

Résumé de thèse

Les ARN régulateurs chez *Staphylococcus aureus* : Fonction et Mécanisme

Thao Nguyen LE LAM

Mots-clés: ARN régulateurs, *Staphylococcus aureus*, fitness, cibles d'ARN, RNase III.

INTRODUCTION

Le *Staphylocoque doré*

Le *Staphylocoque doré* (*S. aureus*) est une bactérie anaérobie facultative Gram positive qui appartient à la flore humaine normale de la peau et du nez.

Les taux de portage de *S. aureus* varient entre les populations humaines. Il peut être divisé en trois catégories: les non-porteurs (environ 20% de la population), les porteurs persistants (20-25%) et les porteurs intermittents (55-60%) (Lindsay 2008).

S. aureus est aussi un pathogène opportuniste de l'homme et de l'animal. Il est responsable de nombreuses maladies, infections suppuratives (exemples : furoncles, endocardites, méningites) ou non suppuratives (exemple : toxi-infections alimentaires). Il est aussi une cause majeure des infections hospitalières et communautaires à travers le monde. L'émergence de souches bactériennes multi-résistantes aux antibiotiques augmente la gravité des infections et constitue un réel problème de santé publique (DeLeo et al. 2010).

S. aureus se reproduit par scissiparité. Après division, les cellules filles restent souvent attachées, générant des grappes bactériennes qui ont donné le nom à la

famille (staphylo pour "grappe de raisin" en grec). *S. aureus* a un chromosome circulaire de 2.8 Mb avec une composition GC faible (32.8%). Le génome de *S. aureus* a environ 2700 séquences codantes dont la fonction est inconnue pour environ 38%.

S. aureus exprime un grand nombre de facteurs de virulence régulés par de nombreux modulateurs tels que des petits peptides, des métabolites secondaires, des protéines régulatrices et des petits ARN régulateurs.

Les ARN régulateurs

A côté du rôle central des ARNm, les ARNr et des ARNt dans la traduction, le rôle régulateur de l'ARN dans l'expression des gènes procaryotes est aujourd'hui bien établi. Les ARN régulateurs exercent généralement leur activité par l'appariement de bases avec des ARNm cibles ou en se liant à des protéines. Certains ARN régulateurs ont une activité «en cis », c'est-à-dire qu'ils agissent directement sur les séquences qui appartiennent à la même molécule. Généralement, Ils sont actifs dans des conditions spécifiques et influent l'expression des gènes en réponse à des changements environnementaux. Souvent, ils se lient aux sites de liaison des ribosomes (RBS) des messagers pour inhiber ou stimuler la traduction ou pour moduler la dégradation des ARN. Les ARN régulateurs peuvent être classés comme suit :

- Les ARN antisens (ARNas) sont exprimés sur les brins complémentaires de séquences codantes. La cible putative des ARNas est l'ARNm exprimé à partir du brin opposé. Les ARNas ont des régions étendues de complémentarité parfaite avec leur cible (souvent plus de 75 nucléotides) (Waters & Storz 2009 ; Georg & Hess 2011).

- Les ARN régulateurs exprimés de régions d'ADN n'ayant pas de gènes sur le brin complémentaire sont appelés ARNrég. Ils ont habituellement une longueur de 50 à 500 nucléotides et sont non-codants (Gottesman & Storz 2011). Les appariements de bases avec leurs cibles sont souvent limités, généralement entre 10 et 25 nucléotides (Waters & Storz 2009).
- Les régulations en *cis* sont souvent associées aux régions non-traduites (UTR) des ARNm. Elles sont généralement en 5' UTR. Ces séquences peuvent détecter des métabolites (riborégulateurs), ARNt non chargés (T-boîtes), ions métalliques, température (thermoswitches) ou pH. Ces signaux affectent la conformation des séquences et permettent de moduler l'expression des gènes en aval.
- Certains ARN régulateurs agissent directement sur les protéines pour en moduler leur activité.

Chez *S. aureus*, les ARN régulateurs sont des médiateurs clés de la virulence, de la viabilité et de l'adaptabilité à diverses conditions environnementales.

l'ARNrég le mieux caractérisé chez *S. aureus* est l'ARN III. Ce transcrit de 514 nucléotides est un régulateur du système Agr (*accessory gene regulator*) qui contrôle l'expression de nombreux gènes de virulence. L'ARN III régule de nombreux processus biologiques importants comme la formation de biofilm, le métabolisme du peptidoglycane, le métabolisme d'acides aminés, et les voies de transport (Novick & Geisinger 2008).

OBJECTIF

Environ 200 ARN régulateurs (ARNrég) ont été identifiés chez *S. aureus*. Cependant, dans la plupart des cas, leurs fonctions sont inconnues.

1) L'objectif principal de cette thèse était de mettre au point une méthodologie globale pour déterminer les phénotypes associés aux gènes des ARNrég de *S. aureus*. Nous avons utilisé une stratégie qui consiste à mettre en compétition une collection de mutants et d'identifier ceux qui s'accumulent ou disparaissent (*fitness*). Nous avons construit 39 souches mutantes ayant un gène d'ARN régulateur remplacé par une étiquette spécifique identifiable par séquençage. Des expériences de compétition ont été réalisées dans douze conditions de cultures différentes (conditions de stress) et dans un modèle souris. Les résultats de ces expériences ont été obtenus par séquençage à haut débit. Des phénotypes ont été mis en évidence pour 11 des ARN régulateurs étudiés. Les phénotypes observés chez ces mutants sont des indications pour identifier les fonctions associées à ces ARNrég chez *S. aureus* (Chapitre A).

2) Nous avons aussi développé une méthode *in vitro* pour identifier les cibles des ARN régulateurs. Elle consiste à utiliser des ARNrég comme appâts pour piéger leurs cibles dans un extrait d'ARN totaux. Les ARN cibles piégés sont ensuite identifiés par des techniques de séquençage des ARN à haut débit. Cette stratégie a été appliquée à quatre ARNrég de *S. aureus* : RsaA, RsaE, RsaH et RNAIII. Plusieurs cibles putatives et motifs qui seraient impliqués dans les interactions ARNrég/ cibles ont été identifiés (Chapitre B).

Chez *S. aureus*, la ribonucléase III (RNase III) est l'enzyme principalement impliquée dans la dégradation des complexes ARNrég-ARNm. La RNase III a été décrite comme étant non essentielle chez *S. aureus*. Cependant, nous avons montré que cette ribonucléase est essentielle dans les souches contenant des prophages

portant un système toxine/antitoxine (TA) de type I. Dans ces souches, la présence de la RNase III est essentielle pour diminuer l'expression des toxines (Chapitre C).

RESULTAT

A) Phénotypes associés aux gènes des ARNrég.

L'expression génique bactérienne est largement dépendante des conditions de croissance. Cette régulation contribue à optimiser la survie des bactéries à l'environnement. De nombreux facteurs contribuent aux adaptations de croissance via des régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles ou les facteurs sigma, les protéines régulatrices et les ARN régulateurs sont des éléments clés des régulations.

L'identification des phénotypes associés à la délétion de gènes est une méthode classique pour trouver les fonctions des gènes. Elle peut nécessiter de tester de nombreuses conditions pour chaque mutant étudié. Comme les ARNrég contribuent souvent à une modulation fine de l'expression des gènes, les phénotypes associés à l'inactivation de leur gène sont souvent faibles et difficiles à détecter. Néanmoins, des phénotypes conférant des avantages modestes peuvent émerger comme des traits dominants après quelques générations. Une partie importante du manuscrit porte sur le développement et l'application d'une méthode pour détecter les phénotypes associés à la délétion de gènes d'ARNrég chez *S. aureus*. Elle est basée sur le remplacement de gènes par des séquences d'ADN (code-barres) qui permettent l'identification de mutants spécifiques dans une population de mutants. Cette méthode a été développée chez la levure (Shoemaker et al. 1996) et aussi appliquée à des bactéries (Mazurkiewicz et al. 2006)(Hobbs et al. 2010)(Hobbs & Storz 2012). Nous avons adapté le protocole à la technologie de séquençage haut débit et appliqué à

l'étude des ARNrég de *S. aureus*. Nous avons construit 39 souches pour lesquelles le gène d'un ARN régulateur a été remplacé par une séquence code-barres spécifique. Les 39 souches ont été mélangées puis la proportion de chaque mutant dans une population a été déterminée avant et après croissance dans différentes conditions grâce à l'analyse par séquençage massif des codes-barres. Les phénotypes ont été jugés pertinents lorsque le rapport des codes-barres entre condition testée / condition contrôle était inférieur à 0,2 (sous-représentés) ou plus de 5 (surreprésentés).

Treize conditions de croissance (12 conditions de stress et un modèle souris) ont été testées et analysées. Nous avons obtenu des 11 souches ayant une altération de croissance dans au moins une des conditions testées. Une des délétions, *rsaOV*, génère un fort retard de croissance à 20°C mais pas à 37°C ou 42°C. Les expériences de complémentation et l'analyse du transcriptome indiquent que le « gène » *rsaOV* correspondrait à la région 3'UTR du gène *cwrA*. La sensibilité au froid serait associée à l'expression du gène *cwrA*.

B) Identification des cibles des ARN régulateurs.

ARN régulateurs (ARNrég) bactériens agissent généralement par appariement de bases avec des ARNm cibles. Alors que l'identification de cibles des ARNrég est l'étape essentielle dans la caractérisation des ARNrég, elle reste une pierre d'achoppement dans la plupart des études.

Pour étudier les réseaux sous le contrôle des ARN, nous avons développé une procédure pour identifier leurs cibles. Des ARNrég synthétisés *in vitro* sont utilisés comme appât pour piéger leurs cibles correspondantes dans des extraits totaux d'ARN. Une analyse différentielle de données d'ARN-seq de capture de plusieurs ARNrég permet d'éliminer les ARN liés non spécifiquement et d'identifier les cibles

putatives. Cette stratégie a été appliquée à l'étude quatre ARN staphylocoques. De nombreuses cibles putatives pour chaque ARN ont été identifiées et utilisées pour prédire des motifs impliqués dans les interactions ARNrég-cibles. Nos résultats suggèrent que les ARNrég RsaA, RsaE et RsaH contrôlent respectivement les autolysines, le métabolisme de l'arginine et le métabolisme du lactate. Nous avons aussi découvert de nouvelles cibles de l'ARNIII qui mettent en lumière son rôle probable dans l'absorption du fer.

C) La RNase III est essentielle chez certaines souches de *S. aureus*.

La RNase III est une endoribonucléase spécifique double-brin conservée. Chez les bactéries, elle contribue à i) la dégradation de l'ARN, ii) réduire la transcription « pervasive » et iii) à la maturations des ARNr et ARNm. Chez *Bacillus subtilis*, la RNase III est essentielle ; elle assure une protection contre un système toxine/antitoxine (TA) de type I en dégradant des duplex ARNas-ARNm. Malgré son implication dans des fonctions essentielles, la RNase III est dispensable dans plusieurs espèces bactériennes, probablement à cause d'une redondance fonctionnelle avec autres ribonucléases. Des délétions du gène *rnc* (exprimant la RNase III) ont été construites chez *S. aureus* et par conséquent la RNase III était considérée comme étant non essentielle chez ce pathogène opportuniste. Cependant, nous avons montré que *rnc* ne peut pas être inactivé dans la souche HG003 de *S. aureus*. Cette souche a trois prophages qui sont absents dans les souches où *rnc* est dispensable. Nous avons montré la toxicité d'un système toxine antitoxine de Type I (que nous avons nommé SapTA) porté par un des prophages de HG003 uniquement

en l'absence de la RNase III. Nos résultats montrent que la RNase III génère un avantage sélectif en présence de phages chez *Staphylococcus aureus*.

Références

- DeLeo, F.R. et al., 2010. Community-associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 375(9725), pp.1557–68..
- Georg, J. & Hess, W.R., 2011. cis-antisense RNA, another level of gene regulation in bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 75(2), pp.286–
- Gottesman, S. & Storz, G., 2011. Bacterial small RNA regulators: versatile roles and rapidly evolving variations. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(12). Available at:
- Hobbs, E.C., Astarita, J.L. & Storz, G., 2010. Small RNAs and small proteins involved in resistance to cell envelope stress and acid shock in *Escherichia coli*: analysis of a bar-coded mutant collection. *Journal of bacteriology*, 192(1), pp.59–67. Available at:
- Hobbs, E.C. & Storz, G., 2012. Competition assays using barcoded deletion strains to gain insight into small RNA function. *Methods Mol Biol*, 905, pp.63–72.
- Lindsay, J.A., 2008. *Staphylococcus: Molecular Genetics*. In *Chapter 2 The Population Structure of Staphylococcus aureus*. Caister Academic Press, pp. 29–43.
- Mazurkiewicz, P. et al., 2006. Signature-tagged mutagenesis: barcoding mutants for genome-wide screens. *Nature reviews. Genetics*, 7(12), pp.929–39.
- Novick, R.P. & Geisinger, E., 2008. Quorum sensing in staphylococci. *Annual review of genetics*, 42, pp.541–64.
- Shoemaker, D.D. et al., 1996. Quantitative phenotypic analysis of yeast deletion mutants using a highly parallel molecular bar-coding strategy. *Nature genetics*, 14(4), pp.450–456.
- Waters, L.S. & Storz, G., 2009. Regulatory RNAs in bacteria. *Cell*, 136(4), pp.615–28.