., Jakoncic, J., Desbonnet, C., Garcia-Solache, M., Rice, L.B., Page, R., and Peti, W. (2018). The structures of penicillin-binding protein 4 (PBP4) and PBP5 from Enterococci provide structural insights into β -lactam resistance. *Journal of Biological Chemistry* 293, 18574–18584. doi: 10.1074/jbc.RA118.006052

Moyes, R.B., Reynolds, J., and Breakwell, D.P. (2009). Differential staining of bacteria: Gram stain. *Current Protocols in Microbiology* 15. doi: 10.1002/9780471729259.mca03cs15

Mueller, J.H., and Hinton, J. (1941). A protein-free medium for primary isolation of the *Gonococcus* and *Meningococcus*. *Experimental Biology and Medicine* 48, 330–333. doi: 10.3181/00379727-48-13311

Munita, J.M., Arias, C.A., and Murray, B.E. (2012). Enterococcal endocarditis: Can we win the war? *Curr Infect Dis Rep* 14, 339–349. doi: 10.1007/s11908-012-0270-8

Murray, B.E. (1990). The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 3, 46–65. doi: 10.1128/CMR.3.1.46

Muyllaert, A., and Mainil, J. (2013). Résistances aux fluoroquinolones : la situation actuelle. *Annales de Médecine Vétérinaire* 157. <http://hdl.handle.net/2268/168956>

Nakao, A., Imai, S., and Takano, T. (2000). Transposon-mediated insertional mutagenesis of the D-alanyl-lipoteichoic acid (*dlt*) operon raises methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Research in Microbiology* 151, 823–829. doi: 10.1016/S0923-2508(00)01148-7

Navarre, W.W., and Schneewind, O. (1999). Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 174–229. PMID: 10066836

- Neuhaus, F.C., and Baddiley, J. (2003). A continuum of anionic charge: Structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in Gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67, 686–723. doi: 10.1128/MMBR.67.4.686-723.2003
- Neuhaus, F.C., Linzer, R., and Reusch, V.M. (1974). Biosynthesis of membrane teichoic acid: role of the D-alanine-activating enzyme and D-alanine: membrane acceptor ligase. *Ann NY Acad Sci* 235, 502–518. doi: 10.1111/j.1749-6632.1974.tb43287.x
- Nilsson, M., Rybtke, M., Givskov, M., Høiby, N., Twetman, S., and Tolker-Nielsen, T. (2016). The *dlt* genes play a role in antimicrobial tolerance of *Streptococcus mutans* biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents* 48, 298–304. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.06.019
- OMS (2016). Plan d'action mondial pour combattre la résistance aux antimicrobiens. Organisation mondiale de la Santé. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/249548>
- OMS (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotic. Organisation mondiale de la santé. <https://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>
- O'Neill, J. (2014). Antimicrobial resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. Review on Antimicrobial Resistance. <http://amr-review.org/>
- Pandin, C., Caroff, M., and Condemine, G. (2016). Antimicrobial peptide resistance genes in the plant pathogen *Dickeya dadantii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 6423–6430. doi: 10.1128/AEM.01757-16
- Pantosti, A., Sanchini, A., and Monaco, M. (2007). Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiology* 2, 323–334. doi: 10.2217/17460913.2.3.323
- Pasquina, L., Santa Maria, J.P., McKay Wood, B., Moussa, S.H., Matano, L.M., Santiago, M., Martin, S.E.S., Lee, W., Meredith, T.C., and Walker, S. (2016). A synthetic lethal approach for compound and target identification in *Staphylococcus aureus*. *Nat Chem Biol* 12, 40–45. doi: 10.1038/nchembio.1967
- Pazos, M., and Peters, K. (2019). Peptidoglycan. In bacterial cell walls and membranes, A. Kuhn, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 127–168. ISBN: 978-3-030-18767-5 978-3-030-18768-2
- Peacock, S.J., and Paterson, G.K. (2015). Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu. Rev. Biochem.* 84, 577–601. doi: 10.1146/annurev-biochem-060614-034516
- Percy, M.G., and Gründling, A. (2014). Lipoteichoic acid synthesis and function in Gram-positive bacteria. *Annual Review of Microbiology* 68, 81–100. doi: 10.1146/annurev-micro-091213-112949

- Perego, M., Glaser, P., Minutello, A., Strauch, M.A., Leopold, K., and Fischer, W. (1995). Incorporation of D-alanine into lipoteichoic acid and wall teichoic acid in *Bacillus subtilis*. Identification of genes and regulation. *J. Biol. Chem.* 270, 15598–15606. doi: 10.1074/jbc.270.26.15598
- Pericás, J., Zboromyrska, Y., Cervera, C., Castañeda, X., Almela, M., Garcia-de-la-Maria, C., Mestres, C., Falces, C., Quintana, E., Ninot, S., *et al.* (2015). Enterococcal endocarditis revisited. *Future Microbiology* 10, 1215–1240. doi: 10.2217/fmb.15.46
- Peschel, A., Otto, M., Jack, R.W., Kalbacher, H., Jung, G., and Götz, F. (1999). Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J. Biol. Chem.* 274, 8405–8410. doi: 10.1074/jbc.274.13.8405
- Peschel, A., Vuong, C., Otto, M., and Götz, F. (2000). The D-alanine residues of *Staphylococcus aureus* teichoic acids alter the susceptibility to vancomycin and the activity of autolytic enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 2845–2847. doi: 10.1128/AAC.44.10.2845-2847.2000
- Qamar, A., and Golemi-Kotra, D. (2012). Dual roles of FmtA in *Staphylococcus aureus* cell wall biosynthesis and autolysis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 3797–3805. doi: 10.1128/AAC.00187-12
- Rahman, M.M., Hunter, H.N., Prova, S., Verma, V., Qamar, A., and Golemi-Kotra, D. (2016). The *Staphylococcus aureus* methicillin resistance factor FmtA is a D-amino esterase that acts on teichoic acids. *MBio* 7, e02070-15, /mbio/7/1/e02070-15.atom. doi: 10.1128/mBio.02070-15
- Ramarao, N., Nielsen-Leroux, C., and Lereclus, D. (2012). The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. *JoVE* 4392. doi: 10.3791/4392
- Rand, K.H., Houck, H.J., and Silverman, J.A. (2007). Daptomycin-reversible rifampicin resistance in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59, 1017–1020. doi: 10.1093/jac/dkm045
- Reichmann, N.T., Cassona, C.P., and Grundling, A. (2013). Revised mechanism of D-alanine incorporation into cell wall polymers in Gram-positive bacteria. *Microbiology* 159, 1868–1877. doi: 10.1099/mic.0.069898-0
- Revilla-Guarinos, A., Alcántara, C., Rozès, N., Voigt, B., and Zúñiga, M. (2014). Characterization of the response to low pH of *Lactobacillus casei* ΔRR12, a mutant strain with low D-alanylation activity and sensitivity to low pH. *Journal of Applied Microbiology* 116, 1250–1261. doi: 10.1111/jam.12442
- Rice, L.B., Carias, L.L., Rudin, S., Hutton, R., Marshall, S., Hassan, M., Josseume, N., Dubost, L., Marie, A., and Arthur, M. (2009). Role of class A Penicillin-Binding Proteins in the expression of β-lactam resistance in *Enterococcus faecium*. *JB* 191, 3649–3656. doi: 10.1128/JB.01834-08

- Rice, L.B., Desbonnet, C., Tait-Kamradt, A., Garcia-Solache, M., Lonks, J., Moon, T.M., D'Andréa, É.D., Page, R., and Peti, W. (2018). Structural and regulatory changes in PBP4 trigger decreased β -lactam susceptibility in *Enterococcus faecalis*. *MBio* 9, e00361-18, /mbio/9/2/mBio.00361-18.atom. doi: 10.1128/mBio.00361-18
- Rodvold, K.A., and McConeghy, K.W. (2014). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* therapy: Past, present, and future. *Clinical Infectious Diseases* 58, S20–S27. doi: 10.1093/cid/cit614
- Rohde, M. (2019). The Gram-positive bacterial cell wall. *Microbiology Spectrum* 7. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0044-2018
- Rosselli Del Turco, E., Bartoletti, M., Dahl, A., Cervera, C., and Pericàs, J.M. (2020). How do I manage a patient with enterococcal bacteraemia? *Clinical Microbiology and Infection* S1198743X20306601. doi: 10.1016/j.cmi.2020.10.029
- Saar-Dover, R., Bitler, A., Nezer, R., Shmuel-Galia, L., Firon, A., Shimoni, E., Trieu-Cuot, P., and Shai, Y. (2012). D-alanylation of lipoteichoic acids confers resistance to cationic peptides in group B *Streptococcus* by increasing the cell wall density. *PLoS Pathog* 8, e1002891. doi: 10.1371/journal.ppat.1002891
- Sahm, D.F., Kissinger, J., Gilmore, M.S., Murray, P.R., Mulder, R., Solliday, J., and Clarke, B. (1989). *In vitro* susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 33, 1588–1591. doi: 10.1128/AAC.33.9.1588
- Sakoulas, G., Kumaraswamy, M., Nonejuie, P., Werth, B.J., Rybak, M.J., Pogliano, J., Rice, L.B., and Nizet, V. (2015). Differential effects of Penicillin Binding Protein deletion on the susceptibility of *Enterococcus faecium* to cationic peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 6132–6139. doi: 10.1128/AAC.00486-15
- Santa Maria, J.P., Sadaka, A., Moussa, S.H., Brown, S., Zhang, Y.J., Rubin, E.J., Gilmore, M.S., and Walker, S. (2014). Compound-gene interaction mapping reveals distinct roles for *Staphylococcus aureus* teichoic acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 12510–12515. doi: 10.1073/pnas.1404099111
- Scheffers, D.-J., and Pinho, M.G. (2005). Bacterial cell wall synthesis: New insights from localization studies. *MMBR* 69, 585–607. doi: 10.1128/MMBR.69.4.585-607.2005
- Schleifer, K.H., and Kilpper-Balz, R. (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 34, 31–34. doi: 10.1099/00207713-34-1-31
- Selleck, E., Van Tyne, D., and Gilmore, M.S. (2019). Pathogenicity of Enterococci. *Microbiology Spectrum* 7. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0053-2018

- Shalaby, M.-A.W., Dokla, E.M.E., Serya, Rabah.A.T., and Abouzid, K.A.M. (2020). Penicillin binding protein 2a: An overview and a medicinal chemistry perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry* *199*, 112312. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112312
- Sobral, R., and Tomasz, A. (2019). The staphylococcal cell wall. *Microbiology Spectrum* *7*. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0068-2019
- Srisuknimit, V., Qiao, Y., Schaefer, K., Kahne, D., and Walker, S. (2017). Peptidoglycan cross-linking preferences of *Staphylococcus aureus* Penicillin-Binding Proteins have implications for treating MRSA infections. *J. Am. Chem. Soc.* *139*, 9791–9794. doi: 10.1021/jacs.7b04881
- Steffen, H., Rieg, S., Wiedemann, I., Kalbacher, H., Deeg, M., Sahl, H.-G., Peschel, A., Gotz, F., Garbe, C., and Schitteck, B. (2006). Naturally processed dermcidin-derived peptides do not permeabilize bacterial membranes and kill microorganisms irrespective of their charge. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* *50*, 2608–2620. doi: 10.1128/AAC.00181-06
- Stephens, L.J., Werrett, M.V., Sedgwick, A.C., Bull, S.D., and Andrews, P.C. (2020). Antimicrobial innovation: a current update and perspective on the antibiotic drug development pipeline. *Future Medicinal Chemistry* *12*, 2035–2065. doi: 10.4155/fmc-2020-0225
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D.L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., *et al.* (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases* *18*, 318–327. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3
- Taneja, N.K., Ganguly, T., Bakaletz, L.O., Nelson, K.J., Dubey, P., Poole, L.B., and Deora, R. (2013). D-Alanine modification of a protease-susceptible outer membrane component by the *Bordetella pertussis* dra locus promotes resistance to antimicrobial peptides and polymorphonuclear leukocyte-mediated killing. *Journal of Bacteriology* *195*, 5102–5111. doi: 10.1128/JB.00510-13
- Terzaghi, B.E., and Sandine, W.E. (1975). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl Microbiol* *29*, 807–813. PMID: 16350018
- Theilacker, C., Holst, O., Lindner, B., Huebner, J., and Kaczyński, Z. (2012). The structure of the wall teichoic acid isolated from *Enterococcus faecalis* strain 12030. *Carbohydrate Research* *354*, 106–109. doi: 10.1016/j.carres.2012.03.031
- Thomson, J.G., and Thilmony, R. (2008). A simple and inexpensive method for sending binary vector plasmid DNA by mail. *Plant Biotechnology* *25*, 403–406. doi: 10.5511/plantbiotechnology.25.403
- Tran, K.-N., and Rybak, M.J. (2018). β -Lactam combinations with vancomycin show synergistic activity against vancomycin-susceptible *Staphylococcus aureus*, vancomycin-intermediate *S. aureus* (VISA), and heterogeneous VISA. *Antimicrob Agents Chemother* *62*. doi: 10.1128/AAC.00157-18

- Tremblay, Y.D.N., Hathroubi, S., and Jacques, M. (2014). Bacterial biofilms: their importance in animal health and public health. *Can J Vet Res* 78, 110–116. doi: 1928-9022
- Trémolières, F. (2010). Quand le miracle antibiotique vire au cauchemar. *Med Sci (Paris)* 26, 925–929. doi: 10.1051/medsci/20102611925
- Tripathi, A., and Pandey, A. (2017). Post-Hoc comparison in survival analysis: An easy approach. *JBM* 05, 112–119. doi: 10.4236/jbm.2017.53012
- Turner, N.A., Sharma-Kuinkel, B.K., Maskarinec, S.A., Eichenberger, E.M., Shah, P.P., Carugati, M., Holland, T.L., and Fowler, V.G. (2019). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nat Rev Microbiol* 17, 203–218. doi: 10.1038/s41579-018-0147-4
- Van Tyne, D., and Gilmore, M.S. (2014). Friend turned foe: Evolution of enterococcal virulence and antibiotic resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* 68, 337–356. doi: 10.1146/annurev-micro-091213-113003
- Wang, X., Yang, Y., and Huycke, M.M. (2020). Risks associated with enterococci as probiotics. *Food Res Int* 129, 108788. doi: 10.1016/j.foodres.2019.108788
- Wecke, J., Perego, M., and Fischer, W. (1996). D -Alanine deprivation of *Bacillus subtilis* teichoic acids is without effect on cell growth and morphology but affects the autolytic activity. *Microbial Drug Resistance* 2, 123–129. doi: 10.1089/mdr.1996.2.123
- Wecke, J., Madela, K., and Fischer, W. (1997). The absence of D-alanine from lipoteichoic acid and wall teichoic acid alters surface charge, enhances autolysis and increases susceptibility to methicillin in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 143, 2953–2960. doi: 10.1099/00221287-143-9-2953
- Weidenmaier, C., McLoughlin, R.M., and Lee, J.C. (2010). The zwitterionic cell wall teichoic acid of *Staphylococcus aureus* provokes skin abscesses in mice by a novel CD4+ T-cell-dependent mechanism. *PLoS ONE* 5, e13227. doi: 10.1371/journal.pone.0013227
- Weiner, L.M., Webb, A.K., Limbago, B., Dudeck, M.A., Patel, J., Kallen, A.J., Edwards, J.R., and Sievert, D.M. (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. doi: 10.1017/ice.2016.174
- Weiner-Lastinger, L.M., Abner, S., Edwards, J.R., Kallen, A.J., Karlsson, M., Magill, S.S., Pollock, D., See, I., Soe, M.M., Walters, M.S., *et al.* (2019). Antimicrobial-resistant pathogens associated with adult healthcare-associated infections: Summary of data reported to the National Healthcare Safety Network, 2015–2017. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 41, 1–18. doi: 10.1017/ice.2019.296

- Wells, C.L., Jechorek, R.P., and Erlandsen, S.L. (1990). Evidence for the translocation of *Enterococcus faecalis* across the mouse intestinal tract. *Journal of Infectious Diseases* 162, 82–90. doi: 10.1093/infdis/162.1.82
- Wheeler, A.L., Hartel, P.G., Godfrey, D.G., Hill, J.L., and Segars, W.I. (2002). Potential of *Enterococcus faecalis* as a human fecal indicator for microbial source tracking. *J. Environ. Qual.* 31, 1286–1293. doi: 10.2134/jeq2002.1286
- Wille, J., and Coenye, T. (2020). Biofilm dispersion: The key to biofilm eradication or opening Pandora’s box? *Biofilm* 2, 100027. doi: 10.1016/j.bioflm.2020.100027
- Williamson, R., Gutmann, L., Horaud, T., Delbos, F., and Acar, J.F. (1986). Use of Penicillin-binding Proteins for the identification of Enterococci. *Microbiology* 132, 1929–1937. doi: 10.1099/00221287-132-7-1929
- Wobser, D., Ali, L., Grohmann, E., Huebner, J., and Sakinc, T. (2014). A novel role for D-Alanylation of lipoteichoic acid of *Enterococcus faecalis* in urinary tract infection. *PLoS ONE* 9, e107827. doi: 10.1371/journal.pone.0107827
- Wydau-Dematteis, S., Louis, M., Zahr, N., Lai-Kuen, R., Saubaméa, B., Butel, M.-J., and Pons, J.-L. (2015). The functional *dlt* operon of *Clostridium butyricum* controls the D-alanylation of cell wall components and influences cell septation and vancomycin-induced lysis. *Anaerobe* 35, 105–114. doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.09.001
- Xia, G., Maier, L., Sanchez-Carballo, P., Li, M., Otto, M., Holst, O., and Peschel, A. (2010). Glycosylation of wall teichoic acid in *Staphylococcus aureus* by TarM. *Journal of Biological Chemistry* 285, 13405–13415. doi: 10.1074/jbc.M109.096172
- Zapun, A., Contreras-Martel, C., and Vernet, T. (2008). Penicillin-binding proteins and β -lactam resistance. *FEMS Microbiol Rev* 32, 361–385. doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00095.x
- Zhong, Z., Zhang, W., Song, Y., Liu, W., Xu, H., Xi, X., Menghe, B., Zhang, H., and Sun, Z. (2017). Comparative genomic analysis of the genus *Enterococcus*. *Microbiological Research* 196, 95–105. doi: 10.1016/j.micres.2016.12.009
- Zhou, X., Liu, Y., Gao, Y., Wang, Y., Xia, Q., Zhong, R., Ma, C., Zhou, M., Xi, X., Shaw, C., et al. (2020). Enhanced antimicrobial activity of N-terminal derivatives of a novel brevinin-1 peptide from the skin secretion of *Odorrana schmackeri*. *Toxins* 12, 484. doi: 10.3390/toxins12080484

Annexe

Annexe

L'ensemble des publications citées dans le tableau 5 sont référencées ci-après :

1. Fabretti, F. *et al.* Alanine esters of enterococcal lipoteichoic acid play a role in biofilm formation and resistance to antimicrobial peptides. *Infection and Immunity* **74**, 4164–4171 (2006). doi: 10.1128/IAI.00111-06
2. Perego, M. *et al.* Incorporation of D-alanine into lipoteichoic acid and wall teichoic acid in *Bacillus subtilis*. Identification of genes and regulation. *J. Biol. Chem.* **270**, 15598–15606 (1995). doi: 10.1074/jbc.270.26.15598
3. Wecke, J., Perego, M. & Fischer, W. D-alanine deprivation of *Bacillus subtilis* teichoic acids is without effect on cell growth and morphology but affects the autolytic activity. *Microbial Drug Resistance* **2**, 123–129 (1996). doi: 10.1089/mdr.1996.2.123
4. Abi Khattar, Z. *et al.* The *dlt* operon of *Bacillus cereus* is required for resistance to cationic antimicrobial peptides and for virulence in insects. *Journal of Bacteriology* **191**, 7063–7073 (2009). doi: 10.1128/JB.00892-09
5. Craynest, M., Jorgensen, S., Sarvas, M. & Kontinen, V. P. Enhanced secretion of heterologous cyclodextrin glycosyltransferase by a mutant of *Bacillus licheniformis* defective in the D-alanylation of teichoic acids. *Lett Appl Microbiol* **37**, 75–80 (2003). doi: 10.1046/j.1472-765X.2003.01357.x
6. Kamar, R. *et al.* DltX of *Bacillus thuringiensis* is essential for D-Alanylation of teichoic acids and resistance to antimicrobial response in insects. *Front. Microbiol.* **8**, 1437 (2017). doi: 10.3389/fmicb.2017.01437
7. Clemans, D. L. *et al.* Insertional inactivation of genes responsible for the D-alanylation of lipoteichoic acid in *Streptococcus gordonii* DL1 (Challis) affects intrageneric coaggregations. *Infect. Immun.* **67**, 2464–2474 (1999). doi: 10.1128/IAI.67.5.2464-2474.1999
8. Boyd, D. A. *et al.* Defects in D-alanyl-lipoteichoic acid synthesis in *Streptococcus mutans* results in acid sensitivity. *J. Bacteriol.* **182**, 6055–6065 (2000). doi: 10.1128/JB.182.21.6055-6065.2000
9. Poyart, C. *et al.* Attenuated virulence of *Streptococcus agalactiae* deficient in D-alanyl-lipoteichoic acid is due to an increased susceptibility to defensins and phagocytic cells: D-alanyl-lipoteichoic acid in *Streptococcus agalactiae*. *Molecular Microbiology* **49**, 1615–1625 (2003). doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03655.x
10. Kovács, M. *et al.* A functional *dlt* Operon, encoding proteins required for incorporation of D-alanine in teichoic acids in Gram-positive bacteria, confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Streptococcus pneumoniae*. *JB* **188**, 5797–5805 (2006). doi: 10.1128/JB.00336-06

11. Cox, K. H. *et al.* Inactivation of DltA modulates virulence factor expression in *Streptococcus pyogenes*. *PLoS ONE* **4**, e5366 (2009). doi: 10.1371/journal.pone.0005366
12. Lecours, M.-P. *et al.* Critical Role for *Streptococcus suis* Cell wall modifications and sullysin in resistance to complement-dependent killing by dendritic cells. *The Journal of Infectious Diseases* **204**, 919–929 (2011). doi: 10.1093/infdis/jir415
13. Saar-Dover, R. *et al.* D-Alanylation of lipoteichoic acids confers resistance to cationic peptides in group B *Streptococcus* by increasing the cell wall density. *PLoS Pathog* **8**, e1002891 (2012). doi: 10.1371/journal.ppat.1002891
14. Vélez, M. P. *et al.* Functional analysis of D-alanylation of lipoteichoic acid in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *AEM* **73**, 3595–3604 (2007). doi: 10.1128/AEM.02083-06
15. Kiekens, S. *et al.* Impact of spray-drying on the pili of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Microb. Biotechnol.* **12**, 849–855 (2019). doi: 10.1111/1751-7915.13426
16. Walter, J. *et al.* D-alanyl ester depletion of teichoic acids in *Lactobacillus reuteri* 100-23 results in impaired colonization of the mouse gastrointestinal tract: Mutation of *dltA* affects gut colonization of *L. reuteri*. *Environmental Microbiology* **9**, 1750–1760 (2007). doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01292.x
17. Debabov, D. V., Kiriukhin, M. Y. & Neuhaus, F. C. Biosynthesis of lipoteichoic acid in *Lactobacillus rhamnosus*: Role of DltD in D-alanylation. *Journal of Bacteriology* **182**, 2855–2864 (2000). doi: 10.1128/JB.182.10.2855-2864.2000
18. Heaton, M. P. & Neuhaus, F. C. Biosynthesis of D-alanyl-lipoteichoic acid: cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Lactobacillus casei* gene for the D-alanine-activating enzyme. *Journal of Bacteriology* **174**, 4707–4717 (1992). doi: 10.1128/JB.174.14.4707-4717.1992
19. Ntamere, A. S., Taron, D. J. & Neuhaus, F. C. Assembly of D-alanyl-lipoteichoic acid in *Lactobacillus casei*: mutants deficient in the D-alanyl ester content of this amphiphile. *Journal of Bacteriology* **169**, 1702–1711 (1987). doi: 10.1128/JB.169.4.1702-1711.1987
20. Palumbo, E. *et al.* D-Alanyl ester depletion of teichoic acids in *Lactobacillus plantarum* results in a major modification of lipoteichoic acid composition and cell wall perforations at the septum mediated by the Acm2 autolysin. *Journal of Bacteriology* **188**, 3709–3715 (2006). doi: 10.1128/JB.188.10.3709-3715.2006
21. Steen, A. *et al.* Autolysis of *Lactococcus lactis* is increased upon D-alanine depletion of peptidoglycan and lipoteichoic acids. *JB* **187**, 114–124 (2005). doi: 10.1128/JB.187.1.114-124.2005
22. Nouaille, S. *et al.* Influence of lipoteichoic acid D-alanylation on protein secretion in *Lactococcus lactis* as revealed by random mutagenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 1600–1607 (2004). doi: 10.1128/AEM.70.3.1600-1607.2004

23. Reimundo, P. *et al.* *dltA* gene mutation in the teichoic acids alanylation system of *Lactococcus garvieae* results in diminished proliferation in its natural host. *Veterinary Microbiology* **143**, 434–439 (2010). doi: 10.1016/j.vetmic.2009.12.004
24. Woods, E. C., Nawrocki, K. L., Suárez, J. M. & McBride, S. M. The *Clostridium difficile* Dlt pathway is controlled by the extracytoplasmic function sigma factor σ^V in response to lysozyme. *Infect. Immun.* **84**, 1902–1916 (2016). doi: 10.1128/IAI.00207-16
25. Wydau-Dematteis, S. *et al.* The functional *dlt* operon of *Clostridium butyricum* controls the D-alanylation of cell wall components and influences cell septation and vancomycin-induced lysis. *Anaerobe* **35**, 105–114 (2015). doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.09.001
26. Abachin, E. *et al.* Formation of D-alanyl-lipoteichoic acid is required for adhesion and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **43**, 1–14 (2002). doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02723.x
27. Le Jeune, A. *et al.* The extracytoplasmic function sigma factor SigV plays a key role in the original model of lysozyme resistance and virulence of *Enterococcus faecalis*. *PLoS ONE* **5**, e9658 (2010). doi: 10.1371/journal.pone.0009658
28. Wecke, J., Madela, K. & Fischer, W. The absence of D-alanine from lipoteichoic acid and wall teichoic acid alters surface charge, enhances autolysis and increases susceptibility to methicillin in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **143**, 2953–2960 (1997). doi: 10.1099/00221287-143-9-2953
29. Chen, Y. *et al.* Enhanced production of heterologous proteins by *Bacillus licheniformis* with defective D-alanylation of lipoteichoic acid. *World J Microbiol Biotechnol* **34**, 135 (2018). doi: 10.1007/s11274-018-2520-x
30. Chan, K. G. *et al.* Role of D-alanylation of *Streptococcus gordonii* lipoteichoic acid in innate and adaptive immunity. *IAI* **75**, 3033–3042 (2007). doi: 10.1128/IAI.01549-06
31. Duwat, P., Cochu, A., Ehrlich, S. D. & Gruss, A. Characterization of *Lactococcus lactis* UV-sensitive mutants obtained by ISS1 transposition. *Journal of bacteriology* **179**, 4473–4479 (1997). doi: 10.1128/JB.179.14.4473-4479.1997
32. Kristian, S. A. *et al.* D-Alanylation of teichoic acids promotes group A *Streptococcus* antimicrobial peptide resistance, neutrophil survival, and epithelial cell invasion. *Journal of Bacteriology* **187**, 6719–6725 (2005). doi: 10.1128/JB.187.19.6719-6725.2005
33. Revilla-Guarinos, A., Alcántara, C., Rozès, N., Voigt, B. & Zúñiga, M. Characterization of the response to low pH of *Lactobacillus casei* Δ RR12, a mutant strain with low D-alanylation activity and sensitivity to low pH. *Journal of Applied Microbiology* **116**, 1250–1261 (2014). doi: 10.1111/jam.12442
34. Okshevsky, M. *et al.* A transposon mutant library of *Bacillus cereus* ATCC 10987 reveals novel genes required for biofilm formation and implicates motility as an important factor for pellicle-biofilm formation. *MicrobiologyOpen* **7**, e00552 (2018). doi: 10.1002/mbo3.552

35. Nakao, A., Imai, S. & Takano, T. Transposon-mediated insertional mutagenesis of the D-alanyl-lipoteichoic acid (*dlt*) operon raises methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Research in Microbiology* **151**, 823–829 (2000). doi: 10.1016/S0923-2508(00)01148-7
36. Hyrylainen, H.-L. D-alanine substitution of teichoic acids as a modulator of protein folding and stability at the cytoplasmic membrane-cell wall interface of *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry* (2000) doi:10.1074/jbc.M003804200. doi: 10.1074/jbc.M003804200
37. Hyrylainen, H.-L. *et al.* The density of negative charge in the cell wall influences two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **153**, 2126–2136 (2007). doi: 10.1099/mic.0.2007/008680-0
38. Stephenson, K., Jensen, C. L., Jorgensen, S. T. & Harwood, C. R. Simultaneous inactivation of the *wprA* and *dltB* genes of *Bacillus subtilis* reduces the yield of alpha-amylase. *Lett Appl Microbiol* **34**, 394–397 (2002). doi: 10.1046/j.1472-765X.2002.01106.x
39. Davis, E., Kennedy, D., Halperin, S. A. & Lee, S. F. Role of the cell wall microenvironment in expression of a heterologous SpaP-S1 fusion protein by *Streptococcus gordonii*. *Applied and Environmental Microbiology* **77**, 1660–1666 (2011). doi: 10.1128/AEM.02178-10
40. Spatafora, G. A. *et al.* Regulated expression of the *Streptococcus mutans dlt* genes correlates with intracellular polysaccharide accumulation. *J. Bacteriol.* **181**, 2363–2372 (1999). doi: 10.1128/JB.181.8.2363-2372.1999
41. Peschel, A. *et al.* Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J. Biol. Chem.* **274**, 8405–8410 (1999). doi: 10.1074/jbc.274.13.8405
42. Kraus, D. *et al.* The GraRS regulatory system controls *Staphylococcus aureus* susceptibility to antimicrobial host defenses. *BMC Microbiol* **8**, 85 (2008). doi: 10.1186/1471-2180-8-85
43. Byl, E., Jokicevic, K., Kiekens, S., Lebeer, S. & Kiekens, F. Strain-specific differences in behaviour among *Lactocaseibacillus rhamnosus* cell wall mutants during direct compression. *International Journal of Pharmaceutics* **588**, 119755 (2020). doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119755
44. Hirt, H., Hall, J. W., Larson, E. & Gorr, S.-U. A D-enantiomer of the antimicrobial peptide GL13K evades antimicrobial resistance in the Gram positive bacteria *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus gordonii*. *PLoS ONE* **13**, e0194900 (2018). doi: 10.1371/journal.pone.0194900
45. Collins, L. V. *et al.* *Staphylococcus aureus* strains lacking D-alanine modifications of teichoic acids are highly susceptible to human neutrophil killing and are virulence attenuated in mice. *J INFECTION* **186**, 214–219 (2002). doi: 10.1086/341454

46. Weidenmaier, C., McLoughlin, R. M. & Lee, J. C. The zwitterionic cell wall teichoic acid of *Staphylococcus aureus* provokes skin abscesses in mice by a novel CD4+ T-cell-dependent mechanism. *PLoS ONE* **5**, e13227 (2010). doi: 10.1371/journal.pone.0013227
47. Tabuchi, Y. *et al.* Inhibitory role for D-alanylation of wall teichoic acid in activation of insect toll pathway by peptidoglycan of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Immunology* **185**, 2424–2431 (2010). doi: 10.4049/jimmunol.1000625
48. Zafar, M. A. *et al.* Identification of pneumococcal factors affecting pneumococcal shedding shows that the *dlt* locus promotes inflammation and transmission. *mBio* **10**, e01032-19, /mbio/10/3/mBio.01032-19.atom (2019). doi: 10.1128/mBio.01032-19
49. Wartha, F. *et al.* Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. *Cellular Microbiology* **9**, 1162–1171 (2007). doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00857.x
50. Fittipaldi, N. *et al.* D-Alanylation of lipoteichoic acid contributes to the virulence of *Streptococcus suis*. *IAI* **76**, 3587–3594 (2008). doi: 10.1128/IAI.01568-07
51. Wobser, D., Ali, L., Grohmann, E., Huebner, J. & Sakinc, T. A novel role for D-alanylation of lipoteichoic acid of *Enterococcus faecalis* in urinary tract infection. *PLoS ONE* **9**, e107827 (2014). doi: 10.1371/journal.pone.0107827
52. Dorling, J., Moraes, C. & Rolff, J. Recognition, survival and persistence of *Staphylococcus aureus* in the model host *Tenebrio molitor*. *Developmental & Comparative Immunology* **48**, 284–290 (2015). doi: 10.1016/j.dci.2014.08.010
53. Hunt, C. L., Nauseef, W. M. & Weiss, J. P. Effect of D-alanylation of (lipo)teichoic acids of *Staphylococcus aureus* on host secretory phospholipase A₂ action before and after phagocytosis by human neutrophils. *J Immunol* **176**, 4987–4994 (2006). doi: 10.4049/jimmunol.176.8.4987
54. Hashimoto, Y. *et al.* Identification of lipoteichoic acid as a ligand for draper in the phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by *Drosophila* Hemocytes. *J Immunol* **183**, 7451–7460 (2009). doi: 10.4049/jimmunol.0901032
55. Lund, L. D., Ingmer, H. & Frøkiær, H. D-alanylation of teichoic acids and loss of poly-N-acetyl glucosamine in *Staphylococcus aureus* during exponential growth phase enhance IL-12 production in murine dendritic cells. *PLoS ONE* **11**, e0149092 (2016). doi: 10.1371/journal.pone.0149092
56. Duncker, S. C., Xang, I., Hols, P. & Bienenstock, J. The D-alanine content of lipoteichoic acid is crucial for *Lactobacillus plantarum*-mediated protection from visceral pain perception in a rat colorectal distension model. *Neurogastroenterol Motil* **20**, 843–850 (2008). doi: 10.1111/j.1365-2982.2008.01085.x
57. Grangette, C. *et al.* From The Cover: Enhanced antiinflammatory capacity of a *Lactobacillus plantarum* mutant synthesizing modified teichoic acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 10321–10326 (2005). doi: 10.1073/pnas.0504084102

58. Gross, M., Cramton, S. E., Götz, F. & Peschel, A. Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect. Immun.* **69**, 3423–3426 (2001). doi: 10.1128/IAI.69.5.3423-3426.2001
59. Mohamed, J. A., Huang, W., Nallapareddy, S. R., Teng, F. & Murray, B. E. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infection and Immunity* **72**, 3658–3663 (2004). doi: 10.1128/IAI.72.6.3658-3663.2004
60. Nilsson, M. *et al.* The *dlt* genes play a role in antimicrobial tolerance of *Streptococcus mutans* biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents* **48**, 298–304 (2016). doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.06.019
61. Kaito, C. & Sekimizu, K. Colony spreading in *Staphylococcus aureus*. *JB* **189**, 2553–2557 (2007). doi: 10.1128/JB.01635-06
62. Mandin, P. *et al.* VirR, a response regulator critical for *Listeria monocytogenes* virulence: Novel *Listeria* virulence regulon. *Molecular Microbiology* **57**, 1367–1380 (2005). doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04776.x
63. Steffen, H. *et al.* Naturally processed dermcidin-derived peptides do not permeabilize bacterial membranes and kill microorganisms irrespective of their charge. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50**, 2608–2620 (2006). doi: 10.1128/AAC.00181-06
64. Matsuo, M., Oogai, Y., Kato, F., Sugai, M. & Komatsuzawa, H. Growth-phase dependence of susceptibility to antimicrobial peptides in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* **157**, 1786–1797 (2011). doi: 10.1099/mic.0.044727-0
65. Simanski, M. *et al.* *Staphylococcus aureus* subverts cutaneous defense by D-alanylation of teichoic acids. *Exp Dermatol* **22**, 294–296 (2013). doi: 10.1111/exd.12114
66. Blake, K. L. & O'Neill, A. J. Transposon library screening for identification of genetic loci participating in intrinsic susceptibility and acquired resistance to antistaphylococcal agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **68**, 12–16 (2013). doi: 10.1093/jac/dks373
67. Herbert, S. *et al.* Molecular basis of resistance to muramidase and cationic antimicrobial peptide activity of lysozyme in Staphylococci. *PLoS Pathogens* **3**, e102 (2007). doi: 10.1371/journal.ppat.0030102
68. Bensaci, M. F. & Takemoto, J. Y. Syringopeptin SP25A-mediated killing of Gram-positive bacteria and the role of teichoic acid D-alanylation. *FEMS Microbiology Letters* **268**, 106–111 (2007). doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00591.x
69. Cao, M. & Helmann, J. D. The *Bacillus subtilis* extracytoplasmic-function σ X factor regulates modification of the cell envelope and resistance to cationic antimicrobial peptides. *JB* **186**, 1136–1146 (2004). doi: 10.1128/JB.186.4.1136-1146.2004
70. Revilla-Guarinos, A. *et al.* Characterization of a regulatory network of peptide antibiotic detoxification modules in *Lactobacillus casei* BL23. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 3160–3170 (2013). doi: 10.1128/AEM.00178-13

71. McBride, S. M. & Sonenshein, A. L. The *dlt* operon confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Clostridium difficile*. *Microbiology* **157**, 1457–1465 (2011). doi: 10.1099/mic.0.045997-0
72. Peschel, A., Vuong, C., Otto, M. & Götz, F. The D-alanine residues of *Staphylococcus aureus* teichoic acids alter the susceptibility to vancomycin and the activity of autolytic enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 2845–2847 (2000). doi: 10.1128/AAC.44.10.2845-2847.2000
73. Mechler, L. *et al.* Daptomycin tolerance in the *Staphylococcus aureus* pitA6 mutant is due to upregulation of the *dlt* operon. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 2684–2691 (2016). doi: 10.1128/AAC.03022-15
74. Pasquina, L. *et al.* A synthetic lethal approach for compound and target identification in *Staphylococcus aureus*. *Nat Chem Biol* **12**, 40–45 (2016). doi: 10.1038/nchembio.1967
75. Santa Maria, J. P. *et al.* Compound-gene interaction mapping reveals distinct roles for *Staphylococcus aureus* teichoic acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 12510–12515 (2014). doi: 10.1073/pnas.1404099111
76. Guariglia-Oropeza, V. & Helmann, J. D. *Bacillus subtilis* σ^V confers lysozyme resistance by activation of two cell wall modification pathways, peptidoglycan O-acetylation and D-alanylation of teichoic acids. *Journal of Bacteriology* **193**, 6223–6232 (2011). doi: 10.1128/JB.06023-11
77. Koprivnjak, T., Peschel, A., Gelb, M. H., Liang, N. S. & Weiss, J. P. Role of charge properties of bacterial envelope in bactericidal action of human group IIA phospholipase A₂ against *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **277**, 47636–47644 (2002). doi: 10.1074/jbc.M205104200
78. Mazda, Y. *et al.* Association of CiaRH with resistance of *Streptococcus mutans* to antimicrobial peptides in biofilms: *dlt*-*ciaRH* interaction in *S. mutans*. *Molecular Oral Microbiology* **27**, 124–135 (2012). doi: 10.1111/j.2041-1014.2012.00637.x

Résumé : La D-alanylation des acides (lipo-)téichoïques comme nouvelle cible thérapeutique chez les bactéries à Gram positif d'intérêt clinique.

L'antibiorésistance des principaux pathogènes humains est devenu un problème de santé mondial, qualifié de priorité critique par l'Organisation Mondiale de la Santé. Cette problématique concerne notamment les infections causées par les entérocoques résistants à la vancomycine (particulièrement *Enterococcus faecium*) et *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM). Ces pathogènes multirésistants s'avèrent hautement tolérants ou résistants aux β -lactamines, qui sont des antibiotiques couramment utilisés en médecine humaine. Pour contrer l'émergence de ces bactéries multirésistantes, il est urgent de développer de nouvelles approches thérapeutiques par la découverte d'antibiotiques ou de nouvelles stratégies efficaces. Une de ces stratégies consiste à utiliser des adjuvants inhibant une cible spécifique de la bactérie permettant alors de la resensibiliser à des traitements antibiotiques courants. Notre objectif a été de déterminer si la D-alanylation des acides téichoïques (TAs) pouvait être une cible thérapeutique prometteuse. Les TAs sont des polymères anioniques de la paroi cellulaire de la majorité des bactéries à Gram-positif, y compris les entérocoques et les staphylocoques. Ces polymères peuvent être modifiés par l'ajout de D-alanine. Quatre enzymes (DltA à DltD) codées par l'opéron *dlt* sont nécessaires pour ce mécanisme de D-alanylation. Dans notre étude, nous avons étudié la croissance et la survie de souches d'*E. faecalis*, *E. faecium* et *S. aureus* dépourvues du mécanisme de D-alanylation face à des traitements antibiotiques utilisés seuls ou en combinaison. L'inactivation du système Dlt, de manière génétique ou pharmacologique, permet de resensibiliser ces bactéries à divers traitements. Les antibiotiques les plus efficaces en l'absence de D-alanylation ont été identifiés comme l'association amoxicilline/céfotaxime contre les entérocoques et l'imipénème contre *S. aureus*. De plus, l'utilisation d'un inhibiteur de DltA comme adjuvant combiné à ces antibiotiques permet un meilleur traitement d'infections létales à *E. faecalis*, *E. faecium* et *S. aureus* dans le modèle animal *Galleria mellonella*. Enfin, l'activité anti-biofilm de l'imipénème a été analysée dans une souche de *S. aureus*. L'inactivation génétique de la D-alanylation couplée à l'imipénème améliore les activités anti-formation et éradication de biofilm. Néanmoins, seule l'activité anti-formation de biofilm a été potentialisée par l'inhibiteur de DltA. L'ensemble de ces résultats montre que le système Dlt est une cible thérapeutique prometteuse pour restaurer l'efficacité d'antibiotiques communs contre les entérocoques et *S. aureus* résistants aux antibiotiques.

Mots-clés : Entérocoques, SARM, D-alanylation, inhibiteur DltA, résistance aux antibiotiques, β -lactamines, nouvelle cible thérapeutique.

Abstract : D-alanylation of teichoic acids as therapeutic target to fight clinical Gram positive bacteria.

The dramatic increase of drug resistance in major human pathogens is a serious global problem, tackled as high priority by the World Health Organization. This emergency applies to infections caused by vancomycin-resistant *enterococci* (especially *Enterococcus faecium*) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). These multidrug-resistant pathogens are tolerant or resistant to β -lactams, which are antibiotics commonly used in human medicine. To counteract emergence of multidrug-resistant bacteria, development of new antibiotics and treatment strategies are urgently needed. Alternative strategies could be based on the use of specific target-inhibiting adjuvants in combination with clinically relevant antibiotics. We explored if the D-alanylation system of teichoic acids (TAs) could be a promising druggable target. TAs are anionic polymer components of the cell wall of many Gram-positive bacteria, including enterococci and staphylococci. These polymers can be decorated with D-alanine. Four enzymes (DltA to DltD) encoded by the *dlt*-operon are necessary for the D-alanylation. In our study, we investigated growth and survival of *E. faecalis*, *E. faecium*, and *S. aureus* strains with nonfunctional D-alanylation after treatment with several antibiotics used alone or in combinations. Inactivation of Dlt system, by genetic or pharmacologic way, allows to resensitize these bacteria to various treatments. Most effective antibiotics in absence of D-alanylation were identified as the combination of amoxicillin/cefotaxime against enterococci and imipenem against *S. aureus*. Moreover, we provide the proof-of-concept that pharmacological inactivation of DltA with the selected antibiotics is also efficient to protect the larvae *Galleria mellonella* against lethal infections by *E. faecalis*, *E. faecium* and *S. aureus*. Finally, the anti-biofilm activities of imipenem were analysed for D-alanylation deficient strain of *S. aureus*. Genetic-inactivation of D-alanylation associated with imipenem enhance biofilm-formation-inhibiting and biofilm-eradicating activities. Nevertheless, only biofilm-forming activity were potentiated by the inhibitor of DltA. The combined results highlight the Dlt system as a promising therapeutic target to restore relevant antibiotics against drug-resistant enterococci and *S. aureus*.

Keywords: *Enterococci*, MRSA, D-alanylation, DltA inhibitor, antibiotic resistance, β -lactams, new therapeutic target.