



HAL
open science

Fonction de la protéine Tex chez *Staphylococcus aureus* : un lien potentiel avec les ARN régulateurs ?

Delphine Parmentier

► To cite this version:

Delphine Parmentier. Fonction de la protéine Tex chez *Staphylococcus aureus* : un lien potentiel avec les ARN régulateurs?. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Strasbourg, 2014. Français. NNT : 2014STRAJ090 . tel-01259400

HAL Id: tel-01259400

<https://theses.hal.science/tel-01259400>

Submitted on 20 Jan 2016

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.

ÉCOLE DOCTORALE VIE ET SANTE

UPR 9002

THÈSE présentée par :

Delphine PARMENTIER

soutenue le : 27 octobre 2014

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**
Discipline/ Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

**FONCTION DE LA PROTEINE TEX CHEZ
STAPHYLOCOCCUS AUREUS :
UN LIEN POTENTIEL AVEC LES ARN
REGULATEURS ?**

THÈSE dirigée par :
Mme ROMBY Pascale

Docteur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme DOCK-BREGEON Anne-Catherine
Mr GEISSMANN Thomas
Mr ROMIER Christophe

Docteur, IBENS Paris
Docteur, INSERM Lyon
Docteur, IGBMC Strasbourg

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chaque membre de mon jury, Dr. Anne-Catherine Dock-Bregeon, Dr. Christophe Romier et Dr. Thomas Geissmann, d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse.

Merci également au Professeur Eric Westhof de m'avoir accueillie au sein de l'UPR9002, ainsi qu'au CNRS, à la DGA et à l'Université de Strasbourg, qui ont permis le financement de mon projet.

Un grand merci à toi Pascale, de m'avoir accordé ta confiance. J'ai beaucoup appris à tes côtés, autant scientifiquement qu'humainement. Merci de m'avoir donné ma chance il y a 5 ans. C'est grâce à toi que je peux présenter ce travail aujourd'hui.

Merci également à l'ensemble de l'équipe : Efi, pour avoir partagé avec moi tes compétences scientifiques en termes de clonage, de RACE... et de culture grecque! Je n'oublierai pas cette école d'été à Héraklion qui nous a considérablement rapprochées. Merci DB pour tous ces instants complices passés autour d'un café, dans les bons comme les mauvais moments ! Merci également à vous 'mejantes' Arnaud, Melo et Marie pour votre bonne humeur au quotidien, sans oublier Cédric, pour ton soutien pendant mes deux premières années de thèse. Il règne une super ambiance dans ce labo et vous y êtes pour quelque chose ! Merci à Isa, Pierre, Stefano et Anne-Catherine pour votre aide et vos conseils scientifiques avisés, votre disponibilité et votre gentillesse.

Merci aux gens du 435 : Serena, pour m'avoir permis de faire mon apprentissage à la fluorescence et pour ta patience à l'interprétation des résultats. Ju, pour tous les moments *Uf* d'après lunch, JC, Valérie, Catherine, Red, Anne, Noé, Elodie, l'Ectoplasme... Sans oublier les déjà partis Santi et Patrick, pour avoir contribué à cette bonne ambiance avec vos nombreux délires du type « courses en cartons » ou « décapsuleur » (vous savez tous de quoi je parle et croyez moi, je n'oublierai jamais ce moment.....).

Merci à Jana et Micka, mes collègues de « galère »/colocataires d'aquarium, pour l'entraide et le soutien quotidien pendant la rédaction. Votre présence m'a été d'une grande aide et plus que jamais je pense qu'il est l'heure de dire *struggle for life* et *boîte le phoque* !!!! ;)

Merci à Mélanie M., Cécile et Cyrielle, pour les *lunch-box times* et les *croustinews* qui les accompagnaient. Sans vous, ces quatre ans n'auraient pas eu le même goût ;)

Merci à toi Christian, d'avoir été présent et de m'avoir supporté (et c'est peu dire !) ces derniers mois de rédaction/préparation de la soutenance. Merci pour ta patience sans fin et ton soutien qui m'ont mené loin.

Je tiens enfin à remercier mes parents. Merci d'avoir été là toutes ces années pour me soutenir. Sans vous je ne serai pas à cette place aujourd'hui.

En m'excusant auprès de tous ceux que j'ai oublié,

Delph 436.

*A mes parents,
ma grand-mère,
et Coyote.*

Sommaire

| | |
|---|-----------|
| REMERCIEMENTS..... | 1 |
| SOMMAIRE..... | 7 |
| ABREVIATIONS..... | 15 |
| INTRODUCTION | 19 |
| I/ STAPHYLOCOCCUS AUREUS, UN PATHOGENE REDOUTABLE | 21 |
| 1. <i>Le début de l'histoire.....</i> | 21 |
| 2. <i>Présentation de S. aureus</i> | 22 |
| 3. <i>Facteurs de virulence de S. aureus.....</i> | 25 |
| 3.1. <i>Les protéines d'adhésion</i> | 25 |
| 3.2. <i>Les protéines sécrétées.....</i> | 26 |
| II/ REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES DE VIRULENCE CHEZ S. AUREUS | 28 |
| 1. <i>Régulation de l'expression des gènes de virulence par les petits ARN</i> | 28 |
| 2. <i>Régulation de l'expression des gènes de virulence par les facteurs de transcription : la famille de protéines Sar</i> | 29 |
| 2.1. <i>Identification de SarA et mécanismes de régulation des gènes cibles.....</i> | 29 |
| 2.2. <i>Les facteurs de transcription homologues à SarA.....</i> | 30 |
| III/ TEX, UNE PROTEINE MULTI-FONCTIONNELLE ?..... | 33 |
| 1. <i>Tex serait impliquée dans la régulation de la transcription des toxines</i> | 33 |
| 1.1. <i>Tex régule négativement la transcription des toxines de Bordetella pertussis.</i> | 33 |
| 1.2. <i>Tex régule positivement la transcription des toxines de Clostridium perfringens.....</i> | 34 |
| 2. <i>Implication de Tex dans l'adaptation de Streptococcus pneumoniae à son environnement ..</i> | 35 |
| 3. <i>Analyse de la structure cristallographique de Tex chez Pseudomonas aeruginosa</i> | 36 |
| 3.1. <i>La structure de la protéine Tex est modulaire.....</i> | 36 |
| Le domaine HtH | 37 |
| Le domaine YqgF..... | 38 |
| Le domaine HhH..... | 38 |
| Le domaine S1..... | 38 |
| 3.2. <i>Tex est l'orthologue structural de la protéine eucaryote Spt6.....</i> | 39 |
| OBJECTIFS | 45 |
| RESULTATS & DISCUSSION | 49 |
| I/ STRATEGIE EXPERIMENTALE..... | 51 |
| 1. <i>Présentation de la stratégie expérimentale adoptée pour mon projet de thèse</i> | 51 |
| 2. <i>Etablissement du protocole de purification de Tex.....</i> | 54 |
| 3. <i>Etablissement du protocole de purification des ARN.....</i> | 56 |
| 4. <i>Les stratégies pour analyser in vitro l'interaction de Tex à l'ARN</i> | 56 |
| Les expériences de cartographie en solution..... | 56 |
| Des expériences de gel retard..... | 57 |
| La filtration sur nitrocellulose | 57 |
| La spectroscopie de fluorescence | 57 |
| 5. <i>Les stratégies pour analyser les fonctions de Tex in vivo</i> | 58 |
| 6. <i>Analyse des bornes de l'ARNm tex par « RACE » circulaire</i> | 63 |

| | |
|--|------------|
| II/ PURIFICATION DES PROTEINES TEX ET TEXΔS1 | 64 |
| 1. Purification de Tex et Tex Δ S1 | 64 |
| 2. Contrôle de l'homogénéité de Tex et Tex Δ S1 par DLS (Dynamic Light Scattering) | 64 |
| III/ INTERACTION DE TEX AUX ARN | 66 |
| 1. Tex reconnaît les motifs en simple brin riches en adénines et uraciles | 66 |
| 1.1. Analyse de l'interaction de Tex à l'ARNIII..... | 66 |
| Le domaine central de l'ARNIII, un site de haute affinité pour Tex ?..... | 66 |
| Tex reconnaît les régions en simple brin riches en A/U de l'ARNIII | 67 |
| 1.2. Analyse de l'interaction de Tex aux ARN non codants RsaA et RsaE | 69 |
| Tex interagit avec RsaA et RsaE | 69 |
| Détermination de l'empreinte de Tex sur RsaA..... | 70 |
| 2. Tex possède plusieurs sites de fixation à l'ARN..... | 70 |
| 2.1. Le domaine S1 de Tex est essentiel pour la reconnaissance des motifs riches en A/U..... | 70 |
| 2.2. La protéine Tex Δ S1 est capable d'accommoder des structures en tiges-boucles..... | 71 |
| IV/ ANALYSE DE L'ARN MESSAGER DE TEX | 77 |
| 1. Localisation génomique de tex | 77 |
| 2. La synthèse de Tex est régulée en fonction de la phase de croissance | 77 |
| 3. tex est-il transcrit en opéron?..... | 79 |
| V/ DETERMINATION DE LA FONCTION DE TEX CHEZ S. AUREUS | 82 |
| 1. Analyse comparative du protéome de la souche HG001 sauvage et de ses mutants par spectrométrie de masse quantitative LC-MSMS..... | 82 |
| 1.1. Principe de la LC-MSMS..... | 82 |
| 1.2. Identification des protéines de l'échantillon | 83 |
| Quantification relative par la méthode du Spectral Count..... | 83 |
| Méthode MS1 Label-Free. | 83 |
| Limites et complémentarité des deux méthodes. | 84 |
| 1.3. Cheminement expérimental | 84 |
| 2. Construction de mutants d'insertion de tex dans les souches RN6390 et HG001 de S.aureus | 92 |
| 2.1. Tex n'est pas essentielle pour la croissance bactérienne | 92 |
| 2.2. Tex serait un répresseur de la synthèse des biofilms | 93 |
| VI/ IDENTIFICATION DES ARN ET PROTEINES PARTENAIRES DE TEX | 97 |
| 1. Contrôles pré-analytiques..... | 97 |
| 2. Analyse des partenaires protéiques de Tex | 99 |
| 2.1. Cheminement expérimental..... | 99 |
| 2.2. Tex interviendrait-elle dans la régulation post-transcriptionnelle des facteurs d'adhésion via le dégradosome ? | 100 |
| 2.2.1 Définition du dégradosome | 100 |
| 2.2.2 Tex agirait-elle au niveau post-transcriptionnel pour réprimer les facteurs d'adhésion de S. aureus ?. | 102 |
| 2.2.3 La protéine Tex pourrait-elle faire le lien entre transcription et métabolisme des ARN ? | 104 |
| CONCLUSIONS & PERSPECTIVES | 107 |
| I/ LA PROTEINE TEX DE S. AUREUS POSSEDE PLUSIEURS SITES DE FIXATION AUX ARN | 109 |
| 1. Le domaine OB..... | 109 |
| 2. Perspectives concernant l'étude des interactions ARN-Tex..... | 113 |

| | |
|---|------------|
| II/ TEX AGIRAIT COMME REGULATEUR DE L'ETAT PHYSIOLOGIQUE DES BACTERIES LORS DE L'INFECTION | 114 |
| 1. Conclusions. | 114 |
| 2. Perspectives | 117 |
| MATERIEL & METHODES | 119 |
| I/ SOUCHES DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS ET PLASMIDES UTILISES | 121 |
| II/ TAMPONS ET SOLUTIONS | 122 |
| III/ ANALYSE DES INTERACTIONS TEX-ARN IN VITRO | 123 |
| 1. Préparation du matériel biologique..... | 123 |
| 1.1. Surexpression des protéines <i>Tex</i> et <i>Tex ΔS1</i> | 123 |
| 1.1.1 Culture d' <i>E. coli</i> et induction de l'expression des protéines | 123 |
| 1.1.2 Lyse des cellules | 123 |
| 2. Purification de <i>Tex</i> et <i>Tex ΔS1</i> | 124 |
| 2.1. Purification sur colonne Ni^{2+} -NTA | 124 |
| 2.2. Purification sur colonne échangeuse d'anions (MonoQ) | 124 |
| 2.3. Concentration et stockage des protéines..... | 124 |
| 3. Préparation des ARN régulateurs | 125 |
| 3.1. Transcription in vitro de l'ARNIII | 125 |
| 3.1.1 Linéarisation du plasmide et purification de la matrice ADN | 125 |
| 3.1.2 Transcription in vitro. | 125 |
| 3.2. Synthèse chimique des ARN non codants <i>RsaA</i> , <i>RsaE</i> , de la tige-boucle 2 de l'ARNIII et d'un petit fragment d'ARN simple brin | 126 |
| IV/ ANALYSE DE LA FORMATION DES COMPLEXES TEX-ARN PAR GEL RETARD | 127 |
| 1. Marquage de l'ARN à l'extrémité 5' | 127 |
| 2. Analyse des complexes <i>Tex</i> -ARN sur gel retard | 127 |
| 3. Expériences de compétition par gel retard | 128 |
| V/ DETERMINATION DE L'EMPREINTE DE TEX AUX ARN | 129 |
| 1. Hydrolyse enzymatique et détection directe des coupures | 129 |
| 2. Hydrolyse enzymatique suivie d'une extension d'amorce | 129 |
| 2.1. Marquage d'oligonucléotide à l'extrémité 5' | 129 |
| 2.2. Hydrolyses enzymatiques et détection des coupures..... | 130 |
| VI/ ANALYSE DE LA FORMATION DES COMPLEXES TEX-ARN PAR FILTRATION SUR NITROCELLULOSE..... | 131 |
| 1. Analyse de la formation des complexes <i>Tex</i> -ARN et <i>TexΔS1</i> -ARN..... | 131 |
| 2. Expériences de compétitions par filtration sur nitrocellulose..... | 131 |
| VII/ ANALYSE DE LA FORMATION DES COMPLEXES TEX-ARN PAR SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE | 132 |
| 1. Contrôle de l'homogénéité des protéines par Dynamic Light Scattering (DLS) ou diffusion de la lumière..... | 132 |
| 2. Analyse de la formation des complexes <i>Tex</i> -ARN et <i>TexΔS1</i> -ARN par spectroscopie de fluorescence..... | 132 |
| VIII/ ANALYSE DE LA FONCTION DE TEX IN VIVO | 134 |
| 1. Analyse de l'ARNm <i>tex</i> par RACE circulaire | 134 |
| 1.1. Préparation des ARN totaux..... | 134 |
| 1.2. Traitement des ARN avec l'enzyme TAP (Tobacco Acid Pyrophosphatase) | 134 |
| 1.3. Circularisation des ARN | 134 |
| 1.4. Réaction de RT-PCR | 135 |

| | |
|--|-----|
| 1.5. Clonage des produits de RT-PCR..... | 135 |
| 1.5.1 Transformation de cellules XL1 blue d' E.coli..... | 135 |
| 1.5.2 Contrôle des clonages par PCR/colonie | 136 |
| 2. Visualisation de l'expression de l'ARNm de <i>Tex</i> et ses cibles in vivo, par DIG-Northern blot. | 136 |
| 2.1. Principe du DIG-Northern | 136 |
| 2.2. Choix et synthèse des oligonucléotides | 137 |
| 2.2.1 Synthèse des sondes ADN par PCR..... | 137 |
| 2.2.2 Transcription in vitro des sondes DIG-ARN..... | 137 |
| 2.3. Cultures de <i>S. aureus</i> | 138 |
| 2.4. Northern blot..... | 138 |
| 2.4.1 Séparation des ARN totaux..... | 138 |
| 2.4.2 Transfert des ARN sur membrane de nitrocellulose | 138 |
| 2.4.3 Hybridation des membranes..... | 138 |
| 2.4.4 Détection des ARN messagers | 139 |
| 3. Construction de mutants conditionnels de <i>tex</i> par insertion d'un intron dans la séquence génomique : le système Targetron®..... | 139 |
| 3.1. Choix du site d'insertion de l'intron sur le gène <i>tex</i> | 139 |
| 3.2. Création du plasmide pNL9162 contenant l'intron modifié | 139 |
| 3.2.1 Réaction de PCR pour la modification de l'intron | 139 |
| 3.2.2 Digestion des introns modifiés et du plasmide pNL9162..... | 140 |
| 3.2.3 Ligation de l'intron et du plasmide pNL9162..... | 141 |
| 3.3. Transformation des cellules DH5α d'E.coli..... | 141 |
| 3.4. Transformation des cellules RN4220 de <i>S. aureus</i> | 141 |
| 3.5. Transformation des cellules RN6390 et HG001 de <i>S. aureus</i> et induction de la transcription de l'intron | 142 |
| 3.5.1 Extraction du plasmide pNL9162 portant l'intron | 142 |
| 3.5.2 Transformation des cellules RN6390 et HG001 de <i>S. aureus</i> et induction de l'expression de l'intron | 142 |
| 3.5.3 Vérification de l'insertion de l'intron dans l'ADN génomique de HG001 et RN6390 par PCR sur colonie | 142 |
| 3.5.4 Elimination du plasmide pNL9162 | 143 |
| 3.6. Analyse du phénotype des souches mutées | 143 |
| 3.6.1 Analyse du phénotype de croissance en milieu NZM..... | 143 |
| 3.6.2 Quantification de la production de biofilms par la méthode du Cristal Violet (Claire Lays, INSERM Lyon) | 144 |
| 4. Analyse quantitative du protéome des souches HG001 et RN6390 sauvages et mutées | 144 |
| 4.1. Conditions de croissance des souches | 144 |
| 4.2. Protocole d'extraction des protéines totales | 145 |
| 4.2.1 Lyse cellulaire..... | 145 |
| 4.2.2 Extraction des protéines totales | 145 |
| 4.3. Estimation de la concentration des protéines totales par la méthode de Bradford..... | 145 |
| 4.4. Analyse comparative des protéomes des souches HG001 et RN6390 sauvages et mutées | 146 |
| 4.4.1 Préparation des échantillons et digestion trypsique..... | 146 |
| 4.4.2 Séparation chromatographique liquide en phase inverse des peptides | 146 |
| 4.4.3 Analyse de masse des peptides..... | 146 |
| 4.4.4 Identification des peptides par bioinformatique | 147 |
| 5. Insertion d'un FLAG-tag en C-terminal du gène <i>tex</i> par recombinaison homologue dans la séquence génomique | 147 |
| 5.1. Choix de la position de l'insertion du FLAG pour <i>Tex</i> WT et <i>Tex</i> ΔS1 | 147 |

| | |
|--|------------|
| 5.2. Choix des oligonucléotides | 147 |
| 5.3. Amplification des régions d'homologie par PCR | 147 |
| 5.4. Création du plasmide pMUTIN portant la région homologue suivie du FLAG | 148 |
| 5.4.1 Digestion du plasmide et des régions homologues..... | 148 |
| 5.4.2 Ligation du plasmide avec les régions homologues et transformation d' E.coli..... | 148 |
| 5.5. Transformation de la souche BJC100 de S. aureus et intégration du FLAG dans le génome | 149 |
| 5.6. Vérification de l'insertion du FLAG par Western blot..... | 149 |
| 5.6.1 Cultures de S. aureus | 149 |
| 5.6.2 Lyse des cellules et détermination de la concentration en protéines totales par la méthode de Bradford | 149 |
| 5.6.3 Western blot | 150 |
| 6. Identification des partenaires de Tex par immunoprécipitation | 150 |
| 6.1. Identification des protéines partenaires | 150 |
| 6.1.1 Cultures de S.aureus | 150 |
| 6.1.2 Lyse des cellules | 151 |
| 6.1.3 Immunoprécipitation | 151 |
| 6.1.4 Analyse des protéines co-éluées avec Tex | 151 |
| 6.2. Identification des ARN partenaires | 151 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 153 |
| ANNEXES | 169 |
| I/ TABLEAUX | 171 |
| II/ PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES..... | 173 |
| <i>Current knowledge on regulatory RNAs and their machineries in Staphylococcus aureus.</i> | <i>175</i> |
| <i>A method map changes in bacterial surface composition induced by regulatory RNAs in Escherichia coli and Staphylococcus aureus.....</i> | <i>177</i> |
| <i>Traditional chemical mapping of RNA structure in vitro and in vivo</i> | <i>179</i> |
| III/ COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES..... | 181 |

Abréviations

| | |
|------------------|---|
| Aa | Acide aminé |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ADNdb | Acide désoxyribonucléique double brin |
| ADNsb | Acide désoxyribonucléique simple brin |
| AcNa | Acétate de sodium |
| AIP | Peptide autoinducteur |
| APS | Persulfate d'ammonium |
| ARN | Acide ribonucléique |
| ARNm | Acide ribonucléique messenger |
| ARNnc | Acide ribonucléique non codant |
| ARNr | Acide ribonucléique ribosomique |
| ATP | Adénosine 5' triphosphate |
| BET | Bromure d'éthidium |
| BHI | Brain Heart Infusion |
| CTP | Cytidine 5' triphosphate |
| ddNTP | Didésoxyribonucléotide triphosphate |
| dNTP | Désoxyribonucléotide triphosphate |
| DO _{nm} | Densité optique à la longueur d'onde indiquée en nanomètres |
| DTT | Dithiothréitol |
| EDTA | Ethylène diamine tétraacétate de sodium |
| GTP | Guanosine 5' triphosphate |
| kb | Kilobase |
| LB | Luria - Bertani |
| μCi | Micro Curie |
| M | Molaire |
| milliQ | Eau bidistillée (Millipore) |
| nts | Nucléotides |
| NZM | NZ amine broth |
| pb | Paire de base |
| PNK | Polynucléotide kinase |
| RNase | Ribonucléase |
| RNAP | ARN polymérase |
| RNP | Particule ribonucléoprotéine |
| rpm | Rotations par minute |
| SD | Séquence Shine et Dalgarno |
| SDS | Sodium dodécyl sulfate |
| TB | Tris - borate |
| TBE | Tris - borate - EDTA |
| TMN | Tris - Magnésium - Sodium |
| Tris | Tris (hydroxyméthyl)-aminométhane |
| TTP | Thymidine 5' triphosphate |
| UV | Ultra-Violet |

Introduction

I/ Staphylococcus aureus, un pathogène redoutable

1. Le début de l'histoire

L'histoire débute en 1928. Alors qu'il étudie l'effet antibactérien du lysozyme sur la croissance de staphylocoques en milieu gélosé, Alexander Fleming (1881-1955) (**Figure 1A**) découvre par hasard que ses boîtes de Pétri sont envahies de colonies cotonneuses de moisissures (**Figure 1B**). Il s'agit d'une contamination par le champignon microscopique *Penicillium notatum* (**Figure 1C**) provenant de son voisin de paillasse Charles J. Latouche, un jeune mycologue Irlandais. Juste avant de commencer à désinfecter ses boîtes, Fleming s'aperçoit de la présence d'une zone translucide autour des moisissures, dans laquelle les staphylocoques ne se sont pas développés. Il émet alors l'hypothèse d'une substance sécrétée par les moisissures qu'il nomma « pénicilline ». Conscient de l'importance du phénomène observé, Fleming étend ses études à un grand nombre de bactéries et découvre que la substance est active contre toutes les bactéries Gram-positives. Enthousiasmé par ses découvertes, il publie alors ses travaux de recherche en 1929, dans le *British Journal of Experimental Pathology*. Un article qui n'attira que très peu l'attention. Il continua néanmoins ses études et démontra que la substance n'était pas toxique pour l'animal. De ce fait, Fleming proposa de l'utiliser comme antiseptique cutané ou en injections. Cependant, il observa que la pénicilline était très difficile à extraire du champignon. D'autre part, la substance agissait avec une certaine lenteur sur les staphylocoques, faisant d'elle une molécule instable et difficile à produire en grandes quantités. Face à ces difficultés et au désintérêt général de la communauté scientifique pour ses travaux, Fleming décide d'abandonner ses recherches. La découverte des sulfamides quelques années plus tard en 1935, laissera bien plus encore la pénicilline dans l'ombre. Il faudra alors attendre 1939, dix ans après ses premières découvertes, que Howard Florey et Ernst Chain reprennent les travaux de Fleming et réussissent à purifier cette substance à grande échelle. Les trois chercheurs seront finalement récompensés d'un Prix Nobel en 1945 pour leurs études sur la pénicilline et son application thérapeutique.

Dès 1945, Fleming lance un avertissement concernant l'utilisation abusive de la pénicilline : « *Au lieu d'éliminer l'infection, le risque serait que les microbes apprennent à résister à la pénicilline et que ces mêmes microbes soient ensuite transmis d'un individu à l'autre et provoquent une infection que la pénicilline ne pourra guérir* » (tiré de «*Sir Alexander Fleming- Discoverer of Penicillin* », *Cal West Med.* Sep 1945; 63(3): 153). Cette crainte est aujourd'hui devenue réalité. Suite à une utilisation massive d'antibiotiques ces dernières décennies, de nombreuses souches bactériennes sont devenues résistantes à l'un ou plusieurs d'entre eux.

C'est le cas de *S. aureus*.



Figure 1. La découverte de la pénicilline par Alexander Fleming.

(A) Sir Alexander Fleming, à l'origine de la découverte de la pénicilline. **(B)** Inhibition de la croissance d'une souche de *S. aureus* sur milieu gélosé par une colonie de *Penicillium* (blanc). **(C)** Observation au microscope électronique d'une structure typique de *Penicillium notatum*.

2. Présentation de *S. aureus*

C'est en 1878 que Louis Pasteur (1822-1895), qui travaillait avec Emile Roux et Chamberland sur les germes de maladie, observa pour la première fois au microscope dans du pus de furoncle et d'ostéomyélite prélevé sur des patients, des « amas en grains » (**Figure 2C**) qu'il nomma staphylocoques. En 1880, le chirurgien écossais Alexander Ogston (1844-1929) (**Figure 2A**) fut ensuite le premier à isoler ces staphylocoques à partir d'abcès et d'autres lésions cutanées (Canadian medical Association, 1929). Il les décrivit en 1881 comme la première espèce de staphylocoques connue et les nomma *Staphylococcus aureus*. L'étymologie grecque *staphyl* signifie « grappe » et *aureus* signifie « doré ». Cette bactérie est donc connue du grand public sous le nom de « staphylocoque doré », en raison de sa couleur jaune d'or sur milieu gélosé, due à la synthèse d'un caroténoïde par la bactérie (**Figure 2B**).

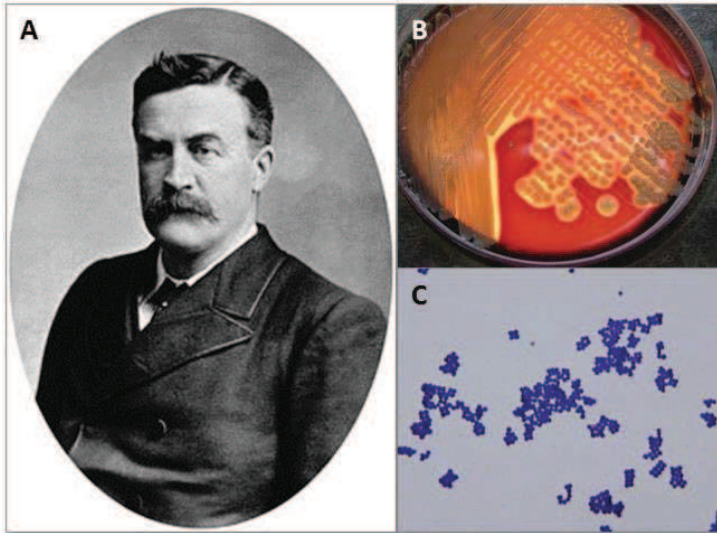


Figure 2. Découverte de *Staphylococcus aureus*.

(A) Sir Alexander Ogston (1844-1929), qui a isolé *S. aureus* à partir de pus d'abcès de patients en 1881. **(B)** Observation du pigment jaune d'or de *S. aureus*, sur milieu gélosé. Source : <http://lib.sytu.edu.cn/> **(C)** Observation au microscope optique des « amas en grains » formés par *S. aureus*, après coloration de Gram.

S. aureus est une bactérie pathogène opportuniste de type Gram-positif (**Figure 2C**). C'est un organisme commensal des surfaces humides de la peau et des muqueuses, porté par 20 à 50% de la population. Par sa capacité à coloniser un grand nombre de tissus et organes de l'hôte, cette bactérie est à l'origine d'un large panel d'infections, des plus bénignes (infections cutanées superficielles telles que l'impétigo) aux plus graves telles que pneumonies, méningites, endocardites ou septicémies (**Figure 3A et 3B**). En milieu hospitalier, *S. aureus* représente l'une des premières causes majeures des infections nosocomiales. En effet, cette bactérie est connue notamment pour sa capacité à former des biofilms sur du matériel biomédical (**Figure 3C**), en particulier lors d'opérations ou de traitements invasifs tels que la pose de cathéters. Le rapport de l'Enquête Nationale de Prévalence (ENP) des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux dans les établissements de santé publique français, publié en juin 2012, a reporté que *S. aureus* constitue l'un des trois micro-organismes les plus fréquemment isolés dans les infections nosocomiales. Ce pathogène, représenté à 15,9%, constitue avec *Escherichia coli* (26%) et *Pseudomonas aeruginosa* (8,4%), la moitié des micro-organismes identifiés dans ces infections. Il est également responsable d'environ 20% des septicémies contractées en milieu hospitalier.

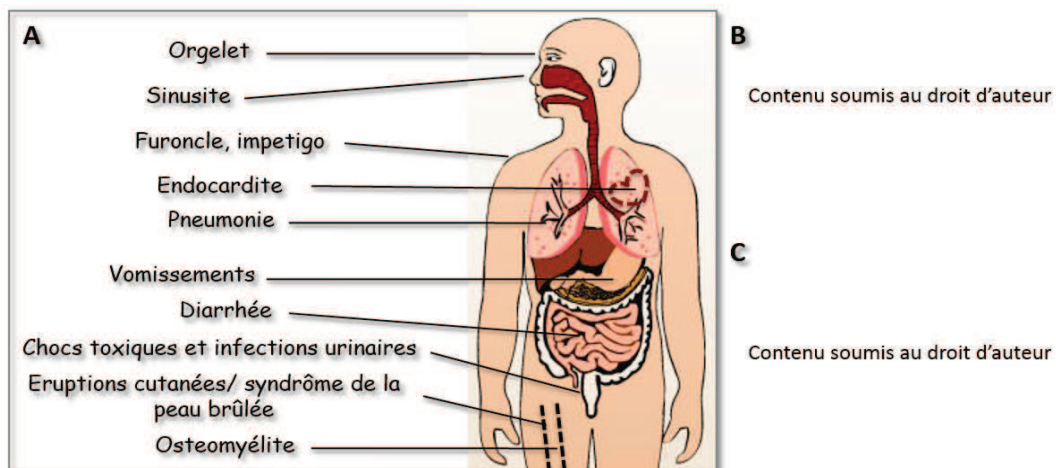


Figure 3. *Staphylococcus aureus*.

(A) Spectre d'infections de *S. aureus*. **(B)** Impétigo en croûtes sur le visage d'un enfant (Pereira, 2014). **(C)** Observation au microscope électronique à balayage d'un biofilm de *S. aureus* (Hunter 2008, photo Credit: Janice Haney Carr - the Centers for Disease Control et Prevention's Public Health Image Library (PHIL)).

La pathogénie de ces infections est aujourd'hui très fortement accentuée par l'augmentation croissante des résistances aux antibiotiques (**Figure 4**). En effet, peu après l'introduction de la méthicilline pour combattre les infections à *S. aureus* résistantes à la pénicilline, c'est au Royaume Uni en 1961, qu'ont été identifiés pour la première fois des isolats de la bactérie, résistants à ce nouvel antibiotique (Methicillin-Resistant S. aureus, *MRSA*). Ces souches se sont ensuite rapidement propagées à travers l'Europe puis à d'autres pays dans le monde tels que le Japon, l'Australie et les Etats-Unis. Le traitement par la vancomycine a été alors mis en place contre ces souches MRSA dans les années 1980, qui a conduit en 1996 à l'isolement d'une souche vancomycine-résistante sur un patient japonais en traitement post-opératoire (Hiramatsu, 2001). A l'image de la rapide dissémination des souches MRSA, des isolats dits vancomycine-intermédiaires (Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus, *VISA*) ont été identifiés en Europe, en Asie et aux Etats-Unis puis entre 2002 et 2005, des souches vancomycine-résistantes (Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus, *VRSA*) sont finalement apparues aux Etats-Unis (Tarai *et al.*, 2013).

Figure 4. Evolution de la résistance aux antibiotiques de *Staphylococcus aureus*.

En bleu, année d'approbation par la FDA (Federal Drug Agency) de l'usage de l'antibiotique. En rouge, année d'apparition d'une souche de *S. aureus* résistante à l'antibiotique, en orange, résistance intermédiaire (Deguchi, 1982; Fuchs *et al.*, 1996; Hanaki and Hiramatsu, 1997; Lacey and Mitchell, 1969; Rammelkamp and Keefer, 1943).

3. Facteurs de virulence de *S. aureus*

3.1. Les protéines d'adhésion

Lors de l'infection, *S. aureus* initie la colonisation de son hôte en adhérant tout d'abord à des composants de la matrice extracellulaire. Cette première étape est permise grâce aux protéines d'adhésion, qui sont synthétisées en début de phase exponentielle de croissance. On distingue deux grandes familles de protéines de surface : les MSCRAMMs (*m*icrobial *s*urface *c*omponents *r*ecognizing *a*dhesive *m*atrix *m*olecules) et les SERAMs (*s*ecretable *e*xpanded *r*epertoire *a*dhesive *m*olecules) (Dreisbach *et al.*, 2011).

Les MSCRAMMs ont été identifiées en 1994 (Patti *et al.*, 1994a) et comprennent trois grands types de facteurs associés de manière covalente aux peptidoglycanes de la paroi bactérienne (Foster et Höök, 1998): les « Fibronectin-binding proteins » (FnbPA et FnbPB), les « clumping factors » (ClfA et ClfB) et les protéines de liaison au collagène, telles que la protéine Cna. Les FnbP permettent l'adhésion des bactéries à la surface cellulaire de l'hôte (Grundmeier *et al.*, 2004) puis leur internalisation par les cellules endothéliales en se liant spécifiquement à la fibronectine, une glycoprotéine qui joue un rôle crucial dans l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire (Peacock *et al.*, 1999). Ces facteurs contribuent aussi à l'initiation de l'infection par leur fixation sur le matériel biomédical resté longtemps au contact de l'hôte en milieu hospitalier (Greene *et al.*, 1995). Les ClfA/B eux, se lient au fibrinogène qui est un facteur de coagulation. Lors de la coagulation, ce facteur initialement soluble dans le plasma, est transformé en fibrine, insoluble. Les « clumping factors » inhibent la phagocytose par leur activité de liaison au fibrinogène (Higgins *et al.*, 2006). Enfin, la protéine Cna (Patti *et al.*, 1994b) est également impliquée dans l'adhésion à la surface cellulaire en se liant aux tissus riches en collagène et/ou cartilagineux (Switalski *et al.*, 1993). La protéine Cna est retrouvée fortement associée à des ostéomyélites (Elasri *et al.*, 2002), des kératites (Rhem *et al.*, 2000) ou encore de l'arthrose (Xu *et al.*, 2004). Une double fonction de cette protéine a récemment été mise en

évidence, puisqu'elle se lierait spécifiquement au domaine collagèneux de certains récepteurs du complément (C1q) et inhiberait la voie classique du complément, permettant ainsi au pathogène d'échapper au système immunitaire de l'hôte (Kang *et al.*, 2013).

Les SERAMs, contrairement aux MSCRAMMs, ne regroupent que des protéines attachées de manière non covalente à la paroi cellulaire (Dreisbach *et al.*, 2011). Parmi cette classe, on distingue des facteurs extracellulaires tels que les Eap (*extracellular adhesion protein*), les Efb (*extracellular fibrinogen-binding protein*) ou encore des coagulases. Tous ces facteurs sont associés à des pathologies endovasculaires (Chavakis *et al.*, 2005). Les protéines Eap sont retrouvées dans plus de 96% des isolats de *S. aureus* et présentent la caractéristique de se lier à un large éventail de composants de l'hôte (fibronectine, fibrinogène, prothrombine, ostéopontine...). Elles sont également capables d'interagir avec la molécule d'adhésion cellulaire ICAM-1 et d'inhiber la réponse cellulaire inflammatoire aiguë (Chavakis *et al.*, 2002). En plus de cette propriété anti-inflammatoire, les protéines Eap possèdent des propriétés immunomodulatoires leur permettant de moduler la réponse des lymphocytes T, induisant une tolérance immunitaire pour le pathogène (Chavakis *et al.*, 2005). Enfin, les Eap ont récemment été identifiés comme inhibiteurs de l'activité des neutrophiles (Stapels *et al.*, 2014), qui sont les premières cellules immunitaires à migrer sur le site de l'infection.

Ainsi, les protéines de surface de *S. aureus* jouent un rôle crucial lors de l'initiation de l'infection par leurs capacités d'adhésion aux différentes molécules plasmatiques et tissulaires, qui permettent l'invasion de l'hôte. Une fois l'initiation de l'infection réalisée, d'autres protéines sont alors nécessaires pour favoriser la dissémination. Il s'agit en particulier des protéines sécrétées.

3.2. Les protéines sécrétées

Encore appelées exotoxines, elles sont synthétisées en phase post-exponentielle de croissance et interviennent dans la pathogénicité de *S. aureus*, en lui permettant de se disséminer dans l'hôte et d'échapper à son système immunitaire. La plupart des souches de *S. aureus* produisent un groupe d'enzymes appelées cytolysines, comprenant notamment les hémolysines α , β , δ et γ qui possèdent différentes fonctions (Dinges *et al.*, 2000). L'hémolysine α forme des pores à la surface d'un grand nombre de cellules (Vandenesch *et al.*, 2012) par l'assemblage de ses monomères en un homoheptamère, qui permet le transport de petites molécules cationiques (K^+ , Ca^{2+}) induisant la nécrose de la cellule cible. L'hémolysine β , qui agit

plutôt sur les érythrocytes, hydrolyse la sphingomyéline présente dans la membrane, conduisant à une modification de sa fluidité et une déstabilisation de sa structure en double couche (Huseby *et al.*, 2007). L'hémolysine δ est codée par l'ARNIII (§ I. 1) et appartient à la classe des PSM (*phenol soluble proteins*), qui ont la capacité de lyser un grand nombre de cellules du système immunitaire (Berube *et al.*, 2014; Vandenesch *et al.*, 2012). Cette toxine regroupe les caractéristiques des deux précédentes et peut en plus, agir comme détergent à hautes concentrations pour solubiliser la membrane. Enfin, l'hémolysine γ est particulière. Elle appartient avec la leucocidine de Panton-Valentine, à la classe des toxines dites « à deux composants ». Cette classe de protéines est constituée de deux polypeptides « S » (*slow*) et « F » (*fast*), en référence à leur vitesse d'élution sur support chromatographique (Woodin, 1960). L'hémolysine γ est capable de lyser une grande variété d'érythrocytes en formant un pore membranaire.

Les superantigènes constituent une seconde famille d'exotoxines regroupant la toxine TSST-1 (*toxin shock syndrom toxin-1*) ainsi que la plupart des entérotoxines de *S. aureus* (Dinges *et al.*, 2000) Cette classe de protéines sécrétées est caractérisée par sa pyrogénicité et sa forte capacité à stimuler la prolifération des lymphocytes T, indépendamment de la spécificité antigénique de ces cellules (Marrack et Kappler, 1990). Ces toxines, en se liant aux récepteurs du CMH (*complexe majeur d'histocompatibilité*) de classe II, induisent une forte prolifération des lymphocytes T, ce qui entraîne la synthèse de cytokines en très fortes quantités à l'origine du choc toxique, souvent mortel.

D'autres types d'exotoxines sont sécrétées par *S. aureus*, notamment des lipases et des nucléases, chargées d'apporter les nutriments à la bactérie (Said-Salim *et al.*, 2003; Smeltzer *et al.*, 1992), des coagulases impliquées dans la coagulation du plasma sanguin (Giraud *et al.*, 1997; Said-Salim *et al.*, 2003) ou encore une staphylokinase, qui par sa capacité à se lier à certains peptides situés sur les neutrophiles (α -défensines), abolit son activité bactéricide (Bokarewa *et al.*, 2006).

II/ Régulation de l'expression des gènes de virulence chez *S. aureus*

S. aureus exprime ses facteurs de virulence de manière temporelle, en fonction de la phase d'infection: les protéines d'adhésion sont exprimées en début de phase exponentielle de croissance pour l'invasion de l'hôte et la colonisation des tissus. Les exotoxines sont exprimées en phase post-exponentielle lors de la dissémination. La transition est finement régulée par l'action coordonnée de différents régulateurs tels que les systèmes à deux composants (*two components regulatory systems*, TCRS), les facteurs de transcription (FT) et les ARN régulateurs. Les mécanismes de régulation par les ARN et le système à deux composants *agr* seront d'abord explicités dans la revue « *Current knowledge on regulatory RNAs and their machineries in Staphylococcus aureus* » à laquelle j'ai contribué (Romilly *et al.*, 2012b, annexe II) (§ II. 1). Je développerai ensuite la régulation par les facteurs de transcription (§ II. 2).

1. Régulation de l'expression des gènes de virulence par les petits ARN

S. aureus est l'un des pathogènes majeurs de l'homme, responsable d'un grand nombre d'infections communautaires et nosocomiales (§ I. 2). L'expression des gènes de virulence de ce pathogène est finement régulée, grâce à l'action coordonnée de différents facteurs de régulation, dont des systèmes à deux composants, des facteurs de transcription et des ARN régulateurs. De récentes études ont permis l'identification de nouveaux ARN régulateurs dont des ARN agissant *in cis*, des ARN antisens, des petits ARN non codants ou des ARNm codant des peptides. Dans la revue « *Current knowledge on regulatory RNAs and their machineries in Staphylococcus aureus* » (Romilly *et al.*, 2012b, annexe II) sont présentés plusieurs exemples d'ARN régulant la pathogénicité de *S. aureus* ainsi que différents aspects de la régulation antisens.

Plus récemment, de nouveaux ARN régulateurs ont été identifiés, dont la fonction a été résolue. C'est le cas par exemple de RsaA, dont la fonction a été identifiée dans l'équipe (Romilly *et al.*, 2014) et qui agirait comme un atténuateur de la virulence, en particulier des infections aiguës. De manière intéressante, certains de ces ARN régulateurs ont également été identifiés sur des éléments génétiques mobiles. C'est le cas de SprD, qui est codé par un îlot de pathogénicité et qui est connu pour augmenter la virulence dans le modèle souris (Felden *et al.*, 2011). Un autre ARN codant un peptide nommé PSM-mec aux propriétés pro-inflammatoires et cytolytiques typiques des PSM (*Phenol-Soluble Modulins*) a été identifié sur la cassette SCCmec (Queck *et al.*, 2009), responsable de l'acquisition du gène de résistance à la méthicilline et l'oxacilline (Katayama *et al.*, 2000). Ainsi, l'association de ces ARN avec les éléments génétiques

mobiles, potentiellement porteurs de gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques, témoigne d'un lien existant entre deux déterminants essentiels pour la bactérie que sont l'évolution et l'adaptation.

2. Régulation de l'expression des gènes de virulence par les facteurs de transcription : la famille de protéines Sar

2.1. Identification de SarA et mécanismes de régulation des gènes cibles

La famille des protéines Sar a largement été décrite. Elle est associée aux infections communautaires survenues en Europe, au Canada et aux Etats-Unis ces dernières années (Thurlow *et al.*, 2012; Ibarra *et al.*, 2013). Cette famille de protéines est spécifique à la famille des Staphylococcaceae (Ibarra *et al.*, 2013). Le premier facteur de transcription identifié à cette famille est SarA (*staphylococcal accessory regulator A*). Il s'agit d'une protéine de liaison à l'ADN, dont le locus génétique est sous la dépendance de trois promoteurs P1, P2 et P3, différenciellement exprimés au cours de la croissance cellulaire (Bayer *et al.*, 1996). La synthèse de SarA est maximale en phase post-exponentielle de croissance, qui correspond également à la phase d'activation du système *agr* (Chien et Cheung, 1998). SarA agit de deux façons différentes. Soit de manière directe par liaison aux régions promotrices des gènes cibles, soit de manière indirecte par liaison à la région promotrice du locus *agr* (Cheung *et al.*, 1997, 2004; Chien et Cheung, 1998; Chien *et al.*, 1999). Dans le deuxième cas, il va permettre d'activer la synthèse d'ARNII et d'ARNIII pour promouvoir l'activation des exotoxines (hémolysines α , δ et γ) (Bronner *et al.*, 2004; Chien *et al.*, 1999; Dunman *et al.*, 2001) et la répression des protéines d'adhésion, telles que la protéine A et les protéines de liaison au fibrinogène ou à la fibrinectine. SarA permet l'activation de plusieurs protéines d'adhésion (FnbA/B, ClfA/B) et de certaines exotoxines. A l'heure actuelle, aucune séquence définie n'a été clairement démontrée pour la liaison de SarA à ses cibles. Cependant une séquence consensus riche en résidus A/T de 26 pb a été décrite en amont de la boîte TATA au niveau du promoteur P2 de l'opéron *agr* (Chien *et al.*, 1999), alors qu'une séquence conservée de seulement 7 pb riche en résidus A/T, a été plus récemment proposée dans la même région (Sterba *et al.*, 2003). Cette séquence de 7 pb, ainsi qu'une autre séquence située dans la même région (Reyes *et al.*, 2011) et englobée dans les 26 pb décrits par Chien *et al.* (1999), constitueraient deux séquences en tandem pour la fixation d'un dimère de SarA (Reyes *et al.*, 2011).

En plus de ses fonctions de régulateur de la transcription, SarA a également été associée à la régulation de la stabilité des ARNm chez *S. aureus* (Morrison *et al.*, 2012). Ce facteur est capable de se lier à un groupe d'ARNm et de les stabiliser en limitant leur accessibilité aux ribonucléases. Parmi ces ARNm, figurent notamment des facteurs de virulence tels que *agrA*, les hémolysines (α , β et γ), le facteur de liaison à la fibronectine FnbA ou la protéine de liaison au collagène Cna. A l'inverse, SarA peut aussi déstabiliser les ARNm en particulier codant pour un grand nombre d'enzymes du métabolisme (Morrison *et al.*, 2012). SarA serait donc une petite protéine aux multiples fonctions agissant à la fois au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel.

2.2. Les facteurs de transcription homologues à SarA

L'élucidation de la structure cristallographique de SarA a montré qu'elle appartient à la famille des « winged-helix proteins » (Liu *et al.*, 2006), classiquement composée de cinq hélices α et de trois feuillets β connectés par plusieurs boucles (**Figure 5A**) (Gajiwala et Burley, 2000). Ces protéines possèdent toutes un domaine HtH (*helix-turn-helix*) de liaison à l'ADN, communément retrouvé dans les facteurs de transcription. La résolution de la structure cristallographique de SarA par Liu *et al.*, en 2006 a révélé une organisation en homodimère (**Figure 5B**). Dans cette structure, les hélices α_3 et α_4 composent le motif HtH, qui permet la liaison de la protéine au sillon majeur de l'ADN cible. Les feuillets β_2 et β_3 composent le motif appelé « winged helix » qui constitue le domaine de liaison au sillon mineur de l'ADN.

Contenu soumis au droit d'auteur

Figure 5. Représentation schématique de la topologie des « winged-helix proteins » (A) et structure de l'homodimère SarA (B) (Figure adaptée de Liu *et al.*, 2006 et Gajiwala et Burley, 2000).

(A) Topologie des «winged-helix proteins ». La partie N-terminale de cette classe de protéines est majoritairement de nature hélicoïdale, composée de trois hélices α (H1, H2, H3) pour seulement un feuillet β (S1). La partie C-terminale est composée de deux feuillets β (S2 et S3) disposés de manière anti-parallèle, ainsi que des deux boucles W1 et W2 qui forment la structure dite « ailée » de la protéine. Les boucles W1 et W2 positionnent l'hélice α H3 (rose) de la même manière que les ailes d'un papillon, ce qui a inspiré son nom à cette classe de protéines (Gajiwala et Burley, 2000). **(B)** Structure de l'homodimère SarA. Chaque monomère (SarA1 en vert et SarA2 en jaune) est constitué de cinq hélices α et trois feuillets β suivant l'ordre $\alpha_1\alpha_2\text{-}\beta_1\alpha_3\alpha_4\text{-}\beta_2\beta_3\text{-}\alpha_5$. Le motif HtH qui permet la liaison au sillon majeur de l'ADN, est constitué des hélices α_3 et α_4 . Les feuillets β_2 et β_3 forment le motif ailé de la structure et permettent la liaison de la protéine au sillon mineur de l'ADN (Liu *et al.*, 2006).

Grâce à des alignements de séquence, d'autres facteurs présentant des homologies structurales avec SarA ont été caractérisés (Cheung *et al.*, 2004). Ces facteurs ont été subdivisés en trois groupes, sur la base de leur taille, de leur similarités de séquences et de leurs homologies structurales (Cheung *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2006). Les facteurs ne possédant qu'un seul domaine de liaison à l'ADN forment le premier groupe et comprennent SarA, SarR, SarT, SarV, SarX et Rot (*repressor of toxin*). Le deuxième groupe est composé des facteurs les plus larges, possédant deux domaines de liaison à l'ADN, chacun étant un homologue de SarA. Ce groupe comprend SarU, SarV et SarY. Enfin, le troisième groupe comprend des facteurs qui ne possèdent qu'un seul domaine mais qui présentent plus d'homologies avec la famille des régulateurs transcriptionnels MarR, impliqués dans la réponse au stress et la virulence chez *E. coli* (Grove, 2013). Ce dernier groupe contient MgrA et SarZ.

Tous ces facteurs possèdent des fonctions de régulation qui interviennent dans les réseaux de régulation médiés par SarA et/ou *agr* (Cheung *et al.*, 2008) et sont présentés dans le **Tableau 1**.

Tableau 1. Facteurs de transcription (FT) de la famille Sar, chez *S. aureus*.

| FT | Fonction/régulation | Référence |
|-------------|---|--|
| SarA | Activateur et répresseur de transcription <i>agr</i> -dépendant ou <i>agr</i> -indépendant | (Cheung <i>et al.</i> , 1997) (Chien et Cheung, 1998) (Chien <i>et al.</i> , 1999) (Cheung <i>et al.</i> , 2004) |
| SarR | Répresseur de SarA Répresseur d' <i>agr</i> | (Manna et Cheung, 2001) (Reyes <i>et al.</i> , 2011) |
| SarT | Activateur de SarS Réprimé par SarA et <i>agr</i> ArtR réprime SarT | (Cheung <i>et al.</i> , 2004) (Xue <i>et al.</i> , 2014) |
| SarV | Réprimé par SarA et MgrA | (Cheung <i>et al.</i> , 2004) |
| SarX | Active sa propre expression Inhibe <i>agr</i> Activé par MgrA | (Manna et Cheung, 2006) |
| Rot | Autorégule sa propre transcription Répresseur des exotoxines, activateur de <i>spa</i> Réprimé par l'ARNIII | (Said-Salim <i>et al.</i> , 2003) (Geisinger <i>et al.</i> , 2006) (Boisset <i>et al.</i> , 2007) |
| SarS | Activateur de <i>spa</i> Répresseur de <i>hla</i> Réprimé par <i>agr</i> et SarA | (Tegmark <i>et al.</i> , 2000) |
| SarU | Active <i>agr</i> Réprimé par SarT | (Manna et Cheung, 2003) (Cheung <i>et al.</i> , 2004) |
| SarY | Fonction inconnue | / |
| MgrA | Active sa propre expression Activateur des gènes de la capsule Activateur des gènes de l'autolyse Activateur d' <i>agr</i> Activateur de SarX Répresseur de SarS Réprimé par RsaA | (Ingavale <i>et al.</i> , 2005) (Romilly <i>et al.</i> , 2012a) (Romilly <i>et al.</i> , 2014) (Luong <i>et al.</i> , 2006) |
| SarZ | Active <i>hla</i> | (Kaito <i>et al.</i> , 2006) |

De manière intéressante, la protéine nommée Tex (*Toxin Expression*) qui a fait l'objet de ma thèse, possède également le motif conservé HtH (Johnson *et al.*, 2008) propre aux facteurs de transcription Sar. Que sait-on de cette protéine ?

III/ Tex, une protéine multi-fonctionnelle ?

1. Tex serait impliquée dans la régulation de la transcription des toxines

1.1. *Tex régule négativement la transcription des toxines de Bordetella pertussis.*

La protéine Tex a été identifiée pour la première fois en 1996 dans la bactérie Gram négative *Bordetella pertussis*, qui est l'agent pathogène responsable de la coqueluche (Fuchs *et al.*, 1996). L'expression des facteurs de virulence de cet organisme est régulée au niveau transcriptionnel par le système à deux composants BvgAS. Le locus génétique *bvgAS* est instable puisque des mutations spontanées y apparaissent régulièrement et conduisent à son inactivation. En conséquence, la synthèse des gènes de virulence est inhibée (Monack *et al.*, 1989). Par ailleurs un autre type de mutation a été identifié, à l'origine d'une surexpression de la sous-unité α de l'ARN polymérase RpoA (Carbonetti *et al.*, 1993). La conséquence directe de cette surexpression est une baisse importante de la transcription des deux toxines majeures de cet organisme, la toxine pertussique (Ptx) et l'adénylate cyclase (CyaA), impliquées respectivement dans la colonisation des tissus respiratoires et l'évasion du système immunitaire. Ces mutations ont été localisées soit dans le facteur de transcription BvgA (Stibitz, 1994), soit dans la séquence Shine et Dalgarno de l'ARNm *rpoA* (Carbonetti *et al.*, 1994). Des mutants suppresseurs de la surexpression de la sous-unité α de l'ARN polymérase ont ensuite été recherchés (**Figure 6**) (Fuchs *et al.*, 1996). Grâce à cette stratégie, un nouveau locus génétique de nature inconnue a été caractérisé, portant la mutation responsable de cette surexpression. Des alignements de séquence ont été réalisés démontrant que ce locus était conservé entre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives. C'est de cette manière, que la protéine nommée Tex pour « *Toxin Expression* » a été ainsi identifiée. Les alignements de séquences ont révélé la présence de deux domaines fonctionnels, un domaine N-terminal homologue au répresseur du maltose MtlR d'*E. coli* (Figge *et al.*, 1994) et un domaine C-terminal homologue au domaine de fixation à l'ARN, le motif de type OB retrouvé dans la protéine ribosomique S1 (Bycroft *et al.*, 1997).

L'effet répresseur de Tex sur la transcription des toxines Cya et Ptx et la présence de domaines de liaisons aux acides nucléiques suggèrent que Tex agirait comme régulateur transcriptionnel de la synthèse des toxines. La fonction précise de la protéine n'a cependant pas été validée car sa délétion s'est révélée impossible, suggérant que Tex est essentielle pour *B. pertussis*.

Figure 6. Représentation schématique de la stratégie expérimentale adoptée par Fuchs *et al.* (1996) pour la recherche des gènes impliqués dans la régulation de l'expression de la sous-unité α de l'ARN pol (figure adaptée de Fuchs *et al.*, 1996).

L'étude porte sur deux souches de *B. pertussis*, BC75 et RPV3. La conséquence d'une surexpression de la sous-unité α de l'ARN polymérase conduit à un phénotype non hémolytique (HLY-). Après mutagenèse aléatoire, les mutants suppresseurs de cette surexpression ont été isolés sur la base de leur activité hémolytique, restaurée sur gélose au sang (HLY+). Ces mutants ont ensuite été transformés par les loci sauvages *rpoA* et *bvgA*, responsables de la mutation en cause de la surexpression. Trois groupes de mutants anti-suppresseurs ont alors été identifiés. Ceux dont l'activité hémolytique a été perdue suite à l'insertion de *rpoA* (type I), ceux dont l'activité hémolytique a été perdue suite à l'insertion de *bvgA* (type II) et ceux dont l'activité hémolytique est toujours présente, témoignant donc du fait que la mutation responsable de la surexpression d' α n'est portée ni par *rpoA*, ni par *bvg* mais par un troisième locus génétique (type III). Ces derniers ont alors été soumis à une complémentation par la librairie génomique de *B. pertussis* Tohama I (sur cosmide) dans le but d'identifier le locus génétique portant la mutation anti-suppresseur. Finalement, des expériences de mutagenèse par transposon ont été menées, pour identifier ce locus et caractériser sa séquence.

1.2. *Tex* régule positivement la transcription des toxines de *Clostridium perfringens*

Comme chez *B. pertussis*, un rôle de *Tex* comme régulateur de la synthèse des toxines a été mis en évidence dans la bactérie Gram-positif *C. perfringens* (He *et al.*, 2006). Des analyses par Northern blot ont révélé que l'expression de l'ARNm *tex* a lieu en début de phase exponentielle de croissance après 2 h de culture, de manière synchrone avec la synthèse des toxines de *C. perfringens*. Pour évaluer la fonction de *Tex* dans la virulence, une délétion du gène *tex* a été réalisée dans une souche de *C. perfringens*. Contrairement à l'étude menée sur *B.*

pertussis, la protéine Tex n'est pas essentielle pour la croissance de *C. perfringens*. Des expériences de Northern blot ont été réalisées dans les souches sauvage et mutée (Δtex) pour analyser l'effet de Tex sur la synthèse de 26 facteurs de virulence. Le taux des transcrits codant quatre toxines comprenant trois hyaluronidases (*nagH*, *nagJ*, *nagL*) et une exosialidase (*nanJ*) est diminué de deux fois dans la souche Δtex par rapport à la souche sauvage. Tex a donc un effet positif sur la transcription de ces quatre facteurs alors que la synthèse des autres facteurs de virulence reste inchangée. Enfin, cette étude a démontré que Tex se lie préférentiellement aux régions 5' UTR des quatre ARNm codant pour ces toxines. Etant donné l'effet positif de Tex sur leur transcription et sa capacité à se lier à ces régions, il a été postulé que la protéine agirait comme anti-terminateur de la transcription.

Ainsi, une fonction commune de régulation de l'expression des toxines par la protéine Tex a été établie entre deux bactéries distantes dans l'évolution, *B. pertussis* et *C. perfringens*. Dans le premier cas, Tex exerce une fonction de répresseur sur les toxines alors que dans le deuxième cas, Tex aurait une action d'activateur. Cependant, les mécanismes moléculaires précis de régulation ne sont pas définis et on ne peut pas exclure que ces régulations soient indirectes. De manière intéressante, cette fonction de Tex dans la virulence n'apparaît pas conservée dans toutes les bactéries pathogènes, comme décrit ci-dessous (He *et al.*, 2006).

2. Implication de Tex dans l'adaptation de *Streptococcus pneumoniae* à son environnement

Basé sur les précédentes études dans lesquelles il a été postulé que Tex pourrait agir comme régulateur transcriptionnel des gènes de toxines, plusieurs études se sont dans un premier temps intéressées à l'effet de la protéine sur la synthèse de pneumolysine, l'une des toxines majeures de *S. pneumoniae* (Hirst *et al.*, 2008; Paton *et al.*, 1993). Cette toxine possède des propriétés hémolytiques et cytolytiques par liaison au cholestérol présent sur les cellules eucaryotes (Alouf, 2000). Une souche délétée au niveau du gène Tex a été construite. L'activité hémolytique de la pneumolysine a ensuite été analysée sur boîte de gélose au sang dans les deux souches (sauvage et mutée) mais aucune différence n'a été constatée. L'effet de Tex sur la croissance et la virulence de *S. pneumoniae* a été analysée (He *et al.*, 2006). Aucun effet de Tex sur la croissance bactérienne n'a été observé. Cependant, lorsque les deux souches WT et Δtex ont été mises en compétition, un retard significatif de la croissance de la souche Δtex a été reportée. La virulence des deux souches a ensuite été testée dans deux modèles d'infection chez la souris où les bactéries ont été injectées soit de façon intra-veineuse (*i.v*) soit intra-péritonéale

(*i.p*) (He *et al.*, 2006). Dans ces conditions, le taux de mortalité des souris restait inchangé dans les deux souches. En revanche, après co-inoculation des deux souches, la souche mutante Δtex présentait un taux de mortalité plus rapide que la souche sauvage. Cette compétition entre les souches montre *in vivo* et *in vitro* que Tex exerce un contrôle fin sur l'expression des gènes et probablement sur les mécanismes d'adaptation. L'activité de liaison de Tex a ensuite été testée sur l'ADN génomique et un ARN riche en uridines se révélant positive pour chacun des deux types d'acides nucléiques.

Bien qu'il soit difficile d'associer Tex à une fonction précise, l'ensemble de ces études suggère un rôle de Tex dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans diverses fonctions, soit dans la virulence pour *B. pertussis* et *C. perfringens*, soit dans l'adaptation à l'environnement pour *S. pneumoniae*. La résolution de la structure cristallographique de la protéine a été élucidée chez *P. aeruginosa* (Johnson *et al.*, 2008) et supporte son rôle potentiel de régulateur. Par ailleurs, une conservation inattendue de sa structure chez les bactéries et les eucaryotes a été observée.

3. Analyse de la structure cristallographique de Tex chez *Pseudomonas aeruginosa*

3.1. La structure de la protéine Tex est modulaire

La résolution de la structure cristallographique de Tex chez *P. aeruginosa* (Johnson *et al.*, 2008) indique que la protéine est de forme allongée et majoritairement composée d'hélices α (53% d'hélices α , 10% de feuillets β). Cette structure combinée à l'alignement des séquences de protéines ont révélé quatre domaines de liaison aux acides nucléiques (**Figure 7A**): deux motifs conservés de fixation à l'ADN (HtH et HhH), un motif S1 de fixation aux ARN (*OB-fold domain*) et un motif YqgF de type « RNase H-like ». Ces différents motifs sont organisés autour d'une grande hélice α centrale, séparés en deux domaines distincts. L'un constitué de la proximité spatiale de HtH et HhH et l'autre de YqgF et S1 (**Figures 7B-7C**).

Figure 7. Structure de la protéine Tex (Figure tirée de Johnson *et al.*, 2008).

(A) Représentation de la séquence primaire de Tex avec les 4 domaines de liaison aux acides nucléiques: le domaine HtH de liaison aux ADN en simple brin (bleu), le domaine RNase H (YqgF) (rouge), le domaine HhH de liaison aux ADN doubles brins (jaune) et le domaine S1 de liaison aux ARN simples brins (vert). (B,C) Deux orientations de la structure cristallographique de Tex de *P. aeruginosa*. Les 4 domaines de fixation aux acides nucléiques sont de la même couleur qu'en (A).

Le domaine HtH (*Helix-turn-helix*) reconnaît le sillon majeur de l'ADN par l'implication d'une hélice α (Aravind *et al.*, 2005). Dans le cas de Tex, ce domaine est prédit pour interagir avec un ADN en simple brin, en raison de l'encombrement stérique lié à la grande taille de la protéine (86 kDa) (Johnson *et al.*, 2008). Ce domaine est par ailleurs parfaitement superposable avec l'hélicase à ADN Hel308 retrouvée chez les Archées. Cette hélicase joue un rôle dans la réplication de l'ADN en déroulant l'ADN en double brin et en utilisant l'hélice α_3 de son domaine HtH pour ne fixer qu'un seul des deux brins de l'ADN (Büttner *et al.*, 2007). La superposition des deux domaines HtH de chaque protéine suggère un mécanisme similaire pour Tex, dans lequel l'ADN en simple brin serait fixé sur HtH et se prolongerait à travers la cavité centrale de Tex (Figure 8).

Figure 8. Modèle proposé pour la fixation d'acides nucléiques au domaine Hth de Tex (figure tirée de Johnson *et al.*, 2008).

La structure de l'hélicase Hel308 d'Archée a été superposée à la structure de Tex (en gris), par alignement des domaines Hth (en bleu). La trajectoire de l'ADN simple brin lié à Hel308 se projette à travers la cavité centrale de Tex.

Le domaine YqgF ou « RNase H-like » est encore mal connu sur le plan fonctionnel mais est conservé dans de nombreux génomes bactériens (Aravind *et al.*, 2000; Ponting, 2002). Ce domaine est aussi trouvé dans la résolvasse RuvC, responsable de la résolution des jonctions Holliday lors de la recombinaison homologue (Aravind *et al.*, 2000; Bennett et West, 1995). Cependant Tex n'a pas d'activité nucléasique habituellement associé au motif YqgF, probablement en raison de l'absence d'un résidu carboxylate conservé qui est nécessaire à l'activité de coupure. On peut donc raisonnablement penser que la répression de la transcription des toxines de *B. pertussis* par Tex ne résulterait pas d'une activité nucléasique de la protéine.

Le domaine HhH (*Helix-hairpin-helix*) lie des ADN en double brin sans spécificité de séquence (Shao et Grishin, 2000). Tex possède deux motifs HhH adjacents, reliés par des interactions hydrophobes permettant de générer une seule unité compacte (HhH)₂. Ce motif est situé en surface de la protéine Tex, et serait donc accessible pour favoriser la reconnaissance de l'ADN en double brin.

Le domaine S1 est un motif encore appelé OB-fold (*oligonucleotides/oligosaccharides binding fold*) qui reconnaît les ARN en simple brin. Le motif OB a été identifié initialement chez la protéine ribosomique S1, impliquée dans l'initiation de la traduction chez les entérobactéries (Subramanian, 1983). Ce motif OB présente cinq feuillets β disposés de manière orthogonale et le site de liaison aux ARN se situe sur les feuillets β 2 et β 3 (Theobald *et al.*, 2003). Ce motif OB est retrouvé dans de nombreuses protéines des trois règnes du Vivant, qui reconnaissent les acides nucléiques en simple brins (Murzin *et al.*, 1995). Chez les eucaryotes, ces protéines interviennent dans le maintien de l'intégrité du génome. En effet, elles sont des points de contrôle dans des mécanismes centraux de la cellule tels que la réplication, la transcription, la traduction ou la réponse à un choc thermique (Theobald *et al.*, 2003). Chez les bactéries, ces protéines sont souvent multi-fonctionnelles. C'est le cas notamment de la protéine ribosomique S1, qui en plus de son implication dans l'initiation de la traduction, a été associée à d'autres processus, tels que la transcription (Hajnsdorf et Boni, 2012; Sukhodolets *et al.*, 2006), la

stabilité des ARN (Briani *et al.*, 2008; Delvillani *et al.*, 2011), la *trans*-traduction (Hajnsdorf et Boni, 2012) ou encore la réplication de l'ARN viral du phage Q β (Takeshita *et al.*, 2014). C'est donc un motif ubiquitaire des protéines ayant un rôle dans le métabolisme des ARN.

Chez *P. aeruginosa*, Tex se lie préférentiellement à des ARN en simple brin (sb) puisque les complexes ARNsb-Tex sont au moins 10 à 30 fois plus stables que les complexes impliquant des ARNdb ou ADN de mêmes tailles (25 nucléotides) (Johnson *et al.*, 2008). De manière surprenante, la délétion du domaine S1 abolit l'interaction avec les différents substrats étudiés qu'ils soient en simple brin ou en double brin (Johnson *et al.*, 2008). De plus, des mutations ponctuelles dans le motif OB altèrent fortement l'activité de liaison aux acides nucléiques. Ces données vont donc à l'encontre du modèle proposé dans la **Figure 8** d'une part et d'autre part, sont également en contradiction avec la présence d'autres domaines de fixation aux acides nucléiques proches dans l'espace, qui pourraient potentiellement intervenir dans leur fixation en absence du domaine S1. Ainsi, même si l'hypothèse d'un changement conformationnel suite à la délétion de S1 ou de mutations ponctuelles a été écartée par les données de purification et de cristallisation de la protéine dont le comportement reste inchangé (Johnson *et al.*, 2008), ce résultat pose donc des questions sur l'implication de S1 dans ces interactions.

De la même manière, la proximité spatiale de ces domaines de liaison aux acides nucléiques entre eux amène à se demander quelles sont les conséquences fonctionnelles de cette organisation et sur quelles cibles va agir la protéine (ADNdb, ARNdb, ADNsb, ARNsb ?).

3.2. Tex est l'orthologue structural de la protéine eucaryote Spt6

Une étude phylogénétique réalisée par Johnson *et al.* (2008) a révélé que Tex serait l'orthologue de la protéine eucaryote Spt6 (*suppressor of Ty6*) (**Figure 9**), identifiée initialement chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Clark-Adams *et al.*, 1987). Cette protéine, de localisation nucléaire (Swanson *et al.*, 1990), joue des rôles variés lors de la transcription.

La transcription des gènes chez les eucaryotes est un processus complexe et finement régulé. Cette régulation peut avoir lieu quelque soit la phase de transcription, mais prend place le plus souvent au moment de l'initiation. Lors de l'initiation de la transcription, l'ARNP II transcrit tout d'abord 20 à 60 nucléotides, puis dans certains cas, une pause de l'ARNP II est observée, qui empêche l'élongation complète du transcrit (Kwak and Lis, 2013). Cette forme de régulation transcriptionnelle a été observée pour un grand nombre de gènes chez les Mammifères et la Drosophile (Rasmussen *et al.*, 1993 ; Tang *et al.*, 2000 ; Rahl *et al.*, 2010 ; Buckley *et al.*, 2014). Il s'agit donc d'une étape limitante dans le processus de transcription, et la transition de cette étape à une élongation dite « productive » est également hautement régulée.

En effet, des modifications importantes prennent place sur le complexe formé par l'ARNP II et l'ARNm en cours de synthèse, qui permettent le recrutement de facteurs additionnels permettant l'élongation productive, ainsi que d'autres facteurs impliqués dans la maturation et l'export des ARNm. L'une de ces modifications est une phosphorylation du domaine C-terminal de l'ARNP II (CTD).

Le CTD de l'ARNP II est constitué d'un heptapeptide répété de séquence consensus Tyr¹-Ser²-Pro³-Thr⁴-Ser⁵-Pro⁶-Ser⁷, dont le nombre de répétitions varie selon l'espèce (Corden *et al.*, 1985 ; West and Corden, 1995). Au cours de la transcription, des changements de phosphorylation prennent place sur ce motif, qui régulent le recrutement des facteurs impliqués dans les différentes phases de la transcription ainsi que la maturation et l'export des ARNm (Meinhart *et al.*, 2005, Chapman *et al.*, 2007, Mayer *et al.*, 2012). De premières études ont ainsi mis en évidence l'existence d'un « code » reflétant l'état de phosphorylation du CTD de l'ARNP II tout au long de la transcription, essentiellement basé sur la phosphorylation de Ser² et Ser⁵ (Buratowski 2003 ; Engloff and Murphy, 2008). Dans ce modèle, Ser⁵ est tout d'abord phosphorylée (Ser⁵p) lors de l'initiation de la transcription, ce qui permet de recruter les enzymes nécessaires à l'ajout de la coiffe 7-méthylguanosine en 5' des ARNm, ainsi que certains facteurs de terminaison. Ser² est ensuite phosphorylée à son tour (Ser²p) et facilite le recrutement de facteurs d'élongation, et notamment la protéine Spt6 (Kaplan *et al.*, 2000 ; Engloff, 2008 ; Yoh *et al.*, 2007 ; Yoh *et al.*, 2008). Récemment, un nouveau modèle a été proposé, dans lequel le recrutement de Spt6 ne dépendrait plus uniquement de la phosphorylation de Ser², mais également de Tyr¹ (Mayer *et al.*, 2012). En effet, en conjugaison avec Ser²p, Tyr¹p empêcherait le recrutement des précédents facteurs de terminaison et stimulerait fortement celui des facteurs d'élongation dont Spt6, qui se lie préférentiellement à Tyr¹p (Mayer *et al.*, 2012).

Une fois l'étape de transcription productive atteinte, l'ARNP II progresse sur l'ADN où elle est confrontée à d'autres « barrières ». La présence de nucléosomes constitue une barrière naturelle à la transcription et perturbe donc fortement la synthèse du transcrit (Izban *et al.*, 1991 ; Petesch and Lis, 2008). Parmi les protéines intervenant pour faciliter l'élongation, Spt6 a la capacité d'induire des modifications de structure de la chromatine par interaction directe avec les histones H3 ou H4 (Bortvin *et al.*, 1996). Cette capacité de la protéine permettrait de désassembler le nucléosome en aval de l'ARNP II, puis de le réassembler en amont (Bortvin *et al.*, 1996, Hartzog *et al.*, 1998 ; Saunders *et al.*, 2006), facilitant alors la progression de la polymérase sur l'ADN cours de transcription. Ainsi, Spt6 aurait la capacité d'augmenter la processivité de l'ARNP II. Cependant, cette capacité ne se limite pas à la seule fonction d'histone chaperonne de Spt6, étant donné que la protéine est également capable d'augmenter cette

processivité sur de l'ADN nu dépourvu de nucléosomes, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Endoh *et al.*, 2004 ; Petesch and Lis, 2008 ; Aderhali *et al.*, 2009). De plus, par sa liaison à l'ARNP II, Spt6 serait également impliqué dans l'export des ARNm matures dans le cytoplasme (Yoh *et al.*, 2007 ; Yoh *et al.*, 2008 ; Diebold *et al.*, 2010b). Pour cela, une interaction de Spt6 est nécessaire avec la protéine Iws1 (Krogan *et al.*, 2002 ; Yoh *et al.*, 2007 ; Diebold *et al.*, 2010b), qui est elle-même liée au facteur d'export REF1/Aly. Il est intéressant de signaler qu'une délétion de la protéine Iws1 entraîne des anomalies au niveau de l'épissage des ARNm, ainsi que leur rétention dans le noyau cellulaire (Yoh *et al.*, 2007). Enfin, un rôle de Spt6 dans le contrôle qualité des ARNm a été mis en évidence chez la drosophile, où Spt6 co-localise avec des composants de l'exosome sur les sites actifs de transcription afin de dégrader les ARNm mal épissés (Andrulis *et al.*, 2002). Plus particulièrement, la sous-unité Rrp6 de l'exosome interagirait soit directement avec le facteur d'export REF1/Aly, soit avec la protéine Iws1 qui permettrait de lier le complexe formé par REF1/Aly et l'exosome à celui composé de Spt6 et de l'ARNP II (Andrulis *et al.*, 2002 ; Yoh *et al.*, 2007). Ainsi, Spt6 permettrait un couplage co-transcriptionnel entre élongation de la transcription, maturation et export des ARNm (Diebold *et al.*, 2010b). De manière intéressante, la protéine Tex de *P. aeruginosa* a été co-purifiée avec l'ARNP et le dégradosome, qui est la machinerie de dégradation des ARNm bactériens (Johnson *et al.*, 2008). Ceci qui pourrait suggérer l'implication de cette protéine dans le dialogue existant entre la transcription et la dégradation des ARNm.

Tex présente 27% de similarité avec Spt6 retrouvée essentiellement dans les motifs HtH, HhH, YqgF et S1 (Johnson *et al.*, 2008). La comparaison des structures cristallographiques des deux protéines montre que le corps central de Spt6 est très proche de la protéine Tex bactérienne (**Figure 9**). Cependant, la protéine Spt6 possède trois domaines additionnels, qui lui confèrent de nouvelles fonctions (Johnson *et al.*, 2008 ; Close *et al.*, 2011).

La première, située en N-terminal, intervient dans le remaniement de la chromatine au cours de la transcription. Ce domaine est aussi requis pour l'interaction avec la protéine Iws1, impliquée dans le recrutement de facteurs d'export des ARNm (**Figure 9C**). (Andrulis *et al.*, 2002 ; Yoh *et al.*, 2007 ; Diebold *et al.*, 2010b). Le second domaine additionnel de Spt6 est situé en C-terminal. Il s'agit du domaine SH₂, responsable de la liaison de Spt6 à l'extrémité C-terminale phosphorylée de l'ARNP II pour l'élongation de la transcription (**Figure 9C**) (Diebold *et al.*, 2010a ; Yoh *et al.*, 2007). Les motifs SH₂ sont largement retrouvés sur des protéines de signalisation eucaryotes. Près de 111 protéines possédant un domaine SH₂ ont été identifiées sur le génome humain, impliquées dans des systèmes de régulation pTyr-dépendants (Liu and Nash, 2012). Récemment, la structure de l'extrémité C-terminale de Spt6 a été résolue chez le

parasite intracellulaire *Antonospora locustae* (Diebold *et al.*, 2010a) et a révélé la présence de deux domaines SH₂ en tandem, tous deux nécessaires et suffisants pour la liaison de Spt6 à l'ARNP II. Enfin, Spt6 possède également un domaine DLD (*death-like domain*) (Figure 9C), qui chez les eucaryotes, est connu pour permettre les interactions entre protéines (Kwon *et al.*, 2012). Ce module est généralement retrouvé sur des protéines impliqués dans divers processus immunitaires tels que les réactions inflammatoires, l'apoptose ou encore la nécrose (Martinon *et al.*, 2001 ; Park *et al.*, 2007 ; Kwon *et al.*, 2012). Chez Spt6, il s'agit du domaine le plus conservé retrouvé sur la protéine. Il est donc probable qu'il intervienne dans des interactions intermoléculaires importantes (Close *et al.*, 2010).

Contenu soumis au droit d'auteur

Figure 9. Comparaison des structures de Tex et Spt6 (Figure adaptée de Johnson *et al.*, 2008 et Close *et al.*, 2010).

(A) Représentation de la séquence primaire de Tex avec les 4 domaines de liaison aux acides nucléiques: le domaine Hth de liaison aux ADN en simple brin (bleu), le domaine RNase H (YqgF) (rouge), le domaine HhH de liaison aux ADN doubles brins (jaune) et le domaine S1 de liaison aux ARN simples brins (vert). (B) et (C) Comparaison schématique de l'organisation des domaines de Tex (B) et Spt6 (C). Les 4 domaines de fixation aux acides nucléiques de Tex sont de la même couleur qu'en (A). L'organisation de ces domaines est conservée chez Spt6 (Hth en bleu, YqgF en orange foncé, HhH en jaune et S1 en vert foncé), qui possède en plus trois domaines additionnels: un domaine de liaison au nucléosome et à la protéine Iws1 en N-terminal (vert clair) (Diebold *et al.*, 2010b), un domaine SH₂ en C-terminal (orange clair) qui interagirait avec l'ARN polymérase (Diebold *et al.*, 2010a; Johnson *et al.*, 2008) et un domaine DLD, potentiellement impliqués dans des interactions intermoléculaires importantes (Close *et al.*, 2010).

Malgré la présence de domaines additionnels sur Spt6, on constate une conservation étonnante du cœur des structures de Spt6 et Tex. On peut ainsi émettre l'hypothèse que Tex, comme Spt6, pourrait exercer un rôle clé dans la régulation de l'expression des gènes et dans les couplages transcription-traduction-dégradation, chez les procaryotes.

Objectifs

Au commencement de ce projet, aucune indication n'était disponible quant à la fonction de la protéine Tex chez *S. aureus*. Seules les études réalisées sur les autres organismes bactériens (Introduction § III) indiquaient une fonction possible de Tex au niveau de la régulation de l'expression des facteurs de virulence (chez *B. pertussis*, Fuchs *et al.*, 1996 et chez *C. perfringens*, Abe *et al.*, 2010) de l'adaptation du pathogène à son environnement (*S. pneumoniae*, He *et al.*, 2006) ou du métabolisme des ARN (*P. aeruginosa*, Johnson *et al.*, 2008). Cependant, le travail de mes prédécesseurs (Thomas Geissmann, en collaboration avec Alain Jaquier, Institut Pasteur, Paris), ont permis de formuler une première hypothèse sur la fonction de Tex dans la régulation par les ARN chez *S. aureus*. En effet, ces derniers ont mené des expériences de chromatographie d'affinité, dans le but d'identifier les protéines interagissant avec l'ARNIII, qui est l'effecteur intracellulaire du système de densité cellulaire (Novick *et al.*, 1993). Dans ces expériences, l'ARNIII biotinylé à son extrémité 3' a été fixé à une matrice de streptavidine, puis incubé avec un extrait brut de *S. aureus*. Les protéines ont été éluées par un gradient de concentration croissant en sel révélant deux protéines éluées aux fortes concentrations salines: l'endoribonucléase III (RNase III), qui est requise pour la dégradation des ARNm réprimés par l'ARNIII (Boisset *et al.*, 2007; Chevalier *et al.*, 2010; Huntzinger *et al.*, 2005) et la protéine Tex. L'existence de ces deux protéines liées à cet ARN régulateur n'est pas sans rappeler que chez les Enterobacteries, les ARN régulateurs sont souvent associés à des co-facteurs protéiques. Il me semblait important ici de mentionner la protéine chaperone nommée Hfq. Cette protéine exerce de multiples fonctions selon le sARN. Elle protège les ARN contre la dégradation, modifie la structure secondaire du sARN et/ou de l'ARNm cible pour favoriser l'interaction des deux partenaires (Vogel et Luisi, 2011) ou augmente la concentration locale des deux ARN en permettant la liaison simultanée du sARN à l'ARNm cible pour former un complexe ternaire transitoire (Storz *et al.*, 2004). Dans ces mécanismes de répression, le complexe ARN-Hfq recrute une machinerie protéique complexe, comprenant notamment la RNase E, qui dégrade rapidement l'ARNm cible pour conduire à une répression irréversible (**Figure 10**). (Vogel et Luisi, 2011). Dans d'autres cas, la protéine Hfq peut elle-même jouer le rôle de répresseur en étant recrutée directement sur le site d'initiation de la traduction après fixation de l'ARNs sur son ARNm cible (Desnoyers et Massé, 2012).

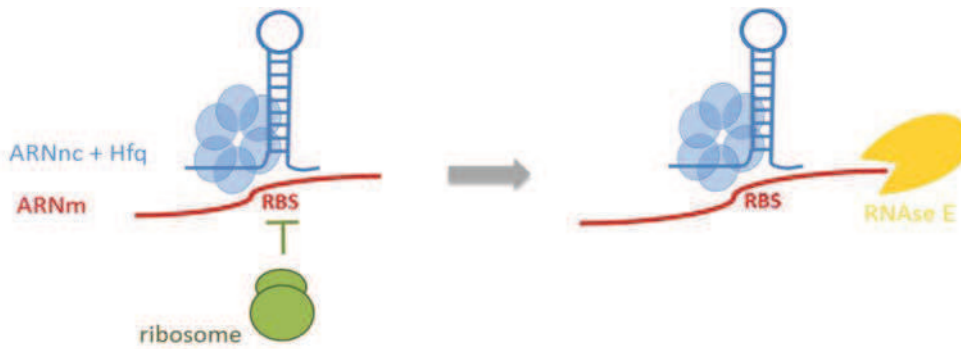


Figure 10. Mécanisme de répression possible d'ARNm par les ARN régulateurs d'*E. coli*, médié par la protéine Hfq (figure adaptée de Vogel et Luisi, 2011).

L'ARN régulateur (bleu) associé à la protéine Hfq (violet) se fixe au site de liaison du ribosome (rbs, rouge), inhibant l'initiation de la traduction et conduisant à la dégradation du message cible par la RNase E (jaune).

Alors que Hfq est un co-facteur essentiel des sARN chez *E. coli*, chez *S. aureus* cette protéine n'est pas requise pour la régulation de l'expression des gènes par l'ARNIII et n'est pas essentielle pour la croissance bactérienne (Bohn *et al.*, 2007; Huntzinger *et al.*, 2005). Cependant, le rôle de Hfq chez cet organisme reste ambigu selon la souche de *S. aureus* étudiée. La délétion de Hfq dans la souche clinique NCTC 8325 altère l'expression de plus de 110 gènes et son inactivation cause une diminution de la virulence de la souche mutée par rapport à la souche sauvage (Liu *et al.*, 2010).

Ainsi je me suis posée les questions suivantes : quelle est la protéine qui pourrait se substituer à Hfq ? Ne pourrait-il pas exister plusieurs protéines qui pourraient participer à ces régulations en interagissant avec des classes particulières d'ARN ? Par exemple, CsrA et Hfq sont deux protéines chez *E. coli* qui interviennent dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes en reconnaissant des signatures différentes des ARN (Holmqvist et Vogel, 2013). Sachant que Tex de *S. aureus* possède des domaines de fixation à l'ARN et reconnaît l'ARNIII, il me semblait que Tex pouvait être un acteur potentiel de la régulation post-transcriptionnelle.

C'est pourquoi les objectifs de ma thèse ont été principalement focalisés sur la protéine Tex afin (i) d'élucider la signature de Tex sur les ARN, (ii) d'identifier les co-facteurs et cibles, et l'ensemble des fonctions régulées par Tex et (iii) analyser les mécanismes de régulation au niveau moléculaire. J'ai ainsi utilisé et mis au point un ensemble d'approches complémentaires *in vivo* et *in vitro*. Au cours de ma thèse j'ai aussi participé à l'introduction d'une nouvelle approche protéomique qui permet de suivre les changements de la surface bactérienne en réponse à la régulation par les sARN. Ce travail de collaboration publié dans Biochimie, est présenté en annexe II.

Résultats & Discussion

I/ Stratégie expérimentale

1. Présentation de la stratégie expérimentale adoptée pour mon projet de thèse

Afin de déterminer la fonction de Tex chez *S. aureus*, une stratégie expérimentale a été mise en place qui s'articule autour de trois grands axes de recherche (**Figure 12**), réunissant les aspects *in vitro* et *in vivo*.

Dans un premier temps, je me suis intéressée aux interactions Tex-ARN. Comme décrit précédemment, Tex a été purifiée comme ligand potentiel de l'ARNIII, effecteur intracellulaire du système de densité cellulaire *agr* (Objectifs). Il était donc tout d'abord nécessaire de comprendre comment Tex se lie à cet ARN. Cette étude s'est étendue à d'autres ARN non codants identifiés dans l'équipe (RsaA, RsaE) qui comme l'ARNIII (**Figure 11A**), régulent l'expression de divers ARNm au niveau post-transcriptionnel par un mécanisme de type antisens. Les fonctions de RsaE et RsaA ont été élucidées dans l'équipe (Geissmann *et al.*, 2009; Romilly *et al.*, 2014). Alors que RsaE se retrouve dans tous les staphylocoques et le genre Bacillaceae, RsaA est spécifique à *S. aureus*. RsaE interagit avec l'ARNm *sucC* codant la succinyl-CoA synthétase (**Figure 11B**) et l'ARNm *opp3A* codant un transporteur ABC pour réprimer leur traduction. Cet ARN coordonne la répression de nombreuses enzymes du métabolisme central (cycle TCA, folate) lorsque les sources carbonées s'épuisent (Bohn *et al.*, 2010; Geissmann *et al.*, 2009). De récents travaux effectués en collaboration avec Ciaran Condon (IBPC, Paris) suggèrent que RsaE serait induit par le système à deux composants SrrAB qui répond à l'anaérobiose et à la synthèse des radicaux NO (Durand *et al.*, données non publiées). RsaA appartient au réseau de régulation de la virulence dépendant du facteur de transcription Sigma B. C'est un produit de maturation d'un ARN long de 276 nts, qui réprime la traduction d'un régulateur majeur de la transcription, MgrA (**Figure 11C**). En régulant la synthèse de MgrA, RsaA stimule la formation des biofilms et inversement, réprime la synthèse de la capsule qui est nécessaire pour protéger la bactérie contre la phagocytose par les macrophages. Cet ARN agirait comme un atténuateur de la virulence, en particulier des infections aiguës (Romilly *et al.*, 2014).

La structure secondaire des trois ARN (ARNIII, RsaA, RsaE) a été établie, révélant des signatures communes et spécifiques à chacun d'eux. Ces ARN contiennent une séquence conservée en simple brin riche en cytosines qui s'est avérée être le point d'ancrage pour interagir avec la séquence Shine et Dalgarno des ARNm cibles (**Figure 11**). Par ailleurs, RsaA possède une région interhélicoidale riche en adénines et uraciles (**Figure 11C**), alors que cette région est

riche en pyrimidines dans RsaE (Figure 11B).

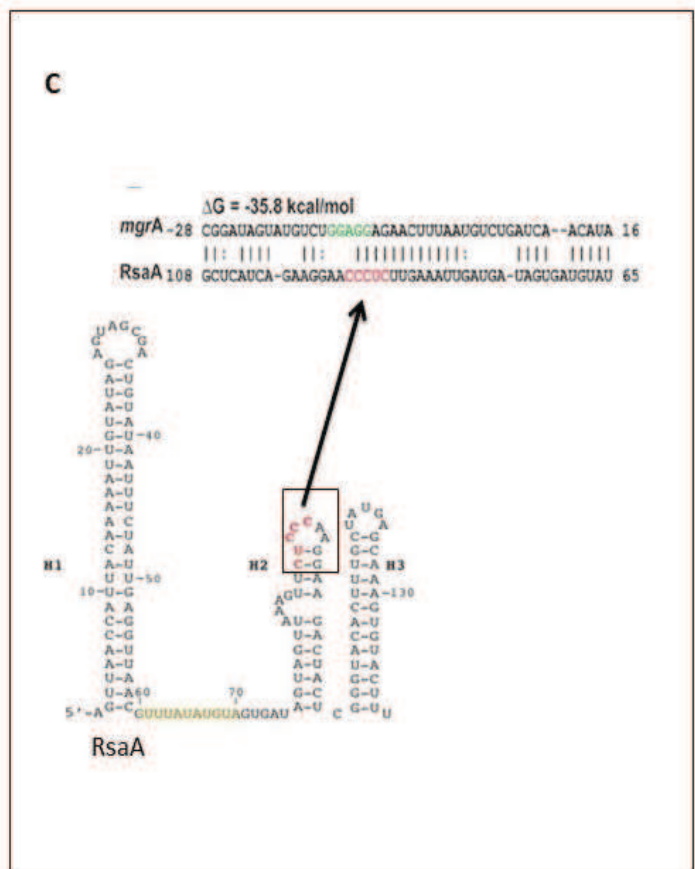
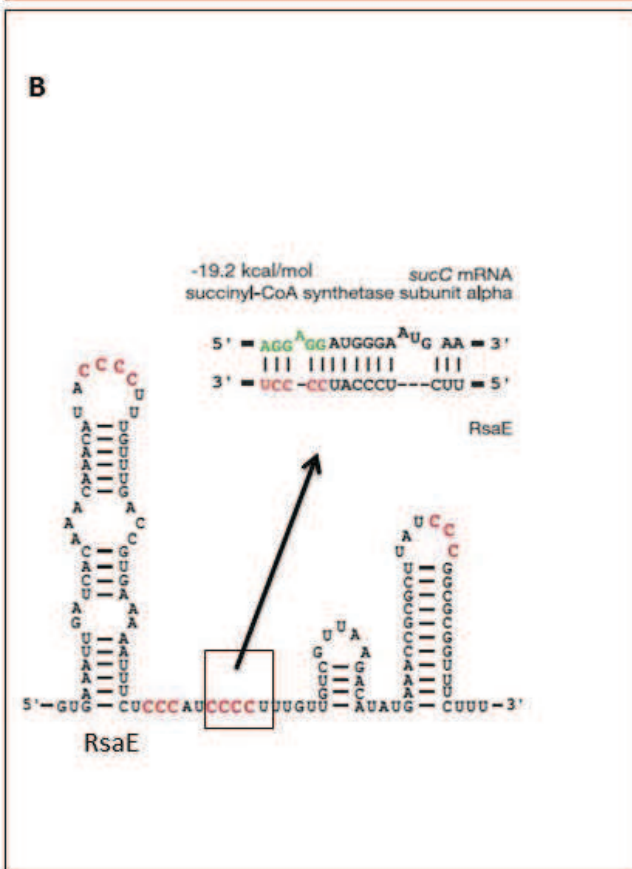
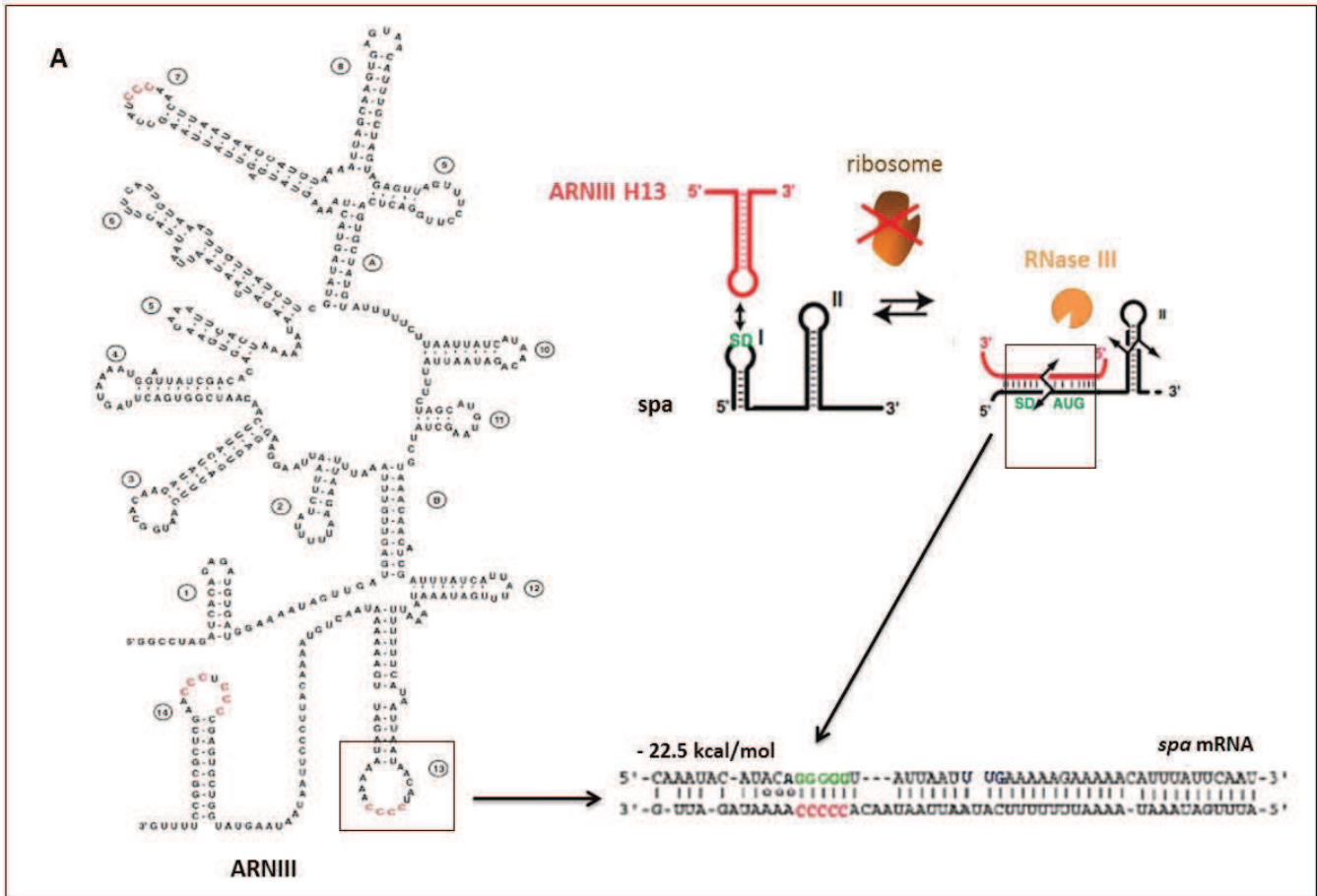


Figure 11. Répression post-transcriptionnelle par les ARN non codants de *S. aureus* (figure adaptée de Huntzinger *et al.*, 2005, Geissmann *et al.*, 2009 et Romilly *et al.*, 2014).

(A) A gauche, structure secondaire de l'ARNIII (Benito *et al.*, 2000). Les motifs riches en C sont indiqués en rouge. L'ARNIII se fixe à son ARNm cible *spa* grâce au motif riche en C situé sur la tige-boucle 13 (en encadré sur la structure). L'appariement est initié entre les boucles apicales des deux ARN au niveau de la séquence Shine et Dalgarno de *spa* (vert), puis s'étend pour former un double brin qui sera ensuite spécifiquement dégradé par la RNase III de *S. aureus* (schématisé en haut à droite, adapté de Boisset *et al.*, 2007) (Introduction, § II. 1). Les appariements de séquence ainsi que l'énergie libre de liaison sont indiqués en bas à droite (adapté de Huntzinger *et al.*, 2005). (B) et (C) Mécanismes de répression de type antisens impliquant le motif riche en C (rouge) de RsaE (B) ou RsaA (C) et la séquence Shine et Dalgarno (vert) de leurs cibles respectives *sucC* et *mgrA* (adapté respectivement de Geissmann *et al.*, 2009 et de Romilly *et al.*, 2014). Le motif riche en A/U de RsaA est indiqué en jaune. Les appariements de séquence potentiels ainsi que les énergies libres de liaison sont également indiquées pour chaque duplexe RsaA-*mgrA* et RsaE-*sucC*.

Dans un deuxième temps, j'ai entrepris l'analyse de la fonction de Tex *in vivo*, par la construction de souches mutantes de la protéine, grâce au système TargeTron® (*Sigma-Aldrich*), qui permet l'obtention de mutants conditionnels. J'ai ainsi pu réaliser quelques tests phénotypiques, qui m'ont donné des pistes pour la fonction de Tex chez *S. aureus*.

Enfin, le troisième axe de mon projet a consisté à déterminer quels sont les ligands potentiels de Tex. Pour ce faire, une étiquette FLAG a été insérée en C-terminal du gène *tex* sur le génome, puis des expériences d'immunoprécipitation ont été réalisées afin de déterminer quels sont les ARN et les protéines partenaires de Tex. Les protéines retenues avec Tex ont été analysées par des techniques de protéomique. Les ARN qui n'ont pas encore été analysés, le seront par séquençage à haut débit (technologie Illumina).

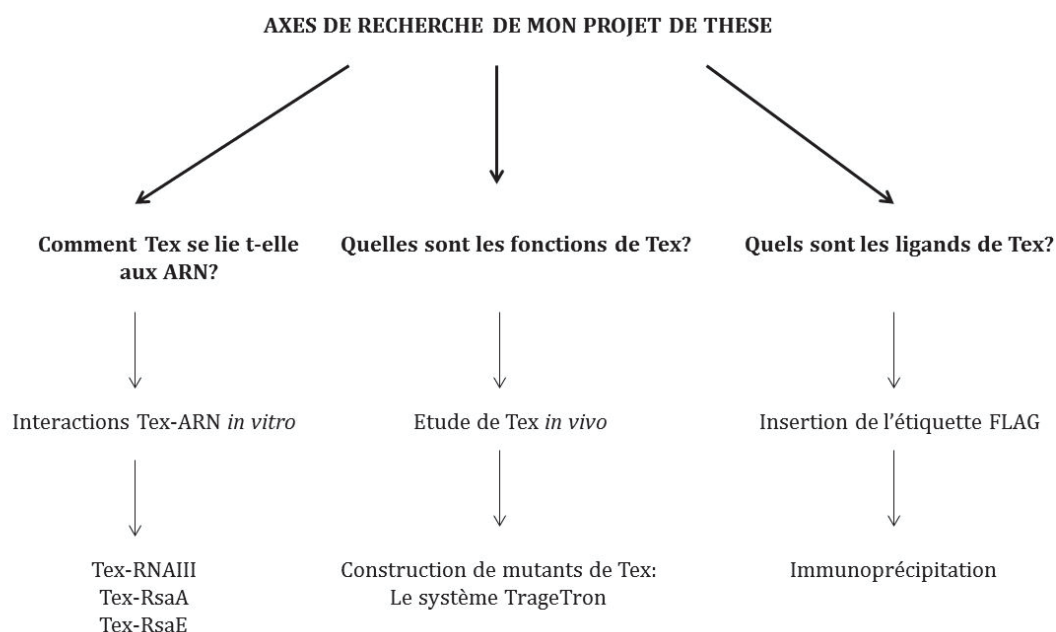


Figure 12. Présentation schématique de la stratégie expérimentale utilisée pour mon projet de thèse.

2. Etablissement du protocole de purification de Tex

Ayant passé une partie non négligeable de ma thèse à mettre au point le protocole de purification de Tex, il me semblait important de développer le cheminement expérimental qui a conduit à l'obtention d'une protéine pure et soluble.

Le gène *tex* a été cloné initialement dans le vecteur pQE30 (*Qiagen*) dans l'équipe de F. Vandenesch (Lyon), permettant la synthèse d'une protéine de fusion portant une étiquette de 6 histidines à son extrémité C-terminale. J'ai ensuite effectué toutes les étapes suivantes. Tex a tout d'abord été surproduite dans les cellules M15 d'*E. coli* après induction à l'IPTG. Après une première chromatographie d'affinité Ni²⁺-NTA (billes Ni²⁺-NTA agarose, *Qiagen*), la protéine retenue par ses 6 histidines a été éluée par l'imidazole, un analogue de l'histidine. Etant donné la présence de nombreux contaminants néanmoins en quantités faibles, j'ai utilisé une deuxième étape chromatographique qui est une colonne échangeuse d'anions (MonoQ 5/50 GL couplée à une HPLC, *GE Healthcare*). Cette étape a non seulement éliminé la plupart des protéines contaminantes, mais aussi les acides nucléiques (Matériel & Méthodes § III. 1).

A mon arrivée dans le laboratoire, j'ai tout d'abord amélioré le protocole de purification car des problèmes de solubilité de la protéine étaient rencontrés de manière récurrente. Sachant que Tex se retrouvait dans les corps d'inclusions à 37°C, j'ai testé différents temps et températures d'induction, pour finalement choisir une induction à 18°C pendant la nuit. Cette baisse de température ralentit le métabolisme d'*E. coli* et évite une surproduction trop importante de la protéine conduisant à son accumulation dans les corps d'inclusion. La concentration en KCl a été un autre facteur déterminant pour éviter que la protéine ne précipite lors de la dialyse précédant l'étape de purification sur MonoQ. C'est pour cela que j'ai maintenu tout au long de la purification une concentration en KCl d'au moins 100 mM. Enfin, j'ai également constaté qu'au-delà d'un certain seuil de concentration correspondant à 1 mg/ml de Tex après élution sur colonne au nickel, la protéine précipitait au cours de la dialyse quelle que soit la concentration de KCl utilisée. Pour cette raison, j'ai augmenté de trois fois le volume d'élution de Tex sur colonne au nickel pour maintenir la protéine à une concentration inférieure à 1 mg/ml. Pour la conserver après purification, j'ai utilisé une concentration en KCl de 500 mM.

Malgré les modifications apportées, la purification de la protéine restait problématique, dû à ce phénomène d'agrégation persistant. L'hypothèse que j'ai alors émise était liée à la position de l'étiquette de 6 histidines placée à l'extrémité C-terminale de la protéine, qui peut induire des perturbations de la structure et/ou modifier ses propriétés. J'ai donc recloné le gène *tex* dans le même vecteur, mais avec l'étiquette His placée en N-terminal du gène. Par cette

dernière étape et en conservant les précédentes modifications apportées au protocole, j'ai ainsi résolu les problèmes d'agrégation et obtenu une protéine soluble et homogène. Après chaque purification, j'ai contrôlé l'homogénéité des protéines en solution par diffusion dynamique de la lumière (*Dynamic Light Scattering, DLS*) (**Figure 13**). Cette méthode permet de mesurer la taille mais aussi la distribution de particules de tailles différentes de l'ordre du nanomètre, en solution. Brièvement, l'échantillon est placé dans un dispositif optique dans lequel il est soumis à un rayonnement laser. Les variations d'intensité du rayonnement laser diffusé par les particules sont ensuite mesurées au cours du temps grâce à un système informatique relié au dispositif optique. Plus ces variations sont rapides, plus les particules se déplacent vite dans l'échantillon et donc plus elles sont de petite taille. Après plusieurs séries de mesures, le logiciel *Zetasizer* (*Malvern Instruments*) représente les données sous la forme d'un graphique, avec l'intensité relative de la lumière diffusée par les particules en pourcentage en fonction de la taille des particules en nanomètres. Le rayon hydrodynamique des particules est dérivé de l'équation de Stokes-Einstein : $R_H = k_B T / 6\pi\eta D_T$ où k_B désigne la constante de Boltzmann, η la viscosité du fluide, D_T le coefficient de diffusion, et R_H le rayon hydrodynamique. Cette équation permet de corrélérer les fluctuations d'intensité de la lumière diffusée avec la taille de la particule et son coefficient de diffusion. La présence d'un pic monodisperse sur le graphe indique la présence d'un seul type de particules en solution, d'une taille homogène. A l'inverse, la présence de multiples pics sur le graphe indique la présence de particules hétérogènes de tailles variées, pouvant correspondre à des agrégats.

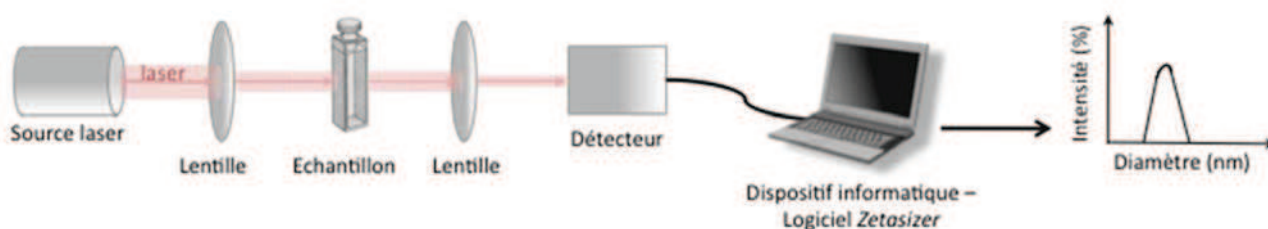


Figure 13. Schéma simplifié du dispositif de mesure DLS.

3. Etablissement du protocole de purification des ARN

Pour la purification de l'ARNIII, la méthode classique de transcription *in vitro* a été utilisée après linéarisation du plasmide portant l'ADN correspondant, suivie d'une purification sur gel de polyacrylamide 8% dénaturant.

Pour les autres ARN de petite taille utilisés au cours de cette étude (RsaA, RsaE, et autres motifs d'une taille inférieure à 20 nucléotides), nous avons fait appel à la société IDT, chez qui ils ont été produits par synthèse chimique puis purifiés sur colonne HPLC (www.idtdna.com).

4. Les stratégies pour analyser *in vitro* l'interaction de Tex à l'ARN

Diverses techniques complémentaires *in vitro* ont été mises en œuvre afin de délimiter les motifs de reconnaissance de Tex sur les ARN.

Les expériences de cartographie en solution ont été effectuées sur l'ARNIII et RsaA pour analyser les empreintes de la protéine et les éventuels changements de conformation. L'accessibilité des nucléotides des ARN à différentes sondes enzymatiques a été analysée sur l'ARN seul ou fixé à la protéine. L'hydrolyse enzymatique est réalisée dans des conditions dites statistiques de manière à obtenir moins de une coupure par molécule. J'ai utilisé la RNase T1 qui reconnaît et coupe les guanines en simple brin, la RNase T2 qui coupe les régions en simple brin (A >> G, C, U) et la RNase V1 qui coupe dans les régions hélicoïdales. Pour la détection des coupures obtenues sur l'ARNIII, deux méthodes ont été employées (**Figure 14**). La première utilise l'ARNIII marqué radioactivement à son extrémité 5', permettant l'analyse de ses 150 premiers nucléotides (**Figure 14A**). La deuxième approche, qui utilise l'extension d'amorce marquée en 5' par la reverse transcriptase, n'a pas de limite de taille de l'ARN (**Figure 14B**). Pour l'analyse de l'empreinte de Tex sur RsaA, seule l'approche directe dans laquelle RsaA a été marqué à son extrémité 5', a été utilisée. Dans ce dernier cas, l'expérience a été menée avec la RNase T2 uniquement, car il avait été montré par Romilly *et al.* (2014) que celle-ci induit des coupures dans la région inter-hélicoïdale et les boucles apicales de RsaA. Ces expériences ont permis de délimiter les régions d'interaction pour les deux ARN et de caractériser un motif conservé riche en A/U.

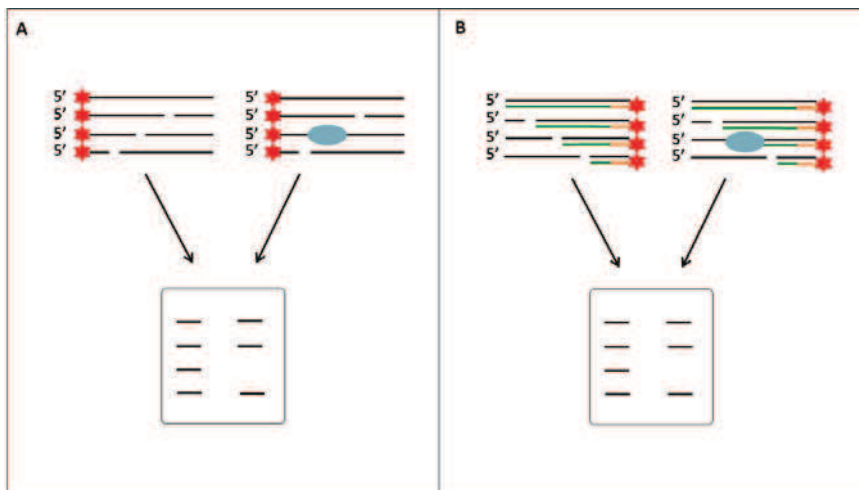


Figure 14. Principe de la cartographie en solution.

L'ARN complexé ou non à la protéine Tex, est soumis à une hydrolyse enzymatique dans des conditions dites statistiques. La fixation de Tex (bleu) peut protéger certaines régions de l'ARN contre les RNases. Les coupures seront visualisées après électrophorèse des fragments d'ARN sur un gel SDS-PAGE en conditions dénaturantes. Deux méthodes de détection des coupures ont été utilisées. **(A)** Dans la méthode directe, l'ARN est marqué radioactivement en 5' et les fragments coupés sont directement fractionnés sur gel. **(B)** Dans la méthode indirecte, l'ARN utilisé n'est pas marqué. Après hydrolyse enzymatique, un oligonucléotide marqué en 5' (orange) est hybridé à l'ARN et la reverse transcriptase (RT) AMV est utilisée pour synthétiser les fragments d'ADN complémentaires (vert). La RT s'arrête au niveau des coupures induites dans l'ARN. La comparaison des profils de coupures sur l'ARN seul et complexé à la protéine permet d'analyser les changements induits par la fixation de la protéine (protection ou augmentation de coupure).

Pour suivre la formation des complexes et évaluer leur stabilité et la spécificité, j'ai utilisé plusieurs méthodes complémentaires.

Des expériences de gel retard ont été effectuées sur l'ARNIII, RsaA et RsaE (marqué au P^{32} à leur extrémité 5') dans lesquelles les complexes Tex-ARN sont formés à 20°C en présence de concentrations croissantes de Tex, puis sont séparés de l'ARN seul sur gel de polyacrylamide 5% contenant 2 mM de magnésium. Ayant rencontré des difficultés pour séparer les complexes, j'ai aussi utilisé deux autres approches, la filtration sur nitrocellulose et la spectroscopie de fluorescence, qui a été réalisée en collaboration avec S. Bernacchi (IBMC, Strasbourg).

La filtration sur nitrocellulose consiste à ajouter des concentrations croissantes de Tex ou de Tex délété de son domaine S1 (Tex Δ S1) à l'ARN RsaA marqué en 5'. L'ARN fixé à la protéine est alors retenu sur la membrane de nitrocellulose alors que l'ARN libre passe au travers du filtre, permettant ainsi de mesurer le pourcentage d'ARN fixé à la protéine.

La spectroscopie de fluorescence exploite la fluorescence intrinsèque de la protéine, générée après excitation des groupements aromatiques des tryptophanes, tyrosines ou phénylalanines. Ces acides aminés (aa) peuvent potentiellement être masqués lors de la liaison de l'ARN s'ils sont localisés proches ou dans le site de liaison, ou suite à un changement conformationnel de la protéine induit par la fixation de l'ARN. Cette méthode a l'avantage d'être

simple à mettre en place et permet de caractériser les paramètres de liaison des complexes protéines-acides nucléiques.

Etant donné la grande majorité de tyrosines dans la protéine Tex par rapport aux tryptophanes et aux phénylalanines, nous avons choisi de mener l'expérience en suivant le signal d'émission des résidus tyrosines. Pour cela, la source UV du spectrofluorimètre a été utilisée pour exciter les tyrosines à 275 nm (longueur d'onde maximale d'absorption de la tyrosine). Les tryptophanes étant également excitables à cette longueur d'onde, ont également été excités. Après ajout de quantités croissantes d'ARN à une quantité fixe de Tex, j'ai enregistré et évalué l'intensité de fluorescence pour chaque spectre enregistré entre 300 et 350 nm, corrigé les données par la fluorescence du tampon et par l'effet de dilution, pour finalement représenter la variation du signal de fluorescence en fonction de la concentration en protéine. Après normalisation, les données du graphe ont été traitées par le modèle mathématique de Scatchard (Scatchard, 1949) à l'aide du logiciel Origin 7 (*OriginLab*), qui génère les paramètres de liaison comprenant la constante de dissociation, la coopérativité de liaison et la stoechiométrie du complexe.

5. Les stratégies pour analyser les fonctions de Tex *in vivo*

Afin de comprendre la fonction de Tex *in vivo*, j'ai construit deux mutants du gène *tex* dans les souches RN6390 et HG001, par l'utilisation du système TargeTron® (*Sigma-Aldrich*). Dans ce système, un intron autocatalytique de groupe II "LI. LtrB" provenant de *Lactococcus lactis*, est utilisé pour s'insérer de manière site-spécifique dans la séquence génomique du gène à inactiver. Par cette méthode, on exploite l'activité ribozyme de cet intron qui s'insère au niveau de la séquence ADN cible grâce à la protéine LtrA, une transcriptase inverse. Après insertion de l'intron, la protéine LtrA génère l'ADN complémentaire et les enzymes de réparation de l'hôte interviennent pour créer une insertion permanente. Ce système permet d'obtenir des mutants conditionnels puisque l'intron peut être excisé à température permissive par la protéine LtrA (**Figure 15**) (Yao *et al.*, 2006).

Ce système original a été mis en place dans l'équipe suite aux difficultés rencontrées lors de l'inactivation de gènes par recombinaison homologue chez *S. aureus*. Pour le caractère original et innovant de la méthode au moment où j'ai repris le projet, j'ai choisi d'en décrire le principe dans cette partie de mon manuscrit. Dans un premier temps, la séquence du gène *tex* a été soumise à un algorithme informatique afin de définir les meilleurs sites candidats pour l'insertion de l'intron. Par ailleurs, l'intron doit aussi être modifié pour générer un appariement

optimal avec les séquences cibles du génome bactérien. Ceci est réalisé par PCR après sélection des oligonucléotides appropriés. Au moment de choisir le site d'insertion de l'intron, deux possibilités existent: l'insertion peut être réalisée soit sur le brin sens du gène à inactiver, soit sur le brin antisens de ce même gène. Dans le premier cas, l'intron transcrit sera fonctionnel et pourra potentiellement être excisé par la protéine LtrA, restaurant la séquence du gène de départ et conduisant ainsi à une mutation conditionnelle. Dans le deuxième cas, la séquence transcrite sera complémentaire à l'intron et donc non fonctionnelle et ne pourra pas être excisée par LtrA. Nous ne sommes donc plus ici dans le cadre d'une mutation conditionnelle. N'ayant aucune information concernant le caractère essentiel de *Tex* chez *Staphylococcus aureus*, j'ai choisi d'effectuer cette insertion sur le brin sens du gène, de façon à pouvoir générer un mutant conditionnel si le gène *tex* se révélait être essentiel.

L'intron modifié au niveau des séquences d'insertion a ensuite été cloné en aval d'un promoteur inductible au cadmium dans le vecteur pNL9164 (dérivé de pCN39 de *S. aureus*, Charpentier *et al.*, 2004) qui possède une origine de répllication thermosensible. Des cellules de *S. aureus* ont été transformées avec ce plasmide par électroporation, puis la transcription de l'intron a été induite au chlorure de cadmium à 30°C. Afin d'éviter l'excision ou la remobilisation de l'intron ainsi inséré, le plasmide thermosensible doit ensuite être éliminé afin d'éviter l'expression de la protéine LtrA. C'est pourquoi, les cellules sont exposées à une température de 43°C. Deux résultats possibles peuvent alors être obtenus: (i) la croissance des cellules possédant l'intron dans leur génome à cette température indique que le gène inactivé n'est pas essentiel ou (ii) l'absence de cellules sur milieu gélosé en boîte témoigne du caractère essentiel du gène inactivé.

Dans le cas de *tex*, cette mutation a été introduite en N-terminal à la position 404 et juste avant le domaine S1 en C-terminal, à la position 2001 (**Figure 15**). L'intron étant composé d'un grand nombre de codons stop, l'insertion à la position 404 devrait aboutir à la synthèse d'une protéine tronquée inactive, voire à l'absence de sa synthèse. Nous appellerons ce mutant « Δ Tex » dans la suite du texte. Dans le deuxième cas, nous devrions générer l'équivalent d'une protéine délétée de son domaine S1 de fixation aux ARN, que nous nommerons « Tex Δ S1 ». L'insertion correcte des introns a ensuite été vérifiée par des expériences de Northern blot.

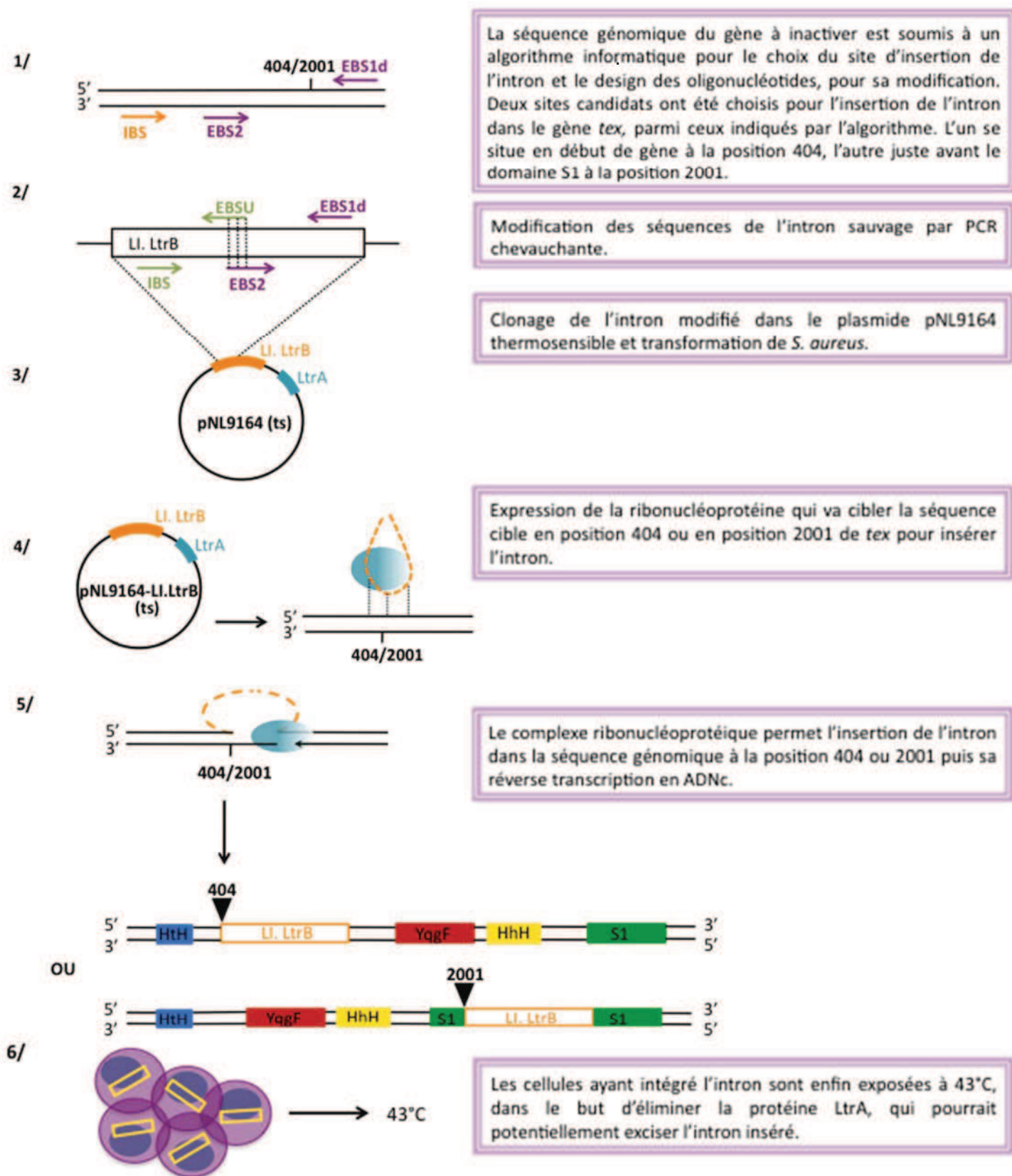


Figure 15. Résumé du protocole de construction des mutants conditionnels par le système Targetron® (adapté de Sigma-Aldrich).

L'insertion à la position 404 en N-terminal génèrera soit une protéine tronquée contenant uniquement le domaine Hth de liaison aux ADN, soit l'équivalent d'une délétion complète de *Tex*. L'insertion à la position 2001 se situe quelques nucléotides après le début du domaine S1 et correspondra à la protéine "délétée" de son domaine S1 de liaison aux ARN.

Une fois l'insertion confirmée, nous avons réalisé quelques tests phénotypiques. L'effet des mutations a été analysé sur la croissance bactérienne en milieu riche (BHI) et en milieu carencé en nutriments (NZM). Cette étude a été poursuivie avec l'analyse de la formation du biofilm précoce par le dépôt d'une culture bactérienne sur plaque elisa, suivi d'une coloration au Cristal Violet (Matériel & Méthodes, § VIII. 3. 6. 2). Cette méthode simple qui permet de visualiser l'adhérence des bactéries sur le support plastique, a été réalisée par C. Lays dans l'équipe du Pr F. Vandenesch (INSERM, Lyon). Une étude comparative du protéome des souches sauvages et mutées dans le contexte de la souche HG001 a récemment été réalisée en collaboration avec la plateforme protéomique de l'IBMC (P. Hammann, L. Kuhn et J. Chicher, Strasbourg) afin de déterminer les fonctions dérégulées par l'absence de la protéine Tex ou par la délétion du domaine S1.

J'ai par ailleurs analysé l'expression de l'ARNm *tex* par des expériences Northern en fonction de la phase de croissance. Les ARN totaux ont été préparés à partir de 2h, 4h et 6h de culture des souches HG001 et RN6390. La souche RN6390 est mutée dans le gène *rsbU*, qui est l'activateur du facteur de transcription Sigma B impliqué dans la réponse au stress et la régulation de l'expression des gènes de virulence chez *S. aureus*. Cette mutation conduit à une plus forte synthèse de l'ARNIII en phase stationnaire de croissance dans la souche RN6390 que dans la souche HG001. L'utilisation de ces deux souches m'a permis de vérifier si la synthèse de Tex dépend de Sigma B. Il me semblait important de vérifier cet aspect puisque le gène *tex* se trouve localisé juste en aval de l'opéron *sigB* (Résultats § IV. 2).

Le profil d'expression de la protéine a ensuite été suivi au cours de la croissance bactérienne par Western blot. Ne disposant pas d'anticorps anti-Tex, j'ai au préalable inséré une étiquette FLAG à l'extrémité C-terminale de la protéine sauvage ou de la protéine délétée du domaine S1. Cette intégration a été réalisée en une étape dans la souche HG001 délétée du système de restriction-modification (BJC100) (Vagner *et al.*, 1998). L'insertion de cette étiquette avait pour objectif de réaliser des expériences de co-immunoprécipitation pour identifier les partenaires potentiels de Tex (**Figure 16**) (Lioliou *et al.*, 2012). J'ai réalisé plusieurs expériences pilotes qui ont conduit récemment à l'identification de protéines partenaires par spectrométrie de masse (en collaboration avec la plateforme protéomique de l'IBMC). L'analyse des ARN co-immunoprécipités seront analysés par séquençage haut débit (Illumina, actuellement en cours).

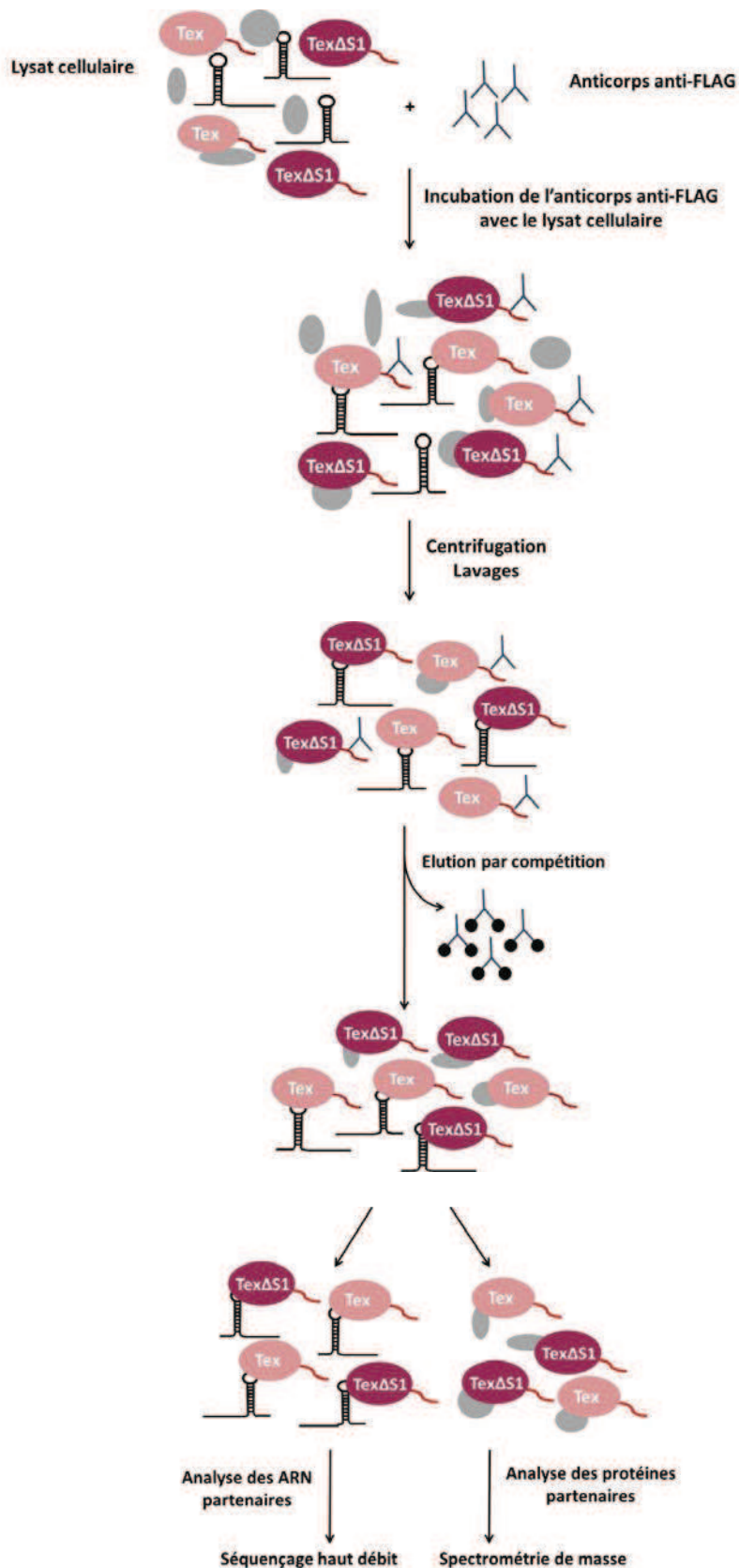


Figure 16. Résumé du protocole d'immunoprécipitation de Tex avec ses partenaires ARN ou protéines.

Un extrait cellulaire des souches BJC100 possédant la protéine Tex wt (rose) ou Tex Δ S1 (rose foncé) avec une étiquette FLAG (rouge) ont été préparés à 3h de culture, puis incubés avec un anticorps anti-FLAG (bleu). Après centrifugation, les anticorps couplés aux complexes Tex/Text Δ S1-ARN ou Tex/Text Δ S1-protéines sont lavés, puis l'éluion a lieu par compétition avec le FLAG peptide (noir). Les ARN co-élués avec Tex seront analysés par séquençage à haut débit et les protéines par spectrométrie de masse.

6. Analyse des bornes de l'ARNm *tex* par « RACE » circulaire

Afin de déterminer si l'ARNm *tex* est transcrit sous la forme d'un opéron avec le gène *sa1867* et la région promotrice de *tex*, nous avons procédé à une analyse des bornes de l'ARNm par 5'-3' RACE (*Rapid Amplification of cDNA ends*). Pour cela, les ARN totaux des souches RN6390 et HG001 ont été extraits et circularisés. Une réaction de RT-PCR a ensuite été réalisée sur les jonctions des ARN ligués, puis les fragments obtenus ont été clonés dans le vecteur d'expression pJET. Des cellules d'*E. coli* ont finalement été transformées avec ces vecteurs (Matériel & Méthodes, § VIII. 1). Une analyse statistique des produits de séquençage des fragments d'ADN portés par le vecteur a alors été réalisée, qui permet de déterminer les extrémités 5' et 3' UTR ainsi que la position du site de démarrage de transcription.

II/ Purification des protéines Tex et Tex Δ S1

1. Purification de Tex et Tex Δ S1

2 L de culture de chaque souche possédant Tex ou Tex Δ S1 portant une étiquette de 6 histidines à leur extrémité N-terminale ont été centrifugés et les culots ont été lysés. Les extraits bruts ont ensuite été purifiés successivement sur colonne au nickel puis sur colonne échangeuse d'anions (**Figure 17A et 17B**) (Matériel & Méthodes, § III. 2). Après purification et concentration de l'échantillon, j'obtiens généralement 2 à 5 mg de protéines Tex ou Tex Δ S1 dans 300 μ l de volume. Le rapport DO_{280nm}/DO_{260nm} mesuré étant supérieur à 2 à la fin de la purification, suggère que les acides nucléiques contaminants ont été éliminés.

2. Contrôle de l'homogénéité de Tex et Tex Δ S1 par DLS (*Dynamic Light Scattering*)

Après chaque purification, l'homogénéité des protéines est contrôlée par diffusion dynamique de la lumière (*Dynamic Light Scattering, DLS*) (§ I. 2). On observe la présence d'un grand pic monodisperse représentant 30% d'intensité relative dans chaque préparation, qui correspond à 17 nm de diamètre pour Tex wt et 15 nm pour Tex Δ S1 (**Figure 17C et 17D**). Ceci indique qu'il existe une population majoritaire correspondant à chaque protéine. Cependant pour Tex wt, j'ai souvent observé des particules de très grandes tailles (supérieures à 100 nm), correspondant probablement à de l'agrégation. Ces particules sont néanmoins en quantités très faibles voire négligeables (inférieur à 5% d'intensité). L'ensemble de ces informations révèle donc que chaque préparation est relativement homogène. J'ai souvent utilisé ce critère pour suivre la qualité de la protéine au cours du temps.

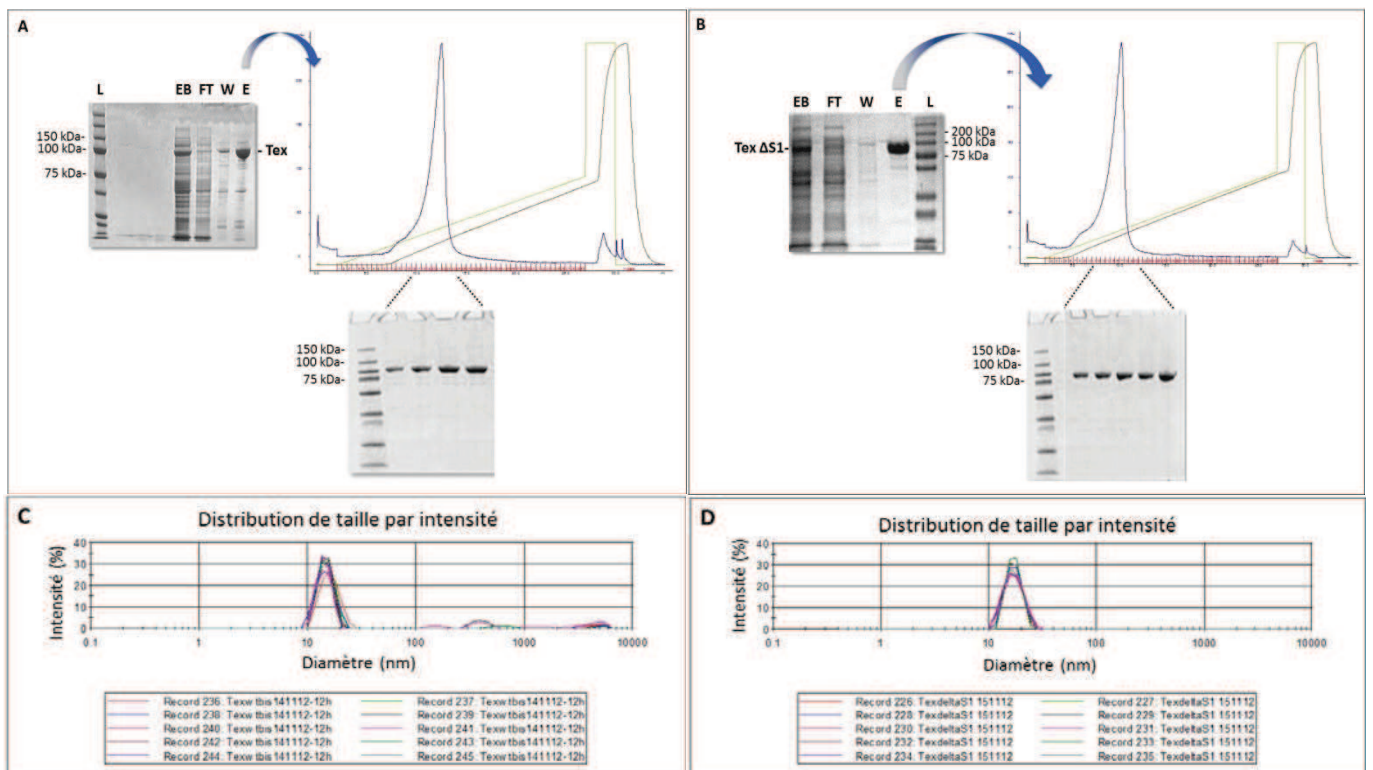


Figure 17. Etapes de la purification des protéines Tex (A) et Tex Δ S1 (B) et contrôle de la solubilité des protéines par DLS (C, D).

(A) Purification de la protéine Tex wt et (B) Tex Δ S1. A gauche, fractions récupérées après purification sur colonne Ni-NTA. EB = extrait brut de protéines totales, FT = protéines non retenues, W = fractions obtenues après lavage, E = protéine éluée à 500 mM d'imidazole. A droite, séparation sur une deuxième chromatographie échangeuse d'anions (MonoQ). La protéine a été éluée par un gradient de KCl entre 100 et 350 mM. Elle est éluée entre 160 et 200 mM KCl. Le profil de densité optique à 280 nm ainsi que l'analyse sur gel des échantillons correspondants au pic sont indiqués pour chaque purification. Après purification, l'homogénéité des protéines Tex wt (C) et Tex Δ S1 (D) a été contrôlée par DLS.

III/ Interaction de Tex aux ARN

1. Tex reconnaît les motifs en simple brin riches en adénines et uraciles

1.1. Analyse de l'interaction de Tex à l'ARNIII

Le domaine central de l'ARNIII, un site de haute affinité pour Tex ? J'ai visualisé la formation des complexes entre Tex et l'ARNIII par des expériences de gel retard (§ I. 3). En l'absence de Tex, une seule bande correspondant à l'ARNIII est observée. L'ajout de concentrations croissantes de la protéine conduit à la formation d'une deuxième bande retardée correspondant au complexe Tex-ARNIII. Cette bande apparaît aux hautes concentrations de Tex (à partir de 0,5 μM). Aux faibles concentrations de Tex, l'ARNIII diminue de manière progressive sans que le complexe puisse être visualisé. Ceci suggère que le complexe se dissocie en cours de migration ou que Tex interagit à plusieurs sites dans l'ARNIII et que ces interactions sont probablement de nature coopérative (**Figure 18A**). Ce comportement électrophorétique particulier ne m'a pas permis d'évaluer avec précision la constante de dissociation du complexe. Parallèlement à l'ARNIII, j'ai aussi analysé l'interaction de Tex au domaine 3' de l'ARNIII (nts 354-514) qui est un domaine indépendant, suffisant pour réprimer l'expression de divers ARNm (Boisset *et al.*, 2007; Chevalier *et al.*, 2010). La même approche a été utilisée dans laquelle l'interaction directe de Tex avec le domaine 3' marqué en 5' a été testée. Ici, même à une concentration élevée de la protéine (7,5 μM), aucun complexe n'a été visualisé (**Figure 18B**).

Des expériences de compétition ont ensuite été menées afin de déterminer la spécificité de fixation de Tex sur l'ARNIII. Pour cela, des concentrations croissantes d'ARNIII non marqué entier (contrôle positif), délété de son domaine central (ARNIII $\Delta 7-9$) ou délété de sa tige-boucle 13 (ARNIII $\Delta 13$) ont été ajoutées au milieu réactionnel (**Figure 18C**). Comme attendu, l'ARNIII sauvage non marqué entre en compétition avec l'ARNIII marqué pour interagir avec Tex. Une compétition efficace est aussi observée avec l'ARNIII $\Delta 13$ en accord avec le fait que la tige-boucle 13 seule n'est pas capable de se fixer à Tex (**Figure 18D**). En revanche, l'ARNIII délété de son domaine central (ARNIII $\Delta 7-9$) a perdu la capacité d'entrer en compétition avec l'ARNIII pour se fixer à Tex (**Figure 18C**). Des expériences antérieures réalisées par E. Huntzinger avaient montré que la délétion de ce domaine n'entraînait pas de changements de structure des autres domaines de l'ARNIII.

Ainsi l'ensemble des résultats suggère que le domaine comprenant les tiges-boucles 7 à 9 constitue un site de haute affinité pour Tex alors que le domaine 3' qui réprime la traduction de

plusieurs ARNm cibles ne contient pas de signaux de reconnaissance pour Tex.

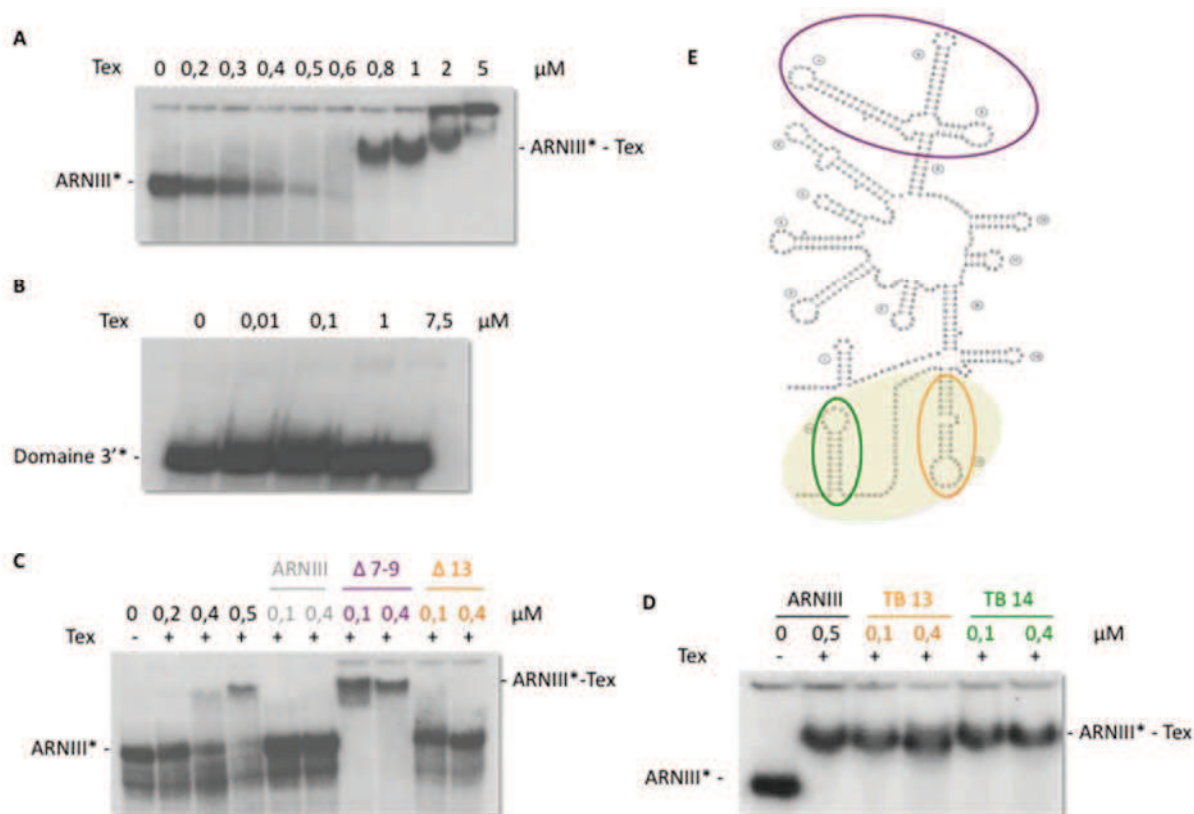


Figure 18. Analyse de la formation des complexes Tex-ARNIII par gel retard.

(A) Formation du complexe entre l'ARNIII marqué en 5' et des concentrations croissantes de Tex (0,2 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,5 ; 0,6 ; 0,8 ; 1 ; 2 et 5 µM). L'ARN libre et le complexe sont indiqués. (B) Interaction entre le domaine 3' de l'ARNIII et des concentrations croissantes de Tex (0,01 ; 0,1 ; 1 et 7,5 µM). (C) Gamme témoin de formation du complexe entre l'ARNIII marqué en 5' et des concentrations croissantes de Tex (0,2 ; 0,4 ; 0,5 µM), suivi des expériences de compétition effectuées avec l'ARNIII sauvage (ARNIII), délété des tiges-boucles 7 à 9 (ARNIII Δ7-9, violet) ou délété de la tige-boucle 13 (ARNIII Δ13, orange). Leurs concentrations sont de 0,1 et 0,4 µM. Tex a une concentration de 0,5 µM. L'ARNIII sauvage et l'ARNIII Δ13 compétent efficacement avec l'ARNIII marqué en 5'. Inversement, l'ARNIII Δ7-9 n'a aucun effet sur le complexe ARNIII-Tex. (D) Expériences de compétition utilisant comme ARN froid la tige-boucle 13 de l'ARNIII (orange, 0,1 et 0,4 µM) et la tige-boucle 14 (vert, 0,1 et 0,4 µM). (E) Figure de l'ARNIII et des différents domaines utilisés ou déléétés (violet, orange, vert ou jaune).

Tex reconnaît les régions en simple brin riches en A/U de l'ARNIII. Des expériences de cartographie en solution par hydrolyse enzymatique ont été réalisées sur l'ARNIII isolé et fixé à Tex. Dans cette étude je n'ai analysé qu'une partie de l'ARNIII comprenant les nucléotides 1 à 280. Les coupures enzymatiques, reportées sur la structure secondaire de l'ARNIII, se corrèlent parfaitement avec les résultats précédents obtenus par Benito *et al.* (2000). En effet, les guanines coupées par la RNase T1 et les nucléotides en simple brin coupés par la RNase T2 sont principalement localisés dans les boucles et les régions inter-hélicoidales (Figure 19). En revanche, la RNase V1 induit des coupures principalement dans les hélices.

En présence de Tex, des changements dans les profils de coupures de l'ARNIII ont été observés seulement avec la RNase T2. De nombreuses régions en simple brin apparaissent

protégées contre l'attaque par la RNase T2, celles-ci comprennent les nucléotides 21-25, 41-46, 156-161 ainsi que la boucle apicale 2. Des protections plus faibles sont également observées au niveau des boucles apicales 3 et 4.

De manière surprenante, aucune protection n'a été observée dans la région incluant les tiges-boucles 7 et 8 alors que la délétion de ce domaine perturbe fortement l'interaction de Tex (§ III. 1). Il n'est donc pas à exclure que la boucle apicale 9 riche en uridines puisse être le site de haute affinité pour Tex. Il sera ainsi nécessaire de compléter ces données par l'analyse complète de l'ARNIII. L'analyse de l'empreinte en fonction de la concentration de Tex permettra aussi de révéler les sites de haute affinité. D'autres sondes plus précises comme le plomb ou le SHAPE préciseront les régions d'interaction. Cependant, cette étude permet d'ores et déjà de révéler que toutes les régions protégées par Tex sont riches en adénines et uraciles, qui sont des sites appropriés pour les motifs de reconnaissance à l'ARN de type OB.

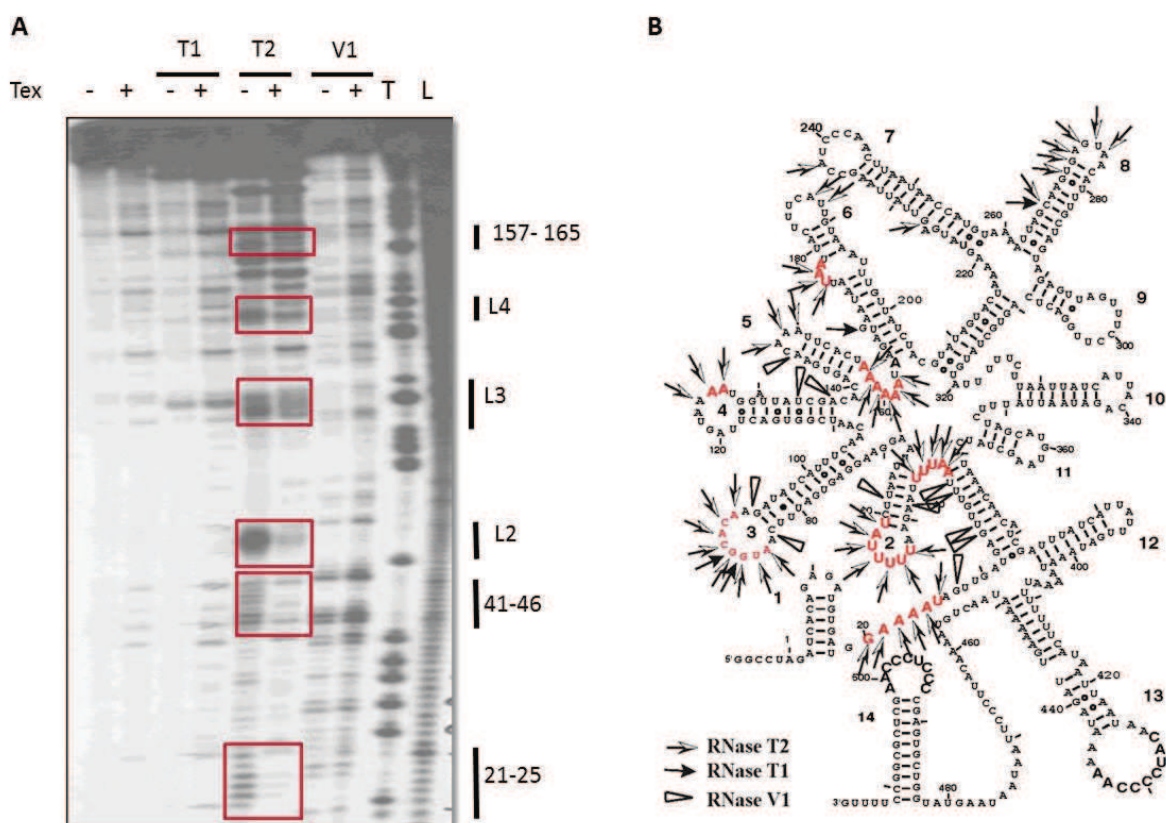


Figure 19. Cartographie en solution de l'ARNIII marqué à son extrémité 5', complexé ou non à la protéine Tex.

(A) Autoradiographie montrant les profils de coupures enzymatiques sur l'ARNIII seul (-) ou complexé à Tex (+, 0,5 µM). Les zones de protection sont encadrées en rouge. T1, T2, V1: hydrolyses par la RNase T1, la RNase T2 et la RNase V1, respectivement ; T: RNase T1 en conditions dénaturantes; L: hydrolyse alcaline. **(B)** Les coupures enzymatiques sont reportées sur la structure secondaire de l'ARNIII: flèche pleine: RNase T1, flèche blanche: RNase T2, triangle: RNase V1. Les protections induites par Tex sont représentées en rouge.

1.2. Analyse de l'interaction de Tex aux ARN non codants RsaA et RsaE

Tex interagit avec RsaA et RsaE. Les résultats précédents montrent que Tex reconnaît essentiellement les régions en simple brin riches en A et U de l'ARNIII. Pour généraliser ces données, j'ai analysé la capacité de Tex à se fixer à d'autres ARN régulateurs dont la fonction a été décrite précédemment (§ I. 1).

Des expériences de compétition ont été réalisées par retard sur gel, dans lesquelles des concentrations croissantes de RsaA ou RsaE non marqué ont été ajoutées à l'ARNIII marqué en 5' en présence d'une concentration donnée de Tex (0,5 μ M). Une compétition a été observée dans les deux cas, indiquant que Tex est capable de se lier à ces deux ARN (**Figure 20**). Cependant il semblerait que l'affinité soit plus forte pour RsaA que pour RsaE. En effet, la compétition est observée avec une concentration assez faible de RsaA (100 nM) (**Figure 20A**) alors qu'il faut 6 fois plus de RsaE pour inhiber la formation du complexe entre Tex et l'ARNIII (**Figure 20B**). RsaA et RsaE possèdent des structures secondaires qui se ressemblent, mais RsaA contient une région interhélicoïdale plus riche en A/U que RsaE (**Figure 20**).

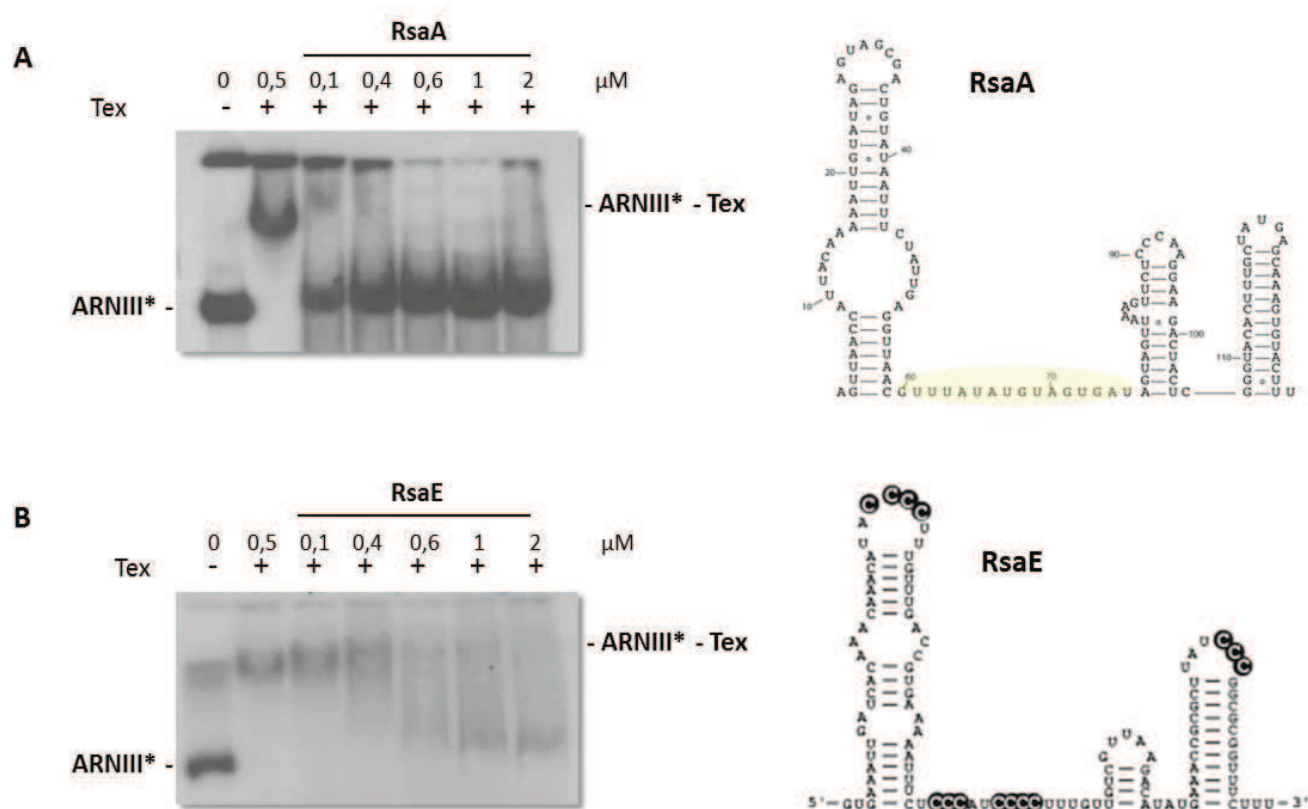


Figure 20. Analyse de la formation des complexes Tex-ARNIII et compétition avec RsaA (A) ou RsaE (B) par gel retard. A gauche, formation du complexe entre l'ARNIII marqué en 5' et Tex (0,5 μ M), suivi des expériences de compétition effectuées avec RsaA ou RsaE en concentrations croissantes (0 ; 0,1 ; 0,4 ; 0,6 ; 1 et 2 μ M). Tex a une concentration de 0,5 μ M. A droite sont représentées les structures des deux ARN, qui indiquent une région centrale de RsaA plus riche en résidus A/U (en jaune) que RsaE.

Détermination de l’empreinte de Tex sur RsaA. Des expériences d’hydrolyse enzymatique ont été réalisées avec la RNase T2 dans les mêmes conditions que pour l’ARNIII (§ III. 1). Comme attendu, les coupures majoritaires ont été retrouvées dans la région riche en A/U incluant les positions 61 à 70 (**Figure 21**). En présence de concentrations croissantes de Tex, une seule zone de protection a été observée au niveau des nucléotides 64 à 70. Ces données sont en accord avec les résultats obtenus sur l’ARNIII qui confirment que Tex se lie préférentiellement à des régions en simple brin riches en adénines et uraciles.

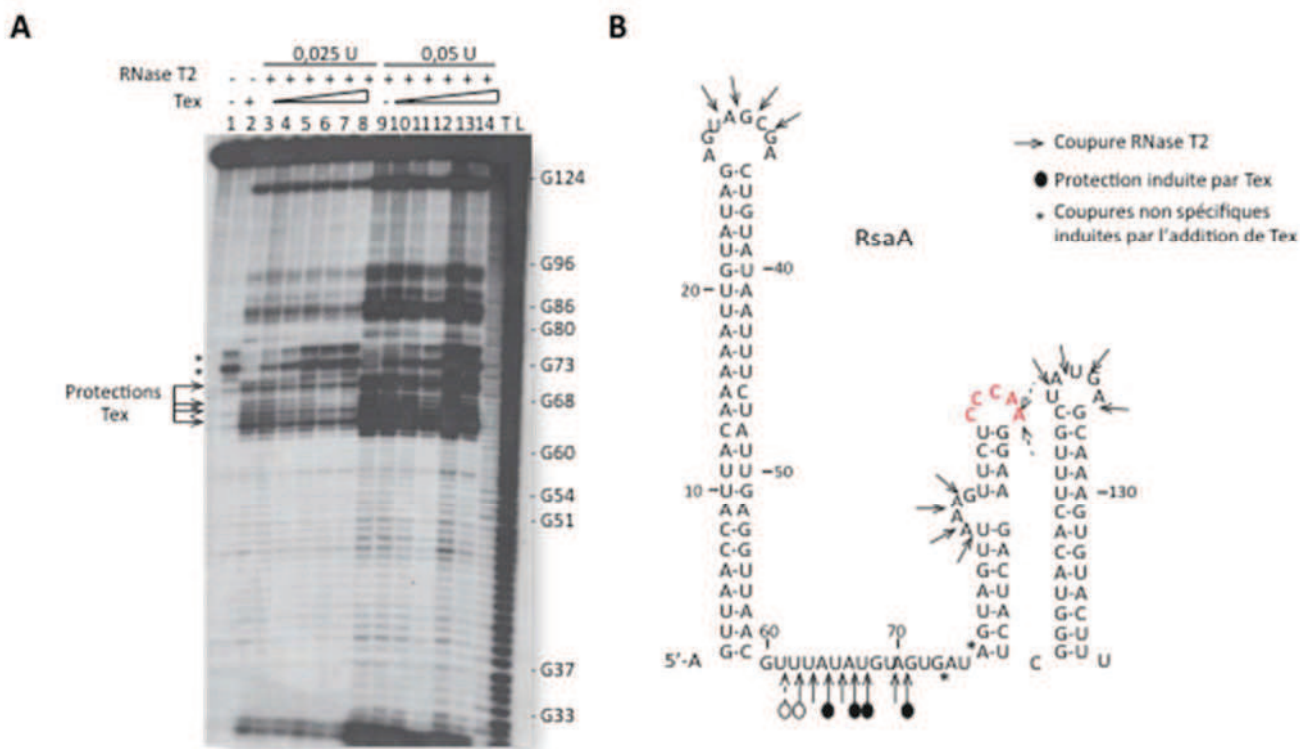


Figure 21. Cartographie en solution de l’ARN RsaA marqué à son extrémité 5’, complexé ou non à la protéine Tex. **(A)** Autoradiographie montrant les profils de coupures enzymatiques sur RsaA seul (-) ou complexé à Tex (+, 1 µM). Les zones de protection sont indiquées (→), les coupures non spécifiques induites par Tex également (+). T1, T2: hydrolyses par la RNase T1 et la RNase T2 respectivement en présence de concentrations croissantes de Tex (0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 et 1 µM); T: RNase T1 en conditions dénaturantes; L: hydrolyse alcaline. **(B)** Les protections induites par Tex sont représentées en rouge sur la structure secondaire de RsaA.

2. Tex possède plusieurs sites de fixation à l’ARN

2.1. Le domaine S1 de Tex est essentiel pour la reconnaissance des motifs riches en A/U

J’ai par la suite étudié si le motif OB de Tex était responsable de la reconnaissance des séquences riches en A/U, par filtration sur nitrocellulose (§ I. 3). La courbe de saturation montre que le pourcentage d’ARN lié à Tex au plateau est peu élevé (de l’ordre de 35%), ce qui pourrait résulter d’une rétention peu efficace des complexes Tex-ARN sur les filtres. Néanmoins, il est possible de déterminer une constante de dissociation (k_D) de Tex pour RsaA, qui correspond à

50% de la concentration en protéine nécessaire pour fixer la totalité de l'ARN parce que dans ces conditions expérimentales, l'ARN marqué est présent en quantités négligeables. Dans cette expérience, si l'on considère que le plateau de saturation est atteint avec 1 μM de protéine Tex, la valeur de K_D déterminée graphiquement correspond à 540 nM (**Figure 22A**). Le résultat de cette expérience indique également que la délétion du domaine S1 de Tex abolit complètement l'interaction avec RsaA, même à une concentration de 5 μM de protéine (**Figure 22A**). Ceci suggère que le motif S1 jouerait un rôle crucial dans la fixation de Tex aux ARN.

2.2. La protéine Tex ΔS1 est capable d'accommoder des structures en tiges-boucles

Des expériences de compétition ont ensuite été réalisées en ajoutant au complexe formé de Tex (500 nM) et RsaA marqué en 5', des concentrations croissantes de différents ARN froids : l'ARN RsaA non marqué, un ARN qui mime un site minimal trouvé dans l'ARNIII (tige-boucle 2, *TB2*), le même ARN portant en 5' une séquence riche en U (*TB2 extraboucle*) et un oligoribonucléotide de 8 nucléotides de séquence AAAUGGUA (*CspA*) qui contient le site préférentiel de la protéine chaperone CspA constituée d'un motif OB similaire à celui observé chez Tex (S. Marzi, communication personnelle). Dans ces expériences, la valeur de radioactivité retenue sur le filtre pour le complexe Tex-RsaA marqué a été fixée comme valeur de référence à 100%. L'ajout de quantités croissantes d'ARN froid compétiteur doit se traduire par une baisse régulière de la rétention du complexe RsaA-Tex si cet ARN est capable de se fixer au même site ou à un site proche de celui de RsaA (**Figure 22B**).

De manière attendue, l'ajout de quantités croissantes de RsaA froid induit une compétition efficace puisqu'à une concentration de 400 nM de RsaA froid, 40% du complexe a été dissocié. Les deux autres motifs structurés TB2 et TB2 extraboucle montrent un profil particulier où une compétition est observée aux faibles concentrations des deux ARN pour atteindre un plateau à 40% (**Figure 22B**). Une grande partie des complexes RsaA-Tex ne sont donc pas déplacés par ces motifs structurés. Ceci me permet de proposer que les complexes RsaA-Tex seraient hétérogènes et que la protéine puisse contenir plusieurs sites de fixation à l'ARN. En revanche, le motif en simple brin « CspA » ne déplace pas RsaA de son site d'interaction dans la gamme de concentrations utilisées (**Figure 22B**). Ce résultat suggère soit que cet ARN « CspA » ne se fixe pas de manière forte à Tex ou, que son site de fixation ne se chevauche pas avec celui de RsaA. Ce résultat est inattendu dans la mesure où Tex reconnaît une région en simple brin de RsaA qui contient une séquence proche de l'ARN CspA.

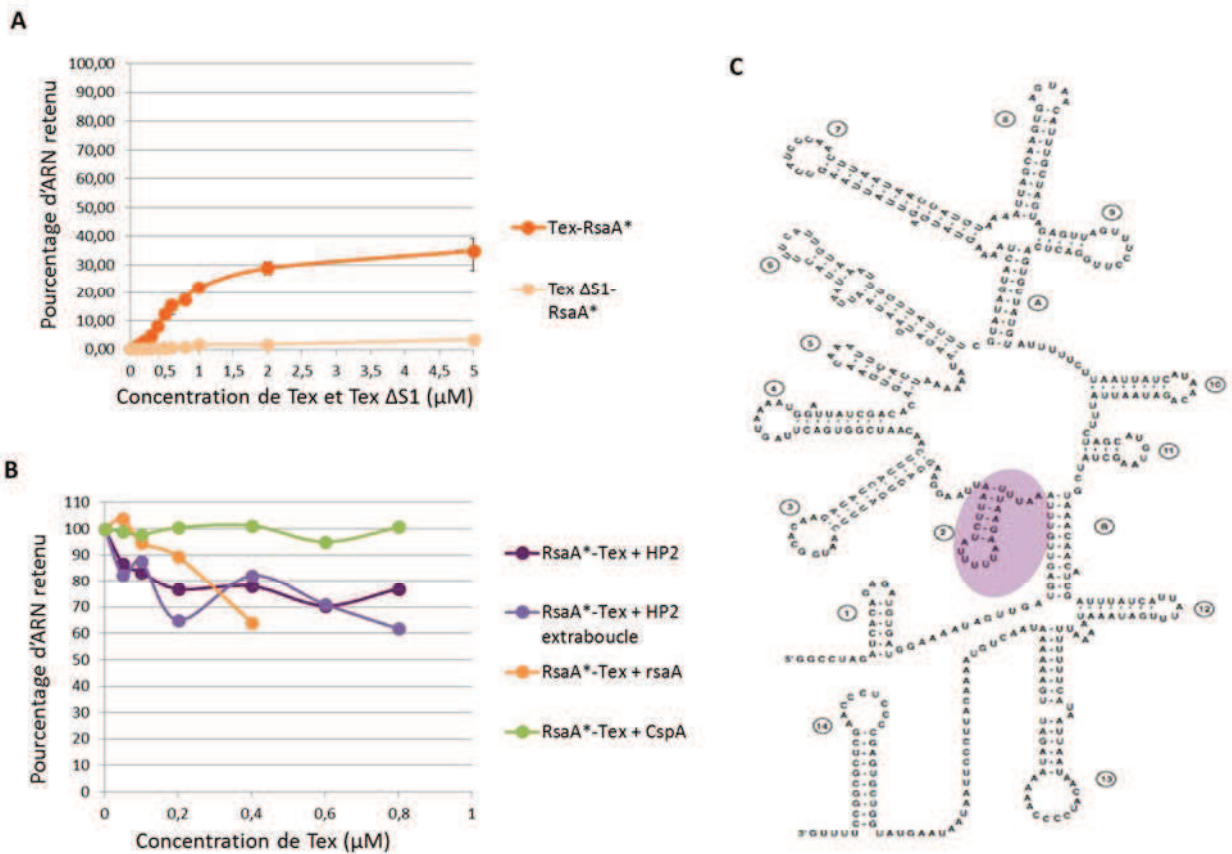


Figure 22. Analyse de la formation des complexes Tex-RsaA et TexΔS1-RsaA par filtration sur nitrocellulose.

(A) Des concentrations croissantes de Tex (orange) ou TexΔS1 (orange clair) (0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ; 1 ; 2 et 5 μM) ont été ajoutées à l'ARN RsaA marqué en 5'. Le pourcentage d'ARN marqué retenu sur le filtre est représenté en fonction de la concentration de Tex ou TexΔS1. La protéine délétée de son domaine S1 perd sa capacité de liaison à RsaA. (B) Expériences de compétition effectuées avec des concentrations croissantes des ARN froids RsaA (orange), de la tige-boucle 2 de l'ARNIII (violet foncé), de la tige-boucle 2 de l'ARNIII et des 5 nucléotides consécutifs UUAAA de la région interhélicoidale en 5' (violet clair) et de l'oligonucléotide CspA (AAAUGGUA, vert) (0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 et 0,8 μM). Tex a une concentration de 500 nM. (C) La tige-boucle 2 et son motif extra-boucle est représentée sur la structure secondaire de l'ARNIII (violet). Toutes les expériences ont été réalisées en triplicats.

Ayant rencontré une forte variabilité de rétention optimale des complexes sur filtre de nitrocellulose, j'ai utilisé une autre approche basée sur la spectroscopie de fluorescence, en collaboration avec S. Bernacchi (IBMC, Strasbourg). Nous avons suivi le changement de fluorescence émise par les tyrosines et les tryptophanes de Tex, induit par la fixation de divers ARN. Les expériences de titration ont été réalisées avec une concentration fixe de Tex wt ou TexΔS1 (200 nM) et des concentrations croissantes des différents fragments d'ARN froids utilisés précédemment, avec en plus: la séquence interhélicoidale riche en A/U de RsaA (UUUAUAUG, *RsaAc*) et l'oligoribonucléotide CspA muté dans son site d'interaction (AACUGGUA, *CspA3*). Dans un premier temps, j'ai évalué les conditions expérimentales afin d'éviter les interactions non spécifiques de type électrostatique. C'est pourquoi j'ai dû augmenter la concentration en NaCl de 100 mM à 200 mM pour éliminer les complexes de faible affinité ($k_D > 300$ nM).

Les résultats obtenus indiquent tout d'abord que pour la majorité des ARN testés, il existe deux constantes de dissociation différentes (**Tableau 2**) (**Figure 23**). L'une très affine de l'ordre de 10 à 30 nM et l'autre plus faible comprise entre 50 et 160 nM. C'est le cas des complexes formés entre les oligonucléotides CspA et RsaA avec Tex wt et de TB2 avec Tex wt ou Tex Δ S1. Nous avons également observé pour les interactions TB2-Tex wt ou TB2-Tex Δ S1 en particulier, que dès l'ajout de l'ARN à 10 nM, un quenching de fluorescence important apparaît, de l'ordre de 40%, puis l'équilibre de l'interaction est ensuite rapidement atteint (dès 200 nM d'ARN ajouté) (**Figure 23**). Ce profil permet d'introduire ici la notion de coopérativité. Dans l'état actuel des expériences, il est cependant difficile de donner une explication rationnelle et unique à ces résultats. On peut émettre l'hypothèse de la présence de deux sites de fixation de l'ARN sur la protéine. Il n'est pas impossible que la fixation d'une première molécule d'ARN sur l'un des sites de Tex induise ensuite la fixation d'une autre molécule d'ARN avec une affinité plus faible, ce qui pourrait également expliquer le fait que nous trouvions deux constantes d'affinité pour un même système. Il sera donc important de déterminer la stoechiométrie des complexes formés.

Les résultats obtenus avec la tige-boucle 2 de l'ARNIII ou la même tige-boucle portant en 5' une séquence riche en U ont montré que ces deux ARN forment un complexe stable avec la protéine sauvage et mutée (**Figure 23**) (**Tableau 2**). Les oligonucléotides CspA (AAAUGGUA) et RsaA (UUUAUAUG) sont également capables de former des complexes de haute affinité avec Tex. En revanche dans les deux cas, nous n'avons pas observé de signaux spécifiques avec la protéine Tex Δ S1, suggérant que la délétion du domaine S1 a aboli la reconnaissance de ces motifs en simples brins (**Figure 23**) (**Tableau 2**). Il en est de même avec l'oligonucléotide CspA3 (AACUGGUA) dont l'adénine à la position 3 a été mutée en cytosine. Aucune interaction n'a été détectée pour cet oligonucléotide avec la protéine Tex Δ S1. De plus, contrairement à l'ensemble des autres ARN, une seule constante d'affinité a été détectée, qui est par ailleurs plus importante ($K_D = 157$ nM) que celles des deux autres oligonucléotides en simple brin (**Tableau 2**). Ce résultat suggère donc que la mutation générée (A \rightarrow C) a un impact non négligeable sur la liaison de Tex wt à cet oligonucléotide, puisqu'il semblerait que la constante de plus haute affinité observée pour les autres oligonucléotides soit perdue dans ce cas.

Il est intéressant de signaler que le motif en simple brin de RsaA, qui est la région trouvée protégée par Tex contre l'attaque par la RNase T2 (**Figure 21**), est reconnue de manière spécifique par le domaine OB de Tex. Ceci conforte les expériences de nitrocellulose qui ont montré que le domaine S1 est important pour la fixation de RsaA. Un résultat qui reste intrigant est que le motif CspA n'est pas capable de déplacer le complexe formé entre RsaA et Tex (**Figure**

22A). Il sera donc important d'analyser la formation des complexes Tex/Tex Δ S1-RsaA par spectroscopie de fluorescence mais aussi de renouveler les expériences de compétition sur nitrocellulose dans les conditions ioniques utilisées pour la spectroscopie de fluorescence.

L'ensemble des résultats obtenus par les deux techniques me permettent ainsi d'émettre l'hypothèse selon laquelle le domaine S1 serait essentiel pour la fixation des motifs riches en A/U en simples brins et que d'autres domaines de la protéine Tex pourraient eux, intervenir pour fixer des motifs en tige-boucle.

Tableau 2. Constantes de dissociation k_D en nM, obtenues lors de la formation des complexes Tex-ARN ou Tex Δ S1-ARN par spectroscopie de fluorescence. Nd : non détectable.

| | Tex wt-ARN k_D en nM | TexΔS1-ARN k_D en nM |
|---------------------------------------|--|--|
| TB2 ARNIII | 30 nM 63 nM | 10 nM 123 nM |
| TB2 ARNIII + motif extraboucle | 27 nM 80 nM | 32 nM 53 nM |
| CspA : AA<u>A</u>UGGUA | 31 nM 124 nM | nd |
| CspA 3 : AAC<u>C</u>UGGUA | 157 nM | nd |
| Motif RsaA central: UUUAUAUG | 10 nM 83 nM | nd |

Tex wt

Tex Δ S1

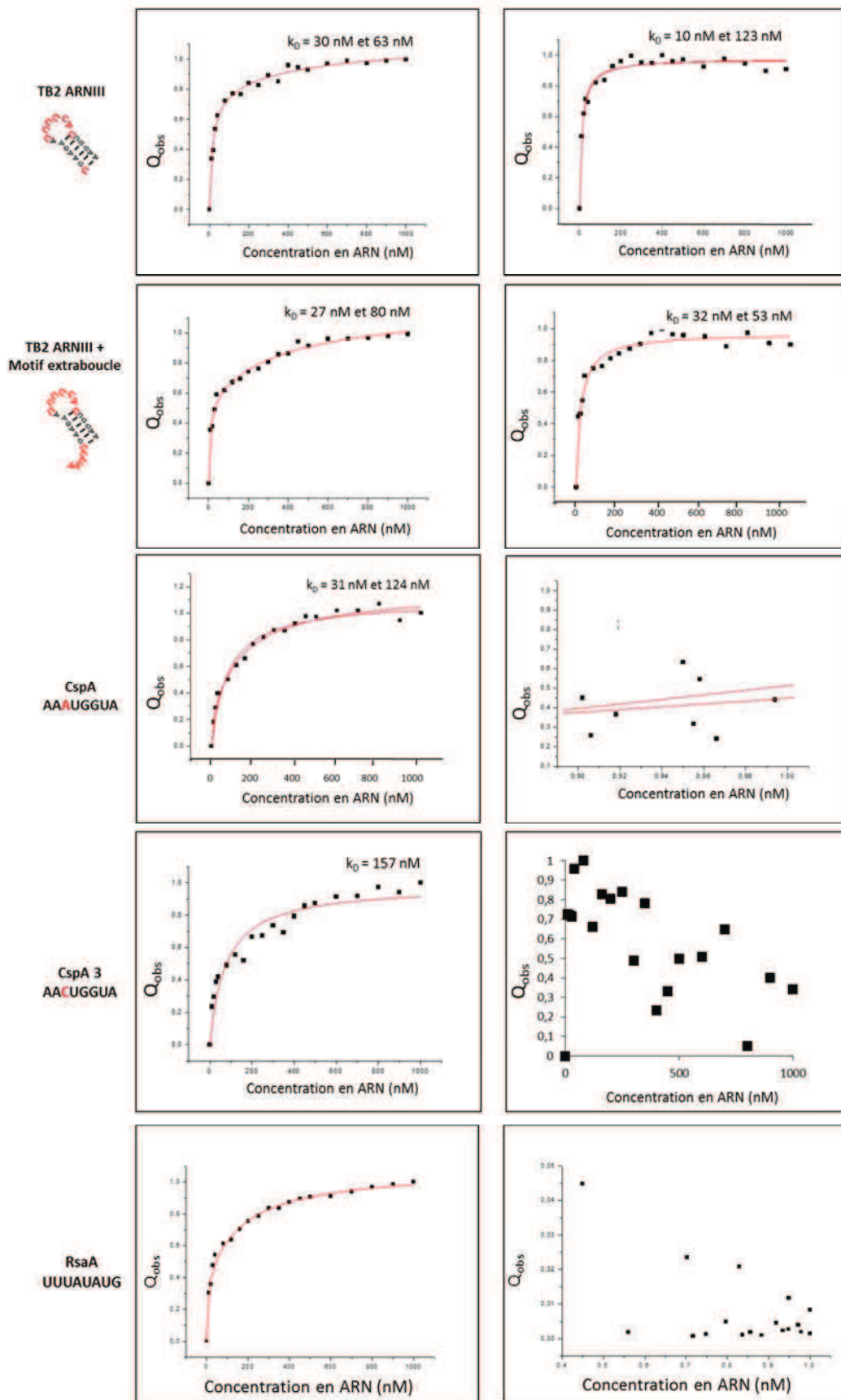


Figure 23. Analyse de la formation des complexes Tex-ARN et Tex Δ S1-ARN par spectroscopie de fluorescence.

Des concentrations croissantes d'ARN (10 ; 20 ; 30 ; 40 ; 80 ; 120 ; 160 ; 200 ; 250 ; 300 ; 350 ; 400 ; 450 ; 500 ; 600 ; 700 ; 800 ; 900 ; 1000 nM) ont été ajoutées à Tex ou Tex Δ S1 (200 nM), puis l'intensité du signal de fluorescence été enregistré entre 300 et 350 nm. Après normalisation des données brutes, la variation du signal de fluorescence en fonction de la concentration en protéine a été représentée graphiquement, puis les données du graphe ont été soumises au modèle mathématique de Scatchard à l'aide du logiciel *Origin 7*, qui a permis de générer les paramètres de liaison du complexe comprenant la constante de dissociation, la coopérativité de liaison et la stoechiométrie de liaison.

IV/ Analyse de l'ARN messager de Tex

1. Localisation génomique de tex

La position du gène *tex* sur le génome a été analysée grâce au logiciel de visualisation et d'annotation de génome, Apollo, avec pour organisme de référence la souche de *S. aureus* N315. Le gène *tex* est codé en antisens et de manière intéressante, est situé en aval du gène du facteur de transcription *sigma B*. D'autre part, *tex* présente un recouvrement de 7 nucléotides avec le gène *sa1867* situé en 3', correspondant à une protéine hypothétique (Figure 24). Ceci indique que *tex* est probablement transcrit sous la forme d'un opéron avec ce gène et qu'un couplage traductionnel pourrait avoir lieu pour traduire SA1867.

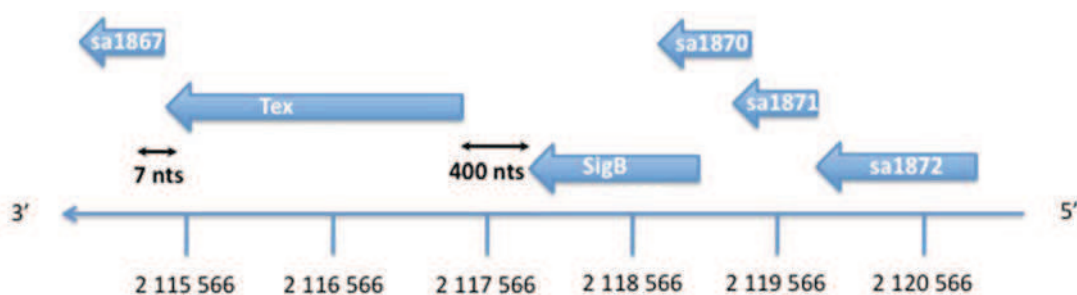


Figure 24. Représentation schématique de la localisation génomique de *tex* et des gènes environnants.

2. La synthèse de Tex est régulée en fonction de la phase de croissance

Par des expériences de Northern blot j'ai suivi dans un premier temps, l'expression de l'ARNm *tex* dans les deux souches HG001 et RN6390 (Figure 25). Comme expliqué plus haut (§ I. 4), la souche RN6390 contient une mutation dans le gène *rsbU*, conduisant à un facteur de transcription Sigma B inactif et à une expression plus forte d'ARNIII en phase stationnaire que dans la souche HG001 où la mutation au niveau *rsbU* a été corrigée.

J'ai suivi l'expression de l'ARNm *tex* des souches RN6390 et HG001 après 2, 4 et 6h de culture dans le milieu riche BHI. Les mêmes expériences ont été réalisées avec les souches mutantes dans lesquelles l'intron a été introduit. Bien que le gel montre des signaux non spécifiques liés à la position des ARNr, des bandes de tailles attendues pour l'ARNm *tex* sauvage et pour les deux ARNm mutés portant les introns catalytiques, ont été révélées (Figure 25). En revanche, nous avons observé dans toutes les souches des produits de dégradation. Ce résultat pourrait s'expliquer par l'insertion des introns qui, contenant un grand nombre de codons stop, a conduit à la synthèse d'ARNm tronqués qui ont pu être reconnus par le système de contrôle qualité de la traduction procaryote ou *trans*-traduction (Gillet et Felden, 2007). Dans ce système,

l'ARNm endommagé en cours de traduction est reconnu par un complexe ribonucléoprotéique formé d'un ARN « hybride » entre un ARN de transfert et un ARN messager (ARNtm) et une petite protéine (SmpB). Par leur action conjointe, l'ARNtm et la protéine SmpB vont conduire à la dégradation du messager défectueux ainsi qu'à la libération du ribosome bloqué sur ce dernier.

Dans notre expérience, les ARNr ont été suivis comme témoins de charge, qui indiquaient que la quantité des ARN totaux déposée dans l'ensemble des poches était équivalente. Malgré la mauvaise qualité de cette expérience, l'expression de l'ARNm *tex* apparaît fortement régulée en fonction de la phase de croissance, puisque dans toutes les souches, l'ARNm est exprimé en phase exponentielle et son taux diminue drastiquement en phase stationnaire (**Figure 25**). La transcription de *tex* semble donc dépendre de la phase de croissance de la bactérie et ne semble pas être sous le contrôle du facteur Sigma B et du système de densité cellulaire *agr*.

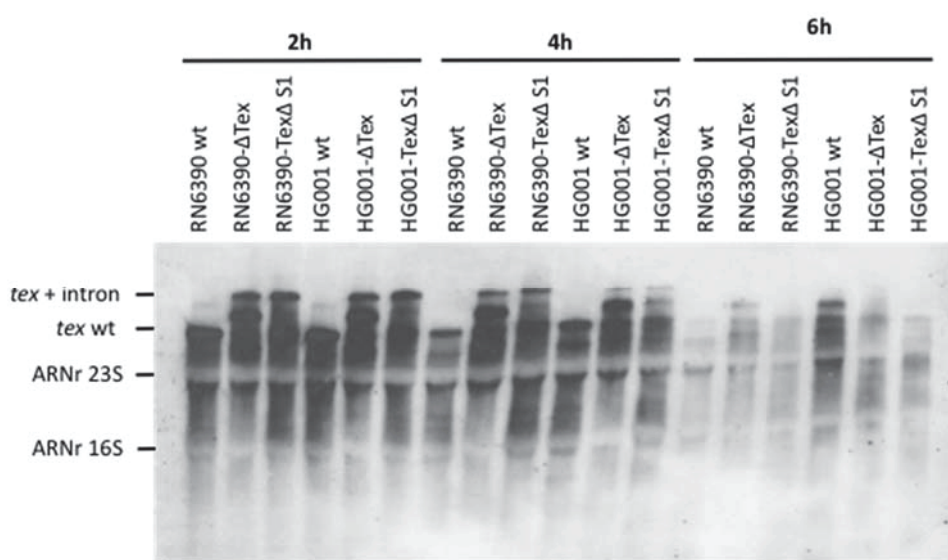


Figure 25. Analyse de l'expression de l'ARNm *tex* par DIG-Northern blot en fonction de la phase de croissance.

10 µg d'ARN totaux des souches RN6390 et HG001 sauvages et mutées ont été prélevés après 2h, 4h et 6h de culture puis déposés sur gel d'agarose 1% en présence de guanidium thiocyanate 20mM. Après transfert sur membrane de nitrocellulose, le gène *tex* a été détecté à l'aide d'une sonde ARN spécifique. L'ARNm *tex* (*tex wt*) est indiqué ainsi que l'ARNm possédant l'intron (*tex+LI-LtrB*).

Dans un deuxième temps, j'ai analysé le profil d'expression de la protéine Tex par Western blot (§ I. 4). De cette manière, j'ai observé que la synthèse de Tex suit le même profil que l'ARNm. La protéine est synthétisée en début de phase de croissance mais est très fortement diminuée après 4h et 6h de culture au moment où l'ARNIII s'accumule (**Figure 26**). Ces résultats suggèrent que Tex et l'ARNIII seraient présents simultanément dans une fenêtre de temps très étroite. Il est donc probable que Tex ne soit pas un co-facteur majeur de l'ARNIII pour l'assister dans ses fonctions de répresseur.

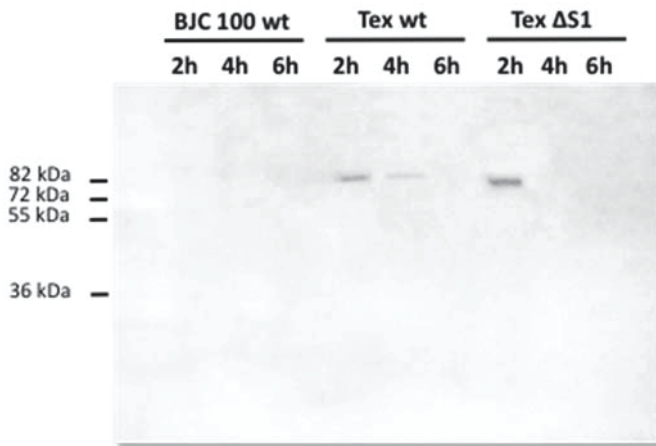


Figure 26. Analyse de l'expression de la protéine Tex par Western blot en fonction de la phase de croissance.

100 µg de protéines totales de la souche BJC100 sauvage et des souches BJC100 portant une étiquette FLAG sur le gène *tex* sauvage et *tex* ΔS1, ont été prélevés après 2h, 4h et 6h de culture et déposés sur gel de polyacrylamide 10%. Après transfert sur membrane polyvinylidène fluorure (PVDF), la protéine Tex ou Tex ΔS1 a été détectée grâce à un anticorps anti-FLAG.

Ainsi, ces dernières observations nous amènent à nous poser quelques questions. Étant donné que les ARN régulateurs tels que l'ARNIII ou RsaA sont principalement exprimés en phase stationnaire de croissance (Janzon *et al.*, 1989; Romilly *et al.*, 2014; Vandenesch *et al.*, 1991) et que Tex est synthétisé en début de phase exponentielle, quel rôle peut avoir Tex dans les mécanismes de régulation par ces ARN ? Pourrait-elle avoir un rôle dans la régulation des facteurs de virulence précoce de *S. aureus* qui sont synthétisés au même moment de la croissance ? Quel pourrait être le régulateur de Tex ? Pour répondre à cette dernière question, il serait intéressant d'analyser l'effet des différents systèmes à deux composants sur la transcription de l'ARNm *tex*.

3. *tex* est-il transcrit en opéron?

Une analyse de 5'-3'RACE (§ I. 4) a été menée sur l'ARNm *tex* dans le but de déterminer si *tex* est transcrit sous la forme d'un opéron avec le gène *sa1867*, pouvant potentiellement donner lieu à un couplage traductionnel entre Tex et SA1867, dont le gène est situé en aval (§ IV. 1). Après avoir analysé près de 50 clones pour chaque souche, les résultats obtenus suggèrent que les extrémités 5' UTR et 3' UTR sont très courtes avec un site de démarrage de la transcription qui se situe principalement à 25 nucléotides en amont du codon AUG de l'ORF pour la souche RN6390 et à 27 nucléotides pour la souche HG001 (**Tableau 3**). Cependant, dans les deux cas, les pourcentages obtenus restent relativement faibles (32% et 29% respectivement pour la

souche RN6390 et HG001). Une analyse sur un plus grand nombre de clones serait probablement nécessaire pour confirmer ou infirmer ces résultats. La technique RACE n'a pas permis de visualiser le gène *sa1867* situé en aval de *tex*, suggérant que *tex* ne serait pas transcrit en opéron avec ce gène ou qu'une maturation ultérieure génèrerait l'ARNm *tex*.

| Position relative à l'AUG | Pourcentage statistique dans RN6390 | Position relative à l'AUG | Pourcentage statistique dans HG001 |
|---------------------------|-------------------------------------|---------------------------|------------------------------------|
| -25 | 31,8 % | -25 | 29,4 % |
| -27 | 13,6 % | -27 | 11,8 % |
| -30 | 13,6 % | -30 | 11,8 % |
| -22 | 9,1 % | -22 | 11,8 % |
| -29 | 9,1 % | -29 | 5,9 % |
| -20 | 4,5 % | -20 | 5,9 % |
| -24 | 4,5 % | -24 | 5,9 % |
| -26 | 4,5 % | -26 | 5,9 % |
| -28 | 4,5 % | -28 | 5,9 % |
| -32 | 4,5 % | -32 | 5,9 % |

Tableau 3. Résultat de l'analyse statistique de la position du site de démarrage de la transcription dans les souches RN6390 et HG001.

Récemment l'équipe de I. Lasa (Institut d' Agrobiotechnologies, Pampelonne, Espagne) a analysé l'expression des ARN dans une souche clinique (15981) de *S. aureus* par des expériences de séquençage haut débit et par micropuces « tiling arrays » (Lasa *et al.*, 2011; Ruiz de los Mozos *et al.*, 2013). Cette étude complète montre que le transcriptome de *S. aureus* est complexe et a révélé de nombreux sites de transcription inattendus. Ces données sont maintenant disponibles pour la communauté scientifique (<http://staph.unavarra.es/>). Comme représenté sur la **Figure 27**, ces approches haut débit montrent que le gène *tex* est clairement co-exprimé avec le gène *sa1867* situé en aval. Cette expression de l'opéron *sa1867-tex* se retrouve conservée dans quatre souches différentes. Du fait de la stricte conservation de ce locus, il est fort probable que les ADNc amplifiés par RACE circulaire aient été générés à partir d'un produit de maturation de l'opéron *tex*. Cette hypothèse pourrait expliquer les expériences de Northern, qui montrent des produits plus courts qui correspondraient à une dégradation de l'opéron *tex* (**Figure 25**).

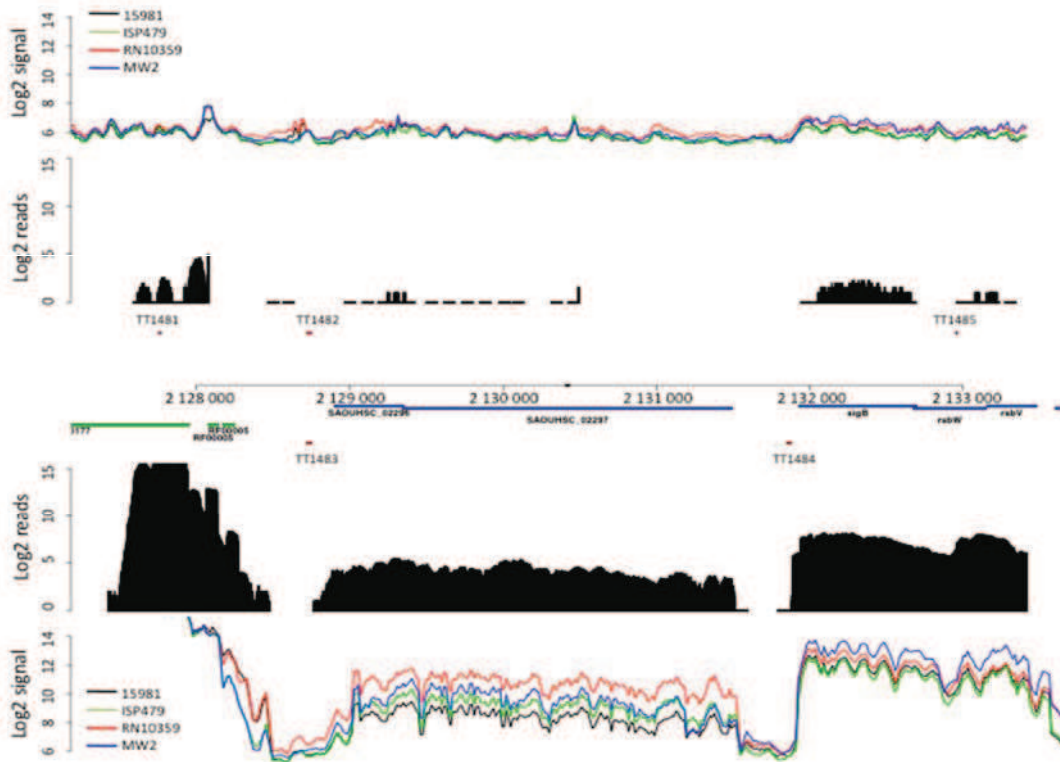


Figure 27. Analyse de l'expression du messenger *tex* par tiling array et RNA-seq sur 4 souches différentes de *S. aureus*. Résultats de Ruiz de los Mozos *et al.*, 2013.

L'axe des ordonnées représente la normalisation des données (nombre de reads et le signal correspondant) en log2 sur le brin sens (haut) et le brin antisens (bas) du génome. L'axe des abscisses représente l'organisation des gènes sur le chromosome. En haut et en bas, sont visualisées les données obtenues sur le tiling arrays sur quatre souches différentes de *S. aureus* (tiré du site web <http://staph.unavarra.es/>).

La question que l'on peut se poser ici est de savoir si la traduction de SA1867 est couplée à celle de Tex. C'est un aspect important puisque les mutations introduites dans le gène *tex* pourraient induire des effets polaires et que nous n'avons pas réussi à compléter les souches mutées de Tex (Δ Tex et Tex Δ S1) avec la protéine sauvage, dû à une impossibilité de cloner *tex* sur un plasmide chez *E. coli*. De manière intéressante, une analyse protéomique a été réalisée (§ V. 1) pour analyser les fonctions dérégulées par les mutations introduites dans le gène *tex*, qui a montré que la protéine SA1867 est produite quelle que soit la souche sauvage ou mutée de Tex, alors que Tex elle-même n'a pas été détectée dans les souches mutées. Ainsi, ces résultats suggèrent une absence de couplage traductionnel entre les deux gènes (§ V. 1).

V/ Détermination de la fonction de Tex chez *S. aureus*

1. Analyse comparative du protéome de la souche HG001 sauvage et de ses mutants par spectrométrie de masse quantitative LC-MSMS

1.1. Principe de la LC-MSMS

Comme expliqué dans la stratégie expérimentale (§ I. 4), j'ai construit deux mutants d'insertion de Tex. La première insertion a été effectuée à la position 404 du gène (Δ Tex) qui doit abolir la synthèse de la protéine car placée en tout début de gène et l'autre a été insérée juste avant le domaine S1 de Tex (Tex Δ S1). L'insertion correcte des introns a été contrôlée par Northern blot (**Figure 25**). Dans le but d'obtenir des informations sur les cibles régulées par Tex, le protéome des souches sauvages et mutées dans le contexte génétique de la souche HG001 a été analysé par LC-MSMS (*Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry*), en collaboration avec la plateforme protéomique de Strasbourg (P. Hammann, L. Kuhn et J. Chicher, Strasbourg). J'ai choisi d'effectuer cette étude avec la souche HG001, plutôt que la souche RN6390, dans laquelle la mutation au niveau du gène *rsbU* a été corrigée (Herbert *et al.*, 2010).

Les mots clés pour réussir une analyse quantitative de protéome sont *reproductibilité expérimentale* et *réplicas biologiques*. Ils conditionnent la fiabilité et la finesse des variations observées. Concrètement, après séparation par chromatographie en phase inverse et ionisation, les peptides sont focalisés et transmis par des champs électrostatiques à un premier analyseur de type Quadrupôle, qui permet leur séparation en fonction d'une première gamme de rapport masse/charge (m/z). Après cette première séparation, les peptides sont fragmentés dans une chambre de collision, puis envoyés à un second analyseur de type TOF (*Time Of Flight*), qui mesure la vitesse avec laquelle les fragments le traversent ou « temps de vol », permettant d'obtenir leur rapport m/z . Ces derniers sont ensuite envoyés sur un détecteur, qui permet d'obtenir un spectre représenté graphiquement par l'intensité du signal en fonction du temps de rétention des peptides ionisés (**Figure 28**). Chaque spectre de fragmentation peptidique est caractérisé par la masse du peptide fragmenté, l'état de charge du peptide, son temps de rétention et les masses des fragments associés.

Cette technique très puissante est en plein essor. Elle bénéficie des progrès des spectromètres en précision de masse, qualité spectrale de fragmentation et vitesse d'acquisition (indispensable pour l'analyse de protéomes complexes).

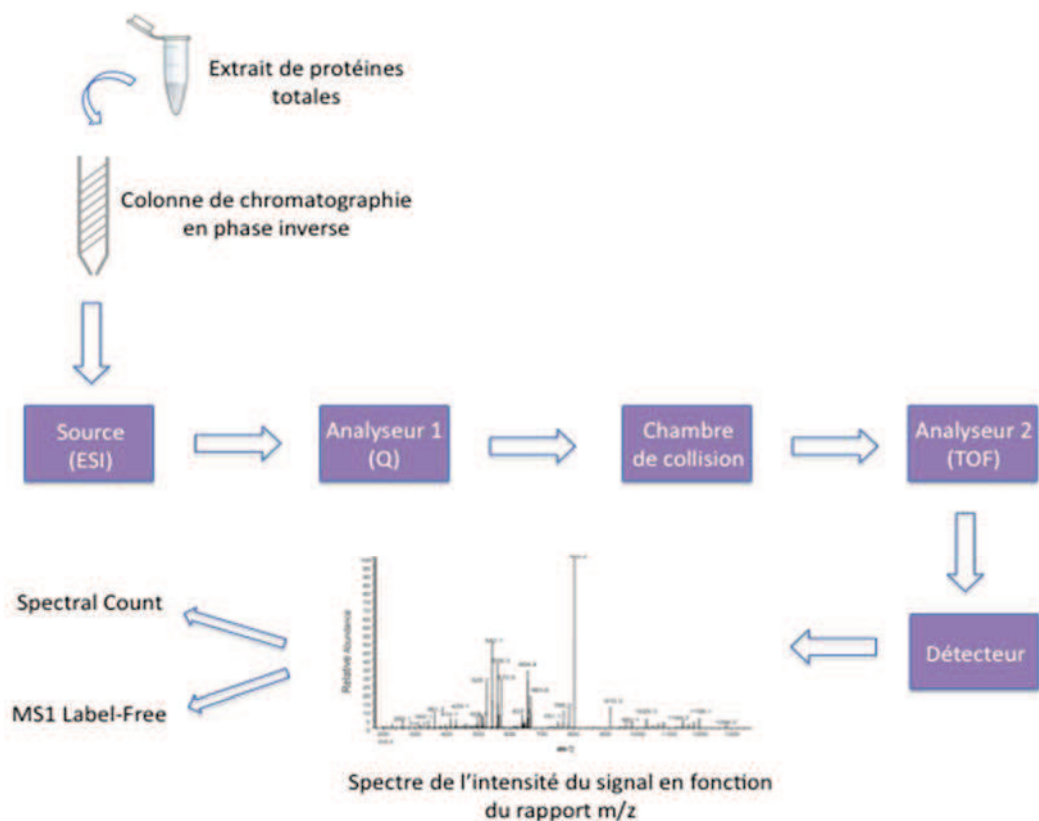


Figure 28. Représentation schématique des différentes étapes de l'analyse d'un extrait de protéines totales par LC-MS MS.

1.2. Identification des protéines de l'échantillon

Deux méthodes complémentaires ont été utilisées pour identifier et quantifier les protéines présentes dans l'échantillon.

Quantification relative par la méthode du Spectral Count. Cette première méthode se base sur la liste des protéines identifiées par le moteur de recherche Mascot (<http://www.matrixscience.com>). Cette liste comporte une information quantitative qui est représentée par le nombre de spectres MSMS utilisés pour identifier une protéine. Celui-ci est directement relié à l'abondance relative de la protéine dans l'extrait. Le taux d'expression de cette protéine est alors déterminé par le rapport :

$$\frac{\text{(nombre de spectres MSMS par protéine dans une condition A)}}{\text{(nombre de spectres MSMS par protéine dans une condition B)}}$$

Méthode MS1 Label-Free. Cette seconde méthode peut être appliquée sur les données MS sans marquage préalable des protéines. Ici, l'aire de chaque peptide associée à l'identification d'une protéine est calculée grâce à un logiciel. Le taux d'expression est alors déterminé par le rapport :

(Σ aires des peptides d'une protéine en condition A)

(Σ aires des peptides de la même protéine en condition B)

Limites et complémentarité des deux méthodes. Pour le Spectral Count, en dessous d'une valeur seuil de 5 spectres MSMS par identification, l'exploitation du différentiel d'expression est problématique. Les données avoisinent le seuil de détection du spectromètre de masse. De même, un peptide nettement détecté lors de l'élution peut générer des spectres MSMS de mauvaise qualité, reflétant une séquence d'acides aminés peu favorable à la fragmentation. Celui-ci n'apparaîtra pas dans le tableau d'identification, non pas par faible abondance mais par mauvaise propriété d'ionisation et de fragmentation.

La technique MS1 Label-Free est plus sensible que le Spectral Count mais une limitation informatique pollue l'exploitation des résultats. La reconstitution automatique des pics d'élutions peptidiques et le calcul d'intégration peut présenter des anomalies d'intégration. En effet dans le cas de léger décalage de temps de rétention entre les répliques, associé à un profil d'expression de type présence/absence, il arrive que le logiciel « force » l'intégration d'un pic dans la condition absence, générant des résultats erronés.

1.3. Cheminement expérimental

Afin de caractériser les cibles candidates de la protéine Tex, les extraits totaux de protéines de la souche HG001 exprimant la protéine Tex wt, ou portant les mutations Δ Tex ou Tex Δ S1, ont été préparés en triplicats et soumis à l'analyse LC-MSMS décrite ci-dessus. L'impression générale concernant la qualité *a priori* de l'expérience est relativement favorable, illustrée par la présence des indices qualitatifs d'une bonne reproductibilité expérimentale (préparation de l'échantillon, dosage par la méthode de Bradford et séparation chromatographique). En effet, une bonne superposition des 9 profils d'élution peptidiques chromatographiques (correspondant aux 3 conditions testées en triplicats Tex wt, Δ Tex et Tex Δ S1) (**Figure 29A**) et une homogénéité du nombre total de spectres MSMS de protéines identifiées par Mascot à FDR < 1% (**Figure 29B**) ont été observées.

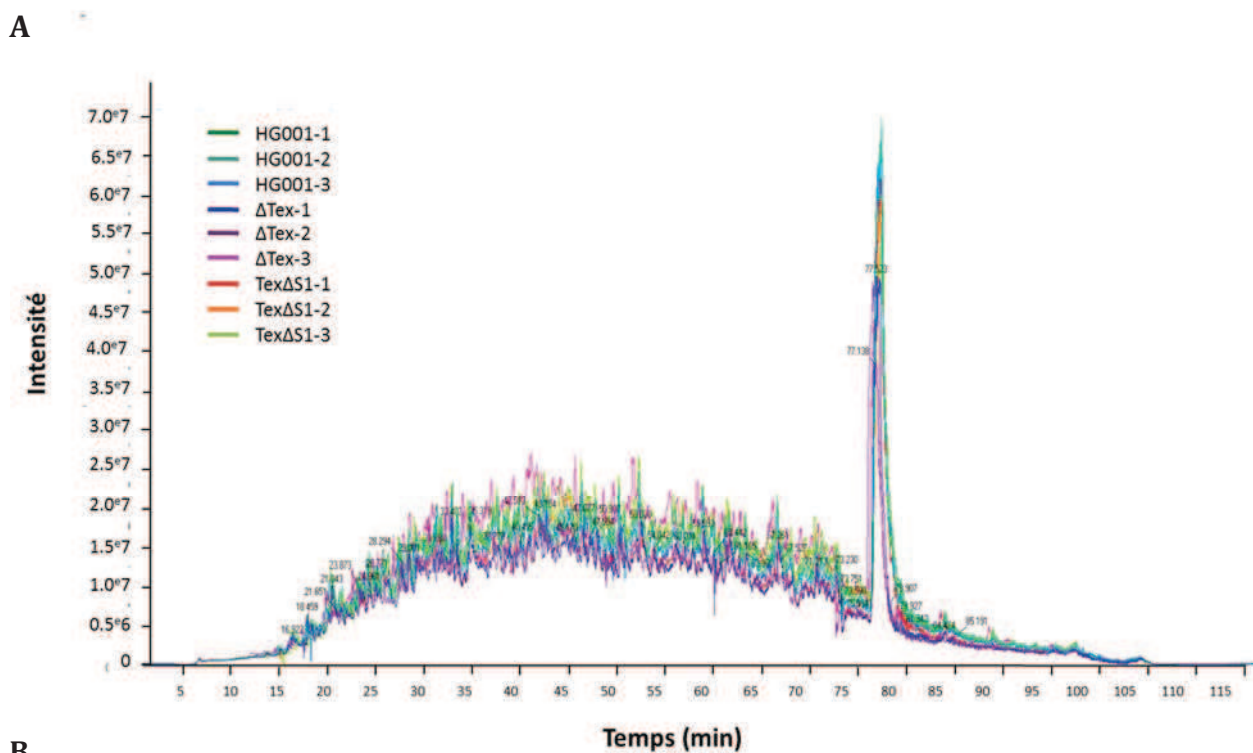


Figure 29. Indices de qualité *a priori* de l'analyse comparative des protéomes (P. Hammann, IBMC Strasbourg).

(A) Superposition de l'intensité des spectres obtenus après élution des peptides par chromatographie en phase inverse. Les spectres des neuf conditions testées sont superposés. **(B)** Nombre de spectres obtenus après quantification des spectres par Spectral Count. Le nombre de spectre obtenu entre les différentes conditions est homogène. La forte superposition des spectres après élution des peptides et le nombre homogène de spectres obtenus par Spectral Count, témoignent d'une bonne reproductibilité des échantillons entre eux.

Les deux méthodes de Spectral Count et MS1 Label-Free ont été utilisées pour l'analyse comparative des protéomes de la souche HG001 portant la protéine Tex wt, ΔTex ou TexΔS1, permettant ainsi la fiabilité des variations observées. Des outils statistiques de validation de ces variations ont également été mis en place, qui comprennent le calcul du coefficient de variation. Enfin, pour chaque technique, les différentiels d'expression observés avec des rapports plus ou moins supérieurs à deux ont été fusionnés. Les protéines d'intérêt montrant des tendances de variations identiques ont toutes été contrôlées manuellement (intégration manuelle des aires peptidiques). Voici donc concrètement, la démarche expérimentale utilisée pour identifier les protéines dont la synthèse est dérégulée par Tex.

Après traitement de nos échantillons par le spectromètre de masse, 867 protéines ont été identifiées dans les trois souches par la technique du Spectral Count. Sachant que *S. aureus*

possède près de 2500 ORFs, nous sommes donc ici en présence d'environ 35% des protéines totales du génome observable de *S. aureus*. Cette limitation du répertoire protéique est due aux limites de charge d'échantillon sur HPLC ainsi qu'au temps de séparation des peptides, qui impose une contrainte d'immobilisation du spectromètre de masse. Sur ces 867 protéines, seulement 693 ont été retenues après analyse par MS1 Label-Free. Le rapport des valeurs obtenues par spectral count ou par MS1 Label-Free a ensuite été effectué entre chaque souche mutée et la souche sauvage ($\Delta\text{Tex}/\text{HG001}$ et $\text{Tex}\Delta\text{S1}/\text{HG001}$). Dans l'approche Spectral Count, les protéines candidates retenues ont un rapport supérieur à 2 (répression) ou inférieur à 0.5 (activation), témoignant d'un effet significatif de Tex sur leur synthèse (Annexes, **Tableau 1**). Dans l'approche MS1 Label-Free (Annexes, **Tableau 2**), les protéines sélectionnées ont un rapport supérieur à 2 ou inférieur à 0.5, avec une *p-value* inférieure à 0.05. Ces étapes successives d'analyse ont ainsi permis de sélectionner 54 protéines. Les résultats obtenus par les deux approches ont ensuite été comparés pour ne prendre en compte que les protéines dont les rapports évoluent dans le même sens par les deux approches avec des données statistiques significatives. Nous avons observé que les données obtenues entre la technique du Spectral Count et du MS1 Label-Free ne présentaient pas toujours la même tendance. Une dernière analyse a alors été effectuée pour vérifier manuellement les spectres obtenus et recalculer les aires de chaque peptide sachant que parfois, la migration des peptides n'est pas strictement superposable d'une expérience à l'autre et nécessite dans certains cas une correction manuelle. Le résultat final de cette analyse manuelle a démontré que sur les 54 protéines, seulement 3 d'entre elles seulement présentent une variation significative et fiable (Annexes, **Tableau 3**). Ce résultat témoigne donc de variations très faibles observées entre les différentes conditions, impliquant des protéines faiblement abondantes ou proches du seuil de détection de cette expérience, mais dont la régulation semble fine.

A ce stade de nos expériences, il était essentiel de vérifier que la protéine Tex et la protéine SA1867 codée par le même opéron (§ IV. 3) étaient toutes deux produites dans la souche sauvage et que les deux mutations réalisées ($\text{Tex}\Delta\text{S1}$ et ΔTex) conduisaient à la synthèse de protéines tronquées et n'affectaient pas la synthèse de SA1867. En effet, nous n'avons pas pu compléter les souches mutantes de Tex, à cause d'une impossibilité à cloner le gène *tex* dans *E. coli*. De manière intéressante, l'histogramme ci-dessous montre que la protéine SA1867 a été trouvée exprimée dans les trois souches et que celle-ci se trouve à un niveau d'expression identique dans les souches sauvage et mutées (**Figure 30**). En revanche dans les deux souches mutées, la protéine Tex tronquée n'a pas été détectée (**Figure 30**). Ceci est particulièrement surprenant pour la souche 2001 qui aurait dû générer une protéine délétée du domaine S1.

Comme évoqué plus haut (§ IV. 2), il se pourrait que l'introduction de l'intron avec des codons stop multiples ait généré un ARNm *tex* instable ou que la protéine tronquée soit plus instable que la protéine sauvage. Ces résultats suggèrent donc que les souches Δ Tex et Tex Δ S1 devraient générer des phénotypes équivalents. D'autre part, la détection de la protéine SA1867 dans toutes les conditions indique l'absence de potentiels effets polaires dus à l'insertion de l'intron dans le gène *tex* et de couplage traductionnel entre Tex et SA1867.

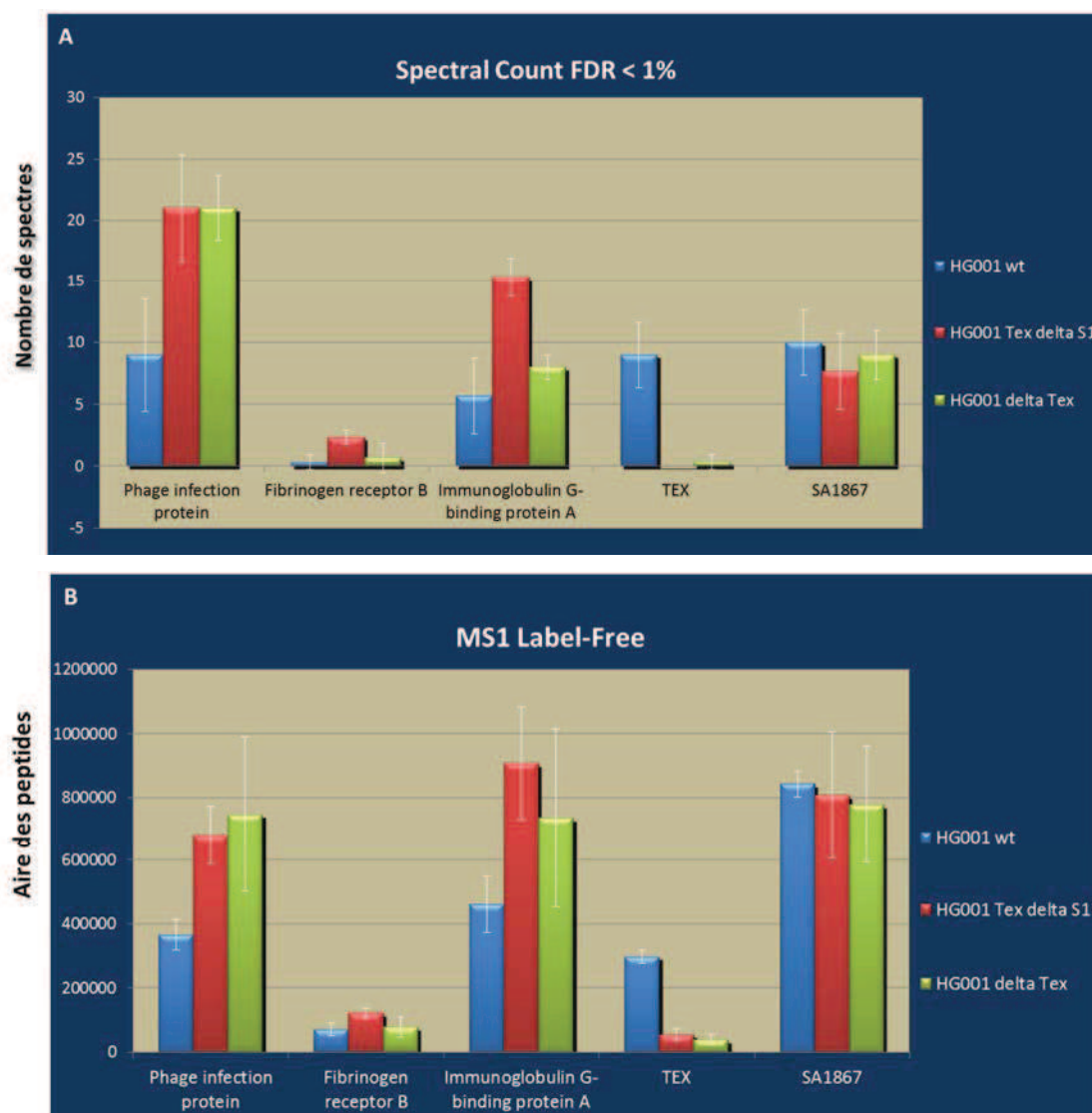


Figure 30. Représentation graphique des niveaux d'expression des trois protéines retenues (Phage Infection Protein, FnbB et Spa) ainsi que Tex et SA1867 par Spectral Count (A) ou MS1 Label-Free (B) dans la souche HG001 sauvage (bleu), HG001-Tex Δ S1 (rouge) ou HG001- Δ Tex (vert) (P. Hammann, IBMC, Strasbourg).

Les résultats montrent premièrement que globalement les mutations introduites dans le gène *tex* ont induit peu d'effet sur le protéome de *S. aureus*. Les deux souches mutantes semblent se comporter de manière similaire, bien que les analyses brutes de spectrométrie de masse aient révélé quelques différences qui ont souvent été attribuées à une mauvaise reproductibilité des triplicats effectués pour chaque souche (Annexes, **Tableau 1** mentions *404 only*).

Deuxièmement, la synthèse de trois protéines est augmentée dans les souches mutantes suggérant que Tex agirait comme répresseur. Il s'agit de la protéine de liaison au fibrinogène (ClfB ou *clumping factor*), de la protéine A (Spa) et d'une protéine appelée « Pip » (*Phage Infection Protein*) (Annexes, **Tableau 3**). Deux de ces protéines sont des facteurs impliqués dans l'adhésion cellulaire, la protéine A et FnbB. Ces deux protéines appartiennent à la grande famille appelée « MSCRAMM » (Introduction, § I. 3), des facteurs de surface ayant un rôle clé dans l'adhésion des cellules hôtes (Clarke et Forster, 2006). Elles sont liées au peptidoglycane de la bactérie et adhèrent aux matrices extracellulaires de l'hôte telles que le fibrinogène ou la fibronectine. Ce groupe de facteurs inclue notamment les protéines reconnaissant la fibronectine (FnbP), les protéines ClfA/ClfB (ou FnbB) et la protéine A.

Les facteurs ClfB ont été démontrés fortement associés à des modèles d'endocardites infectieuses chez le rat (Moreillon *et al.*, 1995). Lors de l'infection, ces facteurs permettent l'adhésion de la bactérie au fibrinogène des thrombocytes recrutés sur la valve cardiaque endommagée, puis leur agrégation successive (Fitzgerald *et al.*, 2006; O'Brien *et al.*, 2002; Sullam *et al.*, 1990). D'autres études ont également permis de définir un rôle de ces protéines dans des modèles d'arthrites (Josefsson *et al.*, 2001; Palmqvist *et al.*, 2005) ou encore dans l'inhibition de la phagocytose par les macrophages (Higgins *et al.*, 2006), via cette activité de liaison au fibrinogène. Enfin, ces facteurs participent eux aussi à la formation des biofilms *icaR*-indépendants et pourraient exercer un rôle clé dans la colonisation des fosses nasales de l'hôte (Ní Eidhin *et al.*, 1998; O'Brien *et al.*, 2002). En plus de leurs fonctions dans l'adhésion, ces protéines exercent de multiples autres fonctions comme celles d'échapper au système immunitaire.

La protéine A se lie aux IgG *via* leur fragment constant, ce qui a pour effet d'empêcher l'activation des cellules du système immunitaire (Foster, 2005). Elle cible également les régions variables des IgM situés sur les lymphocytes B (LB), entraînant une prolifération lymphocytaire anarchique sans sécrétion d'anticorps dirigés contre la bactérie (Bekeredjian-Ding *et al.*, 2007; O'Brien *et al.*, 2002). Cette prolifération mène à l'anergie (inactivation) des LB ou à l'apoptose selon sa concentration (O'Seaghdha *et al.*, 2006). Cette protéine a également été décrite comme interagissant avec le facteur de von Willebrand et contribue à l'inflammation locale des tissus endommagés par l'infection en interagissant avec le facteur TNFR-1 (Gómez *et al.*, 2004). Plus récemment, la protéine A a été trouvée impliquée dans la structure des biofilms *icaR*-indépendants (Merino *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2011). Il a été démontré que sa délétion diminue la capacité de certaines souches de *S. aureus* à adhérer aux cathéters dans un modèle infectieux de la souris (Merino *et al.*, 2009). Enfin, la protéine A peut être détachée du peptidoglycane par les

peptidoglycane hydrolases pour modifier la réponse immunitaire de l'hôte (Becker *et al.*, 2014). Ainsi, cette protéine est requise en début de phase d'infection pour permettre la colonisation de l'hôte et après établissement de l'infection, pour permettre la survie de la bactérie dans l'hôte par des stratégies d'évasion du système immunitaire. Cette pluralité des rôles de la protéine A nécessite une régulation fine de son expression. C'est sans doute pour ces raisons que celle-ci est soumise à un réseau de régulation complexe comprenant de multiples facteurs, dont le système de densité cellulaire *agr*, le facteur Rot, le système à deux composants SaeRS et les facteurs de la famille SarA (Boisset *et al.*, 2007; Geisinger *et al.*, 2006; Giraud *et al.*, 1997; Huntzinger *et al.*, 2005; Novick *et al.*, 1993). Comme la plupart des protéines de surface, la protéine A est exprimée en phase exponentielle de croissance puis réprimée au cours de la phase post-exponentielle (Huntzinger *et al.*, 2005). Pour assurer cette régulation de la protéine, les précédents facteurs vont agir de manière coordonnée (**Figure 31**). Rot (*Repressor of toxins*) joue un rôle crucial dans les premières étapes de l'infection. Il est exprimé en phase exponentielle de croissance et réprime le système à deux composants SaeRS. En conséquence, la synthèse des exotoxines est inhibée (Geisinger *et al.*, 2006; Montgomery *et al.*, 2010). Rot active également le régulateur transcriptionnel SarS, qui se fixe à la région promotrice de *spa*, pour activer sa transcription (Gao et Stewart, 2004; Tegmark *et al.*, 2000). Le régulateur transcriptionnel SarT, qui est également exprimé en début de croissance bactérienne, réprime SaeRS et active SarS (Introduction § II. 2. 2) (Manna et Cheung, 2006; Tegmark *et al.*, 2000), menant ainsi à l'activation de l'ARNm *spa*. Lors du passage en phase post-exponentielle de croissance, le système *agr* est activé sous l'effet de la densité cellulaire et va réprimer la synthèse des protéines d'adhésion nécessaires en début d'infection et promouvoir celle des exotoxines, permettant la dissémination de la bactérie dans l'hôte (Novick, 2003; Novick *et al.*, 1993). L'ARNIII est alors synthétisé et celui-ci va agir de deux manières: (i) il va se fixer directement sur les séquences Shine et Dalgarno des ARNm des protéines de surface dont la protéine A, grâce à un mécanisme de type antisens conduisant à la dégradation successive du duplexe et à la répression irréversible de *spa* (Huntzinger *et al.*, 2005) (ii) l'ARNIII peut également agir indirectement en réprimant la traduction de Rot (Geisinger *et al.*, 2006) et SarT (Schmidt *et al.*, 2003), ce qui a pour conséquence une baisse de la synthèse de SarS, et la répression de l'ARNm *spa*. Le régulateur transcriptionnel SarA, qui est à son maximum d'expression à ce stade de la croissance cellulaire réprime également SarT et SarS et contribue à la répression de la synthèse des protéines d'adhésion (Cheung *et al.*, 2004). Ainsi, ce réseau de régulation complexe implique différents facteurs qui s'entremêlent pour induire la régulation fine des facteurs de virulence de *S. aureus* et notamment de la protéine A.

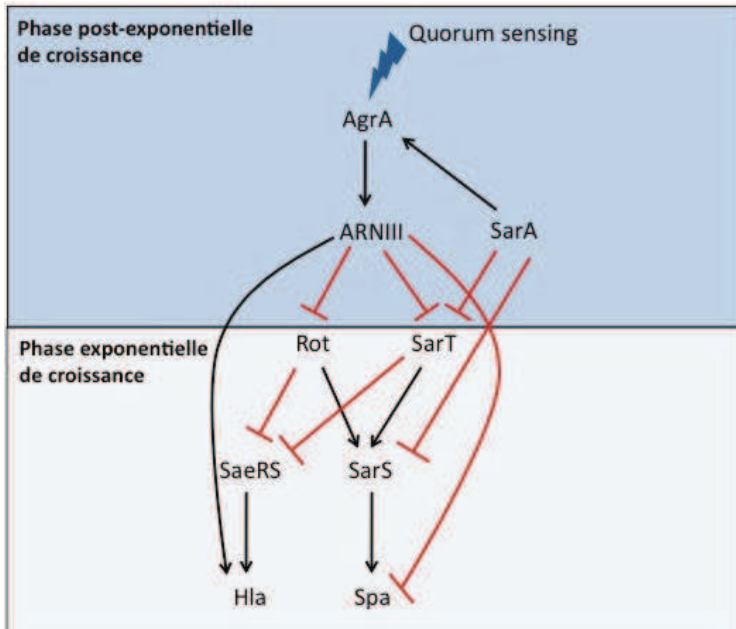


Figure 31. Modèle de régulation transcriptionnelle de *spa*, en fonction de la phase de croissance de *S. aureus*.

La « **Protein Phage Infection** » fait partie d’une classe de protéines exprimées chez les bactéries Gram-positives. C’est une protéine intégrale de la membrane qui a été montrée chez *L. lactis* comme étant nécessaire à l’infection productive par le phage (Mooney *et al.*, 2006). Une mutation non sens introduite dans le gène de cette protéine entraîne une résistance à l’infection par le phage (Garbutt *et al.*, 1997). De plus, c’est la seule protéine requise pour l’infection phagique chez les bactéries Gram positives. Les phages jouent un rôle essentiel dans l’adaptation et l’évolution du règne bactérien. Ils sont en effet responsables de l’acquisition de nombreux gènes de virulence par les bactéries (Deghorain et Van Melderen, 2012; Novick *et al.*, 2010) et de ce fait, contribuent fortement à leur variabilité génétique. L’une des caractéristiques remarquables de *S. aureus* est sa grande capacité d’adaptation à de nombreux environnements (Holden *et al.*, 2004; Lindsay, 2010; Malachowa et DeLeo, 2010). Plusieurs études ont permis de mettre en évidence un rôle essentiel de ces phages dans ces mécanismes d’adaptation. Ils sont en effet responsables du transfert de gènes de résistance aux antibiotiques (Brussow *et al.*, 2004). C’est le cas par exemple de la résistance à la méthicilline et à l’oxacilline, qui sont dues à l’acquisition de la cassette *SCCmec* sur le chromosome (Katayama *et al.*, 2000). Ces phages peuvent également transmettre des gènes de virulence, principalement impliqués dans les stratégies d’évasion du système immunitaire (Lindsay, 2010; Malachowa et DeLeo, 2010). C’est le cas de quelques superantigènes (entérotoxines, TSST-1) ainsi que de certaines leucocidines (PVL) (Introduction § I. 3) (Lindsay *et al.*, 1998). Ces phages ont donc une forte influence sur la dissémination des gènes et peuvent impacter à la fois les souches responsables d’infections communautaires et les souches responsables d’infections en milieu hospitalier.

Ainsi, l'ensemble de ces fonctions suggère que Tex pourrait moduler la synthèse des facteurs d'adhésion au début de la croissance bactérienne. Pour quelle raison Tex intervient-elle dans la régulation de ces facteurs ? Cette protéine serait-elle impliquée dans la régulation des facteurs d'adhésion lors de la transition de la phase de colonisation à la phase d'invasion de l'hôte? Par manque de temps, je n'ai pas réussi à valider ces régulations *in vivo* pour étudier le mécanisme par lequel Tex réprime la synthèse de ces trois protéines. Etant donné la capacité de Tex à se lier aux ARN (§ III), Tex pourrait réguler ses cibles soit au niveau transcriptionnel soit au niveau post-transcriptionnel ou intervenir aux deux niveaux. La détermination du temps de demi-vie de ces ARNm ainsi que la construction de fusions de gènes seront donc essentiels pour déterminer à quel niveau a lieu leur régulation. Ayant analysé les régions promotrices de ces trois gènes, aucun motif consensus n'a été retrouvé suggérant qu'ils pourraient être réprimés de manière indirecte par Tex. C'est pourquoi, je me suis également intéressée au cours de ma thèse à déterminer les éventuels partenaires de Tex par immunoprécipitation, afin de déterminer si cette protéine intervient dans le cadre d'un complexe particulier pour réguler ses cibles.

2. Construction de mutants d'insertion de *tex* dans les souches RN6390 et HG001 de *S.aureus*

2.1. *Tex* n'est pas essentielle pour la croissance bactérienne

Comme expliqué dans la stratégie expérimentale, j'ai construit deux mutants d'insertion de *Tex*. L'un à la position 404 du gène (« ΔTex »), qui devrait abolir la synthèse de la protéine car placée en tout début de gène et l'autre placée juste devant le domaine S1 de *Tex* (« *Tex* $\Delta S1$ »). L'insertion correcte des introns a été contrôlée par Northern blot (Figure 25). Dans les deux cas, les expériences de protéomique comparative n'ont pas permis de retrouver ces deux protéines mutées dans les échantillons (Résultats § V. 1). Ceci suggère soit qu'elles ne sont pas synthétisées, ce qui pourrait être cohérent pour ΔTex dont l'intron est positionné en tout début de gène, soit qu'elles sont rapidement dégradées. Le fait que ni l'une ni l'autre ne se soit retrouvée lors des expériences de protéomique indique que les deux mutants construits devraient générer des phénotypes équivalents.

Le phénotype de croissance des souches mutées a été analysé en milieu riche BHI et en milieu minimum NZM. Aucun phénotype de croissance n'a été observé dans ces deux milieux (Figure 32), ce qui indique que *Tex* n'est pas essentielle pour la croissance de *S. aureus*.

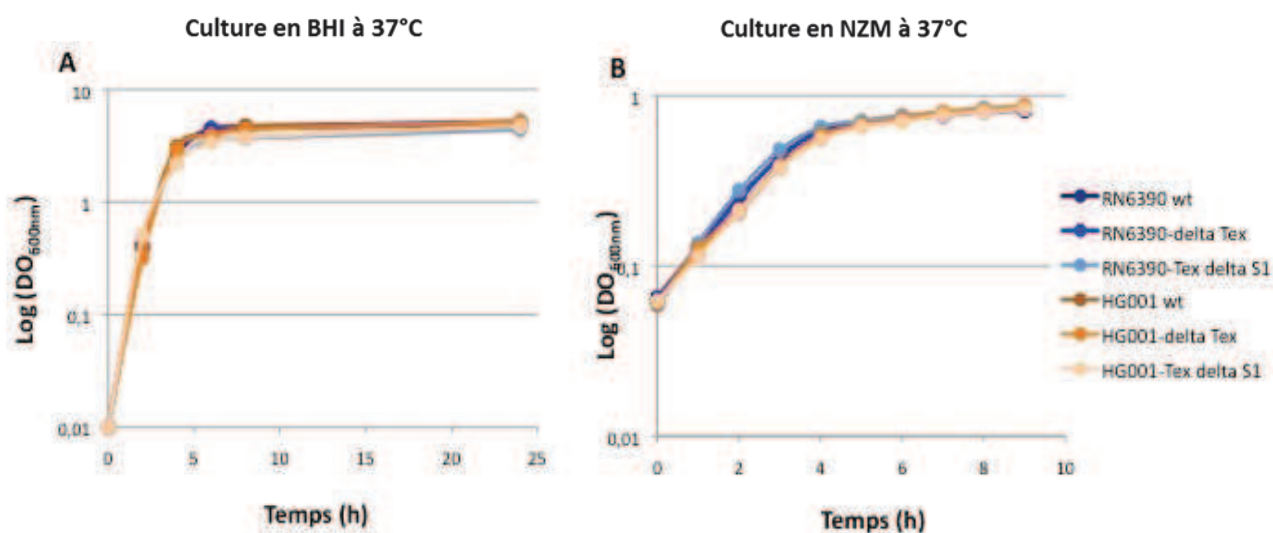


Figure 32. Courbes de croissance des souches RN6390 wt (bleu foncé), RN6390- ΔTex (bleu), RN6390-*Tex* $\Delta S1$ (bleu clair) et HG001 (orange foncé), HG001 ΔTex (orange), HG001- *Tex* $\Delta S1$ (orange clair) en BHI (A) ou NZM (B).

Un volume de 20 ml de milieu BHI ou NZM a été inoculé avec chaque souche par le même nombre de cellules provenant d'une préculture de 1 ml réalisée en BHI pendant la nuit à 37°C. La DO_{600nm} de l'échantillon a été mesurée et le nombre de cellules ensemençé dans les 20 ml de BHI a été ajusté pour chaque fiole. Les cultures en BHI ont été incubées pendant 10 h à 37°C, un aliquot a été prélevé toutes les heures pendant 10 h et la DO_{600nm} a été mesurée. Le même protocole a été suivi pour les cultures en milieu NZM mais la préculture a été préalablement centrifugée et le culot a été lavé deux fois par 1 ml de Tris pH 7.5 à 20°C avant d'être repris dans 1 ml de milieu NZM puis ensemençée dans 20ml du même milieu.

2.2. *Tex* serait un répresseur de la synthèse des biofilms

En collaboration avec F. Vandenesch (INSERM, Lyon), nous avons étudié la production de biofilms dans les deux fonds génétiques RN6390 et HG001 ainsi que leurs mutants respectifs, par la technique du Cristal Violet. Conformément aux données de la littérature, nous avons observé que la souche HG001 produit plus de biofilm que RN6390, à cause de l'inactivation de Sigma B (Cassat *et al.*, 2006). Les souches mutées dans les deux fonds génétiques produisent également un peu plus de biofilm que les souches sauvages respectives (**Figure 33A**). Cette différence est moins marquée avec la souche ΔTex . *Tex* aurait donc un effet répresseur sur la synthèse des biofilms qui est minime mais significatif.

La formation des biofilms a été analysée en présence de 0,25% de glucose dans le milieu. Dans ces conditions, nous avons observé qu'elle était significativement augmentée dans toutes les souches (**Figure 33B**). Toutefois il semblerait que le glucose atténue l'effet répresseur de la protéine *Tex* sur la synthèse des biofilms.

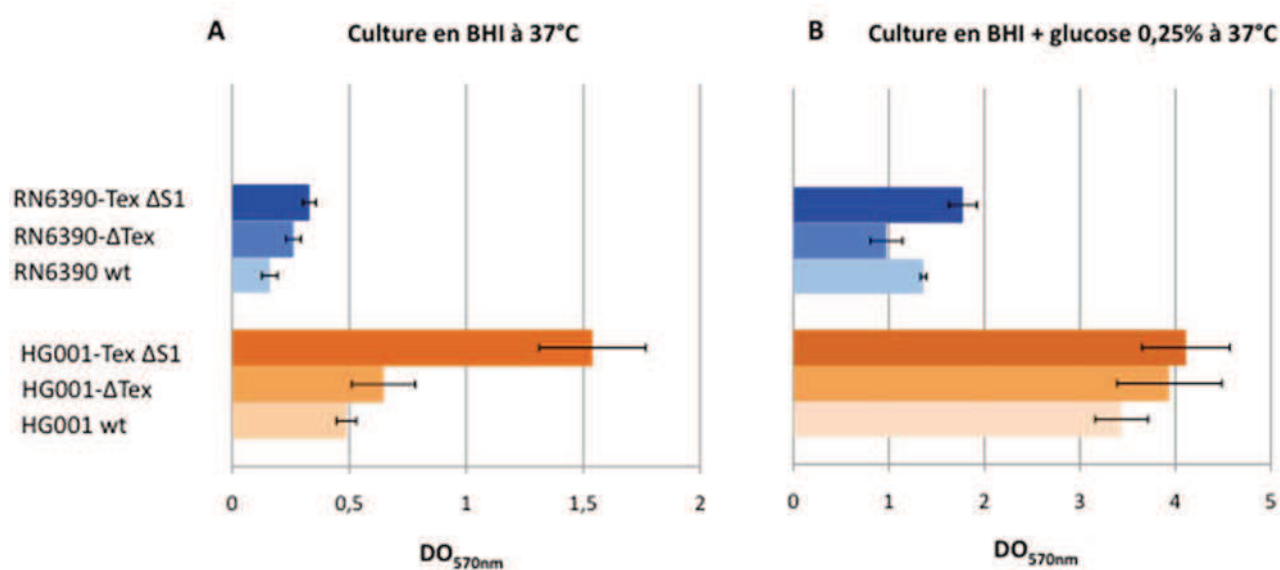


Figure 33. Quantification de la production de biofilms par la technique du Cristal Violet en BHI (A) ou BHI + 0,25 % glucose (B).

Les différentes souches bactériennes ont été cultivées en milieu BHI à 37°C pendant la nuit. Après standardisation à DO_{600nm} = 1, chaque suspension a été diluée au 1:250 en BHI ou en BHI supplémenté de 0,25 % de glucose. 200 μ l de chaque suspension ont été transférés dans une plaque de 96 puits à fond plat, incubée 24 h sans agitation à 37°C. Le biofilm a ensuite été coloré à l'aide d'une solution de 150 μ l de cristal violet (0,01 % p/v) pendant 30 min. Le surplus de colorant a été rincé 4 fois au PBS puis la plaque a été séchée 30 min et le colorant contenu dans le biofilm a été resolubilisé avec 100 μ l d'acide acétique 33 % (v/v). La DO_{570nm} a alors été mesurée pour chaque puits à l'aide d'un lecteur de plaque.

La synthèse des biofilms est complexe et différents types de biofilms ont été décrits (Otto, 2008). Trois étapes composent la formation d'un biofilm et impliquent des facteurs spécifiques pour chacune d'elle (**Figure 34**): (i) l'attachement des bactéries à leur hôte ou à une surface

abiotique est tout d'abord initié par des protéines de surface, (ii) la phase d'agrégation et de maturation du biofilm pendant laquelle sont synthétisés des exopolysaccharides de type PIA/PNAG (*polysaccharide intercellular adhesin/ poly-N-acetylglucosamine*) ou des protéines possédant des fonctions équivalentes et enfin (iii) la phase de détachement des cellules, médiée par la production de surfactants et d'enzymes intervenant dans la lyse du biofilm.

Contenu soumis au droit d'auteur

Figure 34. Représentation schématique des différentes phases de formation d'un biofilm chez le genre *Staphylococcus* (figure adaptée de Otto, 2008).

Les biofilms se forment tout d'abord par adhésion des protéines de surface de la bactérie aux protéines de matrice extracellulaire de l'hôte soit directement sur les tissus, soit sur le matériel biomédical invasif, recouvert de ces protéines juste après leur insertion. Des études antérieures ont également démontré que les autoloysines pouvaient contribuer à l'adhésion des cellules, notamment sur les surfaces abiotiques (Heilmann *et al.*, 1997 et 2003). Une fois l'adhésion réalisée, le biofilm se développe et devient mature. Les molécules qui permettent le maintien des cellules dans le biofilms sont essentiellement des exopolysaccharides, des acides téichoïques ou d'autres protéines comme la protéine Aap (*accumulation-associated protein*). Finalement, lorsque la dissémination des bactéries devient nécessaire, le biofilm se détache. Différents facteurs peuvent alors contribuer au détachement du biofilm, incluant des forces mécaniques provoquées par le flux sanguin de l'hôte ou l'arrêt de la synthèse d'exopolysaccharides. Des facteurs spécifiques vont également intervenir pouvant avoir des propriétés surfactantes, qui vont lyser le biofilm mature.

Le polysaccharide PIA/PNAG est synthétisé par le locus génétique *ica* (*intercellular adhesion*), initialement découvert chez *S. epidermidis* (Heilmann *et al.*, 1996) puis retrouvé plus tard chez *S. aureus* (Cramton *et al.*, 1999). Ce locus est organisé en opéron composé des quatre gènes *icaADBC* (Figure 35). Le gène *icaR*, transcrit à partir d'un promoteur divergent à *icaADBC*, joue le rôle de répresseur de cet opéron en se liant à la séquence promotrice située juste en amont de *icaA* (Cramton *et al.*, 1999).



Figure 35. Représentation schématique du locus génétique *ica*, sur le génome.

Ces dernières années, de nombreuses études ont démontré que la production de biofilms chez le genre *Staphylococcus* est soumise à une régulation complexe. En effet, divers facteurs environnementaux tels que la température, la présence d'éthanol, de sodium ou encore de glucose dans le milieu, sont capables d'influencer la production de biofilms (Cue *et al.*, 2012; Lim *et al.*, 2004). Certains de ces facteurs peuvent agir directement sur l'opéron *ica*, ou par des voies de régulation *ica*-indépendantes. Il a été démontré par exemple chez *S. epidermidis*, que l'éthanol induit la synthèse de biofilms en interagissant directement avec le répresseur *icaR* de l'opéron *icaADBC* (Conlon *et al.*, 2002). En revanche, le mécanisme d'induction des biofilms NaCl-glucose dépendant ne semble pas relié directement à *icaR* et ferait intervenir d'autres facteurs de régulation pour l'activation indirecte de l'opéron *ica* (Conlon *et al.*, 2002; Dobinsky *et al.*, 2003). Chez *S. epidermidis*, la capacité à former des biofilms a été démontrée fortement associée au locus *ica* (Fitzpatrick *et al.*, 2002; Ziebuhr *et al.*, 1997). Chez *S. aureus* en revanche, cette corrélation semble plus difficile à établir en raison des nombreux facteurs intervenant dans la régulation des biofilms mais également, de leur synthèse (Fitzpatrick *et al.*, 2005, O'Neill *et al.*, 2007, 2008). Le régulateur global *agr* par exemple, inhibe la production de biofilms lors de son activation en phase post-exponentielle de croissance, indépendamment de la synthèse de PIA/PNAG (Vuong *et al.*, 2000). Le facteur alternatif de transcription Sigma B en revanche, été décrit comme activateur de la production de biofilms, notamment en conditions de stress (Rachid *et al.*, 2000). De plus, bien que le locus *ica* soit conservé dans la majorité des souches, la production de biofilms *ica*-indépendants a été démontrée à différentes reprises, notamment dans les souches cliniques résistantes à la méthicilline (MRSA) (Fitzpatrick *et al.*, 2005; O'Neill *et al.*, 2007, 2008). Ces dernières études ont mis en évidence la production de biofilms *ica*-indépendants notamment en présence de glucose dans le milieu, composés majoritairement de protéines. En effet, plus de 21 protéines de surface ont été identifiées chez *S. aureus*, possédant un motif conservé LPXTG nécessaire à leur ancrage à la surface cellulaire par une enzyme, la sortase (Mazmanian *et al.*, 2000, 2002). O'Neill *et al.* (2007) ont montré que des souches délétées du gène de la sortase *srtA* induisent une diminution drastique de la densité de biofilms produits, confirmant l'implication de protéines de surface dans ces mécanismes. L'impact de protéines LPXTG elles-mêmes a aussi été analysé et a révélé que parmi les protéines mutées, seule la délétion des protéines FnbPA et FnbPB (*fibronectin binding proteins A et B*) réduisait fortement la synthèse de biofilms de

plusieurs souches MRSA, indiquant un rôle important de ces protéines dans les mécanismes de synthèse du biofilm.

Afin de connaître la nature des biofilms produits, C. Lays (INSERM, Lyon) a effectué des immunoblots avec des anticorps anti-PIA/PNAG, en présence de 0,25% de glucose. Les analyses montrent que les souches HG001 répondent aux anticorps anti-PIA/PNAG mais les mutations introduites dans le gène *tex* n'ont aucune incidence sur la synthèse des biofilms (**Figure 36A**). Ceci suggère que dans les expériences de Cristal Violet, les biofilms induits dans les souches HG001 mutées par rapport à la souche sauvage ne sont probablement pas de nature polysaccharidique, ce qui semble aller dans le sens d'une production de biofilms *ica*-indépendante (**Figure 36B**). Concernant la souche RN6390, le profil semble cohérent avec la quantification des biofilms au Cristal Violet, puisque nous observons une induction plus forte pour la souche RN6390-*Tex* Δ S1 que RN6390- Δ Tex et intermédiaire pour la souche sauvage. De plus, les souches RN6390 répondent aux anticorps anti-PIA/PNAG, ce qui indique que le type de biofilms observé est bien de nature polysaccharidique. Sachant que les deux souches mutées ne produisent pas de protéines Tex, il est surprenant de trouver un phénotype légèrement différent pour ces deux souches mutées. Il sera donc important de vérifier par séquençage des génomes que nous n'avons pas accumulé d'autres mutations dans le génome.

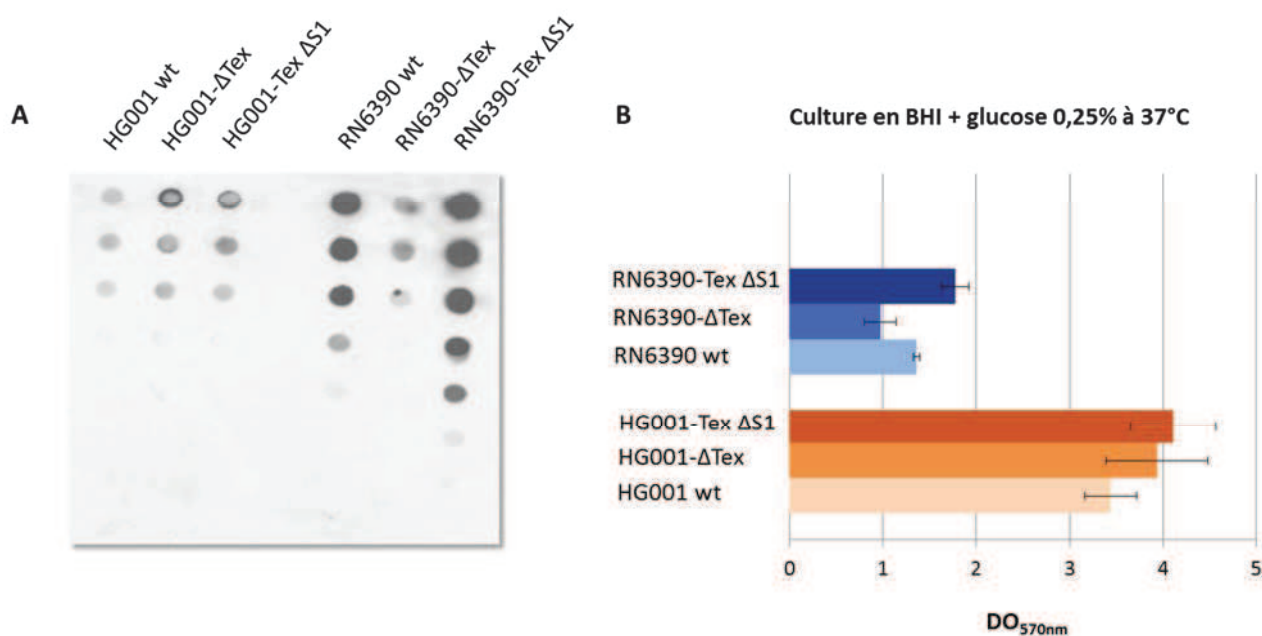


Figure 36. Quantification de la production de PIA/PNAG par immunoblot (A) et de la production de biofilms par la technique du Cristal Violet (B).

Pour les deux expériences, les souches ont été cultivées en BHI + 0,25% de glucose, à 37°C. Après lecture de la DO_{600nm} des cultures, les cellules ont été lysées avec de la lysostaphine, puis traitées avec de la DNase I et de la protéinase K. Les échantillons ont ensuite été dilués en cascade (dilution de trois fois) puis transférés sur une membrane de nitrocellulose avant d'être incubés avec les anticorps anti-PIA.

VI/ Identification des ARN et protéines partenaires de Tex

1. Contrôles pré-analytiques

Dans le but d'apporter d'autres informations sur les fonctions de Tex, j'ai réalisé des expériences d'immunoprécipitation en utilisant une souche qui exprime la protéine Tex wt ou Tex Δ S1 portant une étiquette FLAG, afin de caractériser les ARN et les protéines partenaires liés à chacune. Après immunoprécipitation, les ARN seront identifiés par séquençage haut débit (RNA-seq) et les protéines par LC-MSMS (§ V.1). J'ai réalisé plusieurs expériences pilotes afin de déterminer les conditions expérimentales qui me permettent d'obtenir des échantillons analysables par les approches haut débit.

J'ai tout d'abord vérifié que l'insertion de l'étiquette FLAG dans la souche ne perturbait pas la croissance des souches et que la régulation de *tex* était préservée (**Figure 37**).

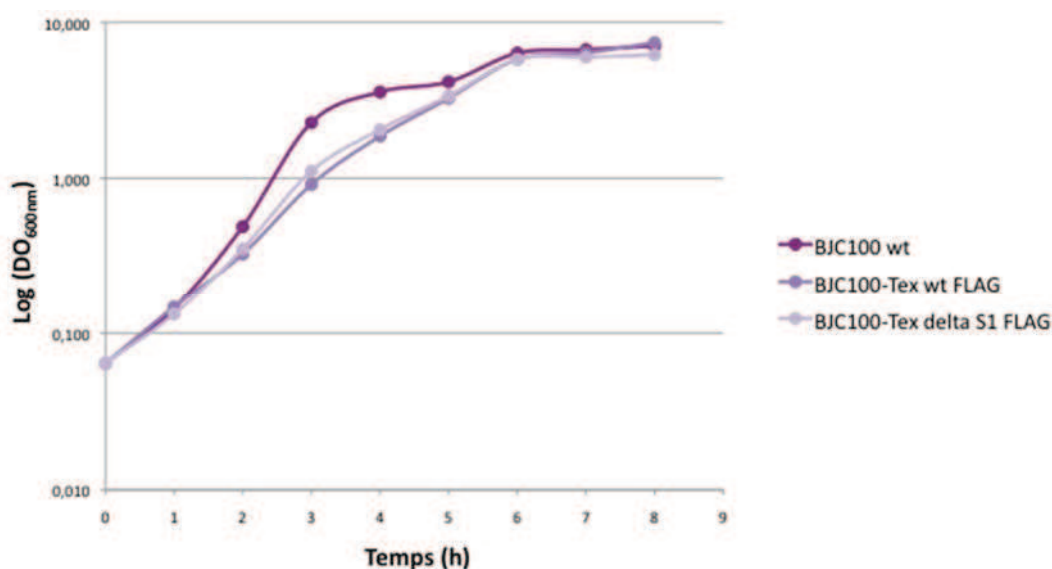


Figure 37. Courbes de croissance des souches BJC100 wt ne portant pas d'étiquette FLAG (violet foncé), BJC100-Tex wt FLAG (violet) et BJC100-Tex Δ S1 FLAG (violet clair).

Un volume de 20 ml de BHI a été inoculé pour chaque souche par le même nombre de cellules provenant d'une préculture de 1 ml en BHI pendant la nuit à 37°C. La DO_{600nm} de la préculture a été mesurée et le nombre de cellules ensemencé dans les 20 ml de BHI a été ajusté pour chaque fiole. Les cultures ont été incubées pendant 8 h à 37°C, un aliquot a été prélevé toutes les heures pendant 8 h et la DO_{600nm} a été mesurée.

J'ai ensuite vérifié que l'expression des protéines étiquetées était dépendante de la phase de croissance afin de déterminer les conditions optimales d'expression de Tex, c'est à dire 3 h à 37°C dans le milieu BHI. Après chaque étape du protocole, une fraction aliquote a été conservée et déposée sur gel de polyacrylamide (**Figure 38**). Un contrôle de la qualité des ARN co-élués avec Tex a été réalisé par mesure du profil d'absorbance à 260 nm ainsi que du rapport

$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$. Bien que l'échantillon d'ARN immunoprécipités avec la protéine sauvage présentait un ratio $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ supérieur à 2, un pic d'absorbance très important à 240 nm indiquait la présence de phénol dans le milieu. Malgré l'ajout de plusieurs étapes de purification par du chloroforme isoamylique, je ne suis pas parvenue à éliminer ces traces contaminantes. Cependant, j'ai tout de même analysé si dans cette expérience pilote, l'ARNIII était présent, par une réaction de RT-PCR. En effet, les expériences de chromatographie d'affinité réalisées antérieurement (§ Objectifs) font de lui un bon témoin de réaction, puisque cet ARN se lie à Tex. Cependant, l'ARNIII n'a pas été amplifié dans cet échantillon, ni d'ailleurs dans les extraits d'ARN totaux de la même souche. Il est donc très probable qu'après 3 h de croissance le taux d'ARNIII ne soit pas suffisant, sachant que celui-ci s'accumule en phase stationnaire de croissance. Ainsi, il sera nécessaire d'augmenter la quantité d'extrait brut pour effectuer l'analyse par RNA-seq. Seule l'analyse des protéines partenaires de Tex a été poursuivie, qui est décrite dans le paragraphe suivant.

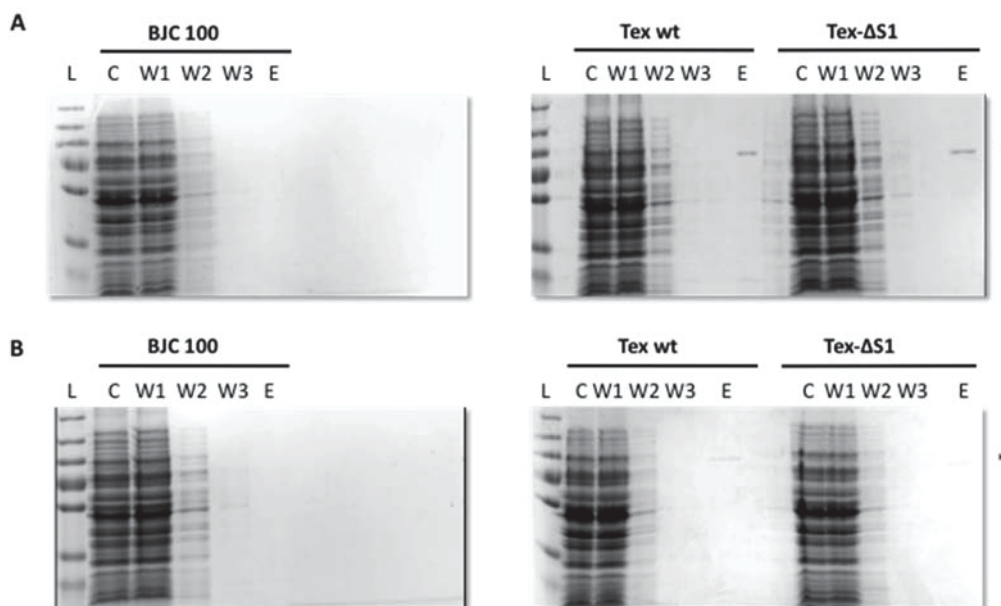


Figure 38. Contrôle de l'expression de la protéine Tex au cours des immunoprécipitations avec les protéines partenaires (A) ou les ARN partenaires sur gel de polycacrylamide 10% (B).

Une fraction aliquote de 10 μl est prélevée à chaque étape de l'immunoprécipitation, mélangée à 5 μl de bleu de dépôt et déposée sur gel SDS-PAGE 10%. L = ladder, C = aliquote prélevée après centrifugation de l'extrait incubé avec l'anticorps anti-FLAG, W = contenu de l'échantillon après lavage, E = contenu de l'échantillon après élution. La présence de Tex ou Tex Δ S1 est symbolisée par la présence d'une petite étoile sur la droite des gels. Comme attendu, la protéine n'est pas détectée dans la souche BJC100, qui ne porte pas de FLAG.

2. Analyse des partenaires protéiques de Tex

2.1. Cheminement expérimental

Les éluats d'immunoprécipitation de Tex avec ses partenaires protéiques ont été analysés par la technique « Spectral Count ». Comme décrit précédemment, nous avons procédé à une sélection stringente pour caractériser les éventuels partenaires de Tex et l'effet de la délétion du domaine S1.

Tout d'abord, les protéines éluées spécifiquement dans chaque échantillon ont été identifiées : 117 protéines ont été retrouvées dans la souche BJC100 ne contenant pas d'étiquette FLAG, 392 protéines dans la souche Tex wt et 62 protéines dans la souche Tex Δ S1. Nous avons ensuite éliminé toutes les protéines retenues de manière non spécifique aux billes. Ces dernières étant nombreuses et majoritairement représentées par les protéines ribosomales, connues pour être abondantes dans la cellule. Enfin, les protéines dont le nombre de spectres était inférieur à 5 ont également été éliminées. De cette manière, nous avons obtenu 66 protéines spécifiques à Tex wt dont 4 protéines communes à Tex wt et Tex Δ S1 (Annexes, **Tableau 4**). Parmi les protéines les plus abondantes associées à Tex wt figurent notamment la PNPase (*polynucléotide phosphorylase*), la RNase J1 et la RNase Y, qui sont quelques unes des protéines composant le dégradosome de *S. aureus*, qui est un complexe multiprotéique impliqué dans la dégradation des ARN au niveau post-transcriptionnel (Romilly *et al.*, 2014; Roux *et al.*, 2011). D'autres protéines parmi les meilleures candidates, ont également été retrouvées liées à Tex, qui ont cette fois un rôle au niveau transcriptionnel. Il s'agit du facteur de transcription Sigma A, de la sous-unité α de la DNA gyrase et du régulateur transcriptionnel SarR. Seules ces trois dernières protéines ainsi qu'une protéine ribosomique très faiblement détectée, sont retrouvées communément chez Tex wt et Tex Δ S1. Cependant l'abondance de la protéine Tex Δ S1 dans cette expérience pilote révèle que l'immunoprécipitation de cette protéine a été moins efficace que celle de Tex wt. Malgré le fait que Tex Δ S1 soit moins abondante que Tex wt, il est tout de même intéressant de noter que la PNPase, qui est l'un des composants majeurs du dégradosome, n'est pas retrouvée associée à Tex Δ S1. Ce résultat suggère que le domaine S1 de Tex pourrait être impliqué dans l'interaction de la protéine avec le dégradosome.

2.2. *Tex* interviendrait-elle dans la régulation post-transcriptionnelle des facteurs d'adhésion via le dégradosome ?

2.2.1 Définition du dégradosome

Ce complexe multi protéique est requis dans les processus normaux de maintien de l'intégrité cellulaire, tels que la maturation des ARN de transfert, des ARN ribosomiques, mais également pour la dégradation de la plupart des ARNm. La régulation de la dégradation des ARNm est souvent mise en place par la cellule pour s'adapter à son environnement (Dressaire *et al.*, 2013; Miller *et al.*, 2011). Le dégradosome a été identifié initialement chez *E. coli*, lors de la purification de l'endoribonucléase E (RNase E) (Carpousis *et al.*, 1994). *In vivo*, cette RNase forme un large complexe protéique avec la polynucléotide phosphorylase (PNPase), une hélicase (RhlB), et une énoïase (Bandyra *et al.*, 2013 pour une revue). Si le mécanisme précis de dégradation des ARN par le dégradosome reste aujourd'hui encore mal connu, différentes études ont été menées sur la caractérisation et la fonction de chacun de ses composants. Ainsi, il a été démontré que la RNase E initie le clivage en 5' de l'ARN monophosphorylé qui est le substrat préférentiel de l'enzyme (Mackie, 1998). Cette reconnaissance se fait après l'attaque par une pyrophosphohydrolase (RppH) qui catalyse la conversion du 5' triphosphate de l'ARN en 5' monophosphate (Deana *et al.*, 2008). L'exoribonucléase 3'-5' qui est la PNPase intervient pour dégrader l'ARN par son extrémité 3' souvent aidée de l'hélicase RhlB qui permet son accès aux régions structurées (Carpousis, 2007; Carpousis *et al.*, 1994; De Lay *et al.*, 2013). D'autres études ont montré chez les Gram négatives, que Hfq (§ Objectifs) est capable de recruter la RNase E, pour dégrader les ARNm souvent ciblés par les ARNnc (Morita *et al.*, 2005). Dans ce modèle, l'ARNnc, est reconnu par la protéine chaperone Hfq qui est elle-même associée à la RNase E. Le complexe ainsi formé est recruté sur l'ARNm cible pour favoriser l'interaction ARNnc-ARNm. La RNase E initie alors la dégradation de l'ARNm cible, qui est ensuite poursuivie par les autres composants du dégradosome, recrutés après ce premier clivage (Figure 39). L'interaction directe de Hfq à la RNase E a cependant été remise en doute mais il est clair que Hfq, les ARNnc, et la RNase E conjointement, interviennent pour réprimer de manière irréversible les ARNm cibles (Desnoyers et Massé, 2012).

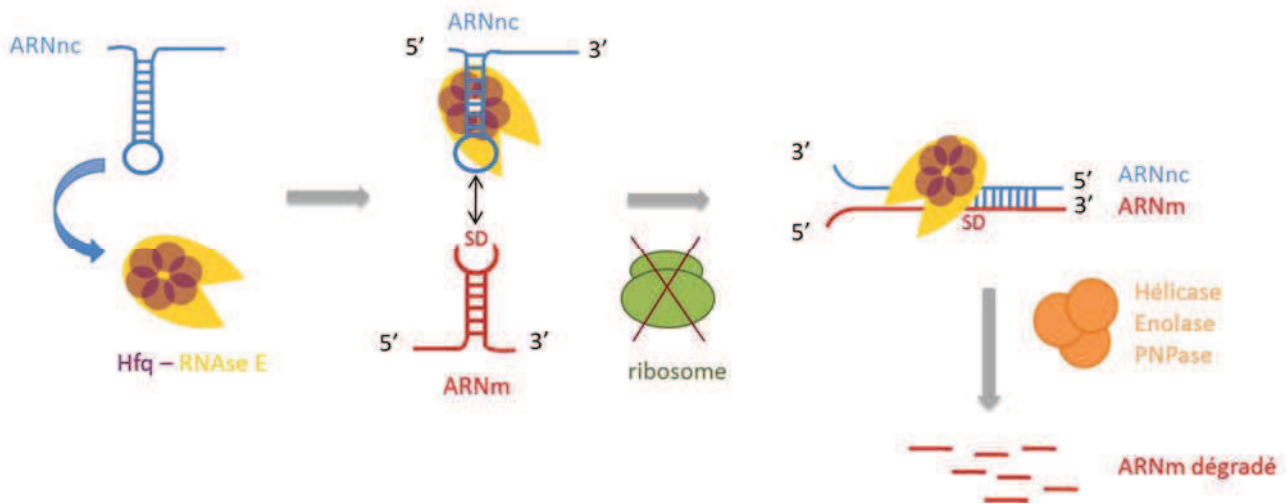


Figure 39. Modèle possible de fonctionnement du dégradosome relié aux ARNnc chez les bactéries Gram négatives.

L'ARNnc (bleu) induit en conditions de stress va se lier au complexe pré-formé Hfq (violet)-RNase E (jaune). Le complexe ternaire Hfq-RNase E-ARNnc va alors se positionner au niveau de la séquence Shine et Dalgarno (SD) de l'ARNm cible (rouge) grâce à un mécanisme d'appariement antisens, ce qui va empêcher l'accès de la séquence SD au ribosome (vert). La dégradation de l'ARNm est ensuite initiée par la RNase E puis poursuivie par les autres composants du dégradosome, pour aboutir à une dégradation complète de celui-ci.

Chez les Gram positives, les composants du dégradosome ont été identifiés tout d'abord chez *Bacillus subtilis* (Commichau *et al.*, 2009) et plus tard chez *Staphylococcus aureus*, notamment par la technique du double hybride (Roux *et al.*, 2011). Deux orthologues fonctionnelles de la RNase E ont été mis en évidence, les RNases J1 et J2, associées comme précédemment à un complexe protéique composé de la PNPase, d'une émolase et d'une hélicase (CshA) (Roux *et al.*, 2011). Deux enzymes supplémentaires ont été identifiées dans le dégradosome des bactéries Gram positives, qui sont la phosphofructokinase, dont le rôle reste pour le moment méconnu et la RNase Y, qui est un homologue fonctionnel de la RNase E (Marincola *et al.*, 2012). L'interaction directe de ces différents partenaires et leur mécanisme précis dans la dégradation des ARNm reste à établir pour ces bactéries. Les RNases J1 et J2, deux homologues fonctionnels de la RNase E sont des enzymes bi fonctionnelles qui possèdent à la fois une activité 5'-3' exonucléase et une activité endonucléase. Grâce à ces deux activités, ces RNases vont donc agir de manière synergique, soit en initiant une dégradation par l'extrémité 5' de l'ARNm ciblé, soit en générant des coupures endonucléolytiques. Dans les deux cas, l'ARNm sera ensuite dégradé par la PNPase dont l'accès aura été facilité par l'hélicase CshA. Le rôle de la RNase Y dans ces mécanismes serait d'intervenir dans la dégradation des ARNm structurés que la RNase J1 ne serait pas capable de dégrader efficacement (Roux *et al.*, 2011). La RNase Y comme la RNase E est présente en partie dans la membrane de la bactérie. Chez *S. aureus*, la RNase Y et les RNases J1/J2 ne sont pas essentielles à la croissance bactérienne, mais elles contribuent à la réponse au stress et à la virulence (Marincola *et al.*, 2012 ; Linder *et al.*, 2014). Enfin, comme

évoqué plus haut, Hfq ne semble pas requise dans les mécanismes de répression des gènes par les ARNnc chez *S. aureus* (Romilly *et al.*, 2012).

Ainsi, sachant que Tex exerce une régulation négative sur les biofilms (§ V. 2. 2) et sur certaines protéines d'adhésion de *S. aureus* (§ V. 1. 3) et que des composants du dégradosome de *S. aureus* ont été immunoprécipités avec Tex (§ VI. 2. 1), serait-il possible d'imaginer que cette protéine contribue aux mécanismes de répression des facteurs d'adhésion par le dégradosome, lors de la transition entre la phase de colonisation et d'invasion de l'hôte?

2.2.2 Tex agirait-elle au niveau post-transcriptionnel pour réprimer les facteurs d'adhésion de *S. aureus* ?

Les protéines d'adhésion trouvées réprimées par Tex dans les expériences de protéomique différentielle, FnbB et la protéine A, sont toutes les deux impliquées dans la synthèse des biofilms *ica*-indépendants (Merino *et al.*, 2009; O'Brien *et al.*, 2002). La protéine A en particulier est un composant essentiel des biofilms de nature protéique. En effet, cette protéine est capable d'initier la formation des biofilms de manière *agr*-dépendante ou *agr*-indépendante (Merino *et al.*, 2009). Sachant que les biofilms observés pour la souche HG001 ne sont probablement pas de nature polysaccharidique (§ V. 2. 2), il est possible que ces deux protéines interviennent dans la formation des biofilms par HG001. Par ailleurs, nous avons immunoprécipité Tex avec des composants du dégradosome (RNase J1, RNase J2, PNPase) (§ VI. 2. 1). Ainsi, nous pourrions émettre l'hypothèse que Tex contribue à la répression de ces facteurs d'adhésion pour permettre la dissémination de la bactérie dans l'hôte. De manière intéressante, diverses études menées ces dernières années ont démontré l'importance du dégradosome pour la régulation post-transcriptionnelle de la synthèse des biofilms. Une étude datée de 2007 par exemple, s'est attachée à isoler les gènes affectant la synthèse des biofilms par la recherche de mutants suppresseurs (Tu Quoc *et al.*, 2007). De cette manière, 19 gènes ont été identifiés parmi lesquels apparaissent ceux de la RNase J1 et J2 et de l'hélicase CshA. Une étude plus récente datée de 2013 (Oun *et al.*, 2013) a démontré que l'hélicase CshA jouait un rôle central dans la dégradation de l'ARNm *agr*, permettant ainsi à la bactérie de passer de la forme persistante à la forme disséminée, dans l'hôte. Par ailleurs, lors de cette transition, la bactérie est également soumise à une régulation au niveau transcriptionnel (Reyes *et al.*, 2011) (Figure 40). Au cours de la phase post-exponentielle de croissance, le système à deux composants *agr* est activé sous l'effet de la densité cellulaire (Novick *et al.*, 2003) et le régulateur de réponse AgrA va se fixer sous forme d'un dimère à deux séquences répétées en tandem sur le promoteur P2 de l'opéron pour auto-activer sa propre expression. Il a été proposé que cette fixation ait pour effet d'induire

un recourbement de l'ADN *agr*, qui est ensuite amplifié par la fixation sur deux séquences en tandem adjacentes du régulateur transcriptionnel SarA (Bayer *et al.*, 1996), qui est exprimé de manière synchrone à *agr* (Introduction, § II. 2. 1) (Chien *et al.*, 1998). Le recourbement induit par cette fixation permet l'interaction des dimères AgrA entre eux et aurait pour conséquence de recruter efficacement la RNAP sur le site d'initiation de la transcription (Reyes *et al.*, 2011). Durant la transition de la phase exponentielle à post-exponentielle de croissance, un autre régulateur transcriptionnel antagoniste de SarA s'accumule, il s'agit de SarR (Introduction, § II. 2. 2). Ce régulateur a été identifié comme répresseur transcriptionnel de SarA (Cheung *et al.*, 2004; Manna et Cheung, 2001) et de l'opéron *agr* (Reyes *et al.*, 2011). Lorsqu'il est exprimé, il se lie à des séquences spécifiques sur l'ARNm *agr*, qui recouvrent partiellement celles de SarA et avec une meilleure affinité que SarA (Reyes *et al.*, 2011). En conséquence, SarR va déplacer SarA du promoteur *agr*. Contrairement à SarA, SarR n'induit pas un recourbement suffisant de l'ADN *agr* pour l'initiation de la transcription, ce qui conduit à une répression progressive du système *agr* pendant la phase post-exponentielle de croissance (**Figure 40**). En réprimant *agr*, la synthèse de la protéine A peut être indirectement augmentée. Il est intéressant ici de signaler que SarR a aussi été trouvé enrichi dans l'immunoprécipitation de Tex.

Ainsi, ne pourrait-on pas imaginer une fonction possible de Tex combinée au dégradosome et à SarR pour réguler finement la transition de la phase de colonisation à la phase d'invasion de l'hôte ? D'autres interactants de Tex ont également été identifiés dans nos immunoprécipitations, qui ont un rôle dans la transcription des gènes. Il s'agit du facteur de transcription Sigma A et de la sous-unité α de l'ADN gyrase. Serait-il alors possible que, à l'image de Spt6, Tex intervienne à la fois au niveau post-transcriptionnel via le dégradosome et au niveau transcriptionnel ?

Figure 40. Modèle proposé par Reyes *et al.* (2011) pour la régulation du promoteur P2 du système Agr par AgrA, SarA et SarR (figure adaptée de Reyes *et al.*, 2011).

Le facteur de transcription majeur pour le promoteur P2 est AgrA, qui se fixe aux séquences en tandem (noir) pour induire un recourbement de 80° conduisant à l'initiation de la transcription. La liaison de SarA va ensuite permettre un recourbement de 80° supplémentaires, conduisant à l'interaction des dimères d'AgrA entre eux. Ce phénomène a pour conséquence de recruter l'ARNP et d'initier la transcription. SarR se lie à un site qui recouvre celui de SarA dans la région promotrice d'*agr*, avec une meilleure affinité que ce dernier. Ainsi, après accumulation de SarR pendant la phase exponentielle tardive de la croissance bactérienne, SarR déplace SarA du promoteur d'*agr*. Contrairement à SarA, SarR n'induit pas de recourbement significatif du message, ce qui a pour conséquence une répression de la transcription par le promoteur P2. Dans le cas du promoteur P3, seul le facteur de transcription AgrA est requis. SarA et SarR contribuent à sa régulation en modulant l'expression d'*agrA* de manière indirecte, via l'activation ou la répression de l'ARNII.

2.2.3 La protéine Tex pourrait-elle faire le lien entre transcription et métabolisme des ARN ?

Comme décrit dans la publication de Johnson *et al.* en 2008 (Introduction, § III. 3), Tex serait l'orthologue de Spt6, qui intervient dans le couplage co-transcriptionnel existant entre transcription et maturation des ARNm. En effet, rappelons que Spt6 contribue à l'élongation de la transcription en interagissant avec l'ARNP II (Hartzog *et al.*, 1998, Kaplan *et al.*, 2000, Yoh *et al.*, 2007) et au contrôle qualité des ARNm par recrutement des composants de l'exosome sur les sites actifs de transcription (Andrulis *et al.*, 2002). De plus, dans leurs travaux sur *P. aeruginosa*, les auteurs ont copurifié Tex avec l'ARNP et des composants du dégradosome. Ceci appuie d'une part l'implication potentielle de Tex dans la dégradation des ARN, mais indique aussi une fonction probable de la protéine au niveau transcriptionnel. De manière intéressante, nos propres expériences d'immunoprécipitation semblent aller dans le même sens, puisque nous avons retrouvé le facteur de transcription Sigma 70 impliqué dans l'initiation de la transcription des gènes de ménage de *S. aureus* (Paget et Helmann, 2003), ainsi que la sous-unité α de l'ADN gyrase. Cette dernière appartient à une classe de protéines appelées topoisomérases, connues pour moduler la topologie de l'ADN au cours de différents processus cellulaires tels que la

réplication ou la transcription (Reece et Maxwell, 1991). Plus particulièrement, ces enzymes induisent un super enroulement négatif du double brin d'ADN, qui peut avoir pour effet d'activer ou de réprimer la transcription (Smith, 1981, Reece et Maxwell, 1991).

Ainsi, l'ensemble de ces données suggèrent qu'à l'image de Spt6, Tex pourrait également lier deux grandes étapes du devenir des ARN, en intervenant à la fois au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel de la régulation des gènes, en particulier impliqués dans l'adhésion de *S. aureus*.

Conclusions & perspectives

I/ La protéine Tex de *S. aureus* possède plusieurs sites de fixation aux ARN.

1. Le domaine OB

Durant ce travail de thèse, je me suis tout d'abord attachée à caractériser les interactions de la protéine Tex de *S. aureus* aux ARN *in vitro*. La liaison de Tex aux acides nucléiques avait déjà été démontrée antérieurement chez *S. pneumoniae* par des expériences de Northwestern et Southwestern (He *et al.*, 2006). Plus tard, Johnson *et al.* (2008) ont montré que la protéine Tex de *P. aeruginosa* est capable d'interagir avec les acides nucléiques, avec une forte préférence pour les ARN en simple brin. Des expériences de chromatographie d'affinité ont également permis d'identifier l'ARNIII de *S. aureus*, qui est l'effecteur intracellulaire du système de densité cellulaire *agr* (Novick *et al.*, 1993 ; Romilly *et al.*, 2012), comme substrat possible de Tex (§ Objectifs). Des expériences d'empreinte enzymatique de Tex sur l'ARNIII et RsaA (Résultats § III. 1. 2) m'ont permis de démontrer premièrement que Tex se lie préférentiellement aux régions simples brins riches en adénines et uraciles.

De manière intéressante, Johnson *et al.* ont mis en évidence la présence d'un motif S1 encore appelé motif OB-fold (*oligonucleotide/oligosaccharide binding proteins*) sur la protéine Tex de *P. aeruginosa* (Introduction, § III. 3). Ce motif est présent dans un large panel de protéines associées au métabolisme des ARN, aussi bien chez les bactéries que chez l'humain (Theobald *et al.*, 2003) et est connu pour sa forte affinité pour les séquences A/U des ARN (e.g. Boni *et al.*, 1991, Zhang et Deutscher, 1992, Komarova *et al.*, 2005). Afin de déterminer l'implication du motif S1 de Tex dans les mécanismes de reconnaissance aux ARN chez *S. aureus*, une protéine mutante délétée de S1 (Tex Δ S1) a été construite et son interaction à différents ARN structurés ou non, a été testée par deux approches complémentaires: la filtration sur nitrocellulose et la spectroscopie de fluorescence (Résultats § III. 2). Les résultats obtenus par ces deux méthodes indiquent que le motif S1 de Tex serait nécessaire à la fixation des motifs simples brins riches en A/U des ARN cibles. En effet, la formation des complexes étudiée par filtration sur nitrocellulose montre que, au contraire de la protéine sauvage, la protéine Tex délétée de son domaine S1 n'est plus capable de reconnaître l'ARN RsaA (Résultats § III. 2. 1) dont le motif central a été identifié comme un site de haute affinité pour Tex (Résultats § III. 1. 1). Par ailleurs, les titrations réalisées par spectroscopie de fluorescence avec des oligoribonucléotides simples brins riches en A/U (RsaAc, CspA, CspA3) ont démontré une liaison efficace de la protéine Tex wt, qui est abolie avec la protéine Tex Δ S1. En revanche, ces mêmes expériences réalisées avec de petits ARN structurés (TB2, TB2 extraboucle) dont la boucle apicale possède une séquence riche en U, sont reconnus

de manière identique par Tex wt et Tex Δ S1 (Résultats § III. 2. 2). Des expériences de compétition réalisées par filtration sur nitrocellulose entre le complexe Tex wt-RsaA radiomarqué et ces mêmes ARN structurés froids montrent que ces motifs ne déplacent qu'une partie des complexes RsaA-Tex wt (Résultats § III. 2. 2). Cependant, contre toute attente, les mêmes expériences de compétition réalisées avec l'oligoribonucléotide CspA (AAAUGGUA), qui possède comme RsaA (UUUAUAUG) une séquence riche en A/U, n'ont pas montré de compétition. Ceci indique soit que CspA ne se lie pas à Tex dans la gamme de concentrations étudiées, soit que cet ARN se lie à un site de Tex qui ne se chevauche pas à celui de RsaA. L'ensemble de mes résultats suggère donc que Tex contient plusieurs domaines de fixation à l'ARN dont le motif OB.

De manière surprenante, ces résultats ne sont pas tout à fait en accord avec ceux de Johnson *et al.* (2008), qui ont démontré que la délétion complète du domaine S1 abolit l'interaction de Tex de *P. aeruginosa* à tout type d'acides nucléiques qu'ils soient en simple brin ou en double brin (ARNsb, ARNdb, ADNsb, ADNdb). Dans ce cas, la formation des complexes a été suivie par gel retard. De plus, leurs expériences ont démontré qu'au-dessous de 10 nts, l'interaction avec Tex wt était aussi abolie. Dans notre cas, Tex wt de *S. aureus* est toujours capable de lier de petits oligoribonucléotides longs de 8 nts.

Ayant constaté ces différences de liaison aux acides nucléiques entre la protéine Tex de *P. aeruginosa* et son homologue de *S. aureus*, j'ai analysé la conservation des domaines S1 entre les deux protéines ainsi que la protéine de choc thermique CspB (*Cold shock protein B*). La structure cristallographique de cette protéine a été résolue en présence d'un hexaribonucléotide rU6 (5'-UUUUUU-3') et d'un heptanucléotide rC7 (5'-GUCUUUA-3'). Ces complexes constituent donc un modèle pour cette famille de protéines (Sachs *et al.*, 2012). Le domaine OB de CspB est organisé sous la forme de 5 feuillets β et est très similaire à celui de Tex de *P. aeruginosa* (Bycroft *et al.*, 1997). Dans le complexe CspB-rU6, les interactions principales sont de type hydrophobe et sont dominées par l'empilement de plusieurs acides aminés aromatiques (His29, Phe27, Phe17, Trp8) avec les uridines U2 à U5 de l'ARN (**Figure 41**). Par ailleurs, des résidus hydrophiles (Gln59, Asp25, Lys7, Asn10) interagissent par liaison hydrogène avec les uridines pour positionner l'ARN correctement sur le domaine S1 et favoriser l'exposition optimale des bases pour s'empiler sur les acides aminés aromatiques (**Figure 41**).

Figure 41. Représentation schématique des interactions de la protéine CspB à son ligand rU6 (figure tirée de Sachs et al., 2012).

L'empilement des acides aminés aromatiques His29, Phe27, Phe17 et Trp8 (en gris) avec les uridines U2 à U5 de l'ARN (en noir) est représenté par des lignes continues, en gris. Les liaisons hydrogènes entre les acides aminés hydrophiles (Gln59, Asp25, lys7, Asn10, en gris) et les uridines U2 à U5 de l'ARN sont en pointillés.

Un modèle similaire de liaison de Tex de *P. aeruginosa* aux ARN peut être envisagé. En effet, basé sur des alignements de séquence avec CspB (**Figure 42A**), un modèle du domaine S1 de la protéine Tex de *P. aeruginosa* (*Pa*-TexS1) complexé à rU6 a été réalisé par S. Marzi (**Figure 42B-C**). Ce modèle montre que la distribution des charges est conservée entre les deux protéines, de même que les acides aminés aromatiques impliqués dans l'interaction directe de S1 avec l'ARN. Les acides aminés Phe27 et His29 correspondant respectivement à Phe671 et His683 dans *Pa*-TexS1 sont strictement conservés. L'acide aminé Trp8 est absent chez *Pa*-TexS1 et Phe27 est substitué par un résidu hydrophobe mais non aromatique, Leu681 (**Figure 42C**). L'analyse de la structure par RMN de CspB-rU6 suggère également que le site d'interaction serait plus étendu que celui observé dans la structure cristallographique et ferait intervenir les Phe30 et Phe38.

Chez *S. aureus*, tous les aa impliqués dans la reconnaissance à l'exception du résidu Tyr696, sont conservés sur Tex (*Sa*-TexS1) (**Figure 42A**). Ainsi, il est raisonnable de penser que le site de liaison à l'ARN de *Sa*-TexS1 est similaire à *Pa*-TexS1 et CspB. Les différences de fixation observées entre les protéines *Sa*-Tex et *Pa*-Tex aux ARN sont difficiles à expliquer mais ne sont probablement pas dues au motif S1. Cette observation conforte cependant mon hypothèse de départ selon laquelle d'autres domaines de *Sa*-Tex interviendraient dans la fixation d'ARN structurés, contrairement aux motifs simples brins qui eux, sont clairement dépendants de la présence du domaine S1.

Au cours de mes expériences de spectroscopie de fluorescence, j'ai obtenu deux k_D différents (l'un de haute affinité, l'autre de plus basse affinité) pour les complexes formés entre Tex wt ou Tex Δ S1 avec les ARN structurés (TB2 et TB2 extraboucle) et Tex wt avec les oligoribonucléotides en simples brins (RsaAc et CspA) (Résultats § III. 2. 2, **Tableau 2**). Ce résultat suggère que deux événements de liaison pourraient exister, qui correspondraient peut-être à la fixation de deux molécules de Tex sur une molécule d'ARN. Ce phénomène a été observé pour tous les ARN testés, sauf l'oligoribonucléotide simple brin CspA3 (AACUGGUA), dont l'adénine à la position 3 a été mutée en cytosine (§ III. 2. 2, **Tableau 2**). Pour celui-ci, un seul k_D a été déterminé qui est 5 à 10 fois supérieur aux k_D déterminés pour les autres ARN testés. Ceci indique que la mutation affecte d'une manière non négligeable la fixation de Tex à l'oligonucléotide, ce qui semble cohérent avec le caractère « préférentiel » du motif S1 pour les séquences riches en A/U.

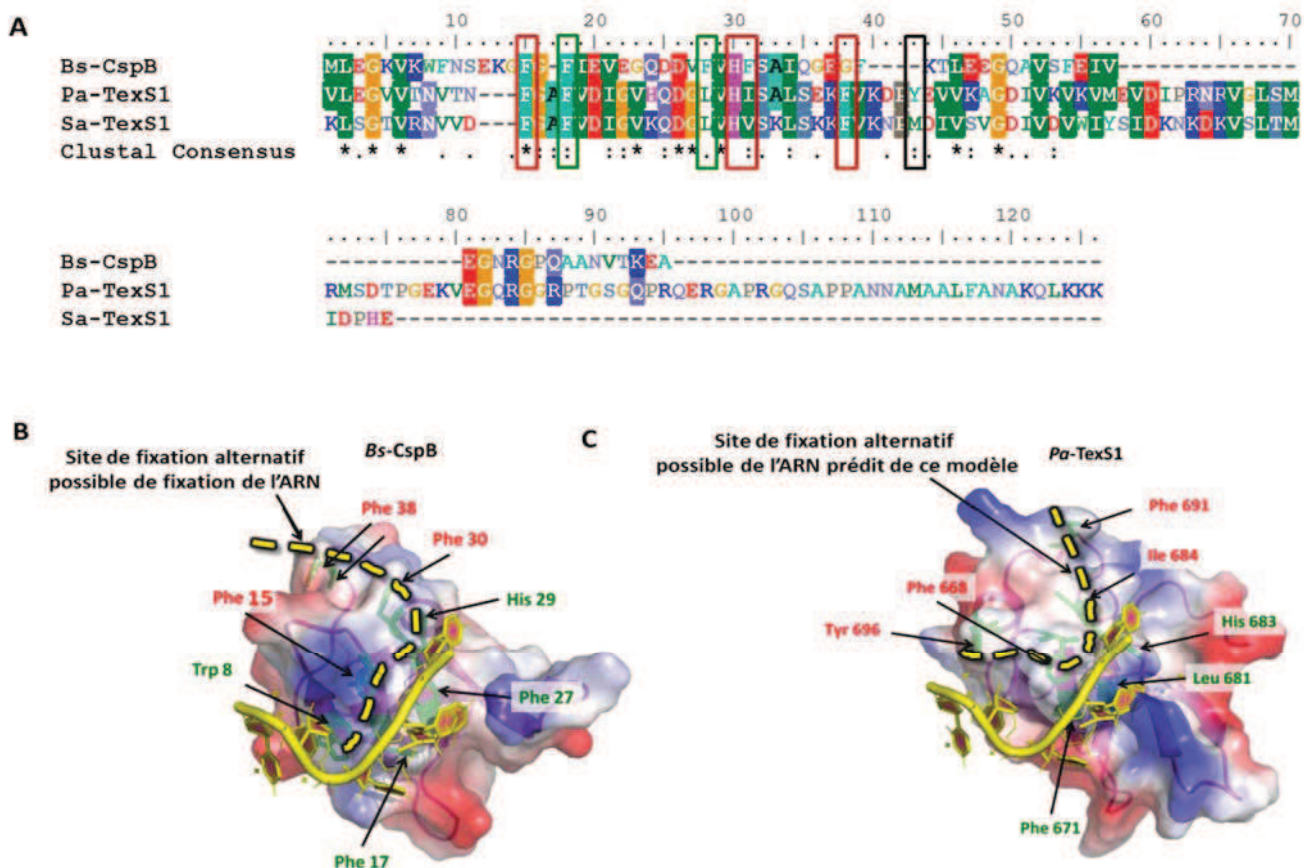


Figure 42. Alignement de séquences du domaine S1 des protéines *Bs-CspB*, *Pa-*Tex** et *Sa-*Tex** (A) et modèle de fixation de l'ARN à ce domaine dans les protéines *Bs-CspB* (B) et *Pa-*Tex** (C). (S. Marzi, IBMC, Strasbourg).

(A) Les acides aminés du domaine S1 conservés entre les trois protéines *Bs-CspB*, *Pa-*Tex** et *Sa-*Tex** sont représentés d'une même couleur. Les résidus hydrophobes conservés entre les trois protéines et nécessaires à l'ancrage de l'ARN sur la structure correspondant à Phe15, Phe17, Phe27, His29, sont en encadrés. (B) et (C) La distribution des charges de chaque aa est représentée en bleu pour les régions chargées négativement et en rouge pour les régions chargées positivement. Les acides aminés importants pour la fixation aux ARN sont représentés en vert. L'ARN se fixe à une région amphipathique de la protéine. Les régions hydrophobes du site sont constituées d'acides aminés aromatiques qui s'empilent sur les bases de l'ARN. Les régions hydrophiles environnantes au site de fixation positionnent l'ARN correctement sur son site de fixation. Ces régions impliquent des aa chargés positivement qui forment des liaisons hydrogène avec les bases de l'ARN.

2. Perspectives concernant l'étude des interactions ARN-*Tex*

L'ensemble de mes analyses *in vitro* met clairement en avant l'importance du domaine S1 de *Sa-*Tex** pour son interaction aux ARN. Cependant, il sera essentiel d'infirmar ou de valider ces résultats. En effet j'ai observé que la présence de concentrations en NaCl au-dessus de 150 mM est un critère essentiel pour maintenir une protéine homogène et soluble et pour éviter les interactions non spécifiques. Il sera donc important de renouveler les expériences de compétition dans ces conditions, et analyser la fixation de *Tex* à RsaA par spectroscopie de fluorescence. Cette technique sera utile pour déterminer la stœchiométrie des complexes impliqués. Enfin, des expériences de microcalorimétrie pourraient être aussi envisageables pour apporter des informations thermodynamiques et cinétiques (Burnouf *et al.*, 2012). L'ensemble de ces données sera utile pour définir un complexe minimal pour effectuer une étude structurale.

En effet, la détermination de la structure cristallographique de la protéine avec l'un des oligoribonucléotides riches en A/U (RsaAc, CspA, CspAc) ou les tiges-boucles (TB2, TB2 extraboucle) testés précédemment, permettront de déterminer précisément quels sont les résidus qui interviennent dans ces deux types de complexes. J'ai effectué des essais de co-cristallisation sur le complexe *Tex*-CspA mais sans succès jusqu'à présent. Parallèlement à ces études structurales, des mutations ponctuelles dans le domaine OB permettraient d'évaluer le degré d'implication des résidus conservés comme Trp8, Phe17, Phe27 et His29, qui ont été décrits comme déterminants majeurs des interactions entre les ARN et CspB ou *Pa-*Tex** (Figure 41-42) (Sachs *et al.*, 2012 ; Johnson *et al.*, 2008). Il sera également intéressant de réaliser des mutations au niveau des ARN, pour valider la préférence du domaine S1 pour les séquences riches en A/U. De même, la composition des bases de la boucle apicale de la tige-boucle 2 de l'ARNIII révélera si l'absence de séquences A/U dans cette tige-boucle affecte son accommodation par les autres domaines de la protéine.

II/ Tex agirait comme régulateur de l'état physiologique des bactéries lors de l'infection

1. Conclusions.

Le deuxième axe de mes recherches constituait la détermination de la fonction de Tex *in vivo*. Des études menées sur différents organismes ont démontré que cette protéine pouvait jouer des rôles multiples. Elle peut aussi bien intervenir dans la virulence (Fuchs *et al.*, 1996 ; Johnson *et al.*, 2008 ; Abe *et al.*, 2010) que l'adaptation du pathogène à son environnement (He *et al.*, 2006). Tex a également été identifiée comme ligand de l'ARNIII de *S. aureus* avant mon arrivée au laboratoire (§ Objectifs) et par la suite, nous avons démontré que la protéine est capable de se lier à des ARN régulateurs tels que l'ARNIII ou RsaA (Résultats § III), qui sont impliqués dans la régulation de la virulence de ce pathogène. Ainsi, j'ai tenté de définir quelle pouvait être la fonction de cette protéine chez cet organisme.

Des expériences de Northern et Western blot nous ont d'abord indiqué que la synthèse de Tex est fortement réprimée en phase exponentielle tardive. Or, l'ARNIII et RsaA étant majoritairement exprimés en phase stationnaire (Novick *et al.*, 1993 ; Novick, 2003), ce résultat suggère que Tex n'est probablement pas un cofacteur des mécanismes de répression par ces ARN. Compte tenu de cette asynchronicité, quel pourrait être le lien entre Tex et les ARN régulateurs ? La fonction de Tex *in vivo* a été abordée par la construction de mutants d'insertion dans les souches RN6390 et HG001 afin d'inactiver complètement le gène ou d'induire une délétion du domaine S1 de Tex (Δ S1). L'absence de phénotype de croissance observé pour les souches mutantes en milieu riche ou carencé, indique que Tex ne semble pas essentielle pour *S. aureus* (Résultats § V. 2. 1, **Figure 32**). Nous avons donc effectué une étude comparative des protéomes sur la souche HG001wt et les souches mutantes (HG001- Δ Tex ou HG001- Δ S1) (Résultats § V. 1) afin de déterminer les gènes dérégulés par la protéine. De manière inattendue, les protéines Tex issues des souches mutées n'ont pas été détectées par l'analyse LC-MS-MS (Résultats § V. 1. 3, **Figure 30**) probablement à cause de l'activation du système de *trans*-traduction (Gillet et Felden, 2007). Cependant, il est intéressant de préciser que la protéine SA1867 située en 3' de Tex et transcrite en opéron avec Tex a été retrouvée exprimée au même taux quelle que soit la souche utilisée (Résultats § V. 1. 3, **Figure 30**). Ayant eu des difficultés à construire un vecteur exprimant Tex chez *E. coli* pour effectuer des expériences de complémentation, j'ai donc utilisé ce critère pour démontrer l'absence d'effets polaires liés aux mutations introduites.

L'analyse des protéomes qui a été effectuée avec des critères stringents n'a révélé que

très peu de variations entre les trois protéomes puisque seulement trois protéines, toutes exprimées à la surface de la bactérie, variaient significativement dont les protéines A, ClfB et Pip (Résultats § V. 1. 3, annexe **Tableau 3**). De manière intéressante, les deux premières appartiennent à la famille MSCRAMMs de *S. aureus* (Introduction, § I. 3) (Clarke et Foster, 2006). Ce sont des facteurs d'adhésion majeurs, qui exercent un rôle crucial en début de cycle infectieux pour la colonisation de l'hôte, ainsi que dans la formation des biofilms *ica*-indépendants (Introduction, § I. 3). Des expériences de quantification du biofilm en milieu riche BHI ou BHI additionné de 0.25% de glucose, ont été menées par la méthode du cristal violet (C. Lays, INSERM, Lyon) (Résultats § V. 2. 2) et ont mis en évidence un effet répresseur de Tex sur ces biofilms dans le fond génétique HG001 (Résultats § V. 2. 2, **Figure 33**). Du fait que la souche HG001 synthétise peu de polysaccharide PIA-PNAG, (Résultats § V. 2. 2, **Figure 36**) et que le glucose a été associé à plusieurs reprises à la formation de biofilms de nature protéique (Fitzpatrick *et al.*, 2005; O'Neill *et al.*, 2007, 2008), on peut émettre l'hypothèse que l'effet de répression de la protéine A et de ClfB peut être associée au phénotype de Tex comme répresseur de biofilm. Ces expériences devront être renouvelées. Si Tex module l'expression de protéines de surface, il serait intéressant de tester l'effet des mutations dans Tex sur un modèle infectieux qui implique une infection locale sur cathéter dans la souris pour révéler le rôle de Tex sur les biofilms (Romilly *et al.*, 2014). Dans ce modèle, un cathéter sous-cutané sera infecté par une souche exprimant ou non Tex puis implanté sur la souris. Le développement de l'infection sera ensuite suivie dans le cathéter et au niveau des tissus environnants. Nous devrions ainsi nous attendre à ce que les bactéries n'exprimant pas Tex se développent mieux au site d'infection ainsi que dans les tissus environnants.

Pour obtenir un peu plus d'information quant aux cibles directes de Tex, j'ai réalisé des immunoprécipitations à partir des souches HG001 wt et HG001-*Tex* Δ S1. Ces données, bien que préliminaires, ont montré un lien possible entre Tex et le dégradosome (Résultats § VI. 2. 1). En effet Tex a été co-immunoprécipitée principalement avec l'exoribonucléase 3'-5' PNPase mais aussi avec la RNase Y et la RNase J1, qui font partie de ce complexe de dégradation des ARN. Il est intéressant de noter que la PNPase n'a pas été retrouvée co-immunoprécipitée avec *Tex* Δ S1 même si ces expériences étaient nettement moins efficaces en terme de rendement. Compte tenu de la répression observée de Tex wt sur les protéines de surface, il est tentant de proposer que Tex pourrait réguler ces cibles négativement au niveau post-transcriptionnel en recrutant le dégradosome de manière active par le biais de son domaine OB. De plus, dans ces mêmes expériences, Tex a également été immunoprécipitée avec des facteurs intervenant dans la régulation de la transcription. Il s'agit de Sigma A, SarR et l'ADN gyrase. De manière intéressante, le régulateur transcriptionnel SarR a été associé à la régulation de la synthèse des biofilms via le système *agr*, qu'il réprime indirectement (Résultats § VI. 2. 1, **Figure 40**) (Reyes *et al.*, 2011).

Cette répression conduit à l'augmentation de la production des biofilms médiée par les protéines de surface de *S. aureus*, dont la protéine A qui a été identifiée comme cible de Tex. On ne peut donc pas exclure que la régulation de la protéine A pourrait être indirecte et se faire par le biais de *sarR*.

Les interactions de Tex observées aussi bien avec des composants du dégradosome qu'avec des facteurs impliqués dans la transcription, suggèrent que Tex pourrait intervenir à deux niveaux de régulation, transcriptionnel et post-transcriptionnel, pour réguler de manière fine la synthèse de certains facteurs d'adhésion de *S. aureus*. A ce titre, Tex pourrait être l'un des régulateurs clés pour favoriser la transition du mode adhésion vers le mode dissémination (Figure 43).

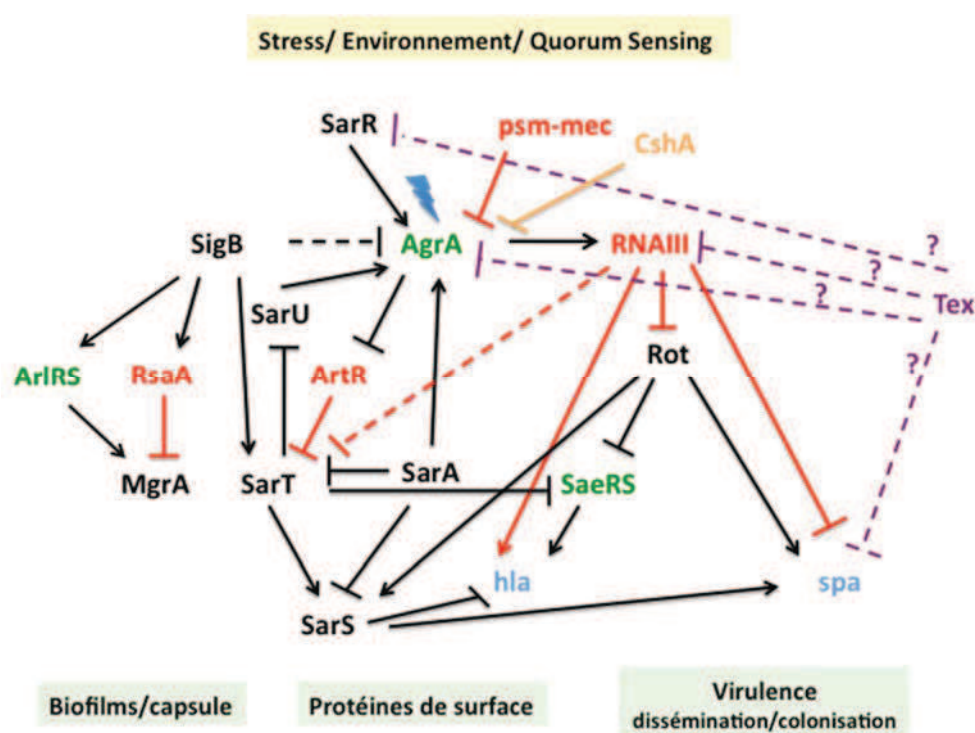


Figure 43. Représentation schématique de la régulation temporelle des facteurs de virulence de *S. aureus* et implication potentielle de Tex dans ces réseaux (Fechter *et al.*, 2014).

Tex serait impliquée dans la régulation de la transition de la phase d'adhésion à la phase de dissémination du pathogène dans l'hôte. Tex régule négativement les protéines de surface de *S. aureus*, notamment la protéine A. Cette régulation peut être directe ou indirecte via d'autres régulateurs, notamment SarR, qui a été retrouvé co-immunoprécipité avec Tex. Les ARN régulateurs sont représentés en rouge, les facteurs de régulation transcriptionnelle sont en noir, les systèmes à deux composants en vert, l'hélicase CshA appartenant au dégradosome et connue pour réguler la synthèse de l'opéron *agr* (Oun *et al.*, 2013) et enfin les ARNm cibles de l'hémolysine α *hla* et de la protéine A *spa*, sont en bleu clair.

2. Perspectives

Nos résultats apportent des ouvertures intéressantes qu'il faudra exploiter. Ayant trois cibles potentielles, il sera important de valider si la dérégulation de la protéine A, CflB et Pip a lieu au niveau transcriptionnel et/ou post-transcriptionnel par l'utilisation de gènes rapporteurs et par l'analyse du temps de demi-vie des ARNm. En général, les protéines qui reconnaissent les régions en simple brin riches en A/U induisent des phénotypes pléiotropiques, c'est le cas par exemple de la protéine ribosomique S1 (Duval *et al.*, 2013), de la RNase E, ou bien encore de la protéine Hfq chez *E. coli* (Vogel and Luisi, 2011). Il est donc surprenant que nous n'ayons pas observé de phénotypes particuliers et que nous ayons observé peu de protéines dont la synthèse était dérégulée.

Quels sont les facteurs qui pourraient diriger l'action de Tex? Les expériences d'immunoprécipitation ouvriront sur de nouvelles perspectives. Le protocole devra être amélioré pour enrichir les partenaires et cibles de Tex. L'utilisation du pontage *in vivo* selon l'approche CLIP développée par D. Tollervey, devrait aider à stabiliser les complexes pour effectuer des lavages dans des conditions dites stringentes. L'approche du séquençage haut débit devrait permettre de caractériser les ARN dont la reconnaissance dépend du domaine S1.

Il sera intéressant de déterminer quels sont les régulateurs de Tex dont la synthèse est fortement réprimée en phase stationnaire. Il existe actuellement des souches mutées pour chaque système à deux composants mais aussi pour les différents facteurs de transcription de la famille Sar. Cette étude pourra être couplée à une analyse phénotypique plus fine en testant différentes conditions de stress (oxydatif, concentration oxygène, NO...).

La quantification des biofilms avait également révélé que les souches mutées pour Tex dans les deux fonds génétiques HG001 et RN6390, produisaient globalement plus de biofilms que les souches sauvages respectives. En revanche, une inconsistance apparaissait dans ce résultat, qui avait démontré une production de biofilms plus importante dans les souches délétées uniquement du domaine S1 de Tex, que dans les souches Δ Tex. D'autre part, les deux protéines mutantes n'ont pas été retrouvées lors de l'analyse par protéomique différentielle ; les deux souches mutantes devraient donc être équivalentes et générer par là, des phénotypes équivalents. Au vu de ces observations il sera donc important de procéder à un séquençage du génome des souches mutantes de Tex, afin de s'assurer de l'absence d'autres mutations qui auraient pu être générées lors du protocole visant à insérer l'intron dans le génome. Peut-être devrions-nous changer de stratégie et développer de nouvelles approches pour inactiver les gènes ; le système CRISPR-cas9 pourrait être une alternative à développer.

Ainsi, les approches pluridisciplinaires utilisées devraient à terme, conduire à établir le rôle précis de *Tex* et son mécanisme d'action dans la physiologie globale et la virulence de *S. aureus*. Ceci devrait révéler de nouvelles connexions entre les communications cellulaires (système de densité cellulaire), l'adaptation et la virulence. Ce projet peut donc ouvrir sur de nouvelles stratégies innovantes dans le but d'interférer avec la croissance bactérienne et/ou la pathogénie de *S. aureus*.

Matériel & Méthodes

I/ Souches de *Staphylococcus aureus* et plasmides utilisés

Tableau 4. Présentation des souches bactériennes utilisées.

| Souche | Description | Phénotype | Origine |
|----------------------|--|---|---------------------------------|
| RN6390 | Dérivée de la souche NCTC 8325-4 <i>agr</i> positive, possède une délétion de 11pb au niveau du gène <i>rsbU</i> | <i>agr+</i> <i>rsbU</i> - | Peng <i>et al.</i> , 1988 |
| RN6390 Tex-404 | Insertion de l'intron à la position 404 du gène <i>tex</i> | | |
| RN6390 Tex-2001 | Insertion de l'intron à la position 2001 du gène <i>tex</i> | | |
| RN4220 | Dérivée de la souche NCTC 8325-4, délétée pour le système de restriction | <i>hsdR</i> - <i>agr</i> - <i>rsbU</i> - | Kreiswirth <i>et al.</i> , 1983 |
| HG001 | Dérivée de la souche NCTC 8325-4 <i>rsbU</i> réparé | <i>rsbU</i> restaurée | Herbert <i>et al.</i> , 2010 |
| HG001 Tex-404 | Insertion de l'intron à la position 404 du gène <i>tex</i> | | |
| HG001 Tex-2001 | Insertion de l'intron à la position 2001 du gène <i>tex</i> | | |
| BJC100 | Dérivée de HG001, délétée pour le système de restriction | <i>hsdR</i> - <i>TypeIII</i> - | Brian Jester (INSERM, Paris) |
| BCJ100 Tex FLAG | Dérivée de HG001, délétée pour le système de restriction | ery ^R | |
| BCJ100 Tex 2001 FLAG | Dérivée de HG001, délétée pour le système de restriction | ery ^R | |

Tableau 5. Présentation des plasmides utilisés.

| Plasmide | Description | Origine |
|----------|--|-----------------------------|
| pJET | Promoteur T7, amp ^R | Fermentas |
| pQE30 | Promoteur T5, tag 6xhis en Nter, amp ^R | Qiagen |
| pMUTIN | Vecteur navette, promoteur PsPac inductible à l'IPTG, possède le gène lacZ, amp ^R , erm ^R | Vagner <i>et al.</i> , 1998 |
| pNL9162 | Vecteur navette dérivé de pCN39 (Charpentier <i>et al.</i> , 2005), origine de répllication pT181 cop-634ts rep C4 thermosensible, promoteur Pcad inductible au cadmium, amp ^R , erm ^R | Yao <i>et al.</i> , 2006 |

II/ Tampons et solutions

- Milieu LB: 10 g/l bactotryptone, 10 g/l NaCl, 5 g/l extrait de levure
- Milieu BHI (*Sigma*): 12,5 g/l extrait de cerveau de veau, 5 g/l extrait de cœur de bœuf, 10 g/l peptones, 2g/l D(+)-glucose, 2,5g/l Na₂HPO₄
- Milieu NZM: 10 g/l NZ amine, 5 g/l NaCl, 2 g/l MgSO₄·7H₂O
- Solution X10 (par exemple A10): 1 mM dGTP, 1 mM dCTP, 1 mM dTTP, 0,25 mM dATP
- Tampon de lyse (purification de Tex): 25 mM Tris-HCl pH 7,5 (4°C), 10 mM MgCl₂, 800 mM KCl, 10 mM imidazole, 1 mM, β-mercaptoéthanol, 10% glycérol.
- Tampon de lyse (membranes cellulaires de *S. aureus*) : 10 mM Tris HCl pH 7.5 à 20°C, 20 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 50 µg/ml lysostaphine, cocktail d'inhibiteurs de protéases 100x, 0,004 U DNase I (1 U/ml) et 2 µl RNase A.
- Tampon A: 25 mM Tris-HCl pH 7,5 (4°C), 2 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 1 mM β-mercaptoéthanol
- Tampon B: 25 mM Tris-HCl pH 7,5 (4°C), 2 mM MgCl₂, 1 M KCl, 1 mM β-mercaptoéthanol
- Tampon de stockage: 50 mM Tris-HCl pH 7,5 à 4°C, 5 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 50% glycérol
- Tampon TAE 50x : 2 M Tris-acetate, 0.05 M EDTA, pH 8.3.
- Tampon TBE 1x: 89 mM Tris-borate pH 8,3 ; 1 mM EDTA
- Tampon TB 20x: 89 mM Tris-borate pH 8,3.
- Tampon TMN 1x: 20 mM Tris-HCl pH 7,5 (20°C), 5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl
- Tampon d'éluion ARN: 0,5 M acétate d'ammonium, 1 mM EDTA, 20% phénol
- Tampon RTB 5x: 50 mM Tris-HCl pH 8,5 (37°C), 6 mM MgCl₂, 40 mM KCl
- Tampon SSC 2x: 300 mM NaCl, 15 mM citrate de sodium pH 7
- Tampon ΔT1: 20 mM citrate de sodium pH 4,5 ; 1 mM EDTA ; 7 M urée ; 0,025% xylène cyanol ; 0,025% bleu de bromophénol.
- Tampon L: 0,1 M NaCO₂ ; 0,1 M NaHCO₂, pH 9,0.
- Solution de blocage 10x (Northern blot): 100ml acide maléique 1x + 10% réactif de blocage (*Roche*)
- Tampon de dénaturation: 0,05 M NaOH, 0,1 M NaCl
- Tampon de détection: 0.1 M Tris HCl pH 9.5, 0.1 M NaCl
- Tampon d'hybridation: 0,5 M NaP, 7% SDS, 1 mM EDTA
- Tampon de lavage (Northern): Acide maléique 1x, 0.3% Tween 20
- Tampon de neutralisation: 0.1 M Tris HCl pH 7.5
- Solution de blocage (Western blot): 20ml TBS + 5% lait en poudre
- Tampon TBS: 50 ml Tris-HCl pH 7.5, 8.76 g NaCl
- Tampon TBST: 200 ml TBS, 200 µl Tween20

III/ Analyse des interactions Tex-ARN *in vitro*

1. Préparation du matériel biologique

1.1. Surexpression des protéines Tex et Tex $\Delta S1$

1.1.1 Culture d' *E. coli* et induction de l'expression des protéines

Une colonie d' *E. coli* M15 transformée avec le plasmide pQE30 (Qiagen) surexprimant Tex ou Tex $\Delta S1$, est prélevée sur boîte de Pétri LB ampicilline (100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), pour ensemercer 5 ml du même milieu liquide dans une fiole Erlenmeyer puis est incubée à 37°C pendant la nuit sous agitation constante (180 rpm). Les cultures sont ensuite réalisées par ensemencement au 1/100ème de 2 fioles Erlenmeyer de 5 L contenant chacune 1 L de milieu LB-amp par la pré-culture de bactéries, puis incubée à 37°C pendant 4 h jusqu'à obtention d'une DO600nm de 0,3 (phase exponentielle de croissance). A DO600nm = 0,3, les cultures sont placées à 18°C pendant environ 1 h, jusqu'à atteindre DO600nm = 0,5, puis l'expression de chaque protéine est induite par ajout de 1 mM IPTG et les cultures sont remises sous agitation pendant la nuit à 18°C. Les cellules sont ensuite centrifugées (4000 rpm pendant 15 min à 4°C). Les culots de cellules sont lavés par 30 ml de Tris-HCl 10 mM pH7,5 puis centrifugés à nouveau (4000 rpm 20 min, à 4°C).

1.1.2 Lyse des cellules

Chaque culot cellulaire est repris dans le tampon de lyse (3 ml/g de cellules) contenant le lysozyme (5 mg/g cellules), 5 U de DNase I/g de cellules et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (*Roche*). La lyse des cellules est initiée par l'action du lysozyme pendant 15 min dans la glace. Les cellules sont ensuite traitées par sonication aux ultrasons pendant 30 sec à 120 V (8 x) puis centrifugées (15000 rpm pendant 15 min à 4°C) pour éliminer les débris cellulaires. Les surnageants sont prélevés, soumis à une ultra-centrifugation (45000 rpm pendant 2 h 30 à 4°C), puis l'extrait brut est récupéré. La surexpression des deux protéines est ensuite vérifiée par l'analyse d'un aliquot de 10 μl sur gel SDS-PAGE 10%. Enfin, les billes Ni²⁺-NTA sont ajoutées aux extraits bruts (500 $\mu\text{l}/5$ mg de protéines, *Qiagen*) et l'incubation est réalisée sous agitation lente à 4°C pendant 1 h.

2. Purification de Tex et Tex Δ S1

2.1. Purification sur colonne Ni²⁺-NTA

Les extraits bruts additionnés de la résine sont tout d'abord centrifugés (7000 rpm pendant 10 minutes à 4°C) puis les billes liées aux protéines taguées de 6 histidines sont déposées sur un support chromatographique PolyPrep (*Biorad*) et les fractions sont récoltées par gravité. Les protéines non retenues par la matrice Ni²⁺-NTA sont récupérées. Les billes sont ensuite lavées avec 5 volumes du tampon de lyse + 10 mM d'imidazole. L'élution de chaque protéine est ensuite effectuée par ajout de 10 ml de tampon A + 500 mM d'imidazole. Un aliquot de 10 μ l de chaque fraction est analysé sur gel SDS-PAGE 10%. La fraction d'élution contenant la protéine Tex ou Tex Δ S1 partiellement purifiée est dialysée contre le tampon A sous agitation constante, toute la nuit à 4°C.

2.2. Purification sur colonne échangeuse d'anions (*MonoQ*)

La colonne MonoQ (1 ml, capacité 50 mg de protéines, *GE Healthcare*) couplée à une HPLC, est d'abord lavée à l'H₂O milliQ puis équilibrée par le passage de 10 volumes de tampon A. Les fractions dialysées sont centrifugées (13000 rpm pendant 10 min à 4 °C) puis déposées sur colonne. Chaque protéine est ensuite éluée par un gradient de 100 mM à 250 mM KCl. Des fractions de 500 μ l chacune sont récoltées et un aliquot de 10 μ l est analysé sur gel SDS-PAGE 10%. Les fractions contenant les protéines pures (éluées entre 65 et 105 mM KCl) sont rassemblées.

2.3. Concentration et stockage des protéines

Les protéines ainsi purifiées sont concentrées au moins 5 fois par centrifugation sur filtres Amicon de capacité 4 ml, constitués d'une membrane de cellulose de « cut-off » égal à 50K (*Millipore*). Pour cela, les filtres sont d'abord lavés avec 4 ml d'H₂O milliQ par centrifugation (4000 x g pendant 15 min à 4°C), puis les échantillons de Tex et Tex Δ S1 sont centrifugés (4000 x g pendant 30 min à 4°C). Chaque échantillon est ensuite dialysé 2 fois 1 h contre le tampon de stockage à 4°C, puis un volume de glycérol est ajouté à chacun et ils seront finalement conservés à -20°C.

3. Préparation des ARN régulateurs

3.1. Transcription *in vitro* de l'ARNIII

3.1.1 Linéarisation du plasmide et purification de la matrice ADN

Les gènes correspondant à l'ARNIII sauvage ou muté et au domaine 3', ont été clonés avant mon arrivée dans un plasmide dérivé de pUC18, juste en aval du promoteur de transcription de l'ARN polymérase du phage T7. La linéarisation du plasmide a ensuite été effectuée dans un volume réactionnel de 250 µl contenant 100 µg de plasmide, 25 µl de l'enzyme BamHI à 20 U/µl (5U/µg ADN à digérer, *BioLabs*), 25 µl de tampon BamHI 10x et 2,5 µl de BSA 10 mg/ml.

La digestion enzymatique est réalisée à 37°C pendant 3 h, puis la réaction est arrêtée par addition de 250 µl de phénol-chloroforme. Les tubes sont mélangés puis centrifugés (13000 rpm pendant 1 min). L'ADN contenu dans la phase aqueuse est récupéré et précipité pendant 30 min à -80°C dans la carboglace, par addition de 1/10 d'Acétate de sodium AcNa 3 M pH 5,6 et 3 volumes d'éthanol absolu. Après centrifugation (13000 rpm pendant 30 min à 4°C), les culots sont lavés par 200 µl d'éthanol 80 %, centrifugés à nouveau (13000 rpm pendant 10 min à 4°C), séchés sous vide pendant 5 min et repris dans 50 µl d'H₂O milliQ. La concentration en ADN est définie par mesure de la DO_{260 nm} (1 unité DO = 50 µg/ml d'ADN).

3.1.2 Transcription *in vitro*.

La transcription s'effectue pendant 3 h à 37°C dans un volume réactionnel de 400 µl contenant 16 µl de chaque NTP 0,1 M, 4 µl de spermidine 100 mM, 40 µl de tampon T7 10x, 4 µl DTT 0,5 M, 4 µl BSA 10 mg/ml, 4 µl RNasine 40 U/µl, 5 µl d'ARN polymérase du phage T7 et 40 µg de plasmide linéarisé.

Après centrifugation 2 min à 10000 rpm, un précipité blanc correspondant au pyrophosphate généré au cours de la transcription indique un taux de synthèse efficace. Les ARN sont extraits par traitement des échantillons au phénol-chloroforme puis précipités comme décrit ci-dessus (§ III. 3.1.1) et repris dans 50 µl de bleu urée.

Les ARN sont ensuite purifiés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide 8%, TBE 1x, urée 8 M. Le gel (50 ml) est polymérisé entre deux plaques de verre en présence de 500 µl d'APS 10% et de 50 µl TEMED. Le gel polymérisé est ensuite préchauffé 15 min à 250 V constant. L'échantillon contenant l'ARN (50 µl) est dénaturé par chauffage pendant 1 min à 90°C puis placé

dans la glace 1 min avant d'être déposé sur le gel. La migration se fait à 300 V pendant 6h à 20°C. L'ARN est ensuite révélé par exposition du gel sous rayons UV. La bande de gel est rapidement découpée et l'ARN est élué de manière passive pendant la nuit à 4°C sous agitation, dans 500 µl de tampon d'éluion. L'ARN est récupéré, extrait par l'addition de 500 µl de phénol-chloroforme (§ III. 3. 1.1) et repris dans 30 µl d'H₂O milliQ stérile. La concentration de l'ARN est finalement déterminée par mesure de la DO_{260nm} (1 unité DO = 40 µg/ml d'ARN) avant d'être conservé à -20°C.

3.2. Synthèse chimique des ARN non codants RsaA, RsaE, de la tige-boucle 2 de l'ARNIII et d'un petit fragment d'ARN simple brin

Pour l'ensemble des autres ARN de petite taille à étudier, nous avons fait appel à la société IDT, chez qui ils ont été produits par synthèse chimique et purifiés par HPLC (www.idtdna.com).

IV/ Analyse de la formation des complexes Tex-ARN par gel retard

1. Marquage de l'ARN à l'extrémité 5'

Avant son marquage, l'ARN (20 µg) est tout d'abord déphosphorylé dans un volume réactionnel de 20 µl. Pour cela, l'ARN est dénaturé par chauffage à 90°C pendant 1 min, suivi d'une incubation de 1 min dans la glace. La réaction est réalisée 1 h à 37°C en présence de 2 µl de tampon FAST AP 10x et 2 µl d'enzyme FAST (1 U/µl, *Fermentas*). 30 µl d'eau sont ajoutés puis l'ARN est extrait par addition de 50 µl d'une solution phénol chloroforme pH 5,6 (§ III.3.1.1) et repris dans 20 µl d'H₂O milliQ.

Le marquage de l'ARN à l'extrémité 5' est effectué 1 h à 37°C dans un volume réactionnel de 20 µl contenant 5 µl d'ARN déphosphorylé, 2 µl de tampon T4 PNK 10x (*Fermentas*), 1 µl d'enzyme T4 PNK (10 U/µl), 5 µl [γ -P32] ATP 10 µCi/µl et 7 µl d'H₂O milliQ. L'ARN marqué est ensuite repris dans 20 µl de bleu urée et purifié par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 5%, TBE 1x, urée 8 M. La migration s'effectue à 25 mA pendant 2 h, puis les ARN sont révélés par autoradiographie du gel. La bande correspondante à l'ARN marqué est découpée puis l'ARN est élué et précipité (§ III. 3.1.2).

2. Analyse des complexes Tex-ARN sur gel retard

L'ARN marqué est repris dans de l'H₂O milliQ stérile de manière à obtenir 10000 cpm/µl. L'ARN subit un traitement de dénaturation par chauffage de 1 min à 90°C suivi de 1 min dans la glace, puis est renaturé dans le tampon TMN à 20°C pendant 15 min. La formation du complexe est réalisée dans un volume final de 10 µl en présence de 1 µl d'ARN marqué (10000 cpm, concentration inférieure à 1 nM) et 1 µl de concentrations croissantes de Tex (10 nM à 10 µM) dans le tampon TMN pendant 15 min à 20°C. 10 µl de bleu glycérol sont ensuite ajoutés et les échantillons sont déposés sur un gel de polyacrylamide 6%, TB 1x, MgCl₂ 2 mM pendant 5 h à 300 V, à 4°C. Une autoradiographie du gel est ensuite réalisée.

3. Expériences de compétition par gel retard

Les expériences de compétition sont réalisées dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus (§ IV. 2) sauf qu'à l'ARNIII marqué sont ajoutés la protéine Tex à une concentration fixe de 500 nM et des concentrations croissantes d'ARN compétiteur non marqué allant de 100 à 400 nM.

V/ Détermination de l'empreinte de Tex aux ARN

1. Hydrolyse enzymatique et détection directe des coupures

L'ARN marqué subit tout d'abord un traitement de dénaturation-renaturation (§ IV. 1). Chaque réaction a lieu dans un volume final de 10 µl contenant l'ARNIII (100000 cpm/réaction) renaturé et 1 µg d'ARNt total dans le tampon TMN. La formation du complexe ARNIII-Tex est réalisée en présence de Tex (500 nM ou 1 µM) pendant 15 min à 20°C. Les réactions enzymatiques sont réalisées en présence de 1 µl de RNase T1 (0,01 U/µl), de RNase T2 (0,025 U/µl) ou de RNase V1 (0,01 U/µl) pendant 5 min à 20°C. Les réactions sont arrêtées par une extraction phénolique des ARN après ajout de 40 µl d'AcNa 0,3 M, 0,5 µl SDS 10% et 50 µl de phénol pH 5,3 suivie de la précipitation des ARN (§ III. 3.1.1). Enfin, les échantillons sont repris dans 10 µl de bleu formamide, mélangés au vortex et la radioactivité dans chaque tube est ajustée.

Les coupures de l'ARN sont assignées en réalisant en parallèle une hydrolyse alcaline et une hydrolyse par la RNase T1 en conditions dénaturantes.

RNase T1: 1 µl d'ARNIII marqué (50000 cpm) et 1 µl d'ARNt total sont ajoutés à 5 µl de tampon ΔT1, puis incubés à 50°C pendant 5 min. L'hydrolyse est ensuite réalisée en présence de 1 µl de RNase T1 (0,2 U/ml) à 50°C pendant 10 min.

Hydrolyse alcaline: 2 µl d'ARN marqué (100000 cpm) et 1 µg d'ARNt total sont incubés dans 5 µl de tampon L pendant 1 min à 90°C. Tous les échantillons sont ensuite déposés sur un gel de polyacrylamide 8%, TBE 1x, urée 8 M ayant subi préalablement un préchauffage 30 min à 75 mA. La migration est ensuite effectuée à 75 mA pendant 2 h 30. Le gel est transféré sur une vieille autoradiographie, recouvert de saran wrap et placé dans une cassette avec un écran de fluorographie (*Sigma*) pendant la nuit à -80°C.

2. Hydrolyse enzymatique suivie d'une extension d'amorce

2.1. Marquage d'oligonucléotide à l'extrémité 5'

L'oligonucléotide utilisé (GTCCAAGGAACTAACTCTACT) est complémentaire aux nucléotides de la tige-boucle 9 de l'ARNIII. Le marquage à l'extrémité 5' est effectué 1 h à 37°C dans un volume réactionnel de 20 µl contenant 5 µl d'oligonucléotide (1 mM), 2 µl de tampon T4 PNK 10x (*Fermentas*), 1 µl d'enzyme T4 PNK (10 U/ml, *Fermentas*), 5 µl de [γ P³²] ATP (10 µCi/µl)

et 7 μl d' H_2O milliQ. L'oligonucléotide marqué est ensuite séparé de l'excès d'ATP par chromatographie d'exclusion sur une colonne MicrobioSpin (*BioRad*). L'échantillon est complété par 30 μl d' H_2O milliQ puis déposé sur la colonne et centrifugé (2000 rpm pendant 4 min à 4°C). L'éluat contenant l'oligonucléotide marqué est conservé à -20°C.

2.2. Hydrolyses enzymatiques et détection des coupures

Les conditions expérimentales concernant les hydrolyses enzymatiques sont identiques à celles décrites précédemment (§ V. 1). La seule différence est que l'ARNIII radioactif est remplacé par 2 pmoles d'ARNIII non marqué. Après arrêt des hydrolyses enzymatiques, extraction phénolique et précipitation des ARN hydrolysés, les culots sont repris dans 4 μl d' H_2O milliQ. L'hybridation est effectuée par l'addition de 1 μl d'oligonucléotide marqué (100000 cpm) et incubation de 1 min à 90°C suivi de 1 min dans la glace. 1 μl de tampon RTB 5x est ensuite ajouté et les échantillons sont incubés pendant 15 min à 20°C. La reverse transcription est réalisée pendant 30 min à 37°C après addition de 2 μl d'une solution de dNTP (2,5 mM) et 1 μl de RT AMV (2 U/ μl) dans un volume total de 15 μl . La réaction est arrêtée par ajout de 50 μl d'AcNa 0,3 M pH 5,3 et 200 μl d'éthanol absolu (§ III. 3.1.1) puis reprise dans 10 μl de bleu formamide. Après mélange au vortex des différents essais, la radioactivité est ajustée de manière identique pour chaque tube.

Une séquence est réalisée en parallèle pour assigner la position des coupures enzymatiques. Comme précédemment, l'hybridation de l'oligonucléotide est réalisée avec 2 pmoles d'ARN froid dans le tampon RTB, dans un volume total de 20 μl . Le mélange est ensuite partagé en 4 échantillons de 5 μl notés A, T, G et C. Dans chacun des tubes, seront ajoutés 2 μl de tampon RTB 5x, 1,5 μl d'une des quatre solutions X10 (un des dNTP est en concentration limitante), 0,5 μl du ddNTP 100 μM (correspondant au dNTP terminateur), 1 μl de la reverse transcriptase AMV (1U/ μl) et 5 μl d' H_2O milliQ. Les réactions sont effectuées pendant 30 min à 37°C puis traitées comme décrit juste ci-dessus. Tous les échantillons sont chauffés 1 min à 90°C, suivi de 1 min dans la glace. Les essais sont déposés sur un gel de polyacrylamide 8%, TBE 1x, urée 8 M. Après une migration de 3h (migration courte) et de 5h (migration longue) à 75 mA, le gel est recouvert de *saran wrap*, placé à -80°C dans une cassette avec un écran de fluorographie (*Sigma*) pendant la nuit.

VI/ Analyse de la formation des complexes Tex-ARN par filtration sur nitrocellulose

1. Analyse de la formation des complexes Tex-ARN et Tex Δ S1-ARN

L'ARN marqué radioactivement à son extrémité 5' subit tout d'abord un traitement de dénaturation-renaturation (§ IV. 1). Chaque réaction est préparée en triplicat et a lieu dans un volume final de 50 μ l contenant l'ARN renaturé à 30000 cpm/réaction dans le tampon TMN. La formation des complexes Tex-ARN est réalisée en présence de concentrations croissantes en protéines, pendant 15 min à 20°C.

Les filtres de nitrocellulose contenus sur une microplaque de 96 puits (porosité 0,45 μ m, capacité 250 μ l, *Millipore*) sont lavés 3x au préalable par passage de 100 μ l de tampon TMN, puis soumis à aspiration sous vide à une pression constante. Les échantillons sont ensuite déposés sur les filtres et aspirés. Les filtres sont lavés à nouveau par passage de 3x 100 μ l de tampon TMN, puis 1 μ l d'ARN radiomarqué est déposé afin d'estimer la radioactivité maximale retenue sur le filtre. La plaque est ensuite placée sous une lampe, jusqu'à séchage complet des filtres, puis 100 μ l de liquide de scintillation sont ajoutés à chaque puit et un comptage de la radioactivité retenue sur chaque filtre est réalisé grâce à un lecteur de plaque (*Chameleon*), relié à un système informatique permettant l'acquisition des données.

2. Expériences de compétitions par filtration sur nitrocellulose

Les expériences de compétition sont réalisées dans les mêmes conditions que précédemment (§ VI. 1), à la différence qu'à l'ARN marqué sont ajoutés la protéine Tex à une concentration fixe de 0,5 μ M et des concentrations croissantes d'ARN compétiteurs.

VII/ Analyse de la formation des complexes Tex-ARN par spectroscopie de fluorescence

1. Contrôle de l'homogénéité des protéines par *Dynamic Light Scattering* (DLS) ou diffusion de la lumière

Une étape préalable de contrôle de l'homogénéité des protéines est nécessaire afin de vérifier qu'elles ne présentent pas d'agrégation en solution. La technique de « DLS » implique une source laser dirigée sur l'échantillon contenu dans une cuve en plastique, qui sera diffusée par les macromolécules présentes en solution. Les fluctuations d'intensité de la lumière diffusée sont alors mesurées, elles correspondent aux mouvements aléatoires des macromolécules ("mouvements Browniens") permettant de déduire leur taille. En effet, plus les particules sont petites, plus leurs mouvements seront rapides et donc, plus les fluctuations de la lumière seront rapides. Cette méthode a été utilisée avant chaque expérience afin de contrôler l'homogénéité des protéines Tex et Tex Δ S1, qui ont tendance à s'agréger à haute concentration.

Pour cela, les protéines sont ultracentrifugées au préalable (45000 rpm pendant 45 min), puis 50 μ l des surnageants sont prélevés et placés dans une cuve en plastique (trUView Cuvettes 12.5 x 12.5 x 45 mm, capacité \geq 50 μ l, *BioRad*). Cette cuve est placée dans un granulomètre (*Zetasizer NanoS*) relié à un système informatique, permettant l'acquisition des données (*logiciel Zetasizer, Malvern*).

2. Analyse de la formation des complexes Tex-ARN et Tex Δ S1-ARN par spectroscopie de fluorescence

Tout d'abord, 450 μ l de tampon TMN 2x ont été introduits dans une cuve en quartz de 1 cm de trajet optique et de 2 mm de largeur intérieure (40 x 12,5 x 12,5 mm, *Hellma Analytics*), placée dans un spectrofluorimètre (*Fluoromax-4, Jobin Yvon*). La ligne de base du spectrophotomètre a été enregistrée contre cette cuve, qui sert de référence.

La protéine Tex wt ou Tex Δ S1 est ensuite ajoutée à la cuve de manière à obtenir une concentration finale de 200 nM de protéines. Après addition de la protéine, la solution est homogénéisée par trois retournements successifs de la cuve puis le signal d'émission des tyrosines excitées à 275 nm (et des triptophanes qui sont également excitables à cette longueur d'ondes) est enregistré entre 300 et 450 nm. On procède ensuite à la titration, par ajout de concentrations croissantes d'ARN de 10 à 1000 nM à Tex wt ou Tex Δ S1. Comme précédemment,

après chaque ajout de l'acide nucléique la cuve est homogénéisée par trois retournements successifs, puis le signal d'émission est enregistré de la même manière au fur et à mesure de la titration. Les données brutes obtenues sont corrigée par l'effet tampon et l'effet de dilution, puis normalisées grâce au modèle mathématique de Scatchard. Les données sont représentées sous la forme d'un graphe représentant le quenching de fluorescence placé en ordonnées, en fonction de la concentration d'ARN.

VIII/ Analyse de la fonction de Tex *in vivo*

1. Analyse de l'ARNm *tex* par RACE circulaire

1.1. Préparation des ARN totaux

Une colonie des souches HG001 et RN6390 est mise en préculture dans 1 ml de milieu BHI pendant la nuit. Le lendemain matin, les cultures sont réalisées par ajout de 500 µl de préculture à 50 ml de milieu BHI et incubées à 37°C. Des prélèvements de 20 ml, 10 ml et 5 ml sont faits respectivement à 2 h, 4 h et 6 h de cultures et les ARN totaux sont extraits isolés grâce au kit «FastRNA Pro Blue Kit » selon le protocole du fournisseur (*MP Biomedicals*). Les ARN sont ensuite traités à la DNase dans un volume réactionnel de 20 µl contenant 10 µg d'ARN totaux de chaque souche, 2 µl de DNase I (1 U/ µl) et 2 µl de tampon DNase 10x, puis sont traités au phénol et précipités dans les mêmes conditions que précédemment (§ III.3.1.1). Ils sont ensuite déphosphorylés (§ IV 1) puis à nouveau extraits par traitement au phénol-chloroforme et reprecipités.

1.2. Traitement des ARN avec l'enzyme TAP (*Tobacco Acid Pyrophosphatase*)

La totalité des ARN totaux déphosphorylés sont traités avec l'enzyme TAP afin de laisser un monophosphate en 5' pour permettre leur circularisation. La réaction a lieu dans un volume total de 50 µl, en présence de 10 U d'enzyme TAP, 5 µl de tampon TAP 10x et 10 U de RNasine. Le tout est incubé 45 min à 37°C, puis les volumes sont complétés à 200 µl avec de l'H₂O milliQ, traités au phénol-chloroforme, précipités (§ III.3.1.1) et repris dans 12 µl d' H₂O milliQ.

1.3. Circularisation des ARN

Les ARN précédemment traités à la TAP sont dénaturés par incubation à 95°C pendant 5 min puis dans la glace pendant 5 min. Pour chaque tube d'ARN totaux, des dilutions sont préparées allant de 30 ng/µl à 1 µg/µl, puis différentes quantités de ces ARN sont circularisées dans un volume réactionnel de 25 µl contenant 30 ng à 1 µg d'ARN, 40 U d'enzyme T4 RNA ligase I, 2,5 µl de tampon T4 RNA ligase 10x, 8% DMSO, 10 U RNasine, 1U DNase I (1 U/µl). Le tout est incubé à 37°C pendant 45 min, puis purifié par phénol-chloroforme et précipité comme précédemment (§ III.3.1.1). Les culots sont repris dans 10 µl d'H₂O milliQ.

1.4. Réaction de RT-PCR

Un mélange réactionnel est préparé dans 50 µl de volume contenant 10 µl des ARN ligués, 10 µl de tampon "One step RT-PCR" 5x, 2 µl d'un mélange de dNTP à 10 mM chacun, 1,5 µl d'oligonucléotide sens à 10 µM, 1,5 µl d'oligonucléotide antisens à 10 µM, 2 µl d'enzyme "One Step RT PCR" et 10 U de RNasine. Le tout est placé dans un thermocycleur et le programme suivant est démarré:

| | |
|--|--------------|
| Réverse transcription | 50°C, 30 min |
| Inactivation de la réverse transcriptase-activation de l'ADN polymérase (34 cycles) | 95°C, 15 min |
| Dénaturation | 94°C, 1 min |
| Hybridation | 57°C, 1 min |
| Extension | 72°C, 1 min |
| Extension finale | 72°C, 10 min |

Les produits de RT-PCR sont analysés sur gel d'agarose 1%-TAE 1x, puis purifiés sur gel agarose 1%.

1.5. Clonage des produits de RT-PCR

1.5.1 Transformation de cellules XL1 blue d' *E.coli*

Les produits de RT-PCR obtenus sont clonés dans le vecteur pJET, selon le protocole du kit fournisseur ("CloneJET™ PCR cloning kit", *Fermentas*). 100 µl de cellules d' *E.coli* XL1 blue chimiocompétentes sont ensuite transformées avec 10 µl des produits de RT-PCR purifiés, par choc thermique de 30 min à 4°C, suivi de 1 min à 42°C. 900 µl de LB liquide sont ajoutés, les cellules sont incubées 1h à 37°C sous agitation (180 rpm) puis centrifugées (13000 rpm pendant 5 min). Enfin, elles sont étalées sur milieu solide LB ampicilline (100 µg/µl) et incubées à 37°C pendant la nuit.

1.5.2 Contrôle des clonages par PCR/colonie

Les transformants sont contrôlés pour l'insertion des ADNc dans le vecteur pJET. Chaque réaction se fait dans un volume de 25 µl contenant 5 µl d'ADN, 2,5 µl de tampon "DreamTaq" 10x, 0,5 µl de chaque dNTP à 10 mM chacun, 0,5 µl d'oligonucléotide sens, 0,5 µl d'oligonucléotide antisens, 0,1 µl d'enzyme "DreamTaq" polymérase à 0,5 U/ µl. La réaction a lieu selon le programme suivant:

| | |
|------------------------------|--------------|
| Dénaturation initiale | 95°C, 3 min |
| 35 cycles | |
| Dénaturation | 94°C, 30 sec |
| Hybridation | 50°C, 30 sec |
| Extension | 72°C, 2 min |
| Extension finale | 72°C, 10 |

Les produits PCR positifs pour l'insertion de l'ADNc dans le vecteur sont ensuite envoyés pour séquençage à GATC, puis analysés pour la position du site +1 de démarrage de la transcription de *tex* manuellement, grâce au logiciel d'alignement de séquence SerialCloner (*Softonic*).

2. Visualisation de l'expression de l'ARNm de Tex et ses cibles *in vivo*, par DIG-Northern blot

2.1. Principe du DIG-Northern

Cette méthode consiste à synthétiser des sondes ARN marquées à la digoxygénine par transcription *in vitro* du brin ADN modèle par l'ARN polymérase T7, en présence d'UTP marqué par la digoxygénine. Contrairement aux sondes radioactives qui présentent un risque potentiel pour la santé et une demi-vie très courte de l'ordre de 15 jours, les sondes marquées à la digoxygénine peuvent être manipulées sans risque et présentent une durée de vie d'un an au moins, conservées à -20°C. Par ailleurs, ces sondes garantissent un temps de détection court de l'ordre de la demi heure, contre une exposition d'une nuit complète pour les sondes radioactives. Pour l'ensemble de ces raisons, cette technique a été utilisée dans notre laboratoire pour l'étude des ARN messagers *in vivo*.

2.2. Choix et synthèse des oligonucléotides

2.2.1 Synthèse des sondes ADN par PCR

Pour chaque ARNm étudié (*tex*, *spa*, *fnbB*), le couple d'oligonucléotides a été choisi dans la séquence codante du gène, de manière à générer une sonde de 300 à 400 nucléotides. Sur l'oligonucléotide antisens de chaque couple a été ajouté le promoteur T7 (TAATACGACTCACTATA), qui servira à la transcription du produit PCR de la sonde par l'ARN polymérase T7.

Pour chaque sonde, la réaction de PCR a été réalisée dans un volume final de 50 µl contenant 50 ng d'ADN génomique de la souche HG001, 200 µM de chaque dNTP, 0,5 µM de chaque oligonucléotide sens et antisens (*Tex DIG-Northern for* et *T7* respectivement, **Tableau 6**) le tampon nécessaire à l'ADN polymérase ("GC buffer") à concentration finale 1x et l'ADN polymérase haute fidélité "Phusion" (*Finnzymes*) à 0,02 U/µl. Le programme choisi pour cette PCR est celui recommandé par le fournisseur, avec une température d'hybridation des amorces choisie en gradient de 55 à 65°C, du fait des températures de fusion relativement élevées et une température d'extension de 72°C pendant 15 sec. Les produits PCR sont déposés sur gel agarose 1% puis purifiés et repris dans 30 µl d'eau milliQ.

2.2.2 Transcription in vitro des sondes DIG-ARN

La réaction a lieu pendant 2h à 37°C, dans 20 µl de volume réactionnel contenant 300 à 500 ng de produit PCR purifié, 2 µl du mélange de marquage à la digoxygénine 10x contenant l'ensemble des NTP dont les UTP marqués (Labeling Mix, 5x concentrated, *Roche*) 2 µl de tampon T7 10x, 1 µl de BSA à 2 mg/ml, 1 µl de spermidine à 0,02 M, 1 µl de DTT 0,1 M, 1 µl de RNasine à 40 U/µl et 2 µl d'enzyme T7. Un traitement DNase est ensuite réalisé par ajout de 3 µl de DNase I, 3 µl de tampon DNase 10x et 4 µl d'H₂O milliQ, puis la réaction est arrêtée par l'ajout de 6 µl d'EDTA 0,1 M. Les ARN sont finalement précipités par ajout de 500 µl d'EtOH absolu pendant la nuit à -20°C, puis sont repris dans 20 µl H₂O milliQ et leur concentration estimée par mesure de la DO_{260nm}.

2.3. Cultures de *S. aureus*

Une pré-culture est réalisée à 37°C pendant la nuit sous agitation (180 rpm) à partir d'une colonie ensemencée dans 1 ml de milieu BHI dans un tube stérile de 15 ml. La culture est réalisée à 37°C sous agitation dans 20 ml de milieu BHI dans une fiole Erlenmeyer de 100 ml, ensemencés par 200 µl de pré-culture. Après 3 h de culture, la totalité des 20 ml est centrifugée 15 min à 4000 rpm et les ARN sont isolés comme précédemment grâce au kit « FastRNA Pro Blue Kit » selon le protocole du fournisseur (*MP Biomedicals*).

2.4. Northern blot

2.4.1 Séparation des ARN totaux

Les ARN totaux sont d'abord dénaturés par chauffage 5 min à 70°C, puis séparés selon leur taille par électrophorèse sur un gel d'agarose 1% en conditions dénaturantes. Ce gel est préparé par mélange de 3 g d'agarose dans 300 ml de tampon TBE 1x et de 6 ml de guanidine thiocyanate 1 M. Ces conditions maintiennent les ARN dénaturés au cours de la migration. Les échantillons, d'un volume de 20 µl et contenant chacun 15 µg d'ARN, sont repris dans un volume de bleu urée puis déposés sur le gel. La migration s'effectue pendant 3 h à 100 V à 4°C.

2.4.2 Transfert des ARN sur membrane de nitrocellulose

Les ARN messagers à étudier étant longs (> 1000 nts), le gel va subir deux bains successifs qui aideront au transfert des ARN sur membrane par la suite. Il est donc d'abord placé 30 min dans le tampon de dénaturation contenant 0,05 M NaOH et 0,1 M NaCl, suivi d'un second bain de 30 min dans le tampon neutralisant contenant du Tris HCl 10 mM, pH 7.5 à 20°C. Le gel est ensuite équilibré 5 min dans du tampon SSC 2x à 20°C. Les ARN sont transférés sur une membrane de nitrocellulose (Hybond-N+, *Amersham*) imbibée de tampon SSC 2x. Le transfert est effectué sous vide avec l'appareil *Biometra* à 150 mbar pendant 1h 15 à 20°C.

2.4.3 Hybridation des membranes

Après transfert, la membrane est placée sous UV à 254 nm (UV Stratalinker 1800, *Stratagene*). Ce pontage lie de manière covalente les ARN à la membrane. Celle-ci est ensuite placée dans 10 ml de tampon d'hybridation dans un four rotatif (*Hybrigene*) à 68°C pendant 45 min. 1 µl de sonde ARN est mélangée à 500 µl du même tampon, chauffée 5 min à 70°C, puis

ajoutée à 20 ml de tampon d'hybridation. L'hybridation de la sonde est réalisée pendant une nuit à 68°C.

2.4.4 Détection des ARN messagers

La membrane est tout d'abord lavée deux fois 5 min à 20°C par 10 ml de tampon SSC 2x, suivi de deux fois 15 min dans 10 ml de tampon de lavage à 68°C, avant d'être bloquée pendant 30 min minimum dans la solution de blocage 1x. L'anticorps anti-digoxygénine (0,75 U/ml, Roche) est centrifugé 5 min à 10000 rpm, puis 2 µl sont prélevés, additionnés de 20 ml de solution de blocage 1x et incubés 30 min à 20°C. La membrane est ensuite lavée deux fois dans du tampon de lavage, puis incubée 5 min dans le tampon de détection. Finalement, la révélation se fera par ajout de quelques gouttes de réactif CDP-Star (Roche), puis exposition de la membrane à un film autoradiographique pendant 5 min à 1 heure.

Un contrôle interne qui permet de visualiser l'ARNr 5S est indispensable, pour vérifier que les quantités d'ARN totaux dans chaque essai sont comparables.

3. Construction de mutants conditionnels de *tex* par insertion d'un intron dans la séquence génomique : le système Targetron®

3.1. Choix du site d'insertion de l'intron sur le gène *tex*

La séquence du gène *tex* a été soumise à un algorithme informatique (www.ingex.com), afin de déterminer les meilleures séquences candidates pour l'insertion de l'intron, ainsi que les oligonucléotides nécessaires à la modification de l'intron pour son insertion optimale dans la séquence choisie. Après soumission, une liste de sites potentiels nous est parvenue (annexe **Tableau 5**). Comme évoqué plus haut (Résultats & Discussion § I. 4) l'insertion de l'intron a été réalisée sur le brin sens au tout début du gène, avant le domaine de liaison à l'ADN Hth (position 404) et à l'extrémité C terminale du gène, juste avant le domaine S1 de fixation aux ARN (position 2001).

3.2. Création du plasmide pNL9162 contenant l'intron modifié

3.2.1 Réaction de PCR pour la modification de l'intron

Une PCR chevauchante a été réalisée conformément au protocole du fournisseur et va permettre de muter l'intron sur une région de 350 pb (Résultats & Discussion, § I. 4). Un mélange

contenant les 4 amorces nécessaires à la réaction est d'abord préparé dans un volume de 20 µl contenant 2 µl d'amorce IBS à 100 µM, 2 µl d'amorce EBS1d à 100 µM, 2 µl d'amorce EBS2 à 20 µM, 2 µl de l'amorce universelle EBS à 20 µM (**Tableau 6**) et 12 µl H₂O milliQ. La PCR est ensuite réalisée dans un volume réactionnel de 50 µl contenant 37,5 µl d' H₂O milliQ, 1 µl de l'intron sauvage qui servira de brin matrice, 5 µl de tampon PCR Dream taq buffer 10x, 5 µl du mélange de dNTP à 2,5 mM et 0,5 µl d'enzyme Dream Taq (5U/µl).

Le programme de PCR suivi est le suivant:

| | |
|------------------------------|--------------|
| Dénaturation initiale | 94°C, 30 sec |
| 30 cycles: | |
| Dénaturation | 94°C, 15 sec |
| Hybridation | 55°C, 30 sec |
| Extension | 72°C, 30 sec |
| Extension finale | 72°C, 2 min |

Les produits PCR ont ensuite été déposés sur gel agarose 2% pour contrôle, puis purifiés sur colonne par l'utilisation du kit commercial "Nucleospin Gel et PCR clean up" (*Macherey-Nagel*) et les culots repris dans 30 µl de tampon d'élution.

3.2.2 Digestion des introns modifiés et du plasmide pNL9162

Les digestions des introns ont été réalisées dans un volume total de 60 µl, contenant 50 µl de produit PCR purifié (soit environ 2,5 µg), 6 µl de tampon de restriction "Tango" 10x, 2 µl d'enzyme HindIII (20 U/ µl) et 2 µl d'enzyme BsrGI (10 U/µl), puis sont incubées 4 h à 37°C et purifiées sur les mêmes colonnes que précédemment ("Nucleospin Gel et PCR clean up", *Macherey-Nagel*).

La digestion du plasmide est réalisée dans les mêmes conditions, puis une purification au phénol-chloroforme est réalisée (§ III.3.1.1), suivi d'une déphosphorylation. Cette réaction a lieu dans un volume total de 40 µl, contenant la totalité du plasmide digéré purifié (20 µl), 4 µl de tampon de déphosphorylation « NEB3 » 10x (*Biolabs*), 3 µl d'enzyme de déphosphorylation « CIP » (*Biolabs*) et 13 µl d'H₂O milliQ. Le tout est incubé 1 h à 50°C, puis est suivi d'un traitement au phénol-chloroforme et d'une précipitation à l'EtOH absolu pendant la nuit à -20°C.

3.2.3 Ligation de l'intron et du plasmide pNL9162

Les ligations ont été réalisées dans un volume total de 20 µl, contenant 10 ng de plasmide linéarisé (1 µl), 100 ng d'intron linéarisé (10 µl), 2 µl de tampon ligase 10x, 1 µl d'enzyme T4 ligase (2U/µl) et 6 µl d' H₂O milliQ puis ont été incubées pendant la nuit à 16°C.

3.3. Transformation des cellules DH5α d'E.coli

100 µl de cellules chimiocompétentes *E. coli* DH5α sont tout d'abord transformées avec 10 µl de produit de ligation, puis subissent un choc thermique de 30 min à 4°C, suivi de 1 min à 42°C. 900 µl de LB liquide sont ajoutés puis les cellules sont incubées 1h à 37°C sous agitation (180 rpm). Les cellules sont ensuite centrifugées (13000 rpm pendant 5 min), puis étalées sur milieu solide LB ampicilline (100 µg/ µl) et incubées à 37°C pendant la nuit.

La vérification du plasmide est ensuite réalisée par extraction et digestion de celui-ci. L'extraction se fait par l'utilisation du kit commercial « Nucleospin plasmid » (protocole fournisseur, *Macherey-Nagel*). La digestion, qui permet de vérifier l'insertion de l'intron dans le plasmide a ensuite lieu dans 10 µl de volume total contenant 5 µl de plasmides extraits, 1 µl de tampon de digestion « Tango 5x », 0,5 µl d'enzyme *HindIII* (20 U/µl), 0,5 µl d'enzyme *BsrGI* (10 U/µl) et 3 µl d'H₂O milliQ. Le tout est incubé à 37°C pendant 1 h 30 puis 5 µl sont déposés sur gel d'agarose 2%. Les clones positifs sont finalement envoyés à *GATC*, pour séquençage.

3.4. Transformation des cellules RN4220 de S. aureus

1 µg du plasmide portant l'intron sont ajoutés à 100 µl de cellules RN4220 puis transférés dans une cuve d'électroporation (*GenePulser/MicroPulser Cuvettes, BioRad*) et transformées par électroporation à 2.5 kV pendant 1.80 ms. 900 µl de BHI sont ajoutés aux cellules, qui sont ensuite incubées à 37°C pendant 3 h. Les cellules sont ensuite centrifugées (3750 rpm pendant 5 min), les culots repris dans 100 µl de milieu et étalés sur milieu BHI agar + erythromycine (10 µg/µl). Les boîtes sont incubées à 30°C pendant la nuit.

3.5. Transformation des cellules RN6390 et HG001 de *S. aureus* et induction de la transcription de l'intron

3.5.1 Extraction du plasmide pNL9162 portant l'intron

Une colonie des cellules RN4220 transformées est mise en préculture dans 20 ml de BHI + erythromycine (10 µg/µl) et incubée à 30°C pendant la nuit. Le lendemain matin, les cultures sont centrifugées 5 min à 3750 rpm. Les cellules sont lysées par incubation à 37°C pendant 30 min, après ajout de 1 ml de tampon de lyse additionné de 20 µl de lysostaphine à 2,5 µg/µl. Les plasmides sont extraits par l'utilisation du kit commercial « Nucleospin plasmid » (protocole fournisseur, *Macherey-Nagel*) selon le protocole du fournisseur.

*3.5.2 Transformation des cellules RN6390 et HG001 de *S. aureus* et induction de l'expression de l'intron*

La transformation des cellules est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment (§ VIII.3.4), par électroporation. Une colonie de chaque mutant est mis en préculture dans 5 ml de BHI + erythromycine (10 µg/µl) et incubée à 30°C pendant la nuit. Le lendemain matin, des cultures sont réalisées à partir de 100 µl de chaque préculture, dans 10 ml de BHI erythromycine et incubées à 30°C jusqu'à ce que la DO_{600nm} soit égale à 0,5. L'expression de l'intron est ensuite induite par ajout de chlorure de cadmium à 10 µM et incubation à 30°C pendant 90 min. Des dilutions de ces cultures à 10^{-6} , 10^{-7} et 10^{-8} sont finalement étalées sur BHI agar + erythromycine à 30°C pendant la nuit.

3.5.3 Vérification de l'insertion de l'intron dans l'ADN génomique de HG001 et RN6390 par PCR sur colonie

L'insertion de l'intron dans l'ADN génomique est vérifiée par PCR sur colonie, dans les conditions suivantes: chaque réaction a lieu dans un volume réactionnel de 50 µl, contenant 6 µl d'un mélange de dNTP à 2,5 mM, 5 µl de tampon PCR "DreamTaq" 10x, 0,5 µl d'oligonucléotide sens à 10 µM, 0,5 µl d'oligonucléotide antisens à 10 µM, 0,5 µl d'enzyme DreamTaq à (5U/µl) et 37,5 µl d'H₂O milliQ. Le programme utilisé est le suivant:

Dénaturation initiale 95°C, 5 min

35 cycles:

Dénaturation 95°C, 30 sec

Hybridation 55°C, 30 sec (intron position 2001) / 58°C (intron position 404)

Extension 72°C, 3 min

Extension finale 72°C, 3 min

Les produits PCR des clones testés positifs sont purifiés sur gel d'agarose 1% (kit "Nucleospin Gel et PCR clean up", *Macherey-Nagel*) puis envoyés à séquencer pour confirmation.

3.5.4 Elimination du plasmide pNL9162

Les clones positifs pour chaque insertion dans les souches RN6390 et HG001 sont mis en cultures dans 3 ml de milieu BHI erythromycine et incubés à 30°C pendant la nuit. Une oèse de ces cultures est étalée sur milieu solide BHI agar et incubée à 42°C pendant la nuit, dans le but d'éliminer le plasmide porteur d'une origine de répllication thermosensible.

L'élimination du plasmide est ensuite vérifiée par repiquage des colonies ayant poussé à 42°C, sur milieu BHI + erythromycine à 30°C et sur milieu BHI sans erythromycine à 37°C. Dans le premier cas, aucune colonie ne devrait apparaître étant donné que le plasmide qui portait la résistance à l'érythromycine a été éliminé. Dans le deuxième cas, l'apparition de transformants sur boîte témoignera du succès de l'insertion de l'intron dans l'ADN génomique. En effet, le plasmide portant l'origine de répllication thermosensible ayant été excisé, les bactéries doivent être capables de pousser à 37°C.

3.6. Analyse du phénotype des souches mutées

3.6.1 Analyse du phénotype de croissance en milieu NZM

Une colonie de chaque souche (RN6390 WT, RN6390-404, RN6390-2001, HG001 WT, HG001-404 et HG001-2001) est mise en préculture dans 1 ml de milieu BHI à 37°C pendant la nuit. La DO_{600nm} est mesurée le lendemain matin, puis les précultures sont centrifugées (13000 rpm pendant 5 min), les culots sont lavés par 1 ml de Tris HCl pH 7.5 à 20°C (13000 rpm pendant 5 min) et sont finalement repris dans 1 ml de milieu NZM. Les cultures sont réalisées par ensemencement de 10 ml de milieu de culture BHI avec le même nombre de cellules pour

chaque souche et la DO_{600nm} est mesurée toutes les heures pendant 9 h.

3.6.2 Quantification de la production de biofilms par la méthode du Cristal Violet (Claire Lays, INSERM Lyon)

La technique de coloration au cristal violet permet de mesurer de manière semi-quantitative la formation de biofilm. Après 24 h de culture en plaque de 96 puits, le biofilm bactérien formé au fond de chaque puit est estimé après coloration au cristal violet et mesure de la DO_{570nm} par spectrophotométrie. La valeur de DO est proportionnelle à la densité de biofilm formé.

Les différentes souches bactériennes ont été cultivées en BHI à 37°C pendant la nuit. Après standardisation à $DO_{600nm} = 1$, chaque suspension a été diluée au 1:250 en BHI supplémenté de 0,25 % de glucose. 200 μ l de cette suspension ont été transférés dans une plaque de 96 puits à fond plat (*Becton Dickinson*). Deux puits ont été utilisés pour chaque souche. Le milieu BHI + glucose 0,25 % a été utilisé comme témoin. La plaque a été alors incubée 24 h sans agitation à 37°C. Après incubation, le contenu de chaque puit a été retiré doucement et les puits ont été rincés au PBS (*Invitrogen*) pour éliminer les bactéries non adhérentes. Le biofilm a été coloré à l'aide d'une solution de 150 μ l de cristal violet (0,01 % p/v) (*Merck*) pendant 30 min. Le surplus de colorant a été rincé 4 fois au PBS. La plaque a été ensuite séchée 30 min et le colorant contenu dans le biofilm a été resolubilisé avec 100 μ l d'acide acétique 33 % (v/v) (*VWR*). La DO_{570nm} a alors été mesurée pour chaque puit à l'aide d'un lecteur de plaque (micro ELISA Auto Reader, model 680, *BioRad*). Tous les essais ont été réalisés trois fois et la moyenne des valeurs de DO_{570nm} a été calculée pour chaque souche et le témoin.

4. Analyse quantitative du protéome des souches HG001 et RN6390 sauvages et mutées

4.1. Conditions de croissance des souches

Une colonie de chaque souche (HG001 wt, HG001-404, HG001-2001 et RN6390 wt, RN6390-404 et RN6390-2001) est mise en pré-culture dans 1 ml de milieu BHI à 37°C pendant la nuit, sous agitation (180 rpm). Les cultures sont préparées en triplicats pour chaque souche dans 50 ml de BHI pendant 3h à 37°C, puis centrifugées 15 min à 4000 rpm.

4.2. Protocole d'extraction des protéines totales

4.2.1 Lyse cellulaire

Les culots cellulaires sont lavés avec du Tris HCl 10 mM pH 7.5 à 20°C, par centrifugation (4000 rpm pendant 15 min) puis repris dans 5 ml de tampon de lyse contenant 10 mM Tris HCl pH 7.5 à 20°C, 20 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, lysostaphine 50 µg/ml, 500 µl d'inhibiteurs de protéases 100x, 2 µl DNaseI (1U/µl) et 2 µl RNase. La lyse est ensuite réalisée par incubation à 37°C pendant 30 min des cellules.

4.2.2 Extraction des protéines totales

Les protéines totales sont extraites par ajout de 3 ml de Trizol® (*Life Technologies*) à chaque échantillon (250 µl/10⁷ cellules). Elles sont ensuite mélangées au vortex pendant 10 sec puis laissées à température ambiante 5 min. 300 µl de réactif BCP (1-Bromo-3-chloropropane) permettant la séparation des protéines et des acides nucléiques en solution sont ensuite ajoutés. Les tubes sont à nouveau mélangés 10 sec au vortex, laissés 5 min à 20°C puis centrifugés 10 min à 13 000 rpm. La phase supérieure qui contient les ARN est éliminée et 900 µl d'éthanol absolu sont ajoutés à la phase inférieure de couleur rose, qui contient les protéines. Les échantillons sont mélangés, laissés 5 min à 20°C, puis centrifugés 5 min à 2000 g. 7 volumes d'acétone froid sont ajoutés aux surnageants dans un tube Falcon 50 ml et laissés à précipiter pendant la nuit à -20°C. Le lendemain, les échantillons sont centrifugés à 8000 rpm pendant 30 min, les culots sont lavés par 3 ml d'éthanol 80%, séchés sous hotte et resolubilisés dans 100 µl d'un tampon dénaturant « 2D » (7 M urée, 2 M thiourée, 4% CHAPS, 25 mM Tris-HCl pH 8) et leur concentration est finalement estimée par la méthode de Bradford.

4.3. Estimation de la concentration des protéines totales par la méthode de Bradford.

20 µl de chaque réplicat pur, dilué 2x ou dilué 4x dans de l'H₂O milliQ sont déposés dans une microplaque 96 puits (*Noon*) en duplicats et 280 µl de réactif de Bradford (*BioRad*) dilué 5x sont ajoutés. En parallèle, une gamme étalon est réalisée dans les mêmes conditions à l'aide de BSA, dont les concentrations varient de 50 à 500 µg/ml. La microplaque est ensuite placée dans un lecteur de plaque (*Microplaque Reader, Model 550, BioRad*) et l'absorbance à 594 nm enregistrée. Enfin, un graphe est tracé de la DO_{594nm} en fonction de la concentration en BSA, les mesures de DO_{594nm} moyennes des duplicats sont reportées sur la droite étalon et les concentrations des protéines totales estimées.

4.4. Analyse comparative des protéomes des souches HG001 et RN6390 sauvages et mutées

4.4.1 Préparation des échantillons et digestion trypsique

5 µg de protéines par réplicat sont précipités par ajout de méthanol et acétate d'ammonium 0.1 M, puis repris dans un tampon contenant du bicarbonate d'ammonium 50 mM. Une étape de dénaturation à 96°C pendant 10 min, suivie d'une réduction-alkylation des cystéines précèdent la digestion des protéines réalisée pendant la nuit à température ambiante, avec 200 ng de trypsine par échantillon.

4.4.2 Séparation chromatographique liquide en phase inverse des peptides

La chaîne chromatographique utilisée est le modèle NanoLC Ultra 2D Plus (*Eksigent-Sciex*). Les peptides séchés au Speed Vac sont repris dans une solution d'H₂O-acide formique 0.1 %. 500 ng des peptides sont injectés un système Nano HPLC de type « Trap Elute » C18 (phase réverse) à faible débit (300 nl/mn). Une première colonne (*Trap C18*) concentre et élimine les sels des échantillons. Les peptides sont ensuite élués de la colonne séparative C18 par gradient d'hydrophobicité en 120 mn. Chaque réplicat d'injection est espacé de 4 h, comprenant la régénération de la colonne C18 sans effet mémoire et la calibration périodique du spectromètre de masse.

4.4.3 Analyse de masse des peptides

L'analyse des échantillons a été réalisée par P. Hammann, L. Kuhn et J. Chicher (plateforme protéomique, IBMC, Strasbourg).

Le mode d'ionisation ESI (*Electrospray Ionisation*) à l'entrée de l'instrumentation génère des peptides multichargés, principalement des 2 à 3 fois chargés, $(M+2H)^{2+}$ et $(M+3H)^{3+}$. Ces ions sont analysés par cycle d'acquisition de 1 spectre MS (masse des peptides) suivi de 20 spectres MSMS (fragmentation des 20 peptides les plus intenses du spectre MS). Chaque cycle « Top 20 » dure 1.5 secondes. Une règle d'acquisition limitant l'observation consécutive d'un peptide de même masse augmente la dynamique de détection de peptides faiblement abondants dans les extraits (problématique de la co-élution peptidique proportionnelle à la taille du protéome). L'appareillage est de type Q TOF, modèle triple TOF 5600 (*Eksigent-Sciex*). Le fichier final d'acquisition comporte la somme des spectres de fragmentation de peptides, détectés à la sortie de colonne HPLC.

4.4.4 Identification des peptides par bioinformatique

L'ensemble de ces données expérimentales de fragmentation MSMS est comparée à une banque de spectres MSMS théoriques de l'organisme bactérien de référence (*S. aureus* N315). Le logiciel Mascot (*Matrix Science*) compile ces données et attribue un score d'identification par peptide et somme les scores des peptides discriminants par protéine. Afin d'estimer la fiabilité de l'identification et de déterminer un seuil de score à partir duquel l'identification est validée, une banque reverse des séquences protéiques de *S. aureus* est fusionnée à celle de l'organisme de référence. L'identification d'une protéine « reverse » est synonyme de « n'importe quoi ». Dans le listing final d'identification, classé par score Mascot décroissant, les hits reverses apparaissent en bas de tableau. Ils sont comptés pour déterminer un taux de faux positifs. Le critère actuel de publication est un FDR (*False Discovery Rate*) inférieur à 1 %, valeur acceptable d'erreur.

5. Insertion d'un FLAG-tag en C-terminal du gène *tex* par recombinaison homologue dans la séquence génomique

5.1. Choix de la position de l'insertion du FLAG pour *Tex* WT et *Tex*ΔS1

Le FLAG a été inséré à l'extrémité C terminale du gène *tex* d'une part, afin de visualiser la protéine sauvage et à la position 1926 du gène d'autre part, qui permettra de visualiser la protéine sans son domaine S1 de liaison aux ARN. Ces insertions ont été réalisées dans les souches BJC100 de *S. aureus*, délétées de leur système de restriction/modification.

5.2. Choix des oligonucléotides

Le protocole utilisé pour la construction du plasmide permettant la recombinaison homologue a été adapté de Vagner *et al.*, 1998.

Les oligonucléotides ont été choisis de manière à créer une région d'homologie suffisante, nécessaire à la recombinaison homologue pour l'insertion de l'étiquette FLAG. Ceux-ci permettent d'amplifier les 1000 derniers nucléotides pour l'insertion du FLAG à l'extrémité du gène sauvage. Pour la protéine sans son domaine S1, les 1926 premiers nucléotides ont été amplifiés, permettant ainsi l'insertion du FLAG juste avant ce domaine.

5.3. Amplification des régions d'homologie par PCR

Les régions d'homologie ont été amplifiées par PCR dans les conditions suivantes. Un volume réactionnel de 50 µl a été préparé qui comprend 10 µl de tampon "GC" 5x, 1 µl de chaque

dNTP à 10mM, 2,5 µl de chaque oligonucléotide sens et antisens à 10 µM, 1 µl d'ADN (50 ng), 1,5 µl de DMSO, 0,5 µl d'enzyme Phusion à 2U/µl et 28 µl d'H₂O milliQ. La réaction a ensuite eu lieu selon le programme:

| | |
|------------------------------|--------------|
| Dénaturation initiale | 98°C, 30 sec |
| 25 cycles: | |
| Dénaturation | 98°C, 10 sec |
| Hybridation | 55°C, 30 sec |
| Extension | 72°C, 30 sec |
| Extension finale | 72°C, 10 min |

5.4. Création du plasmide pMUTIN portant la région homologue suivie du FLAG

5.4.1 Digestion du plasmide et des régions homologues

5 µg de plasmide pMUTIN sont digérés dans un volume réactionnel de 50 µl contenant 4 µl de plasmide, 5 µl de tampon de digestion Kpn buffer 10x, 1 µl d'enzyme Kpn à 10U/µl, 4 µl d'enzyme Hind III à 10 U/µl et 36 µl d' H₂O milliQ. Le mélange réactionnel est ensuite incubé pendant 4 h à 37°C, puis la digestion est vérifiée sur gel d'agarose 1% avant d'être purifiée sur gel grâce au kit "Gel et PCR clean up" (*Macherey-Nagel*). Pour éviter au plasmide de se religuer sur lui-même, on procède ensuite à une déphosphorylation, dans les mêmes conditions que précédemment (§ IV.1). La digestion des régions homologues est réalisée dans les mêmes conditions.

5.4.2 Ligation du plasmide avec les régions homologues et transformation d' E.coli

La ligation du plasmide et des régions homologues est réalisée dans un volume réactionnel de 10 µl, contenant 20ng de plasmide (1 µl), 200 ng de produit PCR purifié (3 µl), 1 µl de tampon de ligation T4 10x, 1 µl d'enzyme T4 ligase à 10U/µl 2 U/µl et 4 µl d'H₂O milliQ. Le tout est incubé à 16°C pendant la nuit. 100 µl de cellules XL1 blue d' *E. coli* ont été transformées avec le plasmide selon les mêmes conditions que précédemment (§ VIII.3.3).

5.5. Transformation de la souche BJC100 de *S. aureus* et intégration du FLAG dans le génome

La transformation est réalisée par ajout de 5 µg d'ADN dans 100 µl de cellules BJC100 compétentes, par électroporation (§ VIII.3.4).

Les insertions sont vérifiées par PCR sur 20 ng d'ADN chromosomique extrait des souches dans les mêmes conditions que précédemment, selon le programme:

| | |
|------------------------------|--------------|
| Dénaturation initiale | 95°C, 5 min |
| 34 cycles: | |
| Dénaturation | 95°C, 30 sec |
| Hybridation | 55°C, 30 sec |
| Extension | 72°C, 30 sec |
| Extension finale | 72°C, 5 min |

Les produits PCR présentant un résultat positif pour l'insertion sont finalement envoyés au séquençage pour confirmation.

5.6. Vérification de l'insertion du FLAG par Western blot

5.6.1 Cultures de *S. aureus*

Une colonie des souches BJC100 sauvages et FLAGuées est prélevée et mise en préculture dans 2 ml de BHI + érythromycine (10 µg/µl) pendant la nuit à 37°C. Les cultures sont ensuite réalisées par ajout de 1 ml de préculture dans 100 ml de BHI + érythromycine et les protéines totales sont extraites à différents temps par prélèvement de 40 ml, 20 ml et 10 ml à 2 h, 4 h et 6 h respectivement.

5.6.2 Lyse des cellules et détermination de la concentration en protéines totales par la méthode de Bradford

Les cellules sont centrifugées (3750 rpm pendant 15 min à 4°C), les culots sont lavés par 20 ml de Tris HCl 20 mM pH 7.5 à 20°C (3750 rpm pendant 15 min à 4°C) puis repris dans du tampon de lyse contenant 20 mM Tris-HCl pH 7.5 à 20°C, 10 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 2 mM DTT,

1 mM EDTA, 50 µg/µl lysostaphine et incubés à 37°C pendant 30 min. Les cellules sont ensuite centrifugées (5 min à 13000 rpm), 2 µl de DNase I (1U/µl) et un cocktail d'anti-protéases (100x) sont ajoutés aux surnageants, puis les lysats sont incubés 5 min à 37°C. La concentration en protéines totales est déterminée par la méthode de Bradford (§ VIII.4.3).

5.6.3 *Western blot*

100 µg de protéines totales sont reprises dans 5 µl de bleu urée dans un volume total de 15 µl et chargées sur un gel SDS-PAGE 10%. Les protéines sont mises à migrer pendant 20 min à 50 V, jusqu'à atteindre la limite entre gel de concentration et gel de séparation, puis le voltage est monté à 100 V.

Les protéines sont ensuite transférées sur membrane PVDF pendant 10 min à 1.3 A grâce au système Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (*BioRad*). La membrane est lavée dans une solution de TBS puis bloquée pendant 1 h à 20°C dans une solution de blocage contenant 5% de lait en poudre (*Regilait*). La détection des protéines FLAGuées se fait comme suit: la membrane est incubée avec l'anticorps primaire (anticorps monoclonal de souris anti-FLAG, *Sigma*) dilué au 1/1000 dans la solution de blocage (1 heure à température ambiante), puis lavée 4x 5 min dans une solution de TBST. Elle est ensuite incubée avec l'anticorps secondaire (anticorps de chèvre anti-souris, *BioRad*) dilué au 1/3000 dans la solution de blocage (1 h à 20°C) et lavée 4x 5 min dans du TBST. Les protéines FLAGuées sont finalement révélées par addition de la solution de détection sur la membrane (ECL Western blotting detection reagents, *Amersham*).

6. Identification des partenaires de Tex par immunoprécipitation

6.1. *Identification des protéines partenaires*

6.1.1 *Cultures de S.aureus*

Une colonie de chaque souche est mise en préculture dans 5 ml de BHI (souche BJC100) ou 5 ml de BHI + erythromycine (10 µg/ µl) (souches BJC100 Tex FLAGuée et BJC100 Tex-2001 FLAGuée) et incubées pendant la nuit à 37°C. Les cultures sont faites dans les mêmes conditions, par ajout de 200 µl dans 200 ml de milieu puis incubées pendant 3h à 37°C.

6.1.2 Lyse des cellules

Après 3 h d'incubation, les cellules sont centrifugées 15 min à 3750 rpm et reprises dans 5 ml de tampon de lyse contenant du TBS 1x, 1% de Triton X-100, un cocktail d'antiprotéases et 1 mM EDTA. La lyse est effectuée de manière mécanique, par l'utilisation du FastPrep (3x 40 sec, set. 6.0, *Sigma*) et les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation 5 min à 13 000 rpm.

6.1.3 Immunoprécipitation

La préparation de la résine couplée aux anticorps anti-FLAG ainsi que l'immunoprécipitation sont faits selon les recommandations du fournisseur (*Sigma*). 40 µl d'anticorps anti-FLAG sont ajoutés par ml de lysat, puis incubés pendant 2 h à 4°C. Les anticorps ayant lié les complexes sont ensuite centrifugés pendant 30 sec à 6000 g, puis lavés 3 fois avec 500 µl de tampon TBS. L'élution se fait par compétition en incubant 100 µl de FLAG peptide à 150 ng/µl avec les anticorps couplés aux complexes, pendant 30 min à 4°C. Le tout est centrifugé 30 sec à 6000 g, et les surnageants contenant les protéines partenaires sont récupérés.

6.1.4 Analyse des protéines co-éluées avec Tex

L'analyse des protéines partenaires de Tex a été menée de la même manière que précédemment, par la technique de LC-MSMS puis comparaison des spectres à une banque de données (§ VIII.4.4).

6.2. Identification des ARN partenaires

L'expérience est menée dans les mêmes conditions que pour les protéines partenaires, à l'exception de l'incubation des anticorps avec le lysat qui est réalisée 30 min à 4°C. Une étape supplémentaire de traitement à la DNase a également été ajoutée après élution, suivi d'une purification au phénol-chloroforme et d'une précipitation (§ III.3.1.1). Cette étape devra être améliorée car nous n'avons pas réussi à éliminer complètement les traces de phénol qui empêche les analyses de séquençage haut débit. Ne disposant pas assez de matériel il sera nécessaire de combiner plusieurs échantillons préparés en parallèle.

Références bibliographiques

- Abe, K., Obana, N., and Nakamura, K. (2010). Effects of depletion of RNA-binding protein Tex on the expression of toxin genes in *Clostridium perfringens*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *74*, 1564–1571.
- Ardehali MB, Yao J, Adelman K, Fuda NJ, Petesch SJ, Webb WW, Lis JT. (2009). Spt6 enhances the elongation rate of RNA polymerase II in vivo. *EMBO J.* *28*, 1067-77.
- Alouf, J.E. (2000). Cholesterol-binding cytolytic protein toxins. *Int. J. Med. Microbiol.* *290*, 351–356.
- Andrulis, E.D., Werner, J., Nazarian, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Lis, J.T. (2002). The RNA processing exosome is linked to elongating RNA polymerase II in *Drosophila*. *Nature* *420*, 837–841.
- Aravind, L., Makarova, K.S., and Koonin, E.V. (2000). Holliday junction resolvases and related nucleases: identification of new families, phyletic distribution and evolutionary trajectories. *Nucleic Acids Res.* *28*, 3417–3432.
- Aravind, L., Anantharaman, V., Balaji, S., Babu, M.M., and Iyer, L.M. (2005). The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiol. Rev.* *29*, 231–262.
- Bayer, M.G., Heinrichs, J.H., and Cheung, A.L. (1996). The molecular architecture of the sar locus in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* *178*, 4563–4570.
- Becker, S., Frankel, M.B., Schneewind, O., and Missiakas, D. (2014). Release of protein A from the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 1574–1579.
- Bekeredjian-Ding, I., Inamura, S., Giese, T., Moll, H., Endres, S., Sing, A., Zähringer, U., and Hartmann, G. (2007). *Staphylococcus aureus* Protein A Triggers T Cell-Independent B Cell Proliferation by Sensitizing B Cells for TLR2 Ligands. *J. Immunol.* *178*, 2803–2812.
- Benito, Y., Kolb, F.A., Romby, P., Lina, G., Etienne, J., and Vandenesch, F. (2000). Probing the structure of RNAIII, the *Staphylococcus aureus* agr regulatory RNA, and identification of the RNA domain involved in repression of protein A expression. *RNA N. Y. N* *6*, 668–679.
- Bennett, R.J., and West, S.C. (1995). RuvC protein resolves Holliday junctions via cleavage of the continuous (noncrossover) strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 5635–5639.
- Berube, B.J., Sampedro, G.R., Otto, M., and Bubeck-Wardenburg, J. (2014). The psm α locus regulates production of *Staphylococcus aureus* alpha-toxin during infection. *Infect. Immun.* *82*, 3350–3358.
- Bohn, C., Rigoulay, C., and Bouloc, P. (2007). No detectable effect of RNA-binding protein Hfq absence in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* *7*, 10.
- Bohn, C., Rigoulay, C., Chabelskaya, S., Sharma, C.M., Marchais, A., Skorski, P., Borezée-Durant, E., Barbet, R., Jacquet, E., Jacq, A., et al. (2010). Experimental discovery of small RNAs in *Staphylococcus aureus* reveals a riboregulator of central metabolism. *Nucleic Acids Res.* *38*, 6620–6636.
- Boisset, S., Geissmann, T., Huntzinger, E., Fechter, P., Bendridi, N., Possedko, M., Chevalier, C., Helfer, A.C., Benito, Y., Jacquier, A., et al. (2007). *Staphylococcus aureus* RNAIII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism. *Genes Dev.* *21*, 1353–1366.
- Bokarewa, M.I., Jin, T., and Tarkowski, A. (2006). *Staphylococcus aureus*: Staphylokinase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *38*, 504–509.
- Bortvin, A., and Winston, F. (1996). Evidence that Spt6p controls chromatin structure by a direct interaction with histones. *Science* *272*, 1473–1476.

- Briani, F., Curti, S., Rossi, F., Carzaniga, T., Mauri, P., and Deho, G. (2008). Polynucleotide phosphorylase hinders mRNA degradation upon ribosomal protein S1 overexpression in *Escherichia coli*. *RNA* *14*, 2417–2429.
- Bronner, S., Monteil, H., and Prévost, G. (2004). Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS Microbiol. Rev.* *28*, 183–200.
- Brussow, H., Canchaya, C., and Hardt, W.-D. (2004). Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens: from Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *68*, 560–602.
- Buckley MS, Kwak H, Zipfel WR, Lis JT. (2014). Kinetics of promoter Pol II on Hsp70 reveal stable pausing and key insights into its regulation. *Genes Dev.* *28*, 14-19.
- Buratowski S. (2003). The CTD code. *Nat Struct Biol.* *10*, 679-80
- Burnouf, D., Ennifar, E., Guedich, S., Puffer, B., Hoffmann, G., Bec, G., Disdier, F., Baltzinger, M., and Dumas, P. (2012). kinITC: a new method for obtaining joint thermodynamic and kinetic data by isothermal titration calorimetry. *J. Am. Chem. Soc.* *134*, 559–565.
- Büttner, K., Nehring, S., and Hopfner, K.-P. (2007). Structural basis for DNA duplex separation by a superfamily-2 helicase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *14*, 647–652.
- Bycroft, M., Hubbard, T.J.P., Proctor, M., Freund, S.M.V., and Murzin, A.G. (1997). The Solution Structure of the S1 RNA Binding Domain: A Member of an Ancient Nucleic Acid–Binding Fold. *Cell* *88*, 235–242.
- Carbonetti, N.H., Khelef, N., Guiso, N., and Gross, R. (1993). A phase variant of *Bordetella pertussis* with a mutation in a new locus involved in the regulation of pertussis toxin and adenylate cyclase toxin expression. *J. Bacteriol.* *175*, 6679–6688.
- Carbonetti, N.H., Fuchs, T.M., Patamawenu, A.A., Irish, T.J., Deppisch, H., and Gross, R. (1994). Effect of mutations causing overexpression of RNA polymerase alpha subunit on regulation of virulence factors in *Bordetella pertussis*. *J. Bacteriol.* *176*, 7267–7273.
- Carpousis, A.J. (2007). The RNA degradosome of *Escherichia coli*: an mRNA-degrading machine assembled on RNase E. *Annu. Rev. Microbiol.* *61*, 71–87.
- Carpousis, A.J., Van Houwe, G., Ehretsmann, C., and Krisch, H.M. (1994). Copurification of *E. coli* RNAase E and PNPase: Evidence for a specific association between two enzymes important in RNA processing and degradation. *Cell* *76*, 889–900.
- Cassat, J., Dunman, P.M., Murphy, E., Projan, S.J., Beenken, K.E., Palm, K.J., Yang, S.-J., Rice, K.C., Bayles, K.W., and Smeltzer, M.S. (2006). Transcriptional profiling of a *Staphylococcus aureus* clinical isolate and its isogenic agr and sarA mutants reveals global differences in comparison to the laboratory strain RN6390. *Microbiology* *152*, 3075–3090.
- Chapman RD, Heidemann M, Albert TK, Mailhammer R, Flatley A, Meisterernst M, Kremmer E, Eick D. (2007). Transcribing RNA polymerase II is phosphorylated at CTD residue serine-7. *Science* *318*, 1780-82
- Charpentier, E., Anton, A.I., Barry, P., Alfonso, B., Fang, Y., and Novick, R.P. (2004). Novel Cassette-Based Shuttle Vector System for Gram-Positive Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* *70*, 6076–6085.
- Chavakis, T., Hussain, M., Kanse, S.M., Peters, G., Bretzel, R.G., Flock, J.-I., Herrmann, M., and Preissner, K.T. (2002). *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat. Med.* *8*, 687–693.

- Chavakis, T., Wiechmann, K., Preissner, K.T., and Herrmann, M. (2005). Staphylococcus aureus interactions with the endothelium. The role of bacterial “Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules” (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thromb. Haemost.*
- Cheung, A.L., Bayer, M.G., and Heinrichs, J.H. (1997). sar Genetic determinants necessary for transcription of RNAII and RNAIII in the agr locus of Staphylococcus aureus. *J. Bacteriol.* 179, 3963–3971.
- Cheung, A.L., Bayer, A.S., Zhang, G., Gresham, H., and Xiong, Y.-Q. (2004). Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 40, 1–9.
- Cheung, A.L., Nishina, K.A., Pous, M.P.T., and Tamber, S. (2008). The SarA protein family of Staphylococcus aureus. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 355–361.
- Chevalier, C., Boisset, S., Romilly, C., Masquida, B., Fechter, P., Geissmann, T., Vandenesch, F., and Romby, P. (2010). Staphylococcus aureus RNAIII binds to two distant regions of coa mRNA to arrest translation and promote mRNA degradation. *PLoS Pathog.* 6, e1000809.
- Chien, Y., and Cheung, A.L. (1998). Molecular Interactions between Two Global Regulators, sar and agr, in Staphylococcus aureus. *J. Biol. Chem.* 273, 2645–2652.
- Chien, Y., Manna, A.C., Projan, S.J., and Cheung, A.L. (1999). SarA, a Global Regulator of Virulence Determinants in Staphylococcus aureus, binds to a Conserved Motif Essential for sar-dependent Gene Regulation. *J. Biol. Chem.* 274, 37169–37176.
- Clark-Adams CD., Winston F. (1987). The Spt6 gene is essential for growth and is required for delta-mediated transcription in Saccaromyces cerevisiae. *Mol. Cell. Biol.* 7, 679-86.
- Close D, Johnson SJ, Sdano MA, McDonald SM, Robinson H, Formosa T, Hill CP. (2011). Crystal structures of the S. cerevisiae Spt6 core and C-terminal tandem SH2 domain. *J Mol Biol.* 408, 697-713
- Commichau, F.M., Rothe, F.M., Herzberg, C., Wagner, E., Hellwig, D., Lehnik-Habrink, M., Hammer, E., Volker, U., and Stulke, J. (2009). Novel Activities of Glycolytic Enzymes in Bacillus subtilis. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 8, 1350–1360.
- Conlon, K.M., Humphreys, H., and O’Gara, J.P. (2002). icaR Encodes a Transcriptional Repressor Involved in Environmental Regulation of ica Operon Expression and Biofilm Formation in Staphylococcus epidermidis. *J. Bacteriol.* 184, 4400–4408.
- Corden JL, Cadena DL, Ahearn JM Jr, Dahmus ME. (1985). A unique structure at the carboxyl terminus of the largest subunit of eukaryotic RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 7934-8.
- Cramton, S.E., Gerke, C., Schnell, N.F., Nichols, W.W., and Gotz, F. (1999). The Intercellular Adhesion (ica) Locus Is Present in Staphylococcus aureus and Is Required for Biofilm Formation. *Infect. Immun.* 67, 5427–5433.
- Cue, D., Lei, M.G., and Lee, C.Y. (2012). Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in staphylococci. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2.
- Deana, A., Celesnik, H., and Belasco, J.G. (2008). The bacterial enzyme RppH triggers messenger RNA degradation by 5’ pyrophosphate removal. *Nature* 451, 355–358.
- Deghorain, M., and Van Melderen, L. (2012). The Staphylococci Phages Family: An Overview. *Viruses* 4, 3316–3335.
- Deguchi, K. (1982). [Susceptibilities of clinical isolates to aminoglycoside antibiotics. Susceptibility of clinical isolates from patients with complex and refractory infections]. *Jpn. J. Antibiot.* 35, 1977–1986.

- Delvillani, F., Papiani, G., Deho, G., and Briani, F. (2011). S1 ribosomal protein and the interplay between translation and mRNA decay. *Nucleic Acids Res.* *39*, 7702–7715.
- Desnoyers, G., and Massé, E. (2012). Noncanonical repression of translation initiation through small RNA recruitment of the RNA chaperone Hfq. *Genes Dev.* *26*, 726–739.
- Diebold, M.-L., Loeliger, E., Koch, M., Winston, F., Cavarelli, J., and Romier, C. (2010a). Noncanonical tandem SH2 enables interaction of elongation factor Spt6 with RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* *285*, 38389–38398.
- Diebold, M.-L., Koch, M., Loeliger, E., Cura, V., Winston, F., Cavarelli, J., and Romier, C. (2010b). The structure of an Iws1/Spt6 complex reveals an interaction domain conserved in TFIIS, Elongin A and Med26. *EMBO J.* *29*, 3979–3991.
- Dinges, M.M., Orwin, P.M., and Schlievert, P.M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* *13*, 16–34.
- Dobinsky, S., Kiel, K., Rohde, H., Bartscht, K., Knobloch, J.K.-M., Horstkotte, M.A., and Mack, D. (2003). Glucose-Related Dissociation between icaADBC Transcription and Biofilm Expression by *Staphylococcus epidermidis*: Evidence for an Additional Factor Required for Polysaccharide Intercellular Adhesin Synthesis. *J. Bacteriol.* *185*, 2879–2886.
- Dreisbach, A., van Dijl, J.M., and Buist, G. (2011). The cell surface proteome of *Staphylococcus aureus*. *Proteomics* *11*, 3154–3168.
- Dressaire, C., Picard, F., Redon, E., Loubiere, P., Queinnec, I., Girbal, L., and Coccagn-Bousquet, M. (2013). Role of mRNA Stability during Bacterial Adaptation. *PLoS ONE* *8*.
- Dunman, P.M., Murphy, E., Haney, S., Palacios, D., Tucker-Kellogg, G., Wu, S., Brown, E.L., Zagursky, R.J., Shlaes, D., and Projan, S.J. (2001). Transcription Profiling-Based Identification of *Staphylococcus aureus* Genes Regulated by the agr and/or sarA Loci. *J. Bacteriol.* *183*, 7341–7353.
- Duval, M., Korepanov, A., Fuchsbauer, O., Fechter, P., Haller, A., Fabbretti, A., Choulier, L., Micura, R., Klaholz, B.P., Romby, P., et al. (2013). *Escherichia coli* Ribosomal Protein S1 Unfolds Structured mRNAs Onto the Ribosome for Active Translation Initiation. *PLoS Biol.* *11*.
- Egloff S, Murphy S (2008). Cracking the RNA polymerase II CTD code. *Trends Genet.* *24*, 280-8.
- Elasri, M.O., Thomas, J.R., Skinner, R.A., Blevins, J.S., Beenken, K.E., Nelson, C.L., and Smelter, M.S. (2002). *Staphylococcus aureus* collagen adhesin contributes to the pathogenesis of osteomyelitis. *Bone* *30*, 275–280.
- Endoh M, Zhu W, Hasegawa J, Watanabe H, Kim DK, Aida M, Inukai N, Narita T, Yamada T, Furuya A, Sato H, Yamaguchi Y, Mandal SS, Reinberg D, Wada T, Handa H. (2004). *Mol Cell Biol.* *24*, 3324-36
- Fechter, P., Caldelari, I., Lioliou, E., and Romby, P. (2014). Novel aspects of RNA regulation in *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett.* *588*, 2523–2529.
- Felden, B., Vandenesch, F., Bouloc, P., and Romby, P. (2011). The *Staphylococcus aureus* RNome and Its Commitment to Virulence. *PLoS Pathog.* *7*.
- Figge, R.M., Ramseier, T.M., and Saier, M.H. (1994). The mannitol repressor (MtlR) of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *176*, 840–847.
- Fitzgerald, J.R., Foster, T.J., and Cox, D. (2006). The interaction of bacterial pathogens with platelets. *Nat. Rev. Microbiol.* *4*, 445–457.

- Fitzpatrick, F., Humphreys, H., Smyth, E., Kennedy, C.A., and O’Gara, J.P. (2002). Environmental regulation of biofilm formation in intensive care unit isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Hosp. Infect.* *52*, 212–218.
- Fitzpatrick, F., Humphreys, H., and O’Gara, J.P. (2005). Evidence for icaADBC-Independent Biofilm Development Mechanism in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates. *J. Clin. Microbiol.* *43*, 1973–1976.
- Foster, T.J. (2005). Immune evasion by staphylococci. *Nat. Rev. Microbiol.* *3*, 948–958.
- Foster, T.J., and Höök, M. (1998). Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* *6*, 484–488.
- Fuchs, T.M., Deppisch, H., Scarlato, V., and Gross, R. (1996). A new gene locus of *Bordetella pertussis* defines a novel family of prokaryotic transcriptional accessory proteins. *J. Bacteriol.* *178*, 4445–4452.
- Gajiwala, K.S., and Burley, S.K. (2000). Winged helix proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *10*, 110–116.
- Gao, J., and Stewart, G.C. (2004). Regulatory Elements of the *Staphylococcus aureus* Protein A (Spa) Promoter. *J. Bacteriol.* *186*, 3738–3748.
- Garbutt, K.C., Kraus, J., and Geller, B.L. (1997). Bacteriophage Resistance in *Lactococcus lactis* Engineered by Replacement of a Gene for a Bacteriophage Receptor. *J. Dairy Sci.* *80*, 1512–1519.
- Geisinger, E., Adhikari, R.P., Jin, R., Ross, H.F., and Novick, R.P. (2006). Inhibition of rot translation by RNAIII, a key feature of agr function. *Mol. Microbiol.* *61*, 1038–1048.
- Geissmann, T., Marzi, S., and Romby, P. (2009). The role of mRNA structure in translational control in bacteria. *RNA Biol.* *6*, 153–160.
- Gillet, R., and Felden, B. (2007). Lost in translation: Le déblocage des ribosomes bactériens par le mécanisme de *trans*-traduction. *Médecine/sciences* *23*, 633–639.
- Giraud, A.T., Cheung, A.L., and Nagel, R. (1997). The *sae* locus of *Staphylococcus aureus* controls exoprotein synthesis at the transcriptional level. *Arch. Microbiol.* *168*, 53–58.
- Gómez, M.I., Lee, A., Reddy, B., Muir, A., Soong, G., Pitt, A., Cheung, A., and Prince, A. (2004). *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. *Nat. Med.* *10*, 842–848.
- Greene, C., McDevitt, D., Francois, P., Vaudaux, P.E., Lew, D.P., and Foster, T.J. (1995). Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins and studies on the expression of *fnb* genes. *Mol. Microbiol.* *17*, 1143–1152.
- Grove, A. (2013). MarR family transcription factors. *Curr. Biol.* *23*, R142–R143.
- Grundmeier, M., Hussain, M., Becker, P., Heilmann, C., Peters, G., and Sinha, B. (2004). Truncation of Fibronectin-Binding Proteins in *Staphylococcus aureus* Strain Newman Leads to Deficient Adherence and Host Cell Invasion Due to Loss of the Cell Wall Anchor Function. *Infect. Immun.* *72*, 7155–7163.
- Hajnsdorf, E., and Boni, I.V. (2012). Multiple activities of RNA-binding proteins S1 and Hfq. *Biochimie* *94*, 1544–1553.
- Hanaki, H., and Hiramatsu, K. (1997). [Emerging infectious and drug-resistant diseases--vancomycin resistant gram-positive cocci]. *Nihon Naika Gakkai Zasshi J. Jpn. Soc. Intern. Med.* *86*, 2075–2080.
- Hartzog, G.A., Wada, T., Handa, H., and Winston, F. (1998). Evidence that Spt4, Spt5, and Spt6 control transcription elongation by RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* *12*, 357–369.

- He, X., Thornton, J., Carmicle-Davis, S., and McDaniel, L.S. (2006). Tex, a putative transcriptional accessory factor, is involved in pathogen fitness in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Pathog.* *41*, 199–206.
- Heilmann, C., Schweitzer, O., Gerke, C., Vanittanakom, N., Mack, D., and Götz, F. (1996). Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol. Microbiol.* *20*, 1083–1091.
- Higgins, J., Loughman, A., Van Kessel, K.P.M., Van Strijp, J.A.G., and Foster, T.J. (2006). Clumping factor A of *Staphylococcus aureus* inhibits phagocytosis by human polymorphonuclear leucocytes. *FEMS Microbiol. Lett.* *258*, 290–296.
- Hiramatsu, K. (2001). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet Infect. Dis.* *1*, 147–155.
- Hirst, R.A., Gosai, B., Rutman, A., Guerin, C.J., Nicotera, P., Andrew, P.W., and O'Callaghan, C. (2008). *Streptococcus pneumoniae* Deficient in Pneumolysin or Autolysin Has Reduced Virulence in Meningitis. *J. Infect. Dis.* *197*, 744–751.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 9786–9791.
- Holmqvist, E., and Vogel, J. (2013). A small RNA serving both the Hfq and CsrA regulons. *Genes Dev.* *27*, 1073–1078.
- Huntzinger, E., Boisset, S., Saveanu, C., Benito, Y., Geissmann, T., Namane, A., Lina, G., Etienne, J., Ehresmann, B., Ehresmann, C., et al. (2005). *Staphylococcus aureus* RNAIII and the endoribonuclease III coordinately regulate spa gene expression. *EMBO J.* *24*, 824–835.
- Huseby, M., Shi, K., Brown, C.K., Digre, J., Mengistu, F., Seo, K.S., Bohach, G.A., Schlievert, P.M., Ohlendorf, D.H., and Earhart, C.A. (2007). Structure and Biological Activities of Beta Toxin from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* *189*, 8719–8726.
- Ibarra, J.A., Perez-Rueda, E., Carroll, R.K., and Shaw, L.N. (2013). Global analysis of transcriptional regulators in *Staphylococcus aureus*. *BMC Genomics* *14*, 126.
- Ingavale, S., van Wamel, W., Luong, T.T., Lee, C.Y., and Cheung, A.L. (2005). Rat/MgrA, a Regulator of Autolysis, Is a Regulator of Virulence Genes in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* *73*, 1423–1431.
- Izban MG, Luse DS. (1991). Transcription on nucleosomal templates by RNA polymerase II in vitro: inhibition of elongation with enhancement of sequence-specific pausing. *Genes Dev.* *5*, 683–96.
- Janzon, L., Löfdahl, S., and Arvidson, S. (1989). Identification and nucleotide sequence of the delta-lysin gene, hld, adjacent to the accessory gene regulator (agr) of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Gen. Genet. MGG* *219*, 480–485.
- Johnson, S.J., Close, D., Robinson, H., Vallet-Gely, I., Dove, S.L., and Hill, C.P. (2008). Crystal structure and RNA binding of the Tex protein from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* *377*, 1460–1473.
- Josefsson, E., Hartford, O., O'Brien, L., Patti, J.M., and Foster, T. (2001). Protection against Experimental *Staphylococcus aureus* Arthritis by Vaccination with Clumping Factor A, a Novel Virulence Determinant. *J. Infect. Dis.* *184*, 1572–1580.
- Kaito, C., Morishita, D., Matsumoto, Y., Kurokawa, K., and Sekimizu, K. (2006). Novel DNA binding protein SarZ contributes to virulence in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* *62*, 1601–1617.
- Kang, M., Ko, Y.-P., Liang, X., Ross, C.L., Liu, Q., Murray, B.E., and Hook, M. (2013). Collagen-binding Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecule (MSCRAMM) of Gram-positive Bacteria Inhibit Complement Activation via the Classical Pathway. *J. Biol. Chem.* *288*, 20520–20531.

- Kaplan, C.D., Morris, J.R., Wu, C. -tin., and Winston, F. (2000). Spt5 and Spt6 are associated with active transcription and have characteristics of general elongation factors in *D. melanogaster*. *Genes Dev.* *14*, 2623–2634.
- Katayama, Y., Ito, T., and Hiramatsu, K. (2000). A New Class of Genetic Element, Staphylococcus Cassette Chromosome mec, Encodes Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *44*, 1549–1555.
- Krogan NJ, Kim M, Ahn SH, Zhong G, Kobor MS, Cagney G, Emili A, Shilatifard A, Buratowski S, Greenblatt JF. (2002). RNA polymerase II elongation factors of *Saccharomyces cerevisiae*: a targeted proteomics approach. *Mol Cell Biol.* *22*, 6979-92.
- Kwak H., Lis JT. (2003). Control of transcriptional elongation. *Annu. Rev. Gen.* *47*, 483-508.
- Kwon D, Yoon JH, Shin SY, Jang TH, Kim HG, So I, Jeon JH, Park HH. (2012). A comprehensive manually curated protein-protein interaction database for the Death Domainsuperfamily. *Nucleic Acids Res.* *40*, D331-6.
- Lacey, R.W., and Mitchell, A.A.B. (1969). Gentamycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet* *294*, 1425–1426.
- Lasa, I., Toledo-Arana, A., Dobin, A., Villanueva, M., de los Mozos, I.R., Vergara-Irigaray, M., Segura, V., Fagegaltier, D., Penades, J.R., Valle, J., et al. (2011). Genome-wide antisense transcription drives mRNA processing in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 20172–20177.
- De Lay, N., Schu, D.J., and Gottesman, S. (2013). Bacterial Small RNA-based Negative Regulation: Hfq and Its Accomplices. *J. Biol. Chem.* *288*, 7996–8003.
- Lim, Y., Jana, M., Luong, T.T., and Lee, C.Y. (2004). Control of Glucose- and NaCl-Induced Biofilm Formation by rbf in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* *186*, 722–729.
- Linder, P., Lemeille, S., and Redder, P. (2014). Transcriptome-Wide Analyses of 5'-Ends in RNase J Mutants of a Gram-Positive Pathogen Reveal a Role in RNA Maturation, Regulation and Degradation. *PLoS Genet.* *10*.
- Lindsay, J.A. (2010). Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* *300*, 98–103.
- Lindsay, J.A., Ruzin, A., Ross, H.F., Kurepina, N., and Novick, R.P. (1998). The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* *29*, 527–543.
- Lioliou, E., Sharma, C.M., Caldelari, I., Helfer, A.-C., Fechter, P., Vandenesch, F., Vogel, J., and Romby, P. (2012). Global regulatory functions of the *Staphylococcus aureus* endoribonuclease III in gene expression. *PLoS Genet.* *8*, e1002782.
- Liu BA, Nash PD. (2012). Evolution of SH2 domains and phosphotyrosine signalling networks. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* *367*, 2556-73.
- Liu, Y., Manna, A.C., Pan, C.-H., Kriksunov, I.A., Thiel, D.J., Cheung, A.L., and Zhang, G. (2006). Structural and function analyses of the global regulatory protein SarA from *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 2392–2397.
- Liu, Y., Wu, N., Dong, J., Gao, Y., Zhang, X., Mu, C., Shao, N., and Yang, G. (2010). Hfq is a global regulator that controls the pathogenicity of *Staphylococcus aureus*. *PloS One* *5*.
- Luong, T.T., Dunman, P.M., Murphy, E., Projan, S.J., and Lee, C.Y. (2006). Transcription Profiling of the mgrA Regulon in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* *188*, 1899–1910.

- Mackie, G.A. (1998). Ribonuclease E is a 5'-end-dependent endonuclease. *Nature* 395, 720–723.
- Malachowa, N., and DeLeo, F.R. (2010). Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 3057–3071.
- Manna, A.C., and Cheung, A.L. (2003). *sarU*, a *sarA* Homolog, Is Repressed by *SarT* and Regulates Virulence Genes in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 71, 343–353.
- Manna, A.C., and Cheung, A.L. (2006). Expression of *SarX*, a Negative Regulator of *agr* and Exoprotein Synthesis, Is Activated by *MgrA* in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 188, 4288–4299.
- Manna, A., and Cheung, A.L. (2001). Characterization of *sarR*, a Modulator of *sar* Expression in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 69, 885–896.
- Marincola, G., Schäfer, T., Behler, J., Bernhardt, J., Ohlsen, K., Goerke, C., and Wolz, C. (2012). RNase Y of *Staphylococcus aureus* and its role in the activation of virulence genes. *Mol. Microbiol.* 85, 817–832.
- Marrack, P., and Kappler, J. (1990). The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 248, 705–711.
- Martinon F, Hofmann K, Tschopp J. (2001). The pyrin domain: a possible member of the death domain-fold family implicated in apoptosis and inflammation. *Curr Biol.* 11, R118-20.
- Mayer A, Heidemann M, Lidschreiber M, Schrieck A, Sun M, Hintermair C, Kremmer E, Eick D, Cramer P. (2012). CTD tyrosine phosphorylation impairs termination factor recruitment to RNA polymerase II. *Science* 336, 1723-5.
- Mazmanian, S.K., Liu, G., Jensen, E.R., Lenoy, E., and Schneewind, O. (2000). *Staphylococcus aureus* sortase mutants defective in the display of surface proteins and in the pathogenesis of animal infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 5510–5515.
- Mazmanian, S.K., Ton-That, H., Su, K., and Schneewind, O. (2002). An iron-regulated sortase anchors a class of surface protein during *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 2293–2298.
- Meinhart A, Kamenski T, Hoepfner S, Baumli S, Cramer P. (2005). A structural perspective of CTD function. *Genes Dev.* 19, 1401-15.
- Merino, N., Toledo-Arana, A., Vergara-Irigaray, M., Valle, J., Solano, C., Calvo, E., Lopez, J.A., Foster, T.J., Penades, J.R., and Lasa, I. (2009). Protein A-Mediated Multicellular Behavior in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 191, 832–843.
- Miller, C., Schwalb, B., Maier, K., Schulz, D., Dumcke, S., Zacher, B., Mayer, A., Sydow, J., Marcinowski, L., Dolken, L., et al. (2011). Dynamic transcriptome analysis measures rates of mRNA synthesis and decay in yeast. *Mol. Syst. Biol.* 7, 458.
- Monack, D.M., Arico, B., Rappuoli, R., and Falkow, S. (1989). Phase variants of *Bordetella bronchiseptica* arise by spontaneous deletions in the *vir* locus. *Mol. Microbiol.* 3, 1719–1728.
- Montgomery, C.P., Boyle-Vavra, S., and Daum, R.S. (2010). Importance of the Global Regulators *Agr* and *SaeRS* in the Pathogenesis of CA-MRSA USA300 Infection. *PLoS ONE* 5.
- Mooney, D.T., Jann, M., and Geller, B.L. (2006). Subcellular location of phage infection protein (Pip) in *Lactococcus lactis*. *Can. J. Microbiol.* 52, 664–672.
- Moreillon, P., Entenza, J.M., Francioli, P., McDevitt, D., Foster, T.J., Francois, P., and Vaudaux, P. (1995). Role of *Staphylococcus aureus* coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis. *Infect. Immun.* 63, 4738–4743.

- Morita, T., Maki, K., and Aiba, H. (2005). RNase E-based ribonucleoprotein complexes: mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. *Genes Dev.* *19*, 2176–2186.
- Morrison, J.M., Anderson, K.L., Beenken, K.E., Smeltzer, M.S., and Dunman, P.M. (2012). The Staphylococcal Accessory Regulator, SarA, is an RNA-Binding Protein that Modulates the mRNA Turnover Properties of Late-Exponential and Stationary Phase *Staphylococcus aureus* Cells. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* *2*.
- Murzin, A.G., Brenner, S.E., Hubbard, T., and Chothia, C. (1995). SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J. Mol. Biol.* *247*, 536–540.
- Ní Eidhin, D., Perkins, S., Francois, P., Vaudaux, P., Höök, M., and Foster, T.J. (1998). Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* *30*, 245–257.
- Novick, R.P. (2003). Mobile genetic elements and bacterial toxins: the superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* *49*, 93–105.
- Novick, R.P., Ross, H.F., Projan, S.J., Kornblum, J., Kreiswirth, B., and Moghazeh, S. (1993). Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J.* *12*, 3967–3975.
- Novick, R.P., Christie, G.E., and Penadés, J.R. (2010). The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* *8*, 541–551.
- O'Brien, L., Kerrigan, S.W., Kaw, G., Hogan, M., Penadés, J., Litt, D., Fitzgerald, D.J., Foster, T.J., and Cox, D. (2002). Multiple mechanisms for the activation of human platelet aggregation by *Staphylococcus aureus*: roles for the clumping factors ClfA and ClfB, the serine–aspartate repeat protein SdrE and protein A. *Mol. Microbiol.* *44*, 1033–1044.
- O'Neill, E., Pozzi, C., Houston, P., Smyth, D., Humphreys, H., Robinson, D.A., and O'Gara, J.P. (2007). Association between Methicillin Susceptibility and Biofilm Regulation in *Staphylococcus aureus* Isolates from Device-Related Infections. *J. Clin. Microbiol.* *45*, 1379–1388.
- O'Neill, E., Pozzi, C., Houston, P., Humphreys, H., Robinson, D.A., Loughman, A., Foster, T.J., and O'Gara, J.P. (2008). A Novel *Staphylococcus aureus* Biofilm Phenotype Mediated by the Fibronectin-Binding Proteins, FnBPA and FnBPB. *J. Bacteriol.* *190*, 3835–3850.
- O'Seaghda, M., van Schooten, C.J., Kerrigan, S.W., Emsley, J., Silverman, G.J., Cox, D., Lenting, P.J., and Foster, T.J. (2006). *Staphylococcus aureus* protein A binding to von Willebrand factor A1 domain is mediated by conserved IgG binding regions. *FEBS J.* *273*, 4831–4841.
- Otto, M. (2008). Staphylococcal Biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *322*, 207–228.
- Oun, S., Redder, P., Didier, J.-P., Francois, P., Corvaglia, A.-R., Buttazzoni, E., Giraud, C., Girard, M., Schrenzel, J., and Linder, P. (2013). The CshA DEAD-box RNA helicase is important for quorum sensing control in *Staphylococcus aureus*. *RNA Biol.* *10*, 157–165.
- Paget, M.S., and Helmann, J.D. (2003). The σ 70 family of sigma factors. *Genome Biol.* *4*, 203.
- Palmqvist, N., Foster, T., Fitzgerald, J.R., Josefsson, E., and Tarkowski, A. (2005). Fibronectin-Binding Proteins and Fibrinogen-Binding Clumping Factors Play Distinct Roles in Staphylococcal Arthritis and Systemic Inflammation. *J. Infect. Dis.* *191*, 791–798.
- Park HH, Lo YC, Lin SC, Wang L, Yang JK, Wu H. (2007). The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation. *Annu Rev Immunol.* *25*, 561–86.
- Paton, J.C., Andrew, P.W., Boulnois, G.J., and Mitchell, T.J. (1993). Molecular analysis of the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*: the role of pneumococcal proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* *47*, 89–115.

- Patti, J.M., Allen, B.L., McGavin, M.J., and Hook, M. (1994a). Mscramm-Mediated Adherence of Microorganisms to Host Tissues. *Annu. Rev. Microbiol.* *48*, 585–617.
- Patti, J.M., Bremell, T., Krajewska-Pietrasik, D., Abdelnour, A., Tarkowski, A., Ryden, C., and Hook, M. (1994b). The Staphylococcus aureus collagen adhesin is a virulence determinant in experimental septic arthritis. *Infect. Immun.* *62*, 152–161.
- Peacock, S.J., Foster, T.J., Cameron, B.J., and Berendt, A.R. (1999). Bacterial fibronectin-binding proteins and endothelial cell surface fibronectin mediate adherence of Staphylococcus aureus to resting human endothelial cells. *Microbiology* *145*, 3477–3486.
- Pereira, L.B. (2014). Impetigo - review. *An. Bras. Dermatol.* *89*, 293–299.
- Petes SJ, Lis JT. (2008). Rapid, transcription-independent loss of nucleosomes over a large chromatin domain at Hsp70 loci. *Cell.* *134*, 74-84.
- Ponting, C.P. (2002). SURVEY AND SUMMARY: Novel domains and orthologues of eukaryotic transcription elongation factors. *Nucleic Acids Res.* *30*, 3643–3652.
- Queck, S.Y., Khan, B.A., Wang, R., Bach, T.-H.L., Kretschmer, D., Chen, L., Kreiswirth, B.N., Peschel, A., DeLeo, F.R., and Otto, M. (2009). Mobile Genetic Element-Encoded Cytolysin Connects Virulence to Methicillin Resistance in MRSA. *PLoS Pathog.* *5*.
- Rachid, S., Ohlsen, K., Wallner, U., Hacker, J., Hecker, M., and Ziebuhr, W. (2000). Alternative Transcription Factor B Is Involved in Regulation of Biofilm Expression in a Staphylococcus aureus Mucosal Isolate. *J. Bacteriol.* *182*, 6824–6826.
- Rahl PB, Lin CY, Seila AC, Flynn RA, McCuine S, Burge CB, Sharp PA, Young RA. (2010). c-Myc regulates transcriptional pause release. *Cell.* *141*, 432-45.
- Rammelkamp, C.H., and Keefer, C.S. (1943). Penicillin: its antibacterial effect in whole blood and serum for the hemolytic Streptococcus and Staphylococcus aureus 1. *J. Clin. Invest.* *22*, 649–657.
- Rasmussen EB., Lis JT. (1993). In vivo Transcriptional pausing and cap formation on three Drosopila heat shock genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *90*, 7923-7.
- Reece, R.J., and Maxwell, A. (1991). DNA gyrase: structure and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *26*, 335–375.
- Reyes, D., Andrey, D.O., Monod, A., Kelley, W.L., Zhang, G., and Cheung, A.L. (2011). Coordinated Regulation by AgrA, SarA, and SarR To Control agr Expression in Staphylococcus aureus. *J. Bacteriol.* *193*, 6020–6031.
- Rhem, M.N., Lech, E.M., Patti, J.M., McDevitt, D., Hook, M., Jones, D.B., and Wilhelmus, K.R. (2000). The Collagen-Binding Adhesin Is a Virulence Factor in Staphylococcus aureus Keratitis. *Infect. Immun.* *68*, 3776–3779.
- Romilly, C., Chevalier, C., Marzi, S., Masquida, B., Geissmann, T., Vandenesch, F., Westhof, E., and Romby, P. (2012a). Loop-loop interactions involved in antisense regulation are processed by the endoribonuclease III in Staphylococcus aureus. *RNA Biol.* *9*, 1461–1472.
- Romilly, C., Caldelari, I., Parmentier, D., Lioliou, E., Romby, P., and Fechter, P. (2012b). Current knowledge on regulatory RNAs and their machineries in Staphylococcus aureus. *RNA Biol.* *9*, 402–413.
- Romilly, C., Lays, C., Tomasini, A., Caldelari, I., Benito, Y., Hammann, P., Geissmann, T., Boisset, S., Romby, P., and Vandenesch, F. (2014). A Non-Coding RNA Promotes Bacterial Persistence and Decreases Virulence by Regulating a Regulator in Staphylococcus aureus. *PLoS Pathog* *10*, e1003979.

- Roux, C.M., DeMuth, J.P., and Dunman, P.M. (2011). Characterization of Components of the *Staphylococcus aureus* mRNA Degradosome Holoenzyme-Like Complex[∇]. *J. Bacteriol.* *193*, 5520–5526.
- Ruiz de los Mozos, I., Vergara-Irigaray, M., Segura, V., Villanueva, M., Bitarte, N., Saramago, M., Domingues, S., Arraiano, C.M., Fechter, P., Romby, P., et al. (2013). Base Pairing Interaction between 5'- and 3'-UTRs Controls *icaR* mRNA Translation in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Genet* *9*, e1004001.
- Sachs, R., Max, K.E.A., Heinemann, U., and Balbach, J. (2012). RNA single strands bind to a conserved surface of the major cold shock protein in crystals and solution. *RNA* *18*, 65–76.
- Said-Salim, B., Dunman, P.M., McAleese, F.M., Macapagal, D., Murphy, E., McNamara, P.J., Arvidson, S., Foster, T.J., Projan, S.J., and Kreiswirth, B.N. (2003). Global Regulation of *Staphylococcus aureus* Genes by Rot. *J. Bacteriol.* *185*, 610–619.
- Saunders A, Core LJ, Lis JT. (2006). Breaking barriers to transcription elongation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* *7*, 557-67.
- Scatchard, G. (1949). Equilibrium in non-electrolyte mixtures. *Chem. Rev.* *44*, 7–35.
- Schmidt, K.A., Manna, A.C., and Cheung, A.L. (2003). SarT Influences *sarS* Expression in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* *71*, 5139–5148.
- Shao, X., and Grishin, N.V. (2000). Common fold in helix–hairpin–helix proteins. *Nucleic Acids Res.* *28*, 2643–2650.
- Smeltzer, M.S., Gill, S.R., and Iandolo, J.J. (1992). Localization of a chromosomal mutation affecting expression of extracellular lipase in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* *174*, 4000–4006.
- Stapels, D.A.C., Ramyar, K.X., Bischoff, M., Köckritz-Blickwede, M. von, Milder, F.J., Ruyken, M., Eisenbeis, J., McWhorter, W.J., Herrmann, M., Kessel, K.P.M. van, et al. (2014). *Staphylococcus aureus* secretes a unique class of neutrophil serine protease inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 13187–13192.
- Sterba, K.M., Mackintosh, S.G., Blevins, J.S., Hurlburt, B.K., and Smeltzer, M.S. (2003). Characterization of *Staphylococcus aureus* SarA Binding Sites. *J. Bacteriol.* *185*, 4410–4417.
- Stibitz, S. (1994). Mutations in the *bvgA* gene of *Bordetella pertussis* that differentially affect regulation of virulence determinants. *J. Bacteriol.* *176*, 5615–5621.
- Storz, G., Opdyke, J.A., and Zhang, A. (2004). Controlling mRNA stability and translation with small, noncoding RNAs. *Curr. Opin. Microbiol.* *7*, 140–144.
- Subramanian, A.R. (1983). Structure and functions of ribosomal protein S1. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* *28*, 101–142.
- Sukhodolets, M.V., Garges, S., and Adhya, S. (2006). Ribosomal protein S1 promotes transcriptional cycling. *RNA* *12*, 1505–1513.
- Sullam, P.M., Payan, D.G., Dazin, P.F., and Valone, F.H. (1990). Binding of viridans group streptococci to human platelets: a quantitative analysis. *Infect. Immun.* *58*, 3802–3806.
- Swanson, M.S., Carlson, M., and Winston, F. (1990). SPT6, an essential gene that affects transcription in *Saccharomyces cerevisiae*, encodes a nuclear protein with an extremely acidic amino terminus. *Mol. Cell. Biol.* *10*, 4935–4941.
- Switalski, L.M., Patti, J.M., Butcher, W., Gristina, A.G., Speziale, P., and Höök, M. (1993). A collagen receptor on *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with septic arthritis mediates adhesion to cartilage. *Mol. Microbiol.* *7*, 99–107.

- Takeshita, D., Yamashita, S., and Tomita, K. (2014). Molecular insights into replication initiation by Q β replicase using ribosomal protein S1. *Nucleic Acids Res.*
- Tang H., Liu Y., Madabusi L., Gilmour DS. (2000). Promoter proximal pausing on the hsp70 promoter in *Drosophila melanogaster* depends on upstream regulator. *Moll. Cell. Biol.* 20, 2569-80.
- Tarai, B., Das, P., and Kumar, D. (2013). Recurrent Challenges for Clinicians: Emergence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Vancomycin Resistance, and Current Treatment Options. *J. Lab. Physicians* 5, 71–78.
- Tegmark, K., Karlsson, A., and Arvidson, S. (2000). Identification and characterization of SarH1, a new global regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 37, 398–409.
- Theobald, D.L., Mitton-Fry, R.M., and Wuttke, D.S. (2003). NUCLEIC ACID RECOGNITION BY OB-FOLD PROTEINS. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 32, 115–133.
- Thurlow, L.R., Joshi, G.S., and Richardson, A.R. (2012). Virulence Strategies of the Dominant USA300 Lineage of Community Associated Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 65, 5–22.
- Tu Quoc, P.H., Genevaux, P., Pajunen, M., Savilahti, H., Georgopoulos, C., Schrenzel, J., and Kelley, W.L. (2007). Isolation and Characterization of Biofilm Formation-Defective Mutants of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 75, 1079–1088.
- Vagner, V., Dervyn, E., and Ehrlich, S.D. (1998). A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Read. Engl.* 144 (Pt 11), 3097–3104.
- Vandenesch, F., Kornblum, J., and Novick, R.P. (1991). A temporal signal, independent of agr, is required for hla but not spa transcription in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 173, 6313–6320.
- Vandenesch, F., Lina, G., and Henry, T. (2012). *Staphylococcus aureus* Hemolysins, bi-component Leukocidins, and Cytolytic Peptides: A Redundant Arsenal of Membrane-Damaging Virulence Factors? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2.
- Vogel, J., and Luisi, B.F. (2011). Hfq and its constellation of RNA. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 578–589.
- Vuong, C., Saenz, H.L., Götz, F., and Otto, M. (2000). Impact of the agr Quorum-Sensing System on Adherence to Polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* 182, 1688–1693.
- West ML, Corden JL. (1995). Construction and analysis of yeast RNA polymerase II CTD deletion and substitution mutations. *Genetics.* 140, 1223-33.
- Woodin, A.M. (1960). Purification of the two components of leucocidin from *Staphylococcus aureus*. *Biochem. J.* 75, 158–165.
- Xu, Y., Rivas, J.M., Brown, E.L., Liang, X., and Höök, M. (2004). Virulence Potential of the Staphylococcal Adhesin CNA in Experimental Arthritis Is Determined by Its Affinity for Collagen. *J. Infect. Dis.* 189, 2323–2333.
- Xue, T., Zhang, X., Sun, H., and Sun, B. (2014). ArtR, a novel sRNA of *Staphylococcus aureus*, regulates α -toxin expression by targeting the 5' UTR of sarT mRNA. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 203, 1–12.
- Yao, J., Zhong, J., Fang, Y., Geisinger, E., Novick, R.P., and Lambowitz, A.M. (2006). Use of targetrons to disrupt essential and nonessential genes in *Staphylococcus aureus* reveals temperature sensitivity of Ll.LtrB group II intron splicing. *RNA* 12, 1271–1281.
- Yoh, S.M., Cho, H., Pickle, L., Evans, R.M., and Jones, K.A. (2007). The Spt6 SH2 domain binds Ser2-P RNAPII to direct Iws1-dependent mRNA splicing and export. *Genes Dev.* 21, 160–174.

Yoh, S.M., Lucas, J.S., and Jones, K.A. (2008). The Iws1:Spt6:CTD complex controls cotranscriptional mRNA biosynthesis and HYPB/Setd2-mediated histone H3K36 methylation. *Genes Dev.* 22, 3422–3434.

Zhu, Y., Nandakumar, R., Sadykov, M.R., Madayiputhiya, N., Luong, T.T., Gaupp, R., Lee, C.Y., and Somerville, G.A. (2011). RpiR Homologues May Link *Staphylococcus aureus* RNAPIII Synthesis and Pentose Phosphate Pathway Regulation. *J. Bacteriol.* 193, 6187–6196.

Ziebuhr, W., Heilmann, C., Gotz, F., Meyer, P., Wilms, K., Straube, E., and Hacker, J. (1997). Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infect. Immun.* 65, 890–896.

Annexes

I/ Tableaux

Tableau 1: Analyse comparative des protéomes de la souche HG001 sauvage et de ses mutants par la technique du Spectral Count (1/2)

| LEGENDE: | | Nb répl. | Nombre de réplicats |
|-----------------|---|----------|-------------------------------|
| ratio | Respect des guidelines = min. 5 spectres | Moy #Spc | Moyenne du nombre de spectres |
| ratio | ratio>2 | Stdev | Déviatoin standard |
| ratio | ratio<0.5 | CV(%) | Coefficient de variation (%) |
| CV% | CV<20% | | |
| | Protéine retenue après validation manuelle, présentant une variation significative et fiable. | | |

| ACC Nb | Name | SPECTRAL COUNT | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------|--|----------------|-------------|-------------|---------------|----------|--------------|-------------|--------------|----------|--------------|-------------|---------------|-------------|-------------|
| | | Rn1 | | | | 2001 | | | | 404 | | | | 2001/Rn1 | 404/Rn1 |
| | | Nb répl. | Moy #Spc | Stdev | CV(%) | Nb répl. | Moy #Spc | Stdev | CV(%) | Nb répl. | Moy #Spc | Stdev | CV(%) | ratio | ratio |
| CLFB_STAA8 | Fibrinogen-binding protein B | 1 | 0,33 | 0,58 | 173,21 | 3 | 2,33 | 0,58 | 24,74 | 1 | 0,67 | 1,15 | 173,21 | 7,00 | 2,00 |
| Q2G221_STAA8 | Phage infection protein, putative | 3 | 9,00 | 4,58 | 50,92 | 3 | 21,00 | 4,36 | 20,76 | 3 | 21,00 | 2,65 | 12,60 | 2,33 | 2,33 |
| LEPA_STAA8 | Ribosomal back-translocase LepA | 3 | 3,33 | 2,52 | 75,50 | 3 | 7,33 | 3,21 | 43,83 | 3 | 6,67 | 3,06 | 45,83 | 2,20 | 2,00 |
| Q7A717_STAA8 | SA0589 protein | 1 | 0,33 | 0,58 | 173,21 | 2 | 0,67 | 0,58 | 86,60 | 2 | 0,67 | 0,58 | 86,60 | 2,00 | 2,00 |
| GYRA_STAA8 | DNA gyrase subunit A | 3 | 3,67 | 2,08 | 56,77 | 3 | 8,33 | 1,15 | 13,86 | 3 | 12,00 | 6,08 | 50,69 | 2,27 | 3,27 |
| Q7A415_STAA8 | SA2100 protein | 2 | 1,67 | 1,53 | 91,65 | 3 | 6,33 | 3,06 | 48,24 | 3 | 4,00 | 1,73 | 43,30 | 3,80 | 2,40 |
| Q7A3G3_STAA8 | SA2327 protein | 2 | 5,00 | 5,00 | 100,00 | 3 | 10,33 | 4,93 | 47,74 | 3 | 11,67 | 4,04 | 34,64 | 2,07 | 2,33 |
| LEP_STAA8 | Leader peptidase IB | nd | nd | nd | nd | 2 | 3,67 | 6,35 | 173,21 | 1 | 5,00 | 8,66 | 173,21 | 2001 only | 404 only |
| RSMH_STAA8 | rRNA (cytosine-N(4)-)-methyltransferase RsmH | 3 | 1,33 | 0,58 | 43,30 | 3 | 6,00 | 5,57 | 92,80 | 3 | 4,00 | 4,36 | 108,97 | 4,50 | 3,00 |
| Q2FVW2_STAA8 | N-acetylmuramoiL-L-alanine amidase | 3 | 2,00 | 1,00 | 50,00 | 3 | 6,33 | 3,06 | 48,24 | 3 | 4,00 | 1,73 | 43,30 | 3,17 | 2,00 |
| CLFB_STAA8 | Fibrinogen-binding protein B | 1 | 0,33 | 0,58 | 173,21 | 3 | 2,33 | 0,58 | 24,74 | 1 | 0,67 | 1,15 | 173,21 | 7,00 | 2,00 |
| FTSA_STAA8 | Cell division protein FtsA | 3 | 3,33 | 0,58 | 17,32 | 3 | 5,00 | 1,00 | 20,00 | 3 | 11,00 | 6,56 | 59,61 | 1,50 | 3,30 |
| Q7A3U0_STAA8 | Respiratory nitrate reductase alpha chain | 2 | 5,33 | 4,73 | 88,61 | 3 | 6,33 | 5,13 | 81,03 | 3 | 11,33 | 6,66 | 58,75 | 1,19 | 2,13 |
| Q2G1U8_STAA8 | Putative uncharacterized protein | 3 | 4,00 | 2,00 | 50,00 | 3 | 6,00 | 1,00 | 16,67 | 3 | 8,00 | 4,00 | 50,00 | 1,50 | 2,00 |
| Q7A4R3_STAA8 | SA1708 protein | 2 | 4,00 | 3,61 | 90,14 | 3 | 6,67 | 2,08 | 31,22 | 3 | 9,00 | 3,61 | 40,06 | 1,67 | 2,25 |
| Q2FYV0_STAA8 | Putative uncharacterized protein | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | 3 | 1,67 | 1,15 | 69,28 | nd | 404 only |
| SPA_STAA8 | Staphylococcal protein A | 3 | 5,67 | 3,06 | 53,91 | 3 | 15,33 | 1,53 | 9,96 | 3 | 8,00 | 1,00 | 12,50 | 2,71 | 1,41 |
| GYRB_STAA8 | DNA gyrase subunit B | 2 | 5,00 | 4,58 | 91,65 | 3 | 10,67 | 1,53 | 14,32 | 3 | 9,33 | 1,53 | 16,37 | 2,13 | 1,87 |
| Q7A5K8_STAA8 | PBP2 | 2 | 9,67 | 8,74 | 90,38 | 3 | 22,00 | 2,65 | 12,03 | 1 | 9,67 | 16,74 | 173,21 | 2,28 | 1,00 |
| CLPB_STAA8 | Chaperone protein ClpB | 2 | 7,67 | 7,51 | 97,90 | 3 | 17,33 | 2,89 | 16,65 | 3 | 15,00 | 4,00 | 26,67 | 2,26 | 1,96 |
| COAE_STAA8 | Dephosphocoenzyme A kinase | 2 | 2,67 | 2,31 | 86,60 | 3 | 5,33 | 0,58 | 10,83 | 3 | 5,00 | 1,73 | 34,64 | 2,00 | 1,88 |
| Q7A3Z5_STAA8 | SA2119 protein | nd | nd | nd | nd | 1 | 0,33 | 0,58 | 173,21 | nd | nd | nd | nd | 2001 only | nd |
| TRXB_STAA8 | Thioredoxin reductase | 3 | 10,00 | 1,73 | 17,32 | 3 | 6,00 | 1,00 | 16,67 | 3 | 9,67 | 1,15 | 11,95 | 0,60 | 0,97 |
| Q7A569_STAA8 | Uncharacterized protein | 3 | 6,33 | 2,08 | 32,87 | 3 | 6,67 | 1,53 | 22,91 | 3 | 6,67 | 2,89 | 43,30 | 1,05 | 1,05 |
| Q7A6Q3_STAA8 | Glycolytic operon regulator | 3 | 1,33 | 0,58 | 43,30 | 3 | 1,67 | 0,58 | 34,64 | 3 | 1,33 | 0,58 | 43,30 | 1,25 | 1,00 |
| Q7A6K0_STAA8 | Poly D-alanine transfer protein | 3 | 4,67 | 2,52 | 53,93 | 3 | 3,67 | 1,15 | 31,49 | 3 | 4,67 | 0,58 | 12,37 | 0,79 | 1,00 |
| NAGD_STAA8 | Protein nagD homolog | 3 | 9,67 | 3,21 | 33,25 | 3 | 6,67 | 0,58 | 8,66 | 3 | 9,00 | 2,65 | 29,40 | 0,69 | 0,93 |
| Q2FXT8_STAA8 | Protein SecDF | 3 | 4,00 | 1,73 | 43,30 | 3 | 6,67 | 2,31 | 34,64 | 3 | 6,00 | 1,00 | 16,67 | 1,67 | 1,50 |
| Q2G2T8_STAA8 | Putative uncharacterized protein | 3 | 2,67 | 1,15 | 43,30 | 3 | 2,67 | 0,58 | 21,65 | 3 | 2,33 | 1,53 | 65,47 | 1,00 | 0,88 |
| COAD_STAA8 | Pantetheine-phosphate adenylyltransferase | 2 | 1,00 | 1,00 | 100,00 | 3 | 1,33 | 0,58 | 43,30 | 1 | 0,67 | 1,15 | 173,21 | 1,33 | 0,67 |

Tableau 1: Analyse comparative des protéomes de la souche HG001 sauvage et de ses mutants par la technique du Spectral Count (2/2)

| ACC Nb | Name | SPECTRAL COUNT | | | | | | | | | | | | | |
|--------------|--|----------------|----------|-------|--------|----------|----------|-------|--------|----------|----------|-------|--------|-----------------|-------------|
| | | Rn1 | | | | 2001 | | | | 404 | | | | 2001/Rn1 | 404/Rn1 |
| | | Nb répl. | Moy #Spc | Stdev | CV(%) | Nb répl. | Moy #Spc | Stdev | CV(%) | Nb répl. | Moy #Spc | Stdev | CV(%) | ratio | ratio |
| Q7A5X9_STAAN | Riboflavin kinase / FAD synthase ribC | 3 | 4,67 | 0,58 | 12,37 | 3 | 3,00 | 1,73 | 57,74 | 3 | 3,33 | 0,58 | 17,32 | 0,64 | 0,71 |
| Q7A7U8_STAAN | SA0247 protein | 3 | 8,67 | 3,51 | 40,52 | 3 | 8,00 | 2,00 | 25,00 | 3 | 9,00 | 5,57 | 61,86 | 0,92 | 1,04 |
| LUXS_STAAN | Autoinducer-2 production protein LuxS | 3 | 8,00 | 1,00 | 12,50 | 3 | 5,67 | 1,15 | 20,38 | 3 | 7,33 | 1,53 | 20,83 | 0,71 | 0,92 |
| ISPT_STAAN | Undecaprenyl diphosphate synthase | 2 | 1,33 | 1,15 | 86,60 | 2 | 1,00 | 1,00 | 100,00 | 2 | 1,00 | 1,00 | 100,00 | 0,75 | 0,75 |
| Q7A5G7_STAAN | Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase | 3 | 6,00 | 1,00 | 16,67 | 3 | 7,00 | 1,00 | 14,29 | 3 | 7,33 | 1,53 | 20,83 | 1,17 | 1,22 |
| Q7A4T6_STAAN | Uncharacterized protein | 3 | 2,33 | 0,58 | 24,74 | 3 | 2,67 | 0,58 | 21,65 | 3 | 1,67 | 1,15 | 69,28 | 1,14 | 0,71 |
| Q2G116_STAAN | Putative uncharacterized protein | 2 | 2,33 | 2,08 | 89,21 | 3 | 1,33 | 0,58 | 43,30 | 2 | 1,33 | 1,53 | 114,56 | 0,57 | 0,57 |
| RL14_STAAN | 50S ribosomal protein L14 | 3 | 26,33 | 2,31 | 8,77 | 3 | 26,67 | 1,15 | 4,33 | 3 | 36,33 | 4,51 | 12,41 | 1,01 | 1,38 |
| Y197A_STAAN | UPF0457 protein SA1975.1 | 3 | 1,67 | 1,15 | 69,28 | 3 | 2,00 | 1,00 | 50,00 | 3 | 1,33 | 0,58 | 43,30 | 1,20 | 0,80 |
| ODO2_STAAN | Dihydrolipoamide succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex | 3 | 2,00 | 0,00 | 0,00 | 3 | 2,00 | 0,00 | 0,00 | 3 | 2,00 | 0,00 | 0,00 | 1,00 | 1,00 |
| Q7A4P5_STAAN | Aldehyde dehydrogenase | 3 | 5,33 | 1,53 | 28,64 | 3 | 2,67 | 0,58 | 21,65 | 3 | 3,67 | 2,52 | 68,63 | 0,50 | 0,69 |
| Q7A4U8_STAAN | Uncharacterized protein | 3 | 1,00 | 0,00 | 0,00 | nd | nd | nd | nd | 2 | 0,67 | 0,58 | 86,60 | Rn1 only | 0,67 |
| Q2G2C1_STAAN | Pyruvate carboxylase | 3 | 11,33 | 2,31 | 20,38 | 3 | 8,00 | 5,20 | 64,95 | 3 | 5,67 | 4,73 | 83,40 | 0,71 | 0,50 |
| Q2FZ09_STAAN | Protein RecA | 3 | 21,00 | 1,00 | 4,76 | 3 | 21,00 | 2,65 | 12,60 | 1 | 6,33 | 10,97 | 173,21 | 1,00 | 0,30 |
| Q7A3C9_STAAN | Uncharacterized protein | 3 | 1,33 | 0,58 | 43,30 | 2 | 2,00 | 1,73 | 86,60 | 2 | 0,67 | 0,58 | 86,60 | 1,50 | 0,50 |
| Y947_STAAN | UPF0223 protein SA0947 | 3 | 1,00 | 0,00 | 0,00 | 2 | 1,33 | 1,15 | 86,60 | 1 | 0,33 | 0,58 | 173,21 | 1,33 | 0,33 |
| YABA_STAAN | Initiation-control protein yabA | 2 | 0,67 | 0,58 | 86,60 | 2 | 0,33 | 0,58 | 173,21 | nd | nd | nd | nd | 0,50 | Rn1 only |
| Q2FXV0_STAAN | Putative uncharacterized protein | 2 | 6,67 | 5,86 | 87,89 | 1 | 2,67 | 4,62 | 173,21 | 1 | 3,00 | 5,20 | 173,21 | 0,40 | 0,45 |
| AROA_STAAN | 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase | 2 | 0,67 | 0,58 | 86,60 | 1 | 0,33 | 0,58 | 173,21 | nd | nd | nd | nd | 0,50 | Rn1 only |
| Q2FWW1_STAAN | MHC class 2 analog protein | 1 | 0,33 | 0,58 | 173,21 | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | Rn1 only | Rn1 only |
| OAT2_STAAN | Ornithine--oxo-acid aminotransferase 2 | 3 | 1,33 | 0,58 | 43,30 | 1 | 0,33 | 0,58 | 173,21 | nd | nd | nd | nd | 0,25 | Rn1 only |
| Q7A6J3_STAAN | Probable cytosol aminopeptidase | 1 | 0,67 | 1,15 | 173,21 | 1 | 0,33 | 0,58 | 173,21 | 1 | 0,33 | 0,58 | 173,21 | 0,50 | 0,50 |
| Q2FWJ5_STAAN | S1 RNA binding domain protein | 3 | 9,00 | 2,65 | 29,40 | nd | nd | nd | nd | 1 | 0,33 | 0,58 | 173,21 | Rn1 only | 0,04 |

Tableau 2: Analyse comparative des protéomes de la souche HG001 sauvage et de ses mutants par la technique du MS1 Label-Free (1/2)

| LEGENDE: | | Nb répl. | Nombre de réplicats |
|----------|---|----------|-------------------------------|
| ratio | Respect des guidelines = min. 5 spectres | Moy #Spc | Moyenne du nombre de spectres |
| ratio | ratio>2 | Stdev | Déviation standard |
| ratio | ratio<0.5 | CV(%) | Coefficient de variation (%) |
| CV% | CV<20% | | |
| | Protéine retenue après validation manuelle, présentant une variation significative et fiable. | | |

| ACC Nb | Name | MS1 LABEL-FREE | | | | | | | | | | | | |
|---------------------|--|-----------------|-----------------|--------------|-----------------|-----------------|--------------|-----------------|-----------------|---------------|---------------|-------------|---------------|--------------|
| | | Rn1 | | | 2001 | | | 404 | | | 2001/Rn1 | | 404/Rn1 | |
| | | Moy | Stdev | CV% | Moy | Stdev | CV% | Moy | Stdev | CV% | p-value | ratio | p-value | ratio |
| CLFB_STAAN | Fibrinogen-binding protein B | 1,00E+05 | 3,57E+04 | 35,72 | 1,83E+05 | 7,52E+03 | 4,11 | 3,22E+04 | 4,96E+04 | 154,05 | 0,0173 | 1,83 | 0,1271 | 0,32 |
| Q2G221_STAA8 | Phage infection protein, putative | 1,83E+05 | 1,34E+05 | 73,37 | 3,35E+05 | 2,66E+05 | 79,46 | 1,70E+06 | 1,04E+06 | 61,02 | 0,4281 | 1,83 | 0,0660 | 9,27 |
| LEPA_STAA8 | Ribosomal back-translocase LepA | 1,09E+05 | 4,84E+04 | 44,37 | 1,12E+05 | 7,14E+04 | 63,92 | 6,41E+05 | 5,07E+05 | 79,10 | 0,9590 | 1,02 | 0,1448 | 5,88 |
| Q7A717_STAAN | SA0589 protein | 3,67E+05 | 3,46E+04 | 9,43 | 2,99E+05 | 9,97E+03 | 3,34 | 9,13E+05 | 3,12E+05 | 34,14 | 0,0302 | 0,81 | 0,0394 | 2,49 |
| GYRA_STAA8 | DNA gyrase subunit A | 9,62E+05 | 1,73E+05 | 18,01 | 1,03E+06 | 5,64E+04 | 5,50 | 1,94E+06 | 6,35E+05 | 32,73 | 0,5801 | 1,07 | 0,0618 | 2,02 |
| Q7A415_STAAN | SA2100 protein | 4,68E+05 | 2,20E+04 | 4,70 | 5,97E+05 | 9,44E+04 | 15,81 | 4,94E+05 | 4,11E+04 | 8,32 | 0,0819 | 1,28 | 0,3819 | 1,06 |
| Q7A3G3_STAAN | SA2327 protein | 1,83E+06 | 3,96E+05 | 21,69 | 1,83E+06 | 4,10E+05 | 22,33 | 1,40E+06 | 5,16E+05 | 36,97 | 0,9807 | 1,00 | 0,3172 | 0,76 |
| LEP_STAAN | Leader peptidase IB | 2,06E+06 | 9,12E+04 | 4,42 | 1,93E+06 | 2,10E+05 | 10,84 | 1,76E+06 | 3,20E+05 | 18,16 | 0,3789 | 0,94 | 0,1902 | 0,85 |
| RSMH_STAAN | rRNA (cytosine-N(4)-)-methyltransferase RsmH | 7,31E+05 | 2,45E+04 | 3,35 | 6,89E+05 | 7,18E+04 | 10,41 | 4,98E+05 | 2,87E+05 | 57,54 | 0,3956 | 0,94 | 0,2340 | 0,68 |
| Q2FVW2_STAA8 | N-acetylmuramoi-L-alanine amidase | 4,68E+05 | 2,20E+04 | 4,70 | 5,97E+05 | 9,44E+04 | 15,81 | 4,94E+05 | 4,11E+04 | 8,32 | 0,0819 | 1,28 | 0,3819 | 1,06 |
| CLFB_STAAN | Fibrinogen-binding protein B | 1,00E+05 | 3,57E+04 | 35,72 | 1,83E+05 | 7,52E+03 | 4,11 | 3,22E+04 | 4,96E+04 | 154,05 | 0,0173 | 1,83 | 0,1271 | 0,32 |
| FTSA_STAAN | Cell division protein FtsA | 4,82E+05 | 3,17E+05 | 65,68 | 7,24E+05 | 1,08E+05 | 14,98 | 1,73E+06 | 1,56E+06 | 90,31 | 0,2792 | 1,50 | 0,2464 | 3,59 |
| Q7A3U0_STAAN | Respiratory nitrate reductase alpha chain | 3,09E+05 | 5,77E+04 | 18,67 | 2,74E+05 | 7,00E+04 | 25,60 | 8,23E+05 | 4,50E+05 | 54,65 | 0,5338 | 0,88 | 0,1213 | 2,66 |
| Q2G1U8_STAA8 | Putative uncharacterized protein | 3,32E+05 | 4,40E+04 | 13,26 | 3,70E+05 | 5,51E+04 | 14,89 | 7,36E+05 | 2,57E+05 | 34,86 | 0,4027 | 1,11 | 0,0547 | 2,22 |
| Q7A4R3_STAAN | SA1708 protein | 7,96E+05 | 8,03E+05 | 100,89 | 8,44E+05 | 9,26E+05 | 109,66 | 1,34E+06 | 8,75E+05 | 65,10 | 0,9486 | 1,06 | 0,4685 | 1,69 |
| Q2FYV0_STAA8 | Putative uncharacterized protein | 9,12E+05 | 8,64E+04 | 9,47 | 7,27E+05 | 1,96E+05 | 26,93 | 3,88E+05 | 2,80E+05 | 72,22 | 0,2092 | 0,80 | 0,0365 | 0,43 |
| SPA_STAAN | Staphylococcal protein A | 4,87E+05 | 1,00E+05 | 20,51 | 1,04E+06 | 2,39E+05 | 23,03 | 5,20E+06 | 3,97E+06 | 76,34 | 0,0212 | 2,13 | 0,1090 | 10,67 |
| GYRB_STAAN | DNA gyrase subunit B | 5,19E+06 | 7,17E+06 | 138,00 | 1,32E+06 | 1,42E+05 | 10,78 | 1,09E+07 | 8,31E+06 | 76,54 | 0,4022 | 0,25 | 0,4219 | 2,09 |
| Q7A5K8_STAAN | PBP2 | 1,02E+06 | 1,27E+05 | 12,51 | 8,06E+05 | 1,77E+05 | 21,93 | 2,02E+06 | 2,74E+05 | 13,58 | 0,1714 | 0,79 | 0,0045 | 1,99 |
| CLPB_STAAN | Chaperone protein ClpB | 4,84E+06 | 5,55E+05 | 11,48 | 4,99E+06 | 1,41E+06 | 28,18 | 4,68E+06 | 1,97E+06 | 42,18 | 0,8694 | 1,03 | 0,8988 | 0,97 |
| COAE_STAAN | Dephosphocoenzyme A kinase | 3,88E+05 | 1,07E+05 | 27,65 | 3,00E+05 | 1,26E+04 | 4,21 | 6,60E+05 | 1,60E+05 | 24,26 | 0,2338 | 0,77 | 0,0705 | 1,70 |
| Q7A3Z5_STAAN | SA2119 protein | 2,11E+05 | 1,98E+04 | 9,36 | 1,62E+05 | 8,85E+04 | 54,61 | 8,18E+04 | 3,04E+04 | 37,13 | 0,4004 | 0,77 | 0,0035 | 0,39 |
| TRXB_STAAN | Thioredoxin reductase | 4,80E+06 | 3,54E+04 | 0,74 | 3,31E+07 | 9,54E+06 | 28,87 | 2,56E+07 | 1,71E+07 | 66,99 | 0,0068 | 6,88 | 0,1036 | 5,33 |
| Q7A569_STAAN | Uncharacterized protein | 3,67E+05 | 4,87E+04 | 13,27 | 7,86E+05 | 4,59E+04 | 5,84 | 8,49E+05 | 3,17E+05 | 37,33 | 0,0004 | 2,14 | 0,0598 | 2,31 |
| Q7A6Q3_STAAN | Glycolytic operon regulator | 7,63E+04 | 1,79E+04 | 23,49 | 1,25E+05 | 2,12E+04 | 16,88 | 3,27E+05 | 2,40E+05 | 73,56 | 0,0376 | 1,64 | 0,1463 | 4,28 |
| Q7A6K0_STAAN | Poly D-alanine transfer protein | 2,61E+05 | 4,55E+04 | 17,46 | 3,61E+05 | 1,71E+05 | 47,47 | 7,33E+05 | 2,33E+05 | 31,85 | 0,3819 | 1,39 | 0,0263 | 2,81 |
| NAGD_STAAN | Protein nagD homolog | 6,61E+05 | 4,71E+05 | 71,16 | 8,63E+05 | 3,68E+05 | 42,61 | 1,73E+06 | 4,05E+05 | 23,48 | 0,5900 | 1,31 | 0,0412 | 2,61 |
| Q2FXT8_STAA8 | Protein SecDF | 1,36E+07 | 9,94E+05 | 7,30 | 1,12E+07 | 9,67E+05 | 8,60 | 5,98E+06 | 6,87E+06 | 114,94 | 0,0408 | 0,82 | 0,1295 | 0,44 |
| Q2G2T8_STAA8 | Putative uncharacterized protein | 6,93E+05 | 1,41E+05 | 20,32 | 6,60E+05 | 1,32E+05 | 20,02 | 3,03E+05 | 1,77E+05 | 58,57 | 0,7866 | 0,95 | 0,0407 | 0,44 |

Tableau 2: Analyse comparative des protéomes de la souche HG001 sauvage et de ses mutants par la technique du MS1 Label-Free (2/2)

| ACC Nb | Name | MS1 LABEL-FREE | | | | | | | | | | | | |
|--------------|--|----------------|----------|-------|----------|----------|-------|----------|----------|--------|----------|-------|---------|-------|
| | | Rn1 | | | 2001 | | | 404 | | | 2001/Rn1 | | 404/Rn1 | |
| | | Moy | Stdev | CV% | Moy | Stdev | CV% | Moy | Stdev | CV% | p-value | ratio | p-value | ratio |
| COAD_STAAN | Pantetheine-phosphate adenylyltransferase | 5,77E+05 | 2,60E+04 | 4,51 | 6,02E+05 | 1,19E+05 | 19,79 | 2,47E+05 | 1,84E+05 | 74,45 | 0,7387 | 1,04 | 0,0367 | 0,43 |
| Q7A5X9_STAAN | Riboflavin kinase / FAD synthase ribC | 1,12E+06 | 4,63E+04 | 4,14 | 1,04E+06 | 7,44E+04 | 7,16 | 4,72E+05 | 2,13E+05 | 45,14 | 0,1962 | 0,93 | 0,0069 | 0,42 |
| Q7A7U8_STAAN | SAO247 protein | 1,16E+06 | 7,64E+04 | 6,59 | 9,83E+05 | 2,49E+05 | 25,30 | 4,76E+05 | 1,62E+05 | 34,08 | 0,3095 | 0,85 | 0,0028 | 0,41 |
| LUXS_STAAN | Autoinducer-2 production protein LuxS | 2,71E+06 | 1,45E+05 | 5,36 | 2,22E+06 | 2,51E+05 | 11,31 | 9,24E+05 | 4,22E+05 | 45,71 | 0,0429 | 0,82 | 0,0023 | 0,34 |
| ISPT_STAAN | Undecaprenyl diphosphate synthase | 2,55E+05 | 1,92E+04 | 7,54 | 1,62E+05 | 3,59E+04 | 22,17 | 8,21E+04 | 1,02E+05 | 124,17 | 0,0166 | 0,63 | 0,0447 | 0,32 |
| Q7A5G7_STAAN | Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase | 1,40E+06 | 3,10E+05 | 22,11 | 1,30E+06 | 1,76E+05 | 13,52 | 4,61E+05 | 2,46E+05 | 53,41 | 0,6401 | 0,93 | 0,0147 | 0,33 |
| Q7A4T6_STAAN | Uncharacterized protein | 8,06E+05 | 8,90E+04 | 11,05 | 7,85E+05 | 7,07E+04 | 9,01 | 2,62E+05 | 6,14E+04 | 23,40 | 0,7639 | 0,97 | 0,0010 | 0,33 |
| Q2G116_STAA8 | Putative uncharacterized protein | 5,87E+05 | 4,95E+04 | 8,43 | 6,96E+05 | 1,60E+05 | 23,01 | 2,65E+05 | 1,77E+05 | 66,80 | 0,3208 | 1,19 | 0,0389 | 0,45 |
| RL14_STAAN | 50S ribosomal protein L14 | 2,37E+07 | 4,86E+05 | 2,05 | 2,20E+07 | 1,73E+06 | 7,84 | 7,13E+06 | 8,14E+06 | 114,11 | 0,1832 | 0,93 | 0,0245 | 0,30 |
| Y197A_STAAN | UPF0457 protein SA1975.1 | 6,46E+05 | 5,31E+04 | 8,22 | 6,16E+05 | 6,70E+04 | 10,89 | 1,03E+05 | 5,18E+04 | 50,06 | 0,5693 | 0,95 | 0,0002 | 0,16 |
| ODO2_STAA8 | Dihydrolipoamide succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex | 1,34E+06 | 2,93E+04 | 2,19 | 6,11E+05 | 3,97E+05 | 65,01 | 4,50E+05 | 6,99E+05 | 155,40 | 0,0338 | 0,46 | 0,0923 | 0,34 |
| Q7A4P5_STAAN | Aldehyde dehydrogenase | 7,37E+05 | 8,46E+04 | 11,47 | 1,09E+06 | 2,07E+05 | 19,07 | 4,56E+05 | 4,23E+05 | 92,64 | 0,0536 | 1,47 | 0,3222 | 0,62 |
| Q7A4U8_STAAN | Uncharacterized protein | 6,33E+06 | 2,06E+05 | 3,26 | 6,49E+06 | 5,38E+05 | 8,29 | 1,85E+06 | 1,36E+06 | 73,63 | 0,6644 | 1,02 | 0,0049 | 0,29 |
| Q2G2C1_STAA8 | Pyruvate carboxylase | 2,83E+06 | 1,11E+06 | 39,19 | 2,34E+06 | 8,46E+05 | 36,10 | 1,10E+07 | 8,10E+06 | 73,39 | 0,5792 | 0,83 | 0,1570 | 3,90 |
| Q2FZ09_STAA8 | Protein RecA | 6,94E+05 | 2,82E+05 | 40,62 | 6,85E+05 | 1,88E+05 | 27,43 | 1,15E+06 | 5,49E+05 | 47,58 | 0,9647 | 0,99 | 0,2666 | 1,66 |
| Q7A3C9_STAAN | Uncharacterized protein | 6,92E+05 | 9,45E+04 | 13,66 | 5,75E+05 | 2,25E+05 | 39,18 | 3,26E+05 | 8,94E+04 | 27,40 | 0,4564 | 0,83 | 0,0082 | 0,47 |
| Y947_STAAN | UPF0223 protein SA0947 | 5,41E+05 | 4,20E+04 | 7,76 | 5,04E+05 | 1,23E+05 | 24,31 | 8,80E+04 | 4,45E+04 | 50,62 | 0,6448 | 0,93 | 0,0002 | 0,16 |
| YABA_STAAN | Initiation-control protein yabA | 7,98E+04 | 3,24E+03 | 4,05 | 6,86E+04 | 5,94E+03 | 8,66 | 2,51E+04 | 4,14E+04 | 164,62 | 0,0457 | 0,86 | 0,0846 | 0,31 |
| Q2FXV0_STAA8 | Putative uncharacterized protein | 2,05E+06 | 3,32E+05 | 16,19 | 2,44E+06 | 4,83E+05 | 19,81 | 1,54E+06 | 8,37E+05 | 54,53 | 0,3184 | 1,19 | 0,3771 | 0,75 |
| AROA_STAA8 | 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase | 1,34E+05 | 1,38E+04 | 10,31 | 1,42E+05 | 2,16E+04 | 15,23 | 3,69E+04 | 1,68E+04 | 45,43 | 0,6205 | 1,06 | 0,0015 | 0,28 |
| Q2FWW1_STAA8 | MHC class 2 analog protein | 1,08E+05 | 2,70E+04 | 24,93 | 1,58E+05 | 8,04E+04 | 51,03 | 2,74E+05 | 3,79E+04 | 13,84 | 0,3716 | 1,45 | 0,0035 | 2,53 |
| OAT2_STAAN | Ornithine--oxo-acid aminotransferase 2 | 2,23E+05 | 3,13E+04 | 14,07 | 1,87E+05 | 3,00E+04 | 16,06 | 3,79E+04 | 4,72E+04 | 124,48 | 0,2249 | 0,84 | 0,0048 | 0,17 |
| Q7A6J3_STAAN | Probable cytosol aminopeptidase | 1,09E+06 | 2,51E+05 | 23,12 | 9,50E+05 | 5,34E+05 | 56,26 | 3,05E+05 | 1,06E+05 | 34,73 | 0,7084 | 0,87 | 0,0077 | 0,28 |
| Q2FWJ5_STAA8 | S1 RNA binding domain protein | 6,82E+05 | 2,61E+04 | 3,83 | 1,70E+05 | 9,01E+04 | 53,03 | 6,99E+04 | 2,53E+04 | 36,20 | 0,0007 | 0,25 | 0,0000 | 0,10 |

Tableau 3: Analyse comparative des protéomes de la souche HG001 sauvage et de ses mutants après vérification manuelle des aires des peptides obtenues par MS1 Label-Free (1/2)

| LEGENDE: | |
|----------|---|
| | Protéine retenue après validation manuelle, présentant une variation significative et fiable. |
| m/z | Rapport masse / charge |
| z | Charge |

| ACC Nb | Name | Sequence | Score Mascot | m/z | z | Rn1-1 | Rn1-2 | Rn1-3 |
|-------------------|------------------------------|-----------------------------------|--------------|----------|---|----------|----------|----------|
| Q2G221_STAA8 | Phage infection protein | K.LTDTGSSVVVEK.A | 92.4 | 617,8289 | 2 | 1,44E+05 | 1,65E+05 | 1,88E+05 |
| | | K.ALNFAADDVPAQFPK.I | 75.0 | 802,4126 | 2 | 1,08E+05 | 1,48E+05 | 1,41E+05 |
| | | K.AGLTIEENVPTINK.I | 67.0 | 749,9108 | 2 | 5,81E+04 | 8,11E+04 | 6,45E+04 |
| Q7A382ICLFB_STAAN | Fibrinogen-binding protein B | K.TTNDANSIATNSELK.N | 70.8 | 789,8831 | 2 | 2,37E+04 | 4,52E+04 | 1,83E+04 |
| | | K.MQDQTVPQEANSQVDNK.T | 33.2 | 644,6317 | 3 | 3,92E+04 | 4,84E+04 | 3,62E+04 |
| P99134ISPA_STAAN | Staphylococcal protein A | R.NGFIQSLKDDPSQSTNVLGEAK.K | 84.2 | 783,399 | 3 | 1,81E+05 | 1,94E+05 | 2,19E+05 |
| | | R.NGFIQSLKDDPSQSANVLGEAQK.L | 64.7 | 816,0823 | 3 | 1,52E+05 | 2,83E+05 | 1,93E+05 |
| | | K.ADAQNNFNKDDQSAFYEILNMPNLNEAQR.N | 60.6 | 878,6693 | 4 | 3,91E+04 | 7,24E+04 | 4,92E+04 |

Tableau 3: Analyse comparative des protéomes de la souche HG001 sauvage et de ses mutants après vérification manuelle des aires des peptides obtenues par MS1 Label-Free (2/2)

| LEGENDE: | |
|----------|---|
| | Protéine retenue après validation manuelle, présentant une variation significative et fiable. |
| m/z | Rapport masse / charge |
| z | Charge |

| ACC Nb | Name | 2001-1 | 2001-2 | 2001-3 | 404-1 | 404-2 | 404-3 | Moy. Rn1 | Moy. 2001 | Moy. 404 | 2001/Rn1 | 404/Rn1 |
|-------------------|------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|----------|----------|---------|
| Q2G221_STAA8 | Phage infection protein | 2,68E+05 | 3,64E+05 | 2,88E+05 | 2,57E+05 | 2,58E+05 | 3,80E+05 | 1,66E+05 | 3,07E+05 | 2,98E+05 | 1,85 | 1,80 |
| | | 2,40E+05 | 2,72E+05 | 2,22E+05 | 2,55E+05 | 2,10E+05 | 3,35E+05 | 1,32E+05 | 2,45E+05 | 2,67E+05 | 1,85 | 2,02 |
| | | 1,13E+05 | 1,52E+05 | 1,25E+05 | 1,16E+05 | 1,16E+05 | 3,14E+05 | 6,79E+04 | 1,30E+05 | 1,82E+05 | 1,91 | 2,68 |
| Q7A382ICLFB_STAAN | Fibrinogen-binding protein B | 3,45E+04 | 4,77E+04 | 5,67E+04 | 1,83E+04 | 2,59E+04 | 9,76E+04 | 2,91E+04 | 4,63E+04 | 4,73E+04 | 1,59 | 1,62 |
| | | 6,89E+04 | 8,16E+04 | 7,46E+04 | 2,84E+04 | 5,02E+04 | 1,32E+04 | 4,13E+04 | 7,50E+04 | 3,06E+04 | 1,82 | 0,74 |
| P99134ISPA_STAAN | Staphylococcal protein A | 3,76E+05 | 4,25E+05 | 2,73E+05 | 2,04E+05 | 2,87E+05 | 3,97E+05 | 1,98E+05 | 3,58E+05 | 2,96E+05 | 1,81 | 1,49 |
| | | 3,87E+05 | 5,20E+05 | 3,92E+05 | 2,28E+05 | 3,44E+05 | 5,44E+05 | 2,09E+05 | 4,33E+05 | 3,72E+05 | 2,07 | 1,78 |
| | | 9,84E+04 | 1,55E+05 | 9,44E+04 | 3,84E+04 | 7,39E+04 | 8,92E+04 | 5,36E+04 | 1,16E+05 | 6,72E+04 | 2,16 | 1,25 |

Tableau 4: Analyse des protéines partenaires de Tex dans les souches BJC100 sauvage, BJC100-TEX flag et BJC100 TEX-2001 flag (1/3)

| LEGENDE: | |
|------------------|---|
| Score / #Spectra | Validation à 1%FDR mais spectres MSMS de mauvaise qualité (inspection visuelle) |
| Ratio | Ratio>2 ou spécifique à une IP |
| MW(kDa) | Masse moléculaire (kDa) |
| pI | Point isoelectrique |
| #Spectra | Nombre de spectres |

PROTEINES IDENTIFIEES UNIQUEMENT DANS 1 OU 2 IP

| Accession Number | Description | MW(kDa) | pI | BCJ100 | | TEX-Flag | | TEX-2001-Flag | | RATIOS IP/Ctrl | |
|--------------------|--|---------|------|--------|-----------|----------|-----------|---------------|-----------|----------------|----------------|
| | | | | Score | # Spectre | Score | # Spectre | Score | # Spectre | TEX/BCJ100 | TEX2001/BCJ100 |
| TEX_STAPH_N315 | >TEX_STAPH_N315 | 80,9 | 6 | | | 6001,3 | 6717 | | | TEX only | |
| TEX2001_STAPH_N315 | >TEX2001_STAPH_N315 | 75,4 | 5,9 | | | | | 3632,1 | 523 | | TEX2001 only |
| Q2FWJ5_STAA8 | S1 RNA binding domain protein | 80,9 | 5,9 | | | 6448,6 | 5147 | 3598 | 410 | IP only | IP only |
| GYRA_STAA8 | DNA gyrase subunit A | 99,3 | 4,9 | | | 876,4 | 37 | 202,9 | 6 | IP only | IP only |
| RPOD_STAA8 | RNA polymerase sigma factor RpoD | 42,1 | 4,8 | | | 299,5 | 11 | 147,1 | 4 | IP only | IP only |
| SARR_STAA8 | HTH-type transcriptional regulator SarR | 13,7 | 9,8 | | | 204,8 | 10 | 120,3 | 5 | IP only | IP only |
| RL35_STAA8 | 50S ribosomal protein L35 | 7,7 | 12,8 | | | 98,2 | 6 | 33,7 | 1 | IP only | IP only |
| PNP_STAA8 | Polyribonucleotide nucleotidyltransferase | 77,3 | 4,7 | | | 1326,1 | 78 | | | TEX only | |
| RS15_STAA8 | 30S ribosomal protein S15 | 10,6 | 10,9 | | | 154,4 | 55 | | | TEX only | |
| Q2FYY6_STAA8 | Glutamine synthetase | 50,8 | 4,9 | | | 652,4 | 28 | | | TEX only | |
| PARC_STAA8 | DNA topoisomerase 4 subunit A | 90,9 | 6 | | | 581,6 | 23 | | | TEX only | |
| RL5_STAA8 | 50S ribosomal protein L5 | 20,3 | -1,1 | | | 162,8 | 20 | | | TEX only | |
| Q2FYI0_STAA8 | Penicillin-binding protein 2 | 80,4 | 9,1 | | | 673,4 | 20 | | | TEX only | |
| Q2G0X6_STAA8 | Type I restriction-modification system, M subunit | 56,1 | 4,4 | | | 503,3 | 20 | | | TEX only | |
| RNJ1_STAA8 | Ribonuclease J 1 | 62,6 | 6,9 | | | 518,9 | 18 | | | TEX only | |
| Q7A4Y5_STAAN | SA1626 protein | 59,4 | 4,5 | | | 474,2 | 18 | | | TEX only | |
| KPYK_STAA8 | Pyruvate kinase | 63,1 | 5,1 | | | 586,6 | 16 | | | TEX only | |
| GATB_STAA8 | Aspartyl/glutamyl-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase subunit B | 53,6 | 4,9 | | | 508,9 | 14 | | | TEX only | |
| ADDB_STAAN | ATP-dependent helicase/deoxyribonuclease subunit B | 134,3 | 5,1 | | | 413,1 | 14 | | | TEX only | |
| RNY_STAA8 | Ribonuclease Y | 58,5 | 5,1 | | | 440,1 | 14 | | | TEX only | |
| Q2FWZ9_STAA8 | UDP-N-acetylmuramyl tripeptide synthetase, putative | 49,2 | 6,1 | | | 440,6 | 14 | | | TEX only | |
| GPSB_STAA8 | Cell cycle protein GpsB | 13,1 | 5,8 | | | 218,4 | 12 | | | TEX only | |
| Q99SD7_STAAN | Transcription termination factor Rho | 49,9 | 7,8 | | | 319 | 12 | | | TEX only | |
| GATA_STAA8 | Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A | 52,8 | 4,9 | | | 323,5 | 11 | | | TEX only | |

Tableau 4: Analyse des protéines partenaires de Tex dans les souches BJC100 sauvage, BJC100-TEX flag et BJC100 TEX-2001 flag (2/3)

| Accession Number | Description | MW(kDa) | pI | BCJ100 | | TEX-Flag | | TEX-2001-Flag | | RATIOS IP/Ctrl | |
|------------------|--|---------|------|--------|-----------|----------|-----------|---------------|-----------|----------------|----------------|
| | | | | Score | # Spectre | Score | # Spectre | Score | # Spectre | TEX/BCJ100 | TEX2001/BCJ100 |
| Q2G2G6_STAA8 | Uncharacterized protein | 40 | 5,8 | | | 357,2 | 11 | | | TEX only | |
| UPP_STAA8 | Uracil phosphoribosyltransferase | 23 | 6,1 | | | 243,3 | 11 | | | TEX only | |
| ADDA_STAA8 | ATP-dependent helicase/nuclease subunit A | 141,2 | 5 | | | 344,2 | 10 | | | TEX only | |
| PGK_STAA8 | Phosphoglycerate kinase | 42,6 | 5 | | | 288,8 | 10 | | | TEX only | |
| Q2FY88_STAA8 | Probable ATP-dependent helicase | 35,9 | 9,3 | | | 152,3 | 10 | | | TEX only | |
| SYA_STAA8 | Alanine--tRNA ligase | 98,5 | 4,9 | | | 313 | 9 | | | TEX only | |
| AHPC_STAA8 | Alkyl hydroperoxide reductase subunit C | 21 | 4,7 | | | 250,4 | 9 | | | TEX only | |
| TOP1_STAAN | DNA topoisomerase 1 | 79 | 9,7 | | | 352 | 9 | | | TEX only | |
| SYP_STAAN | Proline--tRNA ligase | 63,8 | 4,9 | | | 273,7 | 9 | | | TEX only | |
| Q2FVL2_STAA8 | Putative uncharacterized protein | 28,9 | 0 | | | 282,4 | 9 | | | TEX only | |
| Q2G1Y6_STAA8 | SA0959 protein | 69,2 | 4,8 | | | 332,7 | 9 | | | TEX only | |
| EZRA_STAAN | Septation ring formation regulator EzrA | 66,2 | 4,6 | | | 260,5 | 9 | | | TEX only | |
| EZRA_STAA8 | Septation ring formation regulator EzrA | 66,2 | 4,6 | | | 268,7 | 9 | | | TEX only | |
| Q2FXM1_STAA8 | Uncharacterized protein | 15,2 | 10,1 | | | 235,8 | 9 | | | TEX only | |
| Q2FY60_STAA8 | 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating | 51,8 | 4,9 | | | 285,8 | 8 | | | TEX only | |
| Q2FWE9_STAA8 | ATP synthase gamma chain | 29,5 | 5 | | | 210,1 | 8 | | | TEX only | |
| Q2G0Q8_STAA8 | Cysteine synthase | 33 | 5,2 | | | 172,4 | 8 | | | TEX only | |
| PFLB_STAA8 | Formate acetyltransferase | 84,8 | 5,2 | | | 286,1 | 8 | | | TEX only | |
| FEMX_STAA8 | Lipid II:glycine glycytransferase | 48,5 | 9,3 | | | 266,8 | 8 | | | TEX only | |
| Q99RM9_STAAN | Nitrite reductase | 88,6 | 5,1 | | | 338,4 | 8 | | | TEX only | |
| IF2_STAA8 | Translation initiation factor IF-2 | 77,8 | 5 | | | 377 | 8 | | | TEX only | |
| Y1193_STAA8 | Uncharacterized protein SA1069 | 60,5 | 4,5 | | | 225,1 | 8 | | | TEX only | |
| EBPS_STAAN | Elastin-binding protein EbpS | 53,2 | 6 | | | 203,2 | 7 | | | TEX only | |
| Q2FWA0_STAA8 | Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] | 65,8 | 4,8 | | | 317,2 | 7 | | | TEX only | |
| SYI_STAA8 | Isoleucine--tRNA ligase | 104,8 | 5,2 | | | 239 | 7 | | | TEX only | |
| PPAC_STAA8 | Probable manganese-dependent inorganic pyrophosphatase | 34 | 4,5 | | | 270,4 | 7 | | | TEX only | |
| Q2FY78_STAA8 | Pseudouridine synthase | 28 | 9,7 | | | 255 | 7 | | | TEX only | |
| Q7A719_STAAN | SA0587 protein | 34,7 | 9,2 | | | 169,7 | 7 | | | TEX only | |
| Q2FZ59_STAA8 | Uncharacterized protein | 13,4 | 5,7 | | | 271,4 | 7 | | | TEX only | |
| PYRH_STAA8 | Uridylate kinase | 26,1 | 6 | | | 217,1 | 7 | | | TEX only | |
| GI:87201814 | >GI:87201814 | 11,3 | 4,5 | | | 194,2 | 6 | | | TEX only | |
| LEPA_STAA8 | Elongation factor 4 | 68,1 | 4,7 | | | 261,8 | 6 | | | TEX only | |
| FABI_STAA8 | Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADPH] FabI | 28 | 5,6 | | | 105,6 | 6 | | | TEX only | |
| G6PI_STAAN | Glucose-6-phosphate isomerase | 49,8 | 4,7 | | | 188,5 | 6 | | | TEX only | |

Tableau 4: Analyse des protéines partenaires de Tex dans les souches BJC100 sauvage, BJC100-TEX flag et BJC100 TEX-2001 flag (3/3)

| Accession Number | Description | MW(kDa) | pI | BCJ100 | | TEX-Flag | | TEX-2001-Flag | | RATIOS IP/Ctrl | |
|------------------|--|---------|-----|--------|-----------|----------|-----------|---------------|-----------|----------------|----------------|
| | | | | Score | # Spectre | Score | # Spectre | Score | # Spectre | TEX/BCJ100 | TEX2001/BCJ100 |
| RPOE_STAA8 | Probable DNA-directed RNA polymerase subunit delta | 20,9 | 3,4 | | | 235,5 | 6 | | | TEX only | |
| GRPE_STAA8 | Protein GrpE | 24 | 4,3 | | | 121,6 | 6 | | | TEX only | |
| Q2FXT8_STAA8 | Protein-export membrane protein SecDF | 82 | 10 | | | 253,7 | 6 | | | TEX only | |
| Q2G072_STAA8 | Putative uncharacterized protein | 28,8 | 6,6 | | | 213,3 | 6 | | | TEX only | |
| Q7A5Z0_STAAN | Signal recognition particle protein | 50,7 | 9,3 | | | 181,5 | 6 | | | TEX only | |
| Q2FVV6_STAA8 | Uncharacterized protein | 26,6 | 6,8 | | | 207,4 | 6 | | | TEX only | |
| Q2FZR9_STAA8 | 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 2 | 43,7 | 4,9 | | | 192,9 | 5 | | | TEX only | |
| CH60_STAAN | 60 kDa chaperonin | 57,5 | 4,4 | | | 152,8 | 5 | | | TEX only | |
| FEMB_STAA8 | Aminoacyltransferase FemB | 49,6 | 5,3 | | | 106,3 | 5 | | | TEX only | |
| Q2FZF9_STAA8 | Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase, putative | 34,7 | 9,1 | | | 128,8 | 5 | | | TEX only | |
| OATA_STAA8 | O-acetyltransferase OatA | 69,1 | 9,9 | | | 122,5 | 5 | | | TEX only | |
| Q2G0J0_STAA8 | Phosphate acetyltransferase | 34,9 | 4,6 | | | 109,5 | 5 | | | TEX only | |
| Q2FZH5_STAA8 | Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase | 63,2 | 4,5 | | | 231 | 5 | | | TEX only | |
| Q2G0X5_STAA8 | Probable restriction modification system specificity subunit | 47,1 | 9,6 | | | 234,3 | 5 | | | TEX only | |
| SODM1_STAA8 | Superoxide dismutase [Mn/Fe] 1 | 22,7 | 5 | | | 167,3 | 5 | | | TEX only | |
| Q7A4H1_STAAN | Uncharacterized protein SA1868 tex | 80,9 | 6 | | | | | 3632,1 | 410 | | TEX2001 only |

Tableau 5: Sites candidats pour l'insertion de l'intron LI. LtrB dans la séquence génomique de tex, générés d'après l'algorithme informatique du site <http://www.sigma-geosys.com/targetron/>

| Location | Gene 5`exon | | Gene 3`-exon | Score | E-value |
|------------|---------------------------------|--------|------------------|-------|---------|
| 404 405s | AGCGATATGGATGAAGGCACGTAAACATGA | intron | AGTCTCAATTGAAGA | 11.09 | 0.007 |
| 2001 2002s | GCATTTGTAGATATAGGTGTTAAACAAGAT | intron | GGACTTGTCCATGTT | 9.65 | 0.030 |
| 1113 1114s | GTACAAATGGTTAAAGCGTATGATGTGCAA | intron | TTAATTGCAATTGGC | 9.18 | 0.045 |
| 532 533a | ACACACCTTGATGATACATATCTTTTAAAA | intron | TTTTTGTCTATATT | 9.18 | 0.045 |
| 854 855s | TGTCCCTTCGATAGAGCGTGAAATCCATGC | intron | TGATTTAACTGAAAA | 9.18 | 0.045 |
| 356 357a | ATCCATATCGCTAATGGCTCTAACCCCTTA | intron | CGTTTCGCCTCAGTT | 8.62 | 0.069 |
| 1191 1192a | CGCTTCATTGACAATGATGAATTGACTGG | intron | CAACTGATGCTTTTT | 8.43 | 0.079 |
| 1800 1801s | TTGGATATGGATGAACTGGCGATTGAATTA | intron | CAAGTCGGTGTACCT | 8.30 | 0.087 |
| 528 529s | CAAATTTTCAGATAATCCTAAATATAGAACA | intron | AAAATTTTAAAAGAT | 7.85 | 0.122 |
| 2073 2074s | AATCCAATGGATATTGTCAGTGTGGTGAT | intron | ATCGTTGACGTTTGG | 7.85 | 0.122 |
| 98 99s | ATTAACACTGCTAGAAGAAAAAATACAGT | intron | ACCATTTATTGCGAG | 6.98 | 0.232 |
| 1480 1481a | GCGAACTTAGACCAGACACATATTGTAATA | intron | ATGATGATGATGCTG | 6.89 | 0.249 |
| 2121 2122s | TACAGTATTGACAAAAATAAAGACAAAGTA | intron | TCATTAACGATGATT | 6.78 | 0.269 |
| 1303 1304a | CACTTAATGGATCTTGAACGCGTCGTCCAA | intron | TTGATACGGCACTTC | 6.66 | 0.291 |
| 1410 1411s | CATGATGTTAATCAAAAAGCACTAGAAAAT | intron | GCATTAACTTTCGTT | 6.19 | 0.380 |
| 1252 1253a | CCACTTGAAAATCAGGAAATTCATCTCTAG | intron | CAATTTCTGATGCTG | 6.04 | 0.415 |
| 943 944a | TAAATGCTGGATCTACGCCTAATATTTGTT | intron | TACCTTTTCATTGGAG | 5.97 | 0.432 |
| 1601 1602s | GTTAAGCAAGATTAAGCGTTTGGGTGCTAA | intron | AACTTTTGAGCAGAG | 5.97 | 0.434 |

II/ Publications scientifiques

Durant ma thèse, j'ai eu l'opportunité de participer à différentes publications scientifiques, qui sont répertoriées ici.

Current knowledge on regulatory RNAs and their machineries in *Staphylococcus aureus*.

Romilly C., Caldelari I., Parmentier D., Lioliou E., Romby P. et Fechter P.

S.aureus est l'un des pathogènes majeurs de l'homme, responsable d'un grand nombre d'infections communautaires et nosocomiales (§ I. 2). L'expression des gènes de virulence de ce pathogène est finement régulée, grâce à l'action coordonnée de différents facteurs de régulation, dont des systèmes à deux composants, des facteurs de transcription et des ARN régulateurs. De récentes études ont permis l'identification de nouveaux ARN régulateurs dont des ARN agissant en *cis*, des ARN antisens, des petits ARN non codants ou des ARNm codant des peptides. Plusieurs exemples d'ARN régulant la pathogénicité de *S. aureus* ainsi que différents aspects de la régulation antisens sont présentés dans cette revue.

Current knowledge on regulatory RNAs and their machineries in *Staphylococcus aureus*

Cédric Romilly, Isabelle Caldelari, Delphine Parmentier, Efthimia Lioliou, Pascale Romby* and Pierre Fechter

Architecture et Réactivité de l'ARN; Université de Strasbourg; CNRS; IBMC; Strasbourg, France

Key words: *Staphylococcus aureus*, regulatory RNAs, peptides, RNA-binding proteins, gene regulation, virulence

Staphylococcus aureus is one of the major human pathogens, which causes numerous community-associated and hospital-acquired infections. The regulation of the expression of numerous virulence factors is coordinated by complex interplays between two component systems, transcriptional regulatory proteins and regulatory RNAs. Recent studies have identified numerous novel RNAs comprising cis-acting regulatory RNAs, antisense RNAs, small non coding RNAs and small mRNAs encoding peptides. We present here several examples of RNAs regulating *S. aureus* pathogenicity and describe various aspects of antisense regulation.

Introduction

Staphylococcus aureus is a commensal bacterial species of human and a remarkable opportunistic pathogen, which is one of the main causes of hospital-acquired infections. *S. aureus* is responsible for a wide spectrum of human diseases ranging from minor skin infections to systemic infections such as sepsis and endocarditis.^{1,2} One of the major concerns is the fact that the treatment of *S. aureus* diseases is hampered due to the emergence and spread of multi-drug resistant and hypervirulent strains.³ Hence, determining the regulatory networks and their dynamics involved in fast adaptive responses and in virulence is a prerequisite to find alternative strategies to combat *S. aureus* infections.

A successful infection by *S. aureus* is caused by several immuno-evasive strategies, but also by the production of a large array of *S. aureus* virulence factors. These factors include surface proteins that are required for the adhesion and invasion of the host, exoproteins that are involved in host immune evasion, and toxins that disseminate in host tissues allowing the bacteria to acquire novel nutrients.⁴⁻⁶ To be able to adapt to various environments, *S. aureus* has evolved a plethora of signaling pathways that coordinate the temporal expression of virulence genes in response to both environmental and host signals.⁷ Protein-mediated transcriptional regulation is central in these regulatory circuits. Moreover, intricate and complex interactions are also occurring between multiple regulators such as two-component systems, regulatory proteins, peptide secondary metabolites, ribonucleases and RNAs.⁷⁻⁹

Beside transcriptional control, regulation of mRNA translation and decay are major ways to rapidly modify gene expression in response to growth, perturbation of the environmental cues, stress and virulence.⁹ Recent studies in *S. aureus* identified the machineries involved in mRNA decay and evidenced the role of several ribonucleases in the regulation of virulence gene expression. These enzymes have been recently considered as potential targets for therapeutic development against staphylococcal infections.⁹ The stability of mRNAs is modulated by the activity of ribonucleases (RNases) but also by trans-acting factors such as small non coding RNAs (sRNAs) and RNA-binding proteins.¹⁰⁻¹³ In 1993, the largest multi-functional regulatory RNA (RNAIII) was discovered to be the main intracellular effector of the quorum sensing system.¹⁴ Later it was shown that RNAIII acts as an antisense RNA to regulate translation and decay of mRNA targets in a coordinated manner with the double-strand specific endoribonuclease III.^{10,11,15,16} More recently, several studies revealed that the *S. aureus* genome likely encodes a huge diversity of sRNAs (reviewed in ref. 17 and 18), as demonstrated for many other bacteria.^{19,20} These studies include computer software predictions coupled to expression studies,²¹⁻²⁴ microarrays,^{13,25,26} cloning and conventional sequencing of small sized cDNA libraries²⁷ and high throughput sequencing approaches^{28,29} (Lioliou et al. personal communication). More than 250 sRNA genes were discovered. Most of them are distributed all over the core genome while some of them are located in pathogenicity islands and plasmids. The sRNAs include cis-acting regulatory regions of mRNAs (the so-called riboswitches), cis-encoding antisense RNAs (asRNA) and non-coding RNAs (ncRNAs). In addition, mRNAs carrying small open reading frames (sORF) have been identified^{29,30} and one of them was recently shown to express a small cytolytic peptide.³¹ Although functional and mechanistic studies of sRNAs are still lagging behind, recent works show that sRNAs bring the missing links in the regulatory pathways that allow *S. aureus* to sense population density and various environmental changes, modify cell surface properties, adjust its metabolism during cell growth and regulate virulence gene expression (reviewed in ref. 17 and 18). More surprisingly, a recent genome-wide analysis combining high throughput sequencing and tiling arrays revealed a large number of discrete antisense RNAs indicative of pervasive transcription occurring along the *S. aureus* genome. In the same study, the role of RNase III in the degradation of sense/antisense duplexes was highlighted.³² Hence,

*Correspondence to: Pascale Romby; Email: p.romby@ibmc-cnrs.unistra.fr
Submitted: 01/27/12; Revised: 03/21/12; Accepted: 03/22/12
<http://dx.doi.org/10.4161/rna.20103>

ribonucleases and regulatory sRNAs are intimately linked in post-transcriptional regulation.

In this present review, we will describe several novel and representative mechanisms exploited by regulatory RNAs and their machineries to control gene expression in *S. aureus*. A particular focus will be on regulatory RNAs involved in virulence.

Cis-acting Regions of mRNAs Regulate Metabolic Pathways Essential for Bacterial Growth

In bacteria, the 5' untranslated regions (5'-UTR) of numerous mRNAs have evolved dedicated regulatory sites which act as direct sensors of the physical and metabolic states of the cell.³³⁻³⁶ Some of the most widespread cis-acting elements of mRNAs are the so-called riboswitches, which regulate expression of downstream genes in response to elevated concentrations of specific metabolites.³⁷ Elegant biochemical, genetic and structural studies reveal the mechanisms by which riboswitches achieve a strict specificity to small ligands to regulate expression of the downstream gene.³⁷⁻³⁹ Impressive structural studies of the most widespread riboswitch classes show that each ligand binds to a dedicated and conserved cleft formed by a compact three-dimensional folding of the 5' UTR (reviewed in ref. 39). This specific interaction often induces mRNA conformational changes that have direct consequences on the expression of the following coding sequence.⁴⁰ Based on sequence and structure conservation,^{41,42} 15 riboswitches were mapped on *S. aureus* genome. Until now, 7 operons and 33 genes are expected to be under the control of riboswitches specific for S-adenosylmethionine (SAM), thiamine pyrophosphate (TPP), flavin mononucleotide (FMN), lysine, glycine, guanine, 7-aminomethyl-7-deazaguanine (preQ1) and glucosamine-6-phosphate (Glc-6P).^{23,24,27-29,43} For many of them, alternative basepairings can form either an anti-terminator hairpin or a Rho-independent terminator suggesting that binding of the metabolite (SAM, TPP, lysine, glycine, preQ, FMN) to the aptamer domain would induce premature transcription arrest.¹⁸ A highly conserved yybP motif was predicted to regulate transcription termination/anti-termination of SA0878 encoding a transporter protein.^{18,44} This simple but highly common motif in bacteria has been often associated with genes involved in controlling the cellular pH.⁴⁴ Interestingly, recent works show that alkali pH enhanced the duration of RNA polymerase pauses on the nascent *alc* mRNA in *E. coli* and promoted the folding of an active pH responsive element to enhance translation.⁴⁵ This would certainly mean that either the RNA polymerase or the RNA might sense the proton or hydroxide ions. Such a pH effect has not yet been demonstrated in *S. aureus* although it was reported that pH variation affected virulence factor production.⁴⁶

Two riboswitches, which are expected to recognize Glc-6P and FMN, might regulate their downstream genes, *glmS* and SA1316, respectively, by different mechanisms. In Gram-positive bacteria, Glc-6P acts as a co-factor of the regulatory domain of *glmS* mRNA and confers a catalytic activity to the 5'UTR.⁴⁷ The crystal structure of *glmS* regulatory region has shown that the active site is pre-folded and that the ribozyme activity is only promoted by Glc-6P binding.^{48,49} This initial cleavage might lead

to rapid degradation of *glmS* mRNA.⁵⁰ The conservation of the catalytic site strongly suggests that the Glc-6P-induced cleavage is also preserved in *S. aureus*. For the FMN riboswitch, which controls expression of the hypothetical protein SA1316, alternative pairings are predicted to regulate the accessibility of the ribosome binding site. Hence, FMN binding would stabilize the formation of a hairpin structure sequestering the SD sequence to inhibit translation initiation.¹⁸ Two unusual mechanisms involving SAM riboswitches have been described in Gram-positive bacteria. In *Clostridium acetobutylicum*, a SAM riboswitch acts as antisense RNA to control the expression of *ubiG* operon via transcriptional interference.⁵¹ In *Listeria monocytogenes*, a SAM riboswitch was shown to regulate in trans the translation of *prfA* mRNA encoding a transcriptional activator of expression of virulence factors, highlighting a link between bacterial virulence and nutrient availability.⁵² Although such mechanisms are not yet described in *S. aureus*, transcriptomic analysis has shown that short transcripts comprising the whole regulatory regions were detected most likely due to premature transcription termination.^{28,29} Furthermore, additional large 5'UTRs and 3'UTRs have been recently identified suggesting that they might carry specific regulatory domains.^{28,29}

All these riboswitches regulate the synthesis of essential proteins involved in amino acid transport and biosynthesis, as well as co-factor and nucleotide biosynthesis. As these regulatory elements evolved specific binding pockets suitable for the recognition of small molecules, they have been considered as tractable targets for anti-microbial compounds.^{33,53} Recent work has successfully led to the design of non-metabolizable agonistic molecules targeting the guanine riboswitch in *S. aureus* based on the crystal structure of the riboswitch.⁵⁴ A pyrimidine derivative compound, which was able to bind efficiently the guanine riboswitch, constitutively switches off the expression of the essential *guaA* gene encoding GMP synthase. This compound shows bactericidal activity against *S. aureus* and reduced infection in mice. As atomic structures are solved for numerous classes of riboswitches,³⁹ they offer new opportunities to design novel chemical compounds with anti-microbial activities.³⁷

Intricate Interactions between Regulatory Proteins and RNAs in Quorum Sensing System

The quorum sensing system, which senses the population density, has multiple functions in *S. aureus* physiology and pathogenesis. It is aimed not only to respond to environmental changes but also to regulate virulence gene expression.^{55,56} While the system coordinates the temporal expression of numerous virulence factors, strategies have been developed to interfere with virulence and prevent the rapid appearance of drug resistance.⁷ Briefly, the system is composed of two divergent transcripts, RNAlI encoding a quorum sensing cassette and a two-component system and RNAlII encoding hemolysin delta (Fig. 1). The quorum sensing cassette produces the autoinducer peptide AIP which upon a threshold concentration, activates the membrane kinase AgrC and the response regulator AgrA through a phosphorylation mechanism. Studies performed with methicillin resistant

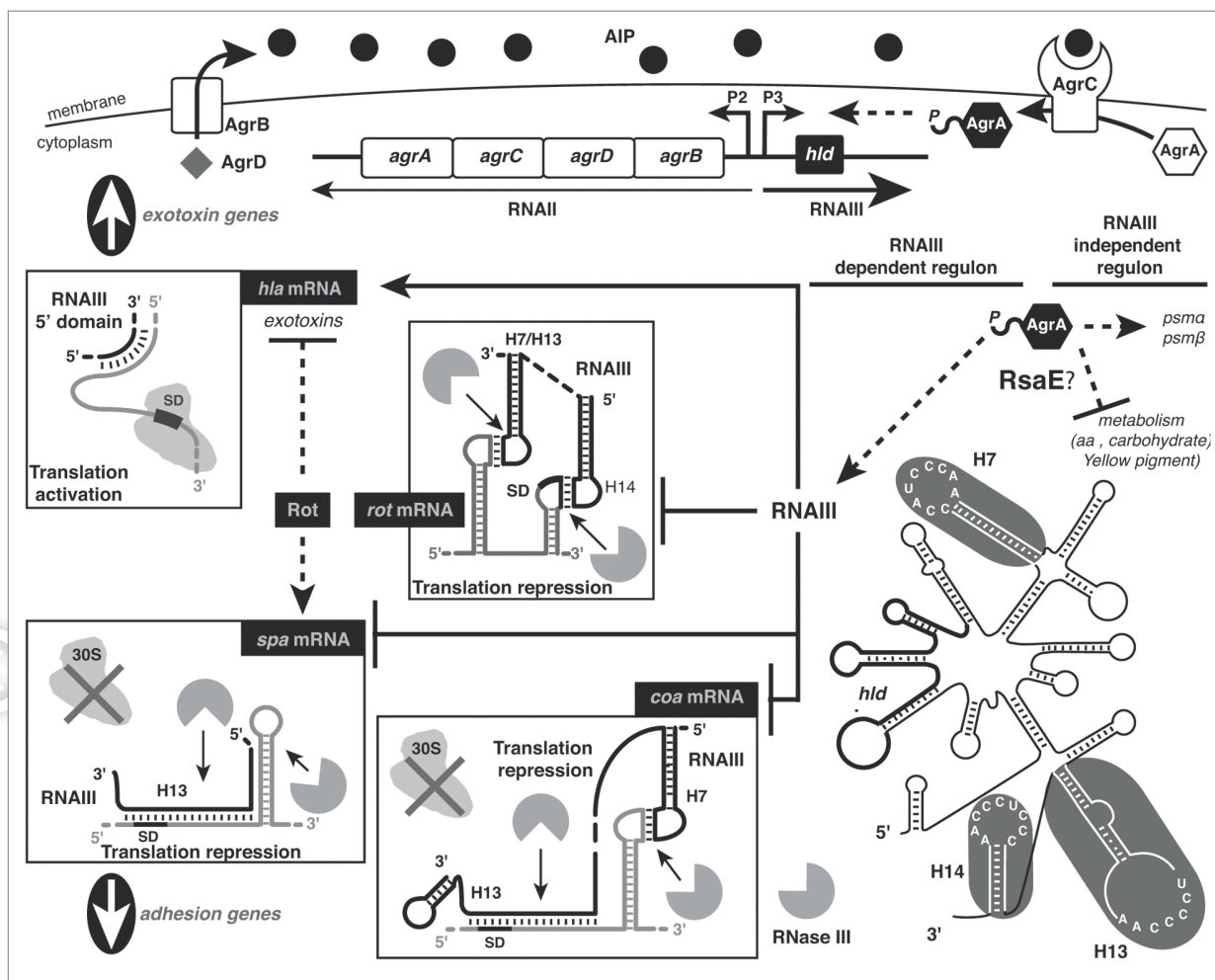


Figure 1. The *agr* system and its two main intracellular effectors AgrA and RNAIII. The quorum-sensing circuit is shown at the top: it involves the auto-inducing peptide (AIP, black circle) matured and exported by AgrB. AIP activates the AgrC/AgrA two-component system. The *agr* system regulates the expression of multiple genes in an RNAIII-independent manner via AgrA and in an RNAIII-dependent manner. RNAIII-independent regulation: AgrA activates the synthesis of several peptides by binding to their promoter regions (Phenol soluble modulins, PSM) and represses metabolic enzymes by an unknown mechanism. Repression might occur via the expression of a small non-coding RNA, RsaE, which is enhanced by AgrA. RsaE regulates enzymes of the central metabolism.^{23,28} RNAIII-dependent regulation: the secondary structure of RNAIII and three of the hairpin domains containing a redundant UCCC motif are colored in gray. RNAIII encodes hemolysin delta (*hld*). The 3' non coding region of *hld* which contains the three redundant hairpin loops binds to the ribosome binding sites of *coa* mRNA encoding coagulase, *rot* mRNA encoding repressor of toxins Rot, and *spa* mRNA encoding protein A. In all cases, RNAIII prevents the binding of the 30S ribosomal subunit to inhibit translation and recruits the endoribonuclease III (RNase III) to initiate rapid degradation. The 5' non coding region of *hld* binds to *hla* mRNA to facilitate ribosome binding and to activate translation. Dashed bars and dashed arrows are for transcriptional regulation while black bars and arrows are for post-transcriptional regulation. Bars are for repression and arrows for activation. The data are taken from previous works.^{10,15,16,57,59}

S. aureus strains show that AgrA directly activates the expression of the adjacent RNAIII and the synthesis of several cytoplasmic PSM peptides while it represses the synthesis of metabolic enzymes and of staphyloxanthin biosynthesis by an unknown mechanism.⁵⁷ Interestingly, recent observations show that AgrA enhances expression of the sRNA RsaE, which in turn represses the synthesis of enzymes involved in the TCA cycle at the post-transcriptional level.^{23,28} Whether AgrA activates expression of other sRNAs to repress expression of RNAIII-independent target genes is still an open question. RNAIII was also shown to coordinate the temporal expression of numerous accessory factors.^{6,14} Hence the two effectors of the quorum sensing system, namely

AgrA and RNAIII, might reflect a stepwise evolution in the lifestyle of *S. aureus*, in order to establish its pathogenicity.⁵⁷

RNAIII is one of the fascinating regulatory and structured mRNAs that regulates multiple targets involved in virulence and peptidoglycan metabolism.^{6,17,58} The non-coding parts of RNAIII are the regulatory domains, which control gene expression at the post-transcriptional level via an antisense mechanism. The 5'UTR of *hld* binds to the leader region of *hla* mRNA to facilitate ribosome recruitment (Fig. 1 and ref. 59) while the large 3' UTR is acting primarily as a repressor domain. The 3'UTR is characterized by three redundant hairpin structures with a conserved C-rich sequence located in the apical loops. This motif is

often used to bind G-rich sequences in mRNAs located primarily in the ribosome binding sites (Fig. 1). Although the topologies of the RNAIII-mRNA duplexes are different, they all efficiently prevent ribosome binding and recruit the double-strand specific endoribonuclease III (RNase III), which initiates the rapid degradation of the repressed mRNAs.^{10,15,16} These mRNAs encode adhesin factors (protein A, coagulase, SA1000) and the transcriptional repressor of toxins, Rot. Through the regulation of Rot, RNAIII indirectly activates the transcription of exotoxins and represses the transcription of adhesins such as protein A.^{10,11} Hence, RNAIII regulates the synthesis of *spa* and *hla* mRNAs at two different levels involving feed-forward regulatory loops (Fig. 1). Such a double regulation ensures that the repression is irreversible and provides a rapid induction of exotoxins.^{60,61} Recent work suggested that part of the coding sequence of *bld* could bind to *map* mRNA encoding the major histocompatibility complex class II analogous protein to activate translation⁶² suggesting that activation of the *map* mRNA translation may interfere with *bld* translation. In addition, RNAIII represses several hydrolases and amidases involved in the metabolism of peptidoglycan and hence it may contribute to the cell wall integrity at high cell density^{10,56} (Lioliou et al. personal communication). Regulation of peptidoglycan metabolism might be the common function of RNAIII in all staphylococcal species including *S. epidermidis*. Apart from RNase III, is there another protein that facilitates the RNAIII functions? In contrast to Gram-negative bacteria, the Sm-like Hfq protein has no detectable effect neither on RNAIII-target mRNA complex formation, on RNAIII-dependent regulation in vivo, nor on the RNAIII stability.^{10,23,63}

Many questions await further experimental works: is the structure of RNAIII sufficient for its regulatory functions? Does RNAIII target other mRNAs encoding regulatory proteins? Does the translation of *bld* affect regulation? Does RNAIII act in concert with other sRNAs? Do other sRNAs contribute to regulation of virulence gene expression? The importance of RNAIII/AgrA for *S. aureus* pathogenesis has also been the subject of debate. The vast majority of clinical isolates from acute infections express RNAIII.⁶⁴ However, the level of RNAIII may vary considerably among clinical isolates⁶⁵ and the pattern of proteins regulated by RNAIII is not conserved in all isolates.^{57,66} Recent study suggested that *agr* mutations, which are often found in methicillin-resistant strains, might be an adaptation of the pathogen within the infected host but conversely this loss of function might be counter-selective outside the host.⁶⁷ The regulators involved in the modulation of RNAIII expression or its stability are not known. Another future task would be to understand how modulation of RNAIII concentration may affect its regulatory circuits and what could be the advantages for *S. aureus* to develop variations in the pattern of virulence gene expression.

S. aureus Acquires Novel sRNAs through Mobile Elements

Mobile genetic elements play essential roles in genome evolution since they favor the acquisition of novel functions that have conferred to *S. aureus* a wide range of adaptive processes for survival

in its hosts.⁶⁸⁻⁷⁰ These elements include prophages, transposons, plasmids and pathogenicity islands (SaPI). Although several major virulence factors are encoded on the core genome, others are carried on SaPIs such as the superantigens and several enterotoxins, implying that these factors have been transferred horizontally. Another type of mobile element, the so-called staphylococcal chromosome cassette (SCCmec), confers resistance to methicillin and other antibiotics to *S. aureus* strains.⁷⁰ Mobile elements and extra-chromosomal elements are tightly controlled so that they do not compromise the integrity of the host. Among the regulatory factors, short antisense RNAs (asRNA) were the first regulatory RNAs discovered to control transposition, plasmid replication, partition and conjugation in the 80s years (reviewed in ref. 71 and 72). In 1989, the first asRNA discovered in *S. aureus* was shown to control the replication of pT181 plasmid.⁷³ Later, several ncRNAs, asRNAs and mRNAs encoding small peptides have been identified in SaPIs, prophages and SCCmec.^{21,27-29,74,75} Mechanistic and functional studies on some of these RNAs revealed unexpected features that are summarized below.

An sRNA mediates inter-relations between pathogenicity islands and the core genome. Several sRNAs, named SprA-G for small pathogenicity island RNA, were identified in SaPIs.^{21,31,76} The fact that the sRNAs are expressed from SaPIs, which were horizontally acquired, does not preclude that the RNA will regulate target genes located within the same locus. An example is provided by SprD, a ncRNA expressed from PI ϕ .^{21,29} SprD was shown to repress translation initiation of *sbi* mRNA encoding an immune-evasion molecule, a gene located on the core genome.⁷⁶ SprD contains four hairpin structures and the third one interacts with the ribosome binding site of the *sbi* mRNA to form a long duplex of 40 base pairs interrupted by bulged nucleotides. The interaction is sufficient to prevent translation initiation in vivo and has no effect on the half-life of *sbi* mRNA. As for *S. aureus* RNAIII, SprD-dependent repression takes place independently of the Sm-like Hfq protein.⁷⁶ Strikingly, *sbi* mRNA strongly decreased at the stationary phase of growth while the yield of SprD remained almost unchanged suggesting that an additional level of regulation takes place independently of SprD. Whether this downregulation is *agr*-dependent and affects transcription or mRNA degradation have still to be addressed. SprD contributed to *S. aureus* diseases in a mouse model, but this effect was not linked to the repression of Sbi production, indicating that SprD might regulate the synthesis of other proteins that play major roles during the host infection.⁷⁶ This work suggested that the regulatory functions of SprD have evolved to mediate inter-connections between the SaPI and the core genome, in order to regulate virulence gene expression.

Antisense RNAs with different properties. Several short and structured asRNAs have been identified to regulate plasmid replication,⁷³ and to repress the expression of transposase^{28,29} or the synthesis of small cytolytic peptides.³¹ These sRNAs are short, highly structured and contain regions that are fully complementary to their target mRNAs since they are transcribed in the opposite direction. Analysis of the mechanism of action for several of them reveals unusual binding pathways that are directly

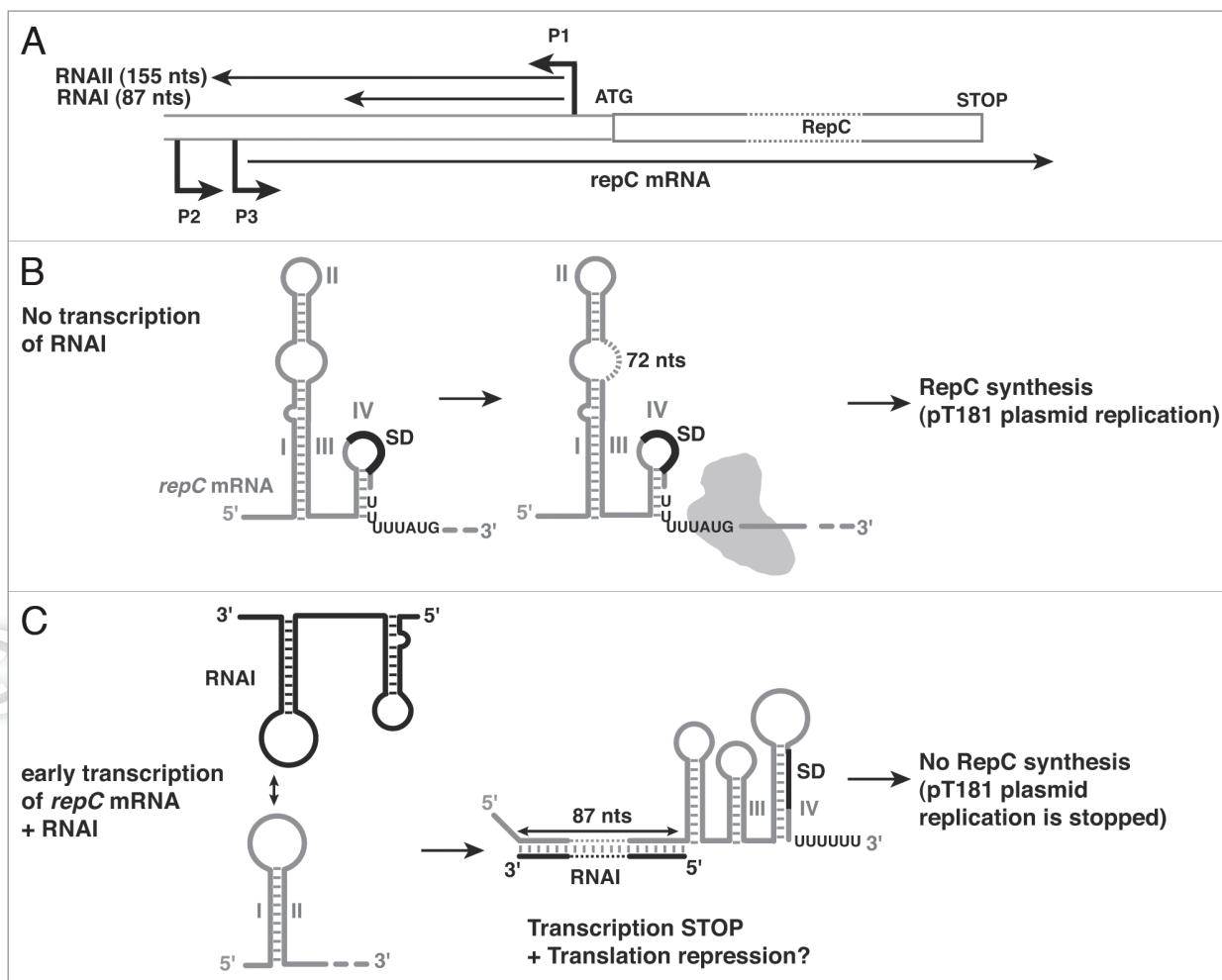


Figure 2. Antisense regulation of plasmid pT181 replication. (A) Genetic organization of pT181 plasmid and its control region. RNAI is the antisense RNA. (B) Schematic secondary structure model of *repC* mRNA leader region as proposed by Novick et al.⁷³ The formation of the large helical domain formed by helices I and III favors the formation of an anti-terminator hairpin to favor the transcription of the whole mRNA. In this structure, the Shine and Dalgarno sequence (SD) and the initiation codon are available for translation. (C) The antisense RNAI traps a transient hairpin structure of *repC* mRNA during transcription, and the formation of the RNAI-mRNA duplex stabilizes a Rho-independent terminator to arrest transcription. RepC synthesis is thus abolished.

dependent on the structures of the mRNA and the asRNA. Novick and collaborators were the first to describe how the antisense RNAI causes transcriptional attenuation of the mRNA encoding the rate-limiting replication RepC protein of plasmid pT181⁷³ (Fig. 2A), a mechanism often used in plasmids of Gram-positive bacteria.^{71,72} This plasmid confers to the bacteria several antibiotic resistances. The mechanism is as follows. The *repC* mRNA can potentially adopt two distinct conformations in which an anti-terminator or a terminator of transcription can be alternatively form (Fig. 2A and B). In the absence of RNAI, the nascent *repC* transcript forms preferentially into a conformation that permits transcription throughout the *repC* mRNA. As the consequence, translation can occur since the Shine and Dalgarno sequence (SD) is accessible to recruit the ribosome (Fig. 2A). In the presence of RNAI, the asRNA binds to a hairpin structure of *repC* mRNA that is transiently formed during transcription. The initial binding probably occurs via a loop-loop interaction

involving several G-C pairings that is subsequently converted into a duplex of 87 base pairs (Fig. 2C). The formed complex modifies the folding process of the mRNA during transcription so that a Rho-independent terminator structure is stabilized just upstream the initiation codon, resulting in a premature termination of transcription. In addition, this hairpin structure sequesters the SD sequence of *repC*, which might block the access of the ribosome (Fig. 2C). The mechanism relies on specific properties. The antisense RNAI has to bind to the 5'UTR of *repC* mRNA within a short time window to be effective so that the mRNA folding pathway during transcription can be modified. The formation of the sense-antisense duplex is indeed a very fast and productive process that is a direct consequence of specific interactions between designed three-dimensional structures of the interacting RNAs, a feature that is generally common to short asRNAs regulating essential processes of extra-chromosomal elements.⁷¹

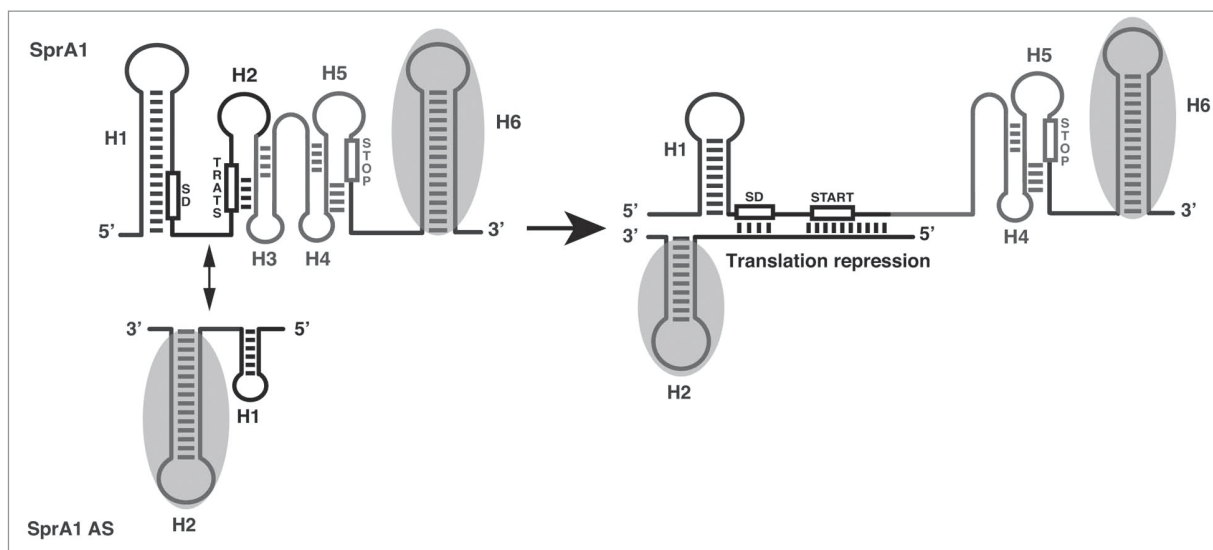


Figure 3. Antisense regulation of the synthesis of a small cytolitic peptide encoded by SprA1. The secondary structures of SprA1 and of the antisense RNA SprA1 AS are from Sayed et al. SprA1 contains two pseudoknot structures H2 and H5. SprA1 is a mRNA which encodes a small cytolitic peptide. The 5' end of SprA1 AS forms imperfect base pairings with the ribosome binding site of SprA1 and unfolds the pseudoknot structure H2 to prevent translation. SD is for Shine and Dalgarno, START is for the initiation codon, and STOP for the stop codon. The fully complementary regions of SprA1 and SprA1 AS (surrounded in gray) do not interact. The model of repression mechanism is from Sayed et al.

A recent work has revisited and questioned the definition of the active region of a short and structured asRNA.³¹ Among the SprA-G sRNAs, two of them, SprA1 and SprG were shown to be expressed together with their asRNAs, SprA1-AS and SprF, respectively.^{21,29} It was previously predicted that these two RNA pairs form type I toxin-antitoxin modules in which SprA1 and SprG would encode small hydrophobic peptides.⁷⁷ The SprA1/SprA1-AS module is found in several copies in the core genome and plasmids. SprA1 was proposed to be a multifunctional RNA since its 3' end could potentially base pair with the 3'-UTRs of three mRNA targets.²¹ The peptide, resulting from the translation of SprA1 sORF, has a lytic activity on human erythrocytes and displays an antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria.³¹ The SprA1 encoded peptide shares physicochemical properties with *S. aureus* PSM, which are also amphipathic α -helical peptides.^{57,74} An sRNA encoding a PSM was recently identified within the SCC-mec cassette, and this PSM has pro-inflammatory and cytolytic activities, and has significant impact on immune evasion and disease.⁷⁴ PSM genes are also present in multi-copies and RNAlII encodes one of them. However, an asRNA against mRNA expressing a PSM was not demonstrated so far. Both SprA1 and SprA1-AS are constitutively expressed and the yield of the asRNA is significantly higher than that of SprA1.³¹ The structure of SprA1 is characterized by two pseudoknot motifs in which the ribosome binding site is partly imbedded but this conformation does not hinder the formation of the ribosomal initiation complex.³¹ Structure probing combined with mutational analysis shows that the short SprA1-AS binds to the ribosome binding site of SprA1 through imperfect pairings to prevent translation of the peptide (Fig. 3). Unexpectedly the interacting region does not involve the 3' end of SprA1-AS, which is fully complementary to the 3' end of SprA1 and is

dispensable in vivo. Instead, the active region is located in its 5' part that is partially complementary to the ribosome binding site of SprA1 (Fig. 3). The reason for this unexpected observation lies in the structures of the two RNAs. The fully complementary regions of both RNAs correspond to Rho-independent terminators, which are highly stable hairpin motifs terminated by four G-C base pairs. Such stable structures probably do not favor the rapid formation of stable intermolecular pairings. Instead, the 5' unpaired region of SprA1-AS may be more appropriate to promote fast and early binding with the connecting loop L2 of the pseudoknot structure of SprA1 (Fig. 3), a mechanism used by sRNAs of Gram-negative bacteria.⁷⁸ Again, Hfq was not found associated with the antisense RNA regulation. In light of this study, the structures and the sequences of both the sRNA and the target must be taken into account to identify the regulatory sites involved in antisense regulation. In addition, this study adds further evidence that *S. aureus* expresses a large variety of peptides.^{6,30,31,70,75,77} Interestingly, the PSM peptides are controlled by AgrA⁷⁴ as is the quorum sensing AIP peptide while two other hypothetical peptides were activated by the alternative σ B factor required for stress adaptation, antibiotic resistance and virulence.³⁰ Whether these short mRNAs regulate gene expression as it was shown for *S. aureus* RNAlII remained to be studied. Elucidation of their functions, structure and mechanisms of action is certainly another area of interest.

Is there a Specific Machinery Associated with sRNA Function?

Little information yet exists on *S. aureus* RNA-binding proteins (RNA chaperone, RNA helicase, enzymes, post-transcriptional regulators...) that might be associated with sRNA regulation.

In contrast to Gram-negative bacteria, all the sRNAs studied so far which regulate gene expression through mRNA binding do not require the Sm-like Hfq protein (see below). However, there is a growing list of works showing that mRNA stability is a highly controlled process in *S. aureus* that allows the pathogen to respond to environmental variations, nutrient availability, growth rate and cell density (reviewed in ref. 9, 12 and 79). Among the proteins that alter mRNA turnover, the pleiotropic transcriptional regulatory protein SarA was unexpectedly identified.¹³ Whether SarA binds to RNA or indirectly affects mRNA degradation through the activation of sRNAs are open questions. Moreover, the roles of several ribonucleases in *S. aureus* virulence have been appreciated,⁹ and among these enzymes, RNase III has been clearly identified as a major partner in sRNA regulation.^{10,15,16,32} Some of the recent data are discussed below.

The controversy concerning *S. aureus* Hfq protein. Hfq is the well-known Sm-like RNA chaperone protein whose function has been deeply studied in Gram-negative bacteria (reviewed in ref. 80). Hfq is able to bind sRNAs and mRNAs,^{81,82} promotes RNA conformational changes favoring the binding of sRNAs to their target mRNAs, stabilizes sRNAs against degradation and mediates transcription antitermination at Rho-dependent terminators through binding to Rho.⁸³ The first crystal structure of Hfq bound to an A(U)5G sequence was solved in *S. aureus* revealing a homohexameric ring made of two distinct faces where the AU5G oligonucleotide binds to the proximal face.⁸⁴ Comparison with the structure of *E. coli* Hfq protein reveals that the overall structure in both distant bacteria is very similar but significant differences in the repartition of charges have been observed.^{85,86} This is particularly true for the region connecting the proximal and distal faces, which is strongly negative in *S. aureus* and conversely strongly positive in *E. coli*.⁸⁷ Such differences might have some consequences on the RNA recognition and the role of Hfq in the formation of mRNA-sRNA complexes. Works in *E. coli* and *S. aureus* show that the proximal site would be dedicated to the recognition of internal A/U rich sequences of sRNAs while the distal site would preferentially recognize A-rich sequences.⁸⁷ More recent studies described that the proximal face of *E. coli* Hfq has a strong preference for the Rho-independent terminator U-tail sequences of sRNAs and has a particularly high affinity for the 3'OH end of a U6 oligonucleotide.^{88,89} This specific recognition of the 3' end of sRNA by Hfq plays a direct role in the stabilization of sRNA.⁸⁸ Comparison of *S. aureus* Hfq-A(U)5G and *E. coli* Hfq-U6 reveals that the conformation of the RNA backbone is very different in both structures where it is highly constrained in *E. coli* allowing a specific recognition of the 3' terminal hydrogen bond of the RNA by Hfq.⁸⁹ These differences are most likely linked to the nature of the sequences of both oligonucleotides rather than the sequences of Hfq itself.⁸⁹

Although *S. aureus* Hfq binds to RNA, its role in sRNA-dependent regulation remains obscure in contrast to enterobacteria.⁹⁰ Deletion of the *hfq* gene in various strain backgrounds (RN6390, COL, Newman) shows that Hfq is not involved in stress response, antibiotic resistance and virulence.^{11,63} *S. aureus* Hfq binds tightly to RNAPIII in vitro but has no detectable effect on RNAPIII-target mRNAs complex formation.^{10,15} A similar behavior was found

for several other sRNAs targeting mRNAs.^{23,31,63,76} Moreover Hfq is not involved in the stability/turnover of sRNAs.^{23,30,31,63,76} As many of the experimentally studied sRNAs interact rapidly with their target mRNAs in vitro and form stable complexes sufficient to prevent ribosome binding, they might preclude the need for Hfq. It was also proposed that there is an apparent link between the dispensability of Hfq, the GC content of the bacterial genomes and the stability of the formed sRNA-mRNAs.⁹¹ This apparent paradox between the absence of in vivo effect of Hfq and the ability of the protein to bind RNA in vitro was explained by the fact that Hfq is not produced in RN6390/COL strains.¹¹ The reason why Hfq cannot be detected has not been yet investigated although it was suggested that mutations in the promoter region led to a significant decrease of *hfq* transcription.¹¹ Interestingly, a recent work⁹² showed that Hfq is detected only in several clinical strains and in the 8325-4 strain but not in COL and RN6390, two laboratory-adapted strains.^{11,63} In 8325-4, where Hfq is expressed, its deletion decreases pathogenicity in a murine peritonitis infection model.⁹² Specifically, the deletion of Hfq deregulates the expression of 116 genes, many of them being associated to virulence.⁹² More specifically, deletion of *hfq* causes increased synthesis of the surface carotenoid pigment and decreased synthesis of exoproteases.⁹² In light of this latter work, the behavior of *S. aureus* (8325-4 strain) cells was analyzed in a low-fluid-shear environment where the bacteria initiated a novel attachment-independent biofilm phenotype.⁹³ These cells displayed slower growth and attenuated virulence characteristics, such as decreased carotenoid production, increased susceptibility to oxidative stress and reduced survival in blood. Microarray profiling of these cells showed alterations in several metabolic pathways, and unexpectedly, expression of the *hfq* gene was strongly decreased. This study suggested that *S. aureus* 8325-4 strain responds to a low-fluid-shear environment by initiating a biofilm/colonization phenotype with decreased virulence characteristics that could be in part attributed to *hfq*.⁹³ These two studies show that Hfq impacts stress response and pathogenesis when it is expressed. Conversely, in other strains, Hfq function may have been superseded by other factors and hence this riboregulator has been downsized by mutational loss of its promoter. Hence, many questions have now to be addressed more specifically: what are the functions and the mechanisms of action of Hfq in strains expressing the protein? Does Hfq promote the formation of some of sRNA-mRNA pairs? Does *S. aureus* Hfq bind to RNAs similarly than the *E. coli* Hfq protein? Are there functional Hfq analogs particular/specific to strains that do not express Hfq? How does regulation occur in strains deficient in Hfq? What would be the advantages of expressing (or not) Hfq in *S. aureus*?

Interestingly, a recent work has shown that the conserved and ubiquitous metallo-protein SMc01113 in *Sinorhizobium meliloti*, ortholog to *E. coli* YbeY, alters the accumulation of sRNAs and their mRNA targets in a way similar to Hfq.⁹⁴ Although these effects might be indirect since the protein has been associated with the maturation of the ribosome at high temperature,^{95,96} the protein shares intriguing structural similarities with the MID domain of eukaryotic AGO proteins.⁹⁷ This protein might be part of the bacterial sRNA pathway,⁹⁴ and although it is found

in several *S. aureus* strains, its function has not been studied yet. In *B. subtilis*, it was shown that three small basic proteins act as RNA chaperones of the sRNA FsrA, to promote degradation of mRNAs encoding iron-dependent proteins under conditions of iron deprivation.⁹⁸ Obviously, the use of genetic screens and/or purification of ribonucleoprotein particles might help to identify the protein co-factors of *S. aureus* sRNAs.

The RNase III as a major player of RNA-dependent regulation. *S. aureus* RNase III belongs to a large class of ubiquitous enzymes which cleave double-stranded RNA (dsRNA) to generate short RNA duplexes ended by 2 nt 3'-overhang. In eukaryotes, the equivalent enzymes are involved in biogenesis of siRNA/miRNA in higher organisms.⁹⁹ RNase III is a highly conserved Mg²⁺-dependent endoribonuclease among bacteria and consists of a catalytic and a dsRNA binding domain and functions as a homodimer (reviewed in ref. 100). *S. aureus* RNase III is capable of recognizing and cleaving a variety of structures such as imperfect duplexes, helices interrupted by bulged residues and loop-loop interaction.¹⁰¹ Besides the well-known function in the maturation of large rRNAs, a recent study shows that the *E. coli* RNase III has a widespread role in cellular mRNA processing and contributes to the turnover of many sRNAs thus affecting indirectly the transcriptome.¹⁰² In *S. aureus*, the enzyme acts as a co-factor of the quorum-sensing dependent RNAIII to coordinate the repression of several mRNA targets encoding protein A, coagulase and the repressor of toxins Rot.^{10,15,101} Binding of RNAIII to its mRNA targets facilitates the decay by RNase III thus rendering the repression irreversible. Given the fact that in Gram-positive bacteria, sRNAs form rather long duplexes with target mRNAs,^{10,103} the role of RNase III in antisense regulation is probably more widespread than previously expected. A recent study based on deep sequencing to analyze short RNA fractions of *S. aureus* has revealed a large collection of 22 nt long RNA fragments generated by RNase III digestion of sense/antisense transcripts all over the chromosome.³² More than 75% of the mRNAs were subjected to specific RNase III processing as a result of antisense regulation. Deletion of RNase III reduced significantly the amount of short RNA fragments and concomitantly accumulation of low levels of antisense transcripts were visualized.³² These data are indicative of antisense transcription all over the genome and this pervasive transcription is hidden due to RNase III processing of sense/antisense transcripts. This activity of RNase III can be considered as an RNA quality control mechanism to remove efficiently transcriptional noise. Interestingly, the involvement of RNase III in this novel post-transcriptional process appears to be restricted to Gram-positive bacteria.³² Moreover, several asRNAs were transcribed in a σ B-dependent manner, and the levels of the sense RNA was regulated accordingly by RNase III.³² Therefore under specific conditions, the levels of asRNAs can reach a threshold concentration so that the mRNA yield can be modulated.³² Besides antisense regulation, this study calls to the question, how many targets can RNase III recognize? Based on in vivo immunoprecipitation of wild type or cleavage-defective mutant RNase III followed by deep sequencing, we have recently identified a large number of RNA targets (Lioliou et al. personal communication). In addition to rRNA processing and mRNA turnover,

the enzyme has been associated with novel functions such as processing of mRNAs with overlapping 5'UTRs, maturation process stabilizing the mRNA, sRNA and asRNA-dependent regulation. Finally, a recent work shows that inactivation of the *rnc* gene in the 8325-4 strain decreased the synthesis of extracellular toxins due to a destabilization of RNAIII and *secY2* mRNA, one component of the accessory secretory pathway.¹⁰⁴ The effect of RNase III on RNAIII levels was not observed in RN6390,¹⁵ but as previously described some significant differences between 8325-4 and RN6390 strains were observed although they originated from the same parental strain.¹⁰⁵ Deletion of *rnc* in 8325-4 strain resulted in a less virulent strain compared with the isogenic wild type strain in a murine peritonitis model¹⁰⁴ while the *rnc* mutant had no effect on cell growth.^{15,104} Taken together, all these studies show that RNase III is a global player of RNA-dependent regulation in *S. aureus*, which has consequences on the regulation of the synthesis of virulence factors.

The impact of other ribonucleases in *S. aureus* pathogenesis and sRNA regulation. Other enzymes than RNase III are also expected to be associated with the sRNA-dependent regulation. In *E. coli*, the endoribonuclease RNase E and the phosphorolytic exoribonuclease PNPase are both required for sRNA-dependent regulation.^{106,107} These two enzymes are part of a multi-enzymatic complex, the so-called degradosome, which also contains the RNA helicase RhlB and the glycolytic enzyme enolase (reviewed in ref. 108). Although there is no homolog of RNase E in Gram-positive bacteria,¹⁰⁹ several enzymes were proposed to be organized into a multi-enzymatic complex in *S. aureus*²⁶ and *B. subtilis*.^{110,111} Using various strategies, networks of interactions have been identified between two glycolytic enzymes (enolase and phosphofruktokinase), the DEAD-box RNA helicase CshA and four RNases, namely RNase J1, RNase J2, RNase Y and PNPase.^{26,110,112} The two *B. subtilis* enzymes RNase J1/J2 are endowed with a dual activity of an endoribonuclease and a 5'-3' exoribonuclease¹¹³ while RNase Y, is the functional equivalent of RNase E and cleaves mRNA at unpaired U/A rich sequences.^{114,115} Hence, *S. aureus* and *B. subtilis* share the same components and three of them (enolase, PNPase, DEAD-box RNA helicase) are also conserved in Gram-negative bacteria. More surprisingly, the protein subunit of RNase P, RnpA, is associated with CshA in *S. aureus* and this interaction takes place in *B. subtilis* too.²⁶ Although the degradosome-like is conserved in Gram-positive bacteria, the interaction networks between the components diverged slightly.²⁶ In *S. aureus*, the two proteins, CshA and enolase, are central since CshA binds to enolase, Pflk, RNase Y, RNase J1 and RnpA while enolase recognizes PNPase, RNase Y and CshA (Fig. 4). However, this work does not provide information on the stoichiometry between the different partners, nor if these interactions happen in the same complex. The interactions might be highly dynamic and sub-populations of the degradosome could occur depending on the subcellular localization of the RNases or of the RNA. It is intriguing that glycolytic enzymes are also part of the degradosome raising the question about the functional links between metabolic enzymes and ribonucleases. The glycolytic enzymes are known to respond to both glycolytic and TCA cycle intermediates, and are thus

sensors of nutritional stress. Hence, it was proposed that they might coordinate the action of RNases under energy limiting conditions.¹¹⁶ Interestingly, functional relationships between metabolic adaptation to nutritional status, mRNA stability regulation and virulence factor production have been well described (Somerville and Proctor, 2009), and at least three RNase components of the degradosome-like may play a role in virulence and stress adaptation, namely PNPase, RNase Y and RpnA.²⁶ Disruption of the *S. aureus pnpA* gene induced a mild change in mRNA turnover, however, cells became sensitive to cold shock.¹² These data suggested that mRNA turnover plays an important role in response to stress and changes of the environmental cues. *S. aureus cvfA* gene encodes RNase Y, which contains a transmembrane domain, a KH RNA-binding domain and a metal-dependent phosphorylase (HD) domain.^{117,118} RNaseY has been first described as an enzyme endowed with a phosphodiesterase activity carrying by its HD domain, which is required for hemolytic activity and virulence in mice and silkworm infection models.¹¹⁸ However, works performed in *B. subtilis*, have shown that RNase Y is an endoribonuclease with a preference for 5' end monophosphorylated mRNA and cleaves unpaired U/A rich sequences in structured regulatory regions of mRNAs such as the SAM-riboswitch.¹¹⁴ Interestingly enough, the localization of RNase Y at the membrane is essential *in vivo* indicating that subcellular localization is required for the turnover of a subset of mRNAs.¹¹⁵ Although the target genes of RNase Y are not yet defined in *S. aureus*, deletion of *cvfA* represses the transcription of the *agr* operon resulting in the repression of exotoxin genes, and in the accumulation of protein A.¹¹⁷ The third protein RpnA, which is the co-factor of RNase P, is an essential protein most likely due to its role in tRNA maturation.¹¹⁹ Unexpectedly RpnA, which adopts an $\alpha\beta$ -fold structure,¹²⁰ exhibits a ribonuclease activity *in vitro* against rRNAs and mRNAs. This activity was not demonstrated *in vivo* although a high number of mRNAs were more stable in *rnpA* deficient cells. A specific compound (RNPA1000), which inhibited the ribonuclease activity of RpnA *in vitro*, was recently selected. It decreased growth of Gram-positive bacteria, prevent biofilm formation and impaired pathogenesis in a murine acute model of *S. aureus* infection.¹²¹ Thus RNA decay machinery appears to be an appropriate target for the design of anti-microbial therapeutics. Considering the development of high throughput methods, one could expect to gain knowledge on the whole set of RNA targets of ribonucleases. This will be of importance in order to get a more complete picture of the complexity of the RNA-dependent regulatory networks and of the role of these enzymes in sRNA regulation in this facultative pathogen.

Perspectives

This review gives a brief glimpse on the functions of some of the regulatory RNAs from *S. aureus*. However, we are still far to get a full appreciation of the sRNA functions and of the complex and intermingled interactions occurring between sRNAs and regulatory proteins to regulate gene expression. The sRNAs for which the functions have been determined show how they

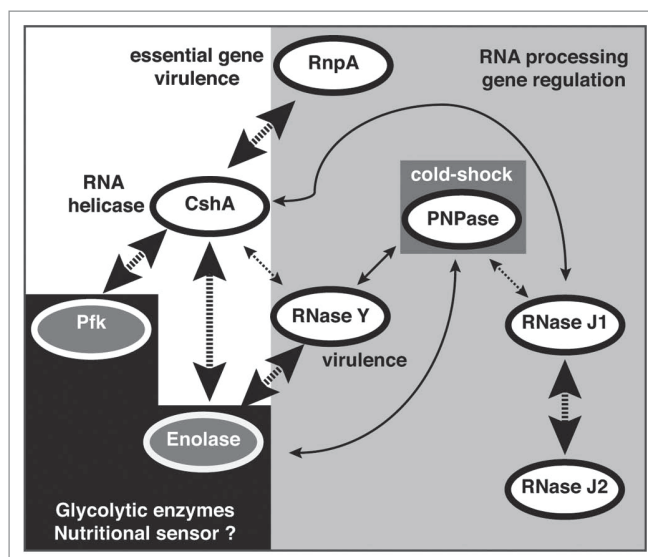


Figure 4. Networks of interactions involving several ribonucleases. The interactions have been demonstrated *in vivo* using the double hybrid approach.²⁶ Thickness of the arrows represents the strength of the interaction. Full arrows represent interactions that are specific of *S. aureus* whereas dashed arrows are for interactions conserved in *S. aureus* and *B. subtilis*. The data are adapted from Roux et al.²⁶ PNPase is for polynucleotide phosphorylase, CshA for DEAD box RNA helicase, Pfk for phosphofructokinase, RnpA for the protein component of RNase P and RNase for Ribonuclease. Specific functions of proteins in virulence, stress response, gene expression and RNA metabolism are given. The different gray colors denote similar functions for the protein partners.

interconnect metabolism, stress adaptation and virulence, and how they mediate crosstalks between pathogenicity islands and the core genome. Deep mechanistic studies show that sRNAs acting as antisense RNA bind to their mRNA targets with very efficient ways that are dependent on designed three-dimensional structures to favor efficient initial contacts followed by rapid propagation of intermolecular base pairings. Thus, the specificity of antisense regulation not only relies on sequence complementarities but also on specific structure motifs of RNAs that prevent or favor the pairings. Continued studies of individual sRNAs and their machineries should certainly unravel unexpected functions and regulatory mechanisms, such as novel cis-acting regulatory elements, sRNA targeting enzymes, sRNA involved in antibiotic resistance.

One major point is the fact that it is difficult to generalize the impact of sRNA regulation in *S. aureus* due to great variability between the strains. For instance, detailed comparison of strains expressing or not Hfq would certainly be of importance to monitor the gain of function. Another challenge is to understand the contribution of *S. aureus* sRNAs in the human context and to gain knowledge about the roles of sRNAs and their co-factors during human colonization and infection.

Note

Several works showed that *Staphylococcus aureus* Hfq failed to substitute *Escherichia coli* Hfq (Vecerek B, Rajkowitsch, L.,

Sonnleitner E., Schroeder R. & Blasi U. The C-terminal domain of *E. coli* Hfq is required for regulation. *Nucleic Acids Research* 2007; 36: 133-143) and *Salmonella typhimurium* Hfq (Rochat T, Bouloc P, Yang Q, Bossi L & Figueroa-Bossi N. Lack of interchangeability of Hfq-like proteins. *Biochimie* 2012; in press) in sRNA-mediated regulation in vivo.”

Acknowledgements

We thank S. Marzi, T. Geissmann, S. Boisset and F. Vandenesch for helpful discussions. The work was supported by the Centre

National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Agence Nationale pour la Recherche (ANR10-Pathogenomics-ARMSA; P.R.), and the labex NetRNA (ANR-10-LABX-36, P.R.). E.L. has received the support of a long-term fellowship from FEBS, C.R. has the support from Région Alsace, “Délégation Générale de l’Armement” DGA and FRM, and D.P. from DGA and CNRS.

References

- Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 1998; 339:520-32; PMID:9709046; <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199808203390806>.
- Kim HK, Thammavongsa V, Schneewind O, Missiakas D. Recurrent infections and immune evasion strategies of *Staphylococcus aureus*. *Curr Opin Microbiol* 2012; 15:92-9; PMID:22088393; <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2011.10.012>.
- Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7:629-41; PMID:19680247; <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2200>.
- Foster TJ, Höök M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 1998; 6:484-8; PMID:10036727; [http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X\(98\)01400-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X(98)01400-0).
- Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13:16-34; PMID:10627489; <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.13.1.16-34.2000>.
- Novick RP. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol* 2003; 48:1429-49; PMID:12791129; <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03526.x>.
- Novick RP, Geisinger E. Quorum sensing in staphylococci. *Annu Rev Genet* 2008; 42:541-64; PMID:18713030; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091640>.
- Wyatt MA, Wang W, Roux CM, Beasley FC, Heinrichs DE, Dunman PM, et al. *Staphylococcus aureus* nonribosomal peptide secondary metabolites regulate virulence. *Science* 2010; 329:294-6; PMID:20522739; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1188888>.
- Morrison JM, Dunman PM. The modulation of *Staphylococcus aureus* mRNA turnover. *Future Microbiol* 2011; 6:1141-50; PMID:22004033; <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.11.102>.
- Boisset S, Geissmann T, Huntzinger E, Fechter P, Bendridi N, Possedko M, et al. *Staphylococcus aureus* RNAIII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism. *Genes Dev* 2007; 21:1353-66; PMID:17545468; <http://dx.doi.org/10.1101/gad.423507>.
- Geisinger E, Adhikari RP, Jin R, Ross HF, Novick RP. Inhibition of rot translation by RNAIII, a key feature of agr function. *Mol Microbiol* 2006; 61:1038-48; PMID:16879652; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05292.x>.
- Anderson KL, Dunman PM. Messenger RNA Turnover Processes in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and Emerging Studies in *Staphylococcus aureus*. *Int J Microbiol* 2009; 2009:525491; PMID:19936110; <http://dx.doi.org/10.1155/2009/525491>.
- Roberts C, Anderson KL, Murphy E, Projan SJ, Mounts W, Hurlburt B, et al. Characterizing the effect of the *Staphylococcus aureus* virulence factor regulator, SarA, on log-phase mRNA half-lives. *J Bacteriol* 2006; 188:2593-603; PMID:16547047; <http://dx.doi.org/10.1128/JB.188.7.2593-603.2006>.
- Novick RP, Ross HF, Projan SJ, Kornblum J, Kreiswirth B, Moghazeh S. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J* 1993; 12:3967-75; PMID:7691599.
- Huntzinger E, Boisset S, Saveanu C, Benito Y, Geissmann T, Namane A, et al. *Staphylococcus aureus* RNAIII and the endoribonuclease III coordinately regulate spa gene expression. *EMBO J* 2005; 24:824-35; PMID:15678100; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7600572>.
- Chevalier C, Boisset S, Romilly C, Masquida B, Fechter P, Geissmann T, et al. *Staphylococcus aureus* RNAIII binds to two distant regions of *coa* mRNA to arrest translation and promote mRNA degradation. *PLoS Pathog* 2010; 6:1000809; PMID:20300607; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000809>.
- Felden B, Vandenesch F, Bouloc P, Romby P. The *Staphylococcus aureus* RNome and its commitment to virulence. *PLoS Pathog* 2011; 7:1002006; PMID:21423670; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002006>.
- Caldelari I, Fechter P, Lioliou E, Romilly C, Chevalier C, Gaspin C, et al. “A Current Overview of Regulatory RNAs in *Staphylococcus aureus*.” In *Regulatory RNAs in Prokaryotes*, edited by Marchfelder A, Hess W, Wien and New York: Wiley Verlag 2011.
- Gottesman S, Storz G. Bacterial small RNA regulators: versatile roles and rapidly evolving variations. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3:3; PMID:20980440; <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a003798>.
- Storz G, Vogel J, Wassarman KM. Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. *Mol Cell* 2011; 43:880-91; PMID:21925377; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.022>.
- Pichon C, Felden B. Small RNA genes expressed from *Staphylococcus aureus* genomic and pathogenicity islands with specific expression among pathogenic strains. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:14249-54; PMID:16183745; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0503838102>.
- Livny J, Teonadi H, Livny M, Waldor MK. High-throughput, kingdom-wide prediction and annotation of bacterial non-coding RNAs. *PLoS One* 2008; 3:3197; PMID:18787707; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0003197>.
- Geissmann T, Chevalier C, Cros MJ, Boisset S, Fechter P, Noirot C, et al. A search for small noncoding RNAs in *Staphylococcus aureus* reveals a conserved sequence motif for regulation. *Nucleic Acids Res* 2009; 37:7239-57; PMID:19786493; <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkp668>.
- Marchais A, Naville M, Bohn C, Bouloc P, Gautheret D. Single-pass classification of all noncoding sequences in a bacterial genome using phylogenetic profiles. *Genome Res* 2009; 19:1084-92; PMID:19237465; <http://dx.doi.org/10.1101/gr.089714.108>.
- Anderson KL, Roberts C, Disz T, Vonstein V, Hwang K, Overbeek R, et al. Characterization of the *Staphylococcus aureus* heat shock, cold shock, stringent and SOS responses and their effects on log-phase mRNA turnover. *J Bacteriol* 2006; 188:6739-56; PMID:16980476; <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00609-06>.
- Roux CM, DeMuth JR, Dunman PM. Characterization of components of the *Staphylococcus aureus* mRNA degradosome holoenzyme-like complex. *J Bacteriol* 2011; 193:5520-6; PMID:21764917; <http://dx.doi.org/10.1128/JB.05485-11>.
- Abu-Qatouseh LF, Chinni SV, Seggewiss J, Proctor RA, Brosius J, Rozhdetsvensky TS, et al. Identification of differentially expressed small RNAs in *Staphylococcus aureus* displaying both the normal and the small-colony variant phenotype. *J Mol Med (Berl)* 2010; 88:565-75; PMID:20151104; <http://dx.doi.org/10.1007/s00109-010-0597-2>.
- Bohn C, Rigoulay C, Chabelskaya S, Sharma CM, Marchais A, Skorski P, et al. Experimental discovery of small RNAs in *Staphylococcus aureus* reveals a riboregulator of central metabolism. *Nucleic Acids Res* 2010; 38:6620-36; PMID:20511587; <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq462>.
- Beaume M, Hernandez D, Farinelli L, Deluen C, Linder P, Gaspin C, et al. Cartography of methicillin-resistant *S. aureus* transcripts: detection, orientation and temporal expression during growth phase and stress conditions. *PLoS One* 2010; 5:10725; PMID:20505759; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0010725>.
- Nielsen JS, Christiansen MH, Bonde M, Gottschalk S, Frees D, Thomsen LE, et al. Searching for small σ B-regulated genes in *Staphylococcus aureus*. *Arch Microbiol* 2011; 193:23-34; PMID:20978742; <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-010-0641-1>.
- Sayed N, Jousselin A, Felden B. A cis-antisense RNA acts in trans in *Staphylococcus aureus* to control translation of a human cytolytic peptide. *Nat Struct Mol Biol* 2012; 19:105-12; PMID:22198463; <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.2193>.
- Lasa I, Toledo-Arana A, Dobin A, Villanueva M, de los Mozos IR, Vergara-Irigaray M, et al. Genome-wide antisense transcription drives mRNA processing in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108:20172-7; PMID:22123973; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1113521108>.
- Breaker RR. Riboswitches: from ancient gene-control systems to modern drug targets. *Future Microbiol* 2009; 4:771-3; PMID:19722830; <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.09.46>.
- Ramesh A, Winkler WC. Magnesium-sensing riboswitches in bacteria. *RNA Biol* 2010; 7:77-83; PMID:20023416; <http://dx.doi.org/10.4161/rna.7.1.10490>.
- Smith AM, Fuchs RT, Grundy FJ, Henkin TM. Riboswitch RNAs: regulation of gene expression by direct monitoring of a physiological signal. *RNA Biol* 2010; 7:104-10; PMID:20061810; <http://dx.doi.org/10.4161/rna.7.1.10757>.
- Narberhaus F. Translational control of bacterial heat shock and virulence genes by temperature-sensing mRNAs. *RNA Biol* 2010; 7:84-9; PMID:20009504; <http://dx.doi.org/10.4161/rna.7.1.10501>.
- Breaker RR. Prospects for riboswitch discovery and analysis. *Mol Cell* 2011; 43:867-79; PMID:21925376; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.024>.

38. Serganov A. The long and the short of riboswitches. *Curr Opin Struct Biol* 2009; 19:251-9; PMID:19303767; <http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2009.02.002>.
39. Serganov A. Determination of riboswitch structures: light at the end of the tunnel? *RNA Biol* 2010; 7:98-103; PMID:20061809; <http://dx.doi.org/10.4161/rna.7.1.10756>.
40. Dambach MD, Winkler WC. Expanding roles for metabolite-sensing regulatory RNAs. *Curr Opin Microbiol* 2009; 12:161-9; PMID:19250859; <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2009.01.012>.
41. Barrick JE, Breaker RR. The distributions, mechanisms and structures of metabolite-binding riboswitches. *Genome Biol* 2007; 8:239; PMID:17997835; <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2007-8-11-r239>.
42. Yao Z, Barrick J, Weinberg Z, Neph S, Breaker R, Tompa M, et al. A computational pipeline for high-throughput discovery of cis-regulatory noncoding RNA in prokaryotes. *PLoS Comput Biol* 2007; 3:126; PMID:17616982; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.0030126>.
43. ten Broeke-Smits NJ, Pronk TE, Jongerius I, Bruning O, Wittink FR, Breit TM, et al. Operon structure of *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res* 2010; 38:3263-74; PMID:20150412; <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq058>.
44. Barrick JE, Corbino KA, Winkler WC, Nahvi A, Mandal M, Collins J, et al. New RNA motifs suggest an expanded scope for riboswitches in bacterial genetic control. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:6421-6; PMID:15096624; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0308014101>.
45. Nechooshtan G, Elgrably-Weiss M, Sheaffer A, Westhof E, Altuvia S. A pH-responsive riboregulator. *Genes Dev* 2009; 23:2650-62; PMID:19933154; <http://dx.doi.org/10.1101/gad.552209>.
46. Weinrick B, Dunman PM, McAleese F, Murphy E, Projan SJ, Fang Y, et al. Effect of mild acid on gene expression in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2004; 186:8407-23; PMID:15576791; <http://dx.doi.org/10.1128/JB.186.24.8407-23.2004>.
47. Winkler WC, Nahvi A, Roth A, Collins JA, Breaker RR. Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. *Nature* 2004; 428:281-6; PMID:15029187; <http://dx.doi.org/10.1038/nature02362>.
48. Klein DJ, Ferré-D'Amaré AR. Structural basis of glmS ribozyme activation by glucosamine-6-phosphate. *Science* 2006; 313:1752-6; PMID:16990543; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1129666>.
49. Cochrane JC, Lipchock SV, Strobel SA. Structural investigation of the GlnS ribozyme bound to its catalytic cofactor. *Chem Biol* 2007; 14:97-105; PMID:17196404; <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.12.005>.
50. Collins JA, Irnov I, Baker S, Winkler WC. Mechanism of mRNA destabilization by the glmS ribozyme. *Genes Dev* 2007; 21:3356-68; PMID:18079181; <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1605307>.
51. André G, Even S, Putzer H, Burguière P, Croux C, Danchin A, et al. S-box and T-box riboswitches and antisense RNA control a sulfur metabolic operon of *Clostridium acetobutylicum*. *Nucleic Acids Res* 2008; 36:5955-69; PMID:18812398; <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkn601>.
52. Loh E, Dussurget O, Gripenland J, Vaitkevicius K, Tiensuu T, Mandin P, et al. A trans-acting riboswitch controls expression of the virulence regulator PrfA in *Listeria monocytogenes*. *Cell* 2009; 139:770-9; PMID:19914169; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.046>.
53. Mulhbach J, St-Pierre P, Lafontaine DA. Therapeutic applications of ribozymes and riboswitches. *Curr Opin Pharmacol* 2010; 10:551-6; PMID:20685165; <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2010.07.002>.
54. Mulhbach J, Brouillette E, Allard M, Fortier LC, Malouin F, Lafontaine DA. Novel riboswitch ligand analogs as selective inhibitors of guanine-related metabolic pathways. *PLoS Pathog* 2010; 6:1000865; PMID:20421948; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000865>.
55. Recsei P, Kreiswirth B, O'Reilly M, Schlievert P, Gruss A, Novick RP. Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by agar. *Mol Gen Genet* 1986; 202:58-61; PMID:3007938; <http://dx.doi.org/10.1007/BF00330517>.
56. Dunman PM, Murphy E, Haney S, Palacios D, Tucker-Kellogg G, Wu S, et al. Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the agr and/or sarA loci. *J Bacteriol* 2001; 183:7341-53; PMID:11717293; <http://dx.doi.org/10.1128/JB.183.24.7341-53.2001>.
57. Queck SY, Jameson-Lee M, Villaruz AE, Bach TH, Khan BA, Sturdevant DE, et al. RNAIII-independent target gene control by the agr quorum-sensing system: insight into the evolution of virulence regulation in *Staphylococcus aureus*. *Mol Cell* 2008; 32:150-8; PMID:18851841; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2008.08.005>.
58. Romby P, Charpentier E. An overview of RNAs with regulatory functions in gram-positive bacteria. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67:217-37; PMID:19859665; <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-009-0162-8>.
59. Morfeldt E, Taylor D, von Gabain A, Arvidson S. Activation of alpha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the trans-encoded antisense RNA, RNAIII. *EMBO J* 1995; 14:4569-77; PMID:7556100.
60. Shimoni Y, Altuvia S, Margalit H, Biham O. Stochastic analysis of the SOS response in *Escherichia coli*. *PLoS One* 2009; 4:5363; PMID:19424504; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0005363>.
61. Beisel CL, Storz G. Discriminating tastes: Physiological contributions of the Hfq-binding small RNA Spot 42 to catabolite repression. *RNA Biol* 2011; 8:8; PMID:21788732; <http://dx.doi.org/10.4161/rna.8.5.16024>.
62. Liu Y, Mu C, Ying X, Li W, Wu N, Dong J, et al. RNAIII activates map expression by forming an RNA-RNA complex in *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett* 2011; 585:899-905; PMID:21349272; <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2011.02.021>.
63. Bohn C, Rigoulay C, Bouloc P. No Detectable Effect of RNA-Binding Protein Hfq Absence in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol* 2007; 7:1-10; PMID:17233889; <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-7-10>.
64. Traber KE, Lee E, Benson S, Corrigan R, Cantera M, Shopsis B, et al. agr function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Microbiology* 2008; 154:2265-74; PMID:18667559; <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.2007/011874-0>.
65. Jelsbak L, Hemmingsen L, Donat S, Ohlsen K, Boye K, Westh H, et al. Growth phase-dependent regulation of the global virulence regulator Rot in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* 2010; 300:229-36; PMID:19665927; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.07.003>.
66. Cassat J, Dunman PM, Murphy E, Projan SJ, Beenken KE, Palm KJ, et al. Transcriptional profiling of a *Staphylococcus aureus* clinical isolate and its isogenic agr and sarA mutants reveals global differences in comparison to the laboratory strain RN6390. *Microbiology* 2006; 152:3075-90; PMID:17005987; <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.29033-0>.
67. Shopsis B, Eaton C, Wasserman GA, Mathema B, Adhikari RP, Agolory S, et al. Mutations in agr do not persist in natural populations of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 2010; 202:1593-9; PMID:20942648; <http://dx.doi.org/10.1086/656915>.
68. Novick RP, Subedi A. The Sapl: mobile pathogenicity islands of *Staphylococcus*. *Chem Immunol Allergy* 2007; 93:42-57; PMID:17369699; <http://dx.doi.org/10.1159/000100857>.
69. Novick RP, Christie GE, Penadés JR. The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8:541-51; PMID:20634809; <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2393>.
70. Otto M. *Staphylococcus aureus* toxin gene hitchhikes on a transferable antibiotic resistance element. *Virulence* 2010; 1:49-51; PMID:21178414; <http://dx.doi.org/10.4161/viru.1.1.10453>.
71. Wagner EG, Altuvia S, Romby P. Antisense RNAs in bacteria and their genetic elements. *Adv Genet* 2002; 46:361-98; PMID:11931231; [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2660\(02\)46013-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2660(02)46013-0).
72. Brantl S. Regulatory mechanisms employed by cis-encoded antisense RNAs. *Curr Opin Microbiol* 2007; 10:102-9; PMID:17387036; <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2007.03.012>.
73. Novick RP, Jordanescu S, Projan SJ, Kornblum J, Edelman I. pT181 plasmid replication is regulated by a countertranscript-driven transcriptional attenuator. *Cell* 1989; 59:395-404; PMID:2478296; [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90300-0](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(89)90300-0).
74. Queck SY, Khan BA, Wang R, Bach TH, Kretschmer D, Chen L, et al. Mobile genetic element-encoded cytotoxin connects virulence to methicillin resistance in MRSA. *PLoS Pathog* 2009; 5:1000533; PMID:19649313; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000533>.
75. Kaito C, Saito Y, Nagano G, Ikuo M, Omae Y, Hanada Y, et al. Transcription and translation products of the cytotoxin gene psm-mec on the mobile genetic element SCCmec regulate *Staphylococcus aureus* virulence. *PLoS Pathog* 2011; 7:1001267; PMID:21304931; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1001267>.
76. Chabelskaya S, Gaillot O, Felden B. A *Staphylococcus aureus* small RNA is required for bacterial virulence and regulates the expression of an immune-evasion molecule. *PLoS Pathog* 2010; 6:1000927; PMID:20532214; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000927>.
77. Fozo EM, Makarova KS, Shabalina SA, Yutin N, Koonin EV, Storz G. Abundance of type I toxin-antitoxin systems in bacteria: searches for new candidates and discovery of novel families. *Nucleic Acids Res* 2010; 38:3743-59; PMID:20156992; <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq054>.
78. Vogel J. An RNA trap helps bacteria get the most out of chitosugars. *Mol Microbiol* 2009; 73:737-41; PMID:19659640; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06806.x>.
79. Jester B, Romby P, Liolieu E. When Ribonucleases Come Into Play in Pathogens: A Survey of Gram-Positive Bacteria. *Int J Microbiol* 2012; In press; <http://dx.doi.org/10.1155/2012/592196>.
80. Vogel J, Luisi BF. Hfq and its constellation of RNA. *Nat Rev Microbiol* 2011; 9:578-89; PMID:21760622; <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2615>.
81. Sitka A, Lucchini S, Papenfort K, Sharma CM, Rolle K, Binnewies TT, et al. Deep sequencing analysis of small noncoding RNA and mRNA targets of the global post-transcriptional regulator, Hfq. *PLoS Genet* 2008; 4:1000163; PMID:18725932; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1000163>.
82. Zhang A, Wassarman KM, Rosenow C, Tjaden BC, Storz G, Gottesman S. Global analysis of small RNA and mRNA targets of Hfq. *Mol Microbiol* 2003; 50:1111-24; PMID:14622403; <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03734.x>.
83. Rabbi M, Espéli O, Schwartz A, Cayrol B, Rahmouni AR, Arluisson V, et al. The Sm-like RNA chaperone Hfq mediates transcription antitermination at Rho-dependent terminators. *EMBO J* 2011; 30:2805-16; PMID:21673658; <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2011.192>.
84. Schumacher MA, Pearson RF, Møller T, Valentini-Hansen P, Brennan RG. Structures of the pleiotropic translational regulator Hfq and an Hfq-RNA complex: a bacterial Sm-like protein. *EMBO J* 2002; 21:3546-56; PMID:12093755; <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/cdf322>.

85. Sauter C, Basquin J, Suck D. Sm-like proteins in Eubacteria: the crystal structure of the Hfq protein from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 2003; 31:4091-8; PMID:12853626; <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkg480>.
86. Link TM, Valentin-Hansen P, Brennan RG. Structure of *Escherichia coli* Hfq bound to polyribadenylate RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106:19292-7; PMID:19889981; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0908744106>.
87. Brennan RG, Link TM. Hfq structure, function and ligand binding. *Curr Opin Microbiol* 2007; 10:125-33; PMID:17395525; <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2007.03.015>.
88. Otaka H, Ishikawa H, Morita T, Aiba H, Poly U. PolyU tail of rho-independent terminator of bacterial small RNAs is essential for Hfq action. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108:13059-64; PMID:21788484; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1107050108>.
89. Sauer E, Weichenrieder O. Structural basis for RNA 3'-end recognition by Hfq. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108:13065-70; PMID:21737752; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1103420108>.
90. Chao Y, Vogel J. The role of Hfq in bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol* 2010; 13:24-33; PMID:20080057; <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2010.01.001>.
91. Jousselin A, Metzinger L, Felden B. On the facultative requirement of the bacterial RNA chaperone, Hfq. *Trends Microbiol* 2009; 17:399-405; PMID:19733080; <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2009.06.003>.
92. Liu Y, Wu N, Dong J, Gao Y, Zhang X, Mu C, et al. Hfq is a global regulator that controls the pathogenicity of *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 2010; 5:5; PMID:20927372.
93. Castro SL, Nelman-Gonzalez M, Nickerson CA, Ott CM. Induction of attachment-independent biofilm formation and repression of Hfq expression by low-fluid-shear culture of *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77:6368-78; PMID:21803898; <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00175-11>.
94. Pandey SP, Minesinger BK, Kumar J, Walker GC. A highly conserved protein of unknown function in *Sinorhizobium meliloti* affects sRNA regulation similar to Hfq. *Nucleic Acids Res* 2011; 39:4691-708; PMID:21325267; <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr060>.
95. Davies BW, Köhrer C, Jacob AI, Simmons LA, Zhu J, Aleman LM, et al. Role of *Escherichia coli* YbeY, a highly conserved protein, in rRNA processing. *Mol Microbiol* 2010; 78:506-18; PMID:20807199; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07351.x>.
96. Rasouly A, Davidovich C, Ron EZ. The heat shock protein YbeY is required for optimal activity of the 30S ribosomal subunit. *J Bacteriol* 2010; 192:4592-6; PMID:20639334; <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00448-10>.
97. Boland A, Tritschler F, Heimstädt S, Izaurralde E, Weichenrieder O. Crystal structure and ligand binding of the MID domain of a eukaryotic Argonaute protein. *EMBO Rep* 2010; 11:522-7; PMID:20539312; <http://dx.doi.org/10.1038/embor.2010.81>.
98. Gaballa A, Antelmann H, Aguilar C, Khakh SK, Song KB, Smaldone GT, et al. The *Bacillus subtilis* iron-sparing response is mediated by a Fur-regulated small RNA and three small, basic proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:11927-32; PMID:18697947; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0711752105>.
99. MacRae IJ, Doudna JA. Ribonuclease revisited: structural insights into ribonuclease III family enzymes. *Curr Opin Struct Biol* 2007; 17:138-45; PMID:17194582; <http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2006.12.002>.
100. Condon C, Bechhofer DH. Regulated RNA stability in the Gram positives. *Curr Opin Microbiol* 2011; 14:148-54; PMID:21334965; <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2011.01.010>.
101. Chevalier C, Huntzinger E, Fechter P, Boisset S, Vandenesch F, Romby P, et al. *Staphylococcus aureus* endoribonuclease III purification and properties. *Methods Enzymol* 2008; 447:309-27; PMID:19161850; [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)02216-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(08)02216-7).
102. Stead MB, Marshburn S, Mohanty BK, Mitra J, Pena Castillo L, Ray D, et al. Analysis of *Escherichia coli* RNase E and RNase III activity in vivo using tiling microarrays. *Nucleic Acids Res* 2011; 39:3188-203; PMID:21149258; <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq1242>.
103. Mandin P, Repoila F, Vergassola M, Geissmann T, Cossart P. Identification of new noncoding RNAs in *Listeria monocytogenes* and prediction of mRNA targets. *Nucleic Acids Res* 2007; 35:962-74; PMID:17259222; <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkl1096>.
104. Liu Y, Dong J, Wu N, Gao Y, Zhang X, Mu C, et al. The production of extracellular proteins is regulated by ribonuclease III via two different pathways in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 2011; 6:20554; PMID:21655230; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0020554>.
105. Peng HL, Novick RP, Kreiswirth B, Kornblum J, Schlievert P. Cloning, characterization and sequencing of an accessory gene regulator (agr) in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1988; 170:4365-72; PMID:2457579.
106. Massé E, Escorcía FE, Gottesman S. Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 2003; 17:2374-83; PMID:12975324; <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1127103>.
107. De Lay N, Gottesman S. Role of polynucleotide phosphorylase in sRNA function in *Escherichia coli*. *RNA* 2011; 17:1172-89; PMID:21527671; <http://dx.doi.org/10.1261/rna.2531211>.
108. Marcaida MJ, DePristo MA, Chandran V, Carpousis AJ, Luisi BF. The RNA degradosome: life in the fast lane of adaptive molecular evolution. *Trends Biochem Sci* 2006; 31:359-65; PMID:16766188; <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2006.05.005>.
109. Condon C, Putzer H. The phylogenetic distribution of bacterial ribonucleases. *Nucleic Acids Res* 2002; 30:5339-46; PMID:12490701; <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkf691>.
110. Commichau FM, Rothe FM, Herzberg C, Wagner E, Hellwig D, Lehnik-Habrink M, et al. Novel activities of glycolytic enzymes in *Bacillus subtilis*: interactions with essential proteins involved in mRNA processing. *Mol Cell Proteomics* 2009; 8:1350-60; PMID:19193632; <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M800546-MCP200>.
111. Herzberg C, Weidinger LA, Dörbecker B, Hübner S, Stülke J, Commichau FM. SPINE: a method for the rapid detection and analysis of protein-protein interactions in vivo. *Proteomics* 2007; 7:4032-5; PMID:17994626; <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200700491>.
112. Lehnik-Habrink M, Pfortner H, Rempeters L, Pietack N, Herzberg C, Stülke J. The RNA degradosome in *Bacillus subtilis*: identification of CshA as the major RNA helicase in the multiprotein complex. *Mol Microbiol* 2010; PMID:20572937; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07264.x>.
113. Mathy N, Bénard L, Pellegrini O, Daou R, Wen T, Condon C. 5'-to-3' exoribonuclease activity in bacteria: role of RNase J1 in rRNA maturation and 5' stability of mRNA. *Cell* 2007; 129:681-92; PMID:17512403; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.051>.
114. Shabbabian K, Jamali A, Zig L, Putzer H, RNase Y, a novel endoribonuclease, initiates riboswitch turnover in *Bacillus subtilis*. *EMBO J* 2009; 28:3523-33; PMID:19779461; <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2009.283>.
115. Lehnik-Habrink M, Newman J, Rothe FM, Solovyova AS, Rodrigues C, Herzberg C, et al. RNase Y in *Bacillus subtilis*: a Natively disordered protein that is the functional equivalent of RNase E from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2011; 193:5431-41; PMID:21803996; <http://dx.doi.org/10.1128/JB.05500-11>.
116. Carpousis AJ. The RNA degradosome of *Escherichia coli*: an mRNA-degrading machine assembled on RNase E. *Annu Rev Microbiol* 2007; 61:71-87; PMID:17447862; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093440>.
117. Kaito C, Kurokawa K, Matsumoto Y, Terao Y, Kawabata S, Hamada S, et al. Silkworm pathogenic bacteria infection model for identification of novel virulence genes. *Mol Microbiol* 2005; 56:934-44; PMID:15853881; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04596.x>.
118. Nagata M, Kaito C, Sekimizu K. Phosphodiesterase activity of CvfA is required for virulence in *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 2008; 283:2176-84; PMID:17951247; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M705309200>.
119. Ji Y, Zhang B, Van SE, Horn, Warren P, Woodnutt G, et al. Identification of critical staphylococcal genes using conditional phenotypes generated by antisense RNA. *Science* 2001; 293:2266-9; PMID:11567142; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1063566>.
120. Spitzfaden C, Nicholson N, Jones JJ, Guth S, Lehr R, Prescott CD, et al. The structure of ribonuclease P protein from *Staphylococcus aureus* reveals a unique binding site for single-stranded RNA. *J Mol Biol* 2000; 295:105-15; PMID:10623511; <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1999.3341>.
121. Olson PD, Kuechenmeister LJ, Anderson KL, Daily S, Beenken KE, Roux CM, et al. Small molecule inhibitors of *Staphylococcus aureus* RnpA alter cellular mRNA turnover, exhibit antimicrobial activity and attenuate pathogenesis. *PLoS Pathog* 2011; 7:1001287; PMID:21347352; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1001287>.

A method map changes in bacterial surface composition induced by regulatory RNAs in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

Hamman P., Parmentier D., Cerciat M., Reimegard J., Helfer AC., Boisset S., Guillier M., Vandenesch F., Wagner EG., Romby P., Fechter P.

Nous avons développé une méthode de visualisation des protéines localisées à la surface bactérienne, qui permet de suivre les effets d'ARN régulateurs spécifiques sur sa composition. Cette méthode implique un marquage direct des protéines de surface sur les bactéries vivantes grâce à des fluorophores, puis une séparation des extraits bruts par électrophorèse sur gel 2D. Cette stratégie permet un enrichissement des protéines de surface par rapport aux protéines cytoplasmiques. Nous avons validé cette méthode en suivant l'effet de l'ARN régulateur MicA d'*E.coli*, qui régule la synthèse de plusieurs protéines de membranes et nous avons mis en évidence le rôle de l'ARNIII de *S. aureus* dans le maintien de l'intégrité de la paroi cellulaire. Mon rôle dans le développement de cette technique a été de contrôler l'interaction de l'ARN régulateur MicA avec ses cibles par des expériences de gel retard.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi

Short communication

A method to map changes in bacterial surface composition induced by regulatory RNAs in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

Philippe Hammann^a, Delphine Parmentier^b, Marie Cerciati^b, Johan Reimegård^c, Anne-Catherine Helfer^b, Sandrine Boisset^{d,1}, Maude Guillier^e, François Vandenesch^d, E. Gerhart H. Wagner^c, Pascale Romby^b, Pierre Fechter^{b,*}

^a Esplanade Proteomic Platform, Université de Strasbourg, CNRS, IBMC, 15 Rue René Descartes, F-67084 Strasbourg, France

^b Architecture et Réactivité de l'ARN, Université de Strasbourg, CNRS, IBMC, 15 rue René Descartes, F-67084 Strasbourg, France

^c Department of Cell & Molecular Biology, Uppsala University, Biomedical Center, Box 596, S-75124 Uppsala, Sweden

^d CIRI, International Center for Infectiology Research, Université de Lyon, Inserm U1111, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, UMR5308, Hospices Civils de Lyon, F-69008 Lyon, France

^e FRE3630 CNRS, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Institut de Biologie Physico-Chimique, F-75005 Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 January 2014

Accepted 10 July 2014

Available online xxx

Keywords:

Non-coding RNAs

DIGE

Surface proteins

Post-transcriptional regulation

ABSTRACT

We have adapted a method to map cell surface proteins and to monitor the effect of specific regulatory RNAs on the surface composition of the bacteria. This method involves direct labeling of surface proteins of living bacteria using fluorescent dyes and a subsequent separation of the crude extract by 2D gel electrophoresis. The strategy yields a substantial enrichment in surface proteins over cytoplasmic proteins. We validated this method by monitoring the effect of the regulatory RNA MicA in *Escherichia coli*, which regulates the synthesis of several outer membrane proteins, and highlighted the role of *Staphylococcus aureus* RNAlII for the maintenance of cell wall integrity.

© 2014 The Authors. Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

1. Introduction

Bacteria interact constantly with their environment via surface-associated proteins to fulfill a range of functions including adhesion, environmental sensing, and nutrient transport. A major drawback in studies of surface proteins is their difficulty of extraction. Different tools have been employed to enrich membrane fractions, but none are able to give a full map of membrane proteins, due to difficulty of experimental conditions settings, contamination or significant loss of these proteins through fractionation [1–3].

Here we have adapted a method that allows specific labeling of exposed lysine residues of surface proteins from living bacteria followed by 2D gel electrophoresis [4,5]. This method was applied to *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to follow the dynamics of cell surface composition that could be controlled by the expression of regulatory RNAs. We have analyzed two RNAs that are

known to modify the surface properties of the bacteria in order to respond to environmental conditions or to escape the host-defense mechanisms. In *E. coli*, the sigma E-induced MicA senses envelope stress and represses the synthesis of several outer membrane proteins (OmpA, OmpX, LamB, OmpW, Tsx), and of the response regulatory protein PhoP [6–8], while in *S. aureus*, the multiple-target regulatory RNAlII controls the switch between the expression of surface proteins and excreted toxins [9,10]. Both RNAs regulate gene expression at the post-transcriptional level by binding in the 5' region of mRNA targets. The results reported show that the method is suitable to gain insights into cell envelope composition and its dynamics upon a variety of experimental conditions.

2. Methods

The *E. coli* strain MC4100 was transformed with a plasmid derived from PZE12-luc, either lacking insert (as control) or expressing wild-type MicA (Table S1), and was grown at 37 °C in LB medium supplemented with ampicillin until late exponential phase (OD = 1). *S. aureus* RN6390 strain, derived from NCTC8325, and the isogenic LUG950 strain (deletion of *rnaIII* gene, $\Delta rnaIII$, see

* Corresponding author. Tel./fax: +33 388417149, +33 388602218.

E-mail address: p.fechter@ibmc-cnrs.unistra.fr (P. Fechter).

¹ Present address: Département des Agents Infectieux, CHU de Grenoble, CS 10217, F-38 043 Grenoble Cedex 9, France.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2014.07.011>

0300-9084/© 2014 The Authors. Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

Please cite this article in press as: P. Hammann, et al., A method to map changes in bacterial surface composition induced by regulatory RNAs in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *Biochimie* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2014.07.011>

Table S1) were grown in BHI medium until late exponential phase (OD = 5).

Cells from 10 ml (*E. coli*) or 2.5 ml of culture (*S. aureus*) were centrifuged at 4500 g at 4 °C, washed twice with 1 ml of PBS buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄, pH 8) and resuspended in 200 µl of the PBS buffer. The Cy Dyes 2, 3 and 5 were prepared freshly in anhydrous dimethylformamide. Accessible lysines of cell surface proteins were labeled with 200 pmol of Cy Dye for 30 min at 4 °C in the dark, and the reaction was stopped by the addition of 20 µl of 10 mM lysine for 10 min at 4 °C. Cells were pelleted by centrifugation at 12,000 g for 1 min.

E. coli cells were disrupted by the addition of 1 ml of Trizol for 5 min at 20 °C. 100 µl of 1-bromo 3-chloropropane chloroform was added to the samples, incubated for 5 min at 20 °C and centrifuged for 10 min at 12,000 g. Cold ethanol (200 µl) was added to the pink phase and the samples were incubated for 5 min at 20 °C, and centrifuged for 5 min at 2000 g. Proteins from the supernatant were precipitated with 7 volumes of cold acetone for at least 2 h at –20 °C. Disruption of *S. aureus* cells was achieved by 30 min incubation at 37 °C in 200 µl of lysis buffer (10 mM Tris–HCl pH 7.5, 20 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 50 µg/ml lysostaphin, protease inhibitors cocktail (Roche), 2 U of DNase, and 2 U of RNase). Proteins were dissolved in the 2D buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 50 mM DTT, 4% CHAPS) in a total volume of 400 µl. Protein concentration was measured using the Bio-Rad Bradford assay and 300 µg of total protein extract was used for 2D gel fractionation.

2D gel analyses were carried out according to the manufacturer's recommendations (Biorad). After electrophoresis, gels were scanned on a DIGE imager (GE Healthcare) and stained with

colloidal blue to visualize the whole set of proteins. Statistical analysis of protein variation was performed for at least two independent replicates. After scanning, the data were analyzed with PDQuest software (Biorad). Protein spots were excised from 2D-gels, trypsin digested, and MALDI mass spectroscopy was carried out on an Autoflex III (Bruker-Daltonik GmbH, Germany) matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer (MALDI-TOF) used in reflector positive mode. Experimental details are given in the [Supplementary Information](#).

3. Results and discussion

3.1. The three Cy-Dyes differentially label surface proteins on living cells

Two previous studies in human [4] and *Legionella pneumophila* [5] have shown that the three Cy Dyes specifically label membrane proteins. However, using two complementary approaches we have verified that the three dyes did not efficiently penetrate into the Gram-negative *E. coli* and the Gram-positive *S. aureus* cells ([Supplementary Information](#)). Cy Dye labeled bacteria submitted to imaging with a Zeiss LSM780 laser scanning confocal microscope reproducibly showed that the fluorescence accumulated predominantly at the periphery of the bacteria ([Figure S1A](#)). Consistently, the Cy Dye labeling was more efficient on membrane-enriched protein fractions than on cytoplasmic protein fractions ([Figure S1B](#), see [Supplementary Information](#)). All in all, these data strongly suggested that the Cy Dyes penetrate only poorly in *E. coli* or *S. aureus* live cells.

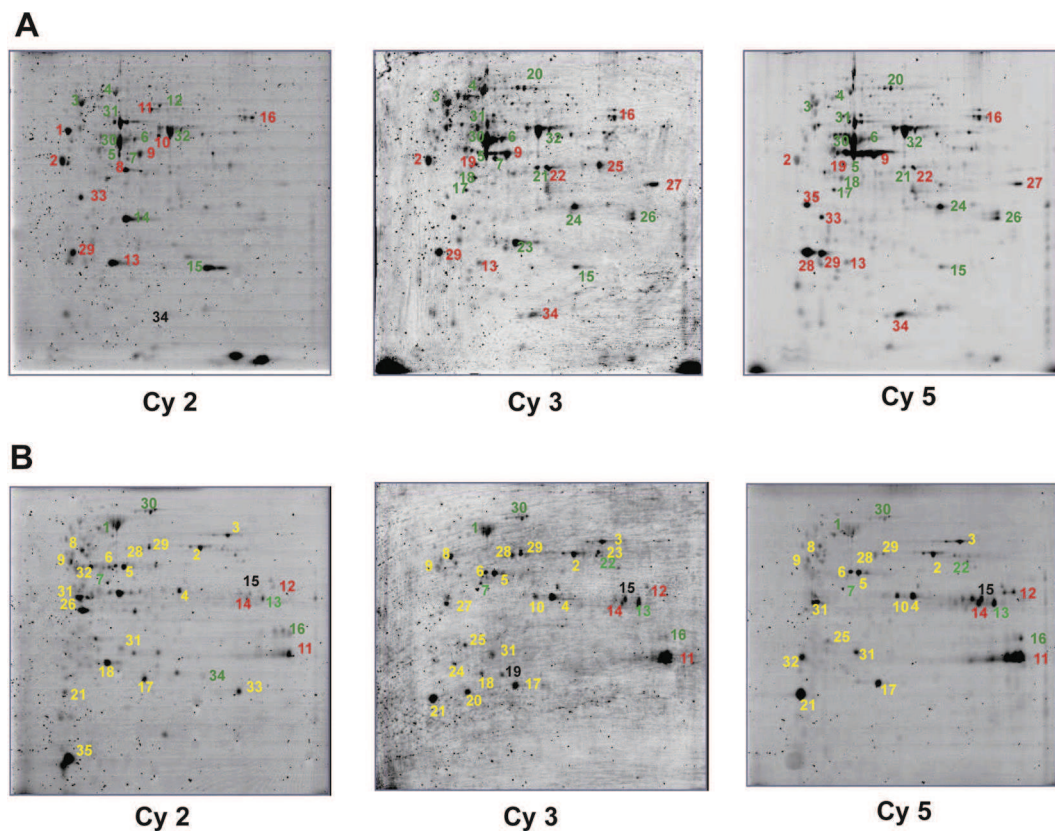


Fig. 1. Labeling of the surface proteins in living *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* cells. (A, B) Two-dimensional gel fractionation of Cy Dye labeled proteins from *E. coli* (A) and *S. aureus* (B) were performed. Labeling was done with cyanine 2, 3 and 5 (Cy 2, Cy 3 and Cy 5, respectively). All spots corresponding to membrane proteins and cell surface proteins are numbered in red while the spots corresponding to cytoplasmic proteins are in green. Spots numbered in yellow color corresponded to *S. aureus* proteins found in different compartments of the cells as demonstrated from a quantitative proteomic analysis [1]. The program Psort (psort.hgc.jp) was used to predict the localization of *S. aureus* proteins. For more details, the identity of the proteins and their localization are given in [Tables S2 and S3](#).

A comparative analysis of the target proteins labeled by the three fluorophores was then performed. Live *E. coli* and *S. aureus* cells were treated separately with each of the three Cy Dyes. After labeling, the cells were collected by low-speed centrifugation to remove excess of unbound dye. Analysis of the supernatant showed that it contained less than 3% of the total proteins from the samples, thus confirming that the labeling protocol did not cause extensive lysis of the cells. The samples were submitted to 2D gel electrophoresis and subsequently scanned to visualize the fluorescent proteins, which were then identified by MALDI-TOF (Fig. 1). For *E. coli*, the data showed a significant enrichment in membrane proteins over cytoplasmic proteins (Figure S1, Table S2). For *S. aureus*, among the labeled proteins, only 20% of them were

predicted to be located in the membrane (Table S3). A quantitative proteome of *S. aureus* COL strain [1] revealed that many proteins with a cytoplasmic location were also found temporary or permanently associated with the membrane sub-fractions (Fig. 1, Table S3). Because the Cy Dyes penetrate poorly in *S. aureus* (Figure S1), it might be possible that these proteins are transiently located at the membrane, as it is the case for several enzymes involved in the respiration (Table S3). Rather unexpectedly, we found that the three Cy Dyes displayed differential labeling properties (Fig. 1) although we did not find specific signatures for each Cy Dye (outer/inner membrane proteins). These variations most likely reflect subtle differences in their structures because the three Cy Dyes gave comparable labeling efficiencies when proteins from

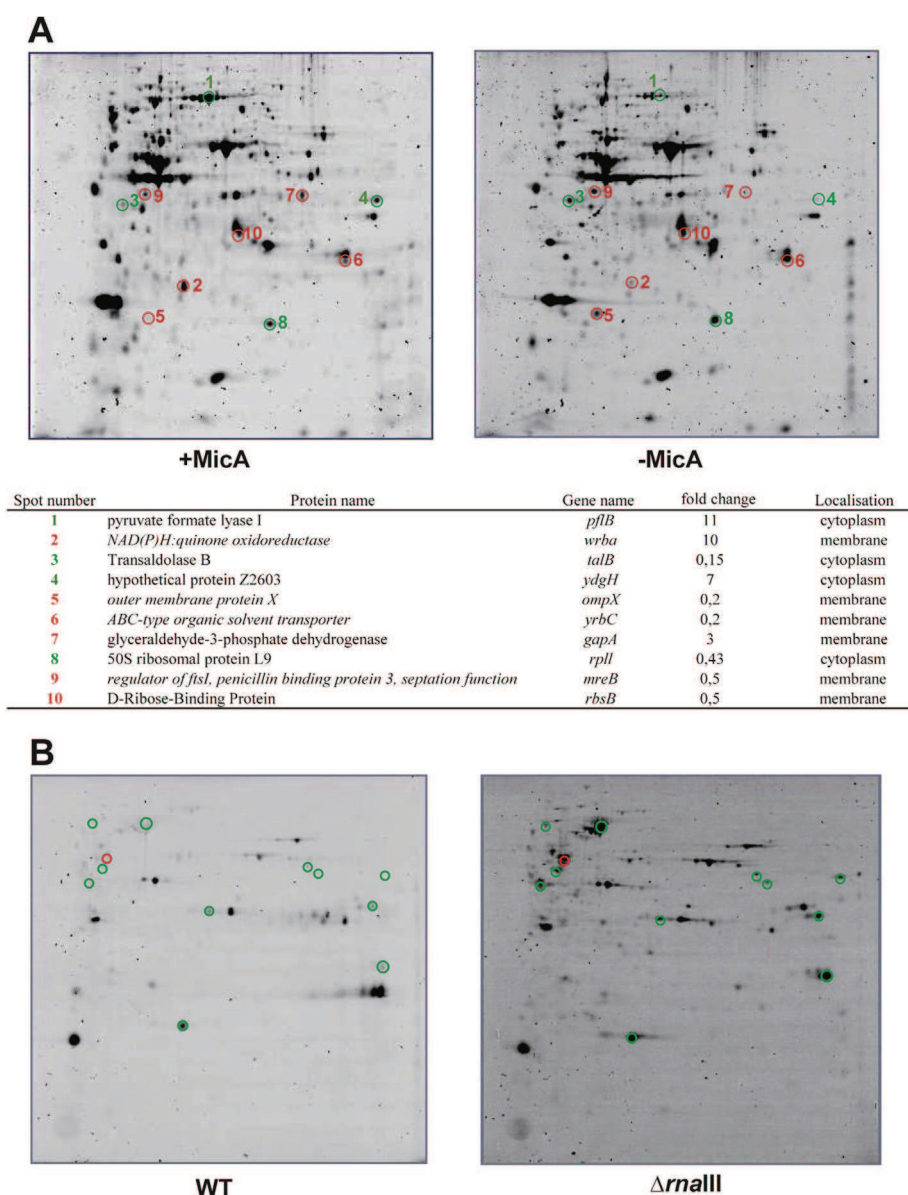


Fig. 2. Effect of regulatory RNA expression on the surface protein patterns in *E. coli* and *S. aureus*. (A) Two-dimensional gel electrophoresis of Cy Dye 5 labeled proteins from the *E. coli* wild-type strain expressing high levels of MicA (+MicA; overproduction of MicA encoded on a plasmid) and from the same strain expressing low levels of MicA (-MicA; chromosomal level of MicA expression). The difference in MicA expression is shown in Figure S2. Cytoplasmic proteins are circled in green and membrane proteins are in red. The names of the proteins and their corresponding genes are given in the table. The quantification (fold change) represents the ratio of protein yield obtained from the wild-type strain expressing high levels of MicA from a plasmid over that of wild-type strain. The data were reproducibly found in three independent experiments. We have only considered the effects above 2-fold. (B) Two-dimensional gel electrophoresis of Cy 5 labeled proteins from *S. aureus* wild-type (WT) strain expressing high levels of RNAIII and the isogenic LUG950 strain deleted of the *rnalIII* gene (Δ rnalIII). The green spots correspond to cytoplasmic proteins that are predominantly observed in the Δ rnalIII mutant strain, and only protein A is shown in red. Other details are given in Figure S3.

crude extracts were treated under denaturing conditions, typically in buffers containing urea or detergent (results not shown). Therefore, it is of importance to perform comparative proteomics on living cells with the same Cy Dye. Although the approach is sensitive, several outer membrane proteins such as OmpA in *E. coli* were not detected (Table S2). The most likely explanation is the inaccessibility of lysine residues of OmpA to the dyes. Indeed, the crystal structure of OmpA has revealed that only one lysine could be exposed at the surface of the cell [11].

3.2. The Cy dye labeling method can map changes of the cell surface

In the following experiments, Cy 5 was used for differential proteomics analysis, because we observed that slightly more membrane proteins were labeled with this dye (Fig. 1; Tables S2 and S3). The cell surface proteomes were analyzed for wild-type *E. coli* cells expressing low levels of MicA and for the same strain expressing high levels of MicA from a multicopy plasmid. Ten proteins with altered yields were reproducibly observed (Fig. 2(A)). Six of them are known to be anchored to membranes (YdgH, OmpX, YrbC/MlaC, RbsB, GapA, and WrbA) or associated with membrane proteins (MreB), while the others (PflB, and TalB) are presumed to be cytoplasmic. Because MicA regulates translation and degradation of mRNA targets by binding to their 5' untranslated regions, we analyzed by Northern blot experiments the levels of several mRNAs (*ompX*, *yrbC/mlaC*, *mreB*, and *wrbA*) that were activated (*wrbA*) or repressed (*ompX*, *yrbC/mlaC*, *mreB*) by MicA at the post-transcriptional level (Figure S2A). These experiments showed that the steady state levels of the mRNAs correlated well with the proteomic data (Fig. 2, S2A). We then searched for putative base-pairings between MicA and the mRNAs whose expression was affected by high MicA expression. Besides the known *ompX/ompA* mRNA targets, basepairing interactions were predicted for the 5' tail of MicA with *mreB* mRNA and *yrbE/mlaE* mRNA, which lies in the same operon as *yrbC/mlaC* (Figure S2B–D). Notably, Hfq, the co-factor of many sRNAs in *E. coli*, has been shown to repress the expression of *mreB* at the post-transcriptional level [12]. However, a translational reporter assay performed with the leader region of *mreB* fused to *lacZ* did not show any effect of MicA on protein synthesis (Figure S2C) while a slight but specific repression of MicA on YrbE/MlaE-LacZ synthesis was observed only in cells grown until OD 0.3 (Figure S2D). As a positive control, we showed that MicA strongly repressed the synthesis of OmpX-LacZ under identical experimental conditions (Figure S2B). These data suggested that some of the MicA-dependent effects observed in this study might be indirect (see discussion in Supplementary Information). However, the reporter gene constructs are different from the genomic context of *mreB* and *yrbE/mlaE*, and we do not exclude that the selected regulatory regions are only partial. Interestingly, the *yrb/mla* operon is the ABC transport system that preserves lipid asymmetry in the Gram-negative outer membrane particularly in stressed cells [13]. Hence, MicA might contribute to maintain the lipid asymmetry under membrane stress conditions.

The same approach was performed on the *S. aureus* strain RN6390 and its isogenic Δ rnalIII derivative strain (Fig. 2(B)). The data revealed that the synthesis of protein A, a major cell-surface protein involved in adhesion and innate immune evasion, is repressed by RNAIII in agreement with previous observations that RNAIII binds to *spa* mRNA to inhibit translation [14]. In addition, the levels of several transporters were significantly decreased by RNAIII (Figure S3A). Surprisingly, several enzymes involved in the metabolism, likely localized in the cytoplasm, were found in the Δ rnalIII mutant strain, although these proteins did not vary significantly between both strains in total protein extracts (result not shown). These data suggested that the absence of RNAIII

rendered the membrane more permeable to the dye although significant lysis of bacteria was not observed. This is consistent with the fact that the synthesis of several peptidoglycan hydrolases (LytM, Sa2353) is repressed by RNAIII in late exponential growth [15]. Thus, we propose that the absence of RNAIII induces an overproduction of these enzymes, modifying the remodeling of the peptidoglycan and the physical properties of the cell wall.

In conclusion, direct labeling of cell surface/membrane proteins is a sensitive approach to monitor changes of the cell envelope composition governed by regulatory RNAs. The method can easily be applied to monitor the effect of other types of regulators (proteins, metabolites) and to follow dynamical properties of the membranes in response to stress and varying environmental conditions.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgments

We thank Jérôme Mutterer from the Microscopy and Imaging Platform (IBMP, CNRS, Strasbourg) for help in image acquisition. We also thank Prof. E. Westhof for helpful discussions and constant support, and E. Lioliou for discussions. This project used equipment facilities provided by the IBMC proteomics platform (Strasbourg). This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS; PR) and the Institut National pour la Recherche Médicale (INSERM; FV). This work has been published under the framework of the LABEX: ANR-10-LABX-0036-NETRNA (PR) and benefits from a funding from the state managed by the French National Research Agency as part of the Investments for the future program.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2014.07.011>.

References

- [1] D. Becher, K. Hempel, S. Sievers, D. Zuhlke, J. Pane-Farre, A. Otto, S. Fuchs, D. Albrecht, J. Bernhardt, A proteomic view of an important human pathogen-towards the quantification of the entire *Staphylococcus aureus* proteome, *PLoS One* 4 (2009) e8176.
- [2] N. Sabarth, S. Lamer, U. Zimny-Arndt, P.R. Jungblut, T.F. Meyer, D. Bumann, Identification of surface proteins of *Helicobacter pylori* by selective biotinylation, affinity purification, and two-dimensional gel electrophoresis, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 27896–27902.
- [3] M. Ythier, G. Resch, P. Waridel, A. Panchaud, A. Gfeller, P. Majcherczyk, M. Quadroni, P. Moreillon, Proteomic and transcriptomic profiling of *Staphylococcus aureus* surface LPXTG-proteins: correlation with *agr* genotypes and adherence phenotypes, *Mol. Cell. Proteomics* 11 (2012) 1123–1139.
- [4] C. Mayrhofer, S. Krieger, G. Allmaier, D. Kerjaschki, DIGE compatible labeling of surface proteins on vital cells *in vitro* and *in vivo*, *Proteomics* 6 (2006) 579–585.
- [5] A. Khemiri, A. Galland, D. Vaudry, P. Chan Tchi Song, H. Vaudry, T. Jouenne, P. Cosette, Outer-membrane proteomic maps and surface-exposed proteins of *Legionella pneumophila* using cellular fractionation and fluorescent labeling, *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 1861–1871.
- [6] K.I. Udekwe, F. Darfeuille, J. Vogel, J. Reimegard, E. Holmqvist, E.G.H. Wagner, Hfq-dependent regulation of OmpA synthesis is mediated by an antisense RNA, *Genes. Dev.* 19 (2006) 2355–2366.
- [7] A. Coornaert, A. Lu, P. Mandin, M. Springer, S. Gottesman, M. Guillier, MicA sRNA links the PhoP regulon to cell envelope stress, *Mol. Microbiol.* 76 (2010) 467–479.
- [8] E.B. Gogol, V.A. Rhodius, K. Papenfort, J. Vogel, C.A. Gross, Small RNAs endow a transcriptional activator with essential repressor functions for single-tier control of a global stress regulon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 108 (2011) 12875–12880.
- [9] R.P. Novick, Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence, *Mol. Microbiol.* 48 (2003) 1429–1449.
- [10] C. Romilly, I. Caldeleri, D. Parmentier, E. Lioliou, P. Romy, P. Fechter, Current knowledge on regulatory RNAs and their machineries in *Staphylococcus aureus*, *RNA Biol.* 9 (2012) 402–413.

- [11] A. Pautsch, G.E. Schulz, Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain, *Nat. Struct. Biol.* 5 (1998) 1013–1017.
- [12] N. Zambrano, P.P. Guichard, Y. Bi, B. Cayrol, S. Marco, V. Arluison, Involvement of HFq protein in the post-transcriptional regulation of *E. coli* bacterial cytoskeleton and cell division proteins, *Cell. Cycle* 8 (2009) 2470–2472.
- [13] J.C. Malinverni, T.J. Silhavy, An ABC transport system that maintains lipid asymmetry in the Gram-negative outer membrane, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 106 (2009) 8009–8014.
- [14] E. Huntzinger, S. Boisset, C. Saveanu, Y. Benito, T. Geissmann, A. Namane, G. Lina, J. Etienne, B. Ehresmann, C. Ehresmann, A. Jacquier, F. Vandenesch, P. Romby, *Staphylococcus aureus* RNAIII and the endoribonuclease III coordinately regulate *spa* gene expression, *EMBO J.* 24 (2005) 824–835.
- [15] S. Boisset, T. Geissmann, E. Huntzinger, P. Fechter, N. Bendridi, M. Possedko, C. Chevalier, A.C. Helfer, Y. Benito, A. Jacquier, C. Gaspin, F. Vandenesch, P. Romby, *Staphylococcus aureus* RNAIII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism, *Genes. Dev.* 21 (2007) 1353–1366.

Traditional chemical mapping of RNA structure *in vitro* and *in vivo*

Fechter P., Parmentier D., Fuchsbauer O., Romby P. and Marzi S.

Chemical probing is often used to gain knowledge on the secondary and tertiary structures of RNA molecules either free or engaged in complexes with ligands. The method monitors the reactivity of each nucleotide towards chemicals of various specificities reflecting the hydrogen bonding environment of each nucleotide within the RNA molecule. In addition, information can be obtained on the binding site of a ligand (non-coding RNAs, protein, metabolites), and on RNA conformational changes that accompanied ligand binding or perturbation of the environmental cues. The detection of the modifications can be obtained either by using end-labeled RNA molecules or by primer extension using reverse transcriptase. The goal of this chapter is to provide the reader with an experimental guide to probe the structure of RNA *in vitro* and *in vivo* with the most suitable chemical probes.

1. Introduction

Despite its chemical simplicity, RNAs fold into intricate three-dimensional structures that are able to recognize a variety of trans-acting ligands such as nucleic acids, proteins and small molecules with high affinity and specificity. Moreover, the ability of RNA molecules to adopt alternative conformations makes them ideal regulators of gene expression (for reviews see 1, 2). For instance, bacterial mRNAs can adopt highly structured domains in their 5' untranslated regions which serve as genetic switches in response to temperature (3, 4), pH (5), divalent ions (6), and to the intracellular concentration of metabolites (7), uncharged tRNAs (8), RNA-binding proteins (9), non-coding RNAs (10, 11), and foreign DNA (12). Furthermore, the folding of an RNA molecule is a complex process that occurs during its transcription. Analysis of the transcription speed, pausing properties of RNA polymerase and the effect of the transcriptional complex and associated factors can reveal insights on the folding pathway of the nascent transcript and on folding intermediates occurring along this pathway (13). Thus, there is an increasing interest in studying the structural features of RNAs, their plasticity and versatility, and their folding pathways (14), and many of these aspects of RNA biology can be addressed using chemical mapping experiments.

Chemicals have the obvious advantage of probing RNA molecules of any size under a wide range of experimental conditions (i.e., by varying temperature, pH, and the concentration of monovalent and divalent ions). The accessibility or the reactivity of each nucleotide towards chemicals identifies without ambiguity the unpaired regions of RNAs. The combination of dimethylsulfate (DMS), 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)carbodiimide metho-*p*toluene sulfonate (CMCT), and kethoxal provides information on the four bases at one of their Watson-Crick positions. Diethylpyrocarbonate (DEPC) and Nickel-complex map the adenines and guanines, respectively, at their N7-position (Table 1). These two reagents are very sensitive to the stacking of the base rings and attack only these positions within a helix if the deep groove is widened (15). Besides these base-specific reagents, other probes cleave or modify RNA in a sequence-independent manner. Hydroxyl radicals generated by Fe-EDTA, which cleave the riboses, are useful to map the solvent-accessible surface and divalent ion binding pocket of large and compact RNA structures. This tool has been particularly used in time-resolved probing techniques to follow conformational rearrangements and transient interactions occurring during RNA folding or during the assembly of RNA-ligand complexes (16). Finally, other approaches such as lead(II)-induced cleavages (17), acylation of ribose 2'-OH functions by

1M7 (SHAPE) (18), and in-line probing (19) are based on differences in the flexibility of individual internucleotide linkages and gave information on unpaired regions regardless of the RNA sequence.

The reactivity of each nucleotide is used as constraints to elaborate reliable RNA secondary structure model inferred from the sequence. This is often obtained by coupling the mapping data with the help of several computer folding programs which are based on energy minimization (20), statistics (21), stochastic simulations (22), nearest-neighbor methods (23) and on phylogenetic and sequence comparison (24). This latter approach takes into account the base compensatory changes and/or mutations occurring during evolution in addition to the structure probing data. Several programs can also predict long-range interactions like pseudoknots or tertiary structure modules (25-28). Once the secondary structure has been established, three-dimensional models can be built *ab initio* or by homology modeling using an RNA motif database (for a review, see 29). The resulting model can be further validated by site-directed mutagenesis studies coupled with chemical probing to analyze the effect of mutations on the RNA structure. For instance, compensatory base changes validate the existence of base pairings, and appropriate deletion help to define independent structural domains.

Alternative methods using chemicals have been developed. Chemicals have been extensively used to map the binding site of a specific ligand, to study RNP assembly and the conformational changes of the RNA (for reviews see 30, 31). A complementary approach, the so-called chemical interference, defines a set of nucleotides, which have lost the capability to interact with a ligand when they are modified by a chemical probe. Finally chemical probes tethered to protein or RNA can provide topographical information on ligand-RNA complexes by inducing site-specific cleavage of a proximal RNA after binding (e.g. 32, 33).

One of the main concerns is how the RNA can be folded in a more complex environment such as in living cells. Ligand binding may indeed change the RNA folding or stabilize a defined conformation. Structure-specific chemical probes are unique tools to map RNA structure *in vivo* under different cell growth conditions. The use of probes is however limited by their inability to penetrate the cell wall and membrane due to their size, structure, and/or charge. The reagents that have gained widespread use for *in vivo* RNA probing are dimethylsulfate (e.g. 34, 35), to a lesser extent kethoxal (36), lead(II)-induced cleavages (37), and SHAPE (38). The comparison between *in vivo* and *in vitro* probing provides complementary data for determining functional RNA structure. Interestingly, new

high-throughput technologies have been recently developed to study RNA structural features within complex RNA populations *in vitro* where numerous molecules could be probed at once (39). These techniques combine acylation of ribose 2'-OH with multiplexed paired-end deep sequencing of primer extension products. Due to these major innovations in the detection and analysis of the chemical probing data, a full appreciation of the RNA structure dynamics in living organisms can be reachable in a nearest future.

Here, we provide an experimental guide of the most commonly used chemical probes and lead(II)-induced cleavages for mapping the structure of a specific RNA *in vitro* and *in vivo*.

2. Material

2.1. Equipment

1. Equipment for denaturing PAGE (Model S2, Gibco BRL) is used to size end-labeled RNA products and labeled cDNA fragments.
2. Basic laboratory materials are required such as microcentrifuge, vortex, thermoblock, water bath, radioactivity counter.
2. Eppendorf tubes, tips, and buffers should be sterilized before use.

2.2. RNA preparation

1. DNA template for *in vitro* transcription (e.g. a linearized plasmid or a PCR product containing the sequence of interest under the control of a T7 promoter).
2. T7 RNA polymerase 50000 units/ml (Biolabs) supplied with 10x reaction buffer.

2.3. End labeling of RNAs and of oligodeoxyribonucleotide

1. Safety rules have to be applied for handling radioactive materials (*see Note 1*)
2. *In vitro* transcribed RNA purified and dephosphorylated at its 5' end (around 5 µg).
3. HPLC-purified oligodeoxyribonucleotide, 50 mM in water. Store at -20°C.
4. T4 polynucleotide kinase (PNK) 10 U/mL (Ambion, Austin, USA).
5. T4 RNA ligase (Ambion, Austin, USA).
6. Radiochemicals: [γ - ^{32}P]ATP (3000 Ci/mmol); [5' - ^{32}P]pCp (3000 Ci/mmol) (Amersham).
7. *RNA elution buffer*: 500 mM ammonium acetate, pH 6.5, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).
8. Phenol saturated with 0.1 M Na-acetate, pH 5.5.

9. Phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) mixture, pH 5.5.

2.4. Modification reaction

1. Most of these chemical reagents are potential carcinogens; therefore, until the removal of the first ethanol supernatant, chemical modification procedures are carried out under a fume hood. DMS and kethoxal solutions are discarded in 1 M sodium hydroxide waste and CMCT in 10% acetic acid waste (*see Note 1*).

2- RNA transcripts are synthesized *in vitro* using T7 RNA polymerase and purified on polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing conditions. After elution, the RNA is kept at -20°C in sterile bi-distilled water and renatured just before used.

3- Buffer N1 5×: 250 mM sodium cacodylate pH 7.5, 25 mM magnesium acetate, 250 mM ammonium chloride.

4- Buffer N2 5x: 250 mM sodium borate pH 8.0, 50 mM magnesium acetate, 250 mM ammonium chloride.

5- Buffer N3 5x: 250 mM Tris Acetate pH 7.5, 5 mM magnesium acetate, 100 mM potassium acetate (*see Note 2*).

6. Chemical probes: DMS (Aldrich) is diluted 1:30 in 100% ethanol; CMCT (Aldrich) is dissolved at 100 mg/mL in water, and kethoxal (ICN Biochemicals) is diluted at 40 mg/mL in 20% ethanol (*see Note 3*). DEPC (Sigma-Aldrich) is not diluted before the reaction. The reagents are prepared just before use.

7. Lead(II) acetate purchased from Acros organics is extemporeously dissolved in sterile bi-distilled water.

8. Total tRNA from yeast was purchased from Sigma.

2.5. Fractionation of end-labeled RNA fragments

1. *Buffer ΔT1*: 20 mM sodium citrate pH 4.5, 1 mM EDTA, 7 M urea, 0.02% xylene cyanol, 0.02% bromophenol blue.

2. *Ladder Buffer*: 0.1 M Na₂CO₃/ 0.1 M NaHCO₃ pH 9.

3. *RNA loading buffer*: 0.02% xylene cyanol, 0.02% bromophenol blue in 8 M urea.

2.6. Detection of cleavages by primer extension

1. 10x *RTB buffer*: 500 mM Tris-HCl pH 8.3, 100 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 10 mM DTT.

2. Prepare a dNTP mix (2.5 mM of dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Promega)

3. For sequencing reactions, prepare each ddNTP at 5 mM (GE Healthcare Life Sciences)

3. Primer extension was performed with avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (AMV RT) purchased from Finnzymes (France) or from Life Sciences (USA).
4. *DNA loading buffer*: 1 mM EDTA, 0.02% xylene cyanol, 0.02% bromophenol blue in formamide.

2.7. Fractionation of cleaved fragments by polyacrylamide-urea gel electrophoresis

1. Electrophoresis apparatus for slab gels (30 cm x 40 cm, BRL) and generator (2000 W, Biorad) are required for the separation of the end-labeled RNA or cDNA fragments generated after enzymatic hydrolysis on polyacrylamide-urea gel electrophoresis (PAGE).
2. *TBE buffer* : 0.09 M Tris-borate pH 8.3, 1 mM EDTA.
3. Prepare 1 l solution of polyacrylamide 25% in urea 8 M: dissolve 480 g urea (Merck) in 625 ml Rotiphorese 40 (acrylamide/bis-acrylamide :19/1, Roth, Karlsruhe, Germany). Complete with bi-distilled water, filtrate the solution.
4. Products for acrylamide polymerization: N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine or TEMED (Roth); ammonium persulfate should be prepared as a 10% (w/v) solution in water.
5. *Gel fixing solution*: 10% ethanol, 6% acetic acid in water. Prepare 2 l before gel fixing.

3. Methods

3.1. Establishing the protocols

1. To probe the structure of RNAs with different chemicals requires the use of defined buffer conditions (pH, ionic strength, magnesium concentration, temperature). The choice of the buffers will depend on the biological function of the analyzed RNA and will take into account the optimal conditions for the chemical reaction (Table 1). For instance CMCT and kethoxal reactions only work at pH 8.0. Many of the chemicals work in a large range of monovalent and divalent ion concentration and of temperature. Hence, the influence of magnesium can be tested on the RNA folding, and thermal transition of RNAs can be obtained by varying the temperature (*see Note 4*). These experiments provide information on the stability of stem-loop structures, and on tertiary elements which are the first to break during the melting of the RNA structure.
2. The chemical reaction is influenced significantly by the electrostatic environment of the nucleotides. Hence, the reactivity of a nucleotide does not always reflect the stereochemical accessibility. However, chemical probing is a method of choice to build reliable secondary structure models and to unravel the existence of specific structural

modules involving noncanonical base pairs (i.e., Loop C motif in Figure 1, 40). In particular, base-specific chemicals easily detect noncanonical base pairs like sheared A-G base pair or reverse Hoogsteen A-U base pair, which are widespread in RNA molecules.

3. The probe:RNA ratio must be adapted so that the experiments are conducted under limited and statistical conditions in order to get less than one modification or cleavage per molecule. For the first experiment, different concentrations of the chemical probe and a time-scale dependence should be performed. Reducing agents (DTT, or β -mercaptoethanol) should be included in footprinting assays if the RNA ligand is a protein.

4. The protocols have been adapted for the analysis of the *Escherichia coli thrS* mRNA (41). Typical experiment is shown in Figure 1.

3.3. Choice of the detection method

1. The identification of the cleavages depends on the length of the RNA molecule. The use of end-labeled RNA is limited to molecules containing less than 200 nucleotides, and this method can only detect cleavages. The primer extension approach detects stops of reverse transcription (RT) at the residue preceding a cleavage or a modification at a Watson-Crick position. Modification at the N7 position of adenine by DEPC is sufficiently bulky to arrest reverse transcriptase. However, for modification of the N7 position of guanines by DMS, a specific treatment is required to induce specific cleavage at the modification site. The length of the primer varies from 12 to 18 nucleotides. For long RNA, primers are selected every 200 nucleotides when gel electrophoresis is used for data analysis.

2. Assays should be performed to define the best concentration of the RNA, the choice of the primer sequence, and the hybridization conditions in order to get an efficient primer extension.

3. As an alternative approach, primer extension can be done using fluorescently labeled oligonucleotides and the labeled DNA fragments are sized by capillary electrophoresis. This sensitive method permits an easy quantification of the data using the whole-trace Gaussian integration (42).

3.4. RNA preparation

1. The RNA is transcribed *in vitro* with T7 RNA polymerase from a plasmid template carrying the T7 promoter fused to the gene of interest. Depending on the size of the RNA, the purification is done either by gel filtration column (43), monoQ column (44) or denaturing polyacrylamide-urea gel electrophoresis (PAGE) (45). Although PAGE is the

best method to separate full-length RNA from abortive transcription or cleavage products, the elution process of the RNA from the gel is not highly efficient for rather long RNAs (> 500 nts) (*see Note 5*).

2. For 5' end labeling, the RNA is previously dephosphorylated at its 5' end, and labeled using [γ -³²P]ATP (150 μ Ci) and T4 polynucleotide kinase according to the Ambion protocol (http://www.ambion.com/techlib/misc/RNA5_labeling.html). To avoid the 5' dephosphorylation of RNA, which is not efficient for structured RNAs, *in vitro* RNA transcription can be started with ApG (Sigma).

2. The 3' end labeling is performed with [$5'$ -³²P]pCp (150 μ Ci) and T4 RNA ligase according to the Ambion protocol (http://www.ambion.com/techlib/misc/RNA3_labeling.html).

3. The labeled RNA can be purified by gel filtration. However to get an homogenous RNA, we usually prefer to purify the RNA by electrophoresis on 8% polyacrylamide (0.5% bis-acrylamide): 8 M urea slab gels. To the sample, 5 μ l of *RNA loading buffer* is added before PAGE loading.

4. After PAGE purification, labeled or cold RNAs are eluted from gel slices covered with the *RNA elution buffer* in the presence of 20% (vol) phenol, and passive elution is done at 4°C overnight by gently mixing. After phenol extraction, the RNA is precipitated with 2.5 volumes of cold ethanol. After two washing steps with 200 μ l of 70% cold ethanol, the pellet is vacuum-dried and dissolved in sterile bi-distilled water.

5. Since the RNA is purified under denaturing conditions, it is worth spending effort to carry out a renaturation process before the probing experiments (*see Note 6*). One protocol is as follows: the RNA is pre-incubated 1 min at 90°C in sterile bi-distilled water, quickly cooled on ice (1 min) and brought back (20 min) at 20°C or at 37°C in the appropriate buffer containing MgCl₂.

3.5. Lead(II)-induced cleavages of RNAs in vitro

1. Labeled mRNA (1 μ l, 50000 cpm) or the cold RNA species (2 pmoles, 1 μ l) were previously denatured in water (§3.4., step 5) and renatured in the presence of 4 μ l of buffer N3 5x at 20°C (or 37°C) for 15 min. The reactions was carried out in a total volume of 20 μ l.

2. 1 μ l of total tRNA (1 μ g) was added to all samples.

3. Hydrolysis was initiated with 2.5 μ l of different concentrations of lead(II)-acetate from 12 mM, 40 mM, 80 mM to 120 mM for 10 min at 20°C or 5 min at 37°C. (The best conditions in our hand was 40 mM). Mix and centrifuge briefly the samples (*see Note 2*).
4. An incubation control was performed in which lead(II)-acetate was replaced by sterile bi-distillated water.
5. The reactions were stopped by adding 5 μ l of 0.1 M EDTA.
6. To all samples, 50 μ l of 0.3 M sodium acetate pH 5.5 and 150 μ l of cold ethanol were added. After a vigorous mix, the samples were transferred in a dry ice-ethanol bath for 10 min and centrifuge (13000 g at 4°C for 15 min).
7. The supernatant was discarded with caution (if end-labeled RNA is used, check that no radioactivity is present). The pellet was washed with 200 μ l of 80% cold ethanol. The samples are centrifuged (13,000 g at 4°C for 5 min), and the supernatants are removed. This step is repeated once.
8. The pellets were vacuum-dried for several seconds and dissolved in either 4 μ l of sterile bi-distillated water (for primer extension) or dissolved in 6 μ l of *RNA loading buffer* for PAGE analysis.

3.6. Base-specific modification of RNA in vitro

1. We provide here protocols for primer extension of RNAs modified by DMS (N1A, N3C, N7G), CMCT (N1G, N3U), kethoxal (N1, N2G) and DEPC (N7). To visualize methylation of N7 of guanines by DMS, an additional treatment has to be carried out to cleave the ribose-phosphate backbone at the modification sites. For the interpretation of the data, it should be reminded that DMS methylates more strongly N1A than N3C and CMCT modifies more strongly N3U than N1G. Uridines are occasionally stabilized in an enol-tautomer form due to a specific local environment and can be reactive towards DMS at their N3 position. Reactions with CMCT and kethoxal have to be carried out at pH 8.0. In addition kethoxal reacts with the N1 and N2 Watson–Crick positions of guanine, giving a cyclic adduct between these two positions and its two carbonyls, which has to be stabilized by borate ions.
2. All reactions are carried out in a total volume of 20 μ l. A control lacking the reagent is incubated in parallel under the same conditions to detect pauses of reverse transcriptase. Unlabeled mRNA is first heated in sterile bi-distillated water at 90°C for 1 min, then cooled on ice for 1 min and renatured in the appropriate buffer.

3.6.1. DMS modification (N3C, N1A)

1- 2 pmoles of mRNA (per assay) were renatured by incubation at 37°C for 5 min in buffer N1 1x.

2- 1 µl of tRNA (2 µg/µl) and 1 µl of pure DMS or 1 µl of DMS freshly diluted in ethanol at 1:2 (vol/vol), 1:5 or 1:10 were added. For the incubation control, DMS was replaced by ethanol. The tubes were gently mixed and rapidly centrifuged. The reaction was performed in a total volume of 20 µl at 37°C for 5 min. The optimal chemical modification was obtained with DMS diluted at 1:10.

3- The reactions were stopped by ethanol precipitation of the RNA as described above (§3.5., steps 7 to 9).

3.6.2. DMS modification (N7G)

1- Same conditions were used as for DMS modifications of N3C and N1A except that the reaction was carried out for 15 min at 37°C.

2- After ethanol precipitation (see §3.5., steps 7 to 8), the pellets were dissolved in 10 µl of 1 M Tris-HCl pH 8.3 and 10 µl of 8 mg/ml sodium borohydrate (dissolved in water extemporaneously). The reaction was carried out in the dark and on ice for 10 min, followed by ethanol precipitation of the modified RNA (§3.5., steps 7-8).

3- The RNA pellets were dissolved in 10 µl of aniline (100 µl of bi-distilled aniline (Fluka), 60 µl acetic acid, 930 µl H₂O) and incubated at 60°C for 10 min in the dark. The reactions were stopped by ethanol precipitation and treated as described above (§3.5., steps 7-9).

3.6.3. CMCT modification (N3U, N1G)

1- 2 pmoles of mRNA (per assay) were first incubated at 37°C for 10 min in buffer N2 1x in a total volume of 15 µl.

2- 1 µl of tRNA (2 µg/µl) and 4 µl of CMCT (40 or 60 mg/ml dissolved in buffer N2 1x just before use) were added, and the samples were gently mixed. The modification was carried out in a total volume of 20 µl at 37°C for 10 min or at 20°C for 20 min. The optimal modification of mRNA is seen with CMCT at 40 mg/ml. The reactions were stopped by ethanol precipitation and treated as described above (§3.5, steps 7-9).

3.6.4. DEPC carbethoxylation (N7A)

1- 2 pmoles of mRNA (per assay) were renatured by incubation at 37°C for 15 min in buffer N1 1x in a total volume of 15 µl.

2- 1 µl of tRNA (2 µg/µl) and 4 µl of pure DEPC were added, and the tubes were mixed gently. The reaction was carried out at 37°C for 20 min in a total volume of 20 µl. The reactions were stopped by ethanol precipitation as described above (§3.5., steps 7-9).

3.6.5. Kethoxal modification (N1,N2G)

1- 2 pmoles of mRNA (per assay) were renatured by incubation at 37°C for 15 min in buffer N3 1x in a total volume of 15 µl.

2- To the samples, were added 1 µl of total tRNAs (2 µg/µl) and 1 µl or 2 µl of kethoxal solution (kethoxal is diluted at 40 mg/ml in 20% of ethanol). The reactions were done at 37°C for 5 min in a total volume of 20 µl. The optimal modification of mRNA was with 2 µl of kethoxal at 40 mg/ml. After the reactions, 10 µl of 100 mM sodium borate pH 8.0 were added (*see Note 7*).

3- The reactions were stopped by ethanol precipitation and treated as described above (§3.5., steps 7-9) except that the pellets were dissolved in 4 µl of 100 mM sodium borate pH 8.0 instead of water.

3.7. Fractionation of end-labeled RNA fragments

3.7.1. Ladders for cleavage assignments

1. RNase T1 ladder: labeled mRNA (25000 cpm) was pre-incubated at 50°C for 5 min in 5 µl of *Buffer ΔT1* containing 1 µg total tRNA. Reaction was performed at 50°C for 10 min in the presence of 1 µl of RNase T1 (0.5 U). The sample was shifted to 4°C and kept at -20°C.

2. Alkaline ladder: labeled mRNA (100000 cpm) was incubated at 90°C for 3 min in the presence of total tRNA (2 µg) in 5 µl of *ladder buffer*. The sample was shifted to 4°C and kept at -20°C.

3.7.2. Purification of end-labeled RNA fragments by PAGE

1. The end-labeled RNA fragments were sized by electrophoresis on 15% polyacrylamide- (0.5% bis)- 8 M urea slab gels (0.35 mm x 30 cm x 40 cm) in 1x TBE.

2. 15% PAGE was prepared as follows; 100 ml of solution containing 60 ml 25% polyacrylamide- 8 M urea, 10 ml 10x TBE buffer, 30 ml 8 M urea, TEMED (75 µl) and

10% ammonium persulfate (750 μ l) (*see Note 8*). The gel solution was poured slowly between two glass plates that were separated by one spacer on each side and placed at the horizontal on the bench. After polymerization (around 30 min), the comb was removed and the wells were washed carefully. Gels were pre-run for 30 min at 75 W.

3. The samples were heated (except the RNase T1 and alkaline ladders) for 3 min at 90°C, centrifuged briefly and 3 μ l were loaded per well. Before loading, be aware that each sample contains the same amount of radioactivity (except for the ladder that should be twice amount).

4. PAGE was run warm (75 W) to avoid band compression. The migration conditions must be adapted to the length of the RNA, knowing that on 15% PAGE, xylene cyanol migrates as a 39 nucleotides-long RNA and bromophenol blue as 9 nucleotides.

5. At the end of the run, the 15% PAGE was transferred without drying on an old autoradiography film, and wrapped with a plastic film. Overnight exposure is done at -80°C using an intensifying screen.

6. Several technical problems might be observed (*see Notes 9-14*).

3.8. Detection of cleavages or modifications by primer extension

3.8.1. Hybridization and primer extension

1. To the 4 μ l of the modified or cleaved mRNA (2 pmoles), 1 μ l of 5' end-labeled DNA primer (around 100000 cpm) was added. The samples were heated 1 min at 90°C, and quickly cooled on ice after a brief centrifugation.

2. RTB buffer 5x (1 μ l) was added and the samples were incubated for 15 min at 20°C.

3. Primer extension was performed in a total volume of 15 μ l. To the hybridization mix, were added 2 μ l of RTB 5x, 2 μ l of dNTP mix (2.5 mM of each dNTP), 4 μ l sterile H₂O, 1 μ l of RT (2 U/ μ l diluted freshly in the commercial buffer). The samples were incubated for 30 min at 37°C.

4. To improve the quality of the gels, the RNA template was hydrolyzed by alkaline treatment. Just after primer extension, were added 20 μ l of the buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 7.5 mM EDTA, 0.5% SDS), and 3.5 μ l of 3 M KOH. The samples were heated at 90°C for 3 min and at 37°C for at least 1 h. To all samples, 6 μ l of 3 M acetic acid, 100 μ l 0.3 M sodium acetate pH 5.5 and 300 μ l of cold ethanol were added. After precipitation, the pellets were washed twice with 70% ethanol, vacuum-dried and dissolved in 6 μ l of *DNA loading buffer*.

3.8.2. Gel fractionation of labeled cDNA fragments

1. The cleavage positions were identified by running in parallel a sequencing reaction. The elongation step was performed as described above (§3.8.1., step 3) except in the presence of one of the dideoxynucleotides ddXTP (2.5 μ M), the corresponding deoxyribonucleotide dXTP (25 μ M) and the three other deoxyribonucleotides (100 μ M).
2. All samples were heated at 90°C for 3 min, and centrifuged briefly.
3. 3 μ l were loaded on 8% polyacrylamide-(0.4% bis)-8 M urea slab gels in TBE 1X as described above (§3.7.2.). The migration conditions must be adapted to the size of the fragments to be analyzed, knowing that on 8% PAGE, xylene cyanol migrates to 81 nucleotides and bromophenol blue to 19 nucleotides. After migration, the gels were dried, and exposed at -80°C with an autoradiography and intensifying screen overnight.
4. Technical problems that were revealed on the autoradiography might occur during the handling process (*see* **Notes 14-16**).

3.9. *In vivo* lead(II)-induced cleavages

1. For the first experiment, it is essential to evaluate the quantity of lead(II) required for mild hydrolysis. For this preliminary experiment, total RNAs are prepared and fractionated on agarose gels and the most abundant rRNAs are visualized by ethidium bromide (37). Upon increasing concentrations of lead(II)-acetate (25 to 200 mM), the intensities of 16S and 23S rRNAs significantly decreased. Choose a concentration of lead(II)-acetate where significant amount of full-length rRNAs is observed.
2. The protocol described below was adapted for *E. coli* to map the structure of mRNA and ncRNAs (37) (*see* **Note 17**).
- 3- Bacteria (20 ml of culture) were grown in LB medium to mid-logarithmic phase at 37°C (until an OD₆₀₀ of 0.5 was reached) in a Falcon tube.
- 4- A fresh solution of 1 M lead(II)-acetate in sterile bi-distilled water was extemporaneously prepared (*see* **Note 2**). Then, 2.8 ml of this solution was mixed with 3.2 ml of sterile water and 2 ml of pre-warmed 4x concentrated LB (at 37°C) to give 8 ml of lead(II)-acetate/LB solution at 350 mM.
- 5- 8 ml of the lead(II)-acetate/LB solution (350 mM) were then added to 20 ml of cells at mid-logarithmic phase. This gave a final concentration of lead(II)-acetate 100 mM. For the first trials, different concentrations of lead(II)-acetate (50, 100, 150 and 200 mM final concentration) should be used and the reaction was performed 5 min at 37°C with gentle shaking.

- 6- Incubation control was performed under the same experimental conditions, except that lead(II)-acetate is avoided.
- 7- Reactions were stopped by addition of 10 ml of cold 0.5 M EDTA (1,5-fold molar excess) and immediately put on ice. The cells were pelleted (3000 g for 15 min at 4°C) and resuspended in 1.5 ml of cold buffer 10 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA. The cells were transferred in a 1.5 ml microtube and centrifuged (13000 g, 15 min at 4°C).
- 8- *E. coli* cells were disrupted by adding 200 µl of buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 8 % sucrose, 0.5 % triton, 10 mM EDTA, 4 mg/ml lysozyme, and incubated 5 min in ice.
- 9- Total RNAs were prepared by phenol extraction treatment (*see Note 18*). To the samples, 200 µl of phenol saturated with 0.1 M sodium acetate pH 5.5 and 10 mM EDTA were added. Cells were vortexed during 30 sec at high speed under the fume hood. The samples were heated at 65°C during 15 min and mixed every 5 min.
- 10- The mixture was cooled on ice and centrifuged (10 min, 13000 g). The aqueous phases were carefully collected, and the phenol and interface were re-extracted by vortexing the samples with 100 µl 0.1 M sodium acetate pH 5.5.
- 11- After centrifugation, the aqueous phases were pooled and extracted once with phenol:chloroform previously saturated in sodium acetate 0.1 M pH 5.5, and once with chloroform. The RNA was then precipitated twice with 3 volumes of cold ethanol in the presence of 0.3 M sodium acetate (final concentration).
- 12- The pellets were washed twice with 200 µl of 80 % ethanol, vacuum-dried, and dissolved in a small volume of sterile bi-distillated water. The RNA concentration was measured and 10 µg of material was used for primer extension.
- 13- Primer hybridization, elongation by reverse transcriptase, and PAGE fractionation were as described (§3.8.), except that primer extension was conducted at 45°C for 30 min with 5 U of reverse transcriptase.
14. Technical problems might occur during the handling process (*see Notes 19-20*).

3.10. *In vivo* DMS modification

1. DMS modification can be performed *in vivo* under different growth conditions (temperature, medium, growth phase). The protocol described below was adapted for *E. coli* to map the structure of mRNA at 15°C and 37°C (4).
- 2- Bacteria (15 ml of culture) were grown in LB medium in a 50 ml sterile tube to mid-logarithmic phase at 37°C (until an OD₆₀₀ of 0.5 was reached).

- 3- Reactions were performed with 30, 60 or 120 μl of DMS for 3 min at 37°C, or with 60, 120, and 240 μl of DMS for 3 min at 15°C after gentle shaking. The best conditions for modifications were with 60 μl of DMS at 37°C and 120 μl of DMS at 15°C.
- 4- The reactions were stopped by adding 75 ml of cold stop buffer containing 100 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM β -mercaptoethanol, 5 mM EDTA.
- 5- The cells were pelleted (3000 g, 15 min, 4°C), and dissolved in 1.5 ml of cold buffer 10 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA. The cells were transferred in a 1.5 ml micro tube and centrifuged (13000 g, 15 min, 4°C).
- 6- Incubation control is performed on cells grown and treated in the same conditions as above but in the absence of DMS. A stop control was also done to verify that no DMS modification occurred during the RNA extraction. In that control, DMS was added after the addition of the stop buffer.
- 7- Preparation of total RNAs, primer extension and PAGE fractionation were as described above (§3.9., steps 8 to 13).

4. Notes

1. Safety rules. For manipulating radioactivity, work behind a plexiglass screen, and wear glasses and gloves. For phenol extraction, work under a fume hood. Since all the chemicals modify nucleic acids, they are potential carcinogens. It is therefore essential to manipulate the reagents under a fume hood and to wear protective gloves. The reagent solutions, the supernatant derived from the first precipitation step following the RNA modification and all the tubes that have been in contact with the reagent must be treated as follows : for DMS and kethoxal, all samples are discarded in 1N sodium hydroxide, and for CMCT all samples are treated in 10% acetic acid.
2. For lead(II)-induced cleavages, buffers with chloride ions should be avoided as Pb(II) acetate might form precipitates with it. Since Pb^{2+} competes with Mg^{2+} for RNA binding, the efficiency of cleavages will depend on the $\text{Pb}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ratio.
3. Kethoxal is a highly viscous solution and should therefore be weighted instead of pipetting. First, tare a micro tube, transfer some kethoxal in the tube with a 200 μl pipettor and weight the tube again. The same procedure is done with CMCT.
4. Since the chemical reactions are influenced by the temperature, the experimental conditions have to be adapted for each temperature. For instance, DMS modification at 4°C was for 20 min with 1 μl of DMS whereas at 50°C reaction was for 5 min with 1 μl of DMS diluted 1:16; CMCT modification was at 4°C for 45 min with 5 μl of CMCT

40 mg/ml and was at 50°C for 5 min with 5 µl of CMCT 14 mg/ml; kethoxal modification at 4°C was for 30 min with 5 µl of kethoxal 20 mg/ml and at 50°C was for 5 min with 1 µl of kethoxal 10 mg/ml.

5. *In vitro* RNA transcripts generated by T7 RNA polymerase have an heterogeneous 3' end and sometimes at the 5' end. A solution is to incorporate ribozymes into the transcripts at the 5'- and/or 3'-end of the target RNA sequence (46). Fractionation of RNA on PAGE remains the method of choice for purification. For long RNA molecules, electro-elution might help to increase the elution efficiency.

6. During PAGE purification, the RNA is denatured, it is thus essential to design renaturation protocols in order to obtain homogeneous RNA population and to test whether this conformation is biologically relevant (enzymatic activity for ribozyme, efficient ligand binding). Alternative RNA conformations may co-exist and by varying the concentration of MgCl₂, one of the two conformers might be stabilized. If the conformers have different electrophoretic mobilities on native polyacrylamide gel, chemical probing can be used to distinguish them. After chemical modification, the co-existing structures are separated on a native polyacrylamide gel, and the modification sites for each conformer are then identified by primer extension.

7. Kethoxal might have a partially denaturing effect on RNA structure even if the reaction was not too strong (all the guanines are modified). Concentration of kethoxal or the incubation time should be reduced in order to get only modifications at guanines located in single-stranded regions.

8. To keep high resolution of the gels, acrylamide, urea solutions, and in particular ammonium persulfate should be prepared freshly.

9. Each experiment should be repeated at least twice, and only the reproducible cleavages/modifications will be considered. As mentioned previously, the elaboration of a reliable secondary structure RNA model requires data from various chemicals.

10. No full-length RNA: reaction was too strong (see Figure 1, lanes 4 and 5). Time of the reaction and/or chemical concentrations have to be reduced (Figure 1, lane 2).

11. Compression of bands due to stable secondary structure (in general rich in G-C base pairs) can be observed using end-labeled RNA. Heat the samples before loading on the gel and the gels should be warm before sample loading and during the migration.

12. Aggregation of end-labeled RNA in the gel pockets and only fragments of small sizes can be visualized. The pellets were not correctly dried after ethanol precipitation. The data cannot be interpreted.

13. Samples do not migrate correctly during electrophoresis due to the presence of salt. Add several washing steps with ethanol 80% at the end of the procedure.

14. Appropriate incubation controls are essential to identify cleavages that are induced during the incubation treatments, and the pauses of reverse transcriptase that are due to stable secondary structures or cuts. Nucleotides for which strong bands are visible in the control lanes are not considered for the interpretation. If too many bands occur in the incubation controls of end-labeled RNA, repurify the RNA and prepare new sterile buffers. If too many RT pauses in the incubation controls, it can be due to RNase contamination, strong secondary structure of RNA (the extension can be done at 42°C), or to the primer location. AMV (Avian Myeloblastosis Virus) RT should be used rather than MMLV (Moloney Murine leukemia Virus) RT, the latter being more sensitive to RNA secondary structure.

15. Absence of signal after primer extension: the modified RNA did not efficiently precipitate, the pellet was lost during the removal of supernatant, the hybridization conditions need to be optimized. Optimal conditions for primer hybridization should be established in a series of pilot experiments. The optimal temperature for annealing varies from RNA to RNA, depending on the G+C content, the propensity of the RNA to form secondary structure, and the length of the primer.

16. Reverse transcriptase stops at the nucleotide preceding the cleaved nucleotide. Thus, the resulting cDNA is one nucleotide shorter than the cDNA corresponding to the sequencing lane (see Figure 1).

17- Data from *in vivo* probing are more complex to interpret than the *in vitro* probing. One of the main reasons is that the studied RNA might be involved simultaneously in several complexes. However, *in vivo* mapping becomes powerful when it is used in a comparative manner. For example, conformational changes of mRNA induced by a *trans*-acting ligand can be identified upon repression or activation of translation. DMS and lead(II)-induced cleavages can be used to monitor the conformational changes of mRNA under different growth conditions and environmental cues such as temperature (4).

18- Alternative to phenol extraction, other protocols used to extract total RNAs can be used. Reagents combining phenol and guanidine thiocyanate enable a straightforward isolation of total RNAs from samples of human, yeast, bacterial and viral origin. Fastprep instrument and the associated commercial kits (Q-biogen) to lyse the cells and to prepare total RNA extracts is also an efficient method.

19- Weak signals and no-more full-length RNA: incomplete homogenization or lysis of samples, not enough material (increase the quantity of RNA), reaction was too strong (reduce either the quantity of the reagent, or/and the time of incubation). Check that the reaction was efficiently stopped before the extraction of total RNAs.

20- Strong stops in the control lanes: degradation of RNA, pauses of RT due to stable secondary structures, post-transcriptional modifications which stop reverse transcriptase elongation (primer should be changed in order to cover the modified base).

Acknowledgments

We thank all members of the team for helpful discussions and we are grateful to E. Westhof for his constant support. This work was supported by the Centre National de Recherche (CNRS), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-09-BLAN-0024-01; ANR-PATHOGENOMICS-ARMSA). DP receives the support from the CNRS and the Délégation Générale de l'Armement.

References

1. Lioliou, E., Romilly, C., Romby, P., and Fechter, P. (2010) RNA-mediated regulation in bacteria: from natural to artificial systems. *N Biotechnol* 27, 222-235.
2. Bastet, L., Dube, A., Masse, E., and Lafontaine, D.A. (2011) New insights into riboswitch regulation mechanisms. *Mol Microbiol* 80, 1148-1154.
3. Narberhaus, F. (2010) Translational control of bacterial heat shock and virulence genes by temperature-sensing mRNAs. *RNA Biol* 7, 84-89.
4. Giuliodori, A.M., Di Pietro, F., Marzi, S., Masquida, B., Wagner, R., Romby, P., Gualerzi, C.O., and Pon, C.L. (2010) The *cspA* mRNA is a thermosensor that modulates translation of the cold-shock protein CspA. *Mol Cell* 37, 21-33.
5. Nechooshtan, G., Elgrably-Weiss, M., Sheaffer, A., Westhof, E., and Altuvia, S. (2009) A pH-responsive riboregulator. *Genes Dev* 23, 2650-2662.
6. Ramesh, A. and Winkler, W.C. (2010) Magnesium-sensing riboswitches in bacteria. *RNA Biol* 7, 77-83.
7. Roth, A. and Breaker, R.R. (2009) The structural and functional diversity of metabolite-binding riboswitches. *Annu Rev Biochem* 78, 305-334.
8. Green, N.J., Grundy, F.J., and Henkin, T.M. (2010) The T box mechanism: tRNA as a regulatory molecule. *FEBS Lett* 584, 318-324.
9. Marzi, S., Myasnikov, A.G., Serganov, A., Ehresmann, C., Romby, P., Yusupov, M., and Klaholz, B.P. (2007) Structured mRNAs regulate translation initiation by binding to the platform of the ribosome. *Cell* 130, 1019-1031.
10. Thomason, M.K. and Storz, G. (2010) Bacterial antisense RNAs: how many are there, and what are they doing? *Annu Rev Genet* 44, 167-188.
11. Vogel, J. (2009) A rough guide to the non-coding RNA world of Salmonella. *Mol Microbiol* 71, 1-11.
12. Terns, M.P. and Terns, R.M. (2011) CRISPR-based adaptive immune systems. *Curr Opin Microbiol* 14, 321-327.
13. Wong, T.N. and Pan, T. (2009) RNA folding during transcription: protocols and studies. *Methods Enzymol* 468, 167-193.
14. Zemora, G. and Waldsich, C. (2010) RNA folding in living cells. *RNA Biol* 7, 634-641.
15. Woodson, S.A., Muller, J.G., Burrows, C.J., and Rokita, S.E. (1993) A primer extension assay for modification of guanine by Ni(II) complexes. *Nucleic Acids Res* 21, 5524-5525.
16. Ralston, C.Y., Sclavi, B., Sullivan, M., Deras, M.L., Woodson, S.A., Chance, M.R., and Brenowitz, M. (2000) Time-resolved synchrotron X-ray footprinting and its application to RNA folding. *Methods Enzymol* 317, 353-368.
17. Chevalier, C., Geissmann, T., Helfer, A.C., and Romby, P. (2009) Probing mRNA structure and sRNA-mRNA interactions in bacteria using enzymes and lead(II). *Methods Mol Biol* 540, 215-232.
18. Wilkinson, K.A., Merino, E.J., and Weeks, K.M. (2006) Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension (SHAPE): quantitative RNA structure analysis at single nucleotide resolution. *Nat Protoc* 1, 1610-1616.
19. Wakeman, C.A., Ramesh, A., and Winkler, W.C. (2009) Multiple metal-binding cores are required for metalloregulation by M-box riboswitch RNAs. *J Mol Biol* 392, 723-735.
20. Zuker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31, 3406-3415.
21. Do, C.B., Woods, D.A., and Batzoglou, S. (2006) CONTRAfold: RNA secondary structure prediction without physics-based models. *Bioinformatics* 22, e90-98.

22. Xayaphoummine, A., Bucher, T., and Isambert, H. (2005) Kinefold web server for RNA/DNA folding path and structure prediction including pseudoknots and knots. *Nucleic Acids Res* 33, W605-610.
23. Reuter, J.S. and Mathews, D.H. (2010) RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. *BMC Bioinformatics* 11, 129.
24. Jossinet, F. and Westhof, E. (2005) Sequence to Structure (S2S): display, manipulate and interconnect RNA data from sequence to structure. *Bioinformatics* 21, 3320-3321.
25. Sato, K., Kato, Y., Hamada, M., Akutsu, T., and Asai, K. (2011) IPknot: fast and accurate prediction of RNA secondary structures with pseudoknots using integer programming. *Bioinformatics* 27, i85-93.
26. Bellaousov, S. and Mathews, D.H. (2010) ProbKnot: fast prediction of RNA secondary structure including pseudoknots. *Rna* 16, 1870-1880.
27. Bindewald, E., Kluth, T., and Shapiro, B.A. (2010) CyloFold: secondary structure prediction including pseudoknots. *Nucleic Acids Res* 38, W368-372.
28. Cruz, J.A. and Westhof, E. (2011) Sequence-based identification of 3D structural modules in RNA with RMDetect. *Nat Methods* 8, 513-521.
29. Rother, M., Rother, K., Puton, T., and Bujnicki, J.M. (2010) ModeRNA: a tool for comparative modeling of RNA 3D structure. *Nucleic Acids Res* 39, 4007-4022.
30. Tijerina, P., Mohr, S., and Russell, R. (2007) DMS footprinting of structured RNAs and RNA-protein complexes. *Nat Protoc* 2, 2608-2623.
31. Woodson, S.A. (2011) RNA Folding Pathways and the Self-Assembly of Ribosomes. *Acc Chem Res*.
32. Joseph, S. and Noller, H.F. (2000) Directed hydroxyl radical probing using iron(II) tethered to RNA. *Methods Enzymol* 318, 175-190.
33. Culver, G.M. and Noller, H.F. (2000) Directed hydroxyl radical probing of RNA from iron(II) tethered to proteins in ribonucleoprotein complexes. *Methods Enzymol* 318, 461-475.
34. Mayford, M. and Weisblum, B. (1989) Conformational alterations in the ermC transcript in vivo during induction. *Embo J* 8, 4307-4314.
35. Altuvia, S., Weinstein-Fischer, D., Zhang, A., Postow, L., and Storz, G. (1997) A small, stable RNA induced by oxidative stress: role as a pleiotropic regulator and antimutator. *Cell* 90, 43-53.
36. Balzer, M. and Wagner, R. (1998) A chemical modification method for the structural analysis of RNA and RNA-protein complexes within living cells. *Anal Biochem* 256, 240-242.
37. Lindell, M., Romby, P., and Wagner, E.G. (2002) Lead(II) as a probe for investigating RNA structure in vivo. *Rna* 8, 534-541.
38. Wilkinson, K.A., Vasa, S.M., Deigan, K.E., Mortimer, S.A., Giddings, M.C., and Weeks, K.M. (2009) Influence of nucleotide identity on ribose 2'-hydroxyl reactivity in RNA. *Rna* 15, 1314-1321.
39. Lucks, J.B., Mortimer, S.A., Trapnell, C., Luo, S., Aviran, S., Schroth, G.P., Pachter, L., Doudna, J.A., and Arkin, A.P. (2011) Multiplexed RNA structure characterization with selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension sequencing (SHAPE-Seq). *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 11063-11068.
40. Leontis, N.B., Lescoute, A., and Westhof, E. (2006) The building blocks and motifs of RNA architecture. *Curr Opin Struct Biol* 16, 279-287.
41. Romby, P., Caillet, J., Ebel, C., Sacerdot, C., Graffe, M., Eyermann, F., Brunel, C., Moine, H., Ehresmann, C., Ehresmann, B., and Springer, M. (1996) The expression

- of E.coli threonyl-tRNA synthetase is regulated at the translational level by symmetrical operator-repressor interactions. *Embo J* 15, 5976-5987.
42. Mortimer, S.A. and Weeks, K.M. (2009) Time-resolved RNA SHAPE chemistry: quantitative RNA structure analysis in one-second snapshots and at single-nucleotide resolution. *Nat Protoc* 4, 1413-1421.
 43. Romaniuk, P.J., de Stevenson, I.L., and Wong, H.H. (1987) Defining the binding site of Xenopus transcription factor IIIA on 5S RNA using truncated and chimeric 5S RNA molecules. *Nucleic Acids Res* 15, 2737-2755.
 44. Jahn, M.J., Jahn, D., Kumar, A.M., and Soll, D. (1991) Mono Q chromatography permits recycling of DNA template and purification of RNA transcripts after T7 RNA polymerase reaction. *Nucleic Acids Res* 19, 2786.
 45. Milligan, J.F. and Uhlenbeck, O.C. (1989) Synthesis of small RNAs using T7 RNA polymerase. *Methods Enzymol* 180, 51-62.
 46. Walker, S.C., Avis, J.M., and Conn, G.L. (2003) General plasmids for producing RNA in vitro transcripts with homogeneous ends. *Nucleic Acids Res* 31, e82.
 47. Torres-Larios, A., Dock-Bregeon, A.C., Romby, P., Rees, B., Sankaranarayanan, R., Caillet, J., Springer, M., Ehresmann, C., Ehresmann, B., and Moras, D. (2002) Structural basis of translational control by Escherichia coli threonyl tRNA synthetase. *Nat Struct Biol* 9, 343-347.

Table 1: list of the most commonly used chemicals for probing RNA structure

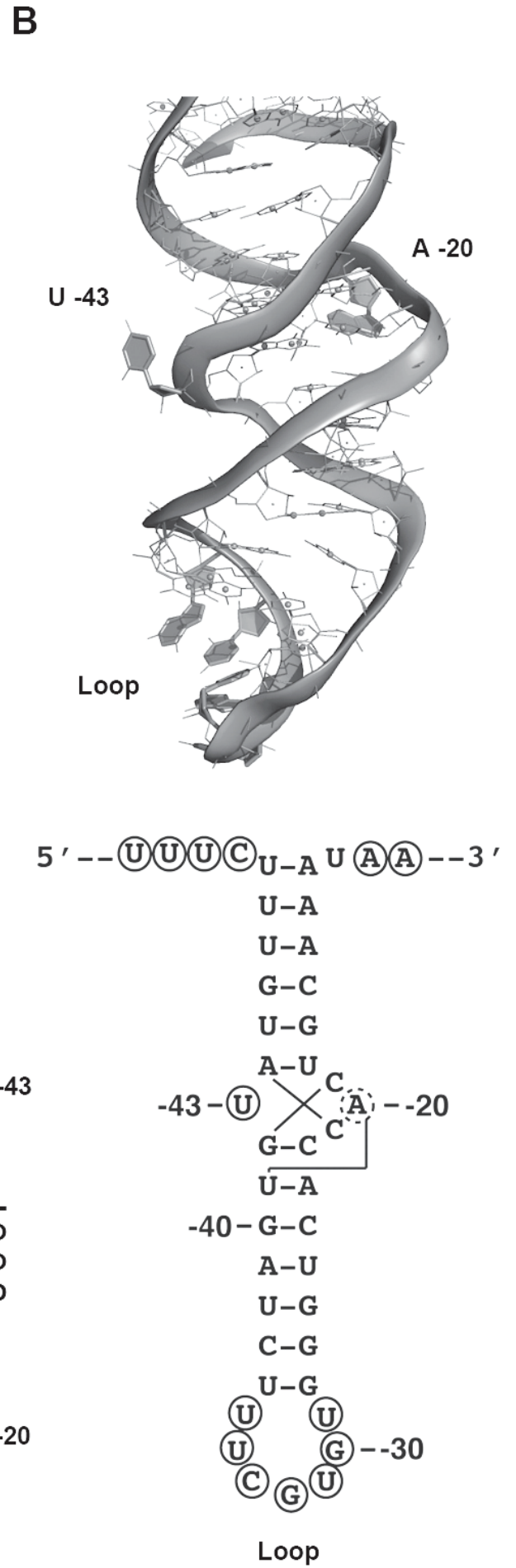
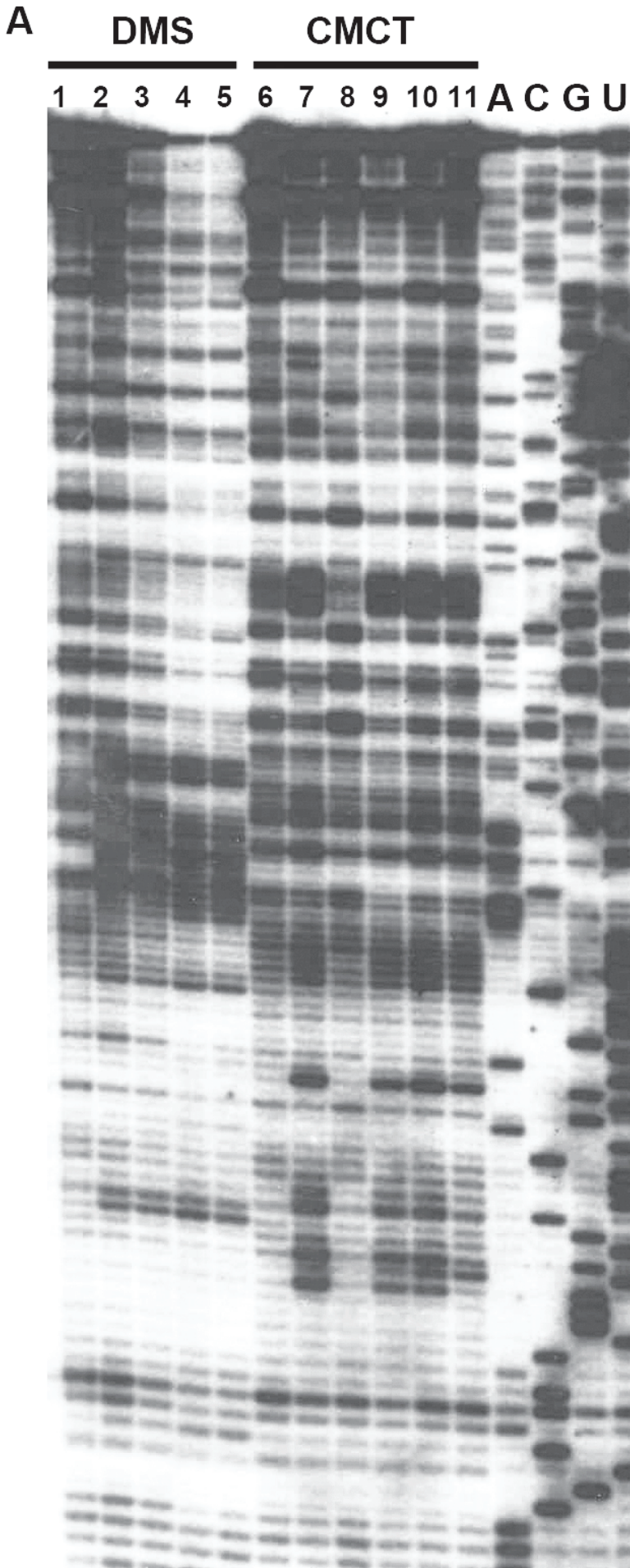
| Probes | Target | Modification | Direct detection | RT detection | In vivo | Comments |
|---|--|--|---------------------------------------|--------------------------|-------------|--|
| Base-specific chemicals | | | | | | |
| DMS | A(N1) C(N3) G(N7) | N1-CH₃ N3-CH₃ N7-CH₃ | - + ^b + ^b | + + + ^b | + + + | - pH 4.5-10 - T° 4-90°C - Tris should be avoided because DMS reacts with amine groups |
| DEPC ^c | A(N7) | N7-CO₂H₂ | + ^b | + | ? | - pH 4.5-10 - T° 4-90°C - Tris should be avoided because DEPC reacts with amine groups |
| CMCT | G(N1) U(N3) | N1-C=N-R NH-R' N3-C=N-R NH-R' | - - | + + | - - | - pH 8 - T° 4-90°C - soluble up to 300 mg/mL in water |
| kethoxal | G(N1) G(N2) | N1-CH-OH R-C-OH N2-N-H | - | + | + | - pH 8 - stabilized by borate ions |
| Ribose specific reagent | | | | | | |
| 1M7 ^a | - 2'-OH ribose - Unpaired nucleotide | O-acylation | - | + | + | - Active under a wide range of conditions - rapidly hydrolyzed in water |
| Divalent ions and hydrolytic cleavages | | | | | | |
| Pb(II) acetate | - Specific binding sites for divalent ions - unpaired and dynamic regions | ...Np (3'p) | + | + | + | - chloride should be avoided - Reaction is stopped by the addition of EDTA |
| Ni(II) complex | - Unpaired guanines, G(N7) | Oxydation of guanine | + ^b | + | ? | - Reaction is stopped by the addition of EDTA |

| | | | | | | |
|------------------------------|--|---------------------------------|---|---|---|--|
| Fe-EDTA (radical hydroxyl) | - Accessible surface of large RNA - Binding sites for divalent ions | - Cleavage at ribose (C1', C4') | + | + | ? | - Reactivity relatively insensitive to pH, T°C - Only sodium phosphate should be avoided and glycerol (lower than 0.5%) |
| In-line probing ^c | - Unpaired nt | Phosphate linkage cleavage | + | + | ? | - Works under a wide range of conditions: salt and Mg, T°C - Optimal pH 7.5-8 - long incubation time |

DMS, dimethylsulfate; DEPC, diethylpyrocarbonate; CMCT, 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl) carbodiimide metho-*p*-toluene sulfonate; (a) 1M7, 1-methyl-7-nitroisatoic anhydride, other derivatives of 1M7 are NMIA (N-methylisatoic anhydride) and BzCN (benzoyl cyanide). Detection method: (direct) detection of cleavages on end-labeled RNA molecule; (indirect) detection by primer extension with reverse transcriptase using either ³²P-labeled primer or primer labeled at the 5' end with a fluorophore. (+) The corresponding detection method can be used; (b) a chemical treatment is necessary to cleave the ribose-phosphate chain prior to the detection. *In vivo* mapping: probes, which diffuse efficiently across membranes and cell walls (+), other probes can be used after permeabilization of the cell (-), probes that were not yet used *in vivo* (?). Specificity, and products generated by the probe action are indicated. Most of the probes provided information useful to build a secondary structure model and elements of the tertiary folding, and to map the binding sites of RNA ligands. (c) not appropriate for mapping the binding sites of proteins because DEPC modifies proteins and the time of incubation for in-line probing is quite long.

Legend to Figures

Figure 1: Chemical probing on *Escherichia coli thrS* mRNA. (A) Gel electrophoresis fractionation of products resulting from dimethylsulfate (DMS; N1A>>N3C) and 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl) carbodiimide metho-*p*-toluene sulfonate (CMCT; N3U>>N1G) modifications followed by primer extension analysis. (Lane 1, 6) Incubation controls performed in the absence of DMS or CMCT, respectively; (lanes 2 to 5) DMS reactions performed with 1 μ l of pure DMS (lane 2), 1 μ l of DMS diluted in ethanol 1:2 (lane 3), 1:5 (lane 4) or 1:10 (lane 5); (lane 7) CMCT modification of free mRNA in the presence of 4 μ l of CMCT 40 mg/ml; (lanes 9 to 11) CMCT modification of *thrS* mRNA in the presence of increasing concentrations of threonyl-tRNA synthetase (ThrRS) (lane 9, 50 nM; lane 10, 100 nM; lane 11, 250 nM). (Lanes A, G, C, U) sequencing ladders corresponding to the mRNA sequence. (B) Structure of the stem-loop located in the 5' leader of *thrS* mRNA that is specifically recognized by ThrRS. (Top) crystallographic structure of the stem-loop structure according to (47). Nucleotides reactive towards chemicals are in grey. (Bottom) Secondary structure model showing the reactivity of nucleotides towards DMS (N1A, N3C) and CMCT (N3U, N1G): circled nucleotides are reactive: strong (black circle) and weak reactivity (dashed circle) ; no symbol, not reactive. The internal loop, the so-called loop C motif, adopts a particular structure formed by three stacked triple base pairs explaining the weak reactivity of A-20 at N1, and the non reactivity of C-21 at N3 towards DMS while U-43 which is bulging out is highly reactive at N3 towards CMCT. Most of the nucleotides of the apical loop are also highly reactive at one of their Watson-Crick position. This loop is the main binding site of ThrRS as evidenced by the protection observed at N3 positions of U-29, U-31, U-34 and U-35 and N1 position of G-32 while N1 position of G-30 became more reactive upon protein binding. The chemical data were fully correlated with the crystal structure of *thrS* mRNA associated with ThrRS (45).



III/ Communications scientifiques

Communications orales

Characterization of a specific interaction between Staphylococcus aureus RNIII and the Tex protein Delphine Parmentier, Pierre Fechter, Sandrine Boisset, Jean-Luc Cortay, Maria Possedko, Alain Jacquier, François Vandenesch & Pascale Romby.

Séminaire de Microbiologie de Strasbourg, mars 2011, Strasbourg (67).

Function of Tex in small RNA mediated regulation of gene expression in Staphylococcus aureus

Delphine Parmentier, Pierre Fechter, Isabelle Caldelari, Sandrine Boisset, Claire Lays, Jean-Luc Cortay, Alain Jacquier, François Vandenesch & Pascale Romby.

Séminaire à mi-parcours de thèse, octobre 2012, Strasbourg (67).

Communications par affiches

Caractérisation d'une interaction spécifique entre l'ARNIII de Staphylococcus aureus et la protéine Tex Delphine Parmentier, Pierre Fechter, Sandrine Boisset, Jean-Luc Cortay, Maria Possedko, Alain Jacquier, François Vandenesch & Pascale Romby.

Forum des jeunes chercheurs, décembre 2010, Strasbourg (67).

Caractérisation d'une interaction spécifique entre l'ARNIII de Staphylococcus aureus et la protéine Tex Delphine Parmentier, Pierre Fechter, Sandrine Boisset, Jean-Luc Cortay, Maria Possedko, Alain Jacquier, François Vandenesch & Pascale Romby.

Séminaire de Microbiologie de Strasbourg, mars 2012, Strasbourg (67).

Caractérisation d'une interaction spécifique entre l'ARNIII de Staphylococcus aureus et la protéine Tex Delphine Parmentier, Pierre Fechter, Sandrine Boisset, Jean-Luc Cortay, Maria Possedko, Alain Jacquier, François Vandenesch & Pascale Romby.

XV^e Symposium International sur les Staphylocoques et Infections à Staphylocoques, août 2012, Lyon (69).

Function of Tex in small RNA mediated regulation of gene expression in Staphylococcus aureus Delphine Parmentier, Pierre Fechter, Isabelle Caldelari, Sandrine Boisset, Claire Lays, Jean-Luc Cortay, Alain Jacquier, François Vandenesch & Pascale Romby.

Host - Microbes Interactions Meeting, septembre 2013, Spetses, Grèce.

FONCTION DE LA PROTEINE TEX CHEZ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* : UN LIEN POTENTIEL AVEC LES ARN REGULATEURS ?

L'ARNIII de *S. aureus* est considéré comme un régulateur majeur de la virulence de la bactérie. Il agit au niveau post-transcriptionnel en interagissant avec ses ARNm cibles, permettant la répression des protéines d'adhésion et l'expression des exotoxines. Des expériences de chromatographie d'affinité ont permis d'identifier deux protéines se liant à l'ARNIII, l'endoribonucléase III (RNase III) et Tex. Alors que la RNase III dégrade les duplexes ARNIII-ARNm, la fonction de Tex n'est pas connue. Tex (Toxin Expression) est l'orthologue de la protéine eucaryote Spt6 impliquée dans la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle. Elle contient deux domaines de liaison à l'ADN (HhH et Hth) et à l'ARN (S1 et YqgF). Afin de déterminer sa fonction chez *S. aureus*, un variant délété du domaine S1 a été construit (Tex delta S1) et la liaison de Tex et Tex delta S1 aux ARN a été analysée par des techniques *in vitro*. Nous avons montré que Tex se lie aux motifs simples brins riches en A/U de plusieurs ARN régulateurs et que le domaine S1 constitue en soi, le domaine de liaison aux ARN. Des données préliminaires suggèrent que d'autres domaines seraient aussi impliqués dans ces interactions. La fonction de Tex a ensuite été étudiée par la construction de mutants d'insertion. Les souches sauvages et mutées montrent une croissance identique en milieu riche et minimum, indiquant que Tex n'est pas essentielle pour *S. aureus*. Les mutants produisent plus de biofilms que les sauvages, indiquant un rôle de Tex dans la virulence. Enfin, des expériences d'immunoprécipitation et protéomique ont montré un rôle de Tex dans la régulation transcriptionnelle et/ou post-transcriptionnelle des facteurs de virulence précoces, lors de la phase de transition de la colonisation à la dissémination dans l'hôte.

Staphylococcus aureus, ARN, Tex, Interactions

S. aureus RNAIII is considered as a master regulator of virulence gene expression. The RNA regulates gene expression at the post-transcriptional level allowing repression of surface proteins and activation of exotoxins. *In vitro* pulled-down experiments led to the identification of two proteins interacting with RNAIII, the endoribonuclease III (RNase III), known to degrade RNAIII-mRNA duplexes and Tex. Tex (Toxin Expression) is an ortholog of the eukaryotic protein Spt6, known to be involved in transcriptional and post-transcriptional regulation. It is composed of two DNA binding domains (HtH and HhH) and two RNA binding domains (S1 and YqgF). To decipher the RNA binding capacity of Tex, we have constructed a variant of the protein lacking the putative RNA-binding domain S1 (Tex Δ S1), and analyzed the binding properties of both the wild type and the Tex- Δ S1 protein by different *in vitro* techniques. Indeed Tex recognizes preferentially unpaired A/U rich sequences of several regulatory RNAs, and that the S1 domain is per se, the RNA-binding domain. However, other domains of Tex seem to be also involved in RNA binding. To better define the function of Tex *in vivo*, we inserted an intron into the coding region of *tex*. Wild type and mutant strains grew at the same rate in rich and minimal media, meaning that Tex is not essential. On the other hand, mutated strains produced more biofilm than the wild type strains, suggesting a role of Tex in virulence. Finally, a combination of immunoprecipitation and proteomics experiments highlighted a possible role of Tex in the regulation of virulence factors expression at the transcriptional and/or posttranscriptional level during the transition from colonisation to invasion of the host.

Staphylococcus aureus, RNA, Tex, Interactions