



**HAL**  
open science

# Des ARN non-codants au cœur du métabolisme des sucres : nouveaux mécanismes et impact sur l'adaptation et la virulence

Delphine Mege-Bronesky

## ► To cite this version:

Delphine Mege-Bronesky. Des ARN non-codants au cœur du métabolisme des sucres : nouveaux mécanismes et impact sur l'adaptation et la virulence. Génomique, Transcriptomique et Protéomique [q-bio.GN]. Université de Strasbourg, 2017. Français. NNT : 2017STRAJ053 . tel-02003421

**HAL Id: tel-02003421**

**<https://theses.hal.science/tel-02003421>**

Submitted on 1 Feb 2019

**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 414 VIE ET SANTE

**THÈSE** présentée par :

Delphine MEGE-BRONESKY

soutenue le : **21 septembre 2017**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

**Des ARN non-codants au cœur du métabolisme  
des sucres : nouveaux mécanismes et impact sur  
l'adaptation et la virulence**

Unité de Recherche : Architecture et Réactivité de l'ARN

IBMC Strasbourg

**THÈSE dirigée par**

**Mme ROMBY Pascale** Docteur, IBMC, Strasbourg

**Rapporteurs**

**Mme SOUTOURINA Olga** Professeur, UMR9198 Université Paris Sud

**Mr LINDER Patrick** Professeur, CEBUG-Genève

**Autre membre**

**Mr PFEFFER Sébastien** Docteur UPR9002 IBMC



# Remerciements

---



Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury, Olga Soutourina, Patrick Linder et Sébastien Pfeffer, d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je tiens ensuite à remercier Pascale Romby, de m'avoir accueillie dans son équipe, soutenue, encouragée, et guidée pendant ces 4 années de thèse. Pascale, merci de m'avoir transmis ton savoir et ta passion et de m'avoir fait confiance dans mon travail, pour ta générosité, ton humanité, et ta patience. Cela a été un vrai plaisir de travailler sur ce projet, et une fierté de l'avoir réalisé dans une équipe aussi investie et passionnée.

J'aimerais remercier toute mon équipe,

**Isabelle**, merci de m'avoir accompagnée tout au long de ce projet, pour tes encouragements, tes précieux conseils, ta détermination, ton énergie et ta bonne humeur, pour toute ton aide et ta rigueur scientifique. Je n'aurai pas pu espérer meilleur encadrant que toi pour me former à ce métier. De tout cœur merci ! Et merci de m'avoir (presque) convertie à la course à pied !

**Stéphano**, merci pour ton aide précieuse sur les analyses de séquençage mais également pour tes conseils et ton soutien permanent. Ce fut un plaisir de travailler avec toi et d'avoir pu échanger sur nos projets respectifs.

**Emma**, j'ai eu beaucoup de chance, pendant cette dernière année de thèse d'avoir pu travailler avec toi et d'avoir échangé sur nos sujets, (très liés ;-)). Merci d'avoir contribué à finaliser ce projet. Cela a été un vrai plaisir de te connaître. J'espère vraiment que nos chemins se recroiseront ! (Peut être dans la Drôme !)

A ma voisine de bureau et de paillasse, **Anne Catherine**, la cohabitation fut très agréable, j'ai pu râler autant que je voulais et tu as toujours été là pour m'écouter. Merci surtout pour tes conseils, ton aide, ta patience et la découverte de milliers de variétés de pommes.

**Alessandra**, Thank you for your encouragements, support and help. I really wish you the best for the future. It was nice and fun to meet and work with you.

**Lucas** merci pour ta bonne humeur et tes encouragements dans les derniers moments de la thèse.

Merci à toutes les personnes de l'**UPR9002**, pour leur disponibilité et leurs conseils. Merci en particulier aux personnes des services communs, Danielle et Léandra pour leur gentillesse et leur disponibilité sans oublier Anaïs et Catherine.

Je tiens à remercier quelques personnes que j'ai rencontré au cours de mon parcours universitaire et professionnel qui m'ont transmis leur connaissance et leur passion et que je n'oublierai pas : Professeur Dominique Lelong (Notre Dame, Toulon), Professeur José Luis (Université d'Aix-Marseille), Professeur Benoit Kammerer (Université de Strasbourg). A special thank you to Beth-Ann Coller, to have given me the opportunity to work in your lab for 3 years in such a beautiful island and for your continuous support.

Mes derniers remerciements, et non des moindres, vont à ma famille, Maman, Papa, Christine, Hervé, Laura, Paul, Sophie B, Xavier, Brigitte, Lyne, Maude, pour votre soutien et votre amour

---

inconditionnel. J'ai une chance extraordinaire de vous avoir, vous avez tous contribué à la réalisation de ce projet ! Merci à chacun d'entre vous ! Je vous aime fort ! Une pensée pour Alex et Michelle, et la toute la famille Montagne ainsi que pour mes amis proches: Sophie T, Ghislain, Niki and Shane, Gwen, Marie C, et ma « belle » belle-sœur Marie.

Kara, Thank you for having been by my side in every step of this adventure, for your continuous support and unconditional love.

Last but not least ...

Thomas, only you know how much this project meant to me, and only I know all the sacrifices you made to help me realize it. You always believed in me, pushed me to the top, and managed at the same time to make me live a wonderful and magical life. This work is yours too. Although, I am glad that after all those years you finally understood that *mitochondria*, even if it is a beautiful word to place in conversations, does not fit in my project ;-). Thank you for everything my love! ASV.

Et enfin à Eve et Maxime, mes deux merveilles, que j'aime de tout mon cœur et qui n'ont pas toujours compris ce que je faisais dans la vie... je voulais juste vous dire que... « ca y est, maman a fini l'école ! »

*Delphine*

# Abréviations

---



**Bases :**

A	Adénine
U	Uracile
C	Cytosine
G	Guanine
T	Thymine
N ou NTP	A,U,C,G (ARN)
dNTP	A,T,C,G (ADN)

**ADN :**

ADNc	ADN complémentaire
------	--------------------

**ARN :**

ARNas	ARN antisens
ARNm	ARN messenger
ARNnc	ARN non codant
ARNr	ARN ribosomique
ARNt	ARN de transfert
ARNti	ARNt initiateur
RBS	site de fixation du ribosome
SD	séquence Shine et Dalgarno
ARNnc	small ARN
UTR	untranslated region

**Métabolites/ions :**

AMPc	adénine monophosphate cyclique
Ca	calcium
Cl	chlore
Fe	fer
K	potassium
Mg	magnésium
Na	sodium
NH <sub>4</sub>	ammonium
ROS	dérivés d'oxygène réactifs

**Espèces de bactéries :**

<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>B.subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

**Milieu et antibiotiques :**

LB	Luria-Bertani
Amp	ampiciline
Cam	chloramphenicol
Kan	kanamycine
Ery	Erythromycine

**Protéines :**

BSA	« bovine serum albumin »
OB	oligonucleotide/oligosaccharide binding
ORF	cadre de lecture
RNase	ribonucléase

---

SOD	superoxyde dismutase
<b>Techniques :</b>	
MS	spectrométrie de masse
RNA-seq	séquençage de l'ARN à haut débit
RT	transcription inverse
PAGE	gel d'électrophorèse en polyacrylamide
<b>Réactifs chimiques :</b>	
BET	bromure d'éthidium
DIG	digoxygénine
DTT	dithiothréitol
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
P32	phosphore 32
SDS	sodium dodécyl sulfate
<b>Généralités :</b>	
°C	degrés Celsius
cpm	coups par minute
DO	densité optique
g	gramme
KD	constante de dissociation
L	litre
M	molaire
mol	mole
nt	nucléotide
pb	paire de base
V	volt
vol	volume
W	watt
WT	Wild type (souche sauvage)

---

# Sommaire

---

<b>Remerciements</b>	<b>3</b>
<b>Abréviations</b>	<b>9</b>
<b>Sommaire</b>	<b>15</b>
<b>I - Introduction</b>	<b>1</b>
<i>I.1. Staphylococcus aureus</i>	3
I.1.a - Une Bactérie pathogène opportuniste redoutable.	3
I.1.b - Les facteurs de virulence de S. aureus.	5
I.1.c - S. aureus chez les personnes diabétiques	8
<i>I.2. Aperçu du Métabolisme carboné de S. aureus</i>	10
I.2.a - La glycolyse	12
I.2.b - Le cycle de l'acide citrique	13
I.2.c - La voie des pentoses phosphate	14
I.2.d - Maintient du pouvoir réducteur	15
I.2.e - Croissance de S. aureus en conditions aérobie et en présence de glucose	16
I.2.f - Mode fermentaire en conditions infectieuses	16
I.2.g - Entrée du glucose dans la cellule	18
<i>I.3. Régulation du métabolisme et lien avec la virulence</i>	19
I.3.a - Les facteurs de transcription liés au métabolisme	19
I.3.b - Les facteurs de transcription impliqués dans la virulence de S. aureus	24
I.3.c - Les systèmes à deux composants	26
I.3.d - Exemples de régulation métabolique en conditions infectieuses	29
<i>I.4. Rôle clef des ARNnc dans la régulation de l'expression des gènes.</i>	37
I.4.a - Les régions régulatrices des ARNm	37
I.4.b - Les ARNnc non codants agissant en trans	41
<i>I.5. Le réseau de l'ARNIII : Lien entre densité cellulaire, stress environnementaux, métabolisme et virulence.</i>	43
<b>II - Objectifs</b>	<b>63</b>
<i>II.1. Etude de la dynamique du réseau de l'ARNIII</i>	66
<i>II.2. Etude de la fonction des ARNnc, RsaI et RsaD</i>	67
<i>II.3. Caractéristiques de RsaI</i>	68
<i>II.4. Caractéristiques de RsaD</i>	69
<i>II.5. Stratégie expérimentale</i>	70
<b>III - Résultats</b>	<b>73</b>
<i>III.1. Etude de la dynamique du double motif feedforward loop impliquant l'ARNIII</i>	74
III.1.a - Suivi du taux des ARNm au cours de la phase de croissance	74
III.1.b - Suivi de la synthèse des protéines au cours de la croissance	76
III.1.c - Implications du double module de régulation	78

---

III.2.	<i>RsaI, un ARNnc au cœur du métabolisme carboné</i>	79
III.3.	<i>Etude de la fonction de RsaD</i>	123
III.3.a -	L'expression de RsaD dépend du TCS SrrAB	123
III.3.b -	Activation de l'expression de RsaD lors d'un stress NO	124
III.3.c -	Recherche des cibles directes de RsaD par l'approche MAPS	126
III.3.d -	Analyse des fonctions biologiques régulées par RsaD.	131
III.3.e -	Interaction RsaD/RsaI.	134
<b>IV -</b>	<b>Discussion et Perspectives</b>	<b>137</b>
IV.1.	<i>RsaI, un ARNnc au cœur du métabolisme carboné</i>	139
IV.1.a -	Régulation des gènes du métabolisme carboné :	140
IV.1.b -	Rôle de RsaI dans la régulation des biofilms	142
IV.2.	<i>La bifonctionnalité de RsaI : un nouveau mécanisme de régulation chez S. aureus</i>	145
IV.2.a -	Rôle de l'interaction RsaI/RsaG	146
IV.2.b -	Rôle coopératif des deux ARNnc :	148
IV.2.c -	Rôle possible de RsaI et RsaG dans le maintien de l'homéostasie	148
IV.2.d -	Interaction RsaI/RsaD	150
IV.3.	<i>Le nouveau réseau de régulation au cœur du métabolisme central impliquant plusieurs ARNnc.</i>	151
IV.4.	<i>Identification de potentiels partenaires protéiques de RsaI</i>	153
IV.5.	<i>Etude de l'expression des ARNnc en cellules uniques.</i>	155
IV.6.	<i>Conclusion générale.</i>	156
<b>V -</b>	<b>Matériel et Méthodes</b>	<b>159</b>
V.1.	<i>Souches de Staphylococcus aureus et plasmides utilisés</i>	160
V.1.a -	Liste des souches bactériennes utilisées	160
V.1.b -	Liste des oligonucléotides utilisés	161
V.1.c -	Liste des plasmides utilisés	162
V.2.	<i>Tampons et solutions</i>	163
V.3.	<i>Outils de clonage et construction des souches</i>	164
V.3.a -	Transformation et amplification de plasmides chez E. coli :	164
V.3.b -	Préparation des cellules compétentes de S. aureus :	164
V.3.c -	Transformation des cellules de S. aureus :	164
V.3.d -	Construction des souches	165
V.4.	<i>Analyse de l'expression des cibles de l'ARNIII</i>	165
V.4.a -	Culture bactérienne	165
V.4.b -	Détection des ARN par Northern blot :	166
V.4.c -	Détection des protéines par western blot :	167
V.5.	<i>Etude de la fonction de RsaD</i>	169
V.5.a -	Expériences de stress NO	169
V.5.b -	Expériences de chromatographie d'affinité MAPS	169
V.5.c -	Expériences de protéomique comparative	170
V.6.	<i>Etude de la fonction de RsaI</i>	171
V.6.a -	Transcription in vitro	171
V.6.b -	Traduction in vitro	173

---

<b>VI -</b>	<b>Références Bibliographiques</b>	<b>175</b>
<b>VII -</b>	<b>Annexes</b>	<b>191</b>
VII.1.	<i>Annexe 1</i>	193
VII.2.	<i>Annexe 2 - inhibition de la traduction du messenger icaR par des expériences de traduction in vitro.</i>	196
VII.3.	<i>Annexe 3 - L'interaction RsaI/ RsaG n'affecte pas le taux des deux ARNnc</i>	197
VII.4.	<i>Annexe 4 – S1 n'affecte pas la stabilité de RsaI</i>	198
VII.5.	<i>Annexe 5 - Liste complète des ARN retrouvés avec MS2-RsaI par les expériences de MAPS</i>	199
VII.6.	<i>Annexe 6 - Résultats de transcriptomique comparative entre la souche HGOO1<math>\Delta</math>rsal et la souche HGOO1<math>\Delta</math>rsal Pcn51-rsal</i>	207

---

# I - Introduction

---

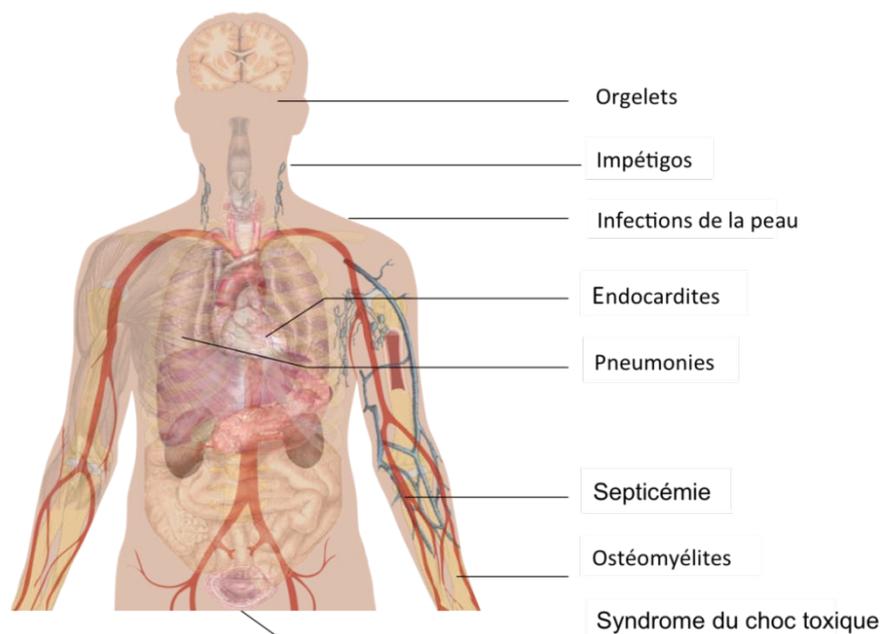


## ***1.1. Staphylococcus aureus***

### ***1.1.a - Une Bactérie pathogène opportuniste redoutable.***

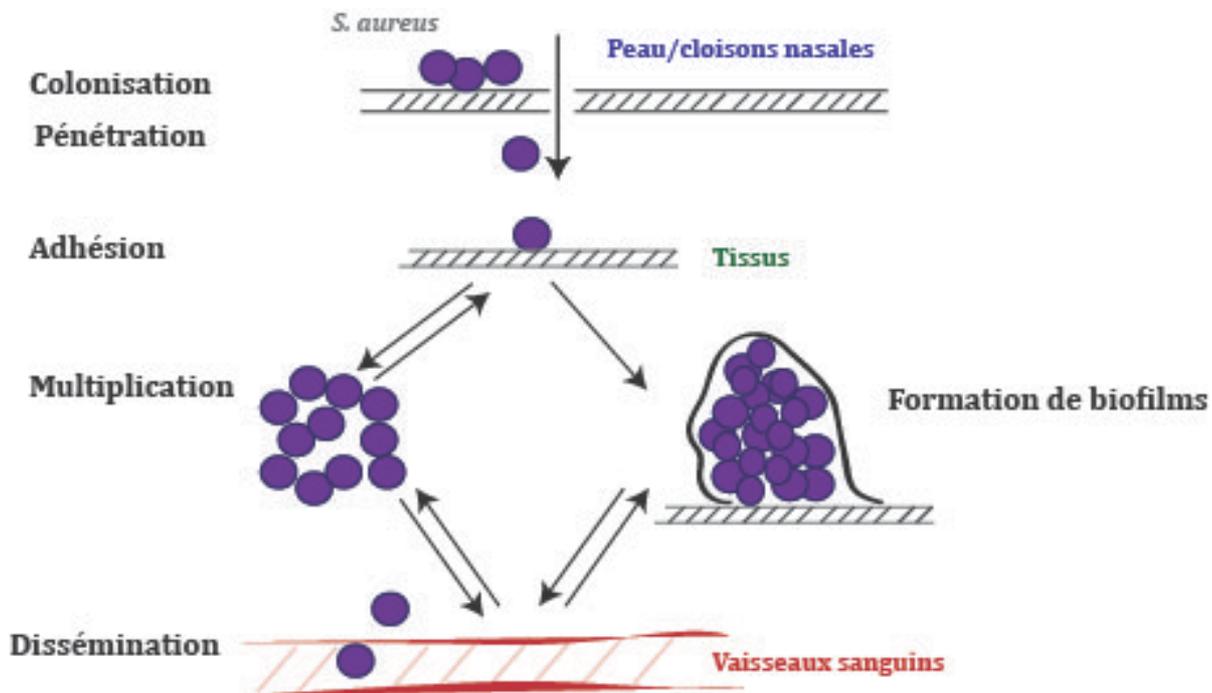
*Staphylococcus aureus* est une bactérie pathogène opportuniste de l'homme qui se distingue par son extraordinaire pouvoir virulent. *S. aureus* provoque de nombreuses maladies, allant des plus bénignes comme les impétigos ou les furoncles, à des maladies plus graves tel que des pneumonies, des ostéomyélites, des endocardites (**figure1**).

*S. aureus* est également responsable du syndrome du choc toxique, une infection aiguë et fatale dans 10% des cas, provoquée par la diffusion de la toxine TSST-1 dans l'organisme et pour lequel il n'existe pas encore de traitement.



**Figure 1 : Maladies associées à *S. aureus*.** *S. aureus* possède un large spectre d'infection. On peut distinguer plusieurs types d'infections, les infections localisées, (furoncles, orgelets, ostéomyélites, pneumonies, endocardites), les infections généralisées (septicémie, syndrome du choc toxique), les infections communautaires : (sinusites, infections urinaires) et les intoxications alimentaires plus rares et souvent asymptomatiques.

*S. aureus* profite d'une plaie pour pénétrer et infecter nos tissus. La bactérie adopte soit un mode de vie de colonisation (plutôt défensif) ou un mode de dissémination (offensif) (figure 2).



**Figure 2 : Mode de vie de *S. aureus*.** *S. aureus* colonise la peau et les muqueuses nasales, adhère aux matrices cellulaires de l'hôte, se dissémine dans les tissus et organes, lorsqu'il passe la barrière cutanée ou pénètre dans les vaisseaux sanguins, ou forme des biofilms entraînant souvent des infections suppurées.

Le pouvoir virulent de *S. aureus* s'explique notamment par ses mécanismes de résistance aux défenses immunitaires de l'hôte. Au niveau cellulaire, *S. aureus* forme une capsule de fibrine le protégeant des cellules de l'immunité et des molécules antibactériennes. Lors de stress environnementaux, comme les traitements antibiotiques ou les agents antimicrobiens, *S. aureus*, comme de nombreuses bactéries pathogènes, a la capacité de former des biofilms sur des surfaces (biotique ou non). Ce dernier point constitue un problème de santé publique, en particulier dans le milieu hospitalier ou l'usage de cathéters et de prothèses est fréquent (Lopez *et al*, 2010). L'émergence de souches résistantes aux antibiotiques ainsi que la rapidité d'adaptation de *S. aureus* à son environnement, accentue son pouvoir virulent et fait de cette bactérie une menace permanente pour l'homme.

### I.1.b - Les facteurs de virulence de *S. aureus*.

Le vaste répertoire de facteurs de virulence de *S. aureus* (tableau 1) lui permet d'adhérer à de nombreuses matrices extracellulaires et de créer une infection dans tous les tissus de notre organisme. Ces facteurs lui permettent également d'acquérir des nutriments en détruisant les cellules et de contrecarrer notre système immunitaire (Foster, 2005).

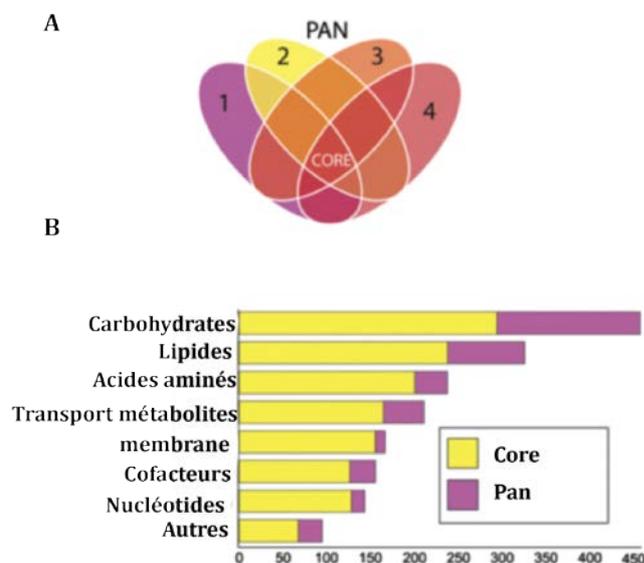
	facteurs de virulence	Gène	Fonctions	Références
Super-antigènes	Entérotoxine A Entérotoxine B Entérotoxine C Entérotoxine D Entérotoxine G Entérotoxine H	<i>sea</i> <i>sab</i> <i>sec</i> <i>sed</i> <i>seg</i> <i>seh</i>	Suractivation des lymphocytes T via ciblage des récepteurs CMH (Complexe Majeur d'histocompatibilité) de type II	Foster <i>et al.</i> , 2005
	Toxic shock syndrome toxin-1	<i>TSST-1</i>	Idem, à l'origine du syndrome foudroyant du choc toxique	Lappin <i>et al.</i> , 2009
	Pro. d'adhérence extracellulaire	<i>Eap</i> <i>/Map</i>	Rôle dans la liaison aux protéines du plasma Modulation du système immunitaire (via liaison au récepteur ICAM-1)	Harraghy <i>et al.</i> , 2003
	Exfoliatine A Exfoliatine B Exfoliatine D	<i>eta</i> <i>etb</i> <i>etd</i>	Suractivation des LT dans le cas de SSSS (Staphylococcal Scaled Skin Syndrom) Activité protéase au niveau des desmosomes des cellules épithéliales (perte d'adhésion)	Plano <i>et al.</i> , 2004
Hémolysines Leucocidines	Hémolysine $\alpha$	<i>hla</i>	Homo-heptamère, formation de pores chez les leucocytes	Menestrina <i>et al.</i> , 2003
	Hémolysine $\delta$ Hémolysine $\gamma$	<i>hld</i> <i>hlg</i>	Formation de pores chez les leucocytes /érythrocytes	
	Leucocidine AB Leucocidine ED	<i>lukAB</i> <i>lukED</i>	Formation de pores chez les leucocytes	Kaneko <i>et al.</i> , 2004 Lo <i>et al.</i> , 2011
	Panton Valentine leucocidine	<i>pvl</i>	Formation de pores chez les leucocytes, CA et HA-MRSA avec cette toxine	
Facteurs d'adhésion	Protéine A	<i>spa</i>	Inactivation du système immunitaire (liaison IgG/IgM) Induit sécrétion d'histamine par les basophiles	King <i>et al.</i> , 1981 Gomez <i>et al.</i> , 2004
	Collagène Binding protein	<i>cna</i>	Formation de pores chez les leucocytes /érythrocytes	Kaneko <i>et al.</i> , 2004 Lo <i>et al.</i> , 2011
	Clumping factor A Clumping factor B	<i>cjfA</i> <i>cjfB</i>	Liaison au fibrinogène, inhibition des opsonines	Foster <i>et al.</i> , 2005
	Fibrinogen binding protein A/B	<i>fnbpA</i> <i>fnbpB</i>	Adhésion, invasion de phages non professionnels	Menzies <i>et al.</i> , 2003
	Extracellular FnBP	<i>efb</i>	Bloque l'adhésion des neutrophiles, diapédèse	Ko <i>et al.</i> , 2011
	Coagulase	<i>coa</i>	Adhésion	Giraud <i>et al.</i> , 1997
	Bone sialoprotein binding protein	<i>sdr</i>	Rôle dans la liaison de <i>S. aureus</i> au niveau des ostéoblastes	Tung <i>et al.</i> , 2010
Enzymes	Staphylokinase	<i>ska</i>	Activation du plasminogène, neutralisation des défenses	Bokarewa <i>et al.</i> , 2006
	Chemotaxis inhibitory protein of staphylococci	<i>CHIPS</i>	Inactivation des récepteurs FP (formyle peptide) et des récepteurs C5a. modulation du système immunitaire	Wright <i>et al.</i> , 2007
	Protéines capsulaires 5 et 8 Protéase	<i>cps</i> <i>sspA</i> <i>sspB</i> <i>V8</i>	Résistance à la phagocytose, persistance sanguine	O'Riordan <i>et al.</i> 2004
	Auréolysine	<i>aur</i>	Dégradation des Ig Inactivation des inhibiteurs de protéinase du plasma	Gustafsson <i>et al.</i> , 2008
	Lipase Glycerol ester hydrolase	<i>lip</i> <i>geh</i>	Métabolisme des lipides	Rosenstein 2000

**Tableau 1 : Principaux facteurs de virulence caractérisés chez *S. aureus*.** Le tableau ci dessus représentent les principaux facteurs de virulence de *S. aureus* caractérisés à ce jour. Ils peuvent être classés en différentes catégories suivant leur mode d'action. Les facteurs d'adhésion comprennent deux grandes familles : les protéines de surface (MSCRAMMs (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*)) et les protéines excrétées (SERAM (*secretable expanded repertoire adhesive molecules*)) (d'après la thèse de C. Romilly, 2012).

La colonisation de la muqueuse des cloisons nasales, qui reste le réservoir principal de *S. aureus*, représente un facteur de risque élevé pour les infections (Honda *et al*, 2010) Au cours de leur vie, 20% de personnes n'auront jamais été porteur de *S. aureus*, parmi les 80 % restant, environ 20% sont des porteurs permanent, et 60% des porteurs intermittents (Kluytmans *et al*, 1997)

Cette colonisation requiert l'expression de facteurs spécifiques d'adhésion comme les *clumping factors* A et B. *S. aureus* est également capable de résister aux peptides antimicrobiens sécrétés par l'hôte et présents dans la muqueuse nasale, par la production d'auréolysines et de la staphylokinase. Malgré la caractérisation de ces facteurs facilitant cette colonisation, aucune condition environnementale n'explique la prédisposition d'un individu à être porteur de *S. aureus*. De nombreuses études cliniques ont été menées afin de comprendre si ce microenvironnement présentait des conditions optimales pour la croissance de *S. aureus*. La muqueuse des cloisons nasales est riche en urée mais pauvre en acides aminés, glucose ou autres mono- et disaccharides. La concentration et la nature des nutriments dans ces muqueuses varient d'un individu à un autre et aucune différence significative n'a pu être montrée dans la composition des sécrétions entre porteurs et non porteurs de *S. aureus* (Krismer *et al*, 2014). L'explication de ce tropisme s'oriente dans l'étude des relations hôtes-pathogène et l'identification des facteurs bactériens favorisant la colonisation. Toutefois la diversité des nutriments retrouvés dans les muqueuses nasales, indique que *S. aureus* est capable de s'adapter à de nombreuses conditions métaboliques. En effet, des analyses du métabolome montrent une augmentation de l'expression des gènes dans les voies de biosynthèse des acides aminés lors de la colonisation du nez. L'inactivation de ces voies augmente d'ailleurs l'activité protéolytique extracellulaire de *S. aureus* en conditions *in vitro* (Shaw *et al*, 2006). La diversité des spécificités de clivage des exotoxines de *S. aureus*, a pour conséquence une multiplicité des produits de dégradation et permet l'acquisition de nombreux nutriments.

Au cours de l'évolution, *S. aureus* a acquis de nombreux facteurs de virulence en particulier par l'acquisition d'éléments mobiles (Qin *et al*, 2016). Ces gènes sont souvent conservés à travers les différentes souches recensées, même si leur expression varie d'une souche à l'autre. Afin de comprendre pourquoi certaines souches de *S. aureus* sont plus virulentes que d'autres, de nombreuses études utilisent une analyse génomique à grande échelle, en comparant le génome de différents isolats de *S. aureus* provenant de diverses niches écologiques, incluant des souches multi résistantes aux antibiotiques. On peut alors distinguer, dans ces analyses, les gènes conservés entre toutes les souches, que l'on appelle le *coregenome*, ainsi que le *pangenome*, qui décrit la gamme complète de gènes dans une espèce. (Figure 3A). Une récente étude d'analyse génomique menée par Bosi *et al*, 2016, a montré que le *coregenome* de *S. aureus* est composé de 1441 gènes et le *pangenome* de 7411. Cette étude a été réalisée sur une totalité de 64 souches de *S. aureus*. Ce qu'il ressort de ces analyses est que les gènes du métabolisme sont très conservés au sein du *coregenome* et représentent également les gènes les plus diversifiés dans le *pangenome*. (Figure 3B).



**Figure 3 : Etude de la variabilité du génome de *S. aureus*.** (A) représentation simplifiée du *coregenome* et *pangenome* avec n=4, les différentes couleurs, associées à un numéro, représentent un génome d'une souche donnée. Le *coregenome* est au centre en rouge, et représente les gènes conservés entre les différentes souches. Le *pangenome* comprend tous les autres gènes. (B) résultats de l'étude du génome sur les 64 souches de *S. aureus*. En jaune sont représentés les gènes du *coregenome* et en violet ceux appartenant au *pangenome* (Figure modifiée d'après Bosi *et al*, 2016).

La variabilité du *pangenome* se retrouve essentiellement dans les voies métaboliques en particulier dans le métabolisme carboné, des lipides et des acides aminés (**Figure 3**). Ces études illustrent la diversité métabolique entre les différentes souches de *S. aureus*, ce qui peut expliquer la capacité de *S. aureus* à coloniser de nombreuses niches écologiques (Bosi *et al*, 2016).

### **I.1.c - *S. aureus* chez les personnes diabétiques**

Les personnes diabétiques représentent la communauté la plus touchée par les infections de *S. aureus*. Le taux de colonisation dans les cloisons nasales est d'ailleurs plus important chez ces personnes que dans le reste de la population (Tamer *et al*, 2006 ; Muller *et al*, 2005) Le diabète de type II, est caractérisé par une hyperglycémie chronique incontrôlée. Le nombre de personnes diabétiques augmente de manière alarmante et constante chaque année (*international diabetic federation*). L'infection du pied est la première cause d'hospitalisation des patients diabétiques. Ces infections sont poly-microbienne, *S. aureus* étant l'espèce dominante dans la plupart des cas (Bravo-Molina A, 2016). La perte de sensibilité des membres inférieurs chez ces patients, contribue largement à une négligence d'une blessure ou d'une petite infection qui s'aggrave en absence de traitement. Lorsque *S. aureus* passe la barrière de la peau et pénètre dans les tissus de l'hôte, les cellules sont confrontées à une forte diminution en oxygène et une forte concentration de glucose (glucose sanguin 0,8-1,2 g/L). En conditions infectieuses, les bactéries vont adapter leur métabolisme à cet environnement plus riche.

Les recherches cliniques montrent que l'hyperglycémie incontrôlée des personnes diabétiques favorise les infections de *S. aureus* d'une manière très significative que ce soit dans l'expression des facteurs de virulence ou dans la formation des biofilms, (Bravo-Molina *et al*, 2016) (Rich & Lee, 2005).

Les réactions chimiques des voies métaboliques étant très conservées parmi les organismes vivants, l'intérêt serait de comprendre quelles sont les stratégies de régulation qui expliquent la versatilité de *S. aureus*. Au cours de l'évolution, cette bactérie semble avoir optimisé toutes ses voies de **régulation du métabolisme carboné pour s'adapter rapidement à ses environnements multiples et survivre.**

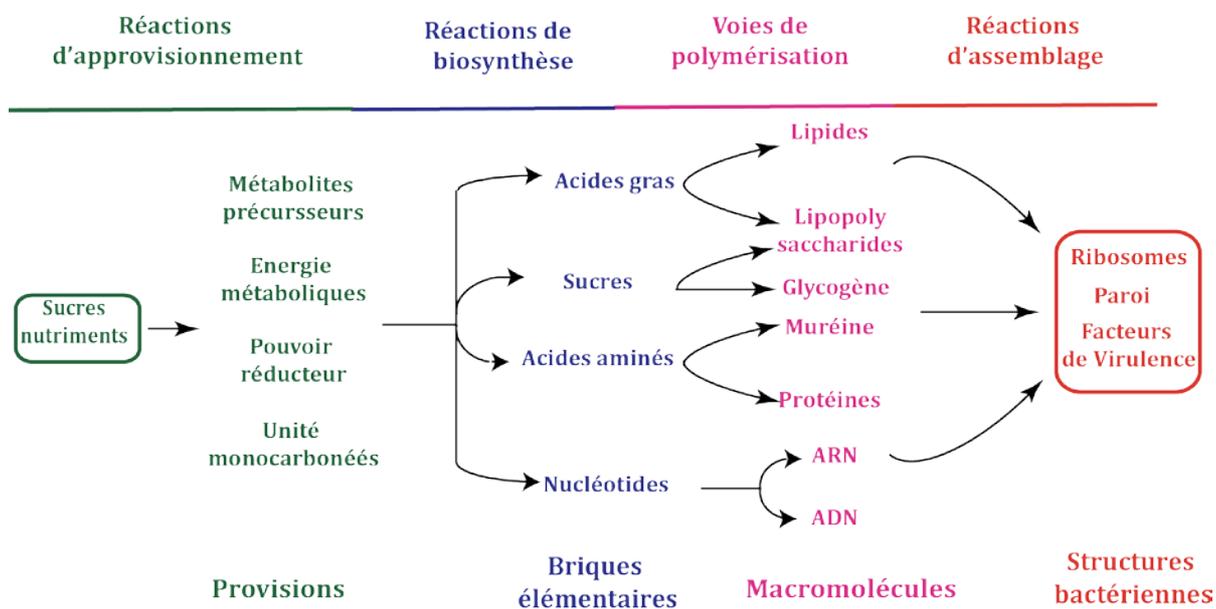
De part la singularité et la complexité des mécanismes de régulation mis en jeu, c'est à travers divers exemples que j'ai fait le choix d'apporter la démonstration du **lien étroit entre le métabolisme et la virulence** et plus particulièrement l'importance de la **disponibilité du glucose en conditions infectieuses.**

Les réactions du métabolisme sont universelles parmi les organismes vivants, avec toutefois une logique de fonctionnement qui diffère entre organismes uni et pluricellulaires. Chez les organismes unicellulaires, comme les bactéries, le métabolisme est orienté vers la production de biomasse et non d'énergie. Cette notion est importante pour saisir le fonctionnement général du métabolisme bactérien. Une description générale du métabolisme carboné de *S. aureus* permettra également une meilleure compréhension des mécanismes de régulation qui seront décrits par la suite.

## I.2. Aperçu du Métabolisme carboné de *S. aureus*

Le métabolisme se décompose en quatre parties distinctes :

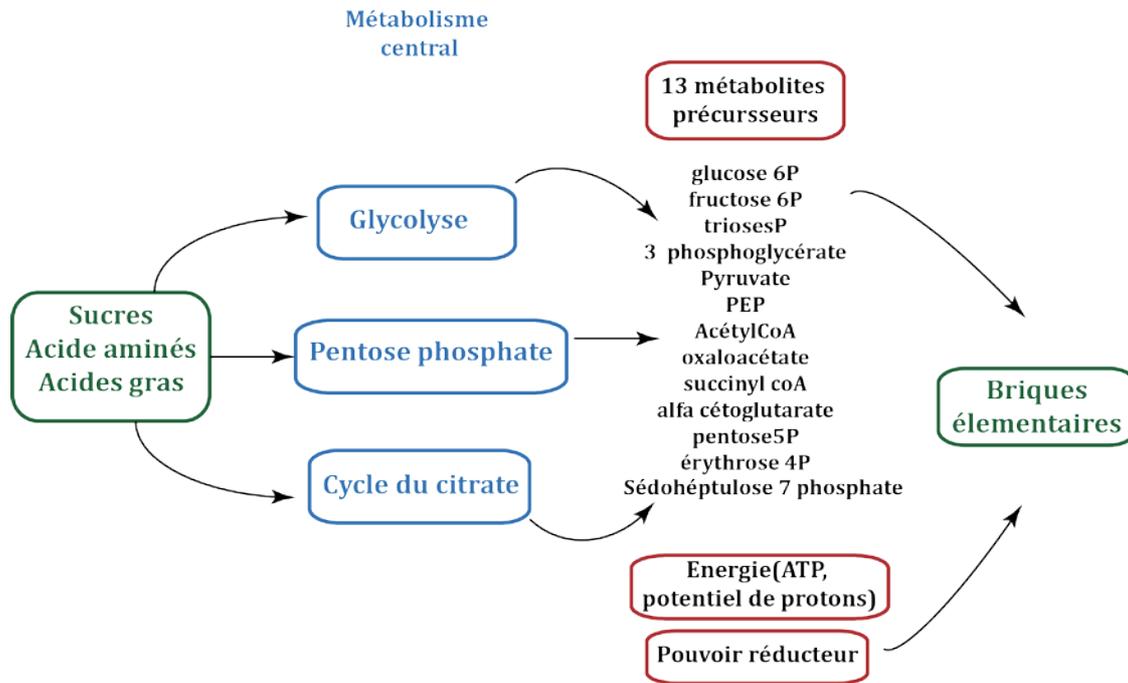
1. les réactions d'approvisionnement, qui permettent aux cellules de produire 13 métabolites précurseurs et l'énergie nécessaire pour l'ensemble du métabolisme,
2. les réactions de biosynthèse, qui permettent d'obtenir les briques élémentaires (acides gras, sucres, acides aminés, nucléotides),
3. les voies de polymérisation qui à partir des briques élémentaires produisent les macromolécules,
4. les réactions d'assemblage permettent la synthèse des structures bactériennes (ribosomes, parois etc.) à partir des macromolécules (**figure 4**).



**Figure 4 : Schéma représentatif des quatre parties du métabolisme :** Ce schéma montre que les réactions du métabolisme peuvent être divisées en 4 parties ; les voies d'approvisionnement (vert), les réactions de biosynthèses (bleu), les réactions de polymérisation (rose) et les réactions d'assemblage (rouge). Les nutriments approvisionnant le métabolisme ainsi que les produits des réactions d'assemblage varient d'une espèce bactérienne à une autre en fonction de leur métabolisme et de leur niche écologique.

Au cœur des réactions d'approvisionnement se trouve le métabolisme central, regroupant toutes les réactions chimiques permettant de fournir à la cellule les 13 métabolites précurseurs, du pouvoir réducteur (électrons sous une forme utilisable) et de l'énergie (potentiel de proton et ATP) à partir de nutriments.

A tout moment la survie des bactéries dépend du maintien de la concentration intracellulaire de ces trois composants. Le métabolisme central regroupe la voie de la glycolyse, la voie des pentoses phosphate, et le cycle du citrate (figure 5).



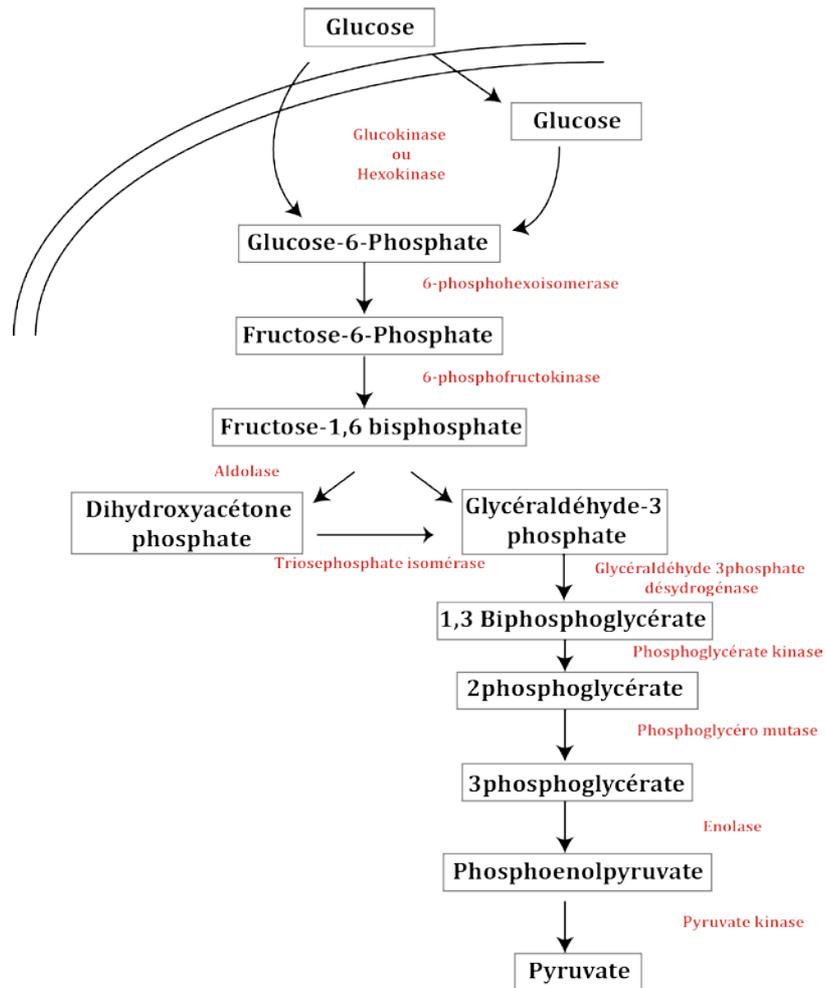
**Figure 5 : Schéma général du métabolisme central.** Le métabolisme central regroupe la voie de la glycolyse, la voie pentose phosphate et le cycle du citrate. Il permet de fournir à la cellule les 13 métabolites précurseurs, du pouvoir réducteur et de l'énergie et conduit à la synthèse des briques élémentaires (modifié d'après Richardson, 2015).

Les bactéries prototrophes (bactéries n'ayant pas besoin de facteurs de croissance pour croître) sont capables de synthétiser les macromolécules dont elles ont besoin à partir de 12 métabolites précurseurs. Les bactéries à Gram négatif nécessitent un 13<sup>ème</sup> métabolite précurseur, le sedoheptulose-7-phosphate, essentiel à la biosynthèse du LPS (lipopolysaccharide) de la membrane externe (Taylor *et al*, 2008) mais retrouvé également chez les bactéries à Gram positif et récemment considéré comme le 13<sup>ème</sup> métabolite précurseur.

Les réactions chimiques du métabolisme central sont très conservées parmi les organismes vivants. Les principales différences se trouvent dans la diversité des voies d'approvisionnement des nutriments. Au cours de l'évolution, en réponse aux contraintes environnementales, certaines bactéries ont perdu une partie des voies de leur métabolisme central. *S. aureus* et d'autres bactéries pathogènes comme *Bacillus anthracis* ont conservé leurs voies métaboliques complètes ce qui leur procure un avantage considérable pour s'adapter à de nouveaux environnements et pouvoir survivre en dehors de l'organisme hôte (Richardson *et al*, 2015).

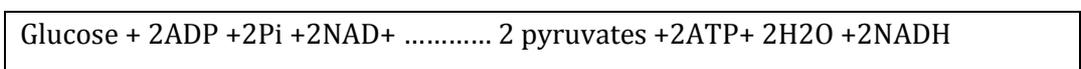
### **1.2.a - La glycolyse**

La glycolyse est la première voie du métabolisme central, impliquée dans le catabolisme des carbohydrates. Les réactions chimiques qui la composent sont présentes, au moins en partie, dans tous les organismes vivants et les enzymes glycolytiques sont les plus conservées dans l'histoire de l'évolution. Son fonctionnement est indépendant de la présence ou non d'oxygène. Cette voie métabolique a certainement existé avant que l'oxygène soit présent dans notre atmosphère terrestre et donc au début de l'évolution des espèces vivantes (Fothergill-Gilmore, 1993). La glycolyse produit 7 des 13 métabolites précurseurs nécessaires à l'élaboration des briques élémentaires (glucose-6-phosphate, fructose-6-phosphate, dihydroxyl-acetone-phosphate, glycéraldéhyde-3-phosphate, phosphoenolpyruvate (PEP), pyruvate, et acétyl coenzyme A). Cette voie est alimentée par les carbohydrates phosphorylés. *S. aureus* est capable d'utiliser la plupart des sources carbonées pour se développer (glucose, fructose, galactose, mannose, maltose, ribose, sucrose, tréhalose etc.) mais également des alcools (mannitol), des acides organiques (acétate) et des acides aminés (glutamine et arginine). Une fois importés dans le cytoplasme, les sucres entrent dans la voie de la glycolyse après conversion en fructose-6-phosphate. Les enzymes impliquées dans ces premières réactions dépendent de la nature du sucre **(figure 6)**.



**Figure 6 : Schéma de la glycolyse.** Schéma simplifié de la glycolyse, montrant les principaux métabolites intermédiaires (encadrés) et les enzymes des réactions principales (rouge). Le glucose entre dans la cellule sous forme de glucose-6-phosphate (glucose phosphorylé par les systèmes de transport lors de son import) soit sous forme de glucose simple qui sera phosphorylé à l'intérieur de la cellule.

La glycolyse produit deux molécules de pyruvate à partir d'une molécule de glucose. Le bilan de la glycolyse en condition aérobie ou anaérobie est le suivant :



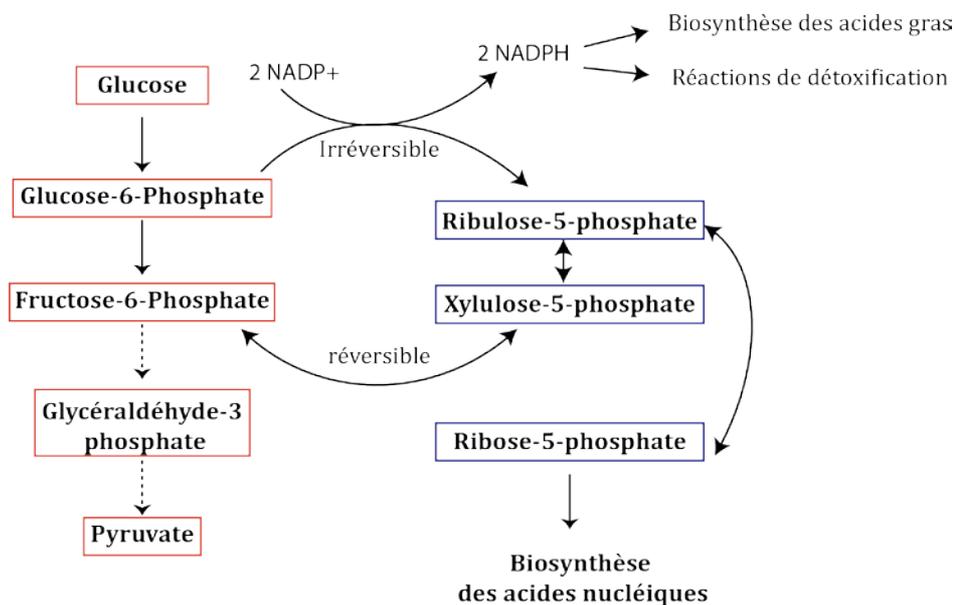
**1.2.b - Le cycle de l'acide citrique**

L'essentiel de l'énergie, nécessaire aux cellules, est fourni par le cycle de l'acide citrique, (encore appelé cycle de Krebs ou cycle TCA) sous forme d'ATP. Cette voie est active en présence d'oxygène et utilise le pyruvate issu de la glycolyse comme métabolite précurseur.

Cette voie est également une source importante de précurseurs pour la synthèse de nombreuses molécules. Les acides  $\alpha$  cétoniques peuvent former des acides aminés après transamination, le citrate est un précurseur de la synthèse des acides gras, le malate peut former du glucose par la voie de la néoglucogenèse. Le cycle de l'acide citrique est régulé suivant les besoins en énergie des cellules, par les métabolites intermédiaires, en particulier le citrate, le taux de NADH,  $H^+$  et par l'ATP.

### 1.2.c - La voie des pentoses phosphate

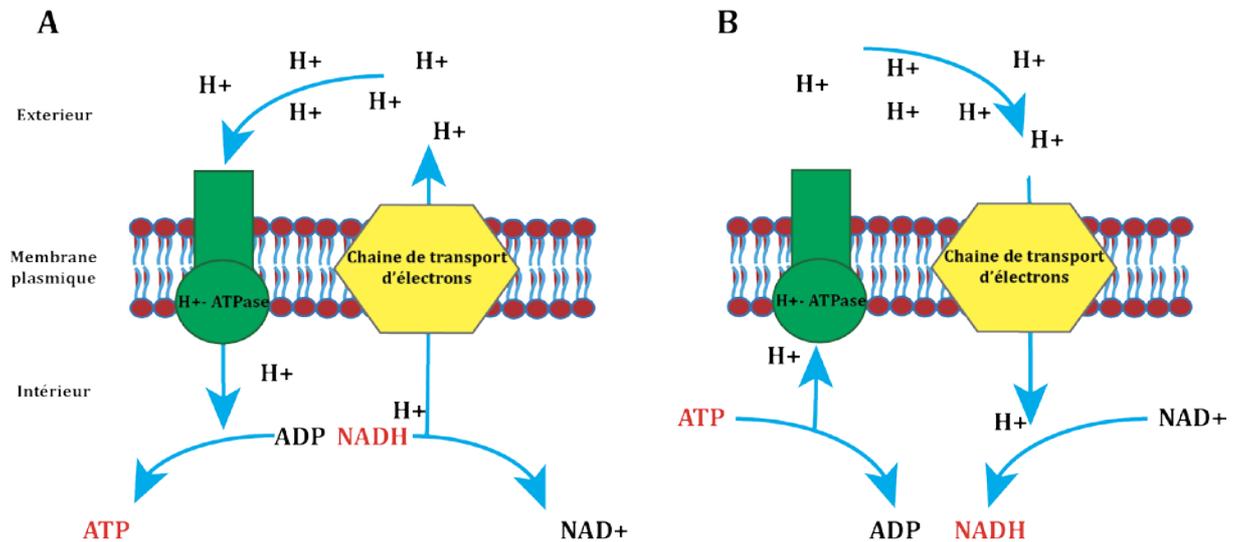
Les rôles principaux de la voie des pentoses phosphate sont de fournir aux cellules du pouvoir réducteur, sous forme de NADPH, nécessaire pour la biosynthèse des macromolécules, ainsi que du ribose-5-phosphate, précurseur de la synthèse des nucléotides, et de coenzymes. à partir de substrats prélevés au niveau de la glycolyse sous forme de fructose-6-phosphate et glycéraldéhyde-3-phosphate (figure 7). Lorsque les bactéries sont en phase de croissance, les besoins cellulaires en ribose-5-Phosphate, sont élevés et lorsque la vitesse de croissance ralentit les enzymes catalysant les réactions de cette voie sont inhibées. Cette voie est active en présence ou non d'oxygène.



**Figure 7 : Voie des pentose phosphate.** Représentation schématique simplifiée de la voie de la glycolyse (orange) et de la voie des pentoses phosphate (bleu). Les flèches en pointillés représentent les intermédiaires, non mentionnés dans ce schéma. La voie oxydative convertissant le glucose-6-Phosphate en ribulose-5-phosphate est irréversible. La voie non oxydative convertissant le glycéraldhéyde-3-phosphate en xylulose-5-phosphate est réversible.

### 1.2.d - Maintient du pouvoir réducteur

L'énergie et le pouvoir réducteur sont totalement inter-convertibles d'un point de vue métabolique. A fortes concentrations de NADH, celui-ci est transformé (NAD) en expulsant un proton hors de la cellule. Les protons peuvent également être importés dans les cellules pour synthétiser de l'ATP (**Figure 8**).



**Figure 8 : schéma simplifié expliquant le potentiel de protons.** La chaîne de transporteur d'électrons est représentée, de manière simplifiée en jaune (voir texte pour explications).

La chaîne de transporteurs d'électrons, (représentée par l'hexagone jaune dans la **figure 8**), plus couramment appelée chaîne respiratoire, est une suite de composés redox qui fait circuler les électrons. Cette chaîne de transport est constituée de plusieurs molécules (flavoprotéines, cytochromes, protéines à noyaux fer-souffre, protéines à cuivre, quinone). Elle est située dans la membrane des bactéries et permet l'import ou l'export de protons. L'entrée des protons dans les cellules s'accompagne d'une synthèse d'ATP qui sera ensuite utilisée pour la majorité des réactions nécessitant de l'énergie.

*S. aureus* est une bactérie aérobie/anaérobie facultative. Lorsqu'elle pénètre dans les tissus de l'hôte, la bactérie doit s'adapter à des changements environnementaux importants. La pression en oxygène passe de 159 mmHg au niveau de la peau (pression de l'oxygène atmosphérique) à 3-5 mmHg au niveau des tissus cellulaires (Ferreira *et al*, 2013). *S. aureus* va donc devoir adapter son métabolisme rapidement pour continuer à se développer.

### **1.2.e - Croissance de *S. aureus* en conditions aérobie et en présence de glucose**

Les analyses des réactions métaboliques en laboratoire permettent de diviser la croissance en deux phases distinctes, la phase exponentielle de croissance et la phase stationnaire. Pendant la phase exponentielle *S. aureus* va cataboliser le glucose présent dans le milieu de culture et fournir à la cellule de grandes quantités d'ATP provenant de la phosphorylation des substrats. La voie de la glycolyse est alors à son maximum. Les enzymes glycolytiques représentent la majorité des protéines synthétisées, viennent ensuite les protéines impliquées dans le métabolisme de l'ADN, de la transcription et de la traduction (Zühlke *et al*, 2016). Le cycle du citrate est au contraire largement réprimé dans ces conditions de cultures.

Les cellules entrent en phase stationnaire lorsque la concentration en nutriments essentiels, comme le glucose, diminue à un niveau critique, qui ne permet plus d'assurer une croissance rapide. Au cours de la phase stationnaire se produit une accumulation de molécules « déchets » comme l'acide lactique ou l'acide acétique. Ces molécules sont inhibitrices pour la croissance de la plupart des bactéries, mais *S. aureus* est capable de les utiliser pour continuer à se diviser si les conditions de croissance sont toujours favorables (température, pH). Dans ces conditions de cultures, les enzymes du TCA vont être activées, permettant de fournir aux cellules de l'ATP, des métaboliques intermédiaires ainsi que du potentiel redox.

### **1.2.f - Mode fermentaire en conditions infectieuses**

Lorsque *S. aureus* pénètre dans les tissus de l'hôte, la concentration en oxygène est très limitée. L'adaptation aux conditions anaérobie passe par le maintien du potentiel redox,  $NAD^+ / NADH$ . En condition d'anaérobie, il y a une accumulation de NADH dans les cellules ce qui a pour conséquences l'inhibition de l'enzyme glyceraldéhyde-3P-déshydrogénase de la glycolyse (figure 6). Lors d'une phase d'adaptation, *S. aureus*, réduit sa consommation de glucose pour limiter l'accumulation de NADH, puis le métabolisme passe en conditions fermentatives (Feirreira *et al*, 2013). Le facteur de transcription Rex répond à la concentration intracellulaire en  $NADH/NAD^+$  et va être indispensable pour le passage d'un mode aérobie à un mode fermentatif (mécanismes d'action décrits dans chapitre III).

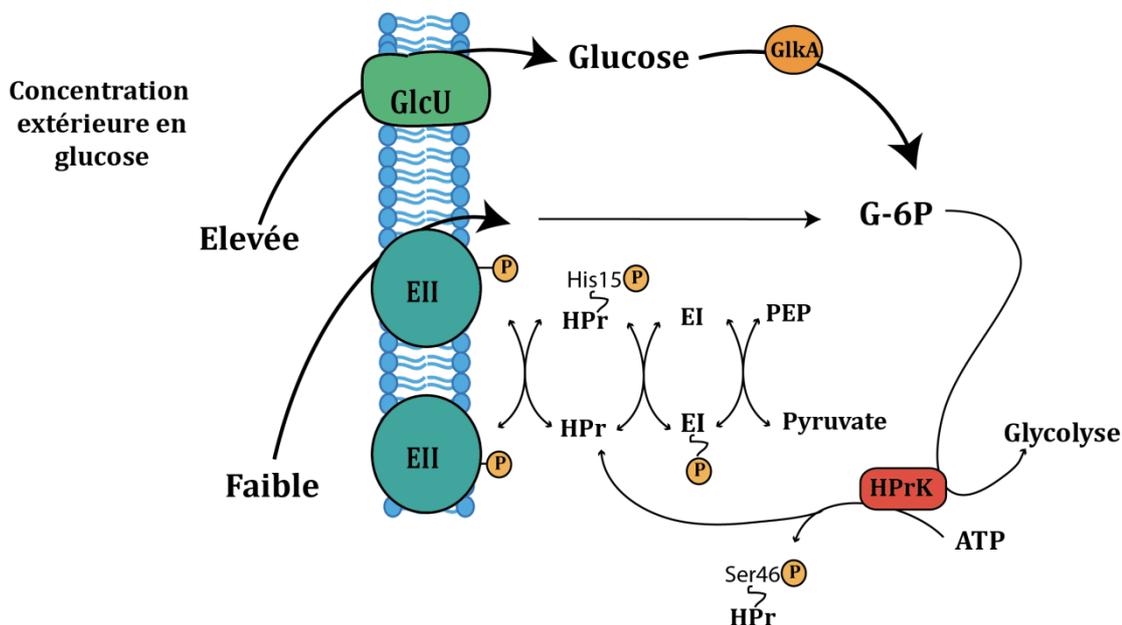
En conditions de fermentation les enzymes de la glycolyse et les enzymes fermentaires augmentent de façon significative dans la cellule (Zühlke *et al*, 2016). Le lactate est le produit final excrété le plus abondant par rapport à l'acétate, l'éthanol et le butyrate. En condition d'anaérobie, *S. aureus* va donc préférer une fermentation lactique qui consiste à réduire le pyruvate en acide lactique, engendrant la réoxydation du NADH en NAD<sup>+</sup> et ainsi compenser le pouvoir rédox pour continuer à fournir de l'énergie aux cellules. La production de lactate est accompagnée de la formation de mannitol qui constitue une voie de recyclage du NAD<sup>+</sup> supplémentaire. La fermentation consomme 4 fois plus de glucose que le métabolisme aérobie, pour un même rendement énergétique. Lorsque le milieu de culture est dépourvu de glucose ou d'autres sources carbonées, pouvant rentrer dans le cycle de la glycolyse, les cellules ne peuvent plus procéder à la fermentation et meurent. Si des acides aminés sont disponibles dans le milieu de culture, *S. aureus* peut les utiliser comme source de carbone, mais à long terme ces voies cataboliques ne compensent pas la perte d'énergie occasionnée par l'arrêt de la glycolyse et ne suffisent pas au maintien de la croissance cellulaire.

Les bactéries favorisent la consommation des sources carbonées qu'elles peuvent cataboliser rapidement et qui leur permet une croissance optimale. Le glucose est la source carbonée dite « préférée » de nombreuses bactéries dont *S. aureus*. La présence du glucose dans l'environnement engendre le phénomène de répression catabolique des autres sources carbonées. Ce phénomène s'appelle "*carbon catabolic repression*" CCR et consiste à réprimer toutes les voies métaboliques non requises pour la croissance bactérienne. Ce système CCR régule 5 à 10 % des gènes totaux des bactéries (Görke et Stülke, 2008). Cette capacité à sélectionner une source de carbone plutôt qu'une autre, est un atout majeur dans la compétition inter espèce dans un écosystème et ceci est particulièrement vrai pour les bactéries pathogènes. Ces mécanismes de répression prennent place dès l'entrée des carbohydrates dans les cellules et constituent les premières voies de régulation des gènes de *S. aureus*.

### 1.2.g - Entrée du glucose dans la cellule

Pour importer les sucres dans la cellule, les bactéries utilisent principalement les systèmes PTS (*phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system*). Ces transporteurs permettent l'import et la phosphorylation simultanée des carbohydrates. Trois enzymes participent à ce mécanisme de transport : EI, EII et HPr. EI et HPr sont des protéines solubles cytoplasmiques communes aux autres systèmes PTS de nombreux sucres, alors que l'enzyme EII est spécifique du sucre transloqué (Somerville 2015). Au cours de l'évolution, *S. aureus* a acquis de nombreux transporteurs de carbohydrates spécifiques ce qui explique la diversité des sources carbonées que cette bactérie peut utiliser (Gill *et al*, 2005). 15 protéines codant des enzymes EII ont été identifiées au total jusqu'à présent.

L'entrée des sucres entraîne une cascade de phosphorylation qui commence par l'autophosphorylation de l'enzyme EI. Le phosphate est ensuite transféré à HPr sur son résidu histidine en position 15. HPr transfère le phosphate sur EII qui lui-même va le transférer au sucre entrant (**Figure 9**). Le donneur de phosphate dans les systèmes PTS est en général le phosphoenolpyruvate (PEP).



**Figure 9 : Schéma simplifié des deux systèmes de transport du glucose chez *S. aureus*.** Le système PTS est utilisé par *S. aureus* lorsque la concentration en glucose dans le milieu est faible. Le glucose est phosphorylé dès son entrée par l'enzyme EII. En concentration élevée de glucose, les perméases importent le glucose qui sera phosphorylé par GlkA. L'augmentation de la voie de la glycolyse active la kinase HPrK qui phosphoryle HPr en Ser46 (d'après Görke & Stülke, 2008).

Les systèmes PTS sont utilisés par la cellule lorsque la concentration extérieure en glucose est faible. Lorsque cette concentration est forte, *S. aureus* utilise un système de transport supplémentaire, les perméases, qui sont des systèmes de transport actifs secondaires utilisant la force proton motrice pour fonctionner (figure 8). Des analyses transcriptomiques ont récemment mis en évidence 10 transporteurs de carbohydrates uniques à l'espèce *S. aureus* dont 4 spécifiques du glucose. Parmi eux, il y a les transporteurs PTS GlcA et GlcB et la perméase GlcU (Vitko *et al*, 2016). GlcU importe le glucose qui sera phosphorylé à l'intérieur de la cellule par l'enzyme GlkA. Lorsque le flux entrant de glucose augmente, la concentration en Fructose 1,6 biphosphate et en ATP augmentent également. Cela conduit à l'activation de la kinase HPrK qui phosphoryle HPr mais sur un résidu Serine en position 46 (HPr-Ser46).

Les mécanismes de répression catabolique (CCR) diffèrent suivant les bactéries. Chez *E. coli* par exemple, l'import du glucose va augmenter la transcription des gènes impliqués dans le catabolisme du glucose, alors que chez *Bacillus subtilis* cela va engendrer une répression des gènes impliqués dans le métabolisme carboné des sources secondaires. La phosphorylation de l'enzyme HPr va jouer un rôle clé dans la régulation du métabolisme carboné. En effet chez les firmicutes, Hpr possède deux sites de phosphorylation, sur son résidu His15, comme décrit précédemment, et sur un autre résidu, la serine en position 46. Hpr-Ser46 ne peut plus se lier avec la protéine EI. (Maurer *et al*, 2004) et lui permet de former un complexe avec le facteur de transcription CcpA (*catabolite control protein*) dont les mécanismes de régulation sont détaillés dans le chapitre suivant.

## **I.3. Régulation du métabolisme et lien avec la virulence**

### ***1.3.a - Les facteurs de transcription liés au métabolisme***

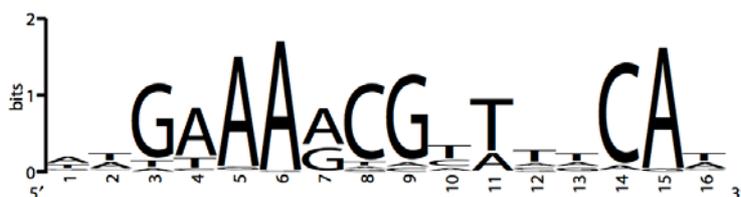
#### ***a.1 CcpA***

CcpA (*catabolite control protein*) est le principal facteur de transcription du catabolisme carboné des bactéries à Gram positif en faible pourcentage G/C. Il fait partie de la famille des répresseurs LacI / GalR et son expression est constitutive tout au long de la croissance bactérienne. CcpA active ou réprime l'expression des gènes du métabolisme mais également des gènes de virulence en fonction du flux d'entrée de

glucose dans la cellule. L'état fonctionnel de CcpA dépend de plusieurs mécanismes de régulation.

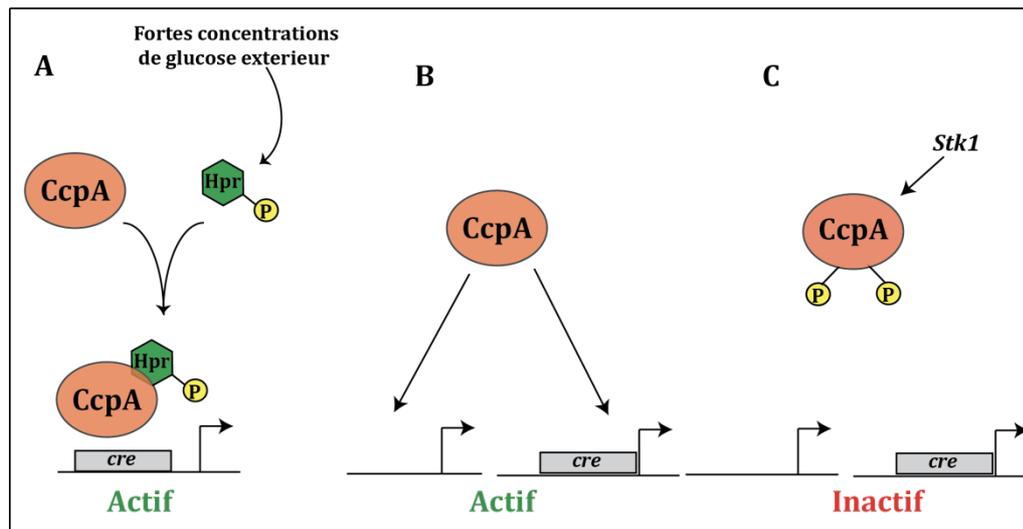
CcpA possède un domaine hélice-tour-hélice qui lui permet de se fixer à l'ADN. Chez *B. cereus*, ce facteur se fixe sur une séquence consensus appelée *cre* (*catabolite responsive element*) (figure 10) (Van Der Voort, 2008). On retrouve ces séquences conservées chez *S. aureus*. La position du motif *cre* dans la région promotrice peut également déterminer l'action d'activateur ou de répresseur de CcpA sur la transcription des gènes cibles.

Lorsque le flux d'entrée du glucose dans la cellule est important, HrpP, phosphorylé en Ser46 forme un complexe avec CcpA ce qui augmente l'affinité de liaison entre CcpA et les séquences *cre* (figure 11A). Les gènes activés par ce mode d'action sont principalement impliqués dans le catabolisme du glucose et les gènes de virulence (Halsey *et al*, 2017).



**Figure 10 : Séquence consensus *cre* identifiée chez *Bacillus cereus* (Van der Voort *et al*, 2008).** La séquence « *cre* » identifiée chez *B. cereus* est longue de 16 nucléotides.

Certains gènes sont régulés par CcpA en absence de sucre et donc sans l'intervention du complexe HPrS46 (figure 11 B). D'autres gènes encore sont régulés par CcpA en absence de séquences *cre* dans leur région promotrice suggérant que CcpA peut agir de manière indirecte en régulant d'autres régulateurs (Seild *et al*, 2009).



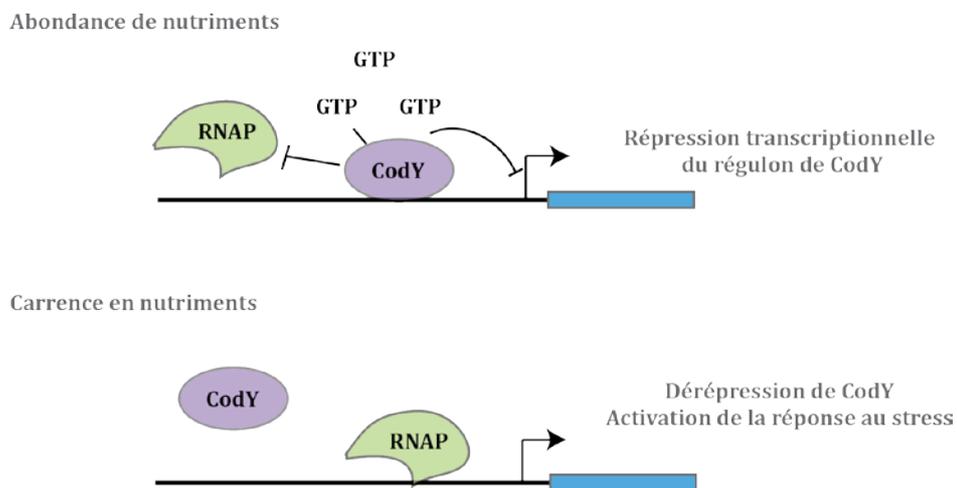
**Figure 11 : Différents états fonctionnels du facteur de transcription CcpA.** Le facteur CcpA peut réprimer ou activer la transcription de nombreux gènes en s'appariant sur des séquences promotrices « *cre* » (B). CcpA forme un complexe avec HprSer46 qui augmente son affinité de liaison aux séquences « *cre* » (A). L'enzyme Stk1 phosphoryle CcpA l'empêchant ainsi de se lier à l'ADN (C).

La serine thréonine kinase, Stk1, impliquée dans divers processus cellulaires comme le métabolisme de la paroi, la sensibilité aux antibiotiques mais également dans la régulation de la virulence, phosphoryle CcpA sur deux résidus thréonines (thr18 et thr33) (figure 11C). Ces résidus sont situés sur le motif hélice-tour-hélice (HTH) de CcpA et leur phosphorylation va inhiber la liaison entre la protéine et l'ADN empêchant ainsi la régulation des gènes cibles (Leiba *et al*, 2012). Les stimuli activant *stk1* n'étant pas à ce jour identifiés, l'inactivation de CcpA par phosphorylation intervient dans des conditions encore inconnues. Les différents mécanismes d'activation et de répression du facteur CcpA montrent la complexité des régulations impliquées dans le métabolisme carboné dès l'entrée du glucose dans la cellule. CcpA est le principal facteur de transcription du métabolisme carboné. Il régule l'expression de nombreux gènes en coordination avec de nombreux autres facteurs qui ont également un rôle primordial pour la réponse adaptative de *S. aureus*.

## a.2 CodY

La réponse stringente est un phénomène physiologique très conservé chez les bactéries qui se produit lorsque la disponibilité des nutriments diminue de l'environnement et en particulier celle des acides aminés. Une série de réactions, impliquant les enzymes RelP, RelQ et RSH, conduit à l'accumulation de molécules appelées alarmones ((p)ppGpp) dans la cellule. La biosynthèse des alarmones réduit le taux intracellulaire de GTP modulant ainsi l'action du facteur de transcription CodY (Dalebroux & Swanson, 2012).

CodY est un répresseur de transcription, conservé parmi les bactéries à Gram positif, qui se fixe sur l'ADN sous forme de dimère pendant la phase exponentielle de croissance, empêchant ainsi la transcription des gènes impliqués dans l'adaptation aux carences nutritives. En phase stationnaire, lorsque les concentrations en acides aminés branchés et en GTP diminuent dans la cellule, l'affinité de CodY pour l'ADN diminue également ce qui conduit à l'induction de son régulon (Geiger and Wolz 2014) (Figure 12). La survie des bactéries, lors d'une carence en acides aminés dans l'environnement, nécessite donc l'action coordonnée entre la réponse stringente et le facteur de transcription CodY (Majerczyk *et al*, 2008).



**Figure 12 : Mode d'action de CodY** (modifiée d'après Dalebroux & Swanson, 2012). Dans des conditions environnementales favorables, CodY se fixe à l'ADN empêchant ainsi la polymérase de se fixer et de transcrire les gènes impliqués dans la réponse stringente. La diminution intracellulaire de GTP dû à la synthèse d'alarmones en conditions de carence nutritive, ne permet plus à CodY de se fixer à l'ADN et l'inhibition de la transcription des gènes cibles est alors levée.

Chez *S. aureus*, CodY régule plus de 200 gènes et opérons impliqués principalement dans le métabolisme des acides aminés. Il va également réprimer indirectement la synthèse de facteurs de virulence comme les exotoxines (Majerczyk *et al*, 2010).

### **a.3 Rex**

Rex est un répresseur transcriptionnel retrouvé dans la plupart des bactéries à Gram positif à faible pourcentage G/C (Richardson *et al*, 2015). Rex répond au taux intracellulaire de NAD<sup>+</sup> /NADH, et se lie à l'ADN sous forme de dimère, dans une région consensus conservée chez *S. aureus* (Pagel *et al*, 2010). Il possède deux domaines distincts, un domaine HTH qui lui permet de se lier à l'ADN et un domaine de liaison NADH (Stickmier *et al*, 2005). NAD<sup>+</sup> favorise sa liaison à l'ADN alors que NADH l'inhibe. Rex régule l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme en condition d'anaérobiose, comme les enzymes de la fermentation (Lactate déshydrogénase). Rex est particulièrement important pour la transition métabolique des cellules d'un mode aérobie à un mode anaérobie.

CcpA, CodY et Rex sont les trois principaux facteurs de transcription qui régulent des gènes impliqués dans les voies du métabolisme central et des gènes de virulence. Chez *S. aureus*, ces trois facteurs se retrouvent souvent connectés aux réseaux de régulation engagés dans des mécanismes de virulence, décrits dans les chapitres suivants.

Des études récentes ont mis en évidence un autre facteur appelé CcpE. Ce facteur de transcription régule des gènes impliqués dans le cycle TCA, dans les mécanismes d'acquisition du fer ainsi que des gènes de virulence (Ding *et al*, 2014). CcpE réprime les facteurs de virulence comme l'hémolysine alpha, et active les gènes requis pour la synthèse de la capsule. Dans un modèle murin, la délétion de CcpE augmente le pouvoir infectieux de *S. aureus* (Hartmann *et al*, 2014). Ce dernier exemple montre le lien direct entre le métabolisme et la virulence de *S. aureus*. Au vu de la diversité des nutriments dans l'environnement de *S. aureus*, on peut supposer que les facteurs de transcription, impliqués dans le métabolisme central, soient nombreux et encore non caractérisés. Le génome de nombreuses souches de *S. aureus* code des protéines ayant un domaine de liaison à l'ADN dont le rôle est encore hypothétique.

### **1.3.b - Les facteurs de transcription impliqués dans la virulence de *S. aureus***

#### **b.1 Le facteur sigma B**

Les facteurs sigma ( $\sigma$ ) guident l'ARN polymérase sur des promoteurs spécifiques pour permettre l'initiation de la transcription de gènes cibles. Le facteur  $\sigma$  impliqué dans la transcription du « *core-génome* » est le facteur  $\sigma A$ . Le génome de *S. aureus* code trois autres facteurs  $\sigma$  ( $\sigma^B$ ,  $\sigma^H$ ,  $\sigma^S$ ) retrouvés dans toutes les souches séquencées à ce jour (Ibarra *et al*, 2013). Chaque facteur  $\sigma$  est spécifique de régions promotrices particulières et leur action indépendante permet la transcription simultanée de gènes impliqués dans différentes fonctions cellulaires en évitant la compétition pour les séquences promotrices.

Le facteur  $\sigma B$  est sans doute le mieux caractérisé à l'heure actuelle. Son expression est régulée au niveau transcriptionnel par de nombreux facteurs de transcription qui diffèrent suivant les souches de *S. aureus*. Le facteur CymR (*cysteine metabolism repressor*) par exemple, impliqué dans la régulation des gènes du métabolisme de la cystéine, réprime le facteur  $\sigma B$  dans la souche RN4220 (Burda *et al*, 2014). Lorsque  $\sigma B$  est exprimé, il est gardé inactif par liaison avec le facteur anti  $\sigma B$ , RsbW. Dans des conditions de croissances normales *in vitro*, l'activité de  $\sigma B$  est observée en fin de phase exponentielle (Giachino *et al*, 2001). En conditions de stress (augmentation de la température ou du pH, exposition à un antibiotique, etc.), RsbW libère  $\sigma B$  qui peut alors exercer ses fonctions régulatrices (Gertz *et al*, 2000).  $\sigma B$  régule des gènes impliqués dans les systèmes de réparation de l'ADN, dans le maintien de l'intégrité de la paroi et dans les voies de synthèses des acides aminés (Somerville, 2015). Les études réalisées sur modèles murins en conditions infectieuses, suggèrent que  $\sigma B$  est impliqué dans la survie de *S. aureus* dans les cellules de l'hôte (Garzoni *et al*, 2007).

#### **b.2 Les facteurs de transcription appartenant à la famille des Sar**

Les facteurs de transcriptions appartenant à la famille des Sar sont des régulateurs très importants chez *S. aureus*. Il en a été dénombré 11 au total (SarA, SarR, SarS, SarT, SarU, SarV, SarX, SarY, SarZ, MgrA et Rot). Cette famille de régulateurs est spécifique au genre des Staphylococcaceae. Le premier facteur ayant été identifié est SarA (*staphylococcal accessory regulator A*). L'expression de SarA est au maximum à la fin de la phase exponentielle de croissance, qui correspond également à l'expression des

gènes de virulence. Ces facteurs peuvent être classés en trois groupes distincts suivant leur structure (Cheung *et al*, 2008). SarA agit soit directement en se liant à l'ADN dans les régions promotrices des gènes cibles, soit de manière indirecte en activant un autre facteur de transcription, AgrA, dont le mécanisme est décrit dans le chapitre suivant. Le tableau ci-dessous résume la fonction des différents facteurs Sar et leur rôle dans la physiologie et la virulence de *S. aureus*. La fonction, les mécanismes de régulation ainsi que l'implication de SarA dans la virulence de *S. aureus* sera présenté à travers différents exemples dans la suite du chapitre introduction.

Facteur de transcription	Fonctions	références
SarA	Activateur /répresseur de la transcription Réseaux de régulation dépendants et indépendants de l'expression d'agr	Manna <i>et al</i> , 1998
SarR	Active agr et SarS ,inhibe SarA	Cheung <i>et al</i> , 2004
SarS	Active l'expression des gènes de surface et de la protéine A Est réprimé par SarA/agr	Tegmark <i>et al</i> , 2000
SarT	Active SarS Répresseur de hla et d'autres exotoxines, réprimé par SarA et AgrA	Cheung <i>et al</i> , 2004
SarU	Active agr Est réprimé par SarT	Cheung <i>et al</i> , 2004
SarV	Régulateur de l'autolyse Est réprimé par SarA/MgrA	Manna <i>et al</i> , 2004
SarX	Active sa propre expression Inhibe agr Est activé par MgrA	Mana <i>et al</i> , 2006
SarY	Fonction inconnue	
SarZ	Active hla, les gènes du biofilm et réprime SarS	Kaito <i>et al</i> , 2006

**Tableau 2 : facteurs de transcription appartenant à la famille des Sar**

### ***b.3*** **Le facteur Rot**

Rot (*repressor of toxins*) est un facteur de transcription activant l'expression des protéines d'adhésion et réprimant celles des toxines et lipases. Rot agit essentiellement en phase exponentielle de croissance et régule plus de 150 gènes (Saïd *et al*, 2003). La régulation de l'expression de Rot varie entre les différents isolats cliniques de *S. aureus* rendant la caractérisation des mécanismes de régulation difficile (Jelsbak *et al*, 2010). Cependant, Rot, est régulé par le facteur AgrA, répondant à la densité cellulaire, (voir chapitre suivant) de façon indirecte par L'ARNIII, dont les mécanismes sont décrits dans la dernière partie de cette introduction. En réprimant l'expression des toxines et en

activant celle des protéines d'adhésion, Rot est au cœur d'un réseau de régulation important, qui permet le passage de *S. aureus* d'un mode d'adhésion à un mode de dissémination.

### 1.3.c - Les systèmes à deux composants

Les systèmes à deux composants sont des régulateurs majeurs permettant aux bactéries de sentir des changements dans leur microenvironnement (pH, température, O<sub>2</sub> etc.) et d'apporter une réponse génétique rapide. La kinase transmembranaire (HK) s'auto-phosphoryle suite à un stimulus extérieur et transfère son groupement phosphate à la protéine régulatrice intracellulaire (RR) à laquelle elle est associée (Stock *et al*, 2000). Le régulateur active ou réprime l'expression des gènes cibles généralement en se fixant directement à l'ADN. *S. aureus* possède 16 systèmes à deux composants à ce jour identifiés (Ibarra *et al*, 2013). Le tableau 3 représente les TCS (Two Component System) les mieux caractérisés chez *S. aureus*.

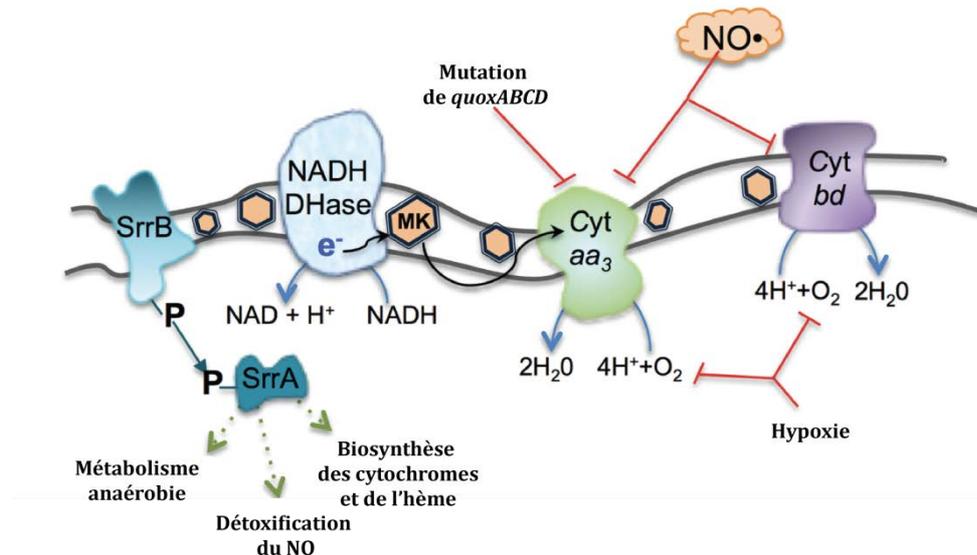
TCS	Senseur	Kinase	Fonction	Références
<b>AgrBCDA</b>	AgrC	AgrA	Régulation des gènes d'exotoxines et d'adhésion	Novick <i>et al</i> , 1993
<b>SaePQRS</b>	SaeS	SaeR	Sensible aux variations de pH et à la concentration en sels, régulation des gènes d'exotoxines et d'adhésion	Jeong <i>et al</i> , 2011
<b>ArlRS</b>	ArlS	ArlR	Remodelage de la membrane, autolyse. Induction de la sialoprotéine osseuse	Fournier <i>et al</i> , 2000
<b>SrrAB</b>	SrrB	SrrA	Homologue à resDE chez <i>B. subtilis</i> adaptation anaérobie Activation des adhésines	Yarwood <i>et al</i> , 2001
<b>LytRS</b>	LytS	LytR	Régulation de l'autolyse	Brunskill <i>et al</i> , 1996
<b>VraSR</b>	VraS	VraR	Induit par des dommages au niveau de la paroi résistance aux antibiotiques	Kuroda <i>et al</i> , 2003
<b>WalKR</b>	WalK	WalR	Métabolisme du peptidoglycane	Delaune <i>et al</i> , 2011
<b>BraSR</b>	BraS	BraR	Induit en réponse à la bacitracine et à la nisine	Hiron <i>et al</i> , 2011
<b>GraSR</b>	GraS	GraR	Impliqué dans la résistance aux antimicrobiens cationiques	Farold <i>et al</i> , 2012
<b>AirSR</b>	AirS	AirR	Rôle dans l'adaptation à l'anaérobiose	Sun <i>et al</i> , 2012
<b>KdpDE</b>	KdpD	KdpE	Induit en réponse à des variations de concentration de K extracellulaire. Régulateur des gènes de virulence	Xue <i>et al</i> , 2011
<b>HssSR</b>	HssS	HssR	Rôle dans la modulation de l'expression des facteurs de virulence chez la souris.	Stauff <i>et al</i> , 2007
<b>HptRS</b>	HptS	HptR	Induit en réponse à de forte concentration de Glucose-6-phosphate.	Park <i>et al</i> , 2015

**Tableau 3 : Principaux TCS caractérisé chez *S. aureus* (modifié d'après la thèse de C. Romilly 2012).** Présentation des principaux systèmes à deux composants, caractérisés chez *S. aureus*. Le dernier système identifié est le système HptRS, répondant au glucose-6-phosphate (Park *et al*, 2015).

Parmi tous ces TCS, seul le système à deux composants WalKR, impliqué dans le métabolisme du peptidoglycane, est essentiel à la croissance de *S. aureus* (Delaune *et al*, 2011)

### c.1 SrrAB premier senseur des stress oxydatifs

Le système à deux composants SrrAB (*staphylococcal respiratory response*) répond à l'absence d'oxygène et à l'oxyde nitrique (NO). Une perturbation dans la chaîne de transporteurs d'électrons par la réduction de la ménaquinone (figure 13) conduit à l'autophosphorylation de SrrB et au transfert du groupement phosphate sur SrrA (Kinkel *et al*, 2013). L'activation de ce TCS va permettre la régulation de nombreux gènes nécessaires pour la survie de la bactérie au sein de l'hôte en réponse à l'hypoxie et aux radicaux monoxyde d'azote (NO) dont les détails seront donnés dans le chapitre suivant.

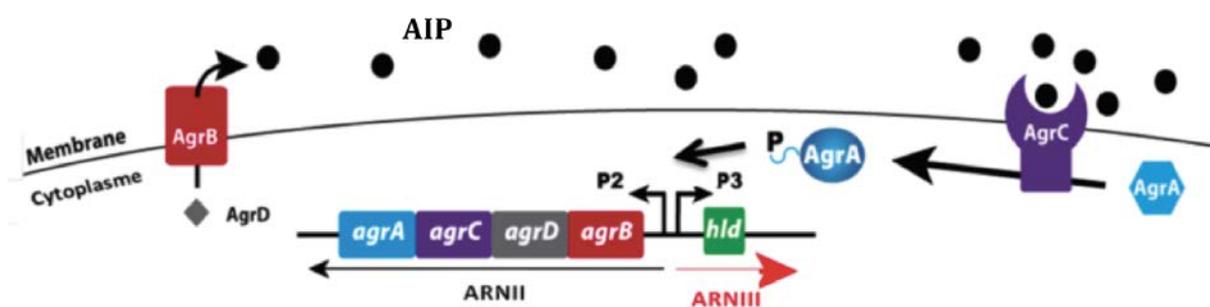


**Figure 13 : Activation du système SrrAB par le stress NO et l'hypoxie.** La perturbation de la chaîne de transporteur d'électrons, composée de cytochromes (cyt bd, Cyt aa3, représentées en vert et violet) de quinones et flavoprotéines (non représentées) entraîne la phosphorylation de SrrB et l'activation de SrrA par transfert du phosphate. SrrA régule plusieurs gènes impliqués dans la réponse NO, dont la synthèse des cytochromes et de l'hème pour le maintien du fonctionnement de la chaîne de transport d'électrons (Figure modifiée d'après Kinkel, 2013)

### c.2 Le système de densité cellulaire agr

*S. aureus* utilise le système *agr* (*accessory gene regulator*) pour sentir la densité cellulaire et coordonner l'expression des gènes de virulence. A faible densité cellulaire, *S. aureus* favorise l'adhésion des cellules aux tissus et lorsque la densité cellulaire atteint

un seuil critique, les facteurs d'adhésion sont rapidement réprimés et après un temps de latence, les toxines sont activées, permettant à *S. aureus* de passer d'un mode d'adhésion à un mode de dissémination. Le locus *agr* est composé de deux unités transcriptionnelles divergentes codant l'ARNII et pour l'ARNIII. L'ARNII code le système à deux composants AgrC/AgrA où AgrC est la kinase membranaire et AgrA le régulateur transcriptionnel, ainsi que pour AgrD et AgrB codant le peptide auto inducteur (AIP) et la protéase membranaire, respectivement. L'AIP est sécrété hors de la cellule après maturation par la protéase membranaire AgrB. A une concentration seuil dans le milieu extracellulaire, l'AIP active le système à deux composants AgrC/AgrA par une cascade de phosphorylation (figure 14).



**Figure 14 : Système à deux composants AgrAB chez *S. aureus*.** Représentation schématique du système *agr*, permettant aux bactéries de sentir la densité cellulaire et de coordonner l'expression des facteurs de virulence, dans le cas de *S. aureus*. Ce système, couramment appelé système de *quorum sensing*, est utilisé par de nombreuses espèces bactériennes et forme une communication moléculaire entre les bactéries d'une même espèce. Les bactéries sécrètent des peptides auto-inducteur (AIP *auto inducer peptide*), dont la nature est spécifique à une espèce bactérienne, détectés par les autres cellules. Chez *S. aureus*, ce mécanisme active le système à deux composants ArgCA. (Figure modifiée d'après Queck *et al*, 2008).

AgrA régule les gènes de virulence de manière indirecte en activant la transcription de l'ARNIII (un ARN impliqué dans la virulence de *S. aureus* dont les mécanismes seront détaillés dans le chapitre V de cette introduction) et de manière directe en activant la transcription des PSM et en réprimant celle de la staphyloxantine (Queck *et al*, 2008). AgrA réprime également de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés (arginine, histidine) et le métabolisme carboné (transport des hexoses). Lorsque AgrA est activé, la densité cellule atteint un seuil critique dans le microenvironnement dans lequel *S. aureus* se trouve. Le pathogène

privilégie donc l'expression des facteurs de virulence à l'augmentation de la croissance cellulaire.

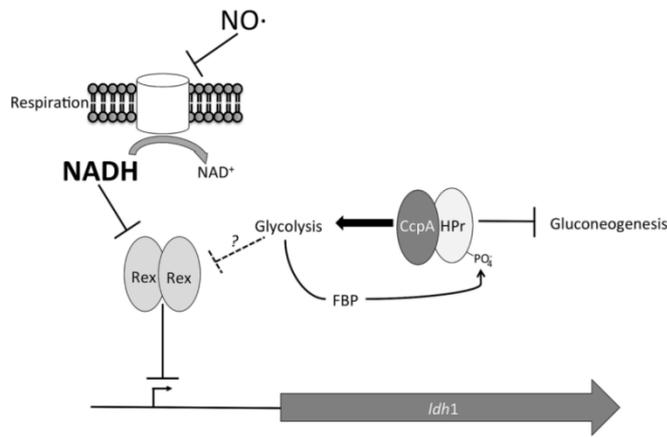
### **1.3.d - Exemples de régulation métabolique en conditions infectieuses**

Afin d'illustrer le lien étroit entre le métabolisme, la réponse aux stress et l'expression des facteurs de virulence, j'ai choisi de présenter trois exemples caractéristiques illustrant la complexité de la régulation génétique, ainsi que l'interaction entre les différents acteurs moléculaires décrit précédemment dans cette introduction. La diversité des mécanismes mis en jeu par *S. aureus* lors d'une infection lui permet de survivre dans des conditions hostiles et d'exercer son pouvoir virulent.

#### **d.1 Exemple 1 : Régulation en conditions de stress NO produits par les macrophages.**

Au cours d'une infection, *S. aureus* développe de multiples stratégies pour contourner notre système immunitaire. Une de ces particularités est de pouvoir survivre dans les macrophages lors de la phagocytose. Ce phénomène s'explique par la faculté de la bactérie de résister à de fortes concentrations en oxyde nitrique (NO), radicaux produits par les macrophages, lors de l'internalisation des bactéries pour les détruire. En pénétrant dans la cellule, les radicaux NO inhibent la chaîne de transporteur d'électrons, créent des mutations sur l'ADN et perturbent les membranes lipidiques. La résistance au NO nécessite la mise en place d'un système de détoxification ainsi qu'un changement rapide des voies métaboliques afin de maintenir le potentiel redox dans les cellules et de pouvoir survivre.

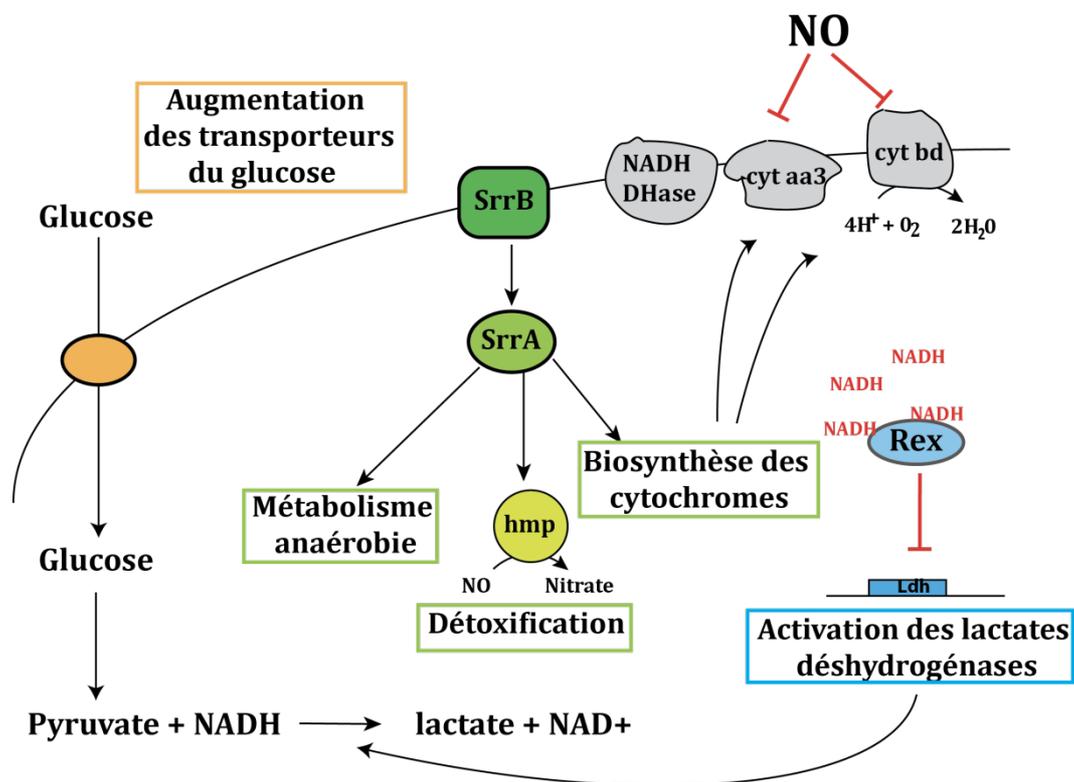
Le NO se fixe sur les cytochromes et perturbe la chaîne respiratoire ce qui a comme premier effet une augmentation intracellulaire de NADH. Le NADH en excès dans la cellule se fixe sur Rex et lève ainsi l'inhibition de la transcription des gènes impliqués dans la fermentation, comme les lactates déshydrogénases (Ldh1, Ddh et Ldh2) (**figure 15**). En passant à un mode de fermentation, *S. aureus* va produire du lactate et du NAD<sup>+</sup>, à partir du pyruvate et du NADH et maintenir ainsi le potentiel redox. Les lactates déshydrogénases, Ldh2 et Ddh, sont conservés chez tous les staphylocoques alors que la déshydrogénase Ldh1 est spécifique à *S. aureus*. Son expression au cours d'une exposition au NO est d'ailleurs prédominante sur l'expression de Ldh2 et Ddh (Richardson *et al*, 2008). Au niveau protéique, on compte plus de 11000 copies par cellules, par rapport à 2000 ou 3000 copies pour Ldh2 et DhD, respectivement (Zühlke *et al*, 2016).



**Figure 15. Activation des lactates déshydrogénases en conditions NO.** Le NADH intracellulaire, en excès lors d'une perturbation de la chaîne de transporteur d'électrons, se fixe sur le facteur de transcription Rex, empêchant ainsi la répression des lactates déshydrogénases et permettant le métabolisme fermentatif (Crooke *et al*, 2013).

Pour procéder à une fermentation lactique optimale, le flux d'entrée du glucose doit être augmenté car la fermentation consomme plus de glucose pour la même production d'énergie. Ce phénomène est sans doute rendu possible par le fait que *S. aureus* code un grand nombre de transporteurs membranaires du glucose. En conditions d'aérobic, les deux types (PTS dépendants et indépendants) de transporteurs sont utilisés et peuvent compenser la perte d'un des deux systèmes, alors qu'en conditions de stress NO, les systèmes PTS dépendants sont indispensables pour la survie de *S. aureus* (Vitko *et al* 2016). Des analyses transcriptomiques récentes ont montré que le taux de transcrits des perméases (PTS-indépendant) variait très peu lors d'un stress NO ce qui suggère que leur régulation se situe probablement au niveau traductionnel (Vitko *et al*, 2016). Lorsque le flux de glucose augmente, CcpA interagit avec HPrPser46 et active les gènes de la glycolyse. Il est possible que les métabolites secondaires inhibent également le facteur Rex (figure 15).

La perturbation de la chaîne de transporteur d'électrons a pour second effet l'activation du système à deux composants SrrAB. SrrA active l'expression des gènes des cytochromes afin de maintenir la chaîne de transporteur d'électrons (figure 16). La respiration aérobie ne pourra reprendre que lorsque la cellule aura éliminé tous les radicaux NO (Kinkel *et al*, 2013). La détoxification du NO intracellulaire est essentielle à la survie de *S. aureus*. La flavohémoglobine Hmp, largement activée lors du stress NO par SrrA, va permettre la conversion du NO en nitrate (Hockgräphe *et al*, 2008). Les facteurs Rot, CodY et Fur jouent également un rôle important dans ce mécanisme de résistance.



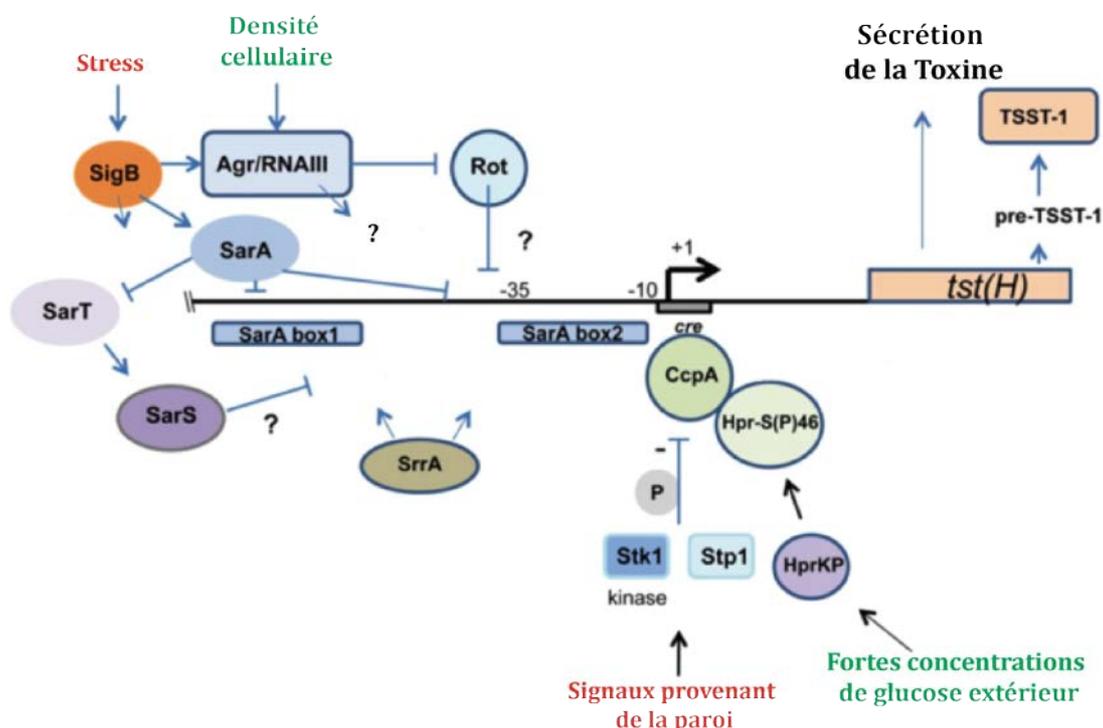
**Figure 16 - Mécanismes de régulation mis en jeu lors de la résistance à un stress NO.** Schéma récapitulatif représentant les différentes voies physiologiques activées lors de la perturbation de la chaîne de transport d'électrons par le NO. Les voies activées par le facteur SrrA sont représentées en vert, celles activées par le facteur Rex sont représentées en bleu.

### d.2 Exemple 2 : Expression de la toxine TSST-1

*S. aureus* provoque le syndrome du choc toxique par la sécrétion de la toxine superantigénique TSST-1 dans l'organisme, capable de provoquer un choc fatal en quelques heures. TSST-1 se lie à la partie constante des molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité et à la région invariable des récepteurs des lymphocytes T entraînant leur sur-activation, ce qui a pour conséquence, un relargage massif de cytokines provoquant une forte hypotension qui peut conduire jusqu'à la mort (Dinges *et al*, 2000). La toxine TSST-1 est codée par le gène *tst*, qui se trouve localisé sur un îlot de pathogénicité (SaPIs) qui n'est pas présent dans toutes les souches de *S. aureus*. La régulation de son expression est un exemple très concret du lien étroit unissant le métabolisme et la virulence.

La concentration en glucose extérieur est un des facteurs ayant le plus d'influence sur l'expression de la toxine. En effet, le gène *tst* possède dans sa région promotrice la séquence « *cre* » qui est reconnue par CcpA sous la forme d'un complexe avec HRPser46

en présence de glucose (figure 17). L'activation de la transcription du gène *tst* par CcpA, peut être empêchée par l'enzyme *stk1* qui phosphoryle CcpA, pour diminuer son affinité à l'ADN.



**Figure 17 : Mécanismes de régulation de l'expression de la toxine TSST-1 chez *S. aureus*.**

La densité cellulaire et la forte concentration en glucose extérieur favorisent l'activation de l'expression de la toxine TSST-1 (vert). Les stress d'ordre général, activant le facteur de transcription sigma B, et les stress associés à la paroi bactérienne favorisent la répression de l'expression de TSST-1 (rouge). Les points d'interrogation représentent d'autres voies de régulations potentielles et non caractérisées (figure modifiée d'après Andrey *et al*, 2015).

La région promotrice de l'ADN contient d'autres signaux reconnus par divers régulateurs de la transcription dont SarA et le facteur Rot, lui même régulé par le système de densité cellulaire *agr*. Il semblerait que le système SrrAB qui répond à l'hypoxie et aux radicaux NO intervient aussi pour moduler l'expression de ce facteur de virulence.

La régulation de la transcription du gène *tst* montre la complexité des réseaux impliqués dans l'expression des facteurs de virulence. Il est cependant important de signaler à ce stade qu'à côté de la régulation transcriptionnelle, d'autres niveaux de régulation interviennent (traduction, stabilité des ARNm, modifications et dégradation des protéines). Cette multiplicité de mécanismes permet à *S. aureus* d'intégrer de nombreux signaux provenant de l'environnement et de l'hôte.

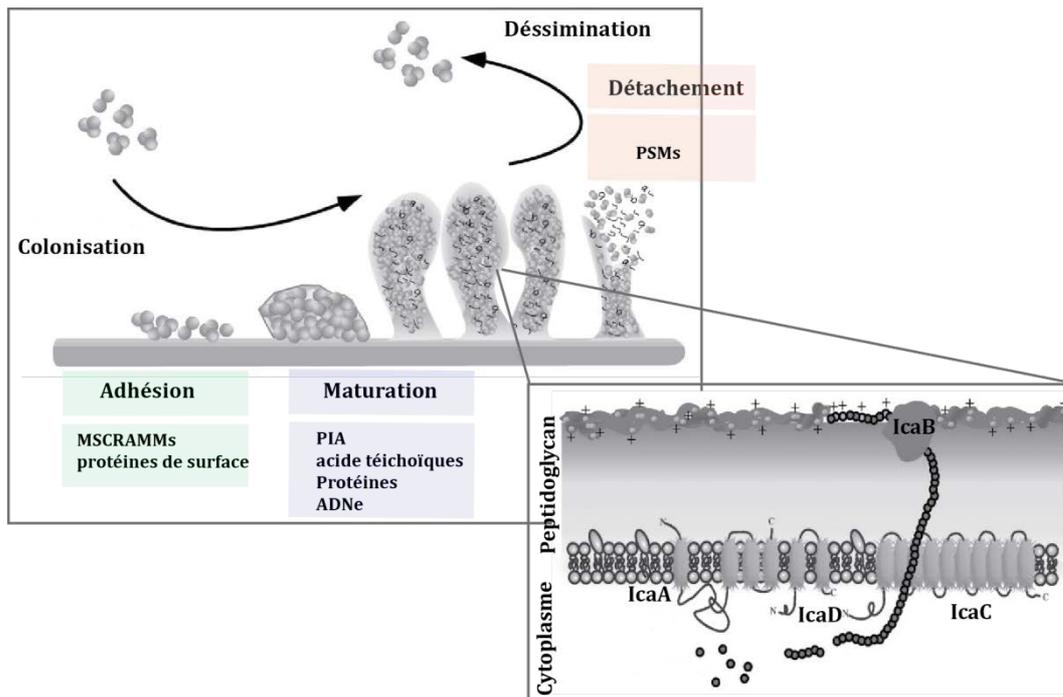
### **d.3 Exemple 3 : Régulation de la formation des biofilms dépendant des PIA**

#### (a) Formation des biofilms

Les biofilms représentent la forme de vie la plus courante des micro-organismes dans l'environnement et forment une population hétérogène (Richards & Melander, 2009). Cette agrégation de cellules, entourées d'une matrice de polysaccharides, protège les bactéries contre les stress environnementaux. Sous cette forme, *S. aureus* résiste aux traitements antibiotiques et aux attaques de notre système immunitaire. Les biofilms sont directement associés à certaines maladies comme les ostéomyélites, les infections cutanées en particulier l'infection du pied chez les personnes diabétiques, les sinusites chroniques et les endocardites (Archer *et al*, 2011).

La formation des biofilms de *S. aureus* peut impliquer différentes voies de biosynthèse. En effet on distingue les biofilms dits « *PIA dependent* » (*polysaccharide intercellular adhesion*) dont la synthèse des polysaccharides dépend de l'expression de l'opéron *icaADBC*, et les biofilms dits « *PIA independent* ». Pour la suite de cette introduction, j'ai choisi de décrire la formation et la régulation des biofilms *PIA dependent*, étant les mieux caractérisés mais aussi parce qu'ils illustrent l'interconnectivité entre les différents facteurs de transcription, précédemment décrit.

La formation d'un biofilm se fait en plusieurs étapes et est initiée par l'attachement des cellules à une surface plane par des protéines de surface (**figure 18**). L'étape de maturation est caractérisée par l'agrégation des cellules entre elles et implique la sécrétion de polysaccharides, appelés PNAG (Poly-N-acétylglucosamine), principal composé des polymères du biofilm (Archer *et al*, 2011). Les PNAG sont synthétisés par l'opéron *icaADBC*, où *icaA* et *icaD* codent des N-glucosamine transférases, *icaB* pour la protéine d'adhésion intercellulaire, et *icaC* pour le transporteur (Otto, 2009).



**Figure 18 : formation des biofilms et de la biosynthèse des PNAG.** Schéma décrivant la formation des biofilms, PIA dépendant, chez *S.aureus*. La partie haute du schéma représente les différentes étapes de la formation d'un biofilm. La figure du bas représente le rôle des différentes protéines exprimées à partir de l'opéron *icaADBC* (figure modifiée d'après Otto, 2009).

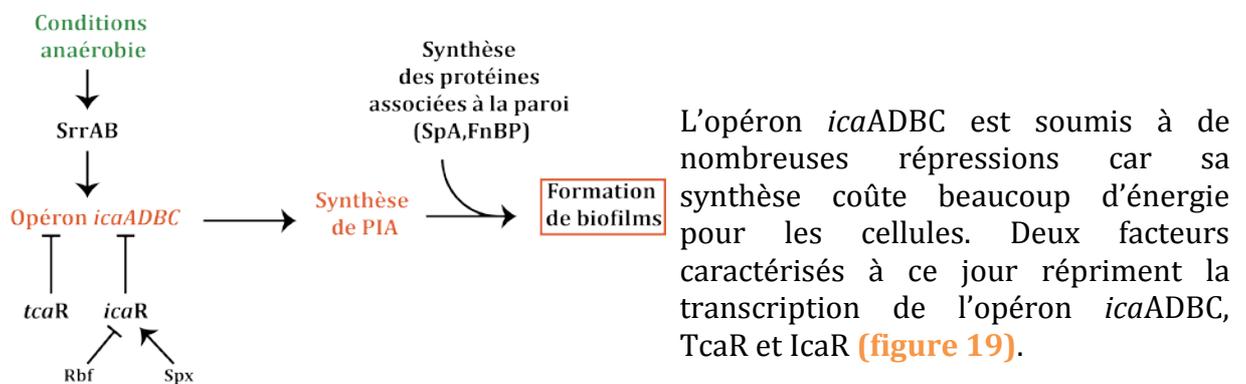
L'étape de détachement se fait soit de manière contrôlée par la population bactérienne en exprimant des enzymes spécifiques de dégradations (protéases, nucléases) ou des peptides appelés PSM (*phénol-soluble modulins*) qui agissent comme surfactants, soit de manière mécanique ou chimique due à un stress de l'environnement. Dans les deux cas un groupe de cellules se détache du biofilm pour se disséminer dans les vaisseaux sanguins et/ou coloniser d'autres tissus. La formation de biofilm qui implique des changements physiologiques importants pour les cellules est un mécanisme soumis à de fines régulations.

#### (b) Régulation de la formation des biofilms dépendant des PIA

De nombreuses conditions de stress (carence en nutriments, augmentation de la température, exposition aux antibiotiques, faible disponibilité en fer, stress oxydatif, baisse du pH, conditions d'anaérobiose) activent la formation de biofilms. Cette activation peut être directe (activation de l'opéron *icaADBC*) ou indirecte en réprimant des facteurs de virulence qui inhibent la formation des biofilms, comme les protéases et nucléases.

Les facteurs de régulation de la transcription SarA et  $\sigma_B$  activent l'expression des facteurs d'adhésion qui participent à l'initiation du biofilm, comme FnbpA et la coagulase, et répriment les gènes impliqués dans la dispersion des cellules, comme l'hémolysine  $\beta$ , ou encore l'entérotoxine B. Le facteur Rot est également impliqué dans la formation des biofilms de manière indirecte en réprimant l'expression des protéases. Les souches dépourvues du facteur Rot comme la souche USA300, ne sont plus capables de former des biofilms et l'expression des protéases dans ces souches est très élevée (Mootz *et al*, 2015). Au sein du biofilm, à cause de la proximité des cellules et de la concentration locale du peptide AIP, AgrA est alors activé pour induire l'expression des gènes codant les PSM  $\alpha$  et  $\beta$  qui contribuent au détachement du biofilm et à la dissémination des cellules. Lorsque *S. aureus* se trouve dans un environnement anaérobie ou micro-anaérobie, le TCS SrrAB est alors activé et est nécessaire pour la survie cellulaire (Kinkel *et al*, 2013). Le facteur SrrA régule positivement l'opéron *icaADBC* en se fixant dans sa région promotrice (Ulrich *et al*, 2007). Dans la phase d'attachement, SrrA active l'expression des PIA mais réprime également la synthèse des nucléases et des protéases.

(c) Répression de la formation des biofilms dépendant des PIA



**Figure 19 : Régulation de l'opéron *icaADBC* chez *S. aureus*.** Le schéma représente les facteurs de transcription, caractérisés, régulant l'opéron *icaADBC* chez *S. aureus*. Les conditions anérobie activent le système SrrAB qui active l'opéron *icaADBC* par fixation de SrrA dans la région promotrice de l'opéron *icaADBC*. Deux répresseurs de l'opéron ont été caractérisés, TcaR et IcaR dont l'expression est soumise à de nombreuses régulations. La formation de biofilms nécessite la synthèse de PIA mais également de protéines associées à la paroi dont l'expression dépend de plusieurs conditions environnementales comme la densité cellulaire pour Spa (exprimée à faible densité cellulaire). Les barres représentent une répression, les flèches, une activation (Figure modifiée Archer, 2011).

IcaR est localisé en amont du gène *icaA* mais avec une transcription divergente. L'expression de IcaR est également soumise à une régulation inhabituelle au niveau post-transcriptionnel (Ruiz de los Mozos *et al*, 2013) dont le mécanisme est décrit dans le chapitre suivant.

Le biofilm a pour fonction de protéger les cellules d'environnement hostile. Les cellules agrégées ne subissent pas les stress environnementaux contrairement aux cellules se trouvant à la périphérie du biofilm. Toutes les cellules constituant un biofilm ne sont donc pas exposées à la même concentration en oxygène et en nutriments. Il existe donc une hétérogénéité métabolique au sein de la population selon la localisation des cellules au sein du biofilm (Stoodley *et al*, 2009). Cette hétérogénéité est à l'origine du phénomène de persistance, qui consiste à un ralentissement de la croissance d'une sous-population de bactéries jusqu'au stade de dormance. Ces cellules persistantes, peuvent alors résister à l'action des antibiotiques mais cet état est réversible lorsque les conditions environnementales redeviennent propices à la croissance bactérienne.

La régulation de l'expression des gènes de virulence implique des interconnexions complexes entre les facteurs de transcription, et les systèmes à deux composants. Cependant la découverte des ARN non codants (ARNnc) dans les organismes appartenant aux trois domaines du vivant, et leurs implications dans la régulation des gènes ont fondamentalement changé notre compréhension des mécanismes mis en jeu dans l'expression génétique.

## **I.4. Rôle clef des ARNnc dans la régulation de l'expression des gènes.**

Grâce en particulier au développement des méthodes haut débit à l'échelle génomique, de nombreux ARNnc ont été identifiés chez les bactéries (Storz *et al*, 2011). On estime que 10 à 15 % du génome bactérien code des ARNnc impliqués dans la régulation de différentes voies physiologiques. Les études fonctionnelles effectuées sur certains d'entre eux et, principalement chez les bactéries à Gram négatif, ont montré qu'ils jouent un rôle capital dans l'adaptation des cellules face à un stress environnemental. Ils s'inscrivent dans des réseaux de régulation complexes qui permettent d'intégrer de nombreux stimuli et de permettre à la cellule de réagir rapidement. Chez *S. aureus*, l'utilisation de diverses approches prédictives et expérimentales ont révélé plus de 200 ARNnc dont la plupart reste de fonction inconnue (revue de Felden *et al*, 2011). A l'heure actuelle, il est difficile de répertorier les ARN régulant l'expression des gènes, en fonction de leur mécanisme d'action. En effet la caractérisation de nouveaux ARN multifonctionnels, qui peuvent être à la fois codant et régulateur, activateur et répresseur, agir en *cis* et en *trans*, sur des cibles ARN mais également protéiques, rend la classification difficile. Cependant on peut définir deux grandes familles représentées par les régions non codantes des ARNm qui vont agir sur l'expression de leur propre ARNm, et les ARN issus des régions intergéniques qui vont exercer leurs fonctions en *trans*.

### **I.4.a - Les régions régulatrices des ARNm**

Les ARNm peuvent réguler leur propre expression en formant des structures particulières. Les régions UTR sont généralement courtes mais les ARNm de *S. aureus* codant des protéines impliquées dans la virulence, le métabolisme et la réponse adaptative, possèdent en général des régions UTR de grande taille (Lasa *et al*, 2011). Les régions 5'UTR sont souvent impliquées dans la reconnaissance directe d'une petite molécule (métabolite) ou d'un facteur physico-chimique (la température).

#### **a.1 Les thermosenseurs et « riboswitch »**

Les « riboswitch » sont des structures complexes présentes sur des ARNm qui permettent à la cellule de sentir la concentration intracellulaire de divers métabolites (nucléotides, acides aminés, vitamines, messagers secondaires etc.). La liaison du

métabolite, en un site spécifique appelé aptamère, entraîne un changement de conformation qui conduit à la formation d'un terminateur/antitermineur de la transcription ou d'une structure qui séquestre ou libère le site de liaison du ribosome pour réguler la synthèse des gènes en aval (Caldelari *et al*, 2013). Ces éléments sont des cibles intéressantes pour la recherche de nouveaux antibiotiques puisqu'ils régulent en général des gènes essentiels du métabolisme (Deigan *et al*, 2011 ; Mulhbachter *et al*, 2010).

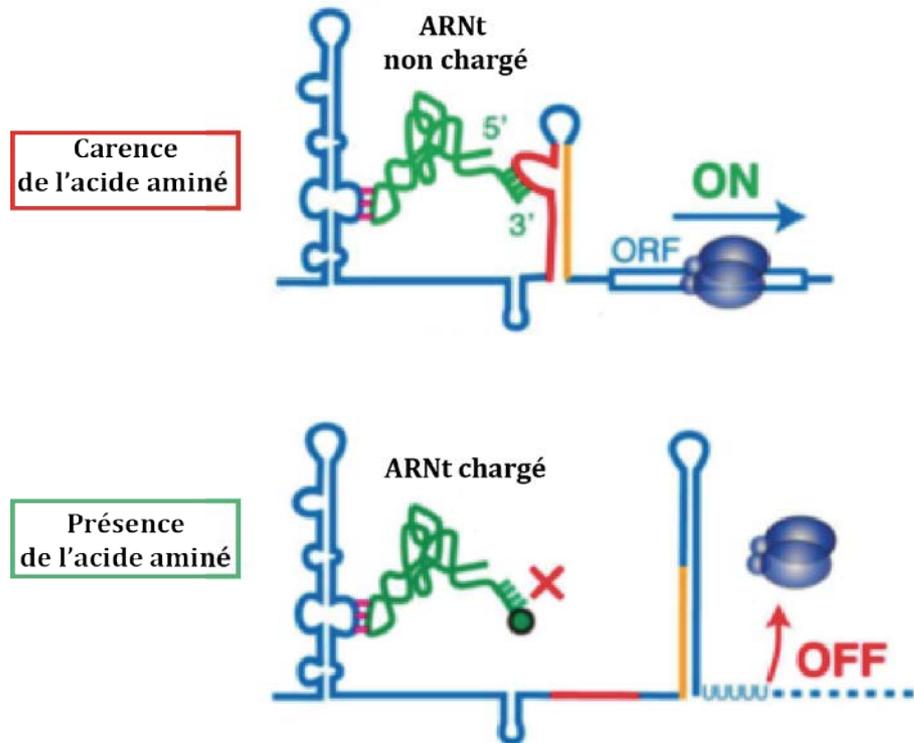
D'autres ARNm appelés thermosenseurs répondent à des changements de température. Dans ce cas, la séquence SD est emprisonnée dans une structure en tige-boucle qui s'ouvre progressivement avec l'augmentation de la température. Ces éléments sont souvent retrouvés dans des ARNm codant des régulateurs de la virulence ou pour des protéines chaperones répondant à la température. Un de ces motifs a été prédit chez *S. aureus* pour le gène *groES* mais la fonctionnalité de ce thermomètre prédit n'a pas encore été caractérisée (Rhigetti and Narberhaus, 2014).

#### **a.2 Les éléments régulateurs appelés « T-box »**

Les T-box sont des éléments régulateurs impliqués dans des mécanismes de régulation transcriptionnelle des enzymes impliquées dans la biosynthèse des acides aminés et des aminoacyl-ARNt synthétases que l'on retrouve en particulier chez les bactéries à Gram positif et dont *S. aureus* (Caldelari *et al*, 2010). Les T-box font appel aux ARN de transfert (ARNt) et répondent directement à la disponibilité ou non des acides aminés dans le milieu de culture. Ils sont composés d'une structure tige boucle qui contient la séquence complémentaire à l'anticodon de l'ARNt régulateur et d'un anti-terminateur de transcription qui contient la séquence complémentaire au CCA terminal de l'ARNt.

Une carence d'un des acides aminés conduit à une accumulation de l'ARNt non chargé, correspondant à l'acide aminé manquant. L'ARNt va alors se fixer sur la séquence appelée T-box des ARNm. Ceci entraîne la formation d'une structure anti-terminatrice qui favorise la transcription de l'ARNm (**figure 20**) (Zhang et Ferré-

D'Amaré, 2015). En revanche, si l'acide aminé est présent dans le milieu de culture, l'ARNt correspondant sera chargé pour être engagé dans la traduction. L'ARNm restera libre et la formation d'un terminateur de la transcription sera privilégiée pour arrêter prématurément la transcription.



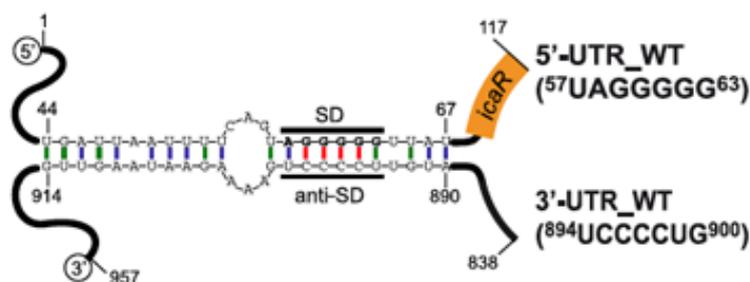
**Figure 20 : Représentation schématique du mécanisme d'action des T-box.** En carence de l'acide aminé auquel il est associé, l'ARNt se fixe sur une région spécifique de l'ARNm. Cette conformation bloque le terminateur de transcription, activant ainsi l'expression des gènes. Au contraire, en présence de l'acide aminé, l'ARNt chargé sera requis pour la traduction et la synthèse de protéines. N'exerçant plus de contraintes structurales sur l'ARNm, un terminateur de transcription se forme, empêchant ainsi l'expression du gène. (Figure modifiée Zhang & Ferré-D'Amaré, 2015).

<b>"Riboswitch" -Métabolite</b>	<b>Gène ou opéron régulé</b>	<b>Mécanisme</b>
Flavine mono nucleotide (FMN)	<i>SA1316</i> <i>RibD</i>	Initiation de la traduction Terminaison de la transcription
Thiamine Pyrophosphate (TPP)	<i>SA1897-thiD-thiM-thiE</i>  <i>SA0929-SA0928-SA0927</i>	Terminaison de la transcription Idem
Queuosine (Pre-Q1)	<i>SA0667-SA0666-SA0665</i>	Terminaison de la transcription
Glycine	<i>gcvT-SA1366-SA1365</i>	Terminaison de la transcription
Lysine	<i>lysC-asd-dapA-dapB-dapD</i>	Terminaison de la transcription
S- <u>adénosyl</u> -méthionine	<i>SA0011</i>  <i>SA0769-SA0770-SA0771</i>  <i>metK</i>	Terminaison de la transcription Idem Idem
Purine	<i>nrdI-nrdE-nrdF</i>  <i>xprT-pbuX-guaB-guaA</i>	Terminaison de la transcription Idem
Mn <sup>2+</sup> responsive <u>element</u>	<i>SA0878</i>	Terminaison de la transcription
Glucosamine 6 Phosphate (GlcN6P)	<i>glmS</i>	Ribozyme-mRNA autocleavage

**Tableau 4 : Quelques exemples d'éléments régulateurs agissant en cis appelés "Riboswitch" qui répondent à la concentration intracellulaire d'un métabolite chez *S. aureus*.** En aval du premier gène, se trouve l'élément riboswitch constitué de l'élément aptamer qui reconnaît le métabolite et de la plateforme génétique. Dans la plupart des cas, la fixation du métabolite induit sur la région « aptamer » le formation d'un terminateur de la transcription localisé en aval du gène régulé ou du premier gène de l'opéron régulé. Un seul cas serait régulé au niveau de la traduction (SA1316) ou au niveau de la stabilité de l'ARNm (*glmS*) (d'après Caldelari *et al*, 2010).

### a.3 Régulation par les régions 3'UTR

Un exemple de région 3'UTR agissant *in cis* se trouve dans l'ARNm *icaR* de *S. aureus*. IcaR est le répresseur de l'opéron *icaADBC* codant les gènes impliqués dans la synthèse du biofilm. Cet ARNm a la particularité de réprimer sa propre traduction par des appariements de bases entre ses régions 3'UTR et 5'UTR empêchant la fixation du ribosome et créant un nouveau site de coupure par l'endoribonucléase spécifique des ARN en double brin, la RNase III (figure 21). L'appariement se fait sur une quarantaine de nucléotides impliquant une région riche en C dans le 3'UTR complémentaire à la séquence Shine et Dalgarno (SD) (Ruiz de los Mozos *et al*, 2013). Ce mécanisme original permet de moduler la synthèse de ce facteur de transcription en réponse à un signal encore méconnu. A l'heure actuelle aucun facteur, expliquant l'ouverture de cette structure, n'a encore été caractérisée. Il est probable que la libération du SD nécessite l'action d'un métabolite, d'une protéine ou l'appariement d'un ou plusieurs ARNnc.



**Figure 21** : Inhibition de la traduction de *icaR* par appariement de la région 3'UTR et 5'UTR du messager (Ruiz de los Mozos *et al*, 2013). La partie 3'UTR de *icaR* comporte une région riche en C (anti-SD) qui se fixe au SD de son propre ARNm.

#### **I.4.b - Les ARNnc non codants agissant en trans**

Une autre classe d'ARN non codants (ARNnc) regroupe ceux codés à un locus génétique différent de leurs cibles. La plupart de ces ARNnc, encore appelés sRNA « *Small RNA* » agissent au niveau post-transcriptionnel par complémentarité de base avec les ARNm cibles. Ces complexes conduisent soit à l'inhibition de la traduction de l'ARNm et/ou sa dégradation, ou au contraire, à l'activation de la traduction en favorisant le recrutement du ribosome et/ou stabilisant l'ARNm. N'étant pas codé par le même locus que l'ARNm cible, l'appariement entre les deux ARN est imparfait. Un ARNnc peut réguler plusieurs ARNm cibles, et un ARNm peut également être régulé par plusieurs ARNnc. Cette particularité explique la complexité des réseaux de régulation. Ce

n'est pas seulement la présence ou l'absence des ARNnc qui détermine la régulation d'une cible mais également sa concentration dans la cellule ainsi que son affinité pour ses cibles. Les ARNnc sont donc des régulateurs globaux au même titre que les facteurs de transcription, mais qui apportent un autre niveau de régulation permettant des réponses rapides face aux divers stress environnementaux (e.g. Wright *et al*, 2013 ; Wagner and Romby, 2015). Certains de ces ARNnc sont activés en réponse directe à un stress et régulent des gènes du métabolisme (Gorke and Vogel, 2008 ; Bobrovskyy and Vanderpool, 2014). Récemment, la fonction de plusieurs ARNnc chez *S. aureus* a été résolue en dehors de l'ARNIII, l'effecteur intracellulaire du système de densité cellulaire (voir § V). Ces ARNnc permettent en outre, un lien entre diverses voies du métabolisme et l'expression des facteurs de virulence. Plusieurs de ces ARNnc ont fait l'objet de mon projet de thèse.

### ***b.1 RsaE et le métabolisme central***

La plupart des ARNnc de *S. aureus* sont conservés uniquement dans les staphylocoques. Cependant, l'un d'entre eux nommé RsaE s'avère conservé dans les Staphylococcaceae, et Bacillaceae comme *B. subtilis*. RsaE de 96 nucléotides possède deux motifs riches en C dans ses régions simples brins, qui est une signature des ARNnc reconnaissant la séquence SD des ARNm cibles (Geissmann *et al*, 2009). L'analyse de l'expression de RsaE dans diverses souches de *S. aureus* montre que son expression est maximale en milieu de la phase exponentielle de croissance et diminue progressivement jusqu'en phase stationnaire. RsaE réprime au niveau traductionnel la synthèse de plusieurs enzymes impliquées dans le cycle TCA, le métabolisme folate-dépendant « one carbon », et des transporteurs de peptides et acides aminés (Geissmann *et al*, 2009 ; Bohn *et al*, 2010). Plus récemment il a été montré que l'expression de RsaE est dépendante du système à deux composants SrrAB et que son taux augmente lors d'un stress par les radicaux NO (Durand *et al*, 2015). En aval de *rsaE*, se trouvent non seulement un site de reconnaissance du facteur de transcription SrrA mais aussi un site de reconnaissance du facteur Rex. Chez *B. subtilis*, Rex réprime la transcription de RsaE suggérant que le ARNnc contribuerait à réajuster le taux de NAD<sup>+</sup>/NADH en réponse à divers signaux ou stress (Durand *et al*, 2017). Ainsi les fonctions de RsaE dans le métabolisme central seraient conservées dans des bactéries aussi éloignées dans l'évolution que sont *B. subtilis* et *S. aureus*.

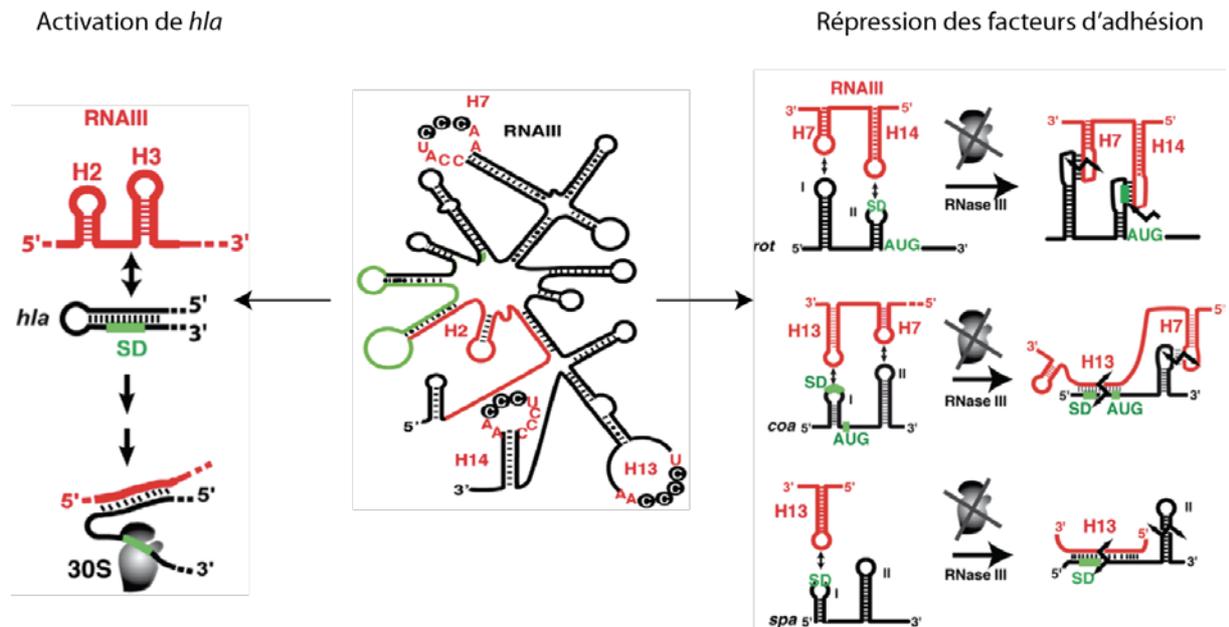
## ***b.2 RsaA , un atténuateur des infections aiguës***

Utilisant différentes approches expérimentales, plusieurs cibles de l'ARNnc RsaA ont été identifiées. *mgrA* qui code un facteur de transcription qui inhibe l'action de l'ARNIII est l'ARNm cible principal de RsaA (Romilly *et al*, 2014 ; Tomasini *et al*, 2017). RsaA réprime la traduction de l'ARNm *mgrA* en se fixant au site de reconnaissance du ribosome et induit ainsi une dégradation de l'ARNm. MgrA est un régulateur pléiotropique qui active la formation de la capsule et le processus d'agglutination, appelé « *clumping* », et réprime la formation des biofilms. En réprimant MgrA, RsaA protège *S. aureus* contre la phagocytose, favorise les infections chroniques et atténue les infections aiguës. RsaA est activé par le facteur sigma B et participe indirectement à la répression de AgrA par MgrA. Ainsi cet ARN relie deux régulateurs de la transcription qui ont des effets opposés sur l'opéron *agr*.

## **I.5. Le réseau de l'ARNIII : Lien entre densité cellulaire, stress environnementaux, métabolisme et virulence.**

Les lésions provoquées dans les tissus de l'hôte par *S. aureus*, nécessite que les exotoxines soient sécrétées de manière simultanée. Cela requiert une régulation coordonnée des gènes au sein de la population bactérienne. Le système *agr* permet à *S. aureus* de ressentir la densité cellulaire et d'activer l'expression des exotoxines. AgrA active la transcription de l'ARNIII, qui joue un rôle central dans le passage de *S. aureus* d'un mode d'adhésion à un mode de dissémination.

L'ARNIII est composé de 514 nucléotides et de 14 structures en tige-boucle, c'est un ARN multifonctionnel qui possède une fonction régulatrice mais code également l'hémolysine  $\delta$  (Hld). Par sa région 5'UTR, L'ARNIII active la synthèse de l'hémolysine  $\alpha$  de façon directe en s'appariant à la région 5'UTR de l'ARNm (Morfeldt *et al*, 1995). Cette action libère la séquence SD, favorisant le recrutement du ribosome et la traduction de l'ARNm *hla*. La région 3'UTR de l'ARNIII possède trois boucles apicales riches en cytosines, qui s'appariant à la séquence SD des ARNm cibles pour empêcher le recrutement du ribosome et la traduction. De manière concomitante, la RNase III reconnaît les duplexes ARNm-ARNIII pour les dégrader, rendant la répression irréversible (**figure 22**) (Caldelari *et al*, 2013).



**Figure 22 : Représentation schématique de la structure et des mécanismes de régulation de l'ARNIII de *S. aureus*.** L'ARNIII possède 14 structures en tige-boucle. Trois boucles (H7, H13, H14) possèdent des motifs riches en C. la région verte représente le cadre ouvert de lecture codant pour l'hémolysine  $\square$  (modifiée(Felden *et al*, 2011)).

Parmi les ARNm cibles, réprimés au niveau de la traduction, on retrouve divers facteurs d'adhésion (protéine A, une protéine fixant le fibrinogène, coagulase), des hydrolases et des amidases impliquées dans le métabolisme du peptidoglycane et le facteur de transcription Rot appelé répresseur des exotoxines. Rot joue un rôle opposé à celui de l'ARNIII. Ce facteur active la transcription du gène *spa* et réprime celle du gène *hla* (Novick & Geisinger, 2008). La régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de l'ARNIII et de Rot sur les cibles *spa* et *hla* forme un motif de régulation aux propriétés particulières et approprié pour effectuer une transition des cellules entre deux états antagonistes, et modifier le comportement d'une population (Nitzan *et al*, 2015 ; voir partie 1, résultats).

Dans la revue suivante, nous avons présenté l'état actuel des connaissances sur l'opéron *agr* et illustré comment les protéines régulatrices, (facteurs de transcription, systèmes à deux composants) et l'ARNIII sont intégrés dans des circuits de régulation complexes, pour exprimer les facteurs de virulence de façon dynamique et rapide en réponse au stress et aux changements de l'environnement et du métabolisme. Il est intéressant qu'un grand nombre de réseaux de régulation convergent, de manière directe ou indirecte, vers le facteur AgrA et l'opéron *agr* ce qui permet aux cellules d'intégrer de multiples signaux environnementaux.



# *Staphylococcus aureus* RNAIII and Its Regulon Link Quorum Sensing, Stress Responses, Metabolic Adaptation, and Regulation of Virulence Gene Expression

Delphine Bronesky,<sup>1</sup> Zongfu Wu,<sup>2</sup> Stefano Marzi,<sup>1</sup> Philippe Walter,<sup>1</sup> Thomas Geissmann,<sup>3</sup> Karen Moreau,<sup>3</sup> François Vandenesch,<sup>3</sup> Isabelle Caldelari,<sup>1</sup> and Pascale Romby<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Architecture et Réactivité de l'ARN, Université de Strasbourg, CNRS, IBMC, 67084 Strasbourg, France; email: p.romby@ibmc-cnrs.unistra.fr

<sup>2</sup>College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

<sup>3</sup>Université Claude Bernard Lyon 1, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université de Lyon, INSERM U1111, CNRS UMR 5308, CIRI, 69008 Lyon, France

Annu. Rev. Microbiol. 2016. 70:299–316

The *Annual Review of Microbiology* is online at [micro.annualreviews.org](http://micro.annualreviews.org)

This article's doi: [10.1146/annurev-micro-102215-095708](https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095708)

Copyright © 2016 by Annual Reviews. All rights reserved

## Keywords

*Staphylococcus aureus*, quorum sensing, regulatory RNAs, posttranscriptional regulation

## Abstract

*Staphylococcus aureus* RNAIII is one of the main intracellular effectors of the quorum-sensing system. It is a multifunctional RNA that encodes a small peptide, and its noncoding parts act as antisense RNAs to regulate the translation and/or the stability of mRNAs encoding transcriptional regulators, major virulence factors, and cell wall metabolism enzymes. In this review, we explain how regulatory proteins and RNAIII are embedded in complex regulatory circuits to express virulence factors in a dynamic and timely manner in response to stress and environmental and metabolic changes.

299

## Contents

INTRODUCTION.....	300
THE QUORUM-SENSING SYSTEM.....	300
THE SURPRISINGLY MULTIFACETED REGULATORY RNAIII .....	303
DYNAMIC PROPERTIES OF THE <i>agr</i> REGULATORY NETWORK.....	305
THE IMPACT OF AgrA/RNAIII DURING INFECTION .....	307
THE <i>Agr</i> /RNAIII SYSTEM AS TARGET FOR DEVELOPING THERAPEUTIC APPROACHES.....	308
CONCLUSION .....	309

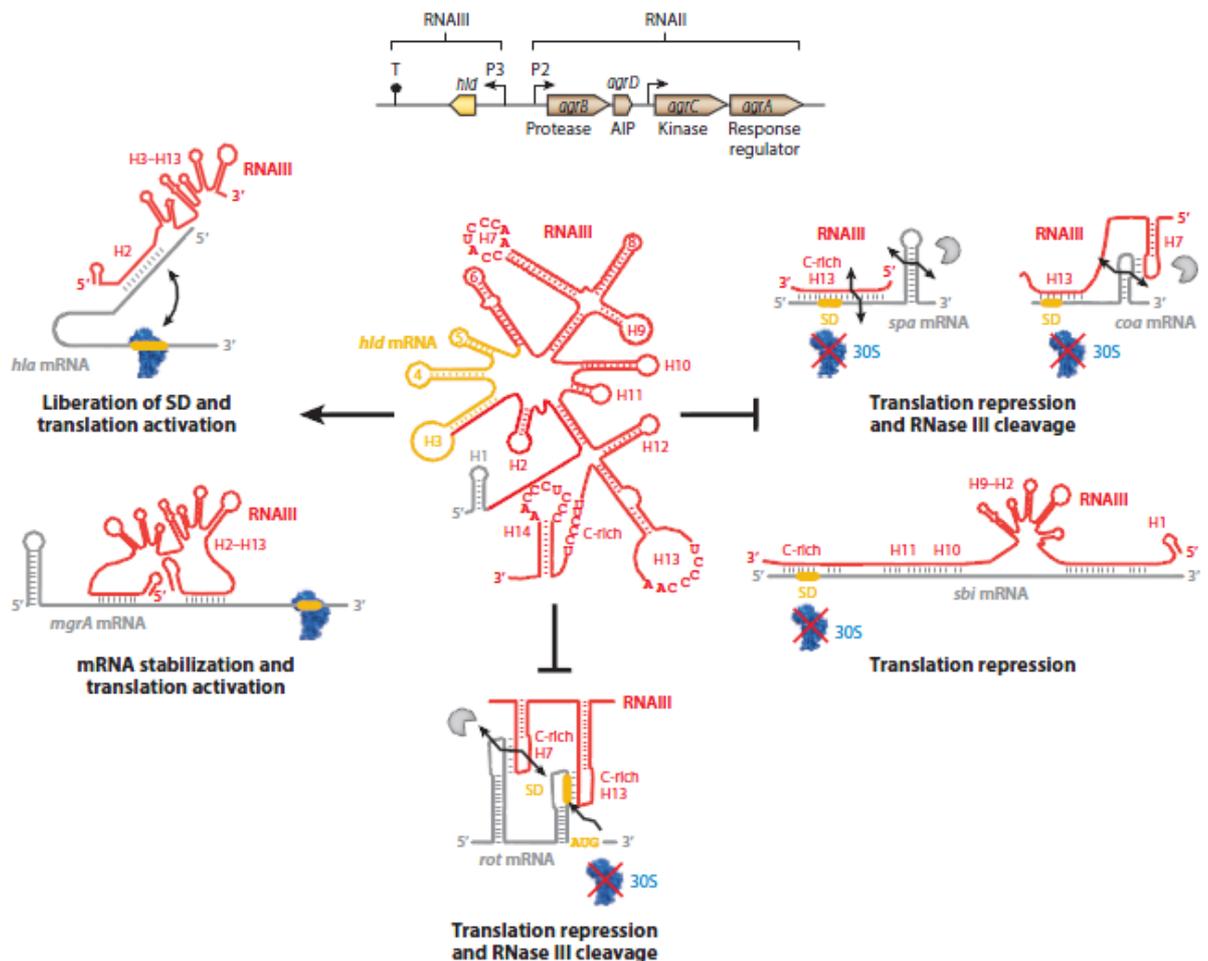
## INTRODUCTION

Staphylococci are widespread commensals of the anterior nares and skin, but several species, such as *S. aureus*, are pathogens causing a large variety of community- and hospital-acquired infections (65). Remarkably, *S. aureus* infects a broad range of body sites—skin, bloodstream, respiratory tract, heart, and skeletal system—as well as tissues surrounding implanted medical devices. The ability of *S. aureus* to colonize a wide range of organs and to cause acute and chronic diseases is most likely due to the large arsenal of virulence factors it produces (toxins, proteases, nucleases, adhesins, etc.). Numerous genome-wide approaches have revealed that expression of virulence factors is often regulated at multiple levels, including transcription, translation, and mRNA degradation. These multilayered regulations are governed by a variety of *trans*-acting factors, including sigma factors, two-component systems (TCSs), metabolite-responsive regulatory proteins, RNA-binding proteins, and regulatory RNAs (46). Thus, complex and dynamic networks allow *S. aureus* to rapidly adapt its metabolism and to fine-tune the synthesis of the virulence factor in response to internal and external signals and environmental changes (46). Moreover, some of the regulators vary among strains as a result of genome rearrangements and acquisition of mobile genetic elements, which contributed to the evolution of bacterial genomes in response to changing conditions (46, 73, 81).

Among the *trans*-acting regulators are the 16 TCSs of *S. aureus*, which sense and respond to various environmental stimuli to regulate the transcription of numerous genes and operons (46, 117). These signal transduction systems consist of a *trans*-membrane-spanning sensor histidine kinase and a cognate response regulator that is activated through phosphorylation to elicit the regulatory response. In addition to targeting coding genes, some of the TCSs control expression of regulatory RNAs, which act at the posttranscriptional level through base-pairing interactions with mRNA targets. In this manner, the regulatory RNAs expand the TCS regulon. In this short review, we describe one of the typical TCS systems, the so-called accessory gene regulator (*agr*) system, which senses bacterial cell density (80, 82). This *agr* system includes the response regulator AgrA and a regulatory RNAIII as main intracellular effectors; these have evolved complementary functions in bacterial physiology and pathogenesis. Given the large number of interesting reviews on this TCS system (e.g., 58, 80, 82, 119), we focus on the dynamic interplay of these two regulators in coordinating and adjusting the timing of virulence factor expression in response to stresses and metabolic and environmental changes.

## THE QUORUM-SENSING SYSTEM

The *agr* (accessory gene regulator) locus comprises two divergent transcriptional units called RNAII and RNAIII that are under the transcriptional control of promoters P2 and P3, respectively



**Figure 1**

Mechanism of action of RNAIII on its target mRNAs. Genomic organization of the quorum-sensing *agr* system is given at top. The schematic secondary structure of RNAIII (red) is from B nito et al. (9). The *hld* gene encoding  $\delta$ -hemolysin is yellow. The various C-rich sequence motifs of RNAIII are the seed sequences that bind to the Shine and Dalgarno (SD) sequence of mRNA targets (gray). Various topologies of RNAIII-mRNA are given. Binding of RNAIII to several mRNAs (*spa*, *coa*, *rot*, *sbi*) can prevent binding of the 30S small ribosomal subunit, and in several cases this step is followed by rapid degradation initiated by the double strand-specific endoribonuclease III (*gray circle*). Binding of RNAIII to target mRNAs can also activate synthesis of exotoxins. For *hla* mRNA, interaction with RNAIII prevents the formation of an inhibitory structure sequestering the SD, whereas for *mgrA* mRNA, binding of RNAIII stabilizes the mRNA against an RNase attack. In these latter cases, the seed sequences initiating base-pairing between RNAIII and mRNA targets (*hla*, *mgrA*) have not yet been demonstrated. Abbreviation: AIP, autoinducing thiolactone peptide.

(Figure 1). The RNAII transcript encodes a cell density-sensing cassette (*agrD* and *agrB*) and a TCS system (*agrA* and *agrC*). *agrD* is a 46-amino acid precursor peptide that is processed by membrane protease *AgrB*, resulting in an autoinducing thiolactone peptide (AIP) that is 7 to 9 amino acids long and is continuously released in the extracellular environment. Upon a threshold concentration, the AIP is sensed by membrane kinase *AgrC*, causing autophosphorylation of its intracellular histidine kinase domain. This phosphoryl group is then transferred to cognate

response regulator AgrA, which in turn activates transcription of its own RNAII transcript and the regulatory RNAIII (84). RNAIII carries an open reading frame encoding  $\delta$ -hemolysin, which is a 26-amino acid cytolytic peptide belonging to the phenol-soluble modulins (PSM) family (48; see below).

The *agr* locus is present in all staphylococci, but high genetic variability has been observed in the AIP, AgrB, and AgrC, leading to at least four *agr* groups among *S. aureus* strains (26, 33, 49, 51). The quorum-sensing response is based on highly specific recognition of the AIP and the sensor portion of AgrC within each group. However, a heterologous AIP from one group can bind to the AgrC of another group, but it cannot induce autophosphorylation of AgrC. As a consequence, the response regulator AgrA is not phosphorylated, and the transcription of RNAIII cannot be activated (51). This *agr* interference has been postulated to isolate bacterial populations through niche competition. However, these allelic variations in the *agr* system correlate with different pathotypes; this is most likely because various significant activities of P3 promoters occur in different groups, affecting expression of the key transcriptional regulator Rot and several virulence factors (33).

Although the *agr* system is activated at high cell density, it has also been reported that under specific physical and chemical confinement conditions, the AIP can activate the *agr* system in a single cell (14). In this study, the bacterium was isolated from the environment and put into a nanostructured matrix mimicking an early endosomal vesicle. This specific confinement-induced *agr* system enhances viability compared to *agr*-negative bacteria, suggesting that the two regulators AgrA and RNAIII modulate gene expression to facilitate adaptation in a specific environment. This implies that shortly after colonization, few individuals have the potential to initiate virulence gene expression. One implication of such phenomena for bacterial pathogenicity has recently been discussed (85). Indeed, *S. aureus* producing high levels of *agr* is able to block autophagic flux, leading to accumulation of the bacteria in autophagosomes to protect them against phagocytic killing. It is proposed that an intracellular survival niche of *S. aureus* within phagocytes would ultimately facilitate further dissemination (85). Recent work has shown that the *agr* system confers to *S. aureus* the ability to escape from human macrophages (77).

Comparative transcriptional analysis revealed the existence of two distinct subsets of *agr* target genes that are regulated either by AgrA or by RNAIII (100). These data, obtained using a clinical MRSA strain, revealed that AgrA activates synthesis of several PSM cytolysin genes, one of them encoded by RNAIII, and concomitantly downregulates genes involved in carbohydrate and amino acid metabolism (100). Furthermore, RNAIII was shown to regulate primarily the expression of major virulence factors and several transcriptional regulators (e.g., 80; see below). Interestingly, the PSM peptides, which are the only toxins regulated by AgrA, were originally proposed to be involved in the noninfectious life cycle of *S. aureus* (100). Based on these data, Queck et al. (100) suggested that the RNAIII-dependent regulatory circuits and the quorum-sensing-dependent networks were connected during evolution so that cell density responds more quickly to virulence gene expression during infection, and to link the PSM peptides to other virulence determinants.

Interestingly, a homolog of the *agr* system of *S. aureus* was also identified in *Listeria monocytogenes* (104). It is required during the early stage of biofilm formation, modulates the expression of several virulence factors, and provides a benefit to populations in soil (104, 126). In addition, the *agr* system regulates expression of two chitinases known to modulate host immune responses. One of the chitinases, ChiA, is mediated through a small noncoding RNA (sRNA), LhrA, which is repressed by *agr* (93). Whether sRNAs other than LhrA are activated by the *agr* system in *Listeria* is still unknown.

**Table 1** Direct targets of quorum-sensing-induced RNAIII

Gene	Protein	Functions	RNAIII-dependent regulation
<i>spa</i>	Protein A	Adhesion Immune evasion	Translation repression RNase III degradation
<i>coa</i>	Coagulase	Adhesion Fibrin clot formation	Translation repression RNase III degradation
<i>sbi</i>	Sbi	Adhesion Immune evasion Activates complement C3	Translation repression
<i>Sa1000</i>	SA1000	Adhesion Fibrinogen-binding protein	Translation repression RNase III degradation
<i>lytM</i>	LytM	Cell wall metabolism Protein A release	Translation repression
<i>rot</i>	Rot	Repressor of toxins	Translation repression RNase III cleavage
<i>mgrA</i>	MgrA	Repressor of cell surface proteins Activator of capsule Inhibitor of autolysis	mRNA stabilization
<i>bla</i>	$\alpha$ -hemolysin (Hla)	Pore-forming toxin Induces apoptosis	mRNA structural changes Translation activation
<i>bld</i>	$\delta$ -hemolysin (Hld)	PSM toxin Hemolysis, cytolysis	Encoded by RNAIII

RNAIII regulates two sets of target mRNAs, which encode either virulence factors (protein A, coagulase, SA1000, Sbi, Hla) or master transcriptional regulatory proteins (Rot, MgrA). The functions of virulence factors have been detailed in previous reviews (96, 131).

### THE SURPRISINGLY MULTIFACETED REGULATORY RNAIII

RNAIII is one of the largest regulatory RNAs. It regulates virulence gene expression as the intracellular effector of the quorum-sensing system (84). The bifunctional RNAIII encodes the PSM  $\delta$ -hemolysin (also called Hld) and acts as a regulator to promote the switch between expression of many surface proteins and synthesis of excreted toxins (82, 120; **Figure 1**; **Table 1**). An open reading frame within RNAIII is not found in every staphylococcal strain (9), and its translation has not been described as a critical event modulating the regulatory activities of RNAIII. Intriguingly, translation of *bld* was delayed by 1 hr after RNAIII synthesis, but this delay was eliminated by deleting the large 3' untranslated region (UTR) (6). These data suggest the involvement of an unknown *trans*-acting intermediate factor that controls *bld* translation during the growth phase. Of note, the 5' and 3' ends of RNAIII are in close proximity (9), suggesting that *bld* translation requires a conformational change of the RNA.

The 3' UTR of *bld* is rather long and is the most conserved region of RNAIII (9). It contains several C-rich sequence motifs present in apical loops and unpaired regions that were identified as seed sequences to initiate binding with the ribosome-binding sites of several target mRNAs (**Figure 1**; **Table 1**). Depending on the mRNA signatures, the topology of the repressed mRNA-RNAIII complexes vary slightly; in several cases, two or three distant regions of the two RNAs are engaged in base-pairing interactions (13, 16, 22; **Figure 1**). Binding of RNAIII occurs with a fast association rate constant, suggesting that no helper protein is required to form the duplexes. In all cases, binding of RNAIII to the target mRNAs prevented initiation of translation (13, 16,

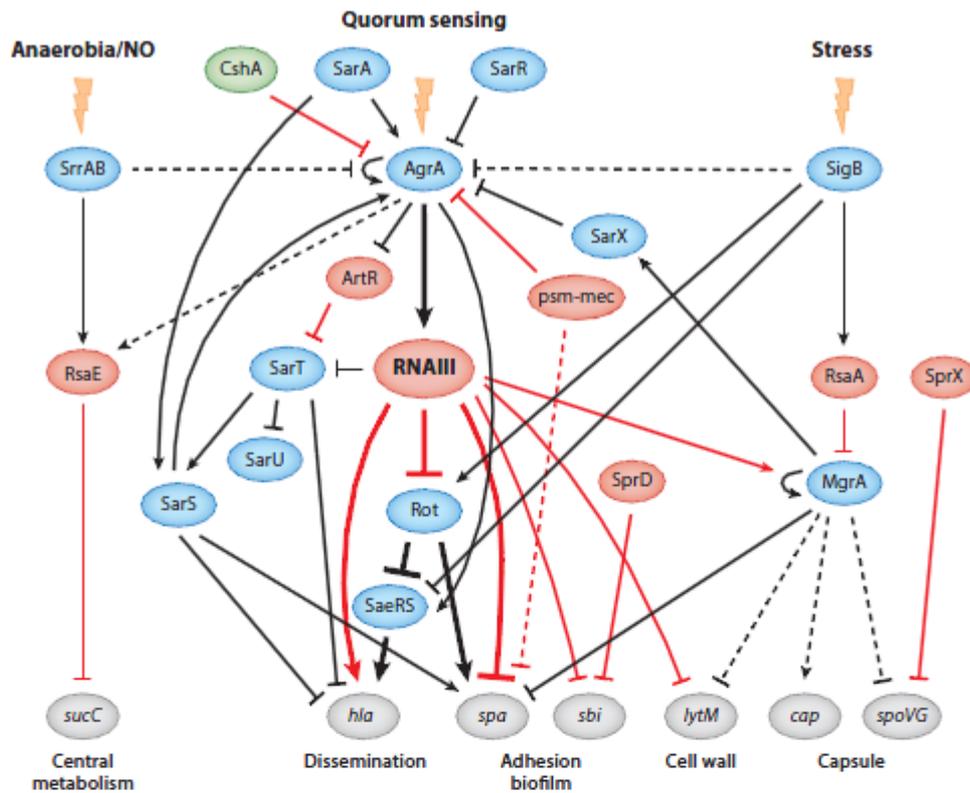
22, 45), and this step can be followed by rapid degradation of the repressed mRNAs initiated by RNase III (13, 22, 45).

Through this direct mechanism, RNAIII represses synthesis of major surface proteins, such as protein A, coagulase, Sbi, and a fibrinogen-binding protein (SA1000), which play key roles in adhesion and in defense against the host immune system (**Figure 1, Table 1**). RNAIII also represses translation of LytM through an antisense mechanism (13, 23). LytM, a major cell wall hydrolytic enzyme, belongs to a family of key enzymes associated with multiple processes, such as peptidoglycan turnover, cell division and separation, protein secretion, biofilm formation, and programmed cell death (125). More recently, it was also shown that LytM triggers protein A release from the bacterial cell wall to modify the host immune responses (7). Base-pairing interactions have been predicted between the 3' domain of RNAIII and several mRNAs encoding enzymes involved in cell wall metabolism; namely, the protein SA2093 (a homolog of the staphylococcal secretory antigen SsaA) and two transglycosylases, SceD and IsaA. Whether RNAIII is able to corepress the synthesis of these enzymes at high cell density has not yet been experimentally demonstrated (62). Transcription of all these enzymes is activated by the essential TCS WalKR during the exponential growth phase, whereas these enzymes are repressed during the stationary growth phase, when WalKR is inactivated (25). The RNAIII-mediated posttranscriptional regulation of *lytM* is most probably required when WalKR is inactivated to curtail synthesis of unwanted protein in order to prevent accidental cell lysis at high cell density, and to facilitate the export of exotoxins.

Using the same mechanism, RNAIII inhibits initiation of translation of *rot* mRNA, encoding the repressor of toxins Rot, a member of the staphylococcal accessory regulator Sar family (13, 32, 107). Rot directly binds to the promoter region of many exoproteins and toxins, blocking their transcription (107); however, it could stimulate transcription of *spa* (which encodes protein A) (86). Therefore, by inhibiting Rot, RNAIII indirectly activates transcription of many exotoxins and indirectly inhibits synthesis of protein A at the transcriptional level (**Figure 2, Table 1**). As mentioned above, RNAIII also directly represses *spa* mRNA translation.

Besides these indirect effects it has on transcription, RNAIII can also directly activate translation of  $\alpha$ -hemolysin. Interaction of RNAIII with the 5' UTR of *bla* mRNA liberates the Shine and Dalgarno (SD) sequence to promote recruitment of the ribosome at the initiation step (76; **Figure 1**). It has also been suggested that RNAIII activates synthesis of the extracellular adherence Map protein by a not yet defined mechanism (64). More recently, it was shown that the 3' and 5' ends of RNAIII both interact with the 5' UTR of *mgrA* mRNA and stabilize the mRNA against degradation by an unknown ribonuclease (**Figure 1**; 41). Although MgrA is transcribed from two promoters, RNAIII stabilizes only the largest transcript and modulates the expression of several MgrA-dependent genes. MgrA is a pleiotropic regulator that has a negative effect on biofilm formation and cell autolysis, has a positive effect on capsule formation and on the *agr* system, and modulates clumping and virulence by repressing several major cell wall-associated proteins (24, 40, 47, 66, 105, 122). Hence, MgrA is the second master global regulatory protein through which RNAIII might perform its regulatory functions (**Figure 2; Table 1**).

These data revealed that *S. aureus* RNAIII and the transcription factor Rot are part of a double-layered switch involving both transcriptional and posttranscriptional regulation, also called a feed-forward loop motif (**Figure 2**; 8). The structural characteristics and dynamic properties of this typical double-selector switch (DSS) were recently studied using deterministic and stochastic computational methods (78). This network guarantees fine-tuned coordination of the inverse expression of the two gene sets—i.e., upregulation of hemolysins, leukocidins, and degradative exoenzymes, and downregulation of surface proteins and adhesins (**Figure 2**). In addition, these regulatory circuits ensure tight regulation and low noise only if RNAIII production dominates for a long period



**Figure 2**

Regulatory circuits involved in virulence gene expression. Only parts of the regulatory circuits, taken from the literature, are represented. The feedforward loop motif involving RNAIII and the transcriptional regulator Rot is represented by bold lines. The transcriptional regulatory proteins are in blue, the regulatory RNAs are in red, the RNA helicase CshA is in green, and the target mRNAs are in gray. Transcriptional regulation is represented by black lines and posttranscriptional regulation by red lines. Arrows correspond to activation, whereas inhibition lines correspond to repression. Indirect regulation is represented by dashed lines. Transcription of the *agr* system is controlled by several two-component systems and the SarA protein family (18).

(78). High production of RNAIII is indeed expected to limit the cell-to-cell variability of gene expression. Hence, this DSS contributes to an effective transition of the pathogen for spreading in host tissues and establishing the infection following a quorum-sensing signal (4, 78, 80); **Figure 2**. Variants of this DSS circuit has been described in gram-negative bacteria, suggesting that it is a very appropriate molecular switch to control key decision-making processes—i.e., the transition between motile and sessile lifestyles, or anaerobic aerobic growth conditions (78).

### DYNAMIC PROPERTIES OF THE *agr* REGULATORY NETWORK

The *agr* (accessory gene regulator) locus is one of the most regulated operons of *S. aureus*. Expression of RNAIII varies considerably in clinical isolates from acute infections (116), raising the question of how variation of the concentration of *agr*-encoded proteins and RNAIII affects the regulatory circuits and, in turn, *S. aureus* pathogenicity.

The promoter regions of the *agr* operon contain binding sites of numerous transcriptional regulatory proteins, and some of them have opposite functions. In the family of staphylococcal accessory regulators, for example, SarA activates the transcription of RNAII by AgrA, whereas SarR acts as a repressor by displacing SarA from the P2 promoter (18, 103). Furthermore, synthesis of most of the virulence factors in staphylococci depends on environmental and nutritional signals, which also alter bacterial metabolic status (115). External signaling molecules such as NO or hypoxia are transduced into a regulatory response by the TCS SrrAB, which in turn represses RNAIII transcription (97). SrrAB has been shown essential to survival for cells exposed to both NO and hypoxia; it regulates various sets of genes required for cytochrome biosynthesis, anaerobic metabolism, iron-cluster repair, and NO detoxification (53). In addition, alteration of the metabolic status (i.e., carbon utilization, pentose phosphate pathway regulation, redox) resulted in transduction of the signals into intracellular metabolic signals that can be sensed by specific regulatory proteins (e.g., CodY, Rex, CcpA, CcpE, RpiR), which in turn alter the quorum-sensing response (42, 70, 90, 112, 132). One of the key factors regulating bacterial switching in response to intracellular stress conditions is the transcriptional factor sigma B (SigB). The SigB regulon is rather large and affects virulence factor production via control of several transcriptional regulators, such as SarA, SarS, and ArlRS, and by modulating RNAIII and Rot (10, 11, 44, 72). By promoting expression of adhesins and formation of biofilms, SigB plays a crucial role in bacterial intracellular persistence and chronic infections (123, 124). By antagonizing RNAIII, SigB modulates virulence factor production in response to changing host environments. An additional essential TCS acting downstream of the *agr* system is SaeRS, which stimulates hemolysin synthesis (1, 60, 69). The major promoter of the *sae* locus is activated by the *agr* system and repressed by Rot and SigB (31, 60). Furthermore, transcription of *saeRS* is affected by numerous environmental signals, such as pH, low salt, glucose as well as subinhibitory concentrations of clindamycin, and oxidative stress (31, 83). Addition of glucose and lowering of pH also strongly decreased *agrABCD* and RNAIII levels (101), suggesting that these parameters act indirectly on *saeRS*. Recently, a semiquantitative model of quorum sensing was analyzed and tested using a variety of mutant strains. A Boolean node interaction network has been modeled using key regulators such as *agr*, *sae*, *arl*, *sar*, *rot*, and *sigB* (4). Although this model may be oversimplified regarding direct interactions of the different nodes, the data confirm the important roles of *sae* and *agr* in promoting *S. aureus* dissemination from existing biofilms.

It would not be surprising if many of these transcriptional factors activate or repress small noncoding RNAs (sRNAs). During the last two decades, genome-wide approaches have revealed complex and dynamic RNA-mediated regulation in *S. aureus* (e.g., 57, 63, 68). In addition, novel sRNAs as well as RNA-binding proteins have been characterized and have been shown to contribute to regulation of virulence-determinant expression at the posttranscriptional level (28). This is, for instance, the case of the RNA DEAD-box helicase CshA, which induces destabilization of the *agrABCD* polycistronic operon in coordination with specific ribonucleases (89). This regulation is thought to contribute to maintaining a balance of the steady-state levels of *agr* required for the proper expression of the virulence determinants, and it might help to rapidly alter the cell response after release from a dense population (89). As for sRNAs, several of them inhibit the action of RNAIII, whereas others act synergistically to coordinate the regulatory switch of the two sets of RNAIII-regulated genes (Figure 2). Interestingly enough, several pathogenicity islands encode sRNAs, which participate in the evolution of *S. aureus* genomes and have been shown to regulate expression of genes of the core genome to modify quorum-sensing responses. The pathogenicity-island-encoded SprD sRNA represses translation of *sbi* mRNA through binding to the ribosome-binding site at low cell density. Conversely, at high cell density, when steady-state levels of SprD significantly decrease, RNAIII takes over using a very similar antisense

mechanism (16, 17; **Figure 1**). These findings suggest that the synthesis of the immune-evasion Sbi protein and the timing of its expression must be precise—most likely early during growth, but whether strict regulation is required during infection is not yet known. Another example concerns a bifunctional sRNA called psm-mec RNA. It is encoded by the staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC-*mec*), which confers  $\beta$ -lactam resistance in hospital-acquired methicillin-resistant *S. aureus* (HA-MRSA). The psm-mec RNA encodes a cytolytic phenol-soluble modulins peptide; in addition, it alters the stability of *agrA* mRNA by binding to its coding sequence (52). Deletion of the psm-mec gene in HA-MRSA enhanced virulence in a murine infection model, most likely in connection with the decreased activity of AgrA (52). However, in another study based on transcriptomic profiling, the psm-mec RNA was shown to significantly enhance the synthesis of protein A in all strains tested, with no major effect on AgrA expression (20). Furthermore, the cytolytic PSM peptide had a limited effect on both *mecA* mRNA expression and oxacillin resistance. This analysis supports the previous hypothesis that expression of virulence genes is balanced according to expression of antibiotic resistance genes; this balance might be mediated through the bifunctional psm-mec RNA (20, 106). Whether all PSM loci have evolved regulatory functions (like RNAIII and psm-mec RNA) requires further analysis.

Other sRNAs that are encoded in the core genome and whose functions have been identified regulate mRNAs encoding transcriptional regulators (**Figure 2**). By doing so, they potentially mediate interactions between global regulators such as the *agr* system. A large sRNA called AgrA-repressed toxin-regulating sRNA (ArtR) interacts with the 5' UTR of *sarT* mRNA to destabilize the mRNA (130). SarT, a SarA homolog, represses transcription of SarU (71) and of *bla* (110) and activates transcription of SarS (109). On the other hand, SarT and the sRNA ArtR are both repressed by AgrA (109, 130). Because SarT represses synthesis of *bla* mRNA (110), it was proposed that ArtR would indirectly activate exotoxin production (130). Whereas the translation of *bla* requires RNAIII (**Figure 1**), ArtR-dependent regulation might occur in a precise time window when AgrA is not strongly activated. Another sRNA, called RsaA, is activated by SigB and represses translation of the global transcriptional regulator MgrA through an antisense mechanism (105). RsaA functionally links global regulators SigB and MgrA, which regulate the *agr* system negatively and positively, respectively (**Figure 2**). Through MgrA regulation, RsaA enhances biofilm formation, decreases synthesis of capsule formation, and favors opsonophagocytic killing of *S. aureus* leukocytes. These phenotypes explain why RsaA attenuated the severity of systemic infections and enhanced chronic infection (105). Finally, RsaE regulates genes involved in the TCA cycle during stress, NO induction, and decrease of carbon sources (12, 27, 34). Transcription of this sRNA is regulated by the TCS SrrAB, which has a negative effect on the *agr* system (27).

Clearly, the quorum-sensing response in *S. aureus* occurs within complex regulatory networks involving intricate interactions between transcriptional regulators, metabolite-sensing proteins, and sRNAs. These networks continually shape the expression pattern of the virulence determinants in response to various metabolic and environmental changes—either directly, by modifying the yield of RNAIII, or indirectly, by modifying the downstream targets. This dynamic expression enables the population of bacteria to mitigate metabolic burden in unfavorable conditions. As sRNAs are discovered, we may find several novel key regulators that substantially enhance the complexity of *agr* networks.

## THE IMPACT OF AgrA/RNAIII DURING INFECTION

The importance of the quorum-sensing *agr* system in *S. aureus* pathogenesis has been a matter of debate. The two main intracellular effectors, AgrA and RNAIII, regulate expression of virulence determinants, which are associated with many infectious diseases (58, 83, 88, 91, 131). For

instance, among the surface proteins, protein A triggers inflammatory signaling pathways (36) and contributes to evasion of the host's immune response (37, 94). RNAIII induces synthesis of a battery of exoproteins, which contribute to the degradation of tissues and subversion of host defenses (56). These include one- and two-component pore-forming toxins encoded in the core genome (e.g., alpha-toxin, gamma toxin AB and BC, LukAB/GH) or in mobile genetic elements (e.g., Panton Valentine leukocidin, LukDE), all of which are presumably positively regulated by RNAIII (2). The only toxins that AgrA activates directly are the PSM peptides, which have proinflammatory and lytic activities (19).

The RNAIII-dependent synthesis of exotoxins, and AgrA-dependent PSM synthesis suggest that the *agr* system is required during acute infections. Indeed, the vast majority of clinical isolates from acute infections express RNAIII (121). However, *agr*-defective isolates with reduced susceptibility to glycopeptides have been associated with persistent bacteremia, notably in patients with intravascular devices (29, 30, 91, 108, 111, 121). While *agr* mutations result in adaptation of the pathogen within the infected host, this loss of function might be counterselective outside the host (114). Agr defects are also detected in colonizing isolates of patients, and these strains have in general lost their ability to disseminate in patient tissues (113, 114). This supports the model of *agr* being important for full expression of virulence, notably during acute infection, whereas *agr* mutants would be positively selected in chronic infections and dormant states (i.e., often associated with biofilm formation). The enhanced survival of *agr* mutants might be due in part to the increased expression of immune-evading factors such as protein A. Intriguingly, a mixture of *agr*-positive and *agr*-defective *S. aureus* strains within individuals has been reported (113, 121). It might be postulated that the *agr*-defective bacteria save resources and benefit from the exotoxins produced by the *agr*-positive bacteria. It was recently proposed that the balance between mutant and *agr*-positive populations might affect the outcomes of the infections and that this heterogeneity of the bacterial population would reflect a transition period in the course of infection (91, 95).

The steady-state levels of RNAIII vary considerably among clinical isolates (50, 116). In particular, higher levels of the master regulators AgrA/RNAIII, SarA, and SacRS have been observed in the increased virulence of community-acquired MRSA strains such as USA300 as compared to other *S. aureus* lineages (54, 61, 74, 75, 133). This was accompanied by enhanced synthesis of toxin synthesis and secretion, providing a decent explanation to community-acquired MRSA virulence (87). An additional layer of complexity is the acquisition of new gene loci through horizontal transfer. Some of these mobile elements cross talk with the core genome where new proteins and/or sRNAs could modulate the expression of key virulence determinants or of regulatory factors (17, 21, 52).

## **THE *Agr*/RNAIII SYSTEM AS TARGET FOR DEVELOPING THERAPEUTIC APPROACHES**

Owing to the emergence of multidrug resistance to the classical antibiotics targeting essential bacterial machineries, it is critical to uncover novel targets as well as alternate antibacterial therapies. Inhibiting virulence factor synthesis appears to be one promising approach to attenuate infections (15). An advantage of such a strategy is that it would use human defense mechanisms to clear the bacteria, without serious effects on the human microbiota; it is thus expected to exert less selective pressure on resistant populations. Because cross-group AIPs competitively inhibited the noncognate AgrC receptors and expression of exotoxins (33, 67), and antibodies against AIP had significant reduction of abscess formation (5, 92), constitutive inhibition of either AIP activity or

the action of key components of the *agr* system is considered a promising therapeutic approach for attenuating pathogenesis of *S. aureus* (reviewed in 3, 38, 39).

Several studies have used high-throughput screening of small synthetic and natural molecules with inhibitory properties against *agr*. One of the best compounds is the so-called savirin product, which specifically disrupted *agr*-mediated quorum sensing in *S. aureus* but not in the important skin commensal *Staphylococcus epidermidis* (118). This compound was shown to bind the sensor regulator AgrA and to prevent exotoxin upregulation. Interestingly, savirin did not provoke stress responses as did conventional antibiotics, but the compound had a significant effect on bacterial infection in two murine skin infection models (118). The development of high-throughput methods and the enhanced knowledge of the structures and functions of master regulators of *S. aureus* will certainly facilitate either design or selection of novel small chemicals inhibiting pathogenesis and/or essential metabolic pathways.

Another approach is to identify natural compounds displaying AgrABCD/RNAIII-inhibitory activity owing to mixed microbial infections. For instance, the *Pseudomonas aeruginosa* exoproduct HQNO had a significant effect on *S. aureus* behavior (43) but unfortunately favored the formation of small colony variants known as a persistent form of the bacteria causing chronic infections (98). The *P. aeruginosa* quorum-sensing molecule *N*-(3-oxododecanoyl)-homoserine lactone (3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL) also had an inhibitory effect on the *agr* system and at high concentration affected growth (99). Another typical example is *Lactobacillus reuteri*, a human vaginal isolate that produces two cyclic dipeptides inhibiting the quorum-sensing response of *S. aureus* and the production of the major toxin associated with the menstruation-associated toxic shock syndrome (102). A deficiency of *L. reuteri* in the vaginal mucosa renders women more susceptible to *S. aureus* infections (102). Another study has recently revealed that the oxygen-reducing properties of *Lactococcus lactis* were responsible for the downregulation of the *agr* system of *S. aureus* (79).

Targeting the *agr* system for drug development is certainly one option to fight against acute diseases. However, other strategies will need to be addressed to circumvent the appearance of small colony variants in *agr* mutant strains that are often associated with biofilm formation, antibiotic resistance, and long-term persistence and recurrence (98).

## CONCLUSION

The *agr* locus affects regulation of the expression of a large variety of virulence determinants, and how RNAIII is able to coordinate two sets of virulence factors. Some of the examples given here highlight how transcriptional regulators and regulatory sRNAs engage in intricate interactions to modulate *agr* in response to changes in the environment and to stresses encountered during the infection (Figures 1 and 2). Although the implication of the *agr* system in acute infections is widely recognized, its mechanism of intervention during chronic infections is less clear. Furthermore, it is still unknown why specific carriage isolates cause suddenly invasive infections, and whether colonization should be considered evolutionarily advantageous or detrimental to the human host (127).

Another major challenge will be to understand the contribution of regulatory proteins and sRNAs in the context of colonization, acute infection, and/or persistence. Indeed, the host response and the human microbiome are expected to influence the expression pattern of regulatory factors and vice versa. Dual RNA-seq approaches performed on the host and *S. aureus* might provide a more comprehensive view of changes in gene expression during the course of infection (128, 129). A recent study revealed simultaneous changes occurring in *Salmonella typhimurium* and the host cell (128). This study demonstrated how a bacterial sRNA controls the expression of virulence genes required for intracellular survival and how it changes considerably the regulation

of many transcripts of the host cell. This important study offers for the first time the possibility of monitoring the intracellular bacteria and the host cell simultaneously to discover new functions of bacterial genes. The functions of *S. aureus* RNAs and the associated proteins (e.g., RNA-binding proteins, ribonucleases) in gene regulation and their impact on virulence can now be better investigated.

Single-cell studies on *S. aureus* have revealed competitive interactions between bacterial cells (55, 59). Surprisingly, isolates of MRSA have coevolved two subpopulations that react differently to antibiotic treatment—the first clue to how bacteria can rapidly evolve antibiotic resistance in the context of an infection (55). Measuring population behavior in single-cell analyses should lead to better characterization of the mechanisms that enhance the survival capacity of the overall population under stressful environmental conditions, to better analysis of their persistence (35), and to better characterization of cell-to-cell communication. Single-cell analysis is also a major challenge in drug discovery.

Last but not least, several studies have shown that sRNAs and peptides can mediate cross talk between mobile genetic elements and the core genome. Therefore, understanding the impact of genetic variations of both *S. aureus* lineages and the hosts is important to combating staphylococcal diseases (73). We have come to a moment when we need to collaborate across multiple disciplines to better integrate big data sets on a variety of *S. aureus* strains from around the world and to develop therapeutic and other biotechnological applications.

## DISCLOSURE STATEMENT

The authors are not aware of any affiliations, memberships, funding, or financial holdings that might be perceived as affecting the objectivity of this review.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank all the members of our respective teams for helpful discussions. This work was supported by Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), has been published under the framework of the LabEx: ANR-10-LABX-0036\_NETRNA (P.R.) and the LabEx Ecofect (F.V.), and benefits from funding from L'Agence Nationale de la Recherche as part of Investissements d'Avenir.

## LITERATURE CITED

1. Adhikari RP, Novick RP. 2008. Regulatory organization of the staphylococcal *sae* locus. *Microbiology* 154:949–959
2. Alonzo FE III, Torres VJ. 2014. The bicomponent pore-forming leucocidins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78:199–230
3. Arya R, Ravikumar R, Santhosh RS, Princy SA. 2015. SarA based novel therapeutic candidate against *Staphylococcus aureus* associated with vascular graft infections. *Front. Microbiol.* 6:416
4. Audretsch C, Lopez D, Srivastava M, Wolz C, Dandekar T. 2013. A semi-quantitative model of quorum-sensing in *Staphylococcus aureus*, approved by microarray meta-analyses and tested by mutation studies. *Mol. Biosyst* 9:2665–80
5. Balaban N, Goldkorn T, Nhan RT, Dang LB, Scott S, et al. 1998. Autoinducer of virulence as a target for vaccine and therapy against *Staphylococcus aureus*. *Science* 280:438–40
6. Balaban N, Novick RP. 1995. Translation of RNAMIII, the *Staphylococcus aureus agr* regulatory RNA molecule, can be activated by a 3'-end deletion. *FEMS Microbiol. Lett.* 133:155–61
7. Becker S, Frankel MB, Schneewind O, Missiakas D. 2014. Release of protein A from the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *PNAS* 111:1574–79

8. Beisel CL, Storz G. 2010. Base pairing small RNAs and their roles in global regulatory networks. *FEMS Microbiol. Rev.* 34:866–82
9. Benito Y, Kolb FA, Romby P, Lina G, Etienne J, 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* 6:668–79
10. Bischoff M, Dunman P, Kormanec J, Macapagal D, Murphy E, et al. 2004. Microarray-based analysis of the *Staphylococcus aureus*  $\sigma^B$  regulon. *J. Bacteriol.* 186:4085–99
11. Bischoff M, Entenza JM, Giachino P. 2001. Influence of a functional *sigB* operon on the global regulators *sar* and *agr* in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 183:5171–79
12. Bohn C, Rigoulay C, Chabelskaya S, Sharma CM, Marchais A, et al. 2010. Experimental discovery of small RNAs in *Staphylococcus aureus* reveals a riboregulator of central metabolism. *Nucleic Acids Res.* 38:6620–36
13. Boisset S, Geissmann T, Huntzinger E, Fechter P, Bendridi N, et al. 2007. *Staphylococcus aureus* RNAIII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an anti-sense mechanism. *Genes Dev.* 21:1353–66
14. Carnes EC, Lopez DM, Donegan NP, Cheung A, Gresham H, et al. 2010. Confinement-induced quorum sensing of individual *Staphylococcus aureus* bacteria. *Nat. Chem. Biol.* 6:41–45
15. Cegelski L, Marshall GR, Eldridge GR, Hultgren SJ. 2008. The biology and future prospects of antivirulence therapies. *Nat. Rev. Microbiol.* 6:17–27
16. Chabelskaya S, Bordeau V, Felden B. 2014. Dual RNA regulatory control of a *Staphylococcus aureus* virulence factor. *Nucleic Acids Res.* 42:4847–58
17. Chabelskaya S, Gaillot O, Felden B. 2010. A *Staphylococcus aureus* small RNA is required for bacterial virulence and regulates the expression of an immune-evasion molecule. *PLoS Pathog.* 6:e1000927
18. Cheung AL, Nishina KA, Trotonda MP, Tamber S. 2008. The SarA protein family of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40:355–61
19. Cheung GY, Joo HS, Chatterjee SS, Otto M. 2014. Phenol-soluble modulins—critical determinants of staphylococcal virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* 38:698–719
20. Cheung GY, Kretschmer D, Duong AC, Yeh AJ, Ho TV, et al. 2014. Production of an attenuated phenol-soluble modulin variant unique to the MRSA clonal complex 30 increases severity of bloodstream infection. *PLoS Pathog.* 10:e1004298
21. Cheung GY, Villaruz AE, Joo HS, Duong AC, Yeh AJ, et al. 2014. Genome-wide analysis of the regulatory function mediated by the small regulatory *psm-mec* RNA of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* 304:637–44
22. Chevalier C, Boisset S, Romilly C, Masquida B, Fechter P, et al. 2010. *Staphylococcus aureus* RNAIII binds to two distant regions of *coa* mRNA to arrest translation and promote mRNA degradation. *PLoS Pathog.* 6:e1000809
23. Chunhua M, Yu L, Yaping G, Jie D, Qiang L, et al. 2012. The expression of LytM is down-regulated by RNAIII in *Staphylococcus aureus*. *J. Basic Microbiol.* 52:636–41
24. Crosby HA, Schlievert PM, Merriman JA, King JM, Salgado-Pabon W, Horswill AR. 2016. The *Staphylococcus aureus* global regulator MgrA modulates clumping and virulence by controlling surface protein expression. *PLoS Pathog.* 4:e1005604
25. Dubrac S, Msadek T. 2008. Tearing down the wall: peptidoglycan metabolism and the WalK/WalR (YycG/YycF) essential two-component system. *Adv. Exp. Med. Biol.* 631:214–28
26. Dufour P, Jarraud S, Vandenesch F, Greenland T, Novick RP, et al. 2002. High genetic variability of the *agr* locus in *Staphylococcus* species. *J. Bacteriol.* 184:1180–86
27. Durand S, Braun F, Lioliou E, Romilly C, Helfer AC, et al. 2015. A nitric oxide regulated small rna controls expression of genes involved in redox homeostasis in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genet.* 11:e1004957
28. Felden B, Vandenesch F, Bouloc P, Romby P. 2011. The *Staphylococcus aureus* RNome and its commitment to virulence. *PLoS Pathog.* 7:e1002006
29. Fowler VGJ, Sakoulas G, McIntyre LM, Meka VG, Arbeit RD, et al. 2004. Persistent bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection is associated with *agr* dysfunction and low-level in vitro resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein. *J. Infect. Dis.* 190:1140–49

30. Gagnaire J, Dauwalder O, Boisset S, Khau D, Freydiere AM, et al. 2012. Detection of *Staphylococcus aureus* delta-toxin production by whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry. *PLOS ONE* 7:e40660
31. Geiger T, Goerke C, Mainiero M, Kraus D, Wolz C. 2008. The virulence regulator Sae of *Staphylococcus aureus*: promoter activities and response to phagocytosis-related signals. *J. Bacteriol.* 190:3419–28
32. Geisinger E, Adhikari RP, Jin R, Ross HF, Novick RP. 2006. Inhibition of *rot* translation by RNAIII, a key feature of *agr* function. *Mol. Microbiol.* 61:1038–48
33. Geisinger E, Chen J, Novick RP. 2012. Allele-dependent differences in quorum-sensing dynamics result in variant expression of virulence genes in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 194:2854–64
34. Geissmann T, Marzi S, Romby P. 2009. A search for small noncoding RNAs in *Staphylococcus aureus* reveals a conserved sequence motif for regulation. *Nucleic Acids Res.* 37:7239–59
35. Germain E, Roghanian M, Gerdes K, Maisonneuve E. 2015. Stochastic induction of persister cells by HipA through (p)ppGpp-mediated activation of mRNA endonucleases. *PNAS* 112:5171–76
36. Gomez MI, Lee A, Reddy B, Muir A, Soong G, et al. 2004. *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. *Nat. Med.* 10:842–48
37. Goodyear CS, Silverman GJ. 2004. Staphylococcal toxin induced preferential and prolonged in vivo deletion of innate-like B lymphocytes. *PNAS* 101:11392–97
38. Gordon CP, Williams P, Chan WC. 2013. Attenuating *Staphylococcus aureus* virulence gene regulation: a medicinal chemistry perspective. *J. Med. Chem.* 56:1389–404
39. Gray B, Hall P, Gresham H. 2013. Targeting *agr*- and *agr*-Like quorum sensing systems for development of common therapeutics to treat multiple gram-positive bacterial infections. *Sensors* 13:5130–66
40. Gupta RK, Alba J, Xiong YQ, Bayer AS, Lee CY. 2013. MgrA activates expression of capsule genes, but not the  $\alpha$ -toxin gene in experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis. *J. Infect. Dis.* 208:1841–48
41. Gupta RK, Luong TT, Lee CY. 2015. RNAIII of the *Staphylococcus aureus agr* system activates global regulator MgrA by stabilizing mRNA. *PNAS* 112:14036–41
42. Hartmann T, Baronian G, Nippe N, Voss M, Schulthess B, et al. 2014. The catabolite control protein E (CcpE) affects virulence determinant production and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 289:29701–11
43. Hoffman LR, Deziel E, D'Argenio DA, Lepine F, Emerson J, et al. 2006. Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS* 103:19890–95
44. Hsieh HY, Tseng CW, Stewart GC. 2008. Regulation of Rot expression in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 190:546–54
45. Huntzinger E, Boisset S, Saveanu C, Benito Y, Geissmann T, et al. 2005. *Staphylococcus aureus* RNAIII and the endoribonuclease III coordinately regulate *spa* gene expression. *EMBO J.* 24:824–35
46. Ibarra JA, Perez-Rueda E, Carroll RK, Shaw LN. 2013. Global analysis of transcriptional regulators in *Staphylococcus aureus*. *BMC Genomics* 14:126
47. Ingavale S, van Wamel W, Luong TT, Lee CY, Cheung AL. 2005. Rat/MgrA, a regulator of autolysis, is a regulator of virulence genes in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 73:1423–31
48. Janzon L, Arvidson S. 1990. The role of the  $\delta$ -lysin gene (*bld*) in the regulation of virulence genes by the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *EMBO J.* 9:1391–99
49. Jarraud S, Lyon GJ, Figueiredo AM, Lina G, Vandenesch F, et al. 2000. Exfoliatin-producing strains define a fourth *agr* specificity group in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 182:6517–22
50. Jelsbak L, Hemmingsen L, Donat S, Ohlsen K, Boye K, et al. 2010. Growth phase-dependent regulation of the global virulence regulator Rot in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* 300:229–36
51. Ji G, Beavis R, Novick RP. 1997. Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science* 276:2027–30
52. Kaito C, Saito Y, Ikuo M, Omae Y, Mao H, et al. 2013. Mobile genetic element SCCmec-encoded *psm-mec* RNA suppresses translation of *agrA* and attenuates MRSA virulence. *PLOS Pathog* 9:e1003269
53. Kinkel TL, Roux CM, Dunman PM, Fang FC. 2013. The *Staphylococcus aureus* SrrAB two-component system promotes resistance to nitrosative stress and hypoxia. *mBio* 4:e00696–13

54. Kobayashi SD, Malachowa N, Whitney AR, Braughton KR, Gardner DJ, et al. 2011. Comparative analysis of USA300 virulence determinants in a rabbit model of skin and soft tissue infection. *J. Infect. Dis.* 204:937–41
55. Koch G, Yepes A, Forstner KU, Wermser C, Stengel ST, et al. 2014. Evolution of resistance to a last-resort antibiotic in *Staphylococcus aureus* via bacterial competition. *Cell* 158:1060–71
56. Kolar SL, Ibarra JA, Rivera FE, Mootz JM, Davenport JE, et al. 2013. Extracellular proteases are key mediators of *Staphylococcus aureus* virulence via the global modulation of virulence-determinant stability. *MicrobiologyOpen* 2:18–34
57. Lasa I, Toledo-Arana A, Dobin A, Villanueva M, de Los Mozos IR, et al. 2011. Genome-wide antisense transcription drives mRNA processing in bacteria. *PNAS* 108:20172–77
58. Le KY, Otto M. 2015. Quorum-sensing regulation in staphylococci—an overview. *Front. Microbiol.* 6:1174
59. Lee HH, Molla MN, Cantor CR, Collins JJ. 2010. Bacterial charity work leads to population-wide resistance. *Nature* 467:82–85
60. Li D, Cheung A. 2008. Repression of *bla* by *rot* is dependent on *sae* in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 76:1068–75
61. Li M, Cheung GY, Hu J, Wang D, Joo HS, et al. 2010. Comparative analysis of virulence and toxin expression of global community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J. Infect. Dis.* 202:1866–76
62. Lioliou E, Fechter P, Caldelari I, Jester BC, Dubrac S, et al. 2016. Various checkpoints prevent the synthesis of *Staphylococcus aureus* peptidoglycan hydrolase LytM in the stationary growth phase. *RNA Biol.* 13:427–40
63. Lioliou E, Sharma CM, Caldelari I, Helfer AC, Fechter P, et al. 2012. Global regulatory functions of the *Staphylococcus aureus* endoribonuclease III in gene expression. *PLoS Genet* 8:e1002782
64. Liu Y, Mu C, Ying X, Li W, Wu N, et al. 2011. RNAIII activates *map* expression by forming an RNA-RNA complex in *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett.* 585:899–905
65. Lowy FD. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *New Engl. J. Med.* 339:520–32
66. Luong TT, Dunman PM, Murphy E, Projan SJ, Lee CY. 2006. Transcription profiling of the *mgrA* regulon in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 188:1899–910
67. Lyon GJ, Wright JS, Muir TW, Novick RP. 2002. Key determinants of receptor activation in the *agr* autoinducing peptides of *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry* 41:10095–104
68. Mäder U, Nicolas P, Depke M, Pané-Farré J, Debarbouille M, et al. 2016. *Staphylococcus aureus* transcriptome architecture: from laboratory to infection mimicking conditions. *PLoS Genet.* 12:e1005962
69. Mainiero M, Goerke C, Geiger T, Gonser C, Herbert S, Wolz C. 2010. Differential target gene activation by the *Staphylococcus aureus* two-component system *saeRS*. *J. Bacteriol.* 192:613–23
70. Majerczyk CD, Sadykov MR, Luong TT, Lee C, Somerville GA, Sonenshein AL. 2008. *Staphylococcus aureus* CodY negatively regulates virulence gene expression. *J. Bacteriol.* 190:2257–65
71. Manna AC, Cheung AL. 2003. *sarU*, a *sarA* homolog, is repressed by SarT and regulates virulence genes in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 71:343–53
72. Meier S, Goerke C, Wolz C, Seidl K, Homerova D, et al. 2007.  $\sigma^B$  and the  $\sigma^B$ -dependent *arlRS* and *yabJ-spoVG* loci affect capsule formation in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 75:4562–71
73. Messina JA, Thaden JT, Sharma-Kuinkel BK, Fowler VGJ. 2016. Impact of bacterial and human genetic variation on *Staphylococcus aureus* infections. *PLoS Pathog.* 12:e1005330
74. Montgomery CP, Boyle-Vavra S, Adem PV, Lee JC, Husain AN, et al. 2008. Comparison of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pulsotypes USA300 and USA400 in a rat model of pneumonia. *J. Infect. Dis.* 198:561–70
75. Montgomery CP, Boyle-Vavra S, Daum RS. 2010. Importance of the global regulators *Agr* and *SaeRS* in the pathogenesis of CA-MRSA USA300 infection. *PLoS ONE* 5:e15177
76. Morfeldt E, Taylor D, von Gabain A, Arvidson S. 1995. Activation of alpha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the *trans*-encoded antisense RNA, RNAIII. *EMBO J.* 14:4569–77
77. Münzenmayer L, Geiger T, Daiber E, Schulte B, Autenrieth SE, et al. 2016. Influence of *Sae* and *Agr* regulated factors on the escape of *Staphylococcus aureus* from human macrophages. *Cell Microbiol.* In press. doi: 10.1111/cmi.12577

78. Nitzan M, Fechter P, Peer A, Altuvia Y, Bronesky D, et al. 2015. A defense-offense multi-layered regulatory switch in a pathogenic bacterium. *Nucleic Acids Res.* 43:1357–69
79. Nouaille S, Rault L, Jeanson S, Loubiere P, Le Loir Y, Even S. 2014. Contribution of *Lactococcus lactis* reducing properties to the downregulation of a major virulence regulator in *Staphylococcus aureus*, the *agr* system. *Appl. Environ. Microbiol.* 80:7028–35
80. Novick RP. 2003. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol. Microbiol.* 48:1429–49
81. Novick RP, Christie GE, Penades JR. 2010. The phage-related chromosomal islands of gram-positive bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 8:541–51
82. Novick RP, Geisinger E. 2008. Quorum sensing in staphylococci. *Annu. Rev. Genet.* 42:541–64
83. Novick RP, Jiang D. 2003. The staphylococcal *saeRS* system coordinates environmental signals with *agr* quorum sensing. *Microbiology* 149:2709–17
84. Novick RP, Ross HF, Projan SJ, Kornblum J, Kreiswirth B, Moghazeh S. 1993. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J.* 12:3967–75
85. O’Keeffe KM, Wilk MM, Leech JM, Murphy AG, Laabei M, et al. 2015. Manipulation of autophagy in phagocytes facilitates *Staphylococcus aureus* bloodstream infection. *Infect. Immun.* 83:3445–57
86. Oscarsson J, Tegmark-Wisell K, Arvidson S. 2006. Coordinated and differential control of aureolysin (*aur*) and serine protease (*sspA*) transcription in *Staphylococcus aureus* by *sarA*, *rot* and *agr* (RNAIII). *Int. J. Med. Microbiol.* 296:365–80
87. Otto M. 2010. *Staphylococcus aureus* toxin gene hitchhikes on a transferable antibiotic resistance element. *Virulence* 1:49–51
88. Otto M. 2014. *Staphylococcus aureus* toxins. *Curr. Opin. Microbiol.* 17:32–37
89. Oun S, Redder P, Didier JP, Francois P, Corvaglia AR, et al. 2013. The CshA DEAD-box RNA helicase is important for quorum sensing control in *Staphylococcus aureus*. *RNA Biol.* 10:157–65
90. Pagels M, Fuchs S, Pane-Farre J, Kohler C, Menschner L, et al. 2010. Redox sensing by a Rex-family repressor is involved in the regulation of anaerobic gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 76:1142–61
91. Painter KL, Krishna A, Wigneshweraraj S, Edwards AM. 2014. What role does the quorum-sensing accessory gene regulator system play during *Staphylococcus aureus* bacteremia? *Trends Microbiol.* 22:676–85
92. Park J, Jagasia R, Kaufmann GF, Mathison JC, Ruiz DI, et al. 2007. Infection control by antibody disruption of bacterial quorum sensing signaling. *Chem. Biol.* 14:1119–27
93. Paspaliari DK, Mollerup MS, Kallipolitis BH, Ingmer H, Larsen MH. 2014. Chitinase expression in *Listeria monocytogenes* is positively regulated by the *Agr* system. *PLoS ONE* 9:e95385
94. Pauli NT, Kim HK, Falugi F, Huang M, Dulac J, et al. 2014. *Staphylococcus aureus* infection induces protein A-mediated immune evasion in humans. *J. Exp. Med.* 211:2331–39
95. Pollitt EJ, West SA, Cruz SA, Burton-Chellew MN, Diggle SP. 2014. Cooperation, quorum sensing, and evolution of virulence in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 82:1045–51
96. Powers ME, Wardenburg JB. 2014. Igniting the fire: *Staphylococcus aureus* virulence factors in the pathogenesis of sepsis. *PLoS Pathog.* 10:e1003871
97. Pragman AA, Ji Y, Schlievert PM. 2007. Repression of *Staphylococcus aureus* SrrAB using inducible anti-sense *srrA* alters growth and virulence factor transcript levels. *Biochemistry* 46:314–21
98. Proctor RA, Kriegeskorte A, Kahl BC, Becker K, Löffler B, Peters G. 2014. *Staphylococcus aureus* small colony variants (SCVs): a road map for the metabolic pathways involved in persistent infections. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 4:99
99. Qazi S, Middleton B, Muharram SH, Cockayne A, Hill P, et al. 2006. *N*-acylhomoserine lactones antagonize virulence gene expression and quorum sensing in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 74:910–19
100. Queck SY, Jameson-Lee M, Villaruz AE, Bach TH, Khan BA, et al. 2008. RNAIII-independent target gene control by the *agr* quorum-sensing system: insight into the evolution of virulence regulation in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Cell* 32:150–58
101. Regassa LB, Novick RP, Betley MJ. 1992. Glucose and nonmaintained pH decrease expression of the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 60:3381–88

102. Reid G, Bruce AW. 2001. Selection of *Lactobacillus* strains for urogenital probiotic applications. *J. Infect. Dis.* 183(Suppl. 1):S77–80
103. Reyes D, Andrey DO, Monod A, Kelley WL, Zhang G, Cheung AL. 2011. Coordinated regulation by AgrA, SarA, and SarR to control *agr* expression in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 193:6020–31
104. Rieu A, Weidmann S, Garmyn D, Piveteau P, Guzzo J. 2007. *agr* system of *Listeria monocytogenes* EGD-c: role in adherence and differential expression pattern. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:6125–33
105. Romilly C, Lays C, Tomasini A, Caldelari I, Benito Y, et al. 2014. A non-coding RNA promotes bacterial persistence and decreases virulence by regulating a regulator in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog.* 10:e1003979
106. Rudkin JK, Edwards AM, Bowden MG, Brown EL, Pozzi C, et al. 2012. Methicillin resistance reduces the virulence of healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by interfering with the *agr* quorum sensing system. *J. Infect. Dis.* 205:798–806
107. Said-Salim B, Dunman PM, McAleese FM, Macapagal D, Murphy E, et al. 2003. Global regulation of *Staphylococcus aureus* genes by Rot. *J. Bacteriol.* 185:610–19
108. Sakoulas G, Eliopoulos GM, Moellering RCJ, Wennersten C, Venkataraman L, et al. 2002. Accessory gene regulator (*agr*) locus in geographically diverse *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to vancomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:1492–502
109. Schmidt KA, Manna AC, Cheung AL. 2003. SarT influences *sarS* expression in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 71:5139–48
110. Schmidt KA, Manna AC, Gill S, Cheung AL. 2001. SarT, a repressor of  $\alpha$ -hemolysin in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 69:4749–58
111. Schwan WR, Langhorne MH, Ritchie HD, Stover CK. 2003. Loss of hemolysin expression in *Staphylococcus aureus agr* mutants correlates with selective survival during mixed infections in murine abscesses and wounds. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 38:23–28
112. Seidl K, Stucki M, Ruegg M, Goerke C, Wolz C, et al. 2006. *Staphylococcus aureus* CcpA affects virulence determinant production and antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:1183–94
113. Shopsin B, Drlica-Wagner A, Mathema B, Adhikari RP, Kreiswirth BN, Novick RP. 2008. Prevalence of *agr* dysfunction among colonizing *Staphylococcus aureus* strains. *J. Infect. Dis.* 198:1171–74
114. Shopsin B, Eaton C, Wasserman GA, Mathema B, Adhikari RP, et al. 2010. Mutations in *agr* do not persist in natural populations of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* 202:1593–99
115. Somerville GA, Proctor RA. 2009. At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in *Staphylococci*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73:233–48
116. Song J, Lays C, Vandenesch F, Benito Y, Bes M, et al. 2012. The expression of small regulatory RNAs in clinical samples reflects the different life styles of *Staphylococcus aureus* in colonization versus infection. *PLoS ONE* 7:e37294
117. Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. 2000. Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 69:183–215
118. Sully EK, Malachowa N, Elmore BO, Alexander SM, Felling JK, et al. 2014. Selective chemical inhibition of *agr* quorum sensing in *Staphylococcus aureus* promotes host defense with minimal impact on resistance. *PLoS Pathog.* 10:e1004174
119. Thoendel M, Kavanaugh JS, Flack CE, Horswill AR. 2011. Peptide signaling in the staphylococci. *Chem Rev.* 111:117–51
120. Tomasini A, Francois P, Howden BP, Fechter P, Romby P, Caldelari I. 2014. The importance of regulatory RNAs in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Genet. Evol.* 21:616–26
121. Traber KE, Lee E, Benson S, Corrigan R, Cantera M, et al. 2008. *agr* function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Microbiology* 154:2265–74
122. Trottonda MP, Tamber S, Memmi G, Cheung AL. 2008. MgrA represses biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 76:5645–54
123. Tuchscher L, Bischoff M, Lattar SM, Noto Llana M, Pfortner H, et al. 2015. Sigma factor SigB is crucial to mediate *Staphylococcus aureus* adaptation during chronic infections. *PLoS Pathog.* 11:e1004870
124. Tuchscher L, Löffler B. 2016. *Staphylococcus aureus* dynamically adapts global regulators and virulence factor expression in the course from acute to chronic infection. *Curr. Genet.* 62:15–17

125. Turner RD, Vollmer W, Foster SJ. 2014. Different walls for rods and balls: the diversity of peptidoglycan. *Mol. Microbiol.* 91:862–74
126. Vivant AL, Garmyn D, Gal L, Hartmann A, Piveteau P. 2015. Survival of *Listeria monocytogenes* in soil requires AgrA-mediated regulation. *Appl. Environ. Microbiol.* 81:5073–84
127. Wertheim HF, Vos MC, Ott A, van Belkum A, Voss A, et al. 2004. Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. *Lancet* 364:703–5
128. Westermann AJ, Forstner KU, Amman F, Barquist L, Chao Y, et al. 2016. Dual RNA-seq unveils noncoding RNA functions in host–pathogen interactions. *Nature* 529:496–501
129. Westermann AJ, Gorski SA, Vogel J. 2012. Dual RNA-seq of pathogen and host. *Nat. Rev. Microbiol.* 10:618–30
130. Xue T, Zhang X, Sun H, Sun B. 2014. ArtR, a novel sRNA of *Staphylococcus aureus*, regulates  $\alpha$ -toxin expression by targeting the 5' UTR of *sarT* mRNA. *Med. Microbiol. Immunol.* 203:1–12
131. Zecconi A, Scali F. 2013. *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. *Immunol. Lett.* 150:12–22
132. Zhu Y, Nandakumar R, Sadykov MR, Madayiputhiya N, Luong TT, et al. 2011. RpiR homologues may link *Staphylococcus aureus* RNAPIII synthesis and pentose phosphate pathway regulation. *J. Bacteriol.* 193:6187–96
133. Zielinska AK, Beenken KE, Joo HS, Mrak LN, Griffin LM, et al. 2011. Defining the strain-dependent impact of the staphylococcal accessory regulator (*sarA*) on the alpha-toxin phenotype of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 193:2948–58

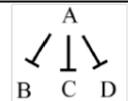
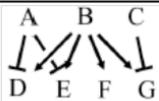
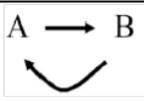
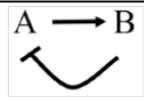
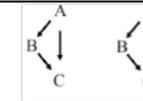
## II - Objectifs

---



La plupart des ARNnc agisse au niveau post-transcriptionnel par complémentarité de base avec leurs ARNm cibles. Ces complexes conduisent à l'inhibition de la traduction de l'ARNm, et/ou à sa dégradation, ou au contraire, à l'activation de la traduction en favorisant le recrutement du ribosome, et/ou à la stabilisation de ces derniers. La particularité de ces ARNnc est que leur expression est fortement régulée aussi bien au niveau de la transcription que de la stabilité. Ainsi ces ARNnc peuvent être à la fois des régulateurs et être régulés par d'autres ARN. Il est donc parfois difficile de discriminer une cible du régulateur.

Ces ARNnc s'inscrivent dans des motifs de régulation qui connectés entre eux forment des réseaux complexes. Plusieurs ARNnc sont parfois impliqués dans un même motif, un ARNnc peut avoir plusieurs cibles, et une cible peut être régulée par plusieurs ARNnc. Chaque motif de régulation dans lequel ils s'inscrivent possède des propriétés particulières (tableau 5). Certains motifs accélèrent l'activation ou la répression d'un gène, d'autres amplifient la réponse cellulaire ou/et réduisent la variabilité de l'expression des gènes d'une cellule à une autre. D'autres plus complexes, permettent d'intégrer plusieurs signaux, déterminant ainsi si les gènes doivent être activés ou réprimés en fonction des conditions environnementales (Beisel & Storz, 2010). La présence de ARNnc permet ainsi de modifier la dynamique des réseaux de régulation. Connaître les propriétés des motifs dans lesquels ils s'inscrivent permet de mesurer leur impact sur la réponse d'une cellule face à un stress.

Motifs	Motif simple	Régulon chevauchant	Boucle autorégulatrice (+)	Boucle autorégulatrice (-)	Boucle de contre-réaction
Diagramme					
Propriétés	Régulation de plusieurs cibles	Intégration de signaux multiples	Amplification du signal	Accélération de la réponse	Changement de la dynamique

**Tableau 5 : Exemple de motifs de régulation identifiés chez les bactéries, impliquant des ARNnc.** Motif simple (*Single Input Module (SIM)*). Régulon chevauchant (*Dense Overlapping Regulon (DOR)*). Boucle autorégulatrice (+) (*Positive Feedback (PF) loop*). Boucle autorégulatrice (-) (*Negative Feedback (NF) loop*). Boucle de contre-réaction (*Feedforward (FF) loop*) (Modifié, Beisel and Storz, 2010).

Pour reconstituer ces réseaux dans lesquels les ARNnc interviennent, il est essentiel de pouvoir définir leurs mécanismes de signalisation, de distinguer leurs cibles primaires des secondaires, et d'établir les nœuds de régulation. Ces étapes sont

importantes afin de mieux appréhender le comportement d'une population bactérienne en réponse à l'environnement mais aussi au cours d'une infection.

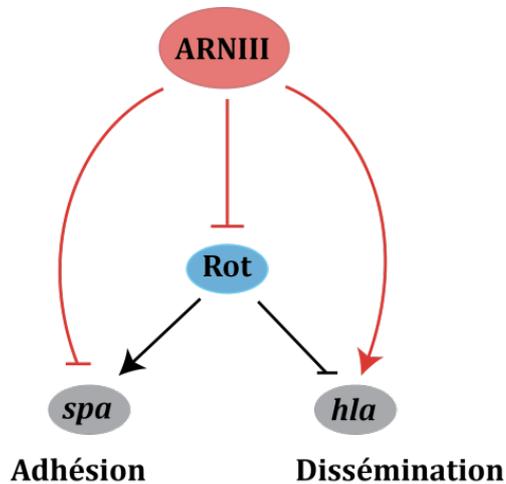
Au cours de mon projet de thèse je me suis intéressée à étudier les propriétés d'un réseau particulier et bien établi, celui de l'ARNIII de *S. aureus*. Je me suis ensuite consacrée à élucider la fonction de deux ARNnc, RsaI et RsaD. RsaI présentait des profils d'expression inattendus suivant les milieux de culture utilisés, me laissant supposer à un lien possible entre cet ARNnc et le métabolisme de la bactérie. Mon intérêt s'est alors porté sur les facteurs environnementaux auxquels RsaI et RsaD répondent mais aussi sur les fonctions biologiques qu'ils régulent. J'ai ainsi caractérisé des liens évidents entre plusieurs ARNnc dans le métabolisme de *S. aureus* et déterminé leur implication dans la physiologie et la virulence de la bactérie. Je discuterai également des convergences possibles entre ces deux ARNnc et le réseau de l'ARNIII.

## II.1. Etude de la dynamique du réseau de l'ARNIII

Les processus adaptatifs, tels que le changement d'un métabolisme aérobie à un métabolisme anaérobie ou le passage d'un mode d'adhésion à un mode de dissémination, nécessitent la présence de réseaux de régulation complexes, intégrant plusieurs stimuli. La dynamique de ces réseaux doit permettre une réponse cellulaire rapide et réversible pour assurer la survie des bactéries lors de stress environnementaux. Parfois ces processus adaptatifs nécessitent un changement de comportement de toute la population bactérienne de façon simultanée.

L'ARNIII qui répond à la densité cellulaire par le système *agr* et régule de manière temporelle les facteurs de virulence de *S. aureus*, forme avec le facteur de transcription Rot un réseau particulier comportant deux motifs « *feedforward loop* » (figure 23). L'association de ces deux régulateurs, permet l'expression coordonnée des gènes et favorise le passage de *S. aureus* d'un mode d'adhésion (infection initiale) à un mode de dissémination (infection établie). Ce réseau garanti un contrôle strict mais également un retour rapide à l'état initial, par exemple après une diminution de la densité cellulaire. En collaboration avec le laboratoire d'Hanah Margalit (Université de Jérusalem, Israël), des analyses expérimentales couplées à une simulation mathématique ont permis de caractériser les propriétés dynamiques de ce module

particulier de régulation, d'en montrer les avantages et les limites et de comprendre **pourquoi ce réseau est particulièrement approprié pour aider la population bactérienne à coloniser de nouveaux tissus de l'hôte.**



**Figure 23 : Motif double « *feedforward loop* » de l'ARNIII chez *S. aureus*.** L'ARNIII réprime la synthèse du facteur de transcription Rot, de la protéine A (codée par le gène *spa*) et active l'expression de l'hémolysine [ ] codée par le gène *hla*) au niveau post-transcriptionnel. Rot, contrairement à l'ARNIII agit au niveau transcriptionnel. Ces deux régulateurs forment un réseau de régulation contenant deux modules *feedforward loop*. Un code de couleur est utilisé pour les réseaux : les ARNnc sont en rouge, les facteurs de transcription en bleu, les cibles en gris. Une flèche rouge représente une activation traductionnelle ; une flèche noire, une activation transcriptionnelle ; une barre rouge, une répression traductionnelle ; une barre noire, une répression transcriptionnelle.

La partie expérimentale de ce projet a consisté à étudier l'expression de trois cibles de l'ARNIII (les ARNm *spa*, *rot*, *hla*) dans la souche RN6390 et dans les souches isogéniques mutées portant une délétion soit au niveau du gène codant l'ARNIII, soit au niveau du gène *rot*. J'ai suivi le taux des ARNm par des expériences de Northern blot au cours de la croissance bactérienne et analysé la synthèse des protéines par des expériences de western blot. Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec Pierre Fechter, au cours de mon master et de ma première année de thèse.

## II.2. Etude de la fonction des ARNnc, RsaI et RsaD

Depuis la découverte de l'ARNIII par R. Novick et ses collaborateurs en 1993, *S. aureus* s'est imposé comme organisme modèle de l'étude des ARN régulateurs bactériens. La régulation de l'expression des gènes de virulence, chez ce pathogène, est

complexe et nécessite des interconnexions entre plusieurs réseaux impliquant de nombreux autres ARNnc. Ces ARNnc contribuent à l'intégration de plusieurs signaux environnementaux et apportent une régulation fine de l'expression des gènes. Ces dernières années, les méthodes de séquençage à haut débit ont permis d'identifier plus de 200 ARNnc mais aussi de mettre en évidence des particularités du génome, comme par exemple des opérons chevauchant (Lasa *et al.*, 2011 ; Lioliou *et al.*, 2012) ou bien encore des ARNm avec de longues régions non traduites (Lasa *et al.*, 2011; Ruiz de los Mozos *et al.*, 2013), et plusieurs systèmes de toxines-antitoxines de type I (Brielle *et al.*, 2016; Bronsard *et al.*, 2017). Le rôle des ARNnc chez *S. aureus* reste encore inconnu pour la plupart, toutefois les nouvelles techniques d'identification des cibles directes ainsi que le séquençage haut débit ont élucidé la fonction de plusieurs ARNnc dont certains sont issus du génome ou des îlots de pathogénicité (revues Tomasini *et al.*, 2014 ; Felden *and* Bouloc, 2017).

L'équipe a contribué à la découverte de nombreux ARNnc chez *S. aureus* dont plusieurs d'entre eux font partie d'une même classe qui présentent une séquence riche en cytosines. Cette séquence est une signature des ARN interagissant avec la séquence SD des ARNm cibles (Geissmann *et al.*, 2009). Ces ARNnc sont stables et la plupart d'entre eux (nommés RsaA, C, D, E, F, G et I) sont fortement exprimés et s'accumulent en particulier en phase stationnaire de croissance qui correspond à un changement métabolique important pour les bactéries et à l'expression des facteurs de virulence. Mon projet a été d'**établir les réseaux de régulation impliquant RsaI et RsaD ainsi que leurs impacts sur la physiologie et la virulence de *S. aureus***. Ces deux ARN présentent des caractéristiques particulières résumées ci-dessous.

### II.3. Caractéristiques de RsaI

RsaI est un ARNnc de 144 nucléotides qui possède deux régions riches en G ainsi qu'une région simple brin riches en U/C, toutes les trois sont conservées chez tous les staphylocoques (**figure 24**). Des prédictions de la structure secondaire de RsaI basé sur la conservation ont suggéré la formation d'un pseudonœud entre la boucle 2, riche en G et la région en simple brin riche en U/C (Marchais *et al.*, 2010). Cette structure pourrait moduler l'activité régulatrice de RsaI en facilitant ou en empêchant son appariement avec les cibles.



La structure secondaire de RsaD contient également une longue région simple brin en 5'. Etant donné que la RNase J1/J2 est une exoribonucléase 5'-3' majeure de *S. aureus* impliquée dans la dégradation et la maturation des ARN et que RsaD est relativement stable, puisque le temps de demie vie est de 20 min (Geissmann *et al*, 2009), il est intéressant de comprendre quel est le mécanisme qui protège cet ARN contre l'attaque par la RNase J1/J2. Se peut-il qu'une protéine soit associée à RsaD pour le protéger et faciliter son rôle de régulateur ?

L'expression de RsaD est augmentée lorsque les cellules subissent un choc thermique froid, et semblerait dépendante du facteur  $\sigma$ B. (Geissmann *et al*, 2009). Le facteur  $\sigma$ B étant impliqué dans la réponse général au stress, l'étude de la fonction de RsaD montre un intérêt particulier pour comprendre la régulation des gènes dans des conditions de stress environnementales.

## II.5. Stratégie expérimentale

L'enjeu de ce projet, a été de définir les cibles directes et indirectes de RsaI et RsaD, les fonctions qu'ils régulent ainsi que les réseaux de régulation dans lesquels ils interviennent. Pour cela, j'ai utilisé une combinaison d'approches expérimentales *in vitro* et *in vivo*. Grâce aux collaborations avec les laboratoires hospitaliers de P. François (Hôpital de Genève, Suisse) et F. Vandenesch (Hôpital de Lyon, INSERM), j'ai disposé de souches de *S. aureus* mutantes portant une délétion du gène codant *rsaI* ou *rsaD*.

Dans un premier temps, j'ai étudié l'expression de ces ARNnc par des expériences de Northern blot pour déterminer les facteurs environnementaux qui stimulent ou inhibent leur expression, tel un choc thermique, l'anaérobiose, les antibiotiques, NO, etc.

L'étude de la fonction des ARNnc nécessitant la caractérisation de leurs cibles directes, j'ai utilisé une technique de chromatographie d'affinité appelée MAPS (*MS2-affinity purification coupled with RNA sequencing*) dérivée des travaux de Lalaouna & *et al*, 2015 et mise au point au laboratoire pour *S. aureus* (Tomasini *et al*, 2017). Le principe de cette technique est d'isoler les complexes formés *in vivo* entre le ARNnc d'intérêt portant une étiquette MS2 en 5' et ses cibles (i.e. de nature protéique ou acide nucléique). Cette étiquette MS2 est reconnue par la protéine de capsid du phage MS2 elle-même fusionnée à la protéine fixant le maltose (MBP) pour fixer la protéine sur une

résine d'amylose et retenir spécifiquement les complexes contenant le MS2-ARNnc modifié. En couplant cette chromatographie d'affinité au séquençage à haut débit, les ARN liés au MS2-ARNnc sont caractérisés. Les interactions entre les ARNm et les ARNnc sont analysées par des expériences de gel retard et validées *in vivo* par l'utilisation d'un gène rapporteur fusionné à la région régulatrice de l'ARNm d'intérêt.

Afin d'évaluer l'ensemble des fonctions régulées par ces ARNnc, une analyse des transcriptomes de la souche *S. aureus* sauvage, des mutants délétés de *rsaI* ou *rsaD*, et des mêmes souches mutantes complémentées avec un plasmide exprimant l'ARN d'intérêt, a permis d'identifier les ARNm dont le taux est affecté par l'expression du ARNnc. De plus, une approche protéomique comparative et quantitative a été utilisée. Cette technique globale a récemment prouvé son efficacité pour l'identification des cibles majeures de RsaA (Tomasini *et al*, 2017).

En collaboration avec A. Toledo-Arana (Université de Pampelona, Espagne) et F. Vandenesch (Université de Lyon, INSERM), nous avons analysé l'effet de RsaI sur la formation des biofilms, sur la phagocytose et l'opsonophagocytose dans des modèles cellulaires (macrophages, neutrophiles) et sur la virulence dans des modèles murins (mimant une infection chronique et péritonéale).



## III - Résultats

---

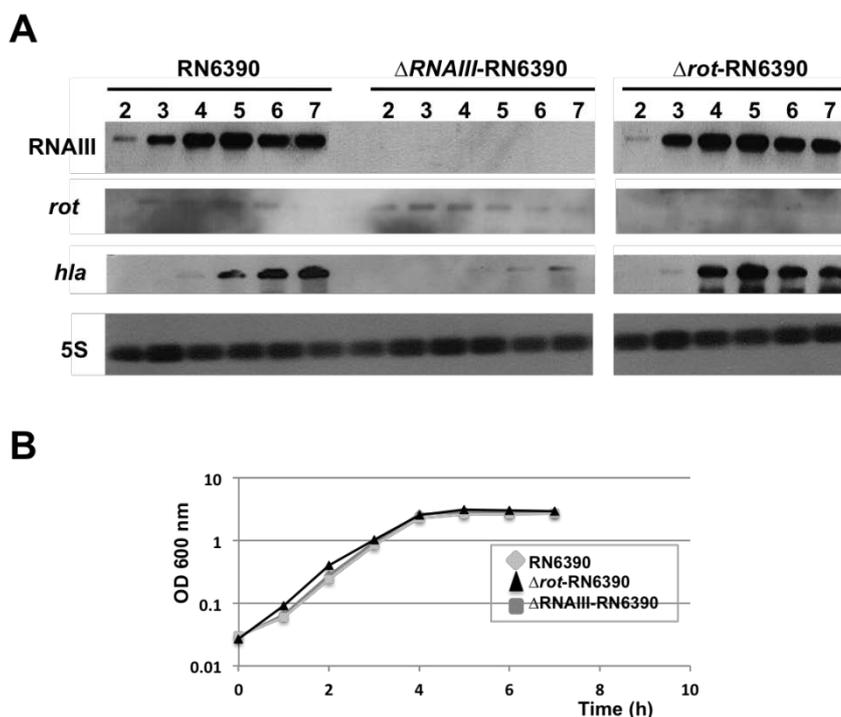
## III.1. Etude de la dynamique du double motif feedforward loop impliquant l'ARNIII

L'ARNIII et Rot forment un réseau de régulation composé de deux modules « *feedforward loop* » qui constitue un motif que nous avons appelé DSS (« *Double Selector Switch* »). Ce motif DSS, permet un rôle coopératif de ces deux régulateurs, en agissant à la fois sur la transcription et la traduction des gènes cibles. Les analyses mathématiques réalisées par Mor Nitzan dans le laboratoire d'Hanah Margalit (*Racah Institute of Physics and Faculty of Medicine, The Hebrew University, Jerusalem*) ainsi que nos résultats expérimentaux ont permis d'étudier les caractéristiques principales du motif DSS et de montrer les avantages majeurs de ce motif pour le passage des cellules entre deux états antagonistes. L'analyse de l'expression des cibles de l'ARNIII a apporté une illustration de la coordination de l'expression des gènes de virulence. Pour cela, j'ai suivi l'expression temporelle de la protéine A, de l'hémolysine  $\alpha$ , et de Rot en fonction de la phase de croissance dans un milieu riche à partir d'extraits cellulaires (ARN ou protéines) provenant de la souche RN6390, qui présente la particularité d'exprimer fortement l'ARNIII, ainsi que des souches mutantes RN6390 $\Delta$ *rnaIII* et RN6390 $\Delta$ *rot*. Je ne présenterai ici que les résultats expérimentaux auxquels j'ai contribué en collaboration avec Pierre Fechter. Ceux-ci ont été intégrés dans la publication où je suis co-auteur (Nitzan *et al*, 2015).

### III.1.a - Suivi du taux des ARNm au cours de la phase de croissance

Des expériences de Northern blot ont permis tout d'abord de suivre le taux des ARNm (*spa*, *hla* et *rot*) du réseau au cours de la croissance cellulaire. Ce taux reflète à la fois l'efficacité de la transcription mais aussi de la dégradation des ARNm. Les souches mutantes RN6390 $\Delta$ *rnaIII* et RN6390 $\Delta$ *rot* ne présentent pas de phénotype particulier de croissance dans les conditions de culture utilisées (figure 26 B).

Le taux de l'ARNIII augmente de manière progressive au cours de la croissance, et s'accumule en début de phase stationnaire (à partir de 4h). Son profil d'expression est le même dans la souche RN6390 $\Delta$ *rot*. Ceci confirme bien que le facteur de transcription Rot n'exerce aucune régulation sur l'expression de l'ARNIII (figure 26 A).



**Figure 26 : Analyse de l'expression de l'ARNIII, et des ARNm *rot* et *hla* par Northern blot.** Les ARN totaux ont été préparés à partir d'échantillons de cultures prélevés toutes les heures sur la souche sauvage RN6390, et les souches mutantes RN6390 $\Delta rot$  et RN6390 $\Delta rnaIII$  (A). L'électrophorèse a été réalisée sur gel d'agarose 1%, contenant 20 mM de guanidium thiocyanate en utilisant 15  $\mu$ g d'ARN total. Après transfert sur membrane de nitrocellulose, les ARN ont été détectés en utilisant des sondes DIG. La détection de l'ARNr 5S a servi de contrôle de charge. Les courbes de croissance ont été réalisées en milieu TSB (B) (Nitzan *et al*, 2015).

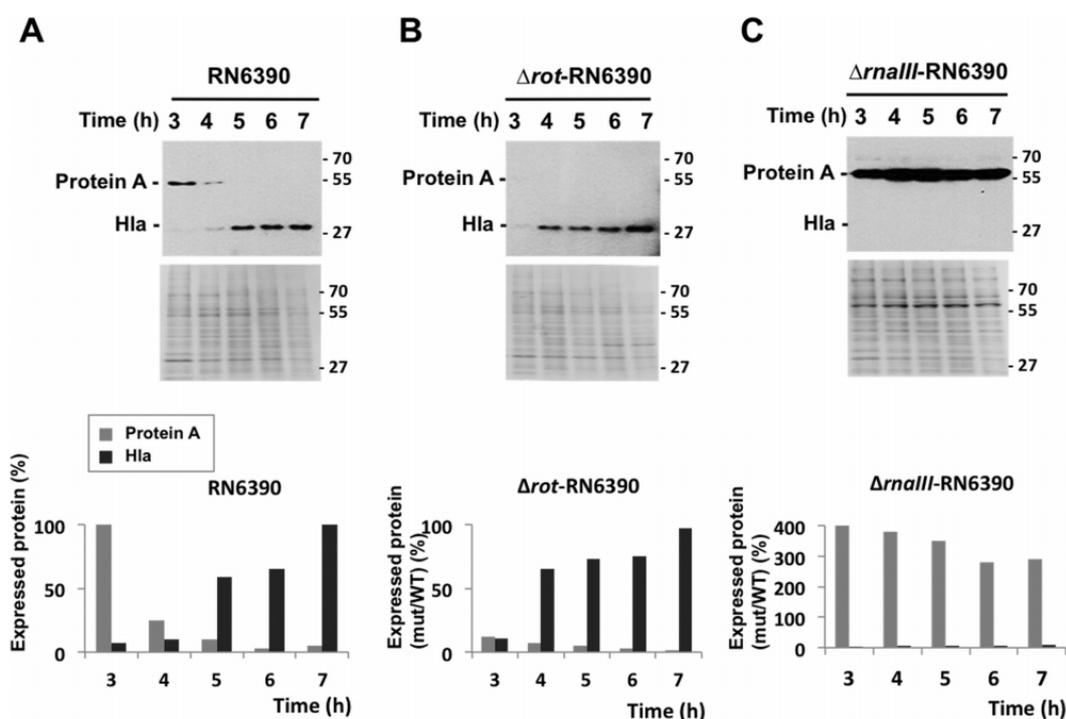
L'expression de l'ARNm *rot* est faible mais constante tout au long de la croissance cellulaire avec une légère baisse en phase stationnaire. Ce profil est identique dans la souche sauvage et dans la souche RN6390 $\Delta rnaIII$ . La régulation de l'expression de *rot* par l'ARNIII étant au niveau de la traduction, ces résultats étaient attendus.

Pour l'ARNm *hla*, celui-ci apparaît dans la souche sauvage lorsque le taux de l'ARNIII est suffisamment important, c'est-à-dire entre 4 et 5 h de culture. En revanche, dans la souche RN6390 $\Delta rot$ , le décalage n'est plus significatif et l'expression de *hla* apparaît simultanée avec celui de l'ARNIII. Ceci reflète bien l'effet de la protéine Rot qui agit comme répresseur transcriptionnel des exotoxines. En absence de Rot, l'ARNIII peut exercer son rôle d'activateur de la traduction de manière plus rapide. Par ailleurs, en absence de l'ARNIII, le taux d'ARNm *hla* est fortement réduit à cause de la répression constitutive de Rot. Ainsi, ces résultats illustrent bien l'impact des deux régulateurs sur l'expression de l'ARNm *hla*.

Je n'ai pas réussi à détecter l'ARNm *spa* au tout début de la phase de croissance dans la souche sauvage par Northern blot. En fait, (Geisinger *et al*, 2012) ont effectivement montré que le promoteur *spa* fusionné à *lacZ* était très peu actif, et qu'il était très difficile de suivre le niveau d'expression de *spa* au cours de la croissance cellulaire. De plus dans la souche RN6390 $\Delta$ *rnalIII*, l'ARNm *spa* est détectable et son temps de demi-vie se monte à plus de 30 min (Huntzinger *et al*, 2005). Ainsi la stabilité de cet ARNm doit compenser le faible taux de transcription.

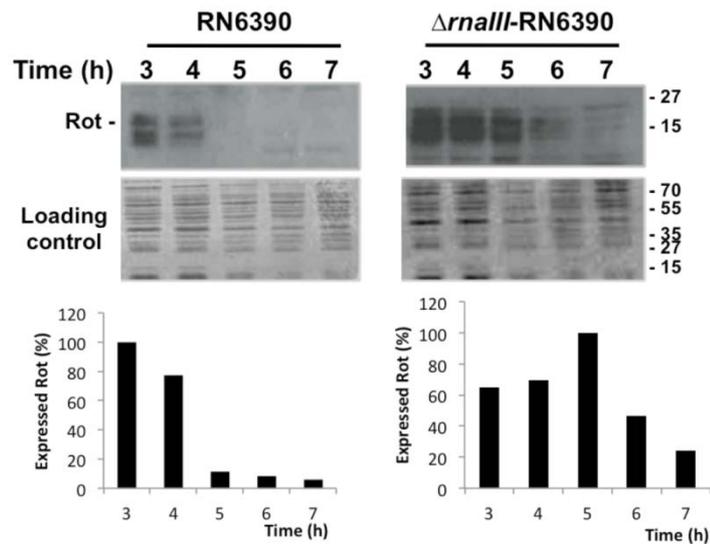
### III.1.b - Suivi de la synthèse des protéines au cours de la croissance

La synthèse de la protéine A, de l'hémolysine  $\alpha$  et de Rot a été analysée par des expériences de Western blot. Les résultats ont permis d'illustrer l'importance des deux régulateurs (RNalIII et Rot) dans la régulation coordonnée des deux facteurs majeurs de la virulence.



**Figure 27 : Expression de la protéine A et de l'hémolysine  $\alpha$ .** Western blot montrant la synthèse des protéines A et Hla dans les souches sauvage RN6390 (A), mutante  $\Delta$ rot-RNA6390 (B) et mutante  $\Delta$ rnalIII-RN6390 (C). Les protéines totales ont été extraites à partir d'échantillons de culture prélevés toutes les heures puis détectées par immunoblot. La quantité de protéine totale a été vérifiée par coloration au bleu de Coomassie du gel effectué à partir des mêmes échantillons. Pour chaque expérience, les bandes correspondant à la protéine A et Hla ont été quantifiées par le logiciel SAFA en utilisant plusieurs protéines du contrôle de charge qui ne variaient pas pour normaliser les résultats. Les expériences ont été réalisées en triplicats (Nitzan *et al*, 2015).

Dans la souche sauvage, la synthèse des protéines A et de Hla se produit de manière séquentielle. En effet, le taux de la protéine A diminue brutalement après 4h de culture alors que celui de l'hémolysine  $\alpha$  est fortement activé après 5h de culture (figure 27). Un état transitoire est visible à 4h, où la quantité des deux protéines est faible. Ceci peut se corrélérer avec le fait que le taux de protéine Rot diminue fortement après 4h de culture (figure 28).



**Figure 28 : expression de Rot au cours de la croissance.** Western blot montrant la synthèse de la protéine Rot dans la souches sauvage RN6390 et mutante  $\Delta$ rnaIII-RN6390. Les protéines totales ont été extraites à partir d'échantillons de culture prélevés toutes les heures puis détectées par immunoblot. La quantité de protéine totale a été vérifiée par coloration au bleu de Coomassie du gel effectué à partir des mêmes échantillons. Pour chaque expérience, les bandes correspondant à la protéine Rot ont été quantifiées par le logiciel SAFA en utilisant plusieurs protéines du contrôle de charge qui ne variaient pas pour normaliser les résultats. Les expériences ont été réalisées en triplicats (Nitzan *et al*, 2015).

Dans la souche  $\Delta$ rot-RN6390, la protéine A n'est plus détectable alors que la synthèse est constitutive dans la souche RN6390 $\Delta$ rnaIII. Cette image est complètement inverse pour le taux de l'hémolysine  $\alpha$ . Enfin, dans la souche RN6390 $\Delta$ rnaIII, la synthèse de Rot est visualisée jusqu'à 5h-6h de croissance et diminue ensuite à 7h. Cette diminution résulte probablement de l'autorégulation de Rot (Geisinger *et al*, 2012). Ainsi l'absence d'un des deux régulateurs conduit à la perte de la régulation temporelle des deux facteurs de virulence.

### **III.1.c - Implications du double module de régulation**

Basé sur nos résultats expérimentaux, une modélisation du système DSS a été entreprise par M. Nitzan dans l'équipe de H. Margalit. Cette étude a révélé des propriétés dynamiques spécifiques à ce double motif « *feedforward loop* ». La caractéristique principale du module DSS, est l'obtention d'une expression séquentielle et coordonnée des facteurs de virulence, résultant en partie du rôle coopératif et antagoniste de Rot et de l'ARNIII. En effet, l'intégration dans le système DSS d'un régulateur traductionnel et d'un régulateur transcriptionnel garantit un changement coordonné précis de l'expression différentielle des cibles. Ce système assure la répression de la première cible avant l'activation de la seconde, ce qui explique le délai d'une heure entre la répression de la synthèse de la protéine A et l'activation de Hla. En d'autre terme, en début de phase de croissance, l'ARNIII sera totalement dédié au mécanisme de répression de la traduction des messagers *spa* et de *rot*.

La modélisation du système DSS suggère également que ce changement coordonné ne peut avoir lieu que si le signal extérieur est persistant. En effet, un circuit de régulation n'est efficace que si celui-ci ne répond pas à un signal externe transitoire.

Enfin, la régulation simultanée de la transcription et de la traduction d'un même gène permet de limiter les fuites d'expression. Ainsi, dans le cas de la répression de l'ARNm *spa*, l'ARNIII inhibe la traduction d'un ARNm peu transcrit mais très stable. Cette répression de la traduction est suivie d'une dégradation de l'ARNm réprimé par la RNase III rendant la régulation irréversible (Huntzinger *et al*, 2005). Ainsi la nature « stoichiométrique » de la régulation par les ARNnc est un des critères importants du système DSS.

Les propriétés du module DSS mises en évidence par cette étude permettent de comprendre l'importance d'un tel système de régulation pour le changement de comportement de *S. aureus*. Ce motif est d'ailleurs retrouvé chez d'autres bactéries, dans des processus décisionnels clés, comme le passage d'un état immobile à un état mobile chez les enterobactéries par exemple. *In vivo* cependant, ce module DSS sera soumis à d'autres contraintes et niveaux de régulations supplémentaires comme décrit dans la revue présentée dans l'introduction. Toutes les souches de *S. aureus* n'expriment pas l'ARNIII au même taux et les facteurs de virulence sont également régulés par d'autres réseaux (Bronsky *et al*, 2016).

## III.2. RsaI, un ARNnc au cœur du métabolisme carboné

### Avant propos

Suite à l'étude de Howden *et al.*, (2013) qui avait montré une induction de RsaI dans les souches de *S. aureus* en présence de concentrations sous-optimales de vancomycine, je me suis intéressée à déterminer les fonctions de cet ARNnc. Ce résultat indiquait que l'ARN pouvait réagir à un stress de l'enveloppe bactérienne. Cependant les expériences de Northern blot que j'ai réalisées pour suivre le taux de RsaI en présence de vancomycine, ne m'ont pas permis de détecter l'induction de RsaI dans ces conditions.

Parallèlement à cette analyse, j'avais aussi remarqué, basée sur l'étude de Geissmann *et al.* (2009), que RsaI était fortement exprimé en fin de phase exponentielle de culture en milieu dit « riche » (production rapide et importante de biomasse) alors que son expression était constitutive dans un milieu dit pauvre (vitesse de croissance et production de biomasse faible). Je me suis donc intéressée à comprendre ce phénotype particulier. En accord avec cette étude, j'ai tout d'abord montré que, dans le milieu BHI (*Brain heart infusion*), RsaI est très fortement exprimé et de façon soudaine dès l'entrée en phase stationnaire des cellules alors que dans le milieu MHB (*Muller Hinton Broth*) RsaI est exprimé dès le début de croissance. De manière surprenante, la composition de ces deux milieux est très similaire. Je me suis alors focalisée sur la différence des nutriments entre les milieux BHI et MHB. Ces deux milieux de culture sont complexes contenant des extraits de viandes, de levures, peptones. J'ai toutefois noté que la source de carbone dans le milieu BHI provenait de 2g/L de D-glucose, alors que celle du milieu MHB provenait de l'amidon de maïs, qui est constitué de deux polymères du glucose, l'amylose (polymère linéaire) et l'amylopectine (forme ramifiée). Ma réflexion a été que le glucose contenu dans l'amidon était moins accessible pour *S. aureus*, puisqu'il doit être dégradé à l'extérieur des cellules avant de pouvoir importer et cataboliser le glucose. Etant la seule différence notable dans la composition des deux milieux, j'ai pensé qu'en ajoutant 2g/L de glucose dans le milieu MHB, le profil d'expression de RsaI devait ressembler à celui obtenu dans le milieu BHI. Les résultats obtenus ont validé cette hypothèse de manière incontestable, ouvrant sur de nouvelles pistes de recherche quant aux rôles de RsaI chez *S. aureus*. Les résultats de ce travail sont présentés sous la forme d'un manuscrit qui sera prochainement soumis à publication.

## Résumé de l'article

Pour leur survie, les bactéries pathogènes doivent s'adapter, aux changements environnementaux et à la disponibilité des nutriments de l'hôte. Cette adaptation nécessite des changements métaboliques importants.

La répression catabolique représente le système de régulation majeur dans la réponse adaptative chez les bactéries. Ce système régule l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme, en fonction de la disponibilité des sources carbonées dans l'environnement. Chez *Staphylococcus aureus*, la répression catabolique, s'effectue au niveau transcriptionnel par l'action de la protéine CcpA.

Dans cette étude, nous avons identifié un ARNnc, appelé RsaI, réprimé par CcpA lorsque la concentration de glucose extérieur est forte.

Nous avons montré que RsaI, réprime la traduction de plusieurs ARNm par appariement de bases, incluant un transporteur majeur du glucose, et IcaR, le répresseur de la production d'exopolysaccharides nécessaire à la synthèse de biofilms. De plus RsaI joue le rôle d'un ARNnc « éponge » afin de réguler l'action d'un autre ARNnc, répondant quant à lui au glucose 6P. Enfin RsaI inhibe l'expression d'enzymes impliquées dans la voie des pentoses phosphates et active plusieurs gènes nécessaires pour la production d'énergie, la fermentation et la détoxification au NO, lorsque la concentration en glucose diminue.

Cet ARN multifonctionnel est un véritable senseur de la présence ou non de glucose extérieur, engendrant ainsi un switch métabolique nécessaire à la réponse adaptative de *S. aureus* en conditions infectieuses.

## **A bifunctional non coding RNA in Staphylococcus aureus acts as a sugar metabolism sensor**

Bronesky D.<sup>1</sup>, Desgranges E.<sup>1</sup>, Beaume M.<sup>2</sup>, Bonetti E-J.<sup>3</sup>, François P.<sup>3</sup>, Toledo-Arana A.<sup>4</sup>, Vandenesch F.<sup>5</sup>, Marzi S.<sup>1</sup>, Romby P.<sup>1\*</sup> and Caldelari I.<sup>1\*</sup>

- <sup>1</sup> Université de Strasbourg, CNRS, Architecture et Réactivité de l'ARN, UPR9002, F-67000 Strasbourg, France
- <sup>2</sup> Deinove, Cap Sigma/ZAC Euromédecine II, 1682 rue de la Valsière, 34790 Grabels, France
- <sup>3</sup> Genomic Research Laboratory, Department of Medical Specialties, Geneva University Hospitals, University of Geneva, Geneva, Switzerland.
- <sup>4</sup> Laboratory of Microbial Biofilms. Instituto de Agrobiotecnología (IDAB), Universidad Pública de Navarra-CSIC-Gobierno de Navarra, Campus de Arrosadía, Pamplona, Spain.
- <sup>5</sup> CIRI, International Center for Infectiology Research, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, École Normale Supérieure de Lyon, Hospices Civils de Lyon, Univ Lyon, F-69008, Lyon, France

\*To whom correspondence should be addressed.

Tel: 33(0) 388417068;

Fax: 33(0) 3886022188;

Email: [i.caldelari@ibmc-cnrs.unistra.fr](mailto:i.caldelari@ibmc-cnrs.unistra.fr); [p.romby@ibmc-cnrs.unistra.fr](mailto:p.romby@ibmc-cnrs.unistra.fr)

## ABSTRACT

Pathogenic bacteria must adapt to ever-changing environmental signals or nutrient availability through fast responses resulting in metabolism remodeling. Among these regulatory pathways, the carbon catabolite repression in bacteria represents a major and global regulatory system, allowing the cells to express genes involved in carbon utilization and metabolism, in the presence of a preferred carbon source.

In *Staphylococcus aureus*, regulation of catabolite repressing genes is mediated at the transcriptional level through the action of the Carbon Catabolite protein A (CcpA). In this study, we have identified a CcpA-dependent small non coding RNA, called RsaI, that is repressed by the presence of high concentration of glucose.

We showed that this sRNA represses, through basepairing interactions, the translation of several mRNAs encoding the major permease of glucose uptake, the FN3K enzyme that protects the cells against damages caused by high concentrations of glucose, and IcaR, the transcriptional repressor of exopolysaccharide production.

Besides, RsaI acts as a sponge to regulate the activities of another sRNA that respond to the uptake of glucose-6 phosphate.

Finally, RsaI inhibits the expression of several enzymes involved in the pentose pathway, and activated many genes involved in energy production, fermentation and NO detoxification when the glucose concentration decreases.

This multifunctional RNA provides a signature for the bacterial metabolic switch when the preferred carbon source is metabolized.

## INTRODUCTION

All bacteria require a source of carbon, providing energy for their growth, division, and for the synthesis of all macromolecules. Besides, pathogenic bacteria during the infectious process of the host, must cope with hostile conditions such as nutrient deficiency, temperature, oxidative and osmotic shocks, and must overcome innate immune responses. To survive in these complex environments and to counteract the host defences, pathogenic bacteria such as *Staphylococcus aureus*, produce a plethora of virulence factors. The synthesis of these factors is fine tuned by a complex interplay between multiple regulators involving both proteins and RNAs (Novick, 2003). Additionally biosynthetic intermediates, generated from the central metabolism of *S. aureus*, have strong impacts on the synthesis of virulence factors. Therefore it is no surprising that among the regulators several metabolite-sensing regulatory proteins were found as key factors, which coordinated the synthesis of genes involved in metabolic pathways, in adaptive responses, and in pathogenesis (Somerville & Proctor, 2009; Richardson *et al.*, 2015). Indeed, in *S. aureus*, the metabolite-responsive proteins CcpA, CodY, Rex and RpiR have been largely documented to modify the patterns of virulence factor expression, and in turn to modify the consequences of the host-pathogen interactions (Richardson *et al.*, 2015).

Among these proteins, CcpA (carbon catabolite protein A) acts as a catabolite regulator, allowing the bacteria to use the preferred carbon source (i.e., glucose) in a hierarchical manner (Seidl *et al.*, 2008b; Seidl *et al.*, 2009). CcpA belongs to the LacI repressor family and binds to a specific DNA sequence, called the *cre* (catabolite responsive element) sequence, which is conserved in many Gram-positive bacteria. Transcription of CcpA is constitutive in laboratory growth conditions and the protein is activated through the binding of its co-regulator histidine-containing phosphocarrier protein HPr, in the presence of glucose. Inactivation of *ccpA* gene affected the expression of a large number of metabolic encoding genes in a glucose-dependent and -independent manner (Seidl *et al.*, 2008b). Additionally, CcpA has a strong impact on the expression of *S. aureus* virulon. It enhances the yield of the quorum-sensing induced RNAIII, which represses at the post-transcriptional level protein A and various adhesin factors, and conversely activates many exotoxins. However, CcpA also modulates the transcription of mRNAs encoding protein A, hemolysin-alpha (*hla*) and TSST (Seidl *et al.*, 2008a ; Seidl *et al.*, 2006) represses capsule formation, and activates biofilms in a glucose-rich environment (Seidl *et al.*, 2008b). These deregulations explained why a *S. aureus ccpA* deletion mutant strain is less pathogenic than the wild-type strain in a murine abscess model (Li *et al.*, 2010) and why *ccpA* inactivation decreased the susceptibility of hyperglycemic individuals to acute pneumonia infections

(Bischoff *et al.*, 2017). Nevertheless, the mechanism by which CcpA affected *S. aureus* pathogenesis cannot be simply resumed as a modulation of the RNAIII-dependent regulatory networks. Therefore, it has been suggested that CcpA can also act indirectly on gene expression through the action of other regulatory proteins or RNAs (Somerville & Proctor, 2009; Richardson *et al.*, 2015).

In Enterobacteriaceae, several small non coding RNAs (sRNA) have been shown as key actors of the uptake, and the metabolism of carbohydrates (reviewed in Bobrovskyy & Vanderpool, 2014). For instance they regulate the use of galactose operon and carbon catabolite repression, metabolism of amino acids, and contribute to bacterial survival during phospho-sugar stress. The contribution of sRNAs in regulatory networks is now well recognized to rapidly adjust cell growth to various stresses and changes in the environment; thus they are obvious candidates creating the links between virulence and metabolism. One example is RsaE, a small non-coding RNA conserved in *S. aureus* and *Bacillus subtilis*, that controls enzymes involved in the TCA cycle (Geissmann *et al.*, 2009; Bohn *et al.*, 2010). Recent observations showed that *B. subtilis* Rex represses RoxS (homologous to *S. aureus* RsaE) to readjust the pool of NAD<sup>+</sup>/NADH in responses to various stress and stimuli (Durand *et al.*, 2017). The Rex binding site is also highly conserved among *Staphylococcaeae*. Additionally, responding to reactive oxygen species through SrrAB, *S. aureus* RsaE may also intervene in the survival of the cells against host immune reactions (Durand *et al.*, 2015; Durand *et al.*, 2017). Here, we have identified a signalling pathway responding to glucose uptake, which involves a small non coding RNA, called RsaI. This 144 nucleotides-long sRNA is highly conserved among *Staphylococcaeae*, and carries two conserved regions including two G-track sequences and a long unpaired interhelical region rich in pyrimidines (Geissmann *et al.*, 2009; Marchais *et al.*, 2009). RsaI is strongly expressed at the stationary phase of growth in rich medium (Geissmann *et al.*, 2009), and is enhanced after vancomycin exposure (Howden *et al.*, 2013). In this study, we revealed that CcpA is the main repressor of RsaI expression in the presence of glucose, and that this inhibition is alleviated after the utilization of glucose. The identification of the targetome of RsaI using the MS2-affinity purification approach coupled to RNA sequencing (MAPS), unexpectedly showed two sets of RNA targets, including mRNAs involved in glucose uptake, sugar metabolism, and biofilm formation, as well as various sRNAs. Using site-directed mutagenesis, we identified two functional regions of RsaI with distinct regulatory functions, sequestering a sRNA regulating sugar-phosphate uptake, and regulating many of its mRNA targets through base pairing interactions.

Taken together, these data illustrate how a multifunctional RNA provides a signal for a metabolic switch when the preferred carbon source is metabolized, and serves as an RNA sponge to control the balance between two essential pathways responding to either glucose or Glucose 6-phosphate uptake. We will discuss the importance of sRNA-mediated regulation in *S. aureus* to fine tune the expression of genes according to nutrient availability, and their consequences on metabolism adaptation and virulence.

## MATERIAL AND METHODS

### Plasmids and Strain Constructions

All strains and plasmids constructed in this study are described in Table S1. The oligonucleotides designed for cloning and for mutagenesis are given in Table S2. *Escherichia coli* strain DC10B was used as a host strain for plasmid amplification before electroporation in *S. aureus*. Plasmids were prepared from transformed *E. coli* pellets following the Nucleospin Plasmid kit protocol (Macherey-Nagel). Transformation of both *E. coli* and *S. aureus* strains was performed by electroporation (Bio-Rad Gene Pulser).

A *rsal* deletion mutant was constructed by homologous recombination using plasmid pMad (Arnaud *et al.*, 2004). The deletion comprises nucleotides 2367907 to 2368111 according to RefSeq NC\_002745. We amplified 967 nucleotides and 1000 nucleotides respectively upstream and downstream to the deleted region by using the following specific primers: Teg24-5'F-MluI and Teg24-5'R-NcoI (for the 5'-region PCR fragment), Teg24-3'F-NcoI and Teg24-3'R-BglII (for the 3'-region PCR fragment). The homologous region amplification was performed in a total reactional volume of 100  $\mu$ L containing dNTPs (0.2 mM final), KOD hot start DNA polymerase (1U/reaction, Novagen), MgSO<sub>4</sub> (1.5 mM final), KOD buffer (1X final), and 5 ng of gDNA. PCR conditions were as follows: denaturation at 95°C for 2 min, 35 cycles of 95°C for 20 s, 55°C for 10 s, 70°C for 20 s followed by a final extension at 74°C for 10 min. The 5'- and 3'-region fragments were digested with *NcoI*, ligated and re-amplified using primers Teg24-5'F-MluI and Teg24-3'R-BglII. The generated 1.96 kb fragment was digested using *BglII* and *MluI* restriction enzymes and cloned into the plasmid pMad ChIR. The resulting plasmid was transformed into *E. coli* strain DH5 $\alpha$  for subsequent electroporation into *S. aureus* strain RN4220. Clones were selected on Mueller-Hinton broth supplemented with 10  $\mu$ g/mL chloramphenicol and plasmid was transduced in *S. aureus* strain HG001 as previously described. Plasmid integration into the chromosome was selected after growth at a non-permissive temperature (42°C) while maintaining antibiotic selective pressure. Second recombination event was screened after growth of the co-integrates at the permissive temperature (30°C). Recombinant genomes were checked by PCR and sequenced using appropriate primers (Table S2). The vectors pCN51::*rsal* and pUC::*rsal* were constructed by ligating a PCR-amplified fragment (see primers in Table S2) containing *rsal* with 166 pb of its promoter region and digested by *PstI* and *SphI* into respectively pCN51 or pUC18 vectors digested with the same enzymes. Mutagenesis of pUC::*rsal* was performed with Quickchange XL Site-directed mutagenesis (Stratagene) leading to pUC::*rsal* mutants 1, 2, 3 and 4 (see primers in Table S2). To obtain the plasmid pCN51::P3::MS2-*rsal*, a PCR product containing the MS2 tag fused to the 5' end of *rsal* was

cloned into pCN51::P3 by digestion of both PCR fragments and of the plasmid by *PstI/BamHI* (Table S2). Plasmids from positive clones were sequenced (GATC Biotech) before being transformed in DC10B, extracted and electroporated into *S. aureus* strains.

### **Growth conditions**

*E. coli* strains were cultivated in Luria-Bertani (LB) medium (1% peptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl) supplemented with ampicillin (100 µg/mL) when necessary. *S. aureus* strains were grown in Brain-Heart Infusion BHI or MHB media (Sigma-Aldrich) supplemented with erythromycin (10 µg/mL) when needed. When needed, MHB was complemented with 0,15% of D-glucose or 0,10% of fructose and of xylose (Sigma-Aldrich). NO production was induced by addition of 100 µM Na-diethylamine NONOate (Sigma-Aldrich) as described (Durand et al, 2015).

### **Preparation of total RNA extracts**

Total RNAs were prepared from *S. aureus* cultures taken at different times of growth. After centrifugation, bacterial pellets were resuspended in 1 mL of RNA Pro Solution (MP Biomedicals). Lysis was performed with FastPrep and RNA purification followed strictly the procedure described for the FastRNA Pro Blue Kit (MP Biomedicals). Electrophoresis of either total RNA (10 µg) or MS2-eluted RNA (500 ng) was performed on 1,5% agarose gel containing 25 mM guanidium thiocyanate. After migration, RNAs were vacuum transferred on nitrocellulose membrane. Hybridization with specific digoxigenin (DIG)-labeled probes complementary to *RsaI*, 5S, *ccpA* sequences, followed by luminescent detection was carried out as described previously (Tomasini et al., 2017).

### **MAPS experiments and RNA-seq analysis**

Crude bacterial extract were prepared and purified by affinity chromatography as described previously (Tomasini et al., 2017). The eluted RNA samples were either used for Northern blot or treated with DNase I prior to RNA-seq analysis. Isolation of tagged sRNAs and the co-purified RNAs was performed in duplicates.

For total RNA extracts and MS2-eluted RNAs, DNase I (0.1 U/ µL) treatment was performed 1h at 37°C. The reactions mixtures were then purified by phenol::chloroform::isoamylalcohol and subsequent ethanol precipitation. RNA pellets were re-suspended in sterile milliQ water. RNA was quantified by a Qubit (Life Technologies) and RNA integrity was assessed with the Bioanalyzer (Agilent Technologies). For transcriptomic, 1 µg of total RNA was ribo-depleted with the bacterial RiboZero kit from Illumina. The truseq total RNA stranded kit from Illumina was used for the library preparation. Library quantity was measured by Qubit and quality was assessed with a TapeStation on a DNA High sensitivity chip (Agilent Technologies). Libraries were pooled at equimolarity and loaded at 7 pM for

clustering. The 50 bases single-read sequencing was performed using TruSeq SBS HS v3 chemistry on an Illumina HiSeq 2500 sequencer.

The RNAs from MS2 affinity purification were then treated to deplete abundant rRNAs, and the cDNA libraries were performed using the ScriptSeq complete kit (bacteria) from Illumina. The libraries were sequenced using Illumina MiSeq using a V3 Reagent kit (Illumina), which preserves the information about the orientation of the transcripts and produces reads of 150 nts, which map on the complementary strand. Each RNA-seq was performed in duplicates. The reads were then processed to remove adapter sequences and poor quality reads by Trimmomatic (Bolger et al., 2014), converted to the FASTQ format with FASTQ Groomer (Blankberg et al., 2010), aligned on the HG001 genome (Caldelari et al., 2017) using BOWTIE2 (Langmead et al., 2009). Finally, the number of reads mapping to each annotated feature has been counted with HTSeq (Anders et al., 2015) using the interception non-empty protocol. All processing steps were performed using the Galaxy platform (Afgan et al., 2016). To estimate the enrichment values for the MAPS experiment or the differential expression analysis for the transcriptomic experiment, we used DEseq2 (Varet et al., 2016). The statistical analysis process includes data normalization, graphical exploration of raw and normalized data, test for differential expression for each feature between the conditions, raw p-value adjustment, and export of lists of features having a significant differential expression (threshold p-value=0.05; fold change threshold=2) between the conditions.

### **Preparation of RNAs for in vitro experiments**

Transcription of RsaI and RsaI mutants was performed using linearized pUC18 vectors. PCR fragments containing the 5'UTR of the coding region of selected mRNA targets were directly used as templates for in vitro transcription using T7 RNA polymerase. The RNAs were then purified using a 6% or 8% polyacrylamide-8 M urea gel electrophoresis. After elution with 0.5 M ammonium acetate pH 6.5 containing 1 mM EDTA, the RNAs were precipitated in cold absolute ethanol, washed with 85% ethanol and vacuum-dried. The labelling of the 5' end of dephosphorylated RNAs (RsaI/RsaI mutants) and DNA oligonucleotides were performed with T4 polynucleotide kinase (Fermentas) and [ $\gamma$ 32P] ATP. Before use, cold or labeled RNAs were renatured by incubation at 90°C for 1 min in 20 mM Tris-HCl pH 7.5, cooled 1 min on ice, and incubated 10 min at 20°C in ToeP+ buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 60 mM KCl, 1 mM DTT).

### **Gel Retardation Assays**

Radiolabeled purified RsaI or RsaI mutants (50000 cps/sample, concentration < 1 pM) and unlabelled mRNAs were renatured separately as described above. For each experiment, increasing concentrations of unlabelled mRNAs were added to the 5' end labeled RsaI or RsaI mutants in a total volume of 10  $\mu$ l containing the ToeP+ buffer. Complex formation was performed at 37°C during 15 min. After incubation, 10  $\mu$ L of glycerol blue was added and the samples were loaded on a 6% or 8 % polyacrylamide gel under non-denaturing conditions (300 V, 4°C). Under these conditions where the concentration of the labeled RNA is negligible, the KD dissociation constant can be estimated as the concentration of the unlabelled RNA that showed 50% of binding.

### **Toe-printing assays**

The preparation of *E. coli* 30S subunits, the formation of a simplified translational initiation complex with mRNA, and the extension inhibition conditions were performed as previously described (Fechter et al., 2009). Increasing concentrations of RsaI were used to monitor their effects on the formation of the initiation complex with glcU and fruK mRNAs.

### **In vivo $\beta$ -galactosidase assays**

Translation fusions were constructed with plasmid pLUG220, a derivative of pTCV-lac, a low-copy-number promoter-less lacZ vector (Table S1), containing the constitutive rpoB promoter. The whole leader region of glcU (-83/+87) (Table S2) were cloned downstream the PrpoB in frame with lacZ.  $\beta$ -galactosidase activity was measured four times with the Enzyme Assay System (Promega).

### **Analysis of PIA-PNAG synthesis.**

The PIA/PNAG exopolysaccharide expressed at the cell surface of various *S. aureus* strains were monitored by western blot experiments according to de los Mozos et al. (2013). Overnight cultures were diluted 1:40 in the growth medium and 2 ml of diluted cells were loaded on sterile 24-well polystyrene microtiter plates. After 24 h of incubation at 37°C, the cells were resuspended in 50  $\mu$ l of 0.5 M EDTA (pH 8.0), incubated for 5 min at 100°C and centrifuged 17,000 g for 5 min. The supernatants (40  $\mu$ l) were treated with 10  $\mu$ l of proteinase K (20 mg ml<sup>-1</sup>) for 30 min at 37°C, and after the addition of 10  $\mu$ l of buffer containing 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, and 0.01% bromophenol blue, the samples (5  $\mu$ l) were spotted on a nitrocellulose membrane. The PIA/PNAG were then visualized by western blot using specific anti-PNAG antibodies.

## RESULTS

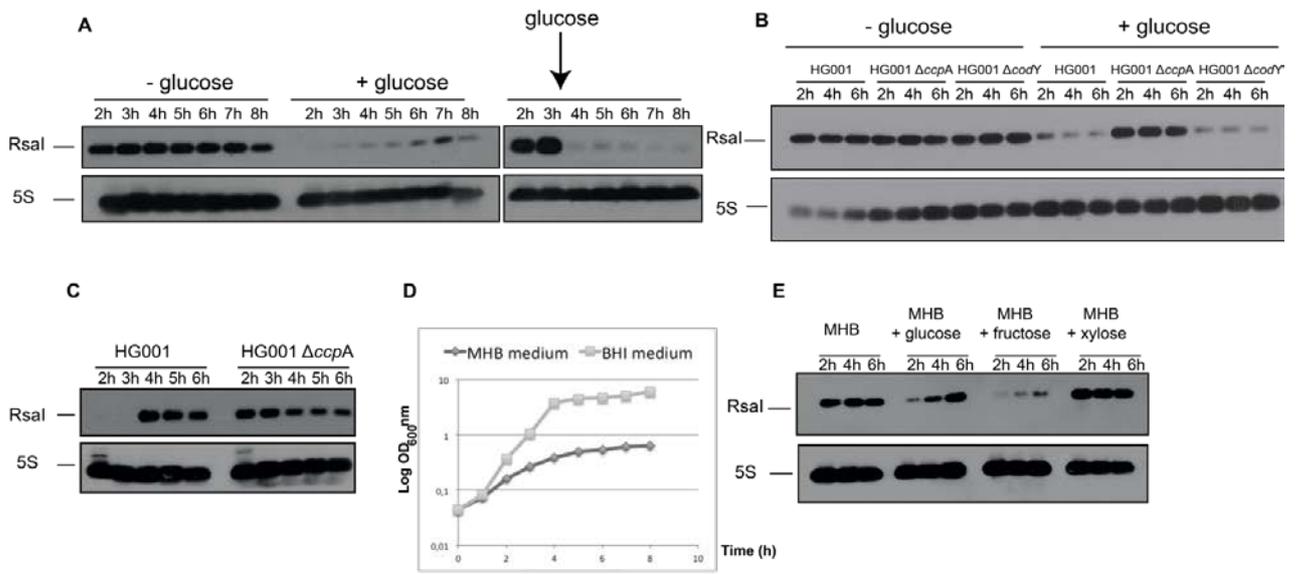
### **The expression of RsaI is inhibited by glucose and by the carbon catabolite protein A.**

We have previously shown that the synthesis of RsaI is high at the stationary phase of growth in the rich-BHI medium while its expression was considerably enhanced at the exponential phase of growth in MHB medium (Geissmann *et al.*, 2009). These data suggested that RsaI expression is regulated in a manner dependent on nutrient or biosynthetic intermediate availability. In a first experiment, we analyzed whether the expression of RsaI might be dependent on glucose metabolism. Northern blot experiments were performed on total RNAs prepared from HG001 strain grown in the MHB medium at various time points (Figure 1A, 1D).

In MHB where the glucose is not immediately available as the carbon source, RsaI was constitutively expressed and at high level (Figure 1A). Conversely, when glucose was added, either at the beginning of the culture or after 3 h of growth, transcription of RsaI was immediately stopped (Figure 1A). As CcpA sensed the intracellular concentration of glucose, we analyzed if the expression of RsaI was CcpA-dependent. Northern blot analysis was performed on total RNA extracts prepared from HG001 (wild type) strain and a mutant HG001 strain deleted of *ccpA* gene ( $\Delta ccpA$ ).

The same experiment was performed with a mutant strain deleted of *codY* gene, which was shown as a direct regulator of amino acid biosynthesis, transport of macromolecules, and virulence (Majerczyk *et al.*, 2010; Pohl *et al.*, 2009). In the absence of glucose, the yield of RsaI was similar in all strains. On the opposite, in the presence of glucose in MHB medium, the expression of RsaI dropped dramatically in the WT and  $\Delta codY$  strains, whereas the expression of RsaI was still high in  $\Delta ccpA$  strain (Figure 1B). In BHI medium, RsaI was expressed after 4 h of growth, while its expression was constitutive in the mutant  $\Delta ccpA$  strain (Figures 1C, S1A). The same pattern was observed for RsaI expression in MHB medium in the presence of fructose, but not with xylose, suggesting that inhibition by sugar is strictly dependent of hexoses (Figure 1E).

Overall, we showed that CcpA represses RsaI expression in the presence of glucose. In accordance with this data, a conserved *cre* (GGAAAcGcTTACAT) sequence was found at position -30 upstream the transcriptional start site of RsaI (Figure S1B).



**Figure 1: RsaI responds to glucose through the transcriptional factor CcpA.** (A) Northern blot experiments showing the expression of RsaI during growth phase in the HG001 strain in MHB medium with or without addition of 1,5 g/L of D-glucose at the beginning of the growth (middle panel) or after 3 h of growth (right panel). (B) Northern blot experiments showing the expression of RsaI during growth phase in the HG001,  $\Delta ccpA$  mutant strain and  $\Delta codY$  mutant strain, in MHB medium with or without the addition of 1,5 g/L of D-glucose. (C) Northern blot experiments showing the expression of RsaI in the HG001 and  $ccpA$  mutant strains. Total RNA were prepared after 2, 3, 4, 5 and 6 h of culture in BHI media at 37°C. Hybridization against 5S RNA was used as loading control (D) Growth curves of HG001 in MHB or BHI. (E) Northern blot analysis of RsaI in MHB medium with or without the addition of 1,5 g/L of glucose, fructose or xylose.

### The targetome of RsaI as revealed by the MAPS approach.

The MAPS approach (“MS2 affinity purification coupled to RNA sequencing”) was used to purify *in vivo* regulatory complexes involving RsaI. MAPS has been successful to identify the RNA targets of any sRNAs in *E. coli* (Lalaouna & Massé, 2015), and more recently of RsaA sRNA in *S. aureus* (Tomasini *et al.*, 2017). Briefly, the MS2 tagged version of RsaI was expressed from a plasmid under the control of the *agr*-dependent P3 promoter, allowing an accumulation of the RNA at the stationary phase of growth in the mutant  $\Delta rsaI$  strain. RsaI was detected by Northern blot using total RNAs extracted at 2, 4 and 6 h of growth in BHI medium. Using a DIG-labelled RsaI probe, we showed that the steady state levels of MS2-RsaI are very similar to the wild type (WT) RsaI, and that MS2-RsaI is specifically retained by the MS2-MBP fused protein after the affinity chromatography (Figure S1C). The RNAs were then extracted from the eluted fraction to be sequenced. The data were analyzed using Galaxy (Afgan *et al.*, 2016), and the sequencing reads were aligned with the reference HG001 genome (Caldelari *et al.*, 2017; Herbert *et al.*, 2010) counted per feature and normalized. The enrichment of putative targets was done by comparing the number of reads obtained from the MS2-RsaI purification and the MS2 alone as control. The

data were reproduced in two independent experiments. The cut-off was defined at around 2-fold using the DeSeq2 method, giving the restricted list of candidates (Tables 1, S1).

Interestingly, two classes of enriched RNAs were identified, including several mRNAs and sRNAs. The most enriched mRNA encodes IcaR, the repressor of polysaccharide intracellular adhesin (PIA) biofilm formation. Other mRNAs highly enriched code for proteins linked to sugar utilization and transport, such as *glcU\_2* encoding a major transporter of glucose, and *fn3K* encoding fructosamine 3-kinase. Three less enriched mRNAs (< 4 fold) encode the trehalose-specific PTS transporter (TreB), a sugar phosphatase and a maltose transport system permease (Table S2). Other mRNAs led to transcriptional regulators (Xre type, the maltose regulatory protein GlvR, slyA, sigS). Moreover, CcpA regulates the expression of several of these targets, *glvR* and *HG001\_2210* (Table 1). As for sRNAs, we found RsaD, RsaE, RsaG, and the less enriched RsaH, which all contained at least one C-rich motif (Geissmann *et al.*, 2009).

We then searched for possible intermolecular basepairing interactions between RsaI and its potential RNA targets using IntaRNA (Table 1). Stable interactions were identified for most of the enriched RNAs. Interestingly enough, the CU-rich unpaired region of RsaI was predicted to form basepairings with most of the mRNAs. They were located close, or at the ribosome binding sites of most of the mRNAs except for *icaR* and *isaA*, which involves their 3' untranslated region (Table 1). A second domain of interaction corresponded to the G-track sequences located in the first hairpin domain of RsaI and the C-rich sequences of the sRNAs RsaD, RsaE, RsaG and RsaH.

These data suggested that RsaI is a multifunctional RNA, which regulates the expression of mRNAs at the post-transcriptional level, while the regulatory activities of sRNAs, or/and its activities might be regulated by other sRNAs.

Target	Product	Base-pairing prediction	Fold change $\Delta_{RsaI/WT}$	Fold change* MS2-RsaI/MS2	Interactions	$\Delta G$ (kcal/mol)
HG001_02704	IcaR Biofilm operon IcaADBC H1H-type negative transcriptional regulator	1382 GGAAGGUAUAAGUAUAUUUAUUUAAGGCCCUAUGUGAUG 1425 104 CCUUUCAU---UCAUUUUU- AUAACUUCUACA----ACACUAC 69 41 AGAAAGGGUAUGACGGUACAACAC-UUGAUGAUU 74 coding 109 UCUUUCUUUCAU-UCAUUUUUAUAACUUCUCA 76 RsaI -58 AAUAAGAGAGAGACGAGAGAGUU 113 UUAUCUUUC-CU-UUCAUCAU -21 AUAACAUAUGGAG-UGA---UGAUAUG +3 92 UAUUUAUAACUUCUACAACACUACAUAU 66 -29 AAGGAAAGUAUGAAAUA AAA---GGAGAUG +3 106 UUUUUUCAUU-CAUUUUUAUAACUUCUCA 76	0,807	33,976	i	-16,16
HG001_02520	XRE family transcriptional regulator	43 CUACCCUU 50 32 GAUGGGGA 25 +602 UACCCUU+608 31 AUGGGGA 25 -22 GGGGAUCCAGCAGUAGUAAUGU AUGUGAAU +8 106 UUUUUUCAU-UCAUUUUU-UAUA-ACUUC 80 741 UAUAUAGUCU-UCCC 755 41 AUAUAUCGAGAUUGGGG 26 59 CCCCUCUUU 68 29 GGGGAACAA 20 -2 AAUUGAAAGAAUUUGAAGUAAU +21 113 UUUUAUCUUUCUUUCAUUCAUUA 91	0,698	22,978	i	-12,08
HG001_01242	Hypothetical protein		0,849	17,369	i	-16,27
HG001_02756	RsaG		1,021	13,621	i	-8,82
HG001_02360	glvR		0,724	9,961	ni	-6,78
HG001_01537	RsmG Putative O- methyltransferase		0,987	7,137	i	-9,74
HG001_02609	isaA		1,008	6,76	ni	-11,36
HG001_00847	RsaE		0,899	5,476	ni	-14,21
HG001_02545	Hypothetical protein		0,950	5,262	i	-11,16

Target	Product	Base-pairing prediction	Fold change $\Delta$ RsaI/WT	Fold change* MS2-RsaI/MS2	Interactions	$\Delta$ G (kcal/mol)
HG001_00316	Peptidase propeptide and YPEB domain protein	-23 AAUAGGAAAGAGAGUGAUUUATG +3 113 UUUUUCUUUC-CUUUCAUUCAUUU 89	1,094	5,234	i	-15,55
HG001_02210	Hypothetical protein	-26 AAUUAUUUAAAGGAUGU -10 90 UUUUAUAAC--UUCUACA 76	1,186	4,978	ni	-8,33
HG001_02293	GlcU_2 putative glucose uptake protein	-25 AAUAGUUAUAGGAGUGAGUAGUCUUG +3 113 UUUUUCUU-UCCUUUCAUUCAUUUUUA 87	1,093	4,769	i	-18,25
HG001_00974	Hypothetical protein	401 CUACCCU 407 32 GAUGGGG 26	1,077	4,532	ni	-7,18
HG001_02628	Fn3K Fructosamine Kinase	-24 UAAGUAGAUUGGAGGUGUUUGU-AUGAUG +7 114 GUUUUUCUUCCUUUCAU--CAUUUUUU 86	1,077	4,37	i	-16,44
HG001_00942	Putative cell wall binding lipoprotein	-24 AAUAGCAAGUGGAGGUACAAGUAUGAAUUUUGGA 12 113 UUUUUCUUUC-CUUUCAU--UCAUUUUUUUAAACUU 81	1,02	4,091	i	-16,06
HG001_00584	RsaD	42 CUCCUUUGU 50 29 GGGGAAACA 21	1,046	4,078	i	-7,97
Common with RsaG						
HG001_00687	DegV domain-containing protein	+157 UAGAAAAGAAAGUAUAGAUUUGUAAGACUUUGAAGA +196 110 AUCUUUCCUUUCAU-----CAUUUUUAUACUUCU 79	0,988	3,269	i	-17,04
HG001_01150	GlpF Glycerol uptake facilitator protein	-31 AUCUCUUUGU -22 30 UGGGAAACA 21	1,044	2,967	nt	-8,26
HG001_00386	TreB PTS system trehalose-specific EIIBC component	-14 AGGGAGUGAAAUUAUUGGUCUAAAAA GAGAAUGU +23 109 UCUUUC-CUUUCAU--UCAUUUUUUUAACUUCUACA 76	1,037	2,653	i	-12,87

**Table 1:** *In silico* predictions basepairing interactions for selected RNAs found by MAPS with MS2-RsaI

\* $p < 0,000005$

The red bases indicate base-pairing interactions. In green are shown the Shine and Dalgarno sequence and the translation start codon AUG (UUG for *glcU\_2* mRNA).  $\Delta G$  for RNA hybrids were predicted with IntaRNA. n.i means no interaction, n.t not tested

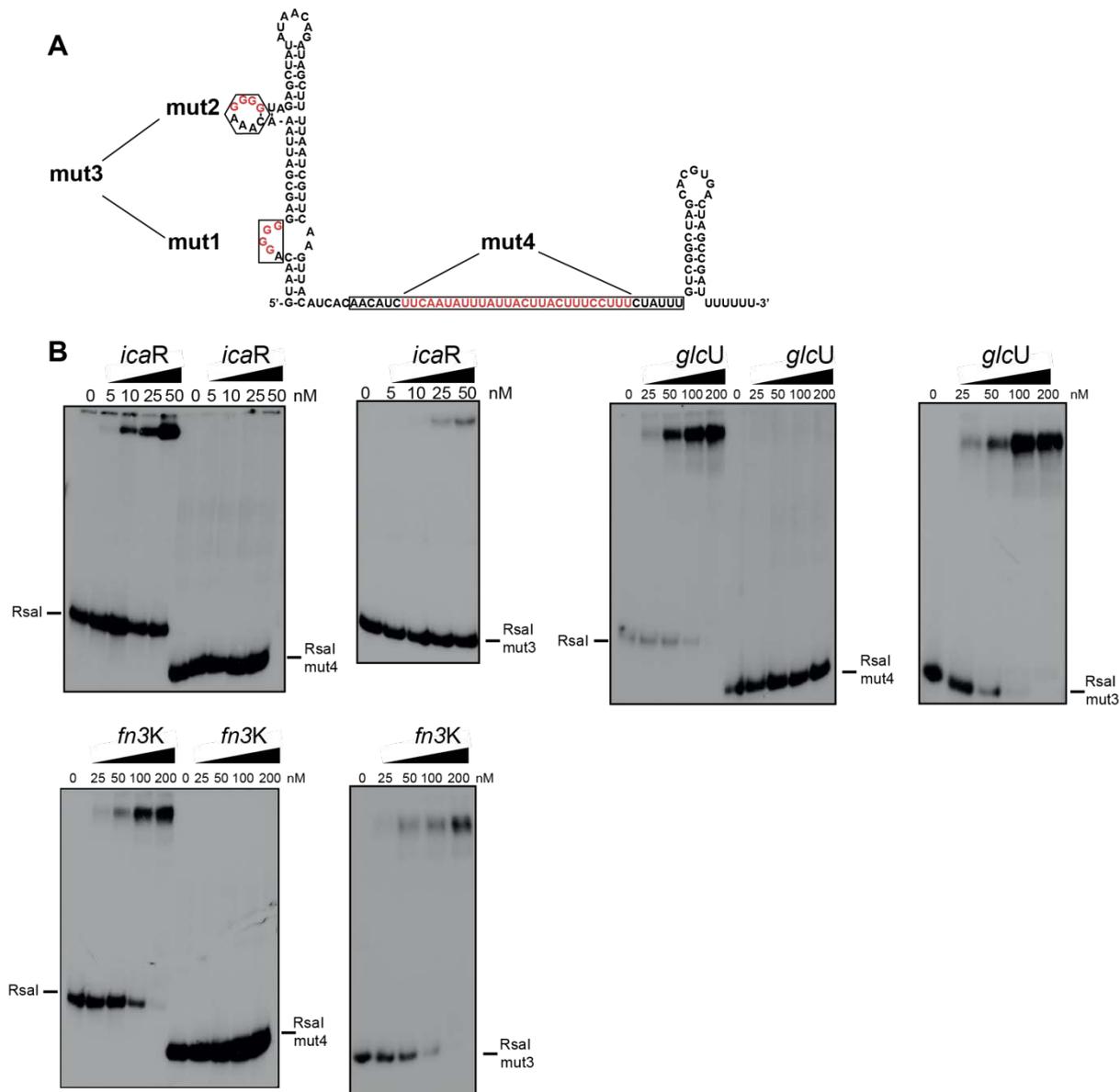
### **RsaI forms stable complexes with most of the enriched RNAs.**

Based on the MAPS data, we first analyzed whether RsaI directly binds to the mRNA and sRNA candidates using gel retardation assays (Figures 2, 3, S2). *In vitro* 5' end-labeled RsaI was incubated with increasing concentrations of various mRNAs encoding hypothetical proteins and proteins involved in biofilm (*IcaR*), sugar uptake and metabolism (*GlvR*, *GlcU*, *isaA*, and *Fn3K*), and several sRNAs (*RsaG*, *RsaE*, and *RsaD*). For these experiments, we used the full-length mRNAs and sRNAs (Table S2).

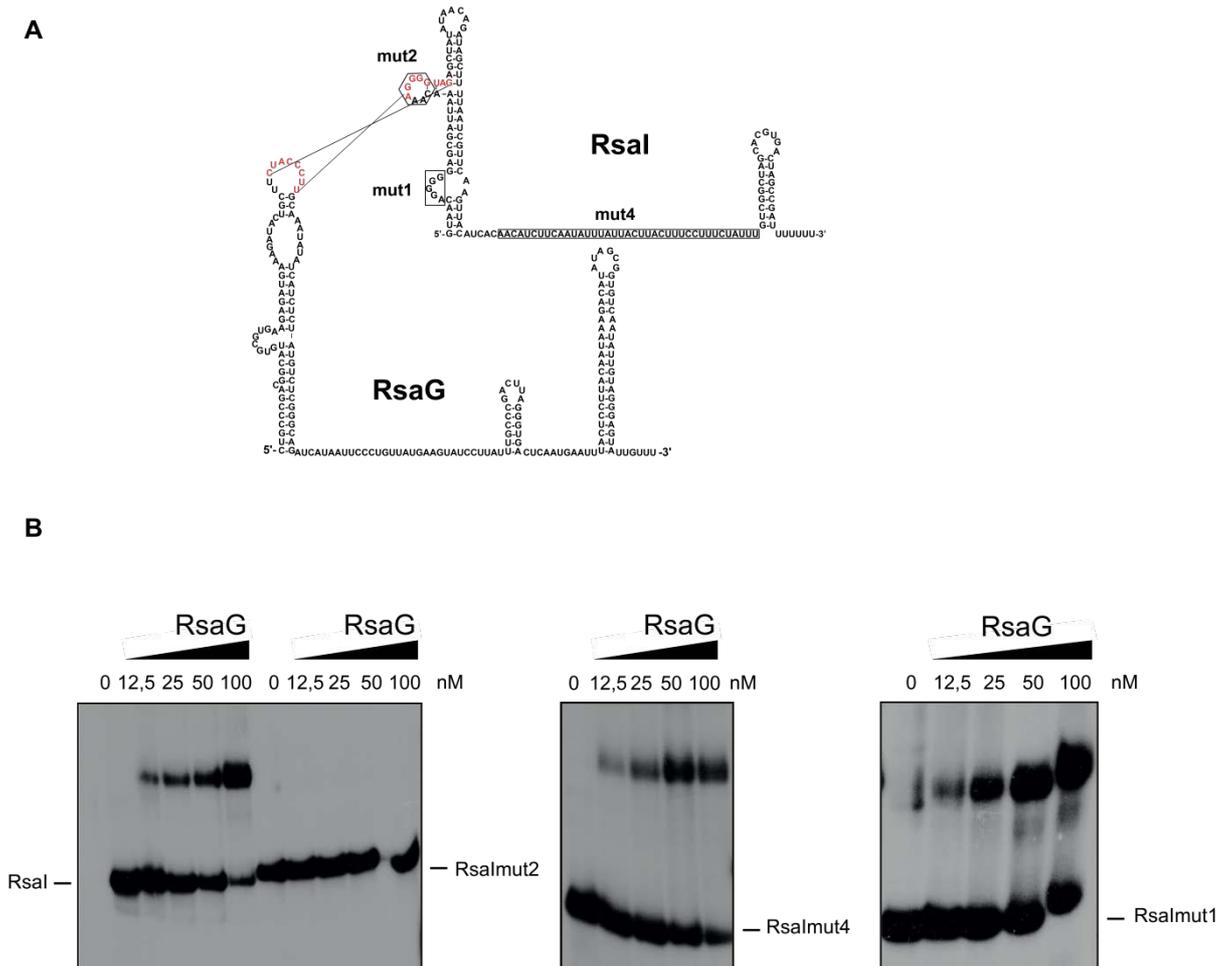
Complex formation was performed with RNAs, which were renatured separately in a buffer containing magnesium and salt. The data showed that RsaI formed complexes with high affinity (between 20-100 nM, Table 1) with many RNAs such as *icaR*, *glcU*, and *fn3K* mRNAs (Figure 2), and *RsaG* sRNA (Figure 3). The stability of other complexes (*treB* mRNA and *RsaD* sRNA) was significantly lowered ( $> 250$  nM) (Figure S2). Finally, no gel retardation was observed with RsaI incubated with increasing concentrations of *isaA*, *glvR* mRNAs and *RsaE* (up to 200 nM, Figure S2).

Based on the basepairing prediction, mutations have been introduced in RsaI to map its functional regulatory regions. The two G-track sequences were mutated separately (RsaI mut1:  $\Delta G7-G10$ , RsaI mut2:  $\Delta G26-G29$ ) or simultaneously (RsaI mut3:  $\Delta G7-G10/\Delta G26-G29$ ), while a large region (RsaI mut4:  $\Delta U81-U107$ ) was deleted in the interhelical unpaired sequence (Figure 2). We then analyzed the ability of mutated RsaI derivatives to form complexes with *glcU*, *fn3K*, and *icaR* mRNAs, and *RsaG* sRNA (Figures 2 and 3). The data showed that RsaI mut3 bind to all three mRNAs similarly to the WT RsaI, while complex formation was completely abolished with RsaI mut4. Interestingly, only the mutations in the second G-track sequences (RsaI mut 2) strongly altered the binding to *RsaG*, while mutated RsaI (mut1 and mut4) recognized *RsaG* with an equivalent binding affinity as the WT RsaI (Figure 3).

Taken together, our data revealed that RsaI has at least two distinct regulatory domains that directly interact either with mRNAs or with sRNAs.



**Figure 2: RsaI binds to *glcU*<sub>2</sub>, *fn3K*, *icaR* and other mRNA.** (A) 2D structure prediction of RsaI. In red are the nucleotides deleted in the mutants 1, 2, 3 and 4. Squared nucleotides represent conserved sequences. (B) Gel retardation assays showing the formation of the complex between RsaI and *icaR*, *glcU*<sub>2</sub> or *fn3K*. The 5' end-labeled of RsaI wild-type (RsaI), RsaI mutant 3 (RsaI mut3) and RsaI mutant 4 (RsaI mut4) were incubated with increasing concentration of mRNAs.



**Figure 3: RsaI interacts with the sRNA RsaG (A)** 2D structure predictions of RsaI and RsaG, in red are putative interacting nucleotides (B) Gel retardation assays showing the formation of the complex between RsaI and RsaG. The 5' end-labeled of RsaI wild-type (RsaI), RsaI mutant 2 (RsaI mut2), RsaI mutant 4 (RsaI mut4), and RsaI mutant 1 (Rsalmut1) were incubated with increasing concentration of RsaG.

### The effect of RsaI on global gene transcription in *S. aureus*.

In order to get a better global overview of RsaI impact on gene regulation, a comparative transcriptomic analysis was performed on total RNAs extracted from the WT HG001 strain, the isogenic HG001 $\Delta$ rsal mutant strain, and the same mutant strain complemented with a plasmid expressing RsaI under the control of its own promoter (Table S2). The cultures were done in triplicates with high reproducibility in BHI medium at 37°C until 6 h, under the conditions allowing the expression of RsaI (Figure 1). While many sRNAs, acting as antisense RNAs often altered the stability of the target RNAs, we first focused our analysis on several mRNAs and sRNAs identified by MAPS (Table 1). Surprisingly, we did not observe any major RsaI-dependent effects on the steady state levels of all RNAs tested. Considering the whole transcriptome, we have considered a gene to be

regulated by RsaI if the ratio between two strains is at least twofold. Significant differences were observed only between the mutant  $\Delta$ rsaI versus the same strain expressing RsaI from a plasmid. Accordingly, the mRNA levels of 26 genes were significantly decreased in the complemented mutant strain, while 50 genes had a level significantly enhanced (Table S3). Most of the RsaI-dependent activation was observed for genes involved in fermentation processes (i.e., *ldhD\_1* encoding lactate dehydrogenase, *pflB* encoding formate acetyltransferase, and *pflA* encoding pyruvate-formate lyase activating enzyme), in energy-generating processing (i.e., *qoxABCD* operon encoding terminal oxidases for aerobic respiration, *ctaA* encoding heme synthase, *hmp* encoding flavoprotein), in amino acid metabolism (i.e., *arg* encoding arginase, *prop* encoding proline/betaine transporter, *tdcB* encoding L-threonine dehydratase catabolic TscB), in peptide transport system (*oppB/D*), and in the biosynthesis of co-factors and prosynthetic groups (i.e., *nasE-nasF* operon). The levels of two sRNAs (*RsaG*, *RsaH*) were also significantly enhanced. Besides, the overexpression of RsaI caused a reduced expression of genes that are functionally related. Several of them are involved in sugar metabolism and pentose pathway (i.e., *fdA* encoding fructose bi-phosphate aldolase, *gnd* encoding 6-phosphogluconate dehydrogenase, *tkt* encoding transketolase, *treR\_2* encoding transcriptional repressor of the trehalose operon containing *treB*), in thiamine co-factor synthesis (*thiDME* operon, *tenA* encoding a putative thiaminase, *thiW* encoding a thiamine transporter), in carbohydrate uptake (*ptsI* encoding phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase), and in arginine catabolism (*arc* operon). Additionally, significant repression was also observed for *miaB* encoding tRNA specific modification enzyme, *tyrS* encoding tryptophanyl-tRNA synthetase, and *ebpS* encoding the cell surface elastin binding protein. Interestingly, the MAPS approach revealed that several of these mRNAs (i.e., *qoxABCD* operon, *tyrS*, *arcC1*, *treR\_2*, *pflA-pflB*) were slightly but reproducibly enriched together with RsaI (Table S1).

These data showed that high concentrations of RsaI affected the synthesis of several enzymes involved in sugar metabolism and primarily in the pentose phosphate pathway, and various processes linked to energy production.

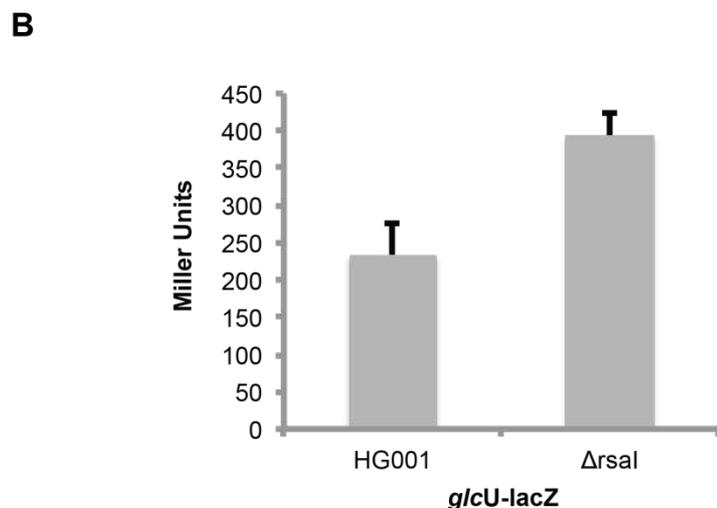
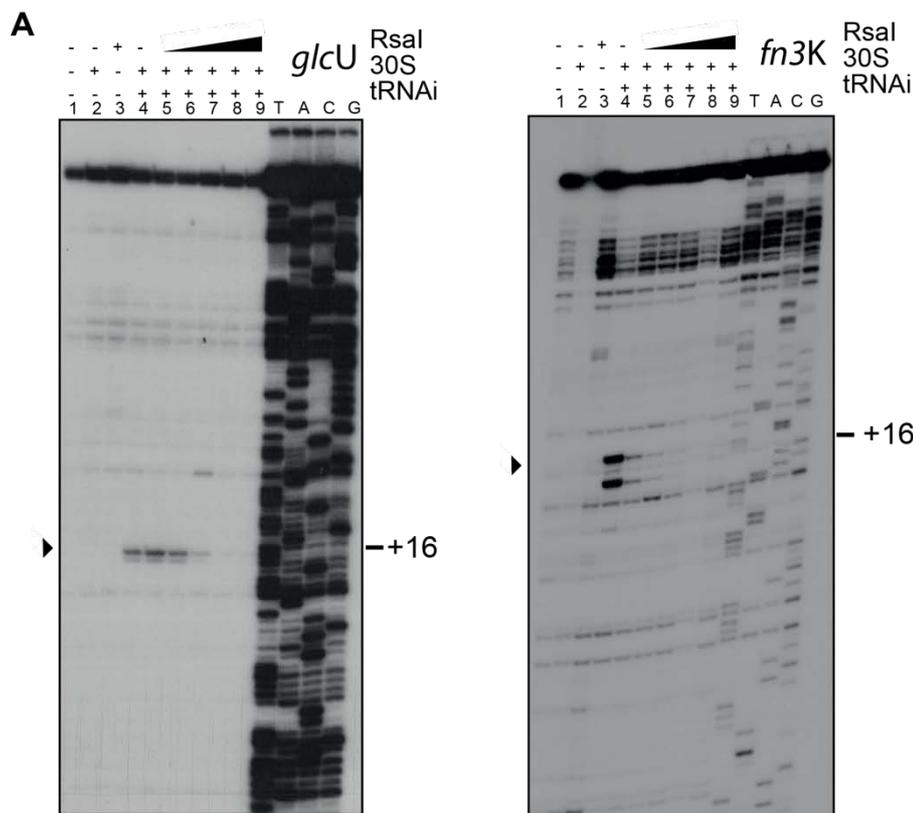
### **RsaI inhibits the translation of *glcU* and *fn3K* mRNAs.**

We analyzed whether RsaI would preferentially regulate their translation, because most of the levels of mRNAs that were identified by MAPS were not altered in the  $\Delta$ rsaI mutant strain. Using toe-printing assays, we first checked the effect of RsaI on the formation of the ternary initiation complex constituting of mRNA, the initiator tRNA, and the 30S subunit. Typical experiments were performed with *glcU* and *fn3K* mRNAs, which interacted efficiently with the CU-rich unpaired region of RsaI (Figure 2). For both mRNAs, the formation of the ternary initiation complex is illustrated by the presence of a toe-print signal at

position +16 (+1 being the initiation codon). For fn3K mRNA, two toe-print signals were observed at +16 and at +20, most probably corresponding to the presence of two AUG codons distant of 5 nucleotides. However, only the first AUG is used in vivo (Gemayel et al., 2007). The addition of increasing concentrations of RsaI together with the 30S, strongly decreased the toe-print signals for both mRNAs showing that RsaI formed a stable complex sufficient to prevent the binding of the 30S subunits (Figure 4A).

To further validate the in vivo relevance of RsaI-dependent repression of the mRNA glcU, we analysed the expression of a reporter construct carrying the regulatory region of glcU fused to lacZ in *S. aureus* HG001 and HG001 $\Delta$ rsaI strains. The  $\beta$ -galactosidase activity was reproducibly found higher in the  $\Delta$ rsaI mutant strain (Figure 4B). Thus, the absence of RsaI alleviated the repression of the reporter gene.

These data strongly suggested that RsaI primarily regulated translation initiation of glcU and fn3K mRNAs by masking their ribosome binding sites.



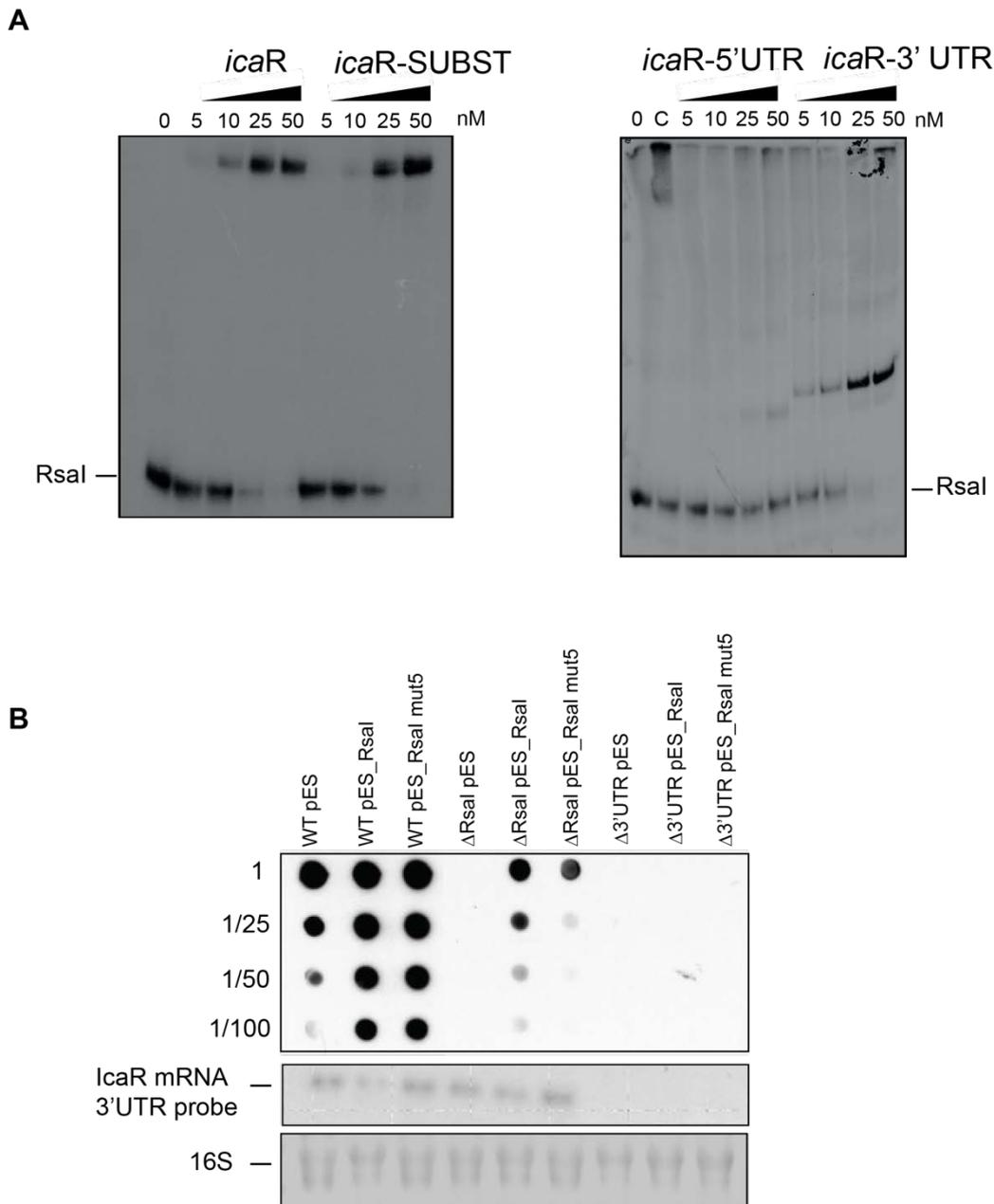
**Figure 4: RsaI inhibits *glcU* and *fn3K* translation. (A)** Toeprint assay showing the effect of RsaI on the formation of the ribosomal initiation complex of *glcU* and *fn3K* respectively. Lane 1 : incubation control of mRNA ; lane 2 : incubation control of mRNA with 30S subunits; lane 3 : formation of the ribosomal initiation complex containing mRNA, 30S and the initiator tRNA<sup>fMet</sup> (tRNA<sup>i</sup>); lane 4: incubation control of mRNA with RsaI; lane 5 to 9 : formation of the initiation complex in the presence of increasing concentrations of RsaI : 100, 200, 400 nM. Lanes U, A, C, G: sequencing ladders. The Shine and Dalgarno (SD) sequence, the start site of translation (A +1 of the AUG initiation codon) and the toe-printing signals (N+16) are indicated. (B)  $\beta$ -galactosidase activity (Miller Units) measured from *PrpoB-glcU* (-83/+87)::*lacZ* expressed in HG001 and HG001- $\Delta rsal$   $\beta$ -galactosidase activity was normalized for total density and the results represented the mean of four independent experiments.

### **RsaI interacts with *icaR* mRNA and affects PIA biofilms.**

We have shown that RsaI is able to form stable basepairings with *icaR* mRNA that encodes the repressor of the main exopolysaccharidic compound of *S. aureus* biofilm matrix. This mRNA is of particular interest because it contains a large 3' UTR that is able to bind to its own Shine and Dalgarno (SD) sequence. Consequently, the long-range interaction provokes an inhibitory effect on translation and generates a new binding site for RNase III (Ruiz de los Mozos *et al*, 2013). In a first experiment, we monitored whether the long-range interaction might be critical for RsaI binding. Previous work showed that the substitution of UCCCCUG sequence by AGGGGAC, located in the 3'UTR of *icaR*, significantly destabilized the long-range interaction to enhance *icaR* translation (Ruiz de los Mozos *et al.*, 2013). However, gel retardation assays showed that the WT and the mutant *icaR* mRNAs bind to RsaI with an equivalent binding affinity (Figure 5A), suggesting that the circularization of the mRNA is not required for RsaI binding. We then demonstrated that the 3'UTR of *icaR* contained the high affinity binding site for RsaI, which correlated with the basepairings prediction (Figure 5A, Table 1).

We then analyzed the capacity of the WT and mutant  $\Delta$ *rsaI* strains to synthesize PIA/PNAG exopolysaccharides. Dot-blot assays were performed with anti PIA/PNAG specific antibodies to monitor the levels of PIA/PNAG in the strain 132, which produced high levels of biofilms. We tested the PIA/PNAG levels in WT strain, the isogenic  $\Delta$ *rsaI* mutant strain and the  $\Delta$ 3'UTR*icaR* mutant strain carrying a deletion of the 3'UTR of *icaR* grown for 6 h in rich TSB medium containing NaCl (Figure 5B). The data suggested that RsaI and the 3'UTR of *icaR* are required for efficient production of PIA/PNAG because only the WT strain produces significant levels of exopolysaccharides. The three strains were also transformed with a plasmid overexpressing RsaI or RsaI mut5 carrying a substitution of nucleotides 88 to 103 (TTATTACTTACTTTCC to AATAATGAATGAAAGG). This mutation is expected to decrease the stability of RsaI-*icaR* duplex. In the WT background, which expresses the endogenous RsaI, the additional overexpression of WT or mutated version of RsaI causes a similar enhanced synthesis of PIA-PNAG. However, in the mutant  $\Delta$ *rsaI* strain background, the expression of RsaI mut5 induces the accumulation of lower levels of PIA/PNAG than the strain expressing the WT RsaI (Figure 5B). Finally, the synthesis of PIA/PNAG is completely inhibited in the three  $\Delta$ 3'UTR mutant strains indicating that in this background, RsaI is not able to exert its regulatory functions.

These data strongly suggest that RsaI controls PIA/PNAG synthesis by reducing the IcaR repressor protein levels through a specific interaction with the 3'UTR of *icaR* mRNA.



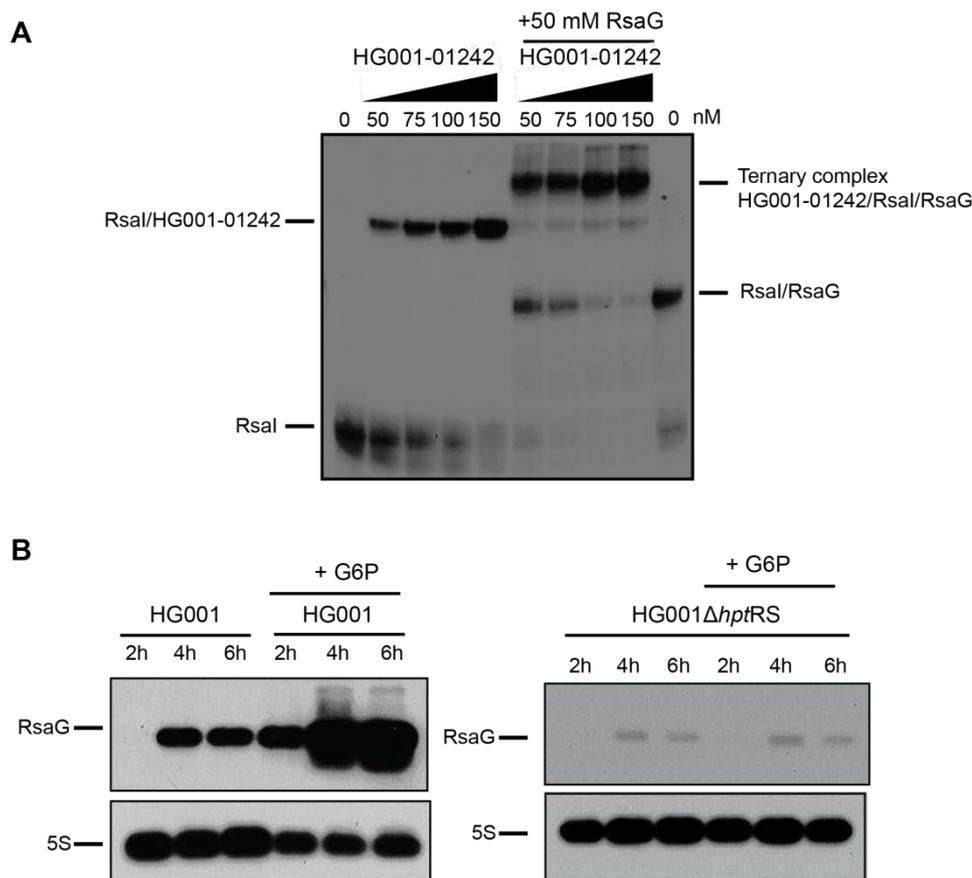
**Figure 5: Interaction of RsaI to *icaR* mRNA induces biofilm production (A)** Gel retardation assays showing the formation of the complex between RsaI and *icaR* full length, *icaR* SUBST, and *icaR*-5' UTR or and *icaR*-3' UTR. The 5' end-labeled of RsaI was incubated with increasing concentration of mRNAs. (B) *In vivo* effects of RsaI on PIA-PNAG synthesis. Quantification of PIA-PNAG exopolysaccharide biosynthesis by dot-blot. Serial dilutions (1/5) of the samples were spotted onto nitrocellulose membranes and PIA-PNAG production was detected with specific anti-PIA-PNAG antibodies. *icaR* mRNA was detected in the same samples by Northern blot using a probe directed against the 3' UTR of *icaR*. 16S rRNA was used as loading control.

**RsaI connects sugar metabolism and NO stress responses through sRNA binding.**

Three sRNAs (RsaD, RsaE, and RsaG) were significantly enriched together with RsaI. RsaG is the most enriched sRNA, and the formed RsaI-RsaG complex was found

highly stable. We first addressed the consequences of such pairings on sRNA regulation. Using gel retardation assays, we analyzed whether RsaG is able to form a ternary complex with RsaI and one of its target mRNA, or if RsaG competes with the mRNA for RsaI binding. In this experiment, we used a defined concentration of RsaG (50 nM) known to be sufficient to bind most of RsaI molecules, which were 5' end labeled. In the absence of RsaG, a concentration dependence of the mRNA *HG001\_01242* showed that it binds efficiently to RsaI. The addition of RsaG induces the formation of a high molecular weight complex formed by RsaG, RsaI and the mRNA (Figure 6A). The formation of a ternary complex suggests that RsaG binding does not interfere with the regulatory functions of RsaI.

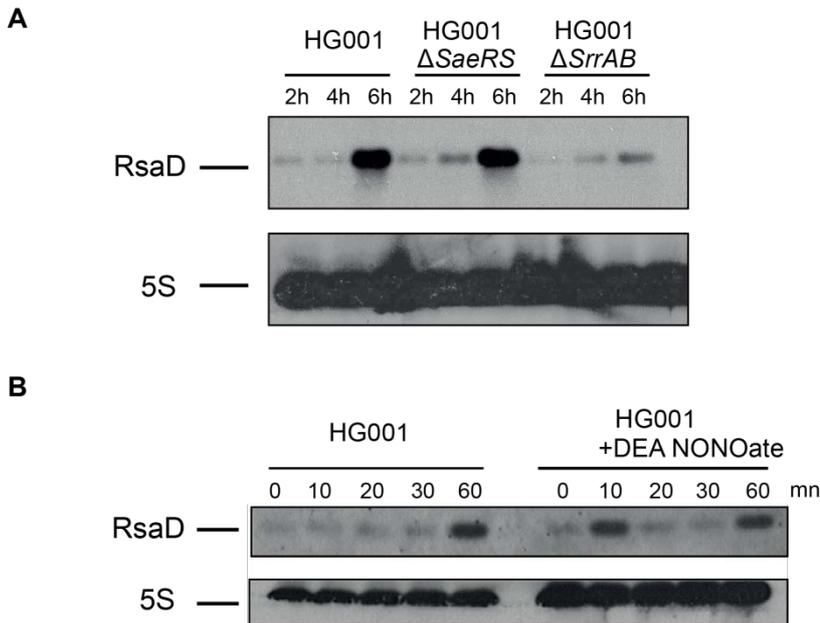
We have previously shown that RsaG is expressed at the stationary phase of growth in BHI medium (Geissmann *et al*, 2009). However, the localization of *rsaG* gene just downstream the mRNA encoding the hexose phosphate transporter UhpT, raises the question that RsaG might belong to the class of 3' UTR derived sRNAs (Chao & Vogel, 2016). We therefore analyzed whether RsaG expression would respond to the cellular concentration of glucose-6 phosphate (G-6P), another important carbon source, which is also produced by host cells (Figure 6B). Northern blot experiments were performed on total RNA extracts produced from the WT HG001 strain grown in MHB medium, which was supplemented with G-6P. Under these conditions, the synthesis of RsaG appears to be constitutive but is strongly enhanced in response to G-6P (Figure 6B). Interestingly enough, the two component system HptRS, which is encoded upstream RsaG in the opposite direction, activates the transcription of *uhpT* in response to extracellular sugar-phosphate (Park *et al*, 2015). The deletion of *hptRS* considerably reduced the levels of RsaG. Therefore these data strongly indicate that RsaG is activated by HptRS upon G-6P signalling (Figure 6C).



**Figure 6: Regulatory function of RsaI is not impaired by binding of RsaG. (A)** Ternary complex formation between RsaI, its mRNA target hp1242 and RsaG. Radio-labeled RsaI was incubated either with increasing concentrations of hp1242 alone, or with 50 nM of RsaG and increasing concentrations of hp1242. **(B)** Northern blot experiment showing RsaG expression in the wild type strain HG001 and the deleted mutant HG001 $\Delta$ hptRS. Total RNA was extracted at 2, 4 and 6 h of growth in MHB with or without addition of glucose-6 phosphate. 5S rRNA was used as loading control.

We also analyzed the signaling pathway of RsaD. This sRNA was previously shown to accumulate at the stationary phase of growth and its expression was enhanced under heat shock conditions (Geissmann *et al.*, 2009). We then discovered that the expression of RsaD is not dependent on the two component system SaeRS but is strongly enhanced by SrrAB. Indeed, its expression drops considerably in a  $\Delta$ srrAB mutant strain (Figure 7A). Because SrrAB is able to sense and respond to nitric oxide (NO) and hypoxia (Kinkel *et al.*, 2013), we tested the effect of NO on RsaD synthesis by adding diethylamine-NONOate as previously described (Durand *et al.*, 2015). We observed a significant and reproducible increase in RsaD expression about 10 min after the addition of diethylamine-NONOate to the medium in the WT strain (Figure 7B). RsaD expression decreased after 20 min due to the short half-life of diethylamine-NONOate. Upstream *rsaD*, we identified a conserved motif AGTGACAA that could be responsible for the SrrAB-dependent transcription. It is of interest that the synthesis of RsaE was also shown to be under the control of SrrAB (Durand *et al.*, 2015).

These data suggested that through the binding of sRNAs, RsaI links sugar metabolism pathways, carbon source utilization, energy production, and stress responses.



**Figure 7: RsaD expression depends on SrrAB and is activated upon NO stress. (A)** Northern blot experiments showing the expression of RsaD at 2, 4 and 6 h of growth, in the wild type strain HG001 and in saeRS and srrAB mutant strains. 5S rRNA was used as loading control. **(B)** Northern blot experiments showing the expression of RsaD increasing upon NO stress. 5S rRNA was used as loading control.

## DISCUSSION

In this work, we have investigated the cellular functions of one abundant sRNA, called RsaI (or RsaOG), which is a highly conserved sRNA among Staphylococcaeae (Geissmann *et al.*, 2009; Marchais *et al.*, 2010).

In contrast to many sRNAs that contained C-track motifs, this RNA has the particularity to carry two conserved G-rich sequences and a large unpaired CU-rich region (Figure 1).

This led to the thought that this RNA can fold into a pseudoknot structure involving the two conserved regions and limit the access of regulatory regions (Marchais *et al.*, 2010). Combining several global approaches (MAPS, transcriptomic analysis), we show that RsaI controls a large mRNA regulon involved in sugar uptake and metabolism, biosynthetic and co-factors synthesis, cytochrome biosynthesis, anaerobic metabolism, as well as iron-sulfur cluster repair, and NO detoxification (Figure 8).



macromolecules, and concomitantly to repress genes that are involved in the metabolism of less-preferred carbon sources. To do so, CcpA has to be activated through a cascade of events involving its co-regulator histidine-containing phosphocarrier protein (HPr), which has been phosphorylated by its cognate kinase/phosphorylase HprK/P activated in the presence of glycolytic intermediates. It is thought that binding of the phosphorylated HPr to CcpA enhances its DNA binding affinity to the *cre* binding site to repress or activate the target gene. Upstream RsaI, we identified a *cre* motif -45GGAAAACGCTTACAT-30 in support with our data that CcpA can indirectly regulate genes through the transcriptional repression of sRNA (Figure 1).

Interestingly, deletion of *ccpA* gene affected vancomycin resistance (Seidl *et al.*, 2009) and recent observations showed that sub-inhibitory treatment of cells with vancomycin led to an enhanced expression of RsaI (Howden *et al.*, 2013). We showed that the repression of RsaI is alleviated as soon as the concentration of glucose is strongly reduced. Therefore RsaI might be a signature of a metabolic switch of the bacterial population. Using the MAPS approach, we could identify several mRNAs that strongly bind to RsaI with its long unpaired CU rich region. Among these mRNAs, we show that *glcU\_2*, encoding a glucose permease, and *fn3K*, encoding fructosamine 3 kinase, are both regulating at the translational level by preventing the formation of the initiation complex.

We think that this mechanism is common to all mRNAs that could form basepairings between their ribosome binding sites and the CU-rich region of RsaI. This is the case for mRNAs encoding a transcriptional regulator of the XRE family, the O-methyltransferase RsmG, a peptidase, a cell wall binding lipoprotein, DegV containing protein, and *treB* encoding the trehalose-specific PTS enzyme (Table 1). Among these proteins, two of them are directly involved in sugar uptake and metabolism (*GlcU\_2*, and *TreB*). In *S. aureus*, the PTS (phosphotransferase system)-dependent and independent transport systems ensure efficient glucose transport (reviewed in Götz *et al.*, 2006). If a rapidly metabolizable sugar (such as glucose) is used during growth at a rather low concentration, the transport will occur via the PTS system and concomitantly, the carbon catabolite repression system will be activated through CcpA protein. At high concentration of glucose, it is assumed that the sugar will be transported by the PTS system and in addition by the permease *GlcU*. The glucose transported by the permease will be phosphorylated within the cell by the glucose kinase *GlcA*. Hence, we think that RsaI represses the synthesis of *GlcU* if the glucose concentration drops. RsaI inhibits also key enzymes of the trehalose metabolism (*TreB*), a diholoside which is transported exclusively by PTS (Bassias & Brückner, 1998). Transcriptomic analysis also revealed that RsaI strongly repressed various key enzymes involved in pentose phosphate pathway such as fructose-biphosphate aldolase (*fda*), 6-

phosphogluconate dehydrogenase 2C decarboxylase (*gnd*), and the thiamine-dependent enzyme transketolase (*tkt*). Additionally, we showed that RsaI repressed the synthesis of fructosamine 3-kinase, which deglycated products of glycation formed from ribose 5-phosphate produced from the pentose pathway (Gemayel *et al.*, 2007).

This enzyme is part of a repair machinery to protect the cells from damages caused by glycation as the results of high glucose concentrations (Deppe *et al.*, 2011). The pentose phosphate pathway is also a central route for glucose metabolism, and provides the source of pentose phosphates necessary for nucleotide synthesis. Although it is not known whether RsaI regulated their expression in a direct and indirect manner, basepairings were predicted between RsaI and the ribosome binding site of *tkt* mRNA (Table S3). The transketolase is a key enzyme of the pentose phosphate pathway, which requires thiamine diphosphate as a co-factor. Interestingly, the thiamine pathway is also repressed in strain expressing RsaI (Tables 2, S2). Although, we have observed very similar pathways that are deregulated by RsaI using the MAPS and RNA-seq approaches, not so many overlaps were identified. It is possible that the conditions of the MAPS approach performed on the wild type strain expressing all the ribonucleases has preferentially selected the mRNAs that are regulated at the translational level.

Therefore, it is tempting to deduct that RsaI would inhibit the synthesis of the major permease of glucose uptake, and of enzymes involved in the pentose pathway when glucose concentration decreases.

### **Does RsaI serve as a sponge of sRNAs?**

The MAPS approach revealed that several sRNAs (RsaG, RsaI, RsaE) were significantly enriched together with RsaI. We demonstrated here that the second G-track sequence located in the first hairpin domain of RsaI is responsible for the formation of a highly stable complex with RsaG. Additionally, mRNA targets interacting with the CU-rich domain of RsaI did not disturb the binding of RsaG suggesting that the two functional domains of RsaI are independent. Conversely, preliminary data suggested that the apical loop of the first hairpin of RsaG contain the C-rich motif that is recognized by RsaI, but which is also used to regulate the expression of several mRNAs (Desgranges *et al.*, data not shown). Furthermore, the level of RsaG was slightly enhanced when RsaI was expressed (Table S3). Therefore, we think that RsaI sequestered the singular 3'UTR derived RsaG sRNA when glucose is consumed. Such sRNA sponge set up the concentration threshold that RsaG must exceed to induce target regulation under specific conditions. In fact, RsaG is part of the 3'UTR of *uhpT* mRNA, and its expression was strongly enhanced by the extracellular concentration of G-6P. Under these conditions, the levels of RsaI are much more lower than for RsaG (Figure 6). These two sRNAs are thus involved in pathways

related to the use of the preferred carbon sources. Indeed, RsaI negatively controls glucose uptake when glucose is consumed or absent from the medium while RsaG responded to the extracellular concentration of G-6P. Although the functions of RsaG remained to be addressed, we made the hypothesis that the sRNA might regulate either the expression of unnecessary genes, or of genes involved in sugar metabolism, or of genes required to protect cells against damages linked to sugar-phosphate uptake and metabolism (Bobrovskyy and Vanderpool, 2014).

It is remarkable that several sRNAs regulating essential metabolic pathways have also been shown to be under the control of RNA sponges using a large variety of mechanisms (Vogel, 2009; Lalaouna *et al.*, 2015). Some of them act as RNA decoys (Figueroa-Bossi *et al.*, 2009; Overgaard *et al.*, 2009) or as RNA sponges (Miyakoshi *et al.*, 2015) to regulate the stability of the target sRNA and consequently affect the expression of their regulons. For instance, the metabolism of chitin-derived oligosaccharide in *Salmonella* has been shown to be under the control of a network of RNA interactions. The sRNA ChiX represses the synthesis of the chitoporin ChiP at the post-transcriptional level, and in the presence of extracellular chitooligosaccharides, the inactivation of ChiP mRNA is alleviated through the targeting of the sRNA ChiX by an intercistronic region of *chb* operon. Another key example is the regulation of a GcvB sRNA, which regulated amino acid uptake and metabolism, by one of its target mRNA encoding an amino acid ABC transporter. This mRNA is processed in its 3'UTR giving rise to a sponge sRNA that interact with GcvB to induce its degradation. This regulatory feedback loop was shown essential for bacterial growth when the peptides are the only carbon and nitrogen sources (Miyakoshi *et al.*, 2015). Additionally, GcvB sRNA can also be sequestered into a complex formed with a sRNA encoded from prophage (Tree *et al.*, 2014). Therefore, the yields of these sRNAs are tightly and rapidly regulated most probably because they need to adapt the cell metabolism in responses to carbon source availability, stress responses and various environments encountered during the infection processes.

Remarkably, the overproduction of RsaI induced numerous changes into the transcriptome of *S. aureus* that resembled the regulon of the two-component system SrrAB, which was demonstrated as the essential system responding to both nitric oxide (NO) and hypoxia (Kinkel *et al.*, 2013). The SrrAB regulon has also been shown to confer to the cells the ability to maintain energy production, to promote repair damages, and NO detoxification (Kinkel *et al.*, 2013). We observed here that RsaI enhanced the expression of genes encoding cytochrome biosynthesis (qoxABCD), as well as genes involved in anaerobic metabolism (PflAB, Idh), in iron sulfur cluster repair (ScdA), and most importantly in NO

detoxification (Hmp). Moreover, we identified two other sRNAs (RsaE and RsaD) enriched with RsaI.

These sRNAs present a C-rich sequence that can potentially form basepairings with the G-track sequences of RsaI (Table 1), but in contrast to RsaG, formation of complexes with RsaI is less efficient than with RsaG. It cannot be excluded that an RNA-binding protein might be required in these cases to facilitate basepairings. We also do not exclude that the two sRNAs were pooled down because they might share similar mRNA targets with RsaI. Interestingly, the expression of RsaD and RsaE is under the control of the two component system *srrAB* and upstream both sRNA genes, a typical *srrAB* site has been found. RsaD and RsaE are both upregulated by the presence of NO in the cellular medium (Durand *et al.*, 2015; Figure 6).

Although the functions of RsaD requires additional studies, *S. aureus* RsaE was previously shown to coordinate the downregulation of numerous metabolic enzymes involved in the TCA cycle and the folate-dependent one-carbon metabolism (Bohn *et al.*, 2010; Geissmann *et al.*, 2009). Additionally, in *B. subtilis*, the homologue of RsaE called RoxS is under the control of the NADH-sensitive transcription factor Rex, and the Rex binding site was also found conserved in *S. aureus* *rsaE* gene. Hence it was thought that RsaE downregulated several enzymes of the central metabolism under non favorable conditions, and in addition would contribute to readjust the cellular NAD<sup>+</sup>/NADH balance under stress conditions (Bohn *et al.*, 2010; Durand *et al.*, 2015; 2017). Many of the RsaI-dependent effects, which have been monitored by the transcriptomic analysis, are most probably indirect, and we deduct that some of these effects resulted from the sponge function of RsaI when the preferred carbon source became scarce.

### **Physiological consequences of RsaI regulation.**

We showed here that several sRNAs in *S. aureus* are part of intricate regulatory networks to interconnect in a dynamic manner various metabolic pathways following sugar metabolism and uptake. The concept that sRNAs are key actors to coordinate the regulation of metabolic enzymes has been largely demonstrated for enterobacteriaceae (reviewed in Görke and Vogel, 2009). These sRNA-dependent regulations often induced significant growth phenotypes in responses to the availability of carbon sources and nutrient. For instance, *E. coli* and *Salmonella* SgrS contributed to stress resistance and growth during glucose-phosphate stress (reviewed in Bobrovskyy and Vanderpool, 2014), *Salmonella* GcvB regulon is required for growth if peptides represent the unique carbon source (Miyakoshi *et al.*, 2015), while *E. coli* Spot42 is important for optimal utilization of carbon sources and its overproduction inhibited growth, when succinate was the sole carbon source (Møller *et al.*,

2002). In *S. aureus*, the overproduction of RsaE induced a growth defect, which was partially alleviated by acetate (Bohn *et al.*, 2010). Therefore, the yields of these sRNAs should be tightly controlled during growth in order to adjust the metabolic pathways, to optimize the use of the preferred carbon sources, and to avoid cell damages or metabolites depletion caused by the intracellular production of glucose-phosphate.

If RsaI interconnect various metabolic pathways by acting as a sponge sRNA and as a post-transcriptional regulator, what could be its function during the infection process? *S. aureus* has the ability to generate infections through the colonization of many different metabolic host niches. Several studies have shown that both glycolysis and gluconeogenesis systems are required for full infection, and moreover *S. aureus* appears to be resistant to NO radicals that are heavily produced by the macrophages. Interestingly, glycolysis is an important process that contributed to persist within the macrophages, and to protect the intracellular bacteria against NO (Vitko *et al.*, 2015).

However, if the bacteria escape the macrophages or lyse the host cells, *S. aureus* is thought to form aggregates at the centre of highly inflamed and hypoxic abscesses. Under these conditions, the host cells consumed a large amount of glucose to fight the inflammation. Hence, glucose will become scarce for *S. aureus* suggesting that lactate and amino acids derived from the host might be used as the major sources of carbon to enter gluconeogenesis (Richardson *et al.*, 2015).

These conditions favored the activation of the two-component system SrrAB, which in turn activates genes required for anaerobic metabolism, cytochrome and heme biosynthesis, and NO radicals detoxification should play an essential role in the survival of the bacteria (Kinkel *et al.*, 2013). Because the CcpA-dependent repression of RsaI is alleviated under conditions where the glucose is strongly reduced, and because many SrrAB-dependent genes are also induced when RsaI is expressed at high levels, it is thus expected that RsaI might also contribute to metabolic adaptations of the cells to the dynamic nature of the host immune environment. Interestingly enough, we also observed a RsaI-dependent activation of the expression of the mRNA encoding EsxA, a virulence factor required for the release of the intracellular *S. aureus* during infection (Korea *et al.*, 2014).

We also showed here that RsaI regulated the synthesis of *icaR*, and enhances the synthesis of the exopolysaccharides PIA, although the precise molecular mechanism is not yet defined. The synthesis of the PIA is tightly controlled according to the metabolic states of the bacterial population. For instance, inactivation of the TCA cycle resulted in a massive derepression of the PIA biosynthetic enzymes to produce the exopolysaccharides (Sadykov *et al.*, 2008), and that glucose enhances PIA-dependent biofilm formation (You *et al.*, 2014), while SrrAB appears as an inducer of PIA-dependent biofilm (Ulrich *et al.*, 2007).

Although our study shed light on the regulatory activities of this fascinating dual functional sRNA, there is still much to be learned on how sRNAs can be integrated into the networks regulating the metabolic pathways that are essential for *S. aureus* survival, persistence and invasion within the host.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Karen Moreau and Thomas Geissmann for helpful advices and discussions.

## FUNDING

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) to [P.R.] and by the Agence Nationale de la Recherche (ANR, grant ANR-16-CE11-0007-01, RIBOSTAPH, to [P.R.]) has been published under the framework of the LABEX: ANR-10-LABX-0036 NETRNA to [P.R.], a funding from the state managed by the French National Research Agency as part of the investments for the future program. D. Bronesky was supported by Fondation pour la Recherche Médicale.

## REFERENCES

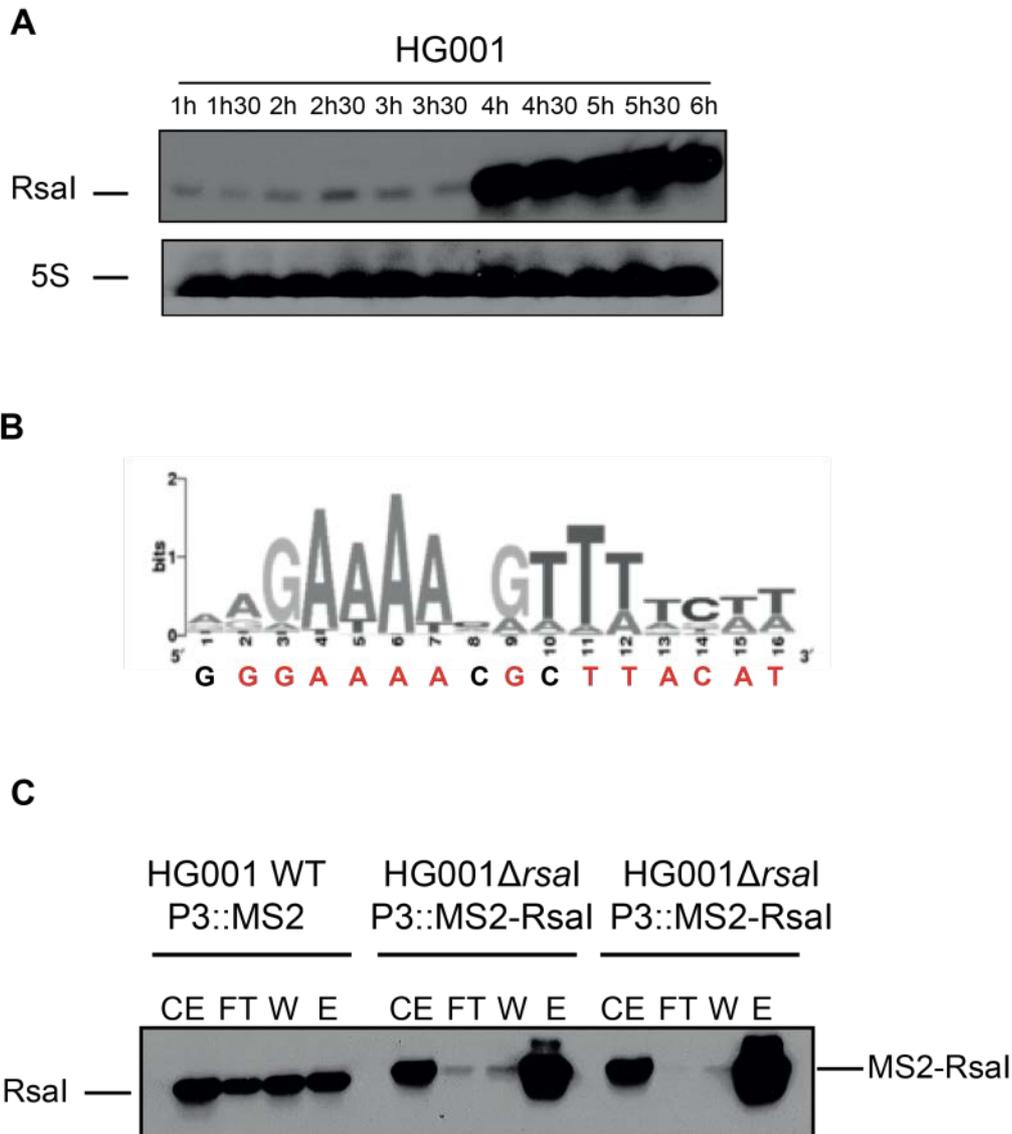
- Afgan E, Baker D, van den Beek M, Blankenberg D, Bouvier D, Čech M, Chilton J, Clements D, Coraor N, Eberhard C, Grüning B, Guerler A, Hillman-Jackson J, Von Kuster G, Rasche E, Soranzo N, Turaga N, Taylor J, Nekrutenko A & Goecks J (2016) The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. *Nucleic Acids Res.* 44: gkw343
- Arnaud M, Chastanet A & Débarbouillé M (2004) New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 6887–6891
- Bassias J & Brückner R (1998) Regulation of lactose utilization genes in *Staphylococcus xylosum*. *J. Bacteriol.* 180: 2273–2279
- Bischoff M, Wonnenberg B, Nippe N, Nyffenegger-Jann NJ, Voss M, Beisswenger C, Sunderkötter C, Molle V, Dinh QT, Lammert F, Bals R, Herrmann M, Somerville GA, Tschernig T, Gaupp R. ( 2017) CcpA Affects Infectivity of *Staphylococcus aureus* in a Hyperglycemic Environment. *Front Cell Infect Microbiol.* 9;7:172
- Bobrovskyy M & Vanderpool CK (2014) The small RNA SgrS: roles in metabolism and pathogenesis of enteric bacteria. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4: 61
- Bohn C, Rigoulay C, Chabelskaya S, Sharma CM, Marchais A, Skorski P, Borezée-Durant E, Barbet R, Jacquet E, Jacq A, Gautheret D, Felden B, Vogel J & Bouloc P (2010) Experimental discovery of small RNAs in *Staphylococcus aureus* reveals a riboregulator of central metabolism. *Nucleic Acids Res.* 38: 6620–6636

- Caldelari I., Chane-Woon-Ming B., Noirot C., Moreau K., Romby P., Gaspin C. and Marzi S. Complete genome sequence and annotation of the *Staphylococcus aureus* strain HG001. *Genome Announc.* 5:e00783-17.
- Chao Y & Vogel J (2016) A 3' UTR-Derived Small RNA Provides the Regulatory Noncoding Arm of the Inner Membrane Stress Response. *Mol. Cell* 61: 352–363
- Deppe VM, Bongaerts J, O'Connell T, Maurer KH & Meinhardt F (2011) Enzymatic deglycation of Amadori products in bacteria: Mechanisms, occurrence and physiological functions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90: 399–406
- Durand S, Braun F, Helfer AC, Romby P & Condon C (2017) sRNA-mediated activation of gene expression by inhibition of 5'-3' exonucleolytic mRNA degradation. *Elife* 6:
- Durand S, Braun F, Lioliou E, Romilly C, Helfer AC, Kuhn L, Quittot N, Nicolas P, Romby P & Condon C (2015) A nitric oxide regulated small RNA controls expression of genes involved in redox homeostasis in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genet.* 11: e1004957
- Fechter P, Chevalier C, Yusupova G, Yusupov M, Romby P & Marzi S (2009) Ribosomal initiation complexes probed by toeprinting and effect of trans-acting translational regulators in bacteria. *Methods Mol. Biol.* 540: 247–263
- Figuroa-Bossi N, Valentini M, Malleret L & Bossi L (2009) Caught at its own game: Regulatory small RNA inactivated by an inducible transcript mimicking its target. *Genes Dev.* 23: 2004–2015
- Geissmann T, Chevalier C, Cros MJ, Boisset S, Fechter P, Noirot C, Schrenzel J, François P, Vandenesch F, Gaspin C & Romby P (2009) A search for small noncoding RNAs in *Staphylococcus aureus* reveals a conserved sequence motif for regulation. *Nucleic Acids Res.* 37: 7239–7257
- Gemayel R, Fortpied J, Rzem R, Vertommen D, Veiga-da-Cunha M & Van Schaffingen E (2007) Many fructosamine 3-kinase homologues in bacteria are ribulosamine/erythrusamine 3-kinases potentially involved in protein deglycation. *FEBS J.* 274: 4360–4374
- Görke B & Vogel J (2008) Noncoding RNA control of the making and breaking of sugars. *Genes Dev.* 22: 2914–2925
- Herbert S, Ziebandt AK, Ohlsen K, Schäfer T, Hecker M, Albrecht D, Novick R & Götz F (2010) Repair of global regulators in *Staphylococcus aureus* 8325 and comparative analysis with other clinical isolates. *Infect. Immun.* 78: 2877–2889
- Howden BP, Beaume M, Harrison PF, Hernandez D, Schrenzel J, Seemann T, Francois P & Stinear TP (2013) Analysis of the small RNA transcriptional response in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* after antimicrobial exposure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57: 3864–3874
- Kinkel TL, Roux CM, Dunman PM & Fang FC (2013) The *Staphylococcus aureus* SrrAB two-component system promotes resistance to nitrosative stress and hypoxia. *MBio* 4:

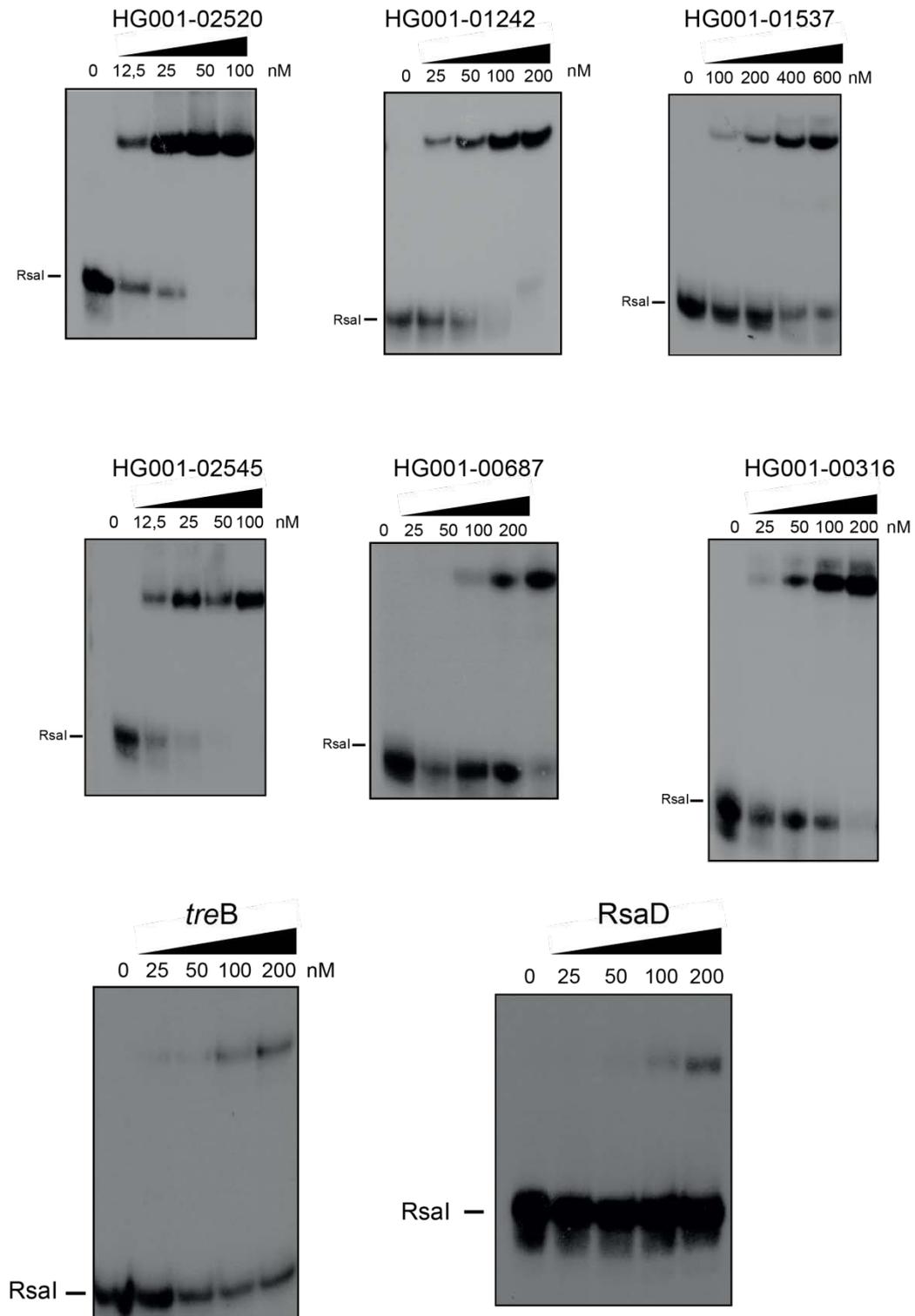
- Korea CG, Balsamo G, Pezzicoli A, Merakou C, Tavarini S, Bagnoli F, Serruto D & Unnikrishnan M (2014) Staphylococcal Esx proteins modulate apoptosis and release of intracellular *Staphylococcus aureus* during infection in epithelial cells. *Infect. Immun.* 82: 4144–4153
- Lalaouna D & Massé (2015) Identification of sRNA interacting with a transcript of interest using MS2-affinity purification coupled with RNA sequencing (MAPS) technology. *Genomics Data* 5: 136–138
- Li C, Sun F, Cho H, Yelavarthi V, Sohn C, He C, Schneewind O & Bae T (2010) CcpA mediates proline auxotrophy and is required for *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *J. Bacteriol.* 192: 3883–3892
- Majerczyk CD, Dunman PM, Luong TT, Lee CY, Sadykov MR, Somerville GA, Bodi K & Sonenshein AL (2010) Direct targets of CodY in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 192: 2861–2877
- Marchais A, Bohn C, Bouloc P & Gautheret D (2010) RsaOG, a new *staphylococcal* family of highly transcribed non-coding RNA. *RNA Biol.* 7: 116–9 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20200491>
- Marchais A, Naville M, Bohn C, Bouloc P & Gautheret D (2009) Single-pass classification of all noncoding sequences in a bacterial genome using phylogenetic profiles. *Genome Res.* 19: 1084–1092
- Miyakoshi M, Chao Y & Vogel J (2015) Cross talk between ABC transporter mRNAs via a target mRNA-derived sponge of the GcvB small RNA. *EMBO J.* 34: 1478–1492
- Møller T, Franch T, Udesen C, Gerdes K & Valentin-Hansen P (2002) Spot 42 RNA mediates discoordinate expression of the *E. coli* galactose operon. *Genes Dev.* 16: 1696–1706
- Novick RP (2003) Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol. Microbiol.* 48: 1429–1449
- Overgaard M, Johansen J, Møller-Jensen J & Valentin-Hansen P (2009) Switching off small RNA regulation with trap-mRNA. *Mol. Microbiol.* 73: 790–800
- Park JY, Kim JW, Moon BY, Lee J, Fortin YJ, Austin FW, Yang SJ & Seo KS (2015) Characterization of a novel two-component regulatory system, HptRS, the regulator for the hexose phosphate transport system in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 83: 1620–1628
- Pohl K, Francois P, Stenz L, Schlink F, Geiger T, Herbert S, Goerke C, Schrenzel J & Wolz C (2009) CodY in *Staphylococcus aureus*: A regulatory link between metabolism and virulence gene expression. *J. Bacteriol.* 191: 2953–2963
- Richardson AR, Somerville GA & Sonenshein AL (2015) Regulating the Intersection of Metabolism and Pathogenesis in Gram-positive Bacteria. *Microbiol. Spectr.* 3: 1–27

- Ruiz de los Mozos I, Vergara-Irigaray M, Segura V, Villanueva M, Bitarte N, Saramago M, Domingues S, Arraiano CM, Fechter P, Romby P, Valle J, Solano C, Lasa I & Toledo-Arana A (2013) Base Pairing Interaction between 5'- and 3'-UTRs Controls *icaR* mRNA Translation in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Genet.* 9:
- Sadykov MR, Olson ME, Halouska S, Zhu Y, Fey PD, Powers R & Somerville GA (2008) Tricarboxylic acid cycle-dependent regulation of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin synthesis. *J. Bacteriol.* 190: 7621–7632
- Seidl K, Bischoff M & Berger-Bächi B (2008a) CcpA mediates the catabolite repression of *tst* in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 76: 5093–5099
- Seidl K, Goerke C, Wolz C, Mack D, Berger-Bächi B & Bischoff M (2008b) *Staphylococcus aureus* CcpA affects biofilm formation. *Infect. Immun.* 76: 2044–2050
- Seidl K, Müller S, François P, Kriebitzsch C, Schrenzel J, Engelmann S, Bischoff M & Berger-Bächi B (2009) Effect of a glucose impulse on the CcpA regulon in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* 9: 95
- Seidl K, Stucki M, Ruegg M, Goerke C, Wolz C, Harris L, Berger-Bächi B & Bischoff M (2006) *Staphylococcus aureus* CcpA affects virulence determinant production and antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 1183–1194
- Somerville GA & Proctor RA (2009) At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in *staphylococci*. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 73: 233–248
- Tomasini A, Moreau K, Chicher J, Geissmann T, Vandenesch F, Romby P, Marzi S, Caldelari I (2017) The RNA targetome of *Staphylococcus aureus* non-coding RNA RsaA: impact on cell surface properties and defense mechanisms. *Nucleic Acids Research*
- Tree JJ, Granneman S, McAteer SP, Tollervey D & Gally DL (2014) Identification of Bacteriophage-Encoded Anti-sRNAs in Pathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Cell* 55: 199–213
- Ulrich M, Bastian M, Cramton SE, Ziegler K, Pragman AA, Bragonzi A, Memmi G, Wolz C, Schlievert PM, Cheung A & Döring G (2007) The staphylococcal respiratory response regulator SrrAB induces *ica* gene transcription and polysaccharide intercellular adhesin expression, protecting *Staphylococcus aureus* from neutrophil killing under anaerobic growth conditions. *Mol. Microbiol.* 65: 1276–1287
- Vitko NP, Spahich NA & Richardson AR (2015) Glycolytic dependency of high-level nitric oxide resistance and virulence in *Staphylococcus aureus*. *MBio* 6:
- Vogel J (2009) An RNA trap helps bacteria get the most out of chitosugars. *Mol. Microbiol.* 73: 737–741
- You Y, Xue T, Cao L, Zhao L, Sun H & Sun B (2014) *Staphylococcus aureus* glucose-induced biofilm accessory proteins, GbaAB, influence biofilm formation in a PIA-dependent manner. *Int. J. Med. Microbiol.* 304: 603–612

**Supplementary data**



**Figure S1: Analysis of the RsaI expression.** (A) Northern blot experiments showing the expression of RsaI in HG001 strain during growth phase. Total RNA was prepared after different hours of culture in BHI medium at 37°C. Hybridization against 5S rRNA was used as loading control. (B) Visualization of the CRE-site consensus defined in *Bacillus cereus* (Van der Voort *et al.*, 2008). Below is the sequence found in the 5' region of RsaI, in red are the conserved residues. (C) MS2-RsaI is correctly retained by affinity chromatography. Northern blot targeting RsaI and MS2-RsaI performed on RNAs purified after MS2 chromatography affinity; 1  $\mu$ g of total RNA was loaded on a 2% agarose gel. CE: crude extract; FT : Flow-Through; W : Washing; EL : Elution.



**Figure S2:** Gel retardation assays showing the formation of complexes between RsaI and several mRNAs and the sRNA RsaD. The 5' end-labeled of RsaI was incubated with increasing concentrations of target mRNAs or sRNAs.

## **Supplementary table S1: List of strains and plasmids**

<b>Strains</b>	<b>Relevant characteristics</b>	<b>Reference</b>
<b><i>E. coli</i></b>		
DC10B	dcm mutant ; used for cloning of plasmids which can be directly transformed in <i>S. aureus</i> cells	(1)
<b><i>S. aureus</i></b>		
HG001	Derivative of 8325-4, rsbU restored RN1, agr positive	(2)
RN4220	Restriction-deficient <i>S. aureus</i> strain	(3)
HG001 pCN51::P3	HG001 transformed with pCN51::P3	(4)
HG001 $\Delta$ rsal	Done by M. Beaume and P. François	This study
HG001 $\Delta$ rsal pCN51::P-rsal	HG001 $\Delta$ rsal transformed with pCN51::Prsal-rsal	This study
HG001 pCN51::MS2	HG001 transformed with pCN51::MS2	(4)
HG001pCN51::MS2-rsal	HG001 transformed with pCN51::MS2	This study
HG001 $\Delta$ ccpA	HG001 $\Delta$ ccpA::tet(M)	(5)
HG001 $\Delta$ codY	HG001 $\Delta$ codY::tet(M)	(6)
HG001 $\Delta$ ssrAB	Gift from T. Msadek	
HG001 $\Delta$ saeRS	Gift from T. Msadek	
HG001 $\Delta$ hptRS	Gift from T. Msadek	
<b><i>Plasmids</i></b>		
pCN51	Shuttle vector	(7)
pUC18::T7-rsal	rsal under T7 promoter	This study
pUC18::T7-rsal mut1,2,3,4	rsal mutated under T7 promoter	This study
pMAD-rsal		
pES-Rsal		
pES-Rsal mut5		
pUT7-icaR	T7 promoter-icaR allowing the in vitro T7 transcription of the full-length icaR mRNA	(8)
pT7-icaRSUBST		
pLUG220	pLUG ::PrpoB	(9)
pLUG220::glcU		This study

- (1) Monk IR, Shah IM, Xu M, Tan MW & Foster TJ (2012) Transforming the untransformable: Application of direct transformation to manipulate genetically *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *MBio* 3:
- (2) Herbert S, Ziebandt AK, Ohlsen K, Schäfer T, Hecker M, Albrecht D, Novick R & Götz F (2010) Repair of global regulators in *Staphylococcus aureus* 8325 and comparative analysis with other clinical isolates. *Infect. Immun.* 78: 2877–2889
- (3) Kreiswirth BN, Löfdahl S, Betley MJ, O'Reilly M, Schlievert PM, Bergdoll MS & Novick RP (2011) The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. *Nature* 305: 709–12
- (4) Tomasini A, Moreau K, Chicher J, Geissmann T, Vandenesch F, Romby P, Marzi S, Caldelari I (2017) The RNA targetome of *Staphylococcus aureus* non-coding RNA RsaA: impact on cell surface properties and defense mechanisms. *Nucleic Acids Research*
- (5) Seidl K, Stucki M, Ruegg M, Goerke C, Wolz C, Harris L, Berger-Bächi B & Bischoff M (2006) *Staphylococcus aureus* CcpA affects virulence determinant production and antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 1183–1194
- (6) Pohl K, Francois P, Stenz L, Schlink F, Geiger T, Herbert S, Goerke C, Schrenzel J & Wolz C (2009) CodY in *Staphylococcus aureus*: A regulatory link between metabolism and virulence gene expression. *J. Bacteriol.* 191: 2953–2963
- (7) Charpentier E, Anton AI, Barry P, Alfonso B, Fang Y & Novick RP (2004) Novel cassette-based shuttle vector system for gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 6076–6085
- (8) Ruiz de los Mozos I, Vergara-Irigaray M, Segura V, Villanueva M, Bitarte N, Saramago M, Domingues S, Arraiano CM, Fechter P, Romby P, Valle J, Solano C, Lasa I & Toledo-Arana A (2013) Base Pairing Interaction between 5'- and 3'-UTRs Controls *icaR* mRNA Translation in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Genet.* 9:
- (9) Romilly C, Lays C, Tomasini A, Caldelari I, Benito Y, Hammann P, Geissmann T, Boisset S, Romby P & Vandenesch F (2014) A Non-Coding RNA Promotes Bacterial Persistence and Decreases Virulence by Regulating a Regulator in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog.* 10:

## Supplementary table S2: List of oligonucléotides

Name	Usage	Sequences are 5'-end to 3'end
RsaI fow DIG	To produce RsaI probe	TAACAGGGGGAGCGATTA
RsaI rev DIG		TAATACGACTCACTATAGGGGCACGTGCTAGCCGACAATA
fow CcpA DIG	To produce CcpA probe	CGTGTTGTTAATGGGAACCAA
rev T7 CcpA DIG		TAATACGACTCACTATAGGGTACCACCAAGGAAAATAATACC
5'T7 IsaA	To produce IsaA mRNA	TAATACGACTCACTATAGGGGTGATATAGTGAGTACCGTT
3'rev isaA		TAAAAATGTATTTTTAATTAATAAAAAAAGTCTC
T7 5'UTR IcaR	To produce 5'UTR IcaR mRNA	TAATACGACTCACTATAGGGAAATATTTGTAATTGCCAATTAATTT
icaR 5'UTR rev		ATCATCAAGTGTGTACCGTCATACCCCTT
T7 3'UTR	To produce 3'UTR IcaR mRNA	TAATACGACTCACTATAGGGCTTTATATTTGTGAATGGTTAAGTTTGTCTTTGAAC
IcaR3term		AAAAAGCGCCTATGTCATGATTTACCATCA
T7 Fow 00974	To produce 00974 mRNA	TAATACGACTCACTATAGGGATGAATACCGAAAGGA
Rev 00974		TTTTAATGAATCTGTAGTCATAGC
T7 Fow 1537	To produce 1537 mRNA	TAATACGACTCACTATAGGGAAGACTTCCAGGGGAATCAATA
Rev 1537		AACTGGGTAATTTTTGTCTTTCT
T7 Fow 02520	To produce 02520 mRNA	TAATACGACTCACTATAGGGTAAGAAGTTAATAAATAGA
Rev 02520		CAATCACACTTCAATTGC
T7 01242 fow	To produce 1242 mRNA	TAATACGACTCACTATAGGGTATAATAAAATGTATAC
01242 REV		CTTTCGAAATAATTGTTAC
5' fruK A	To produce FruK mRNA	TAATACGACTCACTATAGGGAAGATTAATCATCCTAATTAGGCAA
3' fruK A		CTAACTTGTGTATCTTGTAAAATCTT
5' 00687	To produce HG001_00687 mRNA	TAATACGACTCACTATAGGGTGAGTATATTTTAGGAGGA
3' 00687		AAAATTTTATAATTATGTTAATCTTATTT
5' 02545	To produce HG001_02545 mRNA	TAATACGACTCACTATAGGGAAAGGTTACCCCGAA
3' 02545		TGCTTAATTGATAGAGATGTTATACG
5' 00316	To produce HG001_00316 mRNA	TAATACGACTCACTATAGGGATATAAGCTTTTGTATG
5' 00316		CACTCTTTAATACTTTACCGTT
5' treB	To produce treB mRNA	TAATACGACTCACTATAGGGTAAGACATTAAGGGAGTGAA
3' treB		TGGTATAAAAATATCCCCC
<i>glu2</i> toeprint	Perform toeprint on <i>glu_2</i>	AGCGTCGTACCACGA
<i>fn3K</i> toeprint	Perform toeprint on <i>fn3K</i>	AAATGTATCCGTATC

### Cloning

Name	Usage	Sequences are 5'-end to 3'end
SphI-RsaI rev	Clonage <i>rsal</i> and its promoteur in pLUG220	CGCGCATGCGAATAACAATACAACCTGAAGA
pstI- <i>rsal</i> for	Clonage <i>rsal</i> and its promoteur in pLUG220	CGCCTGCAGGACAGCCACCTCCTAAAAG
Mut4 <i>rsal</i> fowdeletion	To produce mut4 quickchange	TTACATCACAACATCCTATTTGTGCGCTAGCAC
Mut4 <i>rsal</i> revdeletion		GTGCTAGCCGACAAATAGGATGTTGTGATGTAA

## Transcriptomic data

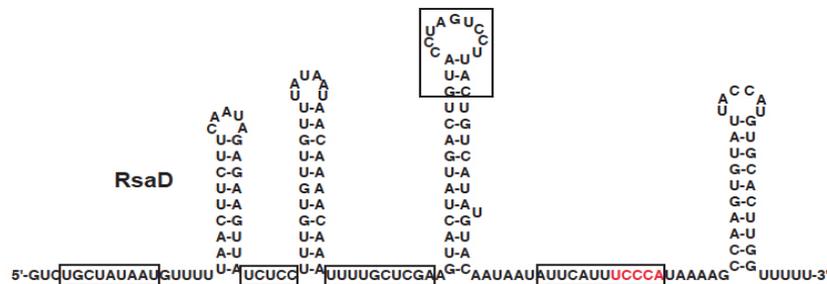
Id	gene	product	FoldChange $\Delta$ rsal/compl	pvalue
HG001_02423	-	Acid shock protein	0,256	4,63E-39
HG001_01846	-	Bacteriophage holin	0,322	4,00E-33
HG001_00184	ldh1	L-lactate dehydrogenase 1	0,35	2,21E-24
HG001_01867	-	hypothetical protein	0,352	3,27E-33
HG001_01853	-	hypothetical protein	0,363	9,72E-41
HG001_01863	-	hypothetical protein	0,363	6,26E-35
HG001_01854	-	hypothetical protein	0,365	5,25E-33
HG001_01866	-	Phage capsid family protein	0,366	4,75E-28
HG001_01849	atl_3	Bifunctional autolysin precursor	0,374	1,21E-26
HG001_01864	-	Phage gp6-like head-tail connector protein	0,376	2,16E-30
HG001_01855	-	Prophage endopeptidase tail	0,383	6,43E-33
HG001_01859	-	Phage protein	0,386	4,19E-29
HG001_01856	-	Phage tail protein	0,386	2,77E-20
HG001_00055	-	Oleate hydratase	0,387	5,97E-23
HG001_01852	-	hypothetical protein	0,39	1,34E-15
HG001_01861	-	hypothetical protein	0,393	8,67E-24
HG001_01865	-	hypothetical protein	0,393	9,33E-19
HG001_01857	-	hypothetical protein	0,394	1,03E-35
HG001_01850	-	hypothetical protein	0,396	5,72E-22
HG001_02513	abgT	p-aminobenzoyl-glutamate transport protein	0,406	2,78E-29
HG001_01862	-	hypothetical protein	0,407	3,40E-24
HG001_00544	adh	Alcohol dehydrogenase	0,413	5,34E-20
HG001_01860	-	Phage major tail protein 2	0,415	1,98E-23
HG001_01858	-	hypothetical protein	0,419	3,06E-16
HG001_01848	-	hypothetical protein	0,422	4,15E-25
HG001_02054	-	hypothetical protein	0,425	1,05E-14
HG001_01847	-	hypothetical protein	0,429	8,42E-17
HG001_01903	-	hypothetical protein	0,43	2,16E-16
HG001_01871	-	Phage terminase large subunit	0,433	7,27E-16
HG001_01885	-	hypothetical protein	0,434	6,14E-09
HG001_01870	-	Phage portal protein%2C SPP1 Gp6-like	0,442	4,00E-21
HG001_01851	-	hypothetical protein	0,445	7,19E-11
HG001_00223	-	hypothetical protein	0,452	1,04E-09
HG001_01371	-	Phage capsid family protein	0,464	6,45E-08
HG001_01902	-	Phage antirepressor protein KiiAC domain protein	0,469	7,20E-10
HG001_00227	esxA	Virulence factor EsxA	0,472	3,64E-16
HG001_01892	-	hypothetical protein	0,473	7,40E-09
HG001_01893	-	hypothetical protein	0,479	9,89E-11
HG001_02520	-	hypothetical protein	0,479	2,41E-07
HG001_01872	-	Terminase small subunit	0,481	6,43E-10
HG001_02756	-	RsaG	0,484	2,43E-14
HG001_00249	focA	putative formate transporter 1	0,485	5,46E-09
HG001_00550	-	putative ABC transporter permease protein	0,487	4,55E-10
HG001_00169	pfiB	Formate acetyltransferase	0,491	2,91E-08
HG001_01869	-	Phage Mu protein F like protein	0,493	2,76E-10
HG001_00170	pfiA	Pyruvate formate-lyase-activating enzyme	0,495	7,70E-07
HG001_00911	qoxA	putative quinol oxidase subunit 2 precursor	0,495	1,43E-06
HG001_01880	-	hypothetical protein	0,496	1,82E-07
HG001_01899	-	hypothetical protein	0,5	1,61E-08

ID	gene	product	FoldChange DRsal-Comp	pvalue
HG001_02644	fda	Fructose-bisphosphate aldolase class 1	4,276	2,70E-81
HG001_01144	miaB	(Dimethylallyl)adenosine tRNA methyltransferase MiaB	4,031	3,52E-56
HG001_01146	-	Thiamine-precursor transporter protein (ThiW)	3,385	2,50E-58
HG001_01435	gnd	6-phosphogluconate dehydrogenase%2C decarboxylating	3,194	1,49E-46
HG001_01648	tyrS	Tyrosine--tRNA ligase	3,149	4,95E-24
HG001_01145	-	hypothetical protein	3,133	4,17E-27
HG001_01340	ebpS	Elastin-binding protein EbpS	2,937	3,56E-43
HG001_01202	tkt	Transketolase	2,766	1,34E-21
HG001_00482	hchA	Molecular chaperone Hsp31 and glyoxalase 3	2,678	7,33E-18
HG001_01191	-	Putative phosphatase	2,656	9,77E-56
HG001_00271	lplJ_1	Lipoate-protein ligase LplJ	2,591	2,26E-18
HG001_01764	ydeN	Putative hydrolase YdeN	2,443	3,59E-12
HG001_01434	-	Glyoxalase-like domain protein	2,385	2,02E-24
HG001_01658	aroF	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	2,335	8,34E-22
HG001_00270	-	hypothetical protein	2,327	1,43E-12
HG001_02674	arcA	Arginine deiminase	2,238	4,22E-10
HG001_02673	arcB	Ornithine carbamoyltransferase%2C catabolic	2,233	6,80E-10
HG001_02672	arcD	Arginine/ornithine antiporter	2,209	2,54E-09
HG001_02638	panE_2	2-dehydropantoate 2-reductase	2,164	9,92E-08
HG001_02408	yhfP	Putative quinone oxidoreductase YhfP	2,153	1,53E-13
HG001_02670	arcR	HTH-type transcriptional regulator ArcR	2,114	5,82E-09
HG001_02671	arcC2	Carbamate kinase 2	2,1	1,02E-07
HG001_02684	-	N-carbamoylsarcosine amidase	2,083	1,01E-15
HG001_02121	tenA	Putative thiaminase-2	2,074	8,30E-18
HG001_02172	yhfK	putative sugar epimerase YhfK	2,035	3,37E-28
HG001_00269	ymdB	O-acetyl-ADP-ribose deacetylase	2,009	5,56E-11

Target	Product	Base-pairing prediction	Fold change Arsal/Complemented
HG001_02644	fda Fructose-bisphosphate aldolase class 1	-12 GGAGUGGAAAGUAUG-AAUAAAAGACAAUUAGAAAAAUGA +27 109 UCUUUCUUUCAUUCAUUAUUUAUAACU-UCUACAACACU 71	4,276
HG001_01144	miaB (Dimethylallyl) adenosine tRNA methyltransferase	11 AAAUAGAAAGGAUUUUGUAAAAGUGAACGAGAACAAGAAAAGCAAGUUCUGUAGAUGUU +70 107 UUUUAUCUUUCCUUU--CAUU-CAUUAAUUUAUAACU-----UCUACAA 75	4,031
HG001_01202	tkt Transketolase	GUAUUUGAUAAA-AUUGAAGAAGGGAAGAU 99 CAUUCAUUAUUUAUAACUUCUACAACACUA 70	2,766

### III.3. Etude de la fonction de RsaD

RsaD est un ARNnc long de 177 nucléotides. Sa structure secondaire montre quatre motifs en tige-boucle comprenant un terminateur Rho-indépendant. RsaD présente une séquence riche en cytosines, susceptible de se lier à la séquence SD d'ARNm cibles pour activer ou réprimer leur traduction (figure 29). Les travaux de Geissmann *et al* 2009, montrent que RsaD est exprimé en phase stationnaire de croissance, en milieu riche. Bien que conservé dans toutes les souches de *S. aureus*, son expression augmente de façon significative dans les souches exprimant le facteur  $\sigma$ B.



**Figure 29 : Structure secondaire de RsaD.** Les nucléotides encadrés sont conservés chez les staphylocoques. Cette structure a été prédite par bioinformatique utilisant RNAfold (Geissmann *et al*, 2009). Les nucléotides marqués en rouge, représentent le motif riche en C.

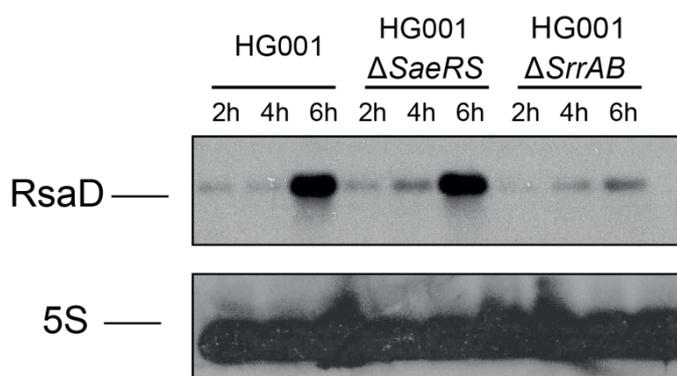
#### III.3.a - L'expression de RsaD dépend du TCS SrrAB

La recherche de séquences consensus, reconnues par des facteurs de transcription dans la région promotrice de RsaD, a mis en évidence une région en -132, similaire à la région retrouvée pour RsaE (figure 30). Celle-ci a été montrée comme étant le site de reconnaissance du facteur de régulation ResD chez *B. subtilis* et son homologue SrrA chez *S. aureus*, pour induire l'expression, respectivement, de RoxS et de RsaE, en réponse à un stress NO ou en anaérobiose (Durand *et al*, 2015).



**Figure 30 :** Région consensus de fixation de SrrA (en bleu), retrouvée dans la région promotrice de *rsaE* et de *rsaD* chez *S. aureus*.

Disposant de la souche délétée des gènes *srrA* et *srrB* (HG001 $\Delta$ *srrAB*), j'ai comparé l'expression de RsaD dans ces deux souches par des expériences de Northern blot (**figure 31**). La souche mutante, HG001 $\Delta$ *saeRS* m'a permis de contrôler que l'expression de RsaD était similaire à la souche sauvage et que RsaD ne répondait pas au système SaeRS. Les souches mutantes HG001 $\Delta$ *srrAB* et HG001 $\Delta$ *saeRS* ne présentent pas de phénotype ou de défaut de croissance particulier (résultats non montrés).



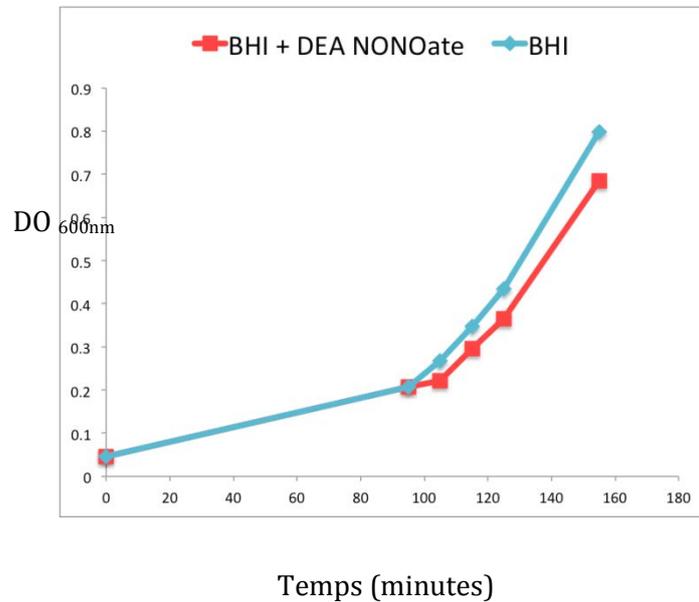
**Figure 31 : Expression de RsaD dépend du système à deux composants SrrAB.** Les ARN totaux ont été préparés à partir d'échantillons de cultures prélevés à 2h, 4h, et 6h de croissance. L'électrophorèse a été réalisée sur gel d'agarose 1%, contenant 20 mM de guanidium thiocyanate en utilisant 10  $\mu$ g d'ARN total. Après transfert sur membrane de nitrocellulose, les ARN ont été détectés en utilisant des sondes DIG. La détection de l'ARNr 5S a servi de contrôle de charge.

Cette expérience montre que l'expression de RsaD est détectable à 6h de culture dans la souche sauvage et mutante HG001 $\Delta$ *saeRS*. En revanche, dans la souche mutante HG001 $\Delta$ *srrAB*, l'expression de RsaD est totalement inhibée. Ces résultats suggèrent que l'activation de RsaD est dépendante du système SrrAB. Le système SrrAB répondant aux stress NO et anaérobie, j'ai donc étudié l'expression de RsaD dans ces deux conditions.

### **III.3.b - Activation de l'expression de RsaD lors d'un stress NO**

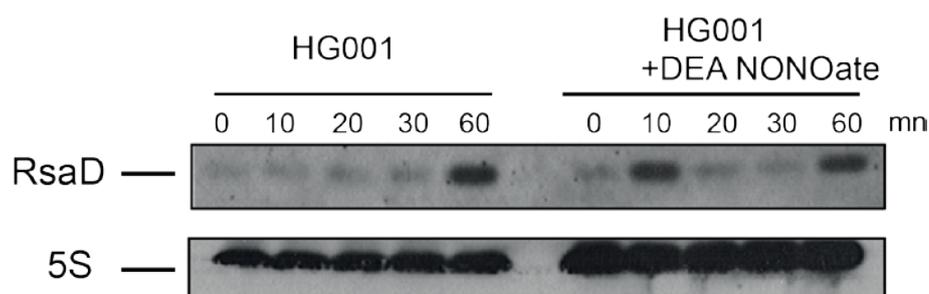
L'ajout de Diéthylamine NONOate (DEA NONOate) dans les cultures de *S. aureus*, libère de l'oxyde nitrique (NO) et produit un stress pour les cellules, ce qui mime un stress NO lors de la phagocytose des bactéries par les macrophages. Le DEA NONOate est un donneur de NO libérant sans délai toute sa charge en 1 à 3,5 min à pH 7,4 et à 30°C (Griveau *et al*, 2007), sa demie vie est donc très courte. L'expérience consiste à cultiver les cellules jusqu'en début de phase exponentielle (DO600nm de 0,2) puis d'ajouter 100  $\mu$ M de DEA NONOate, de mesurer la croissance des bactéries ainsi que

d'extraire les ARN totaux à différents temps pour étudier l'expression de RsaD dans ces conditions. La croissance des bactéries ayant subi un stress NO est légèrement ralentie dès l'ajout du DEA NONOate (figure 32).



**Figure 32 :** Croissance de *S. aureus* HG001 en milieu BHI avec et sans stress NO. Deux flasques contenant du milieu BHI ont étéensemencées avec 1/100 d'une pré-culture sur la nuit de la souche sauvage HG001. A  $DO_{600nm}$  de 0,2, en début de phase exponentielle, 100  $\mu$ M de DEA NONOate ont été ajoutés à l'une des cultures.

Les ARN totaux ont été extraits à partir de prélèvements réalisés toutes les 10 min après induction du stress au NO sur une période d'une heure. Dans les conditions de culture sans NONOate, RsaD commence à être exprimé à partir de 60 min après le début de l'expérience soit à une  $DO_{600nm}$  0,8 et 2,5h de croissance. En présence de NONOate, on observe une induction de RsaD 10 min après le stress. Ensuite l'expression de RsaD diminue rapidement pour réapparaître dès 60 min comme cela est observé pour les cultures n'ayant pas subi le stress. La détoxification du NO par les bactéries ainsi que la durée de vie courte du produit utilisé, peut expliquer ce phénomène (figure 33).



**Figure 33 : Activation de l'expression de RsaD en conditions NO.** Les ARN totaux ont été préparés à partir d'échantillons de cultures prélevés toutes les 10 min. L'électrophorèse a été réalisée sur gel d'agarose 1%, contenant 20 mM de guanidium thiocyanate en utilisant 10 µg d'ARN total. Après transfert sur membrane de nitrocellulose, les ARN ont été détectés en utilisant des sondes DIG. La détection de l'ARNr 5S a servi de contrôle de charge.

Les résultats des expériences en conditions d'anaérobiose n'ont pas montré de changement de l'expression de RsaD (résultat non montré).

### **III.3.c - Recherche des cibles directes de RsaD par l'approche MAPS**

Afin de rechercher les cibles directes de RsaD, j'ai réalisé des expériences de MAPS dont le principe est décrit dans le chapitre II Objectif. RsaD a été fusionné à l'étiquette MS2 à son extrémité 5' et est exprimé dans la souche mutante  $\Delta$ *rsaD* sous le promoteur P3. Les ARN ont été extraits des éluats obtenus après passage sur la chromatographie d'affinité puis séquencés. Les résultats obtenus sont préliminaires et devront être reproduits. Parmi les ARNm identifiés, une liste de 23 candidats, présentant les taux d'enrichissement les plus élevés a été établie. Les prédictions d'appariements entre RsaD et les 23 cibles sont présentées dans le **tableau 6**.

**Tableau 6 : prédiction des appariements entre RsaD et les ARNm cibles retrouvés par les expériences de MAPS.**

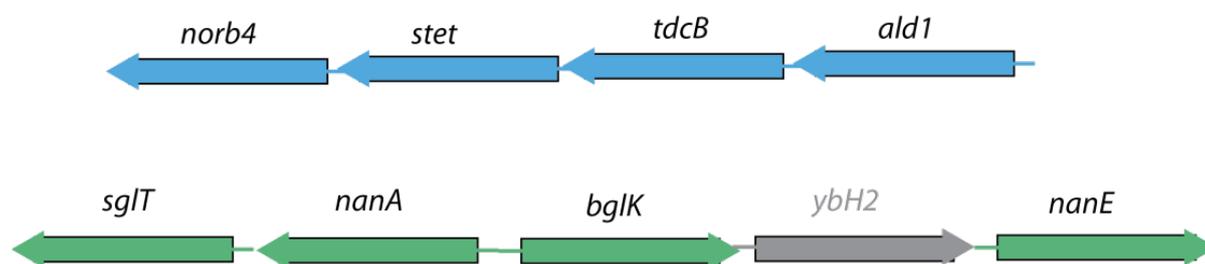
Les prédictions d'appariements ont été réalisées en utilisant le logiciel IntraRNA. Pour chaque appariement représenté, les nucléotides du haut appartiennent à la séquence de l'ARNm cibles. Les nucléotides du bas, ceux de RsaD. Les  $\Delta G$  sont donnés par IntraRNA.

Target	Product	Base-pairing prediction	Fold change MS2-Rsal/MS2
HG001_00258	<i>sgtI</i> Sodium/glucose cotransporter	1175 UAUACUUAAUUGCUUCUAAUUCAAAUGACUUUAUGGGA 1211 155 AUGUGAAC---CGAA-----AAUACCCU 136	51,67
HG001_00259	<i>nanA</i> N-acetylneuraminase	171 GAGCAGAA 178 81 CUCGUUUU 74	49,42
HG001_01296	<i>steT</i> Serine/threonine exchanger	1272 GCACUUGGU 1280 154 UGUGAACCG 146	26,85
HG001_01297	<i>tdcB</i> L-threonine dehydratase, catabolic	761 UGAAGUAGUUA--AACAUU-DAGUAGAU 785 28 ACUUCUCAAUUUUUGUAAUAUCGUCUG 1	24,62
HG001_00185	<i>ptsG_2</i> PTS system glucose-specific EIICBA component	1051 AGCAUUUAUGUGGCAGAC 1069 15 UUGUAA-----UAUCGUCUG 1	20,45
HG001_01295	<i>norB_4</i> Quinolone resistance protein	1115 AGGACUAGG 1123 107 UCCUGAUCC 99	20
HG001_00262	<i>nanE</i> Putative N-acetylmannosamine-6-phosphate 2-epimerase	133 AAGACAUUUUAGCA 146 17 UUUUGUAAUAUCGU 2	17,87

Target	Product	Base-pairing prediction	Fold change MS2-Rsal/MS2
HG001_00260	<i>bgk</i> Beta-glucoside kinase	592 UGUUUGAAGCAGCTGAAGAAGGUGAUGAUUUUGCAAAACAAAUAUUGAAUUGAGU 645 63 AUAUAUUUGUUGG--UUUCCUCUAUUGAAGAG-----AUAACUUUCUUCA 20	15.86
HG001_01629	<i>ald2</i> Alanine dehydrogenase 2	560 AGGACUAGGUGCA 572 107 UCCUGAUCCAUGU 95	12.28
HG001_00484	<i>putative epimerase/dehydratase</i>	862 CACGUGGCGA--AUGGGGAUUUGA 883 153 GUGAACCGAAAAUACCCUUU-ACU 131	9.95
HG001_01298	<i>ald1</i> Alanine dehydrogenase 1	399 GCA-GGUCA-ACGCUCAGCAAUUUUGGGAG 426 164 UGUACCAUUAUGUGAACCGAAAAUACCCUU 135	9.31
HG001_01009	<i>hly</i> Alpha-hemolysin precursor	768 UGGUCAUACACU 779 161 ACCAUUAUGUGA 150	7.31
HG001_00371	<i>mcca</i> O-acetylserine dependent cystathionine beta-synthase	200 UGGUAUACA---GGCA--UA-GGG 218 161 ACCAUUAUGUGAACCGAAAAUACCC 137	6.38
HG001_01049	<i>pyrB</i> Bifunctional protein PyrB	593 UCGAGCAGAUUUUGUU 608 83 AGCUCGUUUUAAACAA 68	6.27
HG001_01926	<i>murE_2</i> UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate--2%2C6-diaminopimelate ligase	1786 GGUACACUUGGU 1797 157 UUAUGUGAACCG 146	6

Target	Product	Base-pairing prediction <a href="#">XXXXXXXXXX</a>	Fold change MS2-Rsal/MS2
HG001_00386	<a href="#">treB</a> PTS system trehalose-specific EIIBC component	639 <a href="#">ACGUGGAACU-UUUUGGCUU</a> 658 164 <a href="#">UGUACCAUUUUGUGAACCGAA</a> 144	5.81
HG001_02247	<a href="#">alsS</a> Acetolactate synthase	90 <a href="#">UACAU-GUAAUACACAUCUAUCAUCACAUUU</a> <a href="#">GAAAGGGAUUGAAUUAU</a> 136 165 <a href="#">GUGUACCAUUUUGUGAACCG</a> ----- <a href="#">AAAAUAACCCUUUACUUUA</a> 127	5.32
HG001_00387	<a href="#">treA</a> Trehalose-6-phosphate hydrolase	372 <a href="#">GUGGUAUGCA--UGGAAG-UAUGAUUCUGAGACAGAU</a> <a href="#">GAAAUUUU</a> 416 162 <a href="#">UACCAUUUUGUGAACCGAAAAUACCC</a> ----- <a href="#">UUUACUUUAUUA</a> 123	5.24
HG001_00372	<a href="#">mccB</a> Cystathionine gamma-lyase	230 <a href="#">AGCAAUCA--GUGCAUUUUUUGUCUGUUGGACAAAAGGAGAU</a> 269 80 <a href="#">UCGUUUUAAA</a> <a href="#">CAAAACAUAUAUUUGU-UGUGUUUCCUCUA</a> 40	5.11
HG001_01016	<a href="#">arcC1</a> Carbamate kinase 1	432 <a href="#">GGAUUUAUUUUGUGAAGAUUCUGGAAAGAGGAUU</a> 467 160 <a href="#">CCAUUAUGUGAACCGAAAAUAC--CCUUUACUUUA</a> 127	4.75
HG001_00388	<a href="#">treR_2</a> Trehalose operon transcriptional repressor	186 <a href="#">CAUGGUAAGGGUCACUUUGCAUUUAUCAGGAGGU</a> 220 163 <a href="#">GUACCAUUU--GUGAACCGAAAAUAC-CCUUUA</a> 133	4.56
HG001_02246	<a href="#">aldC_1</a> Alpha-acetolactate decarboxylase	20 <a href="#">ACAUGGU--ACAUUAGGCACAUUAUUGGCAG--GAUUUAU</a> 56 164 <a href="#">UGUACCAUUUUGUGAACCGA--AAAUACCCUUUACUUUAUU</a> 123	4.47
HG001_01601	<a href="#">thrS</a> Threonine--tRNA ligase	262 <a href="#">UAUUGGUUAUUGUUAAAAUUUGGU</a> 284 165 <a href="#">GUGUACCAUUUUG---</a> <a href="#">UGAAGGA</a> 146	4.12

De manière surprenante, la plupart des appariements prédits entre RsaD et les ARNm cibles se trouve dans la région codante des gènes. Il est intéressant de noter également que quelques ARNm sont aussi retrouvés dans la liste de MAPS de RsaI comme *treAB*, *norB*, *ald1*, *aldC1* et *thrS*. La partie de RsaD s'apparie quant à elle avec les ARNm *ptsG*, *tdcB* et *nanE*. Les régions en simple brin au début de l'extrémité 5' des ARNnc sont souvent requises pour la régulation de gènes cibles (Guillier & Gottesman, 2008 ; Wagner & Romby, 2015). Plusieurs ARNm ont particulièrement attiré mon attention car ils sont localisés dans une même région du génome de la souche HG001, dont certains sont exprimés sous forme d'opéron (figure 34).



**Figure 34 : représentation schématique de deux régions du génome de *S. aureus* (souche HG001).** Les gènes *ald1*, *tdcB* et *stet* (en bleu) formeraient un opéron d'après ten Broeke-Smits *et al*, (2010) dans la souche de *S. aureus* MSSA476. Les gènes *sglT*, *nanA*, *bgIK*, et *nanE* (vert) sont localisés ensemble dans le génome de la souche HG001.

#### Parmi les ARNm de la liste MAPS on retrouve :

*nanA* code la N-acétyl neuraminatase impliquée dans le catabolisme de l'acide sialique.

*stet*, *tdcB*, et *mccA/B* codent des protéines impliquées dans le catabolisme et l'entrée d'acides aminés. Plus particulièrement, la protéine TdcB est une enzyme (L-thréonine déshydratase) intervenant dans l'anaérobiose pour cataboliser la thréonine.

*ptsG*, *sglT*, et *treAB* codent des transporteurs du système PTS spécifique de l'entrée du glucose (*ptsG*, *sglT*) et de l'entrée du tréhalose (*treAB*).

*ald1/ald2*, et *mureE* codent des enzymes impliquées dans la synthèse du peptidoglycane dont deux alanines déshydrogénases.

*norB* code une protéine impliquée dans les pompes à efflux des quinolones.

Ces résultats préliminaires montrent d'ores et déjà que RsaD est impliqué dans la régulation du métabolisme carboné, mais aussi le remodelage de la paroi bactérienne.

L'approche MAPS ne nous permet pas néanmoins de définir si RsaD active ou réprime l'expression de ces ARNm enrichis.

### III.3.d - Analyse des fonctions biologiques régulées par RsaD.

Des analyses de protéomiques comparatives ont alors été réalisées sur la souche sauvage et la souche mutante  $\Delta$ rsaD (délétée du gène *rsaD*). L'analyse de l'expression différentielle des protéines dans les deux conditions apporte une indication sur les voies régulées par RsaD, le mécanisme de régulation (activation ou répression), et/ou les cibles potentielles de cet ARNnc même si l'effet peut être indirect. Ce travail a été réalisé en collaboration avec P. Hammann de la plateforme protéomique (IBMC). Les expériences ont été réalisées en triplicats sur les protéines totales extraites à 6h de culture en milieu riche. Les protéines montrant une différence d'expression significative entre les souches sauvage et mutante sont représentées dans le tableau 7.

Accession Number	Name	Spectral Count			MS1 Label-Free (auto)				MS1 Label-Free (manuel)			
		WT-rsaD	Del-rsaD	RATIO	WT-rsaD	Del-rsaD	RATIO		WT-rsaD	Del-rsaD	RATIO	
		Moy #Spc	Moy #Spc	Del/WT	Moy Area	Moy Area	p-value	Del/WT	Moy Area	Moy Area	Del/WT	
HG001_00607	SarX transcriptional regulator	0	10,00	MUT only	5,14E+05	2,81E+06	0,00178	5,46	3,10E+05	1,19E+06	4,05	>5
HG001_00099	Alcohol dehydrogenase	0,67	5,00	7,50	1,44E+05	2,43E+05	0,25899	1,69	6,84E+04	1,25E+05	1,84	2-5
HG001_02351	Putative uncharacterized protein	1,00	5,67	5,67	4,32E+05	6,51E+05	0,18482	1,51	4,08E+04	7,15E+04	1,75	1.5-2
HG001_00180	Putative uncharacterized protein	2,33	12,33	5,29	6,08E+05	6,91E+05	0,62692	1,14	1,36E+05	2,83E+05	2,07	
HG001_00898	Staphopain B	1,33	6,67	5,00	4,52E+05	4,82E+05	0,89982	1,07	1,16E+05	3,00E+05	2,75	
HG001_02062	AgrA accessory gene regulator	4,33	9,00	2,08	6,59E+05	1,01E+06	0,01705	1,53	3,18E+05	4,68E+05	1,50	
HG001_00870	Serine protease	3,00	6,00	2,00	8,41E+05	8,08E+05	0,53376	0,96	8,69E+04	1,34E+05	1,53	

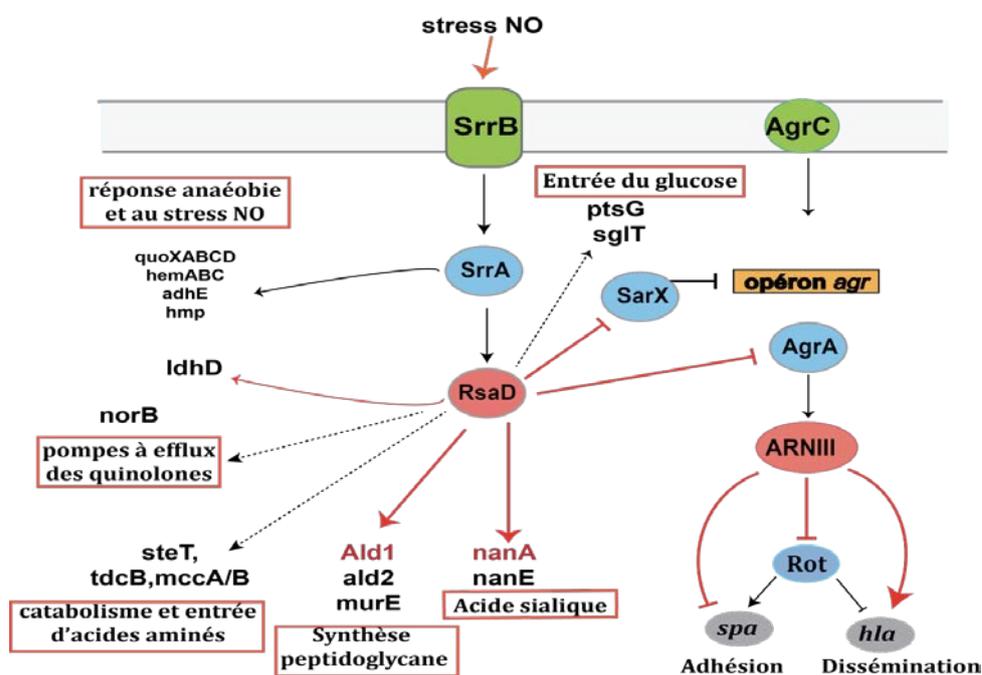
  

Accession Number	Name	Spectral Count			MS1 Label-Free (auto)				MS1 Label-Free (manuel)			
		WT-rsaD	Del-rsaD	RATIO	WT-rsaD	Del-rsaD	RATIO		WT-rsaD	Del-rsaD	RATIO	
		Moy #Spc	Moy #Spc	Del/WT	Moy Area	Moy Area	p-value	Del/WT	Moy Area	Moy Area	Del/WT	
HG001_00259	NanA N-acetylneuraminidase	14,00	0	WT only	9,39E+05	7,60E+04	1,07E-05	0,08	4,42E+05	1,10E+05	0,22	<0.2
HG001_00060	Spa Immunoglobulin G-binding protein	17,67	2,33	0,13	2,07E+06	7,48E+05	0,05018	0,36	1,52E+05	4,63E+04	0,30	0.2-0.5
HG001_01684	Rot transcriptional regulator	5,67	0,33	0,06	4,95E+05	5,97E+05	0,66309	1,21	1,92E+05	8,97E+04	0,43	0.5-0.67
HG001_01298	Ald1 Alanine dehydrogenase	25,33	5,67	0,22	2,35E+06	7,96E+05	0,05145	0,34	3,91E+05	1,48E+05	0,38	
HG001_01297	TdcB L-threonine dehydratase catabolic	23,33	6,33	0,27	2,26E+06	5,82E+05	0,01959	0,26	3,76E+05	1,02E+05	0,29	
HG001_01015	ArgF Ornithine carbamoyltransferase	12,00	5,00	0,42	1,21E+06	7,99E+05	0,03595	0,66	1,65E+05	8,00E+04	0,49	

**Tableau 7 : Représentation des principales protéines montrant une variation significative entre la souche sauvage HG001 et mutante  $\Delta$ rsaD.** Les protéines représentées dans ce tableau ont été validées par deux méthodes ; le « spectral count » (calcul du nombre de peptides) et le « MS1 label free » (calcul des aires des pics correspondants aux peptides). Les aires des pics d'éluion des peptides ont aussi été mesurés et validés manuellement pour chacun des échantillons. Les triplicats de chaque condition ont montrés une grande reproductibilité. La liste complète des protéines montrant un différentiel d'expression significatif, mais qui n'a été validée que par une seule des deux méthodes d'analyse, est présentée en annexe 1.

D'après les résultats obtenus, RsaD réprimerait fortement la synthèse du facteur de transcription SarX, d'une alcool déshydrogénase, de la protéase appelée la staphopain B, et de manière plus faible la synthèse du facteur de transcription AgrA et d'une sérine

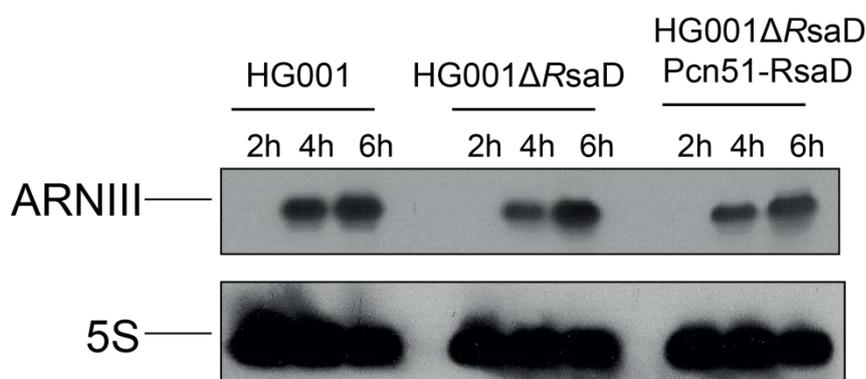
protéase. La seconde partie du tableau montre les protéines dont la synthèse serait activée par RsaD. Parmi celles-ci, on trouve les protéines NanA, Ald1 et TcdB dont les ARNm ont également été enrichis dans les expériences MAPS, ainsi que la protéine A et le facteur de transcription Rot. La liste complémentaire, présentée en annexe 1, montre que RsaD activerait également deux lactates déshydrogénases ainsi que la protéine d'adhésion Emp. Ces résultats suggèrent que RsaD exercerait une action dans la virulence en réprimant les protéases et en activant les facteurs d'adhésion. La combinaison de l'approche MAPS et protéomique sont en faveur d'une activation directe par RsaD de la synthèse de NanA, Ald1 et TcdB au niveau post-transcriptionnel. Bien que les sites d'interaction n'ont pas encore été déterminés avec précision, des appariements ont été prédits dans les régions codantes des ARNm suggérant que la fixation de RsaD pourrait stabiliser les ARNm en masquant un site de coupure par une endoribonucléase (Papenfort *et al*, 2013). Bien qu'hypothétique, je propose un modèle qui donne une idée du rôle régulateur de RsaD et de son impact sur la virulence de *S. aureus*. Ainsi, si on regarde la dynamique de régulation sur le schéma, on suppose que l'activation de *spa* et de *rot* est probablement indirecte à travers la répression de AgrA (figure 35).



**Figure 35: Modèle préliminaire des voies régulées par RsaD.** Les cercles rouges représentent les ARNnc, les cercles bleus, les facteurs de transcription. Les flèches pleines rouges indiquent une régulation traductionnelle, les flèches noires, une régulation transcriptionnelle. Les flèches en pointillés montrent des interactions potentielles avec RsaD, d'après les résultats du MAPS. Les cibles Ald1 et NanA sont représentées en rouge car elles ont été retrouvées dans les expériences de MAPS et de protéomique.

Ceci se corrèle avec le fait que des appariements ont été prédits entre l'ARNm *agrA* et RsaD mais pas avec les ARNm *spa* et *rot*. Si le taux de AgrA diminue, on devrait s'attendre à ce que le taux de l'ARNIII soit également diminué.

Cependant, les expériences de Northern blot que j'ai réalisées dans les souches sauvage, mutante  $\Delta$ *rsaD* et complétée avec un plasmide exprimant RsaD ne montrent pas de variation significative (figure 36).



**Figure 36 :** Expression de l'ARNIII en fonction de RsaD. Les ARN totaux ont été préparés à partir d'échantillons de cultures prélevés à 2h, 4h, et 6h de croissance sur les souches sauvage, mutante  $\Delta$ *rsaD* et complétée HG001  $\Delta$ *rsaD*::pcn51-*rsaD*. L'électrophorèse a été réalisée sur gel d'agarose 1%, contenant 20 mM de guanidium thiocyanate en utilisant 10  $\mu$ g d'ARN total. Après transfert sur membrane de nitrocellulose, les ARN ont été détectés en utilisant des sondes DIG. La détection de l'ARNr 5S a servi de contrôle de charge.

Je n'ai également pas réussi à visualiser les ARNm *agrA* et *sarX* ni par Northern blot, ni par l'approche MAPS. Il sera important de valider ces résultats par une analyse plus sensible, soit par RT-qPCR, soit par séquençage haut débit et de montrer une interaction directe des ARN par gel retard. SarX régule la formation des biofilms et réprime l'opéron *agr* qui répond à la densité cellulaire (Manna & Cheung, 2006). Si RsaD réprime à la fois SarX et AgrA, cela peut signifier que RsaD tend à réprimer le facteur de transcription AgrA sans pour autant affecter tout l'opéron *agr*. De plus, la variation du taux de protéines est beaucoup plus élevée pour SarX que pour AgrA. Le fait que l'ARNIII ne varie pas dans la souche complétée, où RsaD est fortement exprimé, montre que la répression de RsaD sur AgrA a un impact minime sur l'ARNIII. Bien qu'il soit difficile d'apporter une explication rationnelle au fait que la répression de SarX, n'active pas AgrA, donc l'expression des facteurs de virulence, et que les résultats soient quelque peu contradictoires, ils montrent néanmoins que RsaD est au centre de réseaux complexes qui relie le métabolisme carboné, la réponse aux stress, et la virulence.

De plus, les fonctions de SarX ne sont pas toutes connues, et RsaD peut avoir une action plus large sur la dynamique des réseaux, dépendamment de son taux et celui des ARNm cibles.

### ***III.3.e - Interaction RsaD/RsaI.***

Les résultats de RNA-Seq sur les expériences de MAPS de RsaI, montrent un enrichissement de RsaD dans les échantillons MS2-RsaI. Le taux d'enrichissement de RsaD est moins important que celui de RsaG. Les expériences de gel retard montrent que RsaI et RsaD interagissent aussi avec une affinité moindre (cf. chapitre III Résultats, partie II). Des appariements potentiels ont été prédits entre la séquence riche en G (motif 2) de RsaI et la séquence conservée UCUCG incluant une partie de l'hélice II de RsaD, expliquant pourquoi l'interaction *in vitro* entre les deux ARNnc ne se ferait pas de manière optimale. RsaI n'a pas été retrouvé dans l'analyse du MAPS utilisant l'ARN MS2-RsaD. Cependant, les ARNm (*treAB*, *norB*, *ald1*, *aldC1* et *thrS*) se retrouvent aussi bien avec MS2-RsaI et MS2-RsaD pouvant suggérer que les deux ARNnc partagent des cibles communes. Les conséquences de cette interaction RsaI/RsaD sur leurs fonctions de régulation respectives restent à être démontrées.

Conclusion et perspectives.

Bien que RsaD est activé par le système SrrAB lors d'un stress NO, il peut également répondre à d'autres facteurs environnementaux comme le choc thermique froid mis en évidence par Geissmann *et al.* (2009). Le modèle du réseau de régulation, articulé autour de RsaD, et présenté dans la figure 35, permet d'envisager d'autres axes de recherche à suivre et les expériences nécessaires pour confirmer ou infirmer ces voies de régulation. Outre les expériences de MAPS qui devront être renouvelées, il serait intéressant d'utiliser une autre approche pour conserver l'extrémité 5' de RsaD accessible et non modifiée. Chez les entérobactéries, les ARNnc ayant une extrémité 5' en simple brin utilise souvent cette région pour s'apparier aux ARNm cibles (Wagner & Romby, 2015). Nous ne pouvons pas exclure que l'étiquette MS2 interférerait avec certaines des fonctions régulatrices de RsaD. Des expériences de gel retard vérifieront l'interaction de RsaD avec ses cibles potentielles.

Cependant, les résultats suggèrent fortement que cet ARNnc régule des voies métaboliques reliées aux acides aminés, à l'entrée des sucres et au catabolisme de l'acide

sialique. Par ailleurs, RsaD régulerait l'expression de gènes de virulence en réprimant le facteur de transcription SarX, un répresseur de *agr*. Le régulon de SarX n'est pas encore entièrement bien défini. Les analyses de protéomique montrent que la protéine SarX n'a pas été détectée dans la souche exprimant RsaD, l'ARNm *sarX* n'a pas non plus été détecté dans les expériences de MAPS, suggérant que celui-ci est sans doute rapidement dégradé. Au vu de l'appariement entre RsaD et *sarX*, il serait intéressant de réaliser des expériences de gel retard pour confirmer l'interaction *in vitro* ainsi que des expériences de rifampicine pour mesurer la stabilité de l'ARNm *in vivo*. Par ailleurs, il sera essentiel de définir cartographier avec plus de précision les sites d'interaction de RsaD à ces ARNm cibles dont *sarX*, *nana*, *ald1* et *tcdB* en utilisant la cartographie en solution, et pour identifier les mécanismes de régulation qui en découlent.

La survie de *S. aureus* face à un stress d'oxyde nitrique (NO) est un atout pour sa virulence, lors de la phagocytose de la bactérie par les macrophages. L'identification des facteurs de transcription et des ARNnc impliqués dans la régulation des gènes face à ce stress, est essentielle pour comprendre ce mécanisme de résistance. Les résultats obtenus sur RsaD montrent que cet ARNnc pourrait être relié à ce phénomène en régulant des gènes impliqués dans le métabolisme et la virulence.



## **IV - Discussion et Perspectives**

---



Face aux stress environnementaux, *S. aureus* régule l'expression des gènes impliqués dans les processus adaptatifs et apporte ainsi une réponse cellulaire cohérente lui permettant de survivre dans diverses niches écologiques. En conditions infectieuses, ce pathogène opportuniste passe d'un mode de colonisation (mode défensif), à un mode de dissémination (mode offensif). L'ARN régulateur ARNIII, contribue à ce changement de comportement en régulant l'expression des gènes de virulence en fonction de la densité cellulaire. Le réseau de régulation dans lequel il s'inscrit, est interconnecté avec de nombreux TCS et facteurs de transcription. L'implication de ARNnc dans ces réseaux complexes permet une régulation fine et rapide des gènes impliqués dans divers phénomènes biologiques dont les voies métaboliques.

La régulation du métabolisme est étroitement liée avec l'expression des gènes de virulence (Somerville & Proctor, 2009). Dans des cultures de laboratoire, la concentration des nutriments dans le milieu, en particulier celle du glucose, détermine la vitesse de croissance des bactéries. En conditions infectieuses, la présence de glucose dans les tissus et vaisseaux sanguins accentue le pouvoir virulent de *S. aureus* (la formation des biofilms et l'expression des facteurs de virulence), principalement par le facteur de transcription CcpA (Seidl *et al*, 2009). L'hyperglycémie des patients diabétiques augmente d'ailleurs dangereusement les infections à *S. aureus* (Bravo-Molina *et al*, 2016). Le contrôle des gènes du métabolisme par les ARNnc, est essentiel pour apporter aux cellules une réponse adaptative rapide face à des changements environnementaux brutaux. Pour *S. aureus* cette adaptation contribue au passage des cellules d'un mode de vie de colonisation à un mode de vie infectieux.

#### **IV.1. RsaI, un ARNnc au cœur du métabolisme carboné**

La présence de glucose (sous forme libre D-glucose) dans le milieu de culture, inhibe l'expression de RsaI. Lorsque la concentration en glucose extérieur est élevée, la protéine Hpr est phosphorylée à son résidu Ser46 et forme un complexe avec CcpA, ce qui augmente l'affinité de liaison de ce facteur de transcription avec la séquence *cre* présente dans la région promotrice de RsaI. Lorsque le glucose est absent du milieu de culture le complexe CcpA-HpRSer46 n'est plus formé, et l'inhibition de la transcription de RsaI est levée.

#### ***IV.1.a - Régulation des gènes du métabolisme carboné :***

En s'appariant au SD de l'ARNm *glcU*, RsaI va réprimer la traduction de ce transporteur du glucose. La synthèse des perméases, comme GlcU, est activée lorsque la concentration en glucose extérieure est élevée, afin d'augmenter le flux d'import du glucose dans les cellules. Dans ces conditions, le rôle régulateur de RsaI est cohérent. En présence de glucose, RsaI est réprimé et permet la synthèse de l'ARNm *glcU*. A l'inverse, lorsque le glucose a été consommé, RsaI est exprimé, et réprime *glcU*.

RsaI inhibe également la traduction de la fructosamine Kinase FN3K. Cette enzyme est impliquée dans le phénomène de déglycation des protéines. La glycation des protéines est une réaction non enzymatique qui consiste à l'attachement d'un sucre glucose ou fructose, par liaisons covalentes, à une protéine ou à un lipide. Ces réactions ne sont pas des modifications post-traductionnelle, contrairement au phénomène de glycosylation, mais se produisent lorsque le glucose est en excès dans la cellule. La liaison d'un carbohydrate de manière aléatoire sur les protéines, dénature leurs fonctions biologiques. Des enzymes comme la FN3K ont un rôle de déglycation, c'est à dire qu'elles phosphorylent les groupements carbohydrates pour les décrocher des protéines (Deppe *et al*, 2011). Les protéines sont alors à nouveau fonctionnelles. En absence de glucose dans l'environnement, les fructosamines kinases ne sont pas utiles pour la cellule, et leur expression est réprimée, par exemple par RsaI chez *S. aureus* comme j'ai pu le montrer dans au cours de ce projet.

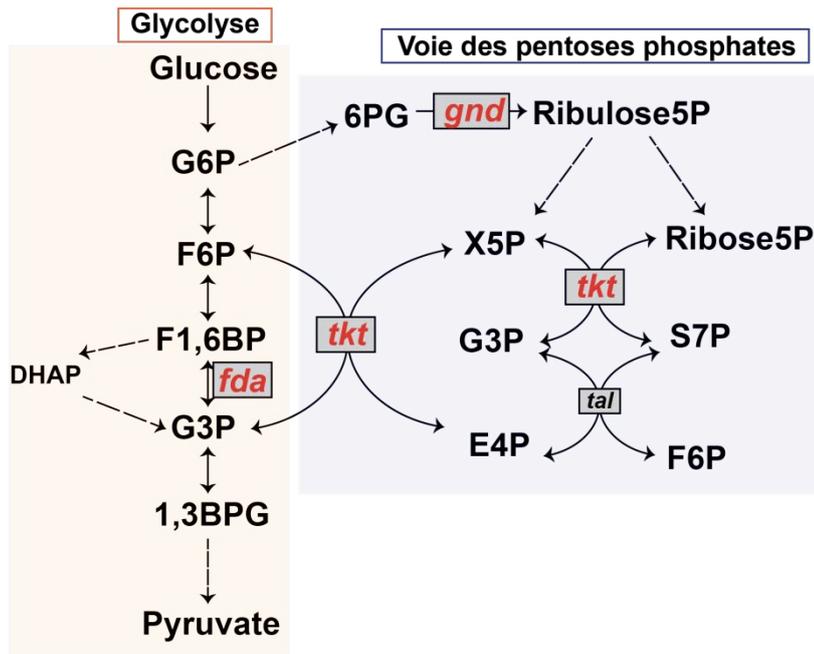
Les données de transcriptomique comparatives ont montrés que RsaI réprime également de nombreux gènes impliqués dans la biosynthèse, de la thiamine, (*thiW*, *thiE*, *thiN*), un cofacteur de nombreuses enzymes intervenant dans le métabolisme des carbohydrates.

Un autre ARNm montrant un fort enrichissement dans les résultats de MAPS, est celui codant la protéine HG001-02520 de fonction inconnue. Cette protéine hypothétique fait partie de la famille des facteurs de transcription XRE. La caractérisation de cette protéine et des gènes qu'elle régule, permettrait sans aucun doute une meilleure compréhension du rôle de RsaI dans la cellule. Il est cependant intéressant de signaler que les facteurs de transcription de la famille XRE sont souvent associés à la régulation de l'expression des gènes provenant des éléments mobiles

comme les phages, les îlots de pathogénicité, mais aussi les systèmes toxines-antitoxines (Ibarra *et al*, 2013).

Dans mes expériences de transcriptomique comparatives, j'ai montré qu'une surexpression de RsaI dans les cellules inhibe la transketolase (Tkt), et la 6-phosphogluconate déhydrogénase (Gnd), deux enzymes directement impliquées dans la voie des pentoses phosphates. RsaI réprime également l'expression de la fructose bi-phosphate aldolase (Fda) qui intervient dans la glycolyse pour former du glyceraldéhyde-3-phosphate (G3P), substrat de Tkt. Lorsque Fda est inhibée, la glycolyse peut se poursuivre en utilisant la voie du dihydroxyacétone phosphate (DHAP) pour la conversion du Fructose-1,6-bi-phosphate (F-1,6BP) en G3P (figure 37).

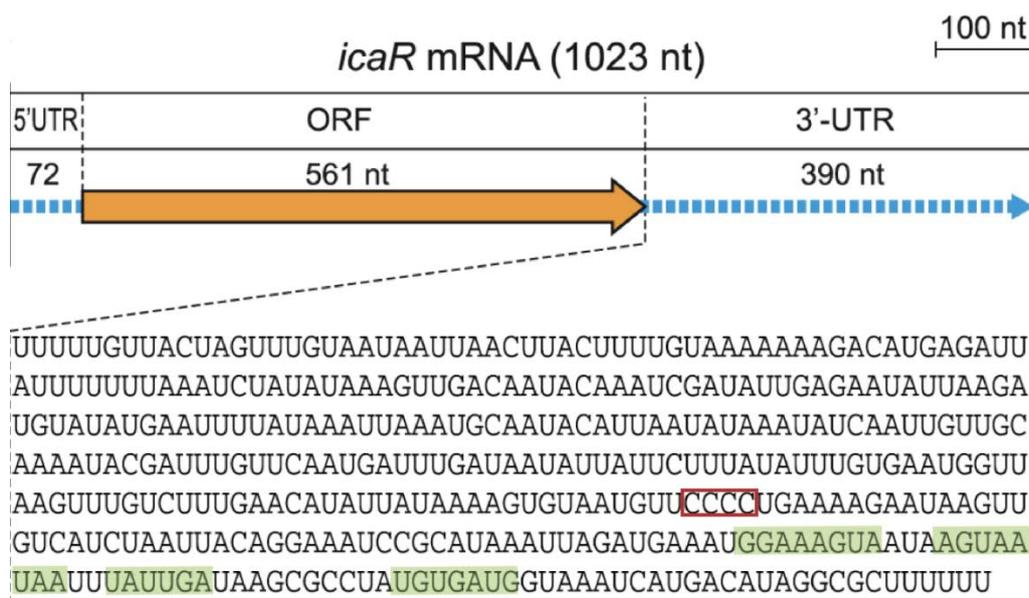
La voie des pentoses phosphate permet à la cellule d'obtenir du pouvoir réducteur sous forme de NADH mais également de convertir les hexoses phosphates en pentose phosphate comme le ribose 5-phosphate, précurseur de la synthèse des nucléotides constituant des acides nucléiques et de coenzymes dont la cellule a besoin en division active. En milieu de culture riche, la consommation du glucose engendre le ralentissement de la vitesse de croissance cellulaire jusqu'à la phase stationnaire où les cellules arrêtent de se diviser. Dans ces conditions, comme l'expression de RsaI est activée lorsque la concentration en sucres diminue, il apparaît cohérent que celui-ci inhibe la voie des pentoses phosphate. En inhibant cette voie, RsaI participerait au ralentissement de la vitesse de croissance, en limitant la biosynthèse des acides nucléiques.



**Figure 37 : Schéma simplifié de la voie de la glycolyse et des pentoses phosphates.** Les flèches en pointillés indiquent que les intermédiaires ne sont pas mentionnés.

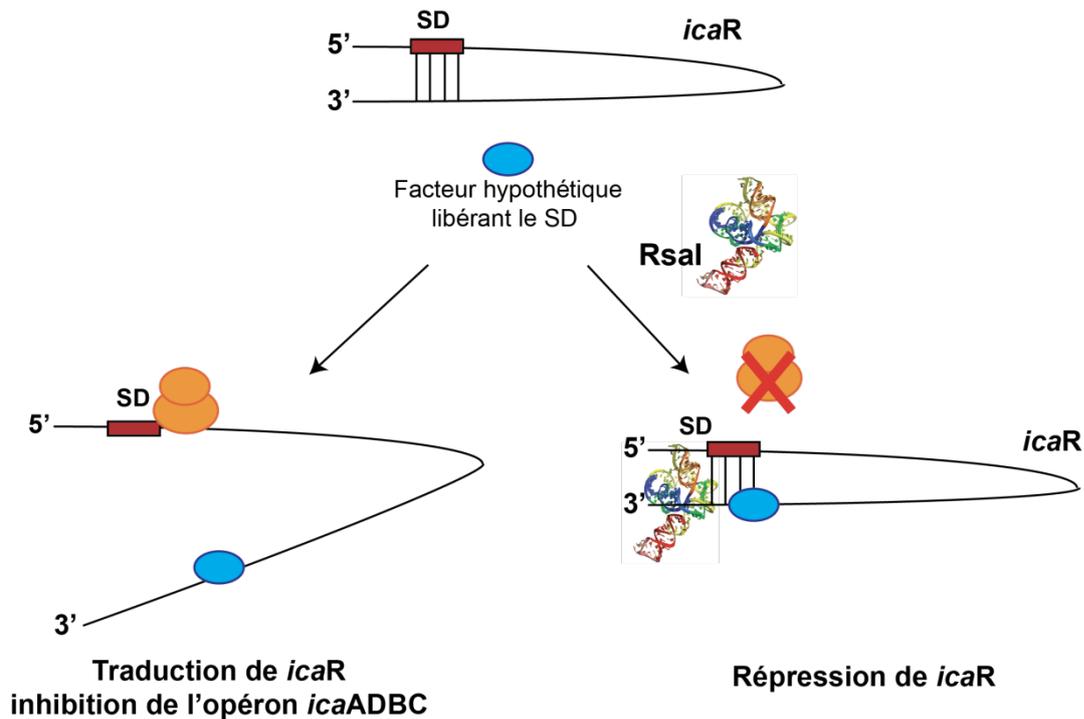
#### **IV.1.b - Rôle de RsaI dans la régulation des biofilms**

La formation des biofilms est un changement physiologique important pour les cellules qui requiert la synthèse de nombreuses protéines d'adhésion ainsi qu'une production d'énergie. Ce mécanisme nécessite une régulation fine des gènes impliquant plusieurs réseaux de régulation interconnectés. Chez *S. aureus*, l'opéron *icaADBC* permet la biosynthèse des exopolysaccharides PIA. Cet opéron est régulé par le facteur SarA ainsi que sigma B. IcaR quant à lui, est le répresseur de l'opéron *icaADBC*. Son expression est finement régulée au niveau transcriptionnel et traductionnel. Sa région 3'UTR contient une région riche en C qui s'apparie au SD empêchant ainsi le recrutement du ribosome et la traduction de l'ARNm *icaR* (Ruiz de los Mozos *et al*, 2013). La libération de la séquence SD requiert un changement structural, probablement occasionné par la fixation d'une molécule, comme une protéine, un métabolite ou un ARNnc. Les données obtenues dans ce projet mettent en évidence une forte interaction entre RsaI et IcaR et plus particulièrement avec sa région 3'UTR, mais qui n'implique pas le motif riche en C. Des appariements potentiels ont été prédits entre les deux ARN qui se trouvent localisés en aval de la séquence riche en C impliquée dans la répression de *icaR* (figure 38).



**Figure 38 : Site de fixation de RsaI dans la région 3'UTR de l'ARNm *icaR*.** Le motif riche en C s'appariant au SD de l'ARNm est encadré en rouge. Les nucléotides s'appariant à RsaI sont surlignés en vert (prédictions IntaRNA) (Figure modifiée, Ruiz de los Mozos *et al*, 2013).

Les expériences *in vivo*, menées par notre collaborateur, Alejandro Toledo-Arana et son équipe, indiquent qu'une forte expression de RsaI est responsable de l'activation de la formation de biofilms. Cela peut s'expliquer par une inhibition de l'expression de *icaR* médiée par RsaI. Des résultats préliminaires de traduction *in vitro* sont en faveur d'une inhibition de la traduction de l'ARNm *icaR* par RsaI (Annexe 2). Comment RsaI peut-il réprimer la traduction en se fixant à la région 3'UTR? Il peut renforcer la stabilisation de la conformation fermée de l'ARNm, dans laquelle la région SD est inaccessible au ribosome, et empêcher ainsi sa traduction. RsaI peut également empêcher la fixation d'une molécule (i.e. protéine, ARNnc, métabolite) qui, au contraire de RsaI, ouvrirait la structure de *icaR* pour libérer le SD (figure 39). Des expériences de MAPS seront envisagées avec l'ARNm *icaR* comme proie pour identifier si d'autres ARNnc interagissent avec *icaR* et éventuellement identifier le facteur clef nécessaire à l'activation de la traduction de cet ARNm.



**Figure 39 : Modèle hypothétique montrant l'inhibition traductionnelle de *icaR* par RsaI.** La partie 3'UTR de *icaR*, possède une région riche en C qui se lie à la séquence SD, empêchant ainsi le recrutement du ribosome et la traduction de l'ARNm. En se fixant au 3'UTR, RsaI peut soit consolider cette conformation fermée, soit empêcher la fixation d'une molécule qui au contraire ouvrirait la structure pour activer la traduction.

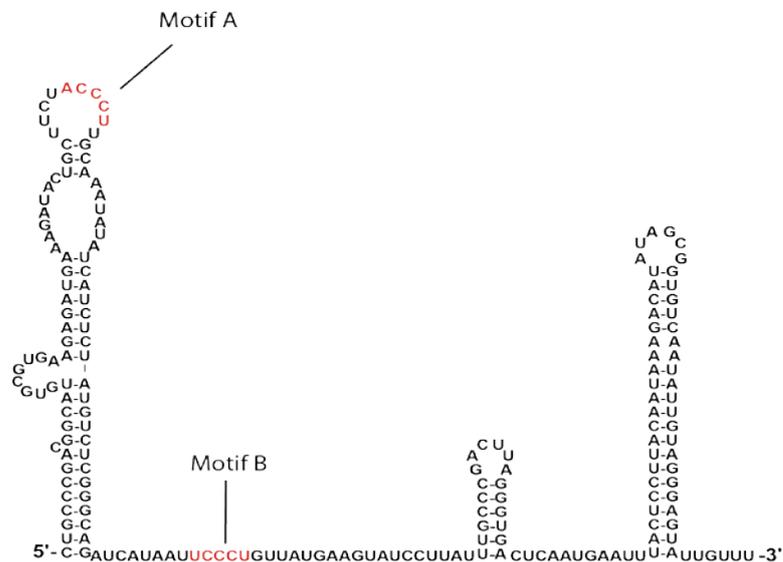
RsaI interagit également avec le début de la séquence codante de *icaR* (chapitre III Résultats, partie 2). Cet appariement peut également réprimer la traduction de l'ARNm en favorisant le recrutement des enzymes de dégradation. Il serait intéressant de savoir si RsaI favorise un site d'interaction plutôt qu'un autre ou si ces interactions se font de façon concomitante par la fixation de plusieurs molécules de RsaI sur *icaR*.

La régulation des biofilms est complexe et dépend de facteurs multiples liés à l'environnement, et à la disponibilité de nutriment. Cependant, il existe peu de consensus sur les métabolites nécessaires à la formation d'un biofilm (Zhu *et al*, 2007). Il a été montré que la présence de glucose peut induire la formation de biofilm par le biais de CcpA (Seidl *et al*, 2008). Cependant, dans des conditions optimales de croissance (température, pH, etc.) et en milieu liquide, la présence de glucose devrait favoriser la croissance cellulaire plutôt que la formation de biofilms. L'inhibition de RsaI, en présence de glucose, permettrait la synthèse de IcaR et donc la répression de l'opéron *icaADBC*.

L'expression de la protéine IcaR est dépendante de nombreux facteurs et l'intervention d'autres ARNnc ou de protéines chaperonnes dans la régulation de sa traduction est tout à fait probable.

## IV.2. La bifonctionnalité de RsaI : un nouveau mécanisme de régulation chez *S. aureus*

La découverte de deux domaines fonctionnels de RsaI ouvre de nouvelles hypothèses sur les mécanismes de régulation des ARNnc chez *S. aureus*. Par sa région simple brin, RsaI régule des ARNm cibles et par ses régions riches en G, il interagit avec d'autres ARNnc également impliqués dans le métabolisme central, comme RsaG qui répond au glucose-6-phosphate (G6P). Les expériences de gel retard, montrent que l'affinité de l'interaction entre RsaI et RsaG est forte et que la seconde boucle de RsaI est essentielle. RsaG est un ARNnc de 194 nucléotides qui présente dans sa séquence deux motifs riches en cytosines, susceptibles de se lier à la séquence SD d'ARNm cibles. Les prédictions d'appariements montrent que seul le motif A de RsaG (**figure 40**) est requis pour une fixation forte à RsaI.



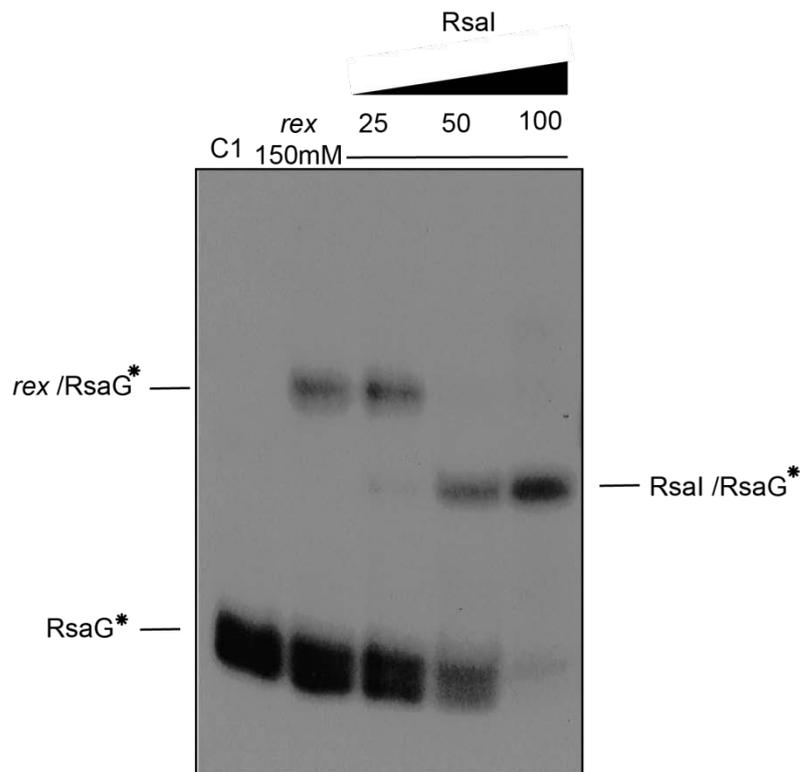
**Figure 40 : Structure secondaire de RsaG démontrée par cartographie en solution de l'ARN (Geissmann *et al*, 2009).** Les oligonucléotides marqués en rouge représentent les deux motifs riches en C interagissant avec la séquence SD des ARNm cibles. Le motif A est impliqué dans l'appariement avec la boucle 2 de RsaI.

RsaG est conservé uniquement chez *S. aureus*. Comme RsaI, il s'exprime en phase stationnaire de croissance en milieu riche. Son expression ne dépend pas de CcpA, ni du glucose. En revanche RsaG est très fortement activé en présence de G6P. Le système à deux composants HptRS répond à la présence de G6P. L'expression de RsaG est d'ailleurs inhibée dans une souche délétée de ce TCS (résultats non montrés, Emma Desgranges). RsaG se trouve dans la partie 3'UTR du gène *uhpT* qui code un transporteur du G6P. Des données préliminaires suggèrent que RsaG et *uhpT* pourraient être transcrits sous le même promoteur avec malgré tout, une forte accumulation de RsaG comparé au transcrit de *uhpT* (A. Toledo-Arana, communication personnelle). Des expériences de Northern blot sur les souches mutantes HG001 $\Delta$ *rsaG* et HG001 $\Delta$ *rsaI* ainsi que sur les souches complémentées HG001 $\Delta$ *rsaG*::pCN51::*rsaG* et HG001 $\Delta$ *rsaI* pCN51::*rsaI* montrent que *in vivo*, l'absence ou la surexpression d'un des deux ARNnc, n'affecte pas la transcription de l'autre et sa stabilité (Annexe 3). L'enjeu est maintenant de comprendre le rôle fonctionnel de l'interaction RsaI /RsaG pour la physiologie de *S. aureus*.

#### **IV.2.a - Rôle de l'interaction RsaI/RsaG**

Des expériences de gel retard montrent que RsaG n'affecte pas l'interaction de RsaI avec ces cibles mais n'augmente pas non plus son affinité de liaison. Cela confirme le rôle bifonctionnel de RsaI et son interaction avec RsaG qui n'affecte pas sa fonction régulatrice. Les résultats du MAPS MS2-RsaG, obtenus par Emma Desgranges, mettent en évidence des cibles directes de RsaG. Ces ARNm cibles codent les facteurs de transcription SarA, Rex, et TcaR. La protéine TcaR est un régulateur transcriptionnel qui réprime l'opéron des biofilms *icaADBC* de manière indépendante de IcaR.

Contrairement à RsaG, RsaI empêche la fixation de RsaG sur ces ARNm cibles lorsque son motif A est impliqué dans les interactions. En effet, d'après les prédictions d'appariements, soit l'un soit l'autre des motifs riches en C de RsaG peuvent interagir avec les ARNm. Par exemple, le motif A de RsaG est requis pour former le complexe RsaG-ARNm *rex*. En présence de concentrations croissantes de RsaI, on observe par des expériences de gel retard, une compétition entre RsaI et l'ARNm *rex*, pour favoriser le duplex RsaI/RsaG (**figure 41**).



**Figure 41 : Inhibition de l'interaction de RsaG/Rex par RsaI.** Expérience de gel retard montrant l'interaction RsaG/Rex. RsaG est radiomarcué au  $^{32}\text{P}$  à l'extrémité 5'. L'ajout d'une concentration croissante de RsaI inhibe l'interaction RsaG/Rex et forme un complexe avec RsaG. (Expérience réalisée par Emma Desgranges).

Le motif A de RsaG étant pris dans l'interaction avec RsaI, ces résultats sont cohérents et montrent que RsaI empêche l'interaction de RsaG avec l'ARNm *rex*. En revanche, lorsque le motif B de RsaG est impliqué dans les interactions avec ses cibles, comme pour les ARNm *sarA* et *tcaR*, RsaI ne change pas l'affinité de liaison des deux ARN (Résultats Emma Desgranges, non montrés). Il pourrait donc exister une hiérarchie dans la régulation des cibles de RsaG. Dans des conditions de croissance normale, lorsque RsaG est exprimé à un taux proche ou plus faible que celui de RsaI, RsaI exercerait son rôle « d'éponge » et piégerait RsaG sur l'un de ses domaines fonctionnels (motif A). En présence de G6P, la quantité de transcrite de RsaG est beaucoup plus élevée que celle de RsaI qui ne peut plus alors jouer son rôle « d'éponge ». Ces hypothèses devront être vérifiées *in vivo*, dans des conditions de culture avec et sans G6P.

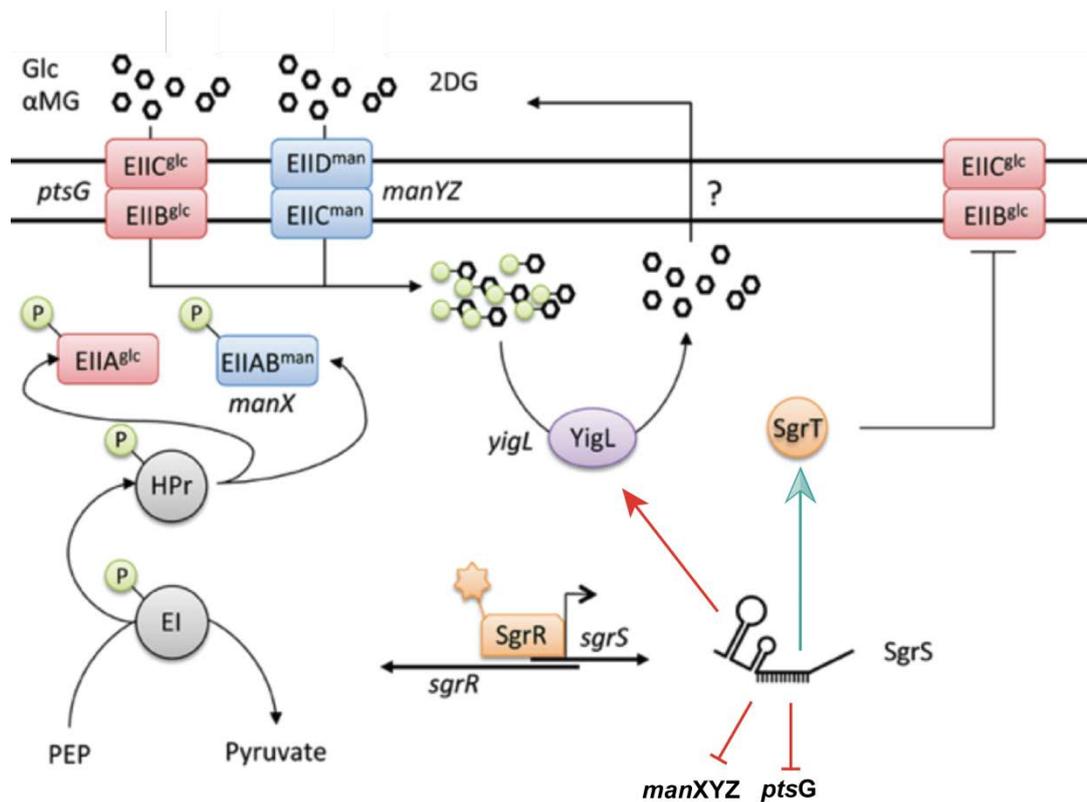
#### **IV.2.b - Rôle coopératif des deux ARNnc :**

Les deux souches mutantes, HG001 $\Delta$ *rsaG* et HG001 $\Delta$ *rsaI* ne présentent pas de phénotype de croissance en milieu riche. Les résultats obtenus pour les expériences de MAPS des deux ARNnc, montrent que RsaI et RsaG ont des cibles communes, comme la fructosamine Kinase Fn3K. RsaI se fixe dans la partie SD de l'ARNm *fn3K*, avec une forte affinité et les expériences de toeprint montrent que RsaI inhibe la formation du complexe d'initiation de la traduction. RsaG se fixe quant à lui dans la région codante de *fn3K* avec une affinité moindre. Le complexe RsaI/*fn3K* empêche la fixation du ribosome alors que celui de RsaG/*fn3K* favoriserait le recrutement d'enzymes de dégradation. Ainsi, RsaI et RsaG agiraient de concert sur *fn3K* pour réprimer sa traduction. *In vivo*, la perte d'un des deux ARNnc peut possiblement être compensé par l'autre pour la régulation de *fn3K*. Ceci est un exemple de rôle coopératif de deux ARNnc sur une cible commune. RsaI et RsaG sont également tous deux impliqués dans la régulation des biofilms par l'inhibition de l'expression de deux répresseurs de l'opéron *icaADBC*, IcaR pour RsaI, et TcaR pour RsaG.

#### **IV.2.c - Rôle possible de RsaI et RsaG dans le maintien de l'homéostasie**

Comme de nombreux carbohydrates phosphorylés, le G6P entre dans la glycolyse pour produire de l'énergie. Faisant partie des 13 métabolites précurseurs, il participe également à la biosynthèse de molécules, comme les lipopolysaccharides, en entrant directement dans les voies d'assemblage. Le G6P est disponible dans le cytoplasme des cellules hôtes comme les macrophages (Richardson *et al*, 2015), où *S. aureus* est retrouvé ainsi que dans les monocytes ou cellules épithéliales alvéolaires. Toutefois, un excès cytoplasmique de G6P dans les cellules peut être toxique pour la croissance bactérienne. En effet, chez certaines bactéries comme *Salmonella* et *E. coli*, cette accumulation engendre une réponse cellulaire particulière de stress. L'accumulation de G6P active le facteur de transcription SgrR, qui induit lui-même la transcription d'un ARNnc appelé SgrS. Par des appariements de base, cet ARN réprime la traduction des ARNm *ptsG* et *manXYZ* codant deux transporteurs de sucre (glucose et mannose), de plusieurs enzymes requises pour la réponse au stress provoqué par le G6P, et active la traduction de l'ARNm *yidL* qui code une phosphatase et permet la déphosphorylation du G6P et son export hors de la cellule (Bobrovskyy & Vanderpool, 2014) (figure 42).

Ainsi SgrS contribue à l'homéostasie cellulaire en maintenant une concentration suffisante de glucose nécessaire à la cellule et en même temps éviter les dommages cellulaires.



**Figure 42 : Rôle de SgrS, un ARNc impliqué dans la détoxification du glucose 6-phosphate chez les  $\gamma$ -protéobactéries (figure modifiée Bobrovskyy & Vanderpool, 2016).** Autour de l'ARN SgrS, les barres rouges représentent une inhibition traductionnelle, la flèche rouge, une activation traductionnelle, la flèche verte représente la traduction du peptide SgrT à partir de la région codante de SgrS.

SgrS est un ARNc particulier car il code également une petite protéine, SgrT, qui inhibe l'activité du transporteur principal du glucose. La bifonctionnalité de SgrS permet d'empêcher rapidement l'accumulation des sucres phosphorylés dans le cytoplasme et ainsi de restaurer la croissance cellulaire.

Un ARNm codant la phosphatase YidA (homologue de YigL chez *E. coli*) est retrouvé parmi les cibles de RsaI. Les mécanismes d'action diffèrent sans doute entre bactéries à Gram positif et à Gram négatif, toutefois l'interaction entre RsaI et *yidA* pourrait avoir une implication dans la régulation de l'homéostasie. En effet, si RsaI

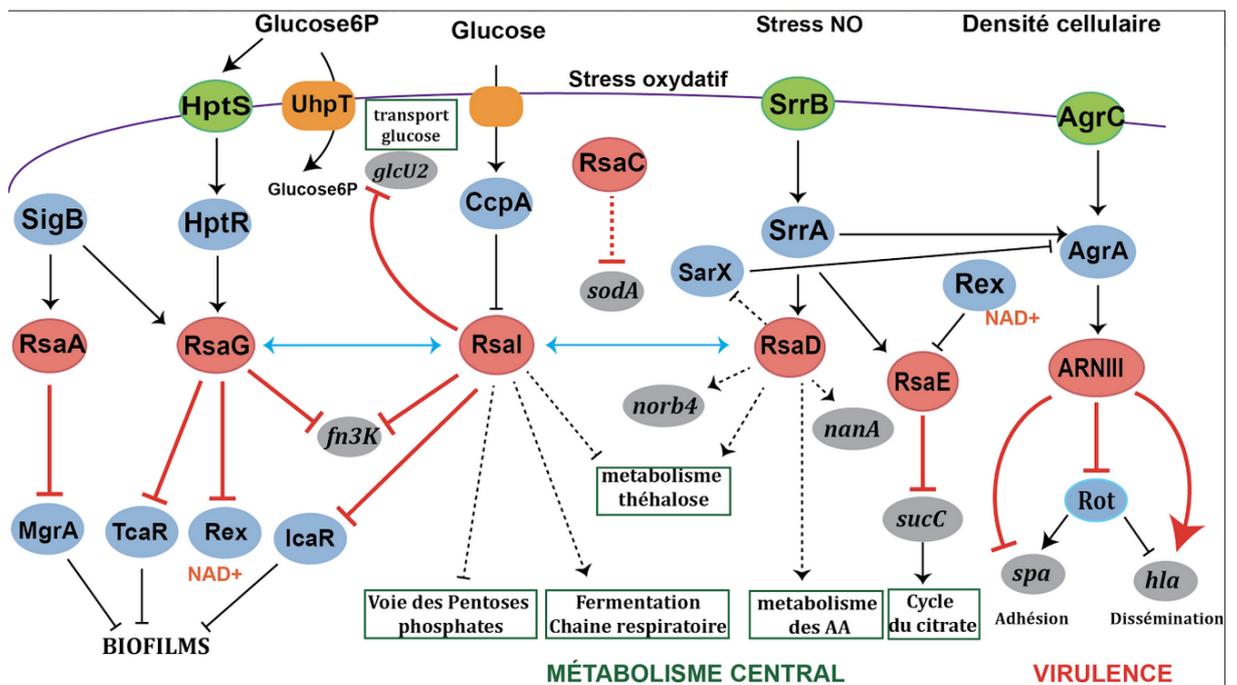
inhibe l'expression de *yidA*, en absence de glucose, lorsqu'il est fortement exprimé, la synthèse de la protéine sera au contraire activée, en forte concentration de glucose, par l'absence de RsaI. RsaG quant à lui, pourrait exercer un rôle similaire à celui de SgrS, chez *S. aureus*. Exprimé très fortement en présence de G6P, RsaG pourrait activer l'expression de gènes impliqués dans le système d'homéostasie. Pour cela il faudra analyser les ARNm enrichis dans les expériences de MAPS ayant un rôle possible dans ce mécanisme et confirmer les interactions par des expériences *in vitro*. Les expériences *in vivo*, conduites actuellement par Emma Desgranges dans l'étude du rôle de RsaG, permettront prochainement de comprendre la dynamique de l'interaction RsaI/RsaG ainsi que son rôle plus précis dans la régulation du métabolisme.

#### ***IV.2.d - Interaction RsaI/RsaD***

Comme décrit dans l'introduction, le métabolisme du glucose, et la réponse au stress NO, sont étroitement liés. Pour survivre les bactéries doivent temporairement passer à un mode fermentatif lors d'un stress NO mais également lorsque pénètre dans les tissus de l'hôte et que la concentration en oxygène est faible. RsaD interagissant avec RsaI, il existe alors une communication moléculaire entre les différentes voies de régulation. L'affinité entre ces deux ARNnc est moins forte que celle de RsaI et RsaG, il serait toutefois intéressant de comprendre le rôle de cette interaction dans la physiologie de *S. aureus*. Pour cela l'identification des cibles directes de RsaD, par des expériences de MAPS doit être renouvelée et validée. La même stratégie expérimentale par gel retard utilisée pour RsaG pourrait être employée pour l'étude de l'action de RsaD sur les interactions de RsaI avec ses cibles, et inversement. Du fait que RsaD répond à la production de NO, il serait intéressant d'étudier son rôle dans la survie des bactéries après internalisation dans les macrophages lors de la phagocytose. Ces expériences seront conduites par notre collaborateur, François Vandenesch et son équipe (laboratoire INSERM, Lyon).

### IV.3. Le nouveau réseau de régulation au cœur du métabolisme central impliquant plusieurs ARNnc.

Plusieurs ARNnc répondant aux stress environnementaux ont été caractérisés chez de nombreuses bactéries. Pour *S. aureus*, l'ARNIII était jusqu'à présent le principal ARNnc impliqué dans la virulence de ce pathogène, mais l'accumulation des données sur les autres ARNnc, montre leur rôle clé dans la régulation des gènes de virulence et du métabolisme et leur lien avec le réseau de l'ARNIII. Les interactions entre RsaI/RsaG et RsaI/RsaD permettent d'établir un nouveau réseau de régulation reliant ces trois ARNnc impliqués dans la régulation du métabolisme mais également de les relier à l'ARNIII ainsi qu'à d'autres ARNnc comme RsaE, impliqué dans le métabolisme central, ou RsaC qui est requis pour la réponse au stress oxydatif (figure 43).



**Figure 43 : Réseaux de régulation du métabolisme et de la virulence, impliquant les ARNnc chez *S. aureus*.** Les ARNnc sont représentés en rouge, les facteurs de transcription en bleu et les cibles en gris. Les barres rouges pleines, représentent une répression traductionnelle, les flèches rouges, une activation traductionnelle, les barres pleines noires, une inhibition transcriptionnelle. Les flèches et barres représentées en pointillés montrent une activation ou répression non caractérisée.

Le schéma du réseau chez *S. aureus* ci-dessus montre l'interconnexion des différents réseaux de régulation, impliquant les ARNnc qui ont été découverts dans l'équipe. Certains réseaux sont connectés par l'interaction directe entre deux ARNnc, comme RsaI et RsaG ou encore RsaI et RsaD. D'autres parties du réseau sont connectées

par les facteurs de transcription, comme SrrA qui régule l'expression de RsaD mais également de RsaE, ou encore du facteur sigma B qui active l'expression de RsaA et RsaG. D'autres ARNnc non décrits dans ce projet mais caractérisés au sein du laboratoire comme RsaC, interagissent également avec ce réseau.

RsaC est un ARNnc de plus de 1000 nucléotides dont l'expression est fortement induite dans les ostéomyélites (Szafranska *et al*, 2014). Cet ARN a une structure secondaire particulière comprenant deux domaines indépendants : la région 5' est composée de plusieurs motifs répétés en tige-boucle, dont le nombre varie d'une souche à l'autre, la partie 3' contient 7 séquences conservées riches en cytosines susceptibles de s'apparier avec la séquence SD des ARNm cibles. Utilisant l'approche (MAPS), le laboratoire a identifié l'ARNm *sodA* comme cible principale. Cet ARNm code la superoxide dismutase SodA, une enzyme impliquée dans les stress oxydatifs rencontrés également au cours d'une infection. Cette protéine était par ailleurs significativement augmentée dans une souche délétée de RsaC. Des expériences de Northern blot ont montré que la transcription de *sodA* par RsaC n'est pas affectée. Actuellement, le laboratoire étudie si RsaC affecterait la traduction de l'ARNm et/ou sa stabilité. Le mutant délété de *rsaC* s'avère plus résistant au stress oxydatif *in vivo*, ce qui corrèlerait avec la surexpression de SodA observée en protéomique. L'approche MAPS a également révélé l'ARNm *cymR* qui est impliqué indirectement dans la détoxification des ROS mais également dans le métabolisme de la cystéine et la formation des biofilms (Soutourina *et al*, 2010), mais aussi l'ARNm *rex* (données non publiées).

D'autres ARNnc, faisant parti des 11 identifiés par Geissmann *et al*, 2009, comme RsaH sont sans doute également reliés à ce réseau de régulation. Leur caractérisation permettra d'accumuler d'avantage de connaissances sur le rôle, le mode d'action et les circuits de régulation des ARNnc qui influent sur la physiologie, la réponse au stress et la virulence de *S. aureus*.

## IV.4. Identification de potentiels partenaires protéiques de RsaI

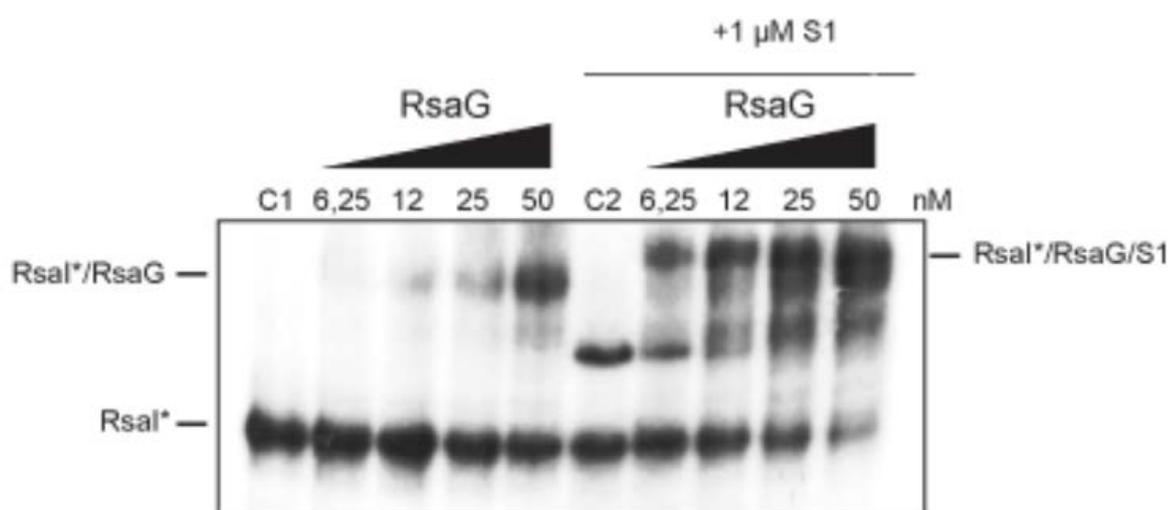
La régulation des gènes au niveau traductionnel, permet une réponse cellulaire rapide dans les processus adaptatifs. L'initiation de la traduction des ARNm est l'étape limitante de la synthèse des protéines, au cours de laquelle l'ARNm se lie à l'ARNt initiateur sur la petite sous-unité du ribosome (30S). Pour être activement traduit, le site de liaison du ribosome sur l'ARNm doit être accessible. Beaucoup d'ARNm présentent des structures particulières dans leurs régions 5'UTR qui peuvent soit directement influencer sur la reconnaissance du ribosome, soit être reconnues par des protéines régulatrices ou des ARNnc. Chez *E. coli*, l'initiation de la traduction des ARNm structurés est facilitée par l'action de la protéine ribosomique S1, capable de déstabiliser les structures des ARNm et de favoriser l'adaptation du codon d'initiation sur le canal de décodage du ribosome. Cette protéine joue également un rôle chaperon pour la régulation de certains ARNm par les ARNnc (Duval *et al*, 2013). Impliquée dans la traduction de nombreux ARNm, S1 est une protéine essentielle pour *E. coli*. Elle est constituée de six domaines OB-fold et est ancrée à la sous-unité 30S grâce aux deux premiers domaines. Chez *S. aureus*, S1 présente une forme plus courte (quatre domaines OB-fold) et ne contient pas le premier domaine d'ancrage sur le ribosome. Son rôle chez *S. aureus*, est en cours de caractérisation au sein de notre laboratoire (par Alessandra Marennna).

Des expériences d'immunoprécipitation, suivies par des analyses protéomiques et de séquençage à haut débit des ARN ont permis de caractériser les protéines et les ARN enrichis avec la protéine étiquetée. Parmi les ARN, plusieurs ARNnc ont été co-immunoprécipités dont RsaI, RsaH, RsaG, RsaE et RsaD. Des expériences de gel retard ont confirmé que S1 forme un complexe stable avec RsaI et RsaH. Une interaction plus faible entre S1 et RsaE a été mise en évidence alors qu'aucune interaction n'a été observée avec les autres ARN (RsaG, RsaD) (Alessandra Marennna). A l'analyse des ces résultats, j'ai dans un premier temps vérifié, par des expériences de rifampicine, que S1 n'affectait pas la stabilité de RsaI (annexe 4). J'ai ensuite analysé le profil d'expression de S1 dans diverses conditions de culture. L'ARNm *rpsA* (codant S1) présente deux isoformes résultant de deux sites d'initiation de la transcription (TSS). Le transcrit court

est constitutivement exprimé alors que le transcrit long est induit à partir de 3 h de croissance et s'accumule en phase stationnaire (résultats non montrés).

Contrairement à RsaI, l'expression de S1 ne dépend pas du facteur de transcription CcpA, ni de la présence de glucose dans le milieu de culture et le profil d'expression de la protéine analysée par Western, montre que sa synthèse est en phase avec l'expression du transcrit long (Alessandra Marena).

Pour comprendre le rôle de l'interaction S1/RsaI et vérifier si S1 stimule la cinétique de l'interaction ARN-ARN en fonctionnant comme une protéine chaperonne, des expériences de gel retard, ont été réalisées entre RsaI et RsaG en présence ou non de S1 (Alessandra Marena [figure 44](#)).



**Figure 44 : Interaction in vitro entre S1-RsaI et RsaG.** Expérience de gel retard montrant l'interaction RsaI/RsaG (gauche) et S1/RsaI/RsaG (à droite), RsaI est radiomarqué au <sup>32</sup>P et des concentrations croissances de RsaG sont ajoutées. C1 : contrôle RsaI, C2 : contrôle RsaI/S1 (expérience réalisée par Alessandra Marena).

Les résultats obtenus montrent la formation d'un complexe ternaire RsaI/RsaG/S1 avec un Kd inférieur à celui de l'interaction RsaI/RsaG. La présence de S1 augmente l'affinité entre RsaI et RsaG et semble donc favoriser cette interaction. Il serait intéressant de savoir si cela est également le cas pour l'interaction RsaI/ RsaD ou même entre RsaI et RsaE qui ne montre aucune interaction *in vitro* alors que RsaE a été retrouvé avec un fort enrichissement dans les expériences de MAPS MS2-RsaI. Il est possible que S1 perturbe la structure en pseudoknot de RsaI afin de lui permettre d'interagir avec les ARNnc.

Des expériences de toeprint ont montré que même non associé directement au ribosome, S1 favorise l'initiation de la traduction d'ARNm spécifiques comme par exemple, ceux codant les peptides PSM (Alessandra Marenna). S1 a-t-elle un effet sur la régulation des cibles des ARNnc ? Cette protéine pourrait favoriser l'appariement de RsaI à ces cibles ou au contraire empêcher leur régulation. Aucune protéine chaperonne des ARNnc n'ayant été encore identifiée chez *S. aureus* jusqu'à présent, de nombreuses hypothèses peuvent être formulées.

La protéine Hfq n'est pas essentielle pour la croissance de *S. aureus* et n'intervient pas dans les mécanismes de régulation des ARNnc, contrairement à *E. coli*. Il est donc possible que RsaI et S1 aient un rôle coopératif dans la régulation des gènes, en particulier ceux impliqués dans les mécanismes de la réponse adaptative.

#### **IV.5. Etude de l'expression des ARNnc en cellules uniques.**

L'émergence et la dissémination rapide des souches multi-résistantes aux antibiotiques, pose un réel problème dans la lutte contre *S. aureus* (Dumitrescu et al, 2010). Les principaux mécanismes de résistance comprennent : la diffusion restreinte et/ou l'efflux de l'antibiotique, son inactivation par des enzymes bactériennes, l'apparition de mutations et le phénomène de persistance. La persistance se réfère à un état d'activité métabolique réduit d'une sous-population de bactéries, ralentissant leur croissance résultant au phénotype des *small colony variant* (SCV). Les cibles des antibiotiques étant impliquées dans les processus de division cellulaire (transcription, traduction, réplication, synthèse de la paroi), leur action est inefficace sur des cellules persistantes. Les mécanismes mis en jeu dans cet état de dormance sont complexes et plusieurs voies peuvent être impliquées. Les cellules persistantes ne sont pas des mutants mais des variants phénotypiques qui peuvent réverter dès la fin du stress. L'expression génétique des cellules persistantes est hétérogène en particulier dans les voies métaboliques (Harms et al, 2016).

Jusqu'à présent, toutes les études concernant la régulation par les ARNnc ont été faites sur des populations globales. C'est le cas pour l'ARNIII, et les ARNnc étudiés dans ce projet, (RsaI, RsaD, et RsaG) dont l'expression a été suivie au sein d'une population où l'on suppose que leur concentration augmente graduellement et de manière homogène

dans toutes les cellules. Il serait intéressant d'étudier l'expression des ARNnc décrits dans le réseau ci-dessus au sein de cellules uniques au cours du temps et en conditions de stress. En répondant aux stress présents lors d'infections par *S. aureus*, ils pourraient contribuer au phénomène de la persistance bactérienne. Cela sera particulièrement intéressant dans l'étude de RsaI en présence et en absence de glucose.

La plateforme microfluidique, dirigée par M. Ryckelincx permet de suivre le comportement de *S. aureus* à l'échelle de la cellule unique. De nombreuses techniques sont en cours de développement afin d'exprimer les ARNnc d'intérêt avec un marqueur fluorescent. Les bactéries peuvent être séparées suivant plusieurs critères dont la fluorescence des cellules et leur transcriptome étudié. Cette plateforme présente également l'avantage d'étudier le comportement de *S. aureus* et de suivre l'expression d'ARN ou de protéines d'intérêt, lorsque les cellules sont soumises à un stress. Dans le cas de RsaI, il serait intéressant de visualiser si l'inhibition de son expression est totale dans toutes les cellules ou hétérogène au sein de la population.

En répondant au glucose extérieur et en régulant l'expression de plusieurs enzymes du métabolisme carboné, RsaI est un acteur important dans la réponse adaptative de *S. aureus*. Il est également directement impliqué dans la virulence de *S. aureus* en réprimant l'expression de *icaR*, impliqué dans la formation des biofilms, mais également en activant l'expression de EsxA, un facteur de virulence nécessaire pour la libération intracellulaire de *S. aureus*, dans les cellules épithéliales, en conditions infectieuses (Korea *et al*, 2014). Cet ARNnc relie indéniablement le métabolisme à la virulence de *S. aureus*.

## IV.6. Conclusion générale.

Les réactions du métabolisme central sont quasi universelles dans tous les domaines du vivant et les enzymes qui participent aux réactions sont très conservées. L'évolution des voies métaboliques se situe essentiellement dans la duplication des gènes codant pour les enzymes qui catalysent les réactions. Par exemple *S. aureus* possède dans son génome plusieurs copies du gène codant la Glyceraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase (GAPD), enzyme de la glycolyse qui convertit le glycéraldéhyde-3 phosphate (G3P) en 1,3 biphosphoglycérate (1,3BPG). Une des copies

code une GAPD particulière capable de s'associer aux sidérophores transmembranaires est impliquée dans l'acquisition du fer (Modun & Williams, 1999).

Cet exemple illustre le fait que le génome de *S. aureus* est très plastique et qu'au cours de l'évolution, ce pathogène a acquis de nombreux gènes de virulence mais a su également optimiser ses voies métaboliques pour s'adapter rapidement et apporter une réponse cellulaire rapide face à des changements environnementaux. Les mécanismes activant ou inhibant l'activité du facteur CcpA en sont un parfait exemple. Les données accumulées au cours de ce projet de thèse confirment le rôle clef des ARNnc dans la régulation du métabolisme et des gènes de virulence de *S. aureus*. Les ARNnc permettent d'établir un lien entre les différents réseaux de régulation. Ils sont particulièrement sollicités lors de changements physiologiques importants comme la formation de biofilm en permettant aux cellules d'intégrer différents signaux environnementaux. L'interaction de RsaI avec d'autres ARNnc montre que les mécanismes de régulation chez *S. aureus* sont loin d'être tous élucidés et que leur diversité est grande. Comprendre les mécanismes des réseaux de régulation devrait conduire à identifier de nouvelles cibles à visée thérapeutique et à plus long terme au développement d'une nouvelle génération de drogues pour éradiquer les infections dues à *S. aureus*.



# V - Matériel et Méthodes

---

## V.1.Souches de *Staphylococcus aureus* et plasmides utilisés

### V.1.a - Liste des souches bactériennes utilisées

Souches	Description	Phénotype	Origine
RN6390	Dérivée de la souche NCTC 8325-4 <i>agr</i> positive, possède une délétion du gène de 11pb au niveau du gène <i>rsbU</i>	<i>agr+</i> , <i>rsbU</i> -	(Peng <i>et al</i> , 1988)
RN6390Δ <i>ARNIII</i>	RN6390 délétée du gène <i>arnIII</i>	<i>ARNIII</i> -	LUG950S.Boisset (INSERMU0230, Lyon).
RN6390Δ <i>rot</i>	RN6390 délétée du gène <i>rot</i>	<i>rot</i> -	Réalisée par P.Fechter
HG001	Dérivée de la souche NCTC 8325-4- <i>rsbU</i> restauré	<i>rsbU</i> restauré	(Herbert <i>et al</i> , 2010)
HG001Δ <i>SrrAB</i>	HG001 délétée du gène <i>srrA</i> et <i>srrB</i>	<i>SrrAB</i> -	T. Msadek
HG001Δ <i>SaeRS</i>	HG001 délétée du gène <i>saeR</i> et <i>saeS</i>	<i>SaeRS</i> -	T. Msadek
HG001Δ <i>rsaD</i>	HG001 délétée du gène <i>rsaD</i>	<i>rsaD</i> -	LUG2085(INSERMU0230, Lyon).
HG001-Pcn51-MS2	HG001 transformée avec pCN51::MS2	Exprime MS2	(Tomasini <i>et al</i> , 2017)
HG001Δ <i>RsaD</i> -Pcn51-p3-MS2 <i>RsaD</i>	HG001 transformée avec pCN51::MS2 <i>RsaD</i>	Exprime MS2 fusionné à <i>rsaD</i>	Réalisée dans cette étude
HG001Δ <i>rsaD</i> -Pcn51-p3	HG001Δ <i>rsaD</i> transformée avec pCN51-p3	<i>rsaD</i> -	Réalisée dans cette étude
HG001Δ <i>rsaD</i> -Pcn51-prsaD- <i>RsaD</i>	HG001Δ <i>rsaD</i> transformée avec pCN51-prsaD- <i>RsaD</i>	<i>rsaD</i> +	Réalisée dans cette étude
HG001Δ <i>rsaG</i>	HG001 délétée du gène <i>rsaG</i>	<i>rsaG</i> -	(INSERMU0230, Lyon).
HG001-Pcn51-p3	HG001 transformée avec pCN51::P3		(Tomasini <i>et al</i> , 2017)
DC10B	Souche d' <i>E. coli</i> utilisée pour le clonage de plasmides dans <i>S. aureus</i> (système de méthylation muté)	<i>dcm</i> -	(Monk <i>et al</i> , 2012)
HG001Δ <i>S1</i> :86	HG001 délétée comportant un intron dans le gène <i>rpsa</i>	<i>S1</i> -	Réalisée par I. caldelari

***V.1.b - Liste des oligonucléotides utilisés***

Sonde DIG <i>hla</i>	T7-Hla for	GATCCCGCAAATTAATACGACTCACTATAGGGTTTGAGCTACTTGATTATCA GGTAGTTGCA
	Hla rev	CATATTAATGAATGAATCCGTCGCTAATGCCGC
Sonde DIG <i>spa</i>	T7-Spa for	GATCCCGCAAATTAATACGACTCACTATAGGGCGTTACGTTGCGCTTCGTTA AGTTAGGCA
	Spa rev	TTAGGTACATTACTTATATCTGGTGGCGTA
Sonde DIG <i>rot</i>	T7-rot for	GATCCCGCAAATTAATACGACTCACTATAGGGCTTGATTCATCCTGATTTTT TTGGTGCAAAGTC
	Rot rev	GATCCCGCAAATTAATACGACTCACTATAGGGCACTGAGTCCAAGGAACTA ACTCTACTAGC
SondeDIG ARNIII	T7-RNAIII for	GATCCCGCAAATTAATACGACTCACTATAGGGCACTGAGTCCAAGGAACTA ACTCTACTAGC
	RNAIII rev	CACAGAGATGTGATGGAAAATAGTTGATGAGTTG
Sonde DIG 5'	5S- NBanti_T7_2	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCCTGGCAGTTCCTACTCTCGCA
	5S- NBanti_REV_ 2	CCACCTGACCCCATGCCGAAC
Sonde DIG RsaD	rsaD fow	ACTTCTCAATAGAGAAGTT
	rsaD T7 DIG	TAATACGACTCACTATAGGGACATGGTAATACACTTGGCT

### V.1.c - Liste des plasmides utilisés

Pcn51	Vecteur de clonage	(Charpentier <i>et al</i> , 2004)
pUT7-icaR	Pour transcription de <i>icaR</i>	(Ruiz de los Mozos <i>et al</i> , 2013)
pT7-icaRSUBST	Pour transcription de <i>icaRSUBST</i>	(Ruiz de los Mozos <i>et al</i> , 2013)
pCN51:: <i>MS2</i>	Pour construction MS2-RsaD	(Tomasini <i>et al</i> , 2017)

## V.2. Tampons et solutions

- Bleu glycérol : 0,025% Bleu de bromophénol; 0,025% xylène cyanol ; 40% glycérol.
- Bleu urée: 0,025% Bleu de Bromophénol; 0,025% xylène cyanol ; 20% sucrose ; urée 8 M.
- Bleu formamide : 0,025% Bleu de Bromophénol ; 0,025% xylène cyanol ; 95% formamide.
- Milieu BHI : infusion cœur-cerveau (SIGMA Aldrich)
- Milieu LB : 10 g/L bactotryptone; 10 g/L NaCl; 5 g/L extraits de levure.
- Milieu LB-agar: 10 g/L bactotryptone; 10 g/L NaCl; 5 g/L extraits de levure; 15 g/L agar.
- Milieu TSB: tryptic soy broth (Fluka)
- Tampon acide maléique 10 X : 100 mM acide maléique pH 7,5; 150 mM NaCl.
- Tampon de détection (Northern) : 100 mM Tris-HCl pH 9,5 ; 100 mM NaCl.
- Tampon de lavage (Northern) : Tampon acide maléique 1X; 0,3% Tween 20.
- Tampon de lyse: 10 mM Tris HCl pH 7,5; 300 mM NaCl; 50 µg/ml lysostaphine, triton 0,025%.
- Tampon TGS (Tris-Glycine-SDS) 10X : 250 mM Tris base; 2 M glycine ; 1% SDS.
- Tampon de transfert (Western): Tris-base 0,025 M, glycine 0,2 M, méthanol 20%
- Tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) 1X: 89 mM Tris-Borate pH 8,3; 2 mM EDTA.
- Tampon SSC (sodium, sodium-citrate) 2X: 300 mM NaCl; 15 mM citrate-NaOH; pH 7.
- Solution de blocage 10X (Northern) : Tampon acide maléique 1X; 10% agent bloquant (Roche).
- Solution de blocage (Western): lait en poudre 5%; TBS.
- Solution TBS : 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5.
- Solution TBST : TSB; 0,1% tween 20.

## V.3.Outils de clonage et construction des souches

### V.3.a - Transformation et amplification de plasmides chez *E. coli* :

Les systèmes de restriction de *S. aureus* empêchent la transformation directe de plasmides issus des souches classiques d'*E. coli*. C'est pourquoi les clonages et/ou l'amplification de plasmides ont été réalisés grâce à la souche d'*E. coli* DC10B, déficiente dans le système de méthylation *dcm*, permettant ainsi la transformation directe de *S. aureus* avec ces plasmides. 100 µL de bactéries compétentes DC10B (cellules disponibles au laboratoire) sont incubées dans la glace avec 100 ng du plasmide à amplifier pendant 30 min. Les tubes sont ensuite plongés dans un bain marie à 42°C pendant 45 secondes puis immédiatement mis dans la glace pendant 5 min. Les bactéries sont cultivées à 37°C dans 1 mL de milieu LB pendant 45 minutes. Les tubes sont ensuite centrifugés et le culot bactérien est repris dans 100 µL de milieu LB qui sont ensuite étalés sur boîte LB + ampicilline. Les plasmides d'intérêts ont été purifiés soit en petite quantité, selon les indications du kit *Nucleospin plasmid Quickpure* (Macherey-Nagel) en partant d'un culot de cellules transformées issues de 2 ml de culture incubée pendant une nuit à 37°C ou en grande quantité à partir de culture de 150 mL incubée pendant une nuit à 37°C, grâce au kit *Purelink* (Invitrogen).

### V.3.b - Préparation des cellules compétentes de *S. aureus* :

200 ml de milieu BHI sont inoculés au 1/100 à partir d'une préculture *overnight* de *S. aureus*, et laissés sous agitation à 37°C jusqu'à DO 0,3 à 600nm. Les cultures sont centrifugées (3000 g, 15 min, 4°C) dans des tubes Falcon de 50 mL. Les culots bactériens sont lavés une fois avec 10 mL de sucrose 0,5 M, une fois avec 20 mL de glycérol 10% et ensuite resuspendus dans 2 mL de glycérol 10%. Les cellules peuvent être utilisées immédiatement pour les transformations ou conservées à -80°C par aliquotes de 200 µL.

### V.3.c - Transformation des cellules de *S. aureus* :

100 µl de cellules électro-compétentes sont incubées à 4°C en présence de 1-5 µg du plasmide d'intérêt pendant 30 min puis transférées dans une cuve à électroporation Biorad de largeur 0,2 cm. L'électroporation est effectuée avec l'appareil *MicroPulser* (Biorad) utilisant les paramètres suivants : 1,8 kV, 2,5 ms. Après ajout de 900 µl de

milieu TSB, les cellules sont cultivées 2h à 37°C avec agitation puis sont centrifugées (3000 g, 5 min, 4°C). L'étalement des culots resuspendus se fait sur milieu gélosé BHI-plus antibiotique suivant le plasmide utilisé pour la transformation. La présence de colonies isolées sur boîtes est vérifiée après incubation dans une étuve à 37°C pendant 1-2 jours.

#### ***V.3.d - Construction des souches***

Les plasmids pCN51::*rsaD* ont été construits par ligation d'un produit amplifié par PCR contenant RsaD et sa région promotrice, digéré par *PstI* ET *SphI* dans le vecteur pCN51 digéré par les mêmes enzymes de restrictions. Pour obtenir le plasmide pCN51::P3::MS2-*rsaD*, un produit PCR contenant le tag MS2 fusionné au 5' de RsaD a été cloné dans le plasmide pCN51::P3 par digestion du produit PCR et du plasmide par les enzymes *PstI/BamHI*. Les plasmides provenant des clones positifs ont été séquencés (GATC Biotech) avant d'être transformés dans la souche *E. coli* DC10B, puis extraits et électroporés dans la souche HG001Δ*rsaD*. L'expression de RsaD dans la souche HG001Δ*rsaD* pCN51::*rsaD* et HG001Δ*rsaD* pCN51::P3::MS2-*rsaD*, a été vérifiée par des expériences de Northern blot.

### **V.4. Analyse de l'expression des cibles de l'ARNIII**

#### ***V.4.a - Culture bactérienne***

Une préculture est réalisée à 37°C pendant la nuit sous agitation (175rpm), à partir d'une colonie prélevée sur gélose au sang. Le lendemain les cultures sont ensemencées au 1/100 dans du milieu TSB. La DO des cultures est mesurée au spectrophotomètre à 600nm toutes les heures. Des échantillons de cultures sont prélevés toutes les heures, à partir de 2h de culture jusqu'à 7h lorsque les cellules atteignent la phase stationnaire. Les échantillons sont centrifugés 10 min à 3750 g à 4°C.

## **V.4.b - Détection des ARN par Northern blot :**

### **b.1 Extraction des ARN totaux:**

Les ARN totaux sont extraits grâce au kit commercial FastRNA Pro Blue Kit (MP 116025050, en suivant les indications du protocole commercial, resuspendus dans de l'eau ultrapure, puis vérifiés sur gel agarose 1% TBE 1X en présence de guanidium thiocyanate (Sigma G9277-100G) à 20mM. 400 ng d'ARN total sont dilués dans du tampon bleu urée, chauffés 3 min à 90°C, migrés à 135V pendant 35 minutes dans du TBE 0,5X, et visualisés grâce au Geldoc EZ Imager (Biorad).

Bleu urée : urée 8 M, xylène cyanol 0,025 %; bromophénol 0,025 %, sucrose 15%

### **b.2 Construction des sondes ARN hla et spa modifiés par la digoxigénine :**

Les amorces utilisées pour générer la sonde sont conçues pour s'hybrider à l'ARN ciblé : ainsi, elles correspondent au reverse complément, derrière un promoteur T7. Une étape de PCR permet d'amplifier le gène cible, la taille du fragment amplifié étant compris entre 100 et 500 pb environ. La transcription se fait grâce au kit *DIG-RNA labelling mix* (Roche 11277073910), en utilisant 100 à 500 ng d'ADN, des NTP contenant le DIG11-UTP fournis dans le kit (cf 1x), du tampon T7 RNA polymerase (cf 1x), du DTT 5 mM, BSA 0,1 mg/mL, 40 U de RNAsin, spermidine 1 mM, et 1/10 du volume total de T7 RNA polymerase (préparée au laboratoire), le mix ayant un volume total de 20 µL. Le mélange est incubé 2h à 37°C, suivi d'un traitement à la DNase I (04716728001 10 U/µL) en ajoutant du tampon (commercial, cf 1x) pendant 15 min à 37°C. La réaction est arrêtée par 17 mM d'EDTA et du AcNa 0,3M. Les ARN-DIG sont ensuite traités au phenol/chloroforme et chloroforme/alcool isoamylique, précipités, lavés, séchés, et resuspendus dans 20 µL d'eau ultrapure. Leur taille, leur absorbance et leur intégrité sont ensuite vérifiées sur gel d'agarose 1% en présence de guanidium thiocyanate 20 mM et de BET (5% vol/vol), et migré 30min à 135V.

### **b.3 Visualisation des ARN par Northern Blot :**

Les échantillons d'ARN totaux sont préparés dans du bleu urée qsp 10 µg par piste dans un volume total de 20 µL, chauffés 5 min à 70°C puis déposés sur un gel d'agarose 1,5% contenant 20mM de guanidium thiocyanate. La migration est réalisée

dans une cuve d'électrophorèse placée à 4°C avec un voltage constant de 140 V pendant 4 h environ. Après la migration, le gel est lavé 10 min dans du tampon SSC 2X. Les ARN sont ensuite transférés sur une membrane de nitrocellulose Hybond N+ (GE healthcare) pré-incubée dans du tampon SSC 2X. Le transfert est réalisé par aspiration sous vide pendant 1 h. la membrane est ensuite cross-linkée et préhybridée dans du **tampon d'hybridation** pendant 30 min minimum à 68°C. La sonde ARN (1 µL) marquée à la digoxigénine est préalablement chauffée 5 min à 70°C dans 500 µL de tampon d'hybridation. L'hybridation est réalisée une nuit à 68°C. La membrane est ensuite lavée deux fois 5 min avec le **tampon de lavage 1** à température ambiante, puis deux fois 15 min avec le **tampon de lavage 2** à 68°C. Toutes les étapes suivantes se déroulent à température ambiante. La membrane est saturée avec du tampon de blocage pendant 30 min, puis la solution est renouvelée avec une concentration au 1/1000 d'anticorps spécifique des groupements DIG couplés à la phosphatase alcaline (Roche Applied Science). L'incubation avec les anticorps s'effectue 30 min. La membrane est lavée deux fois 15 min avec le **tampon de lavage 3** puis incubée 5 min dans le **tampon de détection**. Après ajout du substrat (CDP Star, Roche Applied Science), la membrane est scellée dans un film plastique, puis placée dans une cassette. Les résultats sont ensuite révélés par autoradiographie.

**Tampon d'hybridation** : Formamide 50%, SSC 5x, NaPO<sub>4</sub> pH 7 50 mM, blocking solution 2% (Roche 11 096 176 001 dilué dans de l'acide maléimique pH 7,5 VWR 8.00380.1000), N-Lauroyl sarcosine 0,1% (Sigma L7414), SDS 7%

**Tampon de lavage 1** : 2x SSC, 0,1% SDS

**Tampon de lavage 2** : 0,2x SSC, 0,1% SDS

SSC 20x : 3M NaCl, 300 mM Sodium Nitrate

**Tampon de lavage 3** : acide maléimique 1x (VWR 8.00380.1000), tween 20 0,3%

**Tampon de détection** : Tris pH 9,5 0,1 M, NaCl 0,1M

#### **V.4.c - Détection des protéines par western blot :**

##### **c.1 Extraction des protéines totales et cytoplasmiques :**

Après centrifugation des échantillons de cultures bactériennes, les culots bactériens sont repris dans 1 mL de tampon Tris-HCl 10 mM pH 7, puis la suspension est divisée en deux fois 500 µl permettant d'une part l'extraction des protéines totales

(protéines cytoplasmiques et membranaires) et d'autre part l'extraction des protéines cytoplasmiques. Les tubes sont centrifugés 15 min à 3000 g à 4°C. L'extraction des protéines cytoplasmiques nécessite une lyse douce des cellules. Un volume de tampon de lyse défini par rapport à la DO<sub>600nm</sub> totale selon la relation ci-dessus, est ajouté à chaque culot bactérien. Les tubes sont agités et mis à incuber à 37°C pendant 30 min puis centrifugés (15 min, 10000 g, 4°C) afin d'éliminer les membranes et les débris cellulaires. La quantité en protéines des échantillons est mesurée à l'aide d'une gamme d'étalonnage par la réaction de Bradford. La courbe d'étalonnage est réalisée à partir d'une solution mère de BSA à 1,4 mg/mL et la DO est mesurée à 595 nm.

Pour l'extraction des protéines totales, les culots bactériens sont repris dans un volume de bleu de dépôt toujours calculé par rapport à la DO<sub>600nm</sub>, puis les tubes sont chauffés 5 min à 90°C et centrifugés 15 min à 13000 g à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires. Les surnageants sont transférés dans de nouveaux tubes et les échantillons sont conservés à -20°C.

#### **c.2 Séparation des protéines par gel SDS-PAGE et Western blot:**

Les protéines sont séparées dans un gel de polyacrylamide 12% en présence de SDS à 140 V pendant 40 min dans du **Tampon TGS**, puis transférées sur une membrane de nitrocellulose. Le transfert s'effectue 1 h à 400 mA à 150 V. La membrane est ensuite incubée une nuit à 4°C avec la solution de blocage. Le lendemain, la membrane est incubée 1 h à 20°C avec l'anticorps primaire (Anticorps anti-Rot: Laboratoire Dr Frees, University of Copenhagen, Anticorps anti-HIa: Anticorps de lapin anti-hémolysine  $\alpha$  (Abcam) Anticorps anti-protéine A: utilisation de l'anticorps secondaire seul, la protéine A se fixant à la partie constante (Fc) des IgG), dans la solution de blocage. Trois lavages successifs de 10 min sont réalisés avec la solution de lavage. La membrane est ensuite incubée 1 h à 20°C avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (*Mouse anti rabbit* ECL Lot 4837492). Trois lavages de 10 min sont réalisés. La membrane ajout de 1 mL de substrat (Thermo Scientific Pierce, ECL Western Blotting Substrate). La membrane est scellée dans un film plastique et les résultats sont révélés par autoradiographie.

Gel de concentration: Tris HCl pH 6,8 80 mM, SDS 0,1%, 5% acrylamide, APS 0,1%, Temed 1/1000

Gel de migration: Tris HCl pH 8,8 500 mM, SDS 0,1%, 12% acrylamide, APS 0,1%, Temed 1/1000

Bleu de dépôt de protéine : Tris-HCl pH 6,8 60 mM, Glycérol 25 %, SDS 2 %,  $\beta$  mercaptoéthanol 5 % (0,7 M), Bleu de bromophénol 0,1 %

Tampon TGS 1x : Tris 25 mM, glycine 200 mM, SDS 0,1%

## V.5. Etude de la fonction de RsaD

### V.5.a - Expériences de stress NO

Deux flasques contenant du milieu BHI ont étéensemencées avec 1/100 d'une pré-culture sur la nuit de la souche sauvage HG001. A  $DO_{600nm}$  de 0,2, en début de phase exponentielle, 100  $\mu$ M de DEA NONOate ont été ajoutés à l'une des cultures. Les ARN totaux ont été préparés à partir d'échantillons de cultures prélevés toutes les 10 min après le stress NO. Les ARN ont été préparé comme décrit dans le chapitre « Extraction des ARN totaux ». L'électrophorèse a été réalisée sur gel d'agarose 1%, contenant 20 mM de guanidium thiocyanate en utilisant 10  $\mu$ g d'ARN total. Après transfert sur membrane de nitrocellulose, les ARN ont été détectés en utilisant des sondes DIG. La détection de l'ARNr 5S a servi de contrôle de charge.

### V.5.b - Expériences de chromatographie d'affinité MAPS

#### *b.1* Préparation des lysats

Le culot de cellules provenant de cultures de 100 ml en BHI des souches contenant un plasmide codant RsaD avec l'étiquette MS2 en 5', est repris dans 8 ml de tampon A, puis transféré dans un tube Falcon de 50 ml contenant 5,6 g de billes de verre. Les tubes sont placés dans l'appareil Fastprep (MP Biomedicals) et sont agités pendant 40 secondes à froid, pour lyser les bactéries.

#### *b.2* Préparation des colonnes

Une colonne de polypropylène (Biorad) (une par échantillon) est lavée avec de l'eau MilliQ. La matrice de billes d'amylose (600  $\mu$ l) couplées au maltose (New England BioLabs) est déposée dans la colonne qui est ensuite lavée trois fois avec 10 ml de tampon A. Une quantité totale de 7,1 nanomoles de protéine de fusion CP-MBP y est ajoutée.

### **b.3 Purification des complexes contenant l'ARN chimère**

La purification se déroule à 4°C. La totalité du lysat appelé « *crude extract* » (CE) provenant d'une culture de 100 ml est déposé sur la colonne. Les fractions sont récoltées par gravité. L'ensemble des molécules non retenues par la matrice est récupéré et constitue la fraction appelée « *flow through* » (FT). La colonne est ensuite lavée cinq fois avec 10 ml de tampon A et les fractions de lavage correspondantes sont récupérées (*Washing*, W). Les complexes ribonucléoprotéiques retenus par la protéine CP-MBP fixée à la matrice sont ensuite élués avec 2 ml de tampon E contenant du maltose (12 mM). La fraction récupérée est appelée élution (EL). La totalité de EL est utilisée pour la purification des ARN par un traitement au phénol/chloroforme, puis chloroforme :alcool isoamylique, et précipitation à l'éthanol. Sur les fractions FT et W, 1 ml est utilisé pour les expériences de contrôle. Les ARN sont visualisés par Northern blot.

## **V.5.c - Expériences de protéomique comparative**

### **c.1 Conditions de culture et croissance et extraction des protéines**

Une préculture dans du BHI à 37°C sous agitation (175rpm) pendant toute la nuit à été réalisé pour chaque souche et chaque triplicat à partir d'une colonie isolée différente (réplica biologique). 50mL de BHI a étéensemencé au 1/100 à partir des précultures. Les cellules ont poussé pendant 6H puis centrifugées 15 minutes à 3750 rpm. Les culots cellulaires ont été lavés avec du tris HCl 10 mM pH 7,5, par centrifugation (3750 rpm pendant 15 min) puis repris dans 5mL de tampon de lyse contenant 10mM tris HCl pH 7,5 à 20°C, 20mM NaCl, 1mM EDTA, 5mM.

### **c.2 Analyse de la 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.

### **c.3 Identification des peptides par bioinformatique**

L'ensemble de ces données expérimentales de fragmentation MSMS est comparé à une banque de spectres MSMS théoriques de l'organisme bactérien de référence (*S. aureus* MG1655, *Swissprot*). 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 réverse des séquences protéiques de *S. aureus* est fusionnée à celle de l'organisme de référence. Dans le listing final d'identification, classé par score Mascot décroissant, les hits réverses 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.

## **V.6. Etude de la fonction de RsaI**

Le matériel et méthode, les souches et amorces utilisées pour l'étude de RsaI sont répertoriés dans la section matériel et méthode du manuscrit (Chapitre III résultats partie 2). Cette partie ne concerne que les expériences répertoriées en annexe.

### **V.6.a - Transcription in vitro**

Un volume de 1 mL de mix de transcription *in vitro* contenant 100 µg de plasmide linéarisé ou 5 µg de produit PCR est incubé pendant 2h30 à 37°C. La digestion de l'ADN matrice se fait par ajout de 75 U de DNase I (RNase free, Roche, 10 U/µL, 4716728001) et de 100 µL de tampon DNase dilué (tampon commercial cf 1x) pendant 1h à 37°C. Pour dissoudre le pyrophosphate généré, 45 mM d'EDTA est ajouté au mélange réactionnel. L'ARN est ensuite traité par deux extractions au phénol/chloroforme (24:1 vol/vol). Chaque extraction se déroule de la manière suivante : 1 volume (vol) de phénol/chloroforme est ajouté et l'échantillon est fortement mélangé au vortex pendant

2 min, et après centrifugation (2 min, 12000 g, 4°C), la phase aqueuse est récupérée dans un nouveau tube eppendorf. Un traitement par une extraction au chloroforme/alcool isoamylique (19:1 vol/vol) en suivant le même protocole permet d'éliminer les traces de phénol. L'ARN contenu dans la phase aqueuse est ensuite précipité par ajout d'acétate de sodium (300 mM final) et 2,5 vol d'éthanol absolu. Après mélange de la solution, la précipitation est réalisée dans un bain d'éthanol-carboglâce pendant 30 min. L'ARN précipité est centrifugé (20 min, 4°C, 19000 g), le surnageant est retiré et le culot est lavé par 400 µL d'éthanol 80 %. Après centrifugation (10 min, 4°C, 13000 g), l'étape de lavage est renouvelée. Le culot est ensuite séché par évaporation sous vide et le culot d'ARN est repris dans 40 µL de bleu urée. Après incubation de 3 min à 90°C, l'ARN est purifié par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide 8 % (1:19 bis-acrylamide:acrylamide)-urée 8 M-TBE 1x qui a subi une pré-migration de 30 min à 22 mA. Le pourcentage du gel dépend de la taille de l'ARN à visualiser. La migration s'effectue à 22 mA selon une durée adaptée à la taille du fragment (3h pour 100nt par exemple). L'ARN est visualisé par UV, le gel est alors découpé et l'ARN est élué dans 400 µL de tampon d'éluion + 100 µL de phénol à 4°C pendant la nuit sous agitation. L'éluat est récupéré, et la bande de gel est retraitée avec du tampon d'éluion (135 µl) en présence de phénol (15 µl) pendant environ 1h30 à 4°C. Les deux éluats sont combinés puis l'ARN est extrait par un traitement au phénol/chloroforme puis au chloroforme/alcool isoamylique comme décrit ci-dessus. Après précipitation de l'ARN et lavage, le culot est dissous dans 40 µL d'eau milliQ et stocké à -20°C. La concentration de l'ARN est déterminée par la mesure de la densité optique à 260 nm sachant que 1 unité  $DO_{260nm} = 40 \mu\text{g/mL}$  d'ARN. La pureté de l'ARN est ensuite vérifiée sur un mini-gel de polyacrylamide 8 %-urée 8 M-TBE 1x.

Mix transcription *in vitro* : tampon T7 1x, DTT 5mM, BSA 0,1mg/mL, RNasin (promega N251B) 100 U, spermidine 1 mM, ATP UTP CTP GTP GMP 4mM chacun, ADN, 5 µL de T7 ARN polymérase (préparée dans l'équipe, 18 ng/µL, environ  $1 \times 10^6$  U/mg), dans un volume final de 250 µL.

Tampon d'éluion des ARN :  $\text{NH}_4\text{Ac}$  500 mM, EDTA 1 mM

### **a.1**      **Vérification de l'intégrité de l'ARN sur gel**

La pureté de l'ARN est vérifiée par électrophorèse sur un mini-gel de polyacrylamide X %-urée 8 M-TBE 1x. Le pourcentage du gel dépend de la taille de l'ARN à visualiser, souvent entre 6 et 12%. L'ARN (0,2 µg), mélangé à 1 vol de bleu urée, est chauffé 3 min à 90°C, puis déposé sur le gel qui a subi une pré-migration de 30 min à 200 V. La migration se fait à 200 V dans du tampon TBE 1x pendant un temps adapté à la taille de l'ARN. Dans le cas d'un ARNm non marqué, la coloration se fait pendant 30 min dans un bain de **stains all** et la décoloration dans l'eau milliQ est réalisée à la lumière du jour du gel, l'ARN apparaît alors coloré en violet.

**Stains all**: dissoudre 15 mg de stains all (Sigma-Aldrich E9379) dans 1 L d'eau contenant 10 % diméthylformamide. Garder la solution de couleur parme à l'obscurité.

### **V.6.b -**      **Traduction in vitro**

Le kit PURExpress (*New england BioLabs* ref: E6800S) a été utilisé selon le protocole commercial en présence de Met-S<sup>35</sup>. Le mélange réactionnel est réduit à 10 µL, l'ARNm utilisé est *icaR*, transcrit à partir du plasmide pUT7-*icaR*, à 10pmol en présence d'une quantité croissante de RsaI (0 à 30 pmol). Le mélange réactionnel est incubé 2h à 37°C, puis chargé sur un gel SDS-PAGE 15%, coloré au bleu de coomassie. Le gel est séché et mis au contact d'un film autoradiographique. La présence de bandes aspécifiques présente dans tous les échantillons, permet de normaliser le signal. Un control positif à été utilisé en utilisant l'ARNm *icaRSUBST*, transcrit à partir du plasmide pT7-*icaRSUBST*, pour visualiser une augmentation de la traduction de IcaR.



## **VI - Références Bibliographiques**

---



- Andrey DO, Jousselin A, Villanueva M, Renzoni A, Monod A, Barras C, Rodriguez N & Kelley WL (2015) Impact of the regulators SigB, rot, SarA and sarS on the toxic shock tst promoter and TSST-1 expression in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* **10**:
- Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME & Shirtliff ME (2011) *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence* **2**: 445–459
- Beisel CL & Storz G (2010) Base pairing small RNAs and their roles in global regulatory networks. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**: 866–882
- Bobrovskyy M & Vanderpool CK (2014) The small RNA SgrS: roles in metabolism and pathogenesis of enteric bacteria. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **4**: 61
- Bohn C, Rigoulay C, Chabelskaya S, Sharma CM, Marchais A, Skorski P, Borezée-Durant E, Barbet R, Jacquet E, Jacq A, Gautheret D, Felden B, Vogel J & Bouloc P (2010) Experimental discovery of small RNAs in *Staphylococcus aureus* reveals a riboregulator of central metabolism. *Nucleic Acids Res.* **38**: 6620–6636
- Bokarewa MI, Jin T & Tarkowski A (2006) *Staphylococcus aureus*: Staphylokinase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**: 504–509
- Bosi E, Monk JM, Aziz RK, Fondi M, Nizet V & Palsson BØ (2016) Comparative genome-scale modelling of *Staphylococcus aureus* strains identifies strain-specific metabolic capabilities linked to pathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*: 201523199
- Boyle-Vavra S, Yin S & Daum RS (2006) The VraS/VraR two-component regulatory system required for oxacillin resistance in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **262**: 163–171
- Bravo-Molina A, Linares-Palomino JP, Lozano-Alonso S, Asensio-Garcia R, Ros-De E & Hernandez-Quero J (2016) Influence of wound scores and microbiology on the outcome of the diabetic foot syndrome. *J. Diabetes Complications* **30**: 329–334
- Brielle R, Pinel-Marie ML & Felden B (2016) Linking bacterial type I toxins with their actions. *Curr. Opin. Microbiol.* **30**: 114–121
- ten Broeke-Smits NJP, Pronk TE, Jongerius I, Bruning O, Wittink FR, Breit TM, van Strijp JAG, Fluit AC & Boel CHE (2010) Operon structure of *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res.* **38**: 3263–3274
- Bronesky D, Wu Z, Marzi S, Walter P, Geissmann T, Moreau K, Vandenesch F, Caldelari I & Romby P (2016) *Staphylococcus aureus* RNAlII and Its Regulon Link Quorum Sensing, Stress Responses, Metabolic Adaptation, and Regulation of Virulence Gene Expression. *Annu. Rev. Microbiol.* **70**: 299–316

- Bronsard J, Pascreau G, Sassi M, Mauro T, Augagneur Y, Felden B. (2017) sRNA and cis-antisense sRNA identification in *Staphylococcus aureus* highlights an unusual sRNA gene cluster with one encoding a secreted peptide. *Sci Rep.* Jul 4;7(1):4565.
- Brunskill EW & Bayles KW (1996) Identification and molecular characterization of a putative regulatory locus that affects autolysis in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **178**: 611–618
- Burda WN, Miller HK, Krute CN, Leighton SL, Carroll RK & Shaw LN (2014) Investigating the genetic regulation of the ECF sigma factor  $\sigma_S$  in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* **14**: 280
- Caldelari I, Chao Y, Romby P & Vogel J (2013) RNA-mediated regulation in pathogenic bacteria. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**:
- Caldelari I, Chane-Woon-Ming B., Noirot C., Moreau K., Romby P., Gaspin C. and Marzi S. (2017). Complete genome sequence and annotation of the *Staphylococcus aureus* strain HG001. *Genome Announc.* 5:e00783-17
- Chao Y & Vogel J (2016) A 3' UTR-Derived Small RNA Provides the Regulatory Noncoding Arm of the Inner Membrane Stress Response. *Mol. Cell* **61**: 352–363
- Cheung AL, Nishina KA, Trottonda MP & Tamber S (2008) The SarA protein family of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**: 355–361
- Crooke AK, Fuller JR, Obrist MW, Tomkovich SE, Vitko NP & Richardson AR (2013) CcpA-Independent Glucose Regulation of Lactate Dehydrogenase 1 in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* **8**:
- Dalebroux ZD & Swanson MS (2012) ppGpp: magic beyond RNA polymerase. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**: 203–212
- Deigan KE & Ferré-D'Amaré AR (2011) Riboswitches: Discovery of drugs that target bacterial gene-regulatory RNAs. *Acc. Chem. Res.* **44**: 1329–1338
- Delaune A, Poupel O, Mallet A, Coic YM, Msadek T & Dubrac S (2011) Peptidoglycan crosslinking relaxation plays an important role in *Staphylococcus aureus* walkr-dependent cell viability. *PLoS One* **6**:
- Deppe VM, Bongaerts J, O'Connell T, Maurer KH & Meinhardt F (2011) Enzymatic deglycation of Amadori products in bacteria: Mechanisms, occurrence and physiological functions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **90**: 399–406
- Ding Y, Liu X, Chen F, Di H, Xu B, Zhou L, Deng X, Wu M, Yang C-G & Lan L (2014) Metabolic sensor governing bacterial virulence in *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**: E4981–E4990

- Dinges MM, Orwin PM & Schlievert PM (2000) Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**: 16–34
- Dumitrescu O, Dauwalder O, Boisset S, Reverdy ME, Tristan A & Vandenesch F (2010) *Staphylococcus aureus* resistance to antibiotics: key points in 2010]. *Médecine Sci.* **26**: 943–949
- Durand S, Braun F, Helfer AC, Romby P & Condon C (2017) sRNA-mediated activation of gene expression by inhibition of 5'-3' exonucleolytic mRNA degradation. *Elife* **6**:
- Durand S, Braun F, Lioliou E, Romilly C, Helfer AC, Kuhn L, Quittot N, Nicolas P, Romby P & Condon C (2015) A nitric oxide regulated small RNA controls expression of genes involved in redox homeostasis in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genet.* **11**: e1004957
- Duval M, Korepanov A, Fuchsbauer O, Fechter P, Haller A, Fabbretti A, Choulier L, Micura R, Klaholz BP, Romby P, Springer M & Marzi S (2013) Escherichia coli Ribosomal Protein S1 Unfolds Structured mRNAs Onto the Ribosome for Active Translation Initiation. *PLoS Biol.* **11**:
- Falord M, Karimova G, Hiron A & Msadeka T (2012) GraXSR proteins interact with the *VraFG* ABC transporter to form a five-component system required for cationic antimicrobial peptide sensing and resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**: 1047–1058
- Felden B, Vandenesch F, Bouloc P & Romby P (2011) The *Staphylococcus aureus* RNome and its commitment to virulence. *PLoS Pathog.* **7**:
- Ferreira MT, Manso AS, Gaspar P, Pinho MG & Neves AR (2013) Effect of Oxygen on Glucose Metabolism: Utilization of Lactate in *Staphylococcus aureus* as Revealed by In Vivo NMR Studies. *PLoS One* **8**:
- Foster TJ (2005) Immune evasion by staphylococci. *Nat.Rev.Microbiol.* **3**: 948–958
- Fothergill-Gilmore (1993). Evolution of glycolysis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* Volume 59, Issue 2, Pages 105-235
- Fournier B, Klier A & Rapoport G (2001) The two-component system *ArlS-ArlR* is a regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **41**: 247–261
- Garzoni C, Francois P, Huyghe A, Couzinet S, Tapparel C, Charbonnier Y, Renzoni A, Lucchini S, Lew DP, Vaudaux P, Kelley WL & Schrenzel J (2007) A global view of *Staphylococcus aureus* whole genome expression upon internalization in human epithelial cells. *BMC Genomics* **8**: 171

- Gaupp R, Ledala N & Somerville GA (2012) Staphylococcal response to oxidative stress. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2**: 33
- Geiger T, Goerke C, Mainiero M, Kraus D & Wolz C (2008) The virulence regulator sae of *Staphylococcus aureus*: Promoter activities and response to phagocytosis-related signals. *J. Bacteriol.* **190**: 3419–3428
- Geiger T & Wolz C (2014) Intersection of the stringent response and the CodY regulon in low GC Gram-positive bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* **304**: 150–155
- Geisinger E, Chen J & Novick RP (2012) Allele-dependent differences in quorum-sensing dynamics result in variant expression of virulence genes in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **194**: 2854–2864
- Geissmann T, Chevalier C, Cros MJ, Boisset S, Fechter P, Noirot C, Schrenzel J, François P, Vandenesch F, Gaspin C & Romby P (2009) A search for small noncoding RNAs in *Staphylococcus aureus* reveals a conserved sequence motif for regulation. *Nucleic Acids Res.* **37**: 7239–7257
- Gertz S, Engelmann S, Schmid R, Ziebandt a K, Tischer K, Scharf C, Hacker J & Hecker M (2000) Characterization of the sigma(B) regulon in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **182**: 6983–91
- Giachino P, Engelmann S & Bischoff M (2001)  $\sigma$ B activity depends on RsbU in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **183**: 1843–1852
- Gill SR, Fouts DE, Archer GL, Mongodin EF, DeBoy RT, Ravel J, Paulsen IT, Kolonay JF, Brinkac L, Beanan M, Dodson RJ, Daugherty SC, Madupu R, Angiuoli S V., Durkin AS, Haft DH, Vamathevan J, Khouri H, Utterback T, Lee C, et al (2005) Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J. Bacteriol.* **187**: 2426–2438
- Giraud AT, Cheung AL & Nagel R (1997) The sae locus of *Staphylococcus aureus* controls exoprotein synthesis at the transcriptional level. *Arch. Microbiol.* **168**: 53–58
- Gómez MI, Lee A, Reddy B, Muir A, Soong G, Pitt A, Cheung A & Prince A (2004) *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. *Nat. Med.* **10**: 842–8
- Görke B & Stülke J (2008) Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 613–24
- Görke B & Vogel J (2008) Noncoding RNA control of the making and breaking of sugars. *Genes Dev.* **22**: 2914–2925

- Griveau S, Dumézy C, Goldner P & Bedioui F (2007) Electrochemical analysis of the kinetics of nitric oxide release from two diazeniumdiolates in buffered aqueous solutions. *Electrochem. commun.* **9**: 2551–2556
- Guillier M & Gottesman S (2008) The 5' end of two redundant sRNAs is involved in the regulation of multiple targets, including their own regulator. *Nucleic Acids Res.* **36**: 6781–6794
- Gustafsson E & Oscarsson J (2008) Maximal transcription of *aur* (aureolysin) and *sspA* (serine protease) in *Staphylococcus aureus* requires staphylococcal accessory regulator R (*sarR*) activity. *FEMS Microbiol. Lett.* **284**: 158–164
- Hall-Stoodley L & Stoodley P (2009) Evolving concepts in biofilm infections. *Cell. Microbiol.* **11**: 1034–1043
- Halsey CR, Lei S, Wax JK, Lehman MK, Nuxoll AS, Steinke L, Sadykov M, Powers R & Fey PD (2017) Amino acid catabolism in *Staphylococcus aureus* and the function of carbon catabolite repression. *MBio* **8**:
- Harms A, Maisonneuve E & Gerdes K (2016) Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. *Science (80-. ).* **354**:
- Harraghy N, Hussain M, Hagggar A, Chavakis T, Sinha B, Herrmann M & Flock JI (2003) The adhesive and immunomodulating properties of the multifunctional *Staphylococcus aureus* protein Eap. *Microbiology* **149**: 2701–2707
- Hartmann T, Baronian G, Nippe N, Voss M, Schulthess B, Wolz C, Eisenbeis J, Schmidt-Hohagen K, Gaupp R, Sunderkötter C, Beisswenger C, Bals R, Somerville GA, Herrmann M, Molle V & Bischoff M (2014) The catabolite control protein E (CcpE) affects virulence determinant production and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **289**: 29701–29711
- Herbert S, Bera A, Nerz C, Kraus D, Peschel A, Goerke C, Meehl M, Cheung A & Götz F (2007) Molecular basis of resistance to muramidase and cationic antimicrobial peptide activity of lysozyme in staphylococci. *PLoS Pathog.* **3**: 0981–0994
- Hiron A, Falord M, Valle J, Débarbouillé M & Msadek T (2011) Bacitracin and nisin resistance in *Staphylococcus aureus*: A novel pathway involving the BraS/BraR two-component system (SA2417/SA2418) and both the BraD/BraE and VraD/VraE ABC transporters. *Mol. Microbiol.* **81**: 602–622
- Hochgräfe F, Wolf C, Fuchs S, Liebeke M, Lalk M, Engelmann S & Hecker M (2008) Nitric oxide stress induces different responses but mediates comparable protein thiol protection in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **190**: 4997–5008

- Honda H, Krauss MJ, Coopersmith CM, Kollef MH, Richmond AM, Fraser VJ & Warren DK (2010) *Staphylococcus aureus* nasal colonization and subsequent infection in intensive care unit patients: does methicillin resistance matter? *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **31**: 584–91
- Howden BP, Beaume M, Harrison PF, Hernandez D, Schrenzel J, Seemann T, Francois P & Stinear TP (2013) Analysis of the small RNA transcriptional response in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* after antimicrobial exposure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**: 3864–3874
- Huntzinger E, Boisset S, Saveanu C, Benito Y, Geissmann T, Namane A, Lina G, Etienne J, Ehresmann B, Ehresmann C, Jacquier A, Vandenesch F & Romby P (2005) *Staphylococcus aureus* RNAIII and the endoribonuclease III coordinately regulate spa gene expression. *EMBO J.* **24**: 824–35
- Ibarra JA, Pérez-Rueda E, Carroll RK & Shaw LN (2013) Global analysis of transcriptional regulators in *Staphylococcus aureus*. *BMC Genomics* **14**: 126
- Jeong DW, Cho H, Lee H, Li C, Garza J, Fried M & Bae T (2011) Identification of the P3 promoter and distinct roles of the two promoters of the SaeRS two-component system in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **193**: 4672–4684
- Kaneko J & Kamio Y (2004) Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* **68**: 981–1003
- King BF & Wilkinson BJ (1981) Binding of human immunoglobulin G to protein A in encapsulated *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **33**: 666–672
- Kinkel TL, Roux CM, Dunman PM & Fang FC (2013) The *Staphylococcus aureus* SrrAB two-component system promotes resistance to nitrosative stress and hypoxia. *MBio* **4**:
- Kluytmans J, van Belkum A & Verbrugh H (1997) Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**: 505–20
- Ko YP, Liang X, Wayne Smith C, Degen JL & Höök M (2011) Binding of Efb from *Staphylococcus aureus* to fibrinogen blocks neutrophil adherence. *J. Biol. Chem.* **286**: 9865–9874
- Kolar SL, Nagarajan V, Oszmiana A, Rivera FE, Miller HK, Davenport JE, Riordan JT, Potempa J, Barber DS, Koziel J, Elasri MO & Shaw LN (2011) NsaRS is a cell-envelope-stress-sensing two-component system of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* **157**: 2206–2219

- Korea CG, Balsamo G, Pezzicoli A, Merakou C, Tavarini S, Bagnoli F, Serruto D & Unnikrishnan M (2014) Staphylococcal Esx proteins modulate apoptosis and release of intracellular *Staphylococcus aureus* during infection in epithelial cells. *Infect. Immun.* **82**: 4144–4153
- Krismer B, Liebeke M, Janek D, Nega M, Rautenberg M, Hornig G, Unger C, Weidenmaier C, Lalk M & Peschel A (2014) Nutrient Limitation Governs *Staphylococcus aureus* Metabolism and Niche Adaptation in the Human Nose. *PLoS Pathog.* **10**:
- Kuroda M, Kuroda H, Oshima T, Takeuchi F, Mori H & Hiramatsu K (2003) Two-component system VraSR positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **49**: 807–821
- Lalaouna D & Massé E (2015) Identification of sRNA interacting with a transcript of interest using MS2-affinity purification coupled with RNA sequencing (MAPS) technology. *Genomics Data* **5**: 136–138
- Lappin E & Ferguson AJ (2009) Gram-positive toxic shock syndromes. *Lancet Infect. Dis.* **9**: 281–290
- Lasa I, Toledo-Arana A, Dobin A, Villanueva M, de los Mozos IR, Vergara-Irigaray M, Segura V, Fagegaltier D, Penades J, Valle J, Solano C & Gingeras TR (2011) Genome-wide antisense transcription drives mRNA processing in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**: 20172–20177
- Leiba J, Hartmann T, Cluzel ME, Cohen-Gonsaud M, Delolme F, Bischoff M & Molle V (2012) A novel mode of regulation of the *Staphylococcus aureus* catabolite control protein A (CcpA) mediated by Stk1 protein phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **287**: 43607–43619
- Lioliou E, Sharma CM, Caldelari I, Helfer AC, Fechter P, Vandenesch F, Vogel J & Romby P (2012) Global regulatory functions of the *Staphylococcus aureus* endoribonuclease III in gene expression. *PLoS Genet.* **8**:
- Lo W-T & Wang C-C (2011) Pantone-Valentine leukocidin in the pathogenesis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Pediatr. Neonatol.* **52**: 59–65
- López D, Vlamakis H & Kolter R (2010) Biofilms. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**:
- Majerczyk CD, Dunman PM, Luong TT, Lee CY, Sadykov MR, Somerville GA, Bodi K & Sonenshein AL (2010) Direct targets of CodY in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **192**: 2861–2877

- Majerczyk CD, Sadykov MR, Luong TT, Lee C, Somerville GA & Sonenshein AL (2008) *Staphylococcus aureus* CodY negatively regulates virulence gene expression. *J. Bacteriol.* **190**: 2257–2265
- Manna AC & Cheung AL (2006) Expression of SarX, a negative regulator of agr and exoprotein synthesis, is activated by MgrA in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **188**: 4288–4299
- Marchais A, Bohn C, Bouloc P & Gautheret D (2010) RsaOG, a new staphylococcal family of highly transcribed non-coding RNA. *RNA Biol.* **7**: 116–9
- Maurer T, Meier S, Kachel N, Munte CE, Hasenbein S, Koch B, Hengstenberg W & Kalbitzer HR (2004) High-resolution structure of the histidine-containing phosphocarrier protein (HPr) from *Staphylococcus aureus* and characterization of its interaction with the bifunctional HPr kinase/phosphorylase. *J. Bacteriol.* **186**: 5906–5918
- Menestrina G, Dalla Serra M, Comai M, Coraiola M, Viero G, Werner S, Colin DA, Monteil H & Prevost G (2003) Ion channels and bacterial infection: the case of beta-barrel pore-forming protein toxins of *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett.* **552**: 54–60
- Menzies BE (2003) The role of fibronectin binding proteins in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **16**: 225–9
- Modun B & Williams P (1999) The staphylococcal transferrin-binding protein is a cell wall glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Infect. Immun.* **67**: 1086–1092
- Mootz JM, Benson MA, Heim CE, Crosby HA, Kavanaugh JS, Dunman PM, Kielian T, Torres VJ & Horswill AR (2015) Rot is a key regulator of *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Mol. Microbiol.* **96**: 388–404
- Morfeldt E, Taylor D, von Gabain a & Arvidson S (1995) Activation of alpha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the trans-encoded antisense RNA, RNAIII. *EMBO J.* **14**: 4569–4577
- Mulhbacher J, St-Pierre P & Lafontaine DA (2010) Therapeutic applications of ribozymes and riboswitches. *Curr. Opin. Pharmacol.* **10**: 551–556
- Muller LMAJ, Gorter KJ, Hak E, Goudzwaard WL, Schellevis FG, Hoepelman AIM & Rutten GEHM (2005) Increased risk of common infections in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Clin. Infect. Dis.* **41**: 281–8
- Nitzan M, Fechter P, Peer A, Altuvia Y, Bronesky D, Vandenesch F, Romby P, Biham O & Margalit H (2015) A defense-offense multi-layered regulatory switch in a pathogenic bacterium. *Nucleic Acids Res.* **43**: 1357–1369
- Novick RP & Geisinger E (2008) Quorum sensing in staphylococci. *Annu.Rev.Genet.* **42**: 541–564

- Novick RP, Ross HF, Projan SJ, Kornblum J, Kreiswirth B & Moghazeh S (1993) Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J.* **12**: 3967–3975
- O’Riordan K & Lee JC (2004) *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharides. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**: 218–234
- Otto M (2008) Staphylococcal biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **322**: 207–228
- Pagels M, Fuchs S, Pané-Farré J, Kohler C, Menschner L, Hecker M, McNamarra PJ, Bauer MC, Von Wachenfeldt C, Liebeke M, Lalk M, Sander G, Von Eiff C, Proctor RA & Engelmann S (2010) Redox sensing by a Rex-family repressor is involved in the regulation of anaerobic gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **76**: 1142–1161
- Papenfort K, Sun Y, Miyakoshi M, Vanderpool CK & Vogel J (2013) Small RNA-mediated activation of sugar phosphatase mRNA regulates glucose homeostasis. *Cell* **153**: 426–437
- Pragman AA & Schlievert PM (2004) Virulence regulation in *Staphylococcus aureus*: The need for in vivo analysis of virulence factor regulation. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **42**: 147–154
- Qin L, McCausland JW, Cheung GYC & Otto M (2016) PSM-Mec-A virulence determinant that connects transcriptional regulation, virulence, and antibiotic resistance in staphylococci. *Front. Microbiol.* **7**:
- Queck SY, Jameson-Lee M, Villaruz AE, Bach THL, Khan BA, Sturdevant DE, Ricklefs SM, Li M & Otto M (2008) RNAIII-Independent Target Gene Control by the agr Quorum-Sensing System: Insight into the Evolution of Virulence Regulation in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Cell* **32**: 150–158
- Rich J & Lee JC (2005) The pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infection in the diabetic NOD mouse. *Diabetes* **54**: 2904–2910
- Richards JJ & Melander C (2009) Controlling bacterial biofilms. *ChemBioChem* **10**: 2287–2294
- Richardson AR, Libby SJ & Fang FC (2008) A nitric oxide-inducible lactate dehydrogenase enables *Staphylococcus aureus* to resist innate immunity. *Science (80-. ).* **319**: 1672–1676
- Richardson AR, Somerville GA & Sonenshein AL (2015) Regulating the Intersection of Metabolism and Pathogenesis in Gram-positive Bacteria. *Microbiol. Spectr.* **3**: 1–27

- Rieger-Fackeldey E, Plano LRW, Kramer A & Schulze A (2002) Staphylococcal scalded skin syndrome related to an exfoliative toxin A- and B-producing strain in preterm infants. *Eur. J. Pediatr.* **161**: 649–652
- Righetti F & Narberhaus F (2014) How to find RNA thermometers. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **4**: 132
- Romilly C, Lays C, Tomasini A, Caldelari I, Benito Y, Hammann P, Geissmann T, Boisset S, Romby P & Vandenesch F (2014) A Non-Coding RNA Promotes Bacterial Persistence and Decreases Virulence by Regulating a Regulator in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog.* **10**:
- Rosenstein R & Götz F (2000) Staphylococcal lipases: Biochemical and molecular characterization. *Biochimie* **82**: 1005–1014
- Ruiz de los Mozos I, Vergara-Irigaray M, Segura V, Villanueva M, Bitarte N, Saramago M, Domingues S, Arraiano CM, Fechter P, Romby P, Valle J, Solano C, Lasa I & Toledo-Arana A (2013) Base Pairing Interaction between 5'- and 3'-UTRs Controls *icaR* mRNA Translation in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Genet.* **9**:
- Saïd-Salim B, Dunman PM, McAleese FM, Macapagal D, Murphy E, McNamara PJ, Arvidson S, Foster TJ, Projan SJ & Kreiswirth BN (2003) Global regulation of *Staphylococcus aureus* genes by Rot. *J. Bacteriol.* **185**: 610–619
- Seidl K, Goerke C, Wolz C, Mack D, Berger-Bächi B & Bischoff M (2008) *Staphylococcus aureus* CcpA affects biofilm formation. *Infect. Immun.* **76**: 2044–2050
- Seidl K, Müller S, François P, Kriebitzsch C, Schrenzel J, Engelmann S, Bischoff M & Berger-Bächi B (2009) Effect of a glucose impulse on the CcpA regulon in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* **9**: 95
- Shaw LN, Aish J, Davenport JE, Brown MC, Lithgow JK, Simmonite K, Crossley H, Travis J, Potempa J & Foster SJ (2006) Investigations into  $\sigma_B$ -mediated regulatory pathways governing extracellular virulence determinant production in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **188**: 6070–6080
- Sickmier EA, Brekasis D, Paranawithana S, Bonanno JB, Paget MSB, Burley SK & Kielkopf CL (2005) X-ray structure of a Rex-family repressor/NADH complex insights into the mechanism of redox sensing. *Structure* **13**: 43–54
- Somerville GA & Proctor RA (2009) At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in staphylococci. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **73**: 233–248
- Soutourina O, Dubrac S, Poupel O, Msadek T & Martin-Verstraete I (2010) The pleiotropic *cymr* regulator of *Staphylococcus aureus* plays an important role in virulence and stress response. *PLoS Pathog.* **6**: 1–13

- Stauff DL, Torres VJ & Skaar EP (2007) Signaling and DNA-binding activities of the *Staphylococcus aureus* HssR-HssS two-component system required for heme sensing. *J. Biol. Chem.* **282**: 26111–26121
- Stock AM, Robinson VL & Goudreau PN (2000) Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **69**: 183–215
- Storz G, Vogel J & Wassarman KM (2011) Regulation by Small RNAs in Bacteria: Expanding Frontiers. *Mol. Cell* **43**: 880–891
- Sun J-L, Zhang S-K, Chen J-Y & Han B-Z (2012) Metabolic profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under aerobic and anaerobic conditions with (1)H NMR-based nontargeted analysis. *Can. J. Microbiol.* **58**: 709–18
- Szafranska AK, Oxley APA, Chaves-Moreno D, Horst SA, Roßlenbroich S, Peters G, Goldmann O, Rohd M, Sinha B, Pieper DH, Löffler B, Jauregui R, Wos-Oxley ML & Medina E (2014) High-resolution transcriptomic analysis of the adaptive response of *Staphylococcus aureus* during acute and chronic phases of osteomyelitis. *MBio* **5**:
- Tamer A, Karabay O & Ekerbicer H (2006) *Staphylococcus aureus* nasal carriage and associated factors in type 2 diabetic patients. *Jpn. J. Infect. Dis.* **59**: 10–14
- Taylor PL, Blakely KM, De Leon GP, Walker JR, McArthur F, Evdokimova E, Zhang K, Valvano MA, Wright GD & Junop MS (2008) Structure and function of sedoheptulose-7-phosphate isomerase, a critical enzyme for lipopolysaccharide biosynthesis and a target for antibiotic adjuvants. *J. Biol. Chem.* **283**: 2835–2845
- Teng YTA, Nguyen H, Gao X, Kong YY, Gorczynski RM, Singh B, Ellen RP & Penninger JM (2000) Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *J. Clin. Invest.* **106**:
- Tomasini A, Francois P, Howden BP, Fechter P, Romby P & Caldelari I (2014) The importance of regulatory RNAs in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Genet. Evol.* **21**: 616–626
- Tomasini A, Moreau K, Chicher J, Geissmann T, Vandenesch F, Romby P, Marzi S, Caldelari I (2017) The RNA targetome of *Staphylococcus aureus* non-coding RNA RsaA: impact on cell surface properties and defense mechanisms. *Nucleic Acids Research*
- Torres VJ, Stauff DL, Pishchany G, Bezbradica JS, Gordy LE, Iturregui J, Anderson KL, Dunman PM, Joyce S & Skaar EP (2007) A *Staphylococcus aureus* Regulatory System that Responds to Host Heme and Modulates Virulence. *Cell Host Microbe* **1**: 109–119
- Tung H s, Guss B, Hellman U, Persson L, Rubin K, Rydén C & Ryden C (2000) A bone sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*: a member of the staphylococcal Sdr family. *Biochem.J.* **345 Pt 3**: 611–619

- Türck M & Bierbaum G (2012) Purification and activity testing of the full-length YycFGHI proteins of *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* **7**:
- Ulrich M, Bastian M, Cramton SE, Ziegler K, Pragman AA, Bragonzi A, Memmi G, Wolz C, Schlievert PM, Cheung A & Döring G (2007) The staphylococcal respiratory response regulator SrrAB induces ica gene transcription and polysaccharide intercellular adhesin expression, protecting *Staphylococcus aureus* from neutrophil killing under anaerobic growth conditions. *Mol. Microbiol.* **65**: 1276–1287
- Vitko NP, Grosser MR, Khatri D, Lance TR & Richardson AR (2016) Expanded glucose import capability affords *Staphylococcus aureus* optimized glycolytic flux during infection. *MBio* **7**:
- van der Voort M, Kuipers OP, Buist G, de Vos WM & Abee T (2008) Assessment of CcpA-mediated catabolite control of gene expression in *Bacillus cereus* ATCC 14579. *BMC Microbiol.* **8**: 62
- Wagner EG & Romby P (2015) Small RNAs in Bacteria and Archaea: Who They Are, What They Do, and How They Do It. *Adv Genet* **90**: 133–208
- Wright AJ, Higginbottom A, Philippe D, Upadhyay A, Bagby S, Read RC, Monk PN & Partridge LJ (2007) Characterisation of receptor binding by the chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* and the effects of the host immune response. *Mol. Immunol.* **44**: 2507–2517
- Wright PR, Richter AS, Papenfort K, Mann M, Vogel J, Hess WR, Backofen R & Georg J (2013) Comparative genomics boosts target prediction for bacterial small RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**:
- Xue X, Sztajer H, Buddruhs N, Petersen J, Rohde M, Talay SR & Wagner-Döbler I (2011) Lack of the delta subunit of RNA polymerase increases virulence related traits of streptococcus mutans. *PLoS One* **6**:
- Yarwood JM, McCormick JK & Schlievert PM (2001) Identification of a novel two-component regulatory system that acts in global regulation of virulence factors of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **183**: 1113–1123
- Zhang J & Ferré-D'Amaré AR (2015) Structure and mechanism of the T-box riboswitches. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **6**: 419–433
- Zhu Y, Weiss EC, Otto M, Fey PD, Smeltzer MS & Somerville GA (2007) *Staphylococcus aureus* biofilm metabolism and the influence of arginine on polysaccharide intercellular adhesin synthesis, biofilm formation, and pathogenesis. *Infect. Immun.* **75**: 4219–4226

Zühlke D, Dörries K, Bernhardt J, Maaß S, Muntel J, Liebscher V, Pané-Farré J, Riedel K, Lalk M, Völker U, Engelmann S, Becher D, Fuchs S, Hecker M, Fleischmann RD, Maaß S, Muntel J, Lu P, Vogel C, Wang R, et al (2016) Costs of life - Dynamics of the protein inventory of *Staphylococcus aureus* during anaerobiosis. *Sci. Rep.* **6**: 28172



## VII - Annexes

---





		SUMMARY				VERIFICATION																
		SPECTRAL COUNT				MS1 LABEL-FREE				XIC Manuels												
		WT-rsaD		Del-rsaD		RATIO		RATIO		RATIO		Moy WT		Moy MUT		Del/WT		Area		Del-rsaD		
		Nb repl.oy #Splnb	réplifoy #Spc	Nb repl.oy #Splnb	réplifoy #Spc	p-value	Del/WT	Moy WT	Moy MUT	Del/WT	Moy WT	Moy MUT	Del/WT	Moy WT	Moy MUT	Del/WT	Area	Area	Area	Area	Area	Area
SARX_STAAN	SarX	0	0	3	10,00	0,00178	5,46	3,81E+04	1,85E+05	4,86	3,81E+04	1,85E+05	4,86	4,57E+04	2,8654	4,01E+04	2,20E+05	1,36E+05	2,01E+05	2,01E+05	1,36E+05	2,01E+05
Q2G1K9_STAAB	Alcohol dehydrogenase	2	0,67	3	5,00	0,25899	1,69	3,47E+04	4,73E+04	1,36	3,15E+04	2,8698	4,40E+04	3,15E+04	2,8698	4,40E+04	4,98E+04	5,18E+04	4,04E+04	4,04E+04	5,18E+04	4,04E+04
Q7A408_STAAN	uncharacterized protein	2	1,00	3	5,67	0,18482	1,51	3,37E+04	7,78E+04	2,31	3,37E+04	7,78E+04	2,31	3,50E+04	3,71E+04	2,8864	8,89E+04	7,08E+04	7,35E+04	7,35E+04	8,89E+04	7,08E+04
AGRA_STAAN	agrA	3	4,33	3	9,00	0,01705	1,53	1,82E+05	2,39E+05	1,31	1,82E+05	2,39E+05	1,31	1,64E+05	1,69E+05	2,12E+05	2,80E+05	2,03E+05	2,34E+05	2,34E+05	2,80E+05	2,03E+05
Q2G2P5_STAAB	Putative uncharacterized protein	2	2,33	3	12,33	0,62692	1,14	6,39E+04	1,29E+05	2,02	6,39E+04	1,29E+05	2,02	6,23E+04	6,87E+04	6,08E+04	1,42E+05	1,34E+05	1,12E+05	1,12E+05	1,42E+05	1,34E+05
SSPB_STAAB	Staphopain B OS	1	1,33	3	6,67	0,89982	1,07	7,21E+04	1,53E+05	2,07	7,21E+04	1,53E+05	2,07	7,23E+04	7,49E+04	6,93E+04	1,65E+05	1,29E+05	1,66E+05	1,66E+05	1,65E+05	1,29E+05
HTRAL_STAAN	Serine protease	3	3,00	3	6,00	0,53376	0,96	3,81E+04	1,21E+05	2,75	3,81E+04	1,21E+05	2,75	6,04E+04	8,98E+04	8,21E+04	1,94E+05	1,45E+05	1,99E+05	1,99E+05	1,45E+05	1,99E+05
NANA_STAAB	N-acetylneuraminatase lyase	3	14,00	0	0	1,07E-05	0,08	8,86E+04	1,54E+04	0,17	8,86E+04	1,54E+04	0,17	8,52E+04	7,97E+04	1,01E+05	3,12E+04	7,674	7,260	7,260	3,12E+04	7,674
SPA_STAAN	spa	3	17,67	3	2,33	0,05018	0,36	3,53E+05	9,51E+04	0,27	3,53E+05	9,51E+04	0,27	4,05E+05	2,65E+05	3,89E+05	7,95E+04	6,10E+04	1,45E+05	1,45E+05	7,95E+04	6,10E+04
ROT_STAAB	transcriptional regulator rot	2	5,67	1	0,33	0,66309	1,21	4,44E+04	2,02E+04	0,30	4,44E+04	2,02E+04	0,30	1,05E+05	6,02E+04	8,97E+04	26402	3,26E+04	19298	19298	26402	3,26E+04
TDCB_STAAB	L-threonine dehydratase catabolic T	3	23,33	3	6,33	0,01959	0,26	1,48E+05	7,34E+04	0,43	1,48E+05	7,34E+04	0,43	3,59E+05	1,10E+05	3,01E+05	5,70E+04	5,36E+04	7,62E+04	7,62E+04	5,70E+04	5,36E+04
DHA1_STAAB	Alanine dehydrogenase 1	3	25,33	3	5,67	0,05145	0,34	7,59E+04	3,17E+05	0,40	7,59E+04	3,17E+05	0,40	9,06E+04	4,20E+04	9,50E+04	22214	3,09E+04	3,73E+04	3,73E+04	9,50E+04	22214
Q2FZB0_STAAB	Omithine carbamoyltransferase	3	12,00	3	5,00	0,03595	0,66	1,06E+05	5,12E+04	0,48	1,06E+05	5,12E+04	0,48	1,49E+05	4,65E+04	1,22E+05	5,54E+04	5,04E+04	4,77E+04	4,77E+04	5,54E+04	5,04E+04
								5,90E+04	2,88E+04	0,49	5,90E+04	2,88E+04	0,49	8,35E+04	2,2541	7,20E+04	2,6555	3,06E+04	2,7411	2,7411	2,6555	3,06E+04

## SUMMARY

		SPECTRAL COUNT				RATIO	
		WT-rsaD		Del-rsaD		RATIO	
		Nb repl.oy #Splnb	réplifoy #Spc	Nb repl.oy #Splnb	réplifoy #Spc	p-value	Del/WT
		3	14,00	0	0	1,07E-05	0,08
		3	17,67	3	2,33	0,05018	0,36
		2	5,67	1	0,33	0,66309	1,21
		3	23,33	3	6,33	0,01959	0,26
		3	25,33	3	5,67	0,05145	0,34
		3	12,00	3	5,00	0,03595	0,66

## VERIFICATION

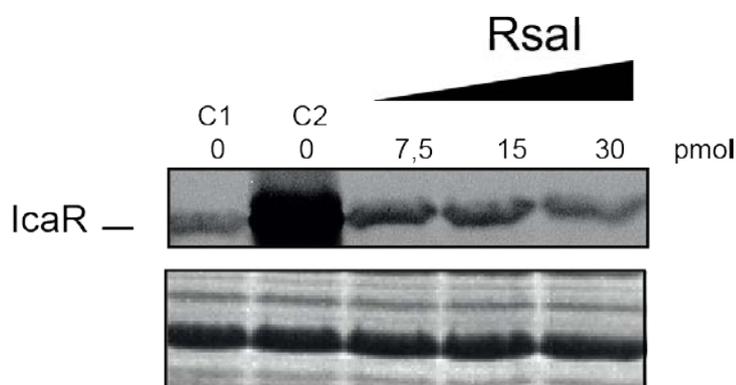
		XIC Manuels							
		WT-rsaD		Del-rsaD		RATIO		RATIO	
		Moy WT	Moy MUT	Moy WT	Moy MUT	Del/WT	Moy WT	Moy MUT	Del/WT
		8,86E+04	1,54E+04	8,86E+04	1,54E+04	0,17	8,86E+04	1,54E+04	0,17
		3,53E+05	9,51E+04	3,53E+05	9,51E+04	0,27	3,53E+05	9,51E+04	0,27
		8,51E+04	2,61E+04	8,51E+04	2,61E+04	0,31	8,51E+04	2,61E+04	0,31
		6,74E+04	2,02E+04	6,74E+04	2,02E+04	0,30	6,74E+04	2,02E+04	0,30
		4,44E+04	7,34E+04	4,44E+04	7,34E+04	0,50	4,44E+04	7,34E+04	0,50
		1,48E+05	7,34E+04	1,48E+05	7,34E+04	0,43	1,48E+05	7,34E+04	0,43
		2,56E+05	6,22E+04	2,56E+05	6,22E+04	0,24	2,56E+05	6,22E+04	0,24
		1,20E+05	4,00E+04	1,20E+05	4,00E+04	0,33	1,20E+05	4,00E+04	0,33
		7,59E+04	3,17E+05	7,59E+04	3,17E+05	0,40	7,59E+04	3,17E+05	0,40
		3,15E+05	1,01E+05	3,15E+05	1,01E+05	0,37	3,15E+05	1,01E+05	0,37
		1,06E+05	5,12E+04	1,06E+05	5,12E+04	0,48	1,06E+05	5,12E+04	0,48
		5,90E+04	2,88E+04	5,90E+04	2,88E+04	0,49	5,90E+04	2,88E+04	0,49

## VERIFICATION

		XIC Manuels							
		WT-rsaD		Del-rsaD		RATIO		RATIO	
		Moy WT	Moy MUT	Moy WT	Moy MUT	Del/WT	Moy WT	Moy MUT	Del/WT
		8,86E+04	1,54E+04	8,86E+04	1,54E+04	0,17	8,86E+04	1,54E+04	0,17
		3,53E+05	9,51E+04	3,53E+05	9,51E+04	0,27	3,53E+05	9,51E+04	0,27
		8,51E+04	2,61E+04	8,51E+04	2,61E+04	0,31	8,51E+04	2,61E+04	0,31
		6,74E+04	2,02E+04	6,74E+04	2,02E+04	0,30	6,74E+04	2,02E+04	0,30
		4,44E+04	7,34E+04	4,44E+04	7,34E+04	0,50	4,44E+04	7,34E+04	0,50
		1,48E+05	7,34E+04	1,48E+05	7,34E+04	0,43	1,48E+05	7,34E+04	0,43
		2,56E+05	6,22E+04	2,56E+05	6,22E+04	0,24	2,56E+05	6,22E+04	0,24
		1,20E+05	4,00E+04	1,20E+05	4,00E+04	0,33	1,20E+05	4,00E+04	0,33
		7,59E+04	3,17E+05	7,59E+04	3,17E+05	0,40	7,59E+04	3,17E+05	0,40
		3,15E+05	1,01E+05	3,15E+05	1,01E+05	0,37	3,15E+05	1,01E+05	0,37
		1,06E+05	5,12E+04	1,06E+05	5,12E+04	0,48	1,06E+05	5,12E+04	0,48
		5,90E+04	2,88E+04	5,90E+04	2,88E+04	0,49	5,90E+04	2,88E+04	0,49

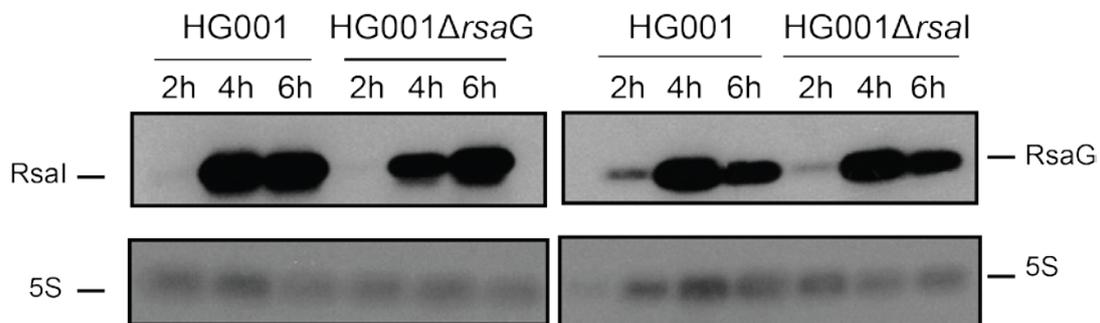


## VII.2. Annexe 2 - inhibition de la traduction du messenger *icaR* par des expériences de traduction *in vitro*.



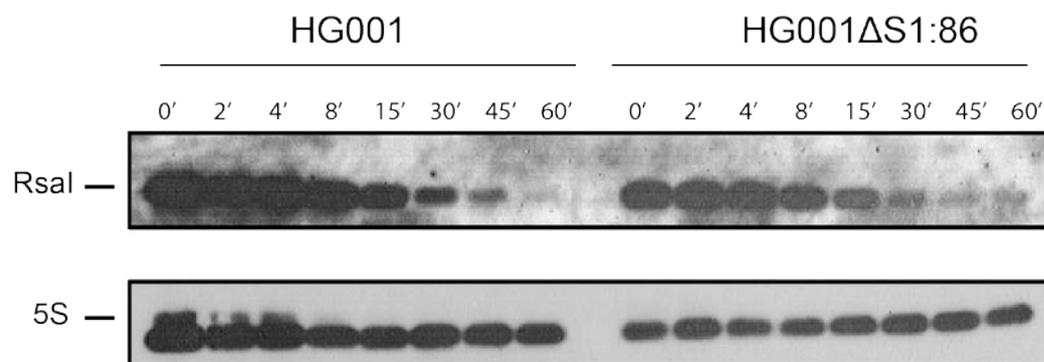
**Expérience de traduction *in vitro* de l'ARNm *icaR* en présence d'une quantité croissante de RsaI.** Le kit PURExpress (*New england BioLabs* ref : E6800S) été utilisé selon le protocole commercial en présence de Met-S<sup>35</sup>. Le mélange réactionnel est réduit à 10  $\mu$ L, l'ARNm utilisé est *icaR* à 10pmol en présence d'une quantité croissante de RsaI (7,5 à 30 pmol). Le mélange réactionnel est incubé 2h à 37°C, puis chargé sur un gel SDS-PAGE 15%, coloré au bleu de coomassie. Le gel est séché et mis au contact d'un film autoradiographique. La présence de bandes aspécifiques présente dans tous les échantillons, permet de normaliser le signal. C1 : 10 pmol *icaR* C2 : 10 pmol *icaR* SUBST (*icaR* muté au niveau de la séquence en 3'UTR s'appariant à la séquence SD).

### VII.3. Annexe 3 - L'interaction RsaI/ RsaG n'affecte pas le taux des deux ARNnc



**Taux de RsaI et RsaG dans la souche WT et dans les souches mutantes HG001ΔrsaI et HG001ΔrsaG.** Expériences de Northern blot sur les ARN totaux, préparés à partir d'échantillons de cultures prélevés à 2, 4, et 6h de croissance, de la souche sauvage HG001, et des souches mutantes HG001ΔrsaI et HG001ΔrsaG. Electrophorèse réalisée sur gel d'agarose 1,5%, contenant 20 mM de guanidium thiocyanate. 10 µg d'ARN total ont été chargé. Après transfert sur membrane de nitrocellulose, les ARN ont été détectés en utilisant des sondes DIG. La détection de l'ARNr 5S a servi de contrôle de charge. (Expériences réalisées par Emma Desgranges).

## VII.4. Annexe 4 – S1 n’affecte pas la stabilité de RsaI



**Expériences de Rifampicine montrant la demi vie de RsaI dans la souche sauvage HG001 et la souche mutante HG001ΔS1:86.** Expériences de Northern blot sur les ARN totaux, préparés à partir d'échantillons de cultures prélevés à 0, 2, 4, 8, 15, 30, 45 et 60 minutes après l'ajout de la rifampicine. Comparaison de la demi vie de RsaI entre la souche sauvage HG001, et la souche mutante HG001ΔS1:86, contenant un intron, ne permettant plus la protéine S1 d'être exprimée. Electrophorèse réalisée sur gel d'agarose 1,5%, contenant 20 mM de guanidium thiocyanate. 10 µg d'ARN total ont été chargé. Après transfert sur membrane de nitrocellulose, les ARN ont été détectés en utilisant des sondes DIG. La détection de l'ARNr 5S a servi de contrôle de charge.

**NB :** les expériences de Northern blot ne permettent pas d'affirmer que S1 a un effet sur la stabilité de RsaI. Le signal du 5S étant saturé une quantification informatique du signal n'est pas optimale. Cette expérience préliminaire devra être reproduite.

VII.5. Annexe 5 - Liste complète des ARN retrouvés avec MS2-RsaI par les expériences de MAPS

Id	gene	product	FoldChange	log2FoldChange	pvalue	padj
HG001_02704	icaR	Biofilm operon icaADBC HTH-type negative transcriptional regulator IcaR	33,976	5,086	8,33E-104	5,18E-101
HG001_02347	-	RsaI	27,531	4,783	2,41E-168	4,50E-165
HG001_02520	-	XRE family transcriptional regulator	22,978	4,522	2,50E-162	2,34E-159
HG001_01242	-	hypothetical protein; type VI secretion protein IcmF; Cytoplasmic Membrane; predicted transmembrane helices (TMHMM): 3	17,369	4,118	4,46E-24	8,33E-22
HG001_02756	-	RsaG	13,621	3,768	1,02E-41	4,75E-39
HG001_02360	glvR	HTH-type transcriptional regulator GlvR; hex regulon repressor; Regulated by CcpA; bifunctional phosphoglucose/phosphomannose isomerase	9,961	3,316	7,73E-31	2,40E-28
HG001_01537	-	Putative O-methyltransferase/MSMEI_4947; protein-(glutamine-N5) methyltransferase, ribosomal protein L3-specific; 16S rRNA (guanine(527)-N(7))-methyltransferase RsmG	7,137	2,835	4,14E-21	5,95E-19
HG001_02609	isaA	putative transglycosylase IsaA precursor	6,76	2,757	7,79E-33	2,91E-30
HG001_00847	-	RsaE	5,476	2,453	4,29E-11	2,00E-09
HG001_02545	-	hypothetical protein; Glyoxalase_2; Glyoxalase-like domain	5,262	2,396	1,56E-17	1,95E-15
HG001_00316	-	Peptidase propeptide and YPEB domain protein	5,234	2,388	4,98E-24	8,46E-22
HG001_02210	-	hypothetical protein; regulated by CcpA	4,978	2,316	5,63E-14	4,20E-12
HG001_02293	glcU_2	putative glucose uptake protein GlcU	4,769	2,254	1,20E-08	NA
HG001_00974	-	hypothetical protein	4,532	2,18	2,57E-12	1,37E-10
HG001_02628	-	Fructosamine kinase; FN3K; Fructosamine-3-kinase is part of an ATP-dependent system for removing carbohydrates from non-enzymically glycosylated proteins.	4,37	2,128	2,32E-26	4,80E-24
HG001_00942	-	Putative cell-wall binding lipoprotein; Cell division chromosome segregation protein SMC; Lipid anchored	4,091	2,032	7,33E-17	8,55E-15
HG001_00584	-	RsaD	4,078	2,028	3,15E-06	NA
HG001_02336	odh	Opine dehydrogenase	3,826	1,936	6,51E-29	1,74E-26
HG001_01701	-	hypothetical protein	3,796	1,925	5,91E-07	1,11E-05
HG001_00733	-	cspA	3,701	1,888	2,68E-15	2,28E-13
HG001_00975	-	hypothetical protein	3,44	1,783	2,51E-28	5,85E-26
HG001_00709	-	Epimerase family protein	3,391	1,762	5,83E-20	7,76E-18
HG001_00687	-	DegV domain-containing protein fatty-acid binding, it may play a role in the cellular functions of fatty acid transport or metabolism; EDD domain common to mannose transporter EIIA	3,269	1,709	1,49E-07	3,26E-06
HG001_01700	sigS	RNA polymerase sigma factor SigS	3,238	1,695	3,36E-09	1,08E-07
HG001_02334	ssaA2_2	Staphylococcal secretory antigen ssaA2 precursor	3,225	1,689	5,43E-06	7,98E-05
HG001_00646	-	DoxX	3,204	1,68	4,05E-06	6,19E-05
HG001_01904	-	hypothetical protein	3,156	1,658	0,00013907	NA

Id	gene	product	FoldChange	log2FoldChange	pvalue	padj
HG001_01064	-	hypothetical protein	3,096	1,63	6,92E-06	9,86E-05
HG001_00412	ispE	4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase	3,058	1,612	1,21E-23	1,88E-21
HG001_01548	-	hypothetical protein	3,035	1,602	2,63E-16	2,89E-14
HG001_00614	-	hypothetical protein	3,015	1,592	0,0002426	NA
HG001_01150	glpF	Glycerol uptake facilitator protein	2,967	1,569	9,17E-06	0,00012401
HG001_01041	-	S4 domain protein	2,908	1,54	1,12E-12	6,32E-11
HG001_00347	speC_1	Exotoxin type C precursor	2,908	1,54	1,14E-06	2,05E-05
HG001_01523	mtnN	5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase	2,894	1,533	7,26E-16	7,44E-14
HG001_02744	-	cspA	2,861	1,516	1,51E-06	2,59E-05
HG001_02259	ecfA1	Energy-coupling factor transporter ATP-binding protein EcfA1	2,858	1,515	4,19E-07	8,31E-06
HG001_00303	-	T-box	2,822	1,497	0,00058486	NA
HG001_01841	-	hypothetical protein	2,821	1,496	4,15E-10	1,61E-08
HG001_02753	rnpA	Ribonuclease P protein component	2,804	1,488	4,32E-09	1,34E-07
HG001_01601	thrS	Threonine-tRNA ligase	2,798	1,484	5,23E-14	4,07E-12
HG001_01712	metK	S-adenosylmethionine synthase	2,682	1,424	7,22E-08	1,71E-06
HG001_01351	-	hypothetical protein	2,674	1,419	8,83E-06	0,00012115
HG001_00386	treB	PTS system trehalose-specific EIIBC component Phosphotransferase system; Regulated by CcpA	2,653	1,408	8,68E-16	8,10E-14
HG001_01596	rpml	50S ribosomal protein L35	2,644	1,403	2,11E-13	1,39E-11
HG001_02584	-	hypothetical protein	2,64	1,4	0,00134204	NA
HG001_00581	dacA	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase DacA precursor	2,633	1,397	2,11E-06	3,52E-05
HG001_00054	-	Na <sup>+</sup> /Pi-cotransporter	2,628	1,394	1,81E-05	0,00023113
HG001_01236	cof	HMP-PP phosphatase	2,621	1,39	3,10E-07	6,42E-06
HG001_02667	slyA_3	Transcriptional regulator SlyA	2,619	1,389	7,57E-16	7,44E-14
HG001_01526	-	Adenosine monophosphate-protein transferase SofC	2,619	1,389	1,36E-05	0,00018013
HG001_00165	uhpT	Hexose phosphate transport protein	2,601	1,379	6,27E-05	0,00066452
HG001_00818	yidA	Sugar phosphatase YidA	2,599	1,378	9,79E-09	2,73E-07
HG001_00838	oppD_2	Oligopeptide transport ATP-binding protein OppD	2,597	1,377	0,00032632	0,0026022
HG001_00475	rplGB	Ribosome-associated protein L7Ae-like protein	2,587	1,371	2,15E-13	1,39E-11
HG001_02103	kdpC	Potassium-transporting ATPase C chain	2,56	1,356	7,49E-10	2,79E-08
HG001_00985	-	Putative TrmH family tRNA/rRNA methyltransferase	2,553	1,352	1,48E-12	8,14E-11
HG001_02606	ssaA_2	Staphylococcal secretory antigen SsaA precursor	2,545	1,348	0,00181452	NA
HG001_00907	pbpX_1	Putative penicillin-binding protein PbpX	2,535	1,342	3,94E-10	1,56E-08
HG001_01005	fib_2	Fibrinogen-binding protein precursor	2,535	1,342	7,69E-09	2,24E-07
HG001_00425	yugL_1	General stress protein 13	2,529	1,339	8,04E-12	4,06E-10
HG001_01779	-	hypothetical protein	2,515	1,331	1,49E-10	6,33E-09
HG001_02639	aldC_2	Alpha-acetolactate decarboxylase	2,506	1,325	1,50E-08	4,07E-07

Id	gene	product	FoldChange	log2FoldChange	pvalue	padj
HG001_00450	nupC_2	Nucleoside permease NupC	2,45	1,293	9,31E-05	0,00090936
HG001_00502	gph_1	Phosphoglycolate phosphatase	2,41	1,269	0,00012701	0,00117908
HG001_00317	-	hypothetical protein	2,403	1,265	4,43E-12	2,29E-10
HG001_00766	-	hypothetical protein	2,401	1,263	0,00371959	NA
HG001_01295	norB_4	Quinolone resistance protein NorB	2,397	1,261	0,00036798	0,00286101
HG001_00411	-	hypothetical protein	2,379	1,25	7,06E-14	5,07E-12
HG001_02055	-	Nitroreductase family protein	2,371	1,245	5,39E-13	3,25E-11
HG001_02485	norB_5	Quinolone resistance protein NorB	2,371	1,245	0,00139709	NA
HG001_01680	-	T-box	2,359	1,238	0,0003926	0,00298547
HG001_01423	fur	Ferric uptake regulation protein	2,358	1,238	0,0018917	NA
HG001_00710	-	RsaH	2,357	1,237	0,00044092	0,00329822
HG001_02076	ilvD	Dihydroxy-acid dehydratase	2,348	1,231	0,00419069	NA
HG001_00170	pflA	Pyruvate formate-lyase-activating enzyme	2,323	1,216	2,05E-14	1,67E-12
HG001_01010	-	hypothetical protein	2,321	1,215	5,06E-07	9,74E-06
HG001_01843	-	hypothetical protein	2,32	1,214	9,14E-13	5,33E-11
HG001_02407	paiA	Protease synthase and sporulation negative regulatory protein PAI 1	2,312	1,209	0,00096297	0,00628288
HG001_00961	-	hypothetical protein	2,304	1,204	3,04E-05	0,00036786
HG001_00862	-	2'%2C5' RNA ligase family	2,297	1,2	1,53E-09	5,08E-08
HG001_02566	-	Sortase family protein	2,287	1,194	0,00250298	NA
HG001_00959	typA	GTP-binding protein TypA/BipA	2,283	1,191	8,98E-09	2,58E-07
HG001_02555	-	hypothetical protein	2,28	1,189	0,00061123	0,0043203
HG001_02171	-	hypothetical protein	2,268	1,182	8,88E-07	1,62E-05
HG001_02719	-	Polysaccharide deacetylase	2,265	1,179	3,95E-05	0,00045741
HG001_02697	-	hypothetical protein	2,258	1,175	0,00024064	0,0019957
HG001_01602	-	T-box	2,256	1,174	9,66E-10	3,53E-08
HG001_02641	yhdG_2	putative amino acid permease YhdG	2,247	1,168	0,00720471	NA
HG001_01022	-	Antibacterial protein 3	2,244	1,166	2,03E-13	1,39E-11
HG001_02748	-	hypothetical protein	2,243	1,165	8,26E-06	0,0001141
HG001_01107	rpsB	30S ribosomal protein S2	2,226	1,154	2,69E-10	1,12E-08
HG001_02666	-	hypothetical protein	2,213	1,146	0,00176268	0,01047503
HG001_01366	-	Phage major tail protein	2,205	1,141	0,00932705	NA
HG001_00664	-	Putative lipid kinase	2,202	1,139	3,63E-13	2,26E-11
HG001_00618	-	Acetyltransferase (GNAT) family protein	2,201	1,138	0,0071477	NA
HG001_01186	-	hypothetical protein	2,197	1,136	6,57E-06	9,50E-05
HG001_01655	acuA	Acetoin utilization protein AcuA	2,18	1,125	2,66E-08	6,81E-07
HG001_00487	dck	Deoxyadenosine/deoxycytidine kinase	2,179	1,124	0,00730825	NA
HG001_01549	-	CsBD-like protein	2,177	1,122	2,25E-08	6,00E-07
HG001_00376	sle1_1	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase sle1 precursor	2,171	1,118	2,18E-05	0,00027508
HG001_01785	-	hypothetical protein	2,166	1,115	0,01013967	NA
HG001_01301	-	PepSY-associated TM helix	2,163	1,113	0,00355972	0,01824845
HG001_00725	-	hypothetical protein	2,159	1,11	2,46E-08	6,37E-07
HG001_02638	panE_2	2-dehydropantoate 2-reductase	2,155	1,108	7,33E-06	0,00010278
HG001_00842	trpS	Tryptophan--trNA ligase	2,153	1,106	0,00076856	0,00523406
HG001_00846	pepF1_1	Oligoendopeptidase F%2C plasmid	2,149	1,104	1,10E-09	3,88E-08

Id	gene	product	FoldChange	log2FoldChange	pvalue	padj
HG001_00264	lip2	Lipase 2 precursor	2,138	1,097	5,85E-07	1,11E-05
HG001_02678	-	hypothetical protein	2,135	1,094	0,00099849	0,00646936
HG001_01482	cshB	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase CshB	2,127	1,089	3,66E-06	5,74E-05
HG001_00932	-	hypothetical protein	2,121	1,085	1,01E-08	2,77E-07
HG001_01713	-	SAM	2,121	1,085	0,01207416	NA
HG001_00306	-	hypothetical protein	2,115	1,081	0,012464	NA
HG001_00880	-	rli28	2,113	1,079	0,01179518	NA
HG001_02320	fhuD_2	Iron(3+)-hydroxamate-binding protein FhuD precursor	2,112	1,079	1,78E-07	3,82E-06
HG001_00929	-	hypothetical protein	2,112	1,079	0,00089118	0,00589694
HG001_00344	-	superantigen-like protein	2,106	1,075	0,00840804	NA
HG001_02629	pyrD	Dihydroorotate dehydrogenase (quinone)	2,068	1,048	7,05E-10	2,68E-08
HG001_00159	malF	Maltose transport system permease protein MalF	2,065	1,046	0,00207665	0,01203426
HG001_00616	-	hypothetical protein	2,064	1,046	0,00399559	0,01972425
HG001_00761	yurY	Vegetative protein 296	2,058	1,042	0,00922451	0,03851067
HG001_00400	-	hypothetical protein	2,057	1,04	0,00023881	0,0019957
HG001_02754	rpmH	50S ribosomal protein L34	2,056	1,04	2,43E-08	6,37E-07
HG001_00972	rsmD	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase D	2,053	1,038	0,00093782	0,00614025
HG001_01201	-	hypothetical protein	2,046	1,033	8,37E-05	0,00083235
HG001_01600	-	Lysine	2,046	1,033	0,01847057	NA
HG001_00398	speA	Arginine decarboxylase	2,045	1,032	3,77E-06	5,81E-05
HG001_02376	-	hypothetical protein	2,043	1,031	0,00157769	0,00952738
HG001_00976	rpmF	50S ribosomal protein L32	2,041	1,029	4,37E-05	0,00048805
HG001_02030	-	hypothetical protein	2,032	1,023	0,00754197	0,03257712
HG001_00125	-	hypothetical protein	2,031	1,022	0,00019066	0,00167819
HG001_01837	-	hypothetical protein	2,027	1,02	0,00215029	0,01234596
HG001_01061	rpoZ	DNA-directed RNA polymerase subunit omega	2,026	1,019	0,00391626	0,0194355
HG001_02547	sauU	putative sulfoacetate transporter SauU	2,017	1,012	2,84E-06	4,53E-05
HG001_00310	ssb_1	Single-stranded DNA-binding protein ssb	2,008	1,006	5,65E-09	1,67E-07
HG001_01665	ytpP	Thioredoxin-like protein YtpP	2,007	1,005	9,26E-09	2,62E-07
HG001_00291	-	hypothetical protein	1,994	0,996	0,01748913	NA
HG001_02057	-	RNAIII	1,993	0,995	1,29E-10	5,60E-09
HG001_02050	-	Terminase small subunit	1,99	0,993	0,01713416	NA
HG001_00098	-	Transposase IS200 like protein	1,983	0,988	0,02375555	NA
HG001_00680	garK_1	Glycerate 2-kinase	1,977	0,983	2,92E-08	7,35E-07
HG001_02546	-	Fusaric acid resistance protein family protein	1,977	0,983	0,00251692	0,0140616
HG001_00694	yfbR	5'-deoxynucleotidase YfbR	1,965	0,974	3,60E-05	0,00043083
HG001_02104	kdpB	Potassium-transporting ATPase B chain	1,963	0,973	1,04E-09	3,73E-08
HG001_01002	fib_1	Fibrinogen-binding protein precursor	1,962	0,972	0,01542702	NA
HG001_00480	yxeP_2	putative hydrolase YxeP	1,96	0,971	2,63E-06	4,27E-05
HG001_01039	sepF	Cell division protein SepF	1,955	0,967	2,33E-05	0,00028996
HG001_02746	immR_2	HTH-type transcriptional regulator ImmR	1,948	0,962	0,00068901	0,0047795
HG001_02723	-	hypothetical protein	1,942	0,958	0,01986829	NA
HG001_01873	-	hypothetical protein	1,938	0,954	0,01921146	NA

Id	gene	product	FoldChange	log2FoldChange	pvalue	padj
HG001_00226	ssaA2_1	Staphylococcal secretory antigen ssaA2 precursor	1,936	0,953	0,00025791	0,0021108
HG001_01553	-	6S	1,934	0,952	0,00270983	0,01478523
HG001_01764	ydeN	Putative hydrolase YdeN	1,926	0,946	0,01150681	0,04607662
HG001_01343	-	Ferredoxin	1,922	0,943	0,00082869	0,00558247
HG001_00311	rpsR	30S ribosomal protein S18	1,92	0,941	0,00219516	0,01256495
HG001_02069	rex	Redox-sensing transcriptional repressor Rex	1,915	0,937	1,18E-06	2,10E-05
HG001_00074	-	hypothetical protein	1,905	0,93	0,03404952	NA
HG001_01786	-	hypothetical protein	1,904	0,929	1,70E-07	3,68E-06
HG001_00822	ampR	HTH-type transcriptional activator AmpR	1,904	0,929	0,01586274	NA
HG001_02255	-	L13_leader	1,901	0,927	0,00016183	0,00145877
HG001_00164	-	Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase (ICMT) family protein	1,899	0,925	0,03481651	NA
HG001_01914	-	hypothetical protein	1,894	0,921	0,02284754	NA
HG001_01455	-	hypothetical protein	1,887	0,916	0,00688025	0,03027959
HG001_00238	yezG_1	putative antitoxin YezG	1,886	0,915	3,73E-06	5,80E-05
HG001_00549	btuF	Vitamin B12-binding protein precursor	1,883	0,913	0,0333748	NA
HG001_01060	gmk	Guanylate kinase	1,876	0,908	0,0001135	0,00107506
HG001_00154	-	putative lipoprotein precursor	1,873	0,906	0,00024028	0,0019957
HG001_02457	hlgA	Gamma-hemolysin component A precursor	1,87	0,903	0,03518013	NA
HG001_00744	-	hypothetical protein	1,87	0,903	0,03915751	NA
HG001_00879	-	CAAX amino terminal protease self- immunity	1,868	0,902	0,03874633	NA
HG001_01007	-	hypothetical protein	1,865	0,899	0,03991976	NA
HG001_00042	yofA	HTH-type transcriptional regulator YofA	1,862	0,896	0,03833791	NA
HG001_02043	-	putative leukocidin-like protein 1 precursor	1,857	0,893	0,00090165	0,00594517
HG001_00994	trxA_2	Thioredoxin	1,85	0,887	0,00203255	0,01181538
HG001_00621	-	hypothetical protein	1,84	0,88	1,73E-05	0,00022429
HG001_01042	divIVA	Septum site-determining protein DivIVA	1,827	0,87	1,07E-06	1,94E-05
HG001_01017	-	hypothetical protein	1,821	0,865	4,57E-05	0,00049625
HG001_01296	steT	Serine/threonine exchanger SteT	1,821	0,865	0,00088755	0,00589382
HG001_02170	gmuF	putative mannose-6-phosphate isomerase GmuF	1,82	0,864	4,25E-07	8,34E-06
HG001_00326	tcyP	L-cystine uptake protein TcyP	1,819	0,863	0,00024273	0,00200416
HG001_01787	nagB_2	Glucosamine-6-phosphate deaminase	1,816	0,861	4,75E-08	1,15E-06
HG001_00973	coaD	Phosphopantetheine adenylyltransferase	1,814	0,859	0,00632263	0,02829263
HG001_00953	-	hypothetical protein; Cytoplasmic Membrane; predicted transmembrane helices (TMHMM): 3	1,803	0,851	1,39E-06	2,39E-05
HG001_01538	-	hypothetical protein	1,801	0,849	0,00038038	0,00293298
HG001_02730	-	lineage-specific thermal regulator protein	1,801	0,849	0,048841	NA
HG001_00586	yusV_1	putative siderophore transport system ATP-binding protein YusV	1,796	0,845	0,00226695	0,01289676
HG001_00778	-	D-Ala-teichoic acid biosynthesis protein	1,781	0,833	2,29E-05	0,00028653
HG001_02105	kdpA	Potassium-transporting ATPase A chain	1,78	0,831	4,44E-07	8,64E-06

Id	gene	product	FoldChange	log2FoldChange	pvalue	padj
HG001_00387	treA	Trehalose-6-phosphate hydrolase	1,78	0,832	4,15E-05	0,00047743
HG001_02556	mhqD	Putative hydrolase MhqD	1,777	0,83	0,0001258	0,0011737
HG001_00171	ugpQ_1	Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	1,775	0,828	0,00678524	0,02993204
HG001_01650	mrcA	Penicillin-binding protein 1A	1,769	0,823	4,51E-05	0,00049471
HG001_02596	-	hypothetical protein	1,769	0,823	0,02698425	NA
HG001_01180	-	ABC-2 family transporter protein	1,766	0,821	0,04556786	NA
HG001_00388	treR_2	Trehalose operon transcriptional repressor	1,765	0,82	0,00447645	0,02141809
HG001_00419	pth	Peptidyl-tRNA hydrolase	1,765	0,82	0,02959072	0,091644
HG001_02634	cocE	Cocaine esterase	1,765	0,82	0,0292335	NA
HG001_00343	-	superantigen-like protein	1,759	0,815	0,03956317	NA
HG001_00290	tatAy	Sec-independent protein translocase protein TatAy	1,756	0,813	0,00017527	0,00156484
HG001_01844	-	hypothetical protein	1,751	0,809	0,00958893	0,03965733
HG001_02330	sarR	HTH-type transcriptional regulator SarR	1,744	0,803	7,46E-06	0,00010383
HG001_00908	qoxD	Quinol oxidase subunit 4	1,742	0,801	0,00037114	0,00287361
HG001_01016	arcC1	Carbamate kinase 1	1,735	0,795	0,00022264	0,00189704
HG001_01023	-	Antibacterial protein 3	1,734	0,794	8,52E-07	1,58E-05
HG001_01648	tyrS	Tyrosine--tRNA ligase	1,734	0,794	0,00023657	0,0019885
HG001_00045	-	hypothetical protein	1,73	0,79	0,0259122	0,08438423
HG001_01627	gloB_1	Hydroxyacylglutathione hydrolase	1,729	0,79	0,00052534	0,00377032
HG001_02518	-	putative oxidoreductase	1,718	0,781	0,0004207	0,00316822
HG001_00711	-	hypothetical protein	1,71	0,774	4,90E-05	0,00052843
HG001_02654	-	anaerobic ribonucleotide reductase-activating protein	1,709	0,773	0,00044248	0,00329822
HG001_01183	-	hypothetical protein	1,708	0,772	0,00100779	0,0064846
HG001_00169	pfIB	Formate acetyltransferase	1,707	0,772	0,00020597	0,00178759
HG001_01791	artQ	Arginine transport system permease protein ArtQ	1,704	0,769	0,00047862	0,00345068
HG001_01322	-	hypothetical protein	1,696	0,762	0,00044895	0,00329822
HG001_00933	ptsH	Phosphocarrier protein HPr	1,693	0,76	0,00015267	0,00138969
HG001_00931	rlmI	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase I	1,681	0,749	0,00068358	0,00475959
HG001_01298	ald1	Alanine dehydrogenase 1	1,669	0,739	9,65E-05	0,00093762
HG001_01038	-	hypothetical protein	1,669	0,739	0,00011243	0,00107033
HG001_01597	infC	Translation initiation factor IF-3	1,667	0,737	0,00427705	0,02069042
HG001_00241	-	hypothetical protein	1,665	0,735	0,0012014	0,00757367
HG001_02669	clfB	Clumping factor B precursor	1,663	0,734	7,95E-05	0,00080629
HG001_01510	rpsT	30S ribosomal protein S20	1,661	0,732	0,00064956	0,0045396
HG001_00413	purR	Pur operon repressor	1,657	0,729	5,02E-05	0,00053827
HG001_00909	qoxC	Quinol oxidase subunit 3	1,655	0,726	2,07E-06	3,48E-05
HG001_00911	qoxA	putative quinol oxidase subunit 2 precursor	1,654	0,726	4,29E-05	0,00048626
HG001_00947	-	hypothetical protein	1,652	0,725	0,01822998	0,06549694
HG001_01715	-	Transposase IS200 like protein	1,648	0,721	0,03854488	0,11274555
HG001_01615	cycA_1	D-serine/D-alanine/glycine transporter	1,647	0,72	0,03579992	0,10643947
HG001_02410	-	Ferredoxin--NADP reductase	1,642	0,715	0,02601516	0,08457194
HG001_02156	bltD_2	Spermine/spermidine acetyltransferase	1,641	0,714	0,03986139	0,11489987
HG001_00783	nfuA	Fe/S biogenesis protein NfuA	1,64	0,714	0,01795648	0,06493563

Id	gene	product	FoldChange	log2FoldChange	pvalue	padj
HG001_02440	nirC	Nitrite transporter NirC	1,625	0,7	0,01166858	0,04659827
HG001_01297	tdcB	L-threonine dehydratase catabolic TdcB	1,623	0,698	0,00072953	0,00500553
HG001_00786	-	hypothetical protein	1,619	0,695	0,02966397	0,091644
HG001_02254	rplM	50S ribosomal protein L13	1,618	0,694	3,30E-05	0,00039713
HG001_00415	spoVG	Putative septation protein SpoVG	1,618	0,694	0,00042107	0,00316822
HG001_01503	prmA	Ribosomal protein L11 methyltransferase	1,617	0,693	0,00018356	0,00163109
HG001_01178	cls_1	Cardiolipin synthase	1,615	0,692	0,00257472	0,01434156
HG001_02394	tcaR_2	HTH-type transcriptional regulator TcaR	1,606	0,683	0,00526633	0,02444522
HG001_02420	gltT	Proton/sodium-glutamate symport protein	1,601	0,679	0,00721059	0,03143683
HG001_02164	deoC2	Deoxyribose-phosphate aldolase 2	1,59	0,669	8,34E-05	0,00083235
HG001_02542	ydfH	putative HTH-type transcriptional regulator YdfH	1,587	0,666	0,02671887	0,08606845
HG001_00309	rpsF	30S ribosomal protein S6	1,586	0,666	7,03E-05	0,00072883
HG001_01332	-	Heptaprenyl diphosphate synthase (HEPPP synthase) subunit 1	1,585	0,665	0,00320458	0,01679705
HG001_00372	mccB	Cystathionine gamma-lyase	1,585	0,665	0,0332766	0,10078965
HG001_00910	qoxB	putative quinol oxidase subunit 1	1,583	0,663	0,00012363	0,00115928
HG001_02734	-	hypothetical protein	1,581	0,661	0,01358134	0,05225314
HG001_00759	-	CsbD-like protein	1,579	0,659	0,00014155	0,0012948
HG001_02458	hlgC	Gamma-hemolysin component C precursor	1,578	0,658	0,01443216	0,05496
HG001_02155	rpoE	putative DNA-directed RNA polymerase subunit delta	1,577	0,657	0,01735137	0,06299157
HG001_00513	yhdG_1	putative amino acid permease YhdG	1,57	0,651	0,00072477	0,00500553
HG001_00946	pdhD	Dihydrolipoyl dehydrogenase	1,569	0,649	2,12E-05	0,00026955
HG001_01842	-	hypothetical protein	1,569	0,65	0,00605582	0,02716384
HG001_02605	-	hypothetical protein	1,567	0,648	0,00072964	0,00500553
HG001_00679	-	hypothetical protein	1,563	0,645	0,03617959	0,10720794
HG001_02632	-	hypothetical protein	1,562	0,643	0,02892427	0,0907104
HG001_01203	-	hypothetical protein	1,554	0,636	0,02476247	0,08207241
HG001_00554	-	hypothetical protein	1,545	0,628	0,00322282	0,0168453
HG001_01599	lysP_2	Lysine-specific permease	1,54	0,623	0,00031161	0,00251714
HG001_00022	walR	Transcriptional regulatory protein WalR	1,539	0,622	0,00013054	0,00120591
HG001_02405	-	CDP-Glycerol:Poly(glycerophosphate) glycerophosphotransferase	1,538	0,621	0,00269011	0,01472068
HG001_02211	-	Nucleoside recognition	1,537	0,62	0,0020255	0,0118112
HG001_01404	-	hypothetical protein	1,535	0,618	0,0017147	0,01022246
HG001_00307	ychF	Ribosome-binding ATPase YchF	1,529	0,612	0,00312555	0,01656898
HG001_00523	-	hypothetical protein	1,529	0,613	0,00331833	0,0172961
HG001_01173	-	hypothetical protein	1,529	0,613	0,02726729	0,08727788
HG001_02676	aur	Zinc metalloproteinase aureolysin precursor	1,527	0,611	0,03520592	0,10494289
HG001_00476	rpsL	30S ribosomal protein S12	1,523	0,607	0,00573297	0,02596536
HG001_01949	nos	Nitric oxide synthase oxygenase	1,521	0,605	0,00044836	0,00329822
HG001_01744	-	hypothetical protein	1,52	0,604	0,00265688	0,0146246
HG001_02513	abgT	p-aminobenzoyl-glutamate transport protein	1,52	0,604	0,00431026	0,02078278

Id	gene	product	FoldChange	log2FoldChange	pvalue	padj
HG001_00414	yabJ	Enamine/imine deaminase	1,518	0,602	9,87E-05	0,00095405
HG001_00492	sdrC	Serine-aspartate repeat-containing protein C precursor	1,518	0,602	0,00010744	0,00102813
HG001_01416	srrB	Sensor protein SrrB	1,518	0,602	0,01180374	0,04676386
HG001_02684	-	N-carbamoylsarcosine amidase	1,516	0,6	0,00016755	0,00150315
HG001_02747	-	hypothetical protein	1,514	0,598	0,01023432	0,04160619
HG001_02601	crtN	Dehydrosqualene desaturase	1,51	0,595	0,00133991	0,00827907
HG001_01847	-	hypothetical protein	1,508	0,592	0,03208945	0,09752266
HG001_02158	-	hypothetical protein	1,505	0,59	0,0022464	0,01281888
HG001_01959	-	Acyl-coenzyme A:6-aminopenicillanic acid acyl-transferase	1,502	0,586	0,04039703	0,11545747
HG001_01140	-	Calcineurin-like phosphoesterase	1,502	0,587	0,04732498	0,13102139

VII.6. **Annexe 6** - Résultats de transcriptomique comparative entre la souche  
HG001Δrsal et la souche HG001Δrsal Pcn51-rsal

Id	gene	product	FoldChange DRsal- Comp	pvalue
HG001_02644	fda	Fructose-bisphosphate aldolase class 1	4,276	2,70E-81
HG001_01144	miaB	(Dimethylallyl)adenosine tRNA methylthiotransferase Mia	4,031	3,52E-56
HG001_01146	-	Thiamine-precursor transporter protein (ThiW)	3,385	2,50E-58
HG001_01435	gnd	6-phosphogluconate dehydrogenase%2C decarboxylating	3,194	1,49E-46
HG001_01648	tyrS	Tyrosine--tRNA ligase	3,149	4,95E-24
HG001_01145	-	hypothetical protein	3,133	4,17E-27
HG001_01340	ebpS	Elastin-binding protein EbpS	2,937	3,56E-43
HG001_01202	tkt	Transketolase	2,766	1,34E-21
HG001_00482	hchA	Molecular chaperone Hsp31 and glyoxalase 3	2,678	7,33E-18
HG001_01191	-	Putative phosphatase	2,656	9,77E-56
HG001_00271	lplJ_1	Lipoate-protein ligase LplJ	2,591	2,26E-18
HG001_01764	ydeN	Putative hydrolase YdeN	2,443	3,59E-12
HG001_01434	-	Glyoxalase-like domain protein	2,385	2,02E-24
HG001_01658	aroF	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	2,335	8,34E-22
HG001_00270	-	hypothetical protein	2,327	1,43E-12
HG001_02674	arcA	Arginine deiminase	2,238	4,22E-10
HG001_02673	arcB	Ornithine carbamoyltransferase%2C catabolic	2,233	6,80E-10
HG001_02672	arcD	Arginine/ornithine antiporter	2,209	2,54E-09
HG001_02638	panE_2	2-dehydropantoate 2-reductase	2,164	9,92E-08
HG001_02408	yhfP	Putative quinone oxidoreductase YhfP	2,153	1,53E-13
HG001_02670	arcR	HTH-type transcriptional regulator ArcR	2,114	5,82E-09
HG001_02671	arcC2	Carbamate kinase 2	2,1	1,02E-07
HG001_02684	-	N-carbamoylsarcosine amidase	2,083	1,01E-15
HG001_02121	tenA	Putative thiaminase-2	2,074	8,30E-18
HG001_02172	yhfK	putative sugar epimerase YhfK	2,035	3,37E-28
HG001_00269	ymdB	O-acetyl-ADP-ribose deacetylase	2,009	5,56E-11
HG001_02452	emrB_2	Multidrug export protein EmrB	1,936	3,58E-16
HG001_00676	murB	UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase	1,935	4,00E-07
HG001_02120	thiD	Hydroxymethylpyrimidine/phosphomethylpyrimidine kinase	1,926	8,48E-14
HG001_00260	bgkK	Beta-glucoside kinase	1,92	7,22E-08
HG001_02709	lipA_2	Lipase 1 precursor	1,918	1,40E-10
HG001_01222	dinB_1	DNA polymerase IV	1,915	3,71E-07
HG001_00456	-	putative PIN and TRAM-domain containing protein precursor	1,843	1,85E-12
HG001_02375	mro	Aldose 1-epimerase precursor	1,833	1,53E-07
HG001_00455	-	hypothetical protein	1,826	1,22E-18
HG001_00675	-	CHY zinc finger	1,813	2,13E-08
HG001_02119	thiM	Hydroxyethylthiazole kinase	1,804	1,57E-16
HG001_02297	swrC	Swarming motility protein SwrC	1,795	1,70E-16
HG001_00934	ptsI	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase	1,785	4,10E-22
HG001_02118	thiE	Thiamine-phosphate synthase	1,774	9,31E-18
HG001_00268	gcvH_1	Glycine cleavage system H protein	1,745	6,17E-06
HG001_01211	-	Iron-sulphur cluster biosynthesis	1,718	2,97E-11
HG001_00432	folB	Dihydroneopterin aldolase	1,709	6,11E-06
HG001_00464	-	RNA polymerase factor sigma-70	1,699	4,29E-09
HG001_00718	-	hypothetical protein	1,696	2,30E-05
HG001_00803	-	NADH oxidase	1,69	4,98E-06
HG001_01176	ltaE	Low specificity L-threonine aldolase	1,686	1,71E-09
HG001_01440	pdhC_2	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component	1,673	1,49E-14
HG001_01487	yqfL	Putative pyruvate%2C phosphate dikinase regulatory protein	1,673	5,06E-09
HG001_02056	-	2-oxoglutaramate amidase	1,671	2,63E-09

Id	gene	product	FoldChange DRsal- Comp	pvalue
HG001_00573	ideR	Iron-dependent repressor IdeR	1,664	2,49E-10
HG001_01643	serA	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	1,651	1,73E-06
HG001_01956	pgl	6-phosphogluconolactonase	1,631	1,56E-09
HG001_01557	lytC	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase LytC precursor	1,63	1,47E-12
HG001_01441	bfmBAB	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta	1,612	1,40E-14
HG001_02581	cynR_2	HTH-type transcriptional regulator CynR	1,612	8,83E-06
HG001_01558	dtd	D-tyrosyl-tRNA(Tyr) deacylase	1,611	5,12E-09
HG001_02049	-	Acetyltransferase (GNAT) family protein	1,607	9,14E-06
HG001_00730	ssp	Extracellular matrix protein-binding protein emp precursc	1,605	0,000668341
HG001_00933	ptsH	Phosphocarrier protein HPr	1,602	5,52E-15
HG001_00817	cdr	Coenzyme A disulfide reductase	1,601	0,000149928
HG001_02685	-	hypothetical protein	1,599	1,86E-09
HG001_00334	guaA	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	1,597	5,51E-07
HG001_00877	lpj_2	Lipoate-protein ligase LpJ	1,595	0,000776191
HG001_01325	aroA	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	1,587	3,83E-10
HG001_02117	yidC	Membrane protein insertase YidC precursor	1,585	7,11E-16
HG001_01174	-	hypothetical protein	1,577	0,010250685
HG001_01142	korB	2-oxoglutarate oxidoreductase subunit KorB	1,57	7,40E-06
HG001_01689	ribH	6%2C7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	1,567	3,46E-05
HG001_01511	-	DNA polymerase III subunit delta	1,567	0,004691861
HG001_01447	xseB	Exodeoxyribonuclease 7 small subunit	1,562	3,45E-06
HG001_01141	korA	2-oxoglutarate oxidoreductase subunit KorA	1,557	1,14E-05
HG001_01099	femA_1	Aminoacyltransferase FemA	1,546	0,000947749
HG001_01919	vraS	Sensor protein VraS	1,544	7,67E-06
HG001_02376	-	hypothetical protein	1,543	0,001067057
HG001_01094	rbgA	Ribosome biogenesis GTPase A	1,541	4,11E-05
HG001_01119	rplGA	putative ribosomal protein YlxQ	1,54	2,86E-10
HG001_01452	accB_1	Biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase	1,54	5,58E-06
HG001_00088	deoB	Phosphopentomutase	1,53	2,90E-05
HG001_01442	bfmBAA	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha	1,525	3,91E-11
HG001_01117	-	hypothetical protein	1,523	1,37E-08
HG001_02388	emrB_1	Multidrug export protein EmrB	1,519	3,20E-07
HG001_01488	ccpN	Transcriptional repressor CcpN	1,518	1,10E-05
HG001_00130	psf-1	4'-phosphopantetheinyl transferase psf-1	1,517	6,42E-09
HG001_01503	prmA	Ribosomal protein L11 methyltransferase	1,517	7,77E-06
HG001_00742	pspB	Putative phosphoserine phosphatase 2	1,515	1,04E-05
HG001_02457	hlgA	Gamma-hemolysin component A precursor	1,512	0,002339341
HG001_01235	femB	Aminoacyltransferase FemB	1,507	3,67E-11

Id	gene	product	FoldChange Δrsal/compl	pvalue
HG001_02423	-	Acid shock protein	0,256	4,63E-39
HG001_01846	-	Bacteriophage holin	0,322	4,00E-33
HG001_00184	ldh1	L-lactate dehydrogenase 1	0,35	2,21E-24
HG001_01867	-	hypothetical protein	0,352	3,27E-33
HG001_01853	-	hypothetical protein	0,363	9,72E-41
HG001_01863	-	hypothetical protein	0,363	6,26E-35
HG001_01854	-	hypothetical protein	0,365	5,25E-33
HG001_01866	-	Phage capsid family protein	0,366	4,75E-28
HG001_01849	atl_3	Bifunctional autolysin precursor	0,374	1,21E-26
HG001_01864	-	Phage gp6-like head-tail connector protein	0,376	2,16E-30
HG001_01855	-	Prophage endopeptidase tail	0,383	6,43E-33
HG001_01859	-	Phage protein	0,386	4,19E-29
HG001_01856	-	Phage tail protein	0,386	2,77E-20
HG001_00055	-	Oleate hydratase	0,387	5,97E-23
HG001_01852	-	hypothetical protein	0,39	1,34E-15
HG001_01861	-	hypothetical protein	0,393	8,67E-24
HG001_01865	-	hypothetical protein	0,393	9,33E-19
HG001_01857	-	hypothetical protein	0,394	1,03E-35
HG001_01850	-	hypothetical protein	0,396	5,72E-22
HG001_02513	abgT	p-aminobenzoyl-glutamate transport protein	0,406	2,78E-29
HG001_01862	-	hypothetical protein	0,407	3,40E-24
HG001_00544	adh	Alcohol dehydrogenase	0,413	5,34E-20
HG001_01860	-	Phage major tail protein 2	0,415	1,98E-23
HG001_01858	-	hypothetical protein	0,419	3,06E-16
HG001_01848	-	hypothetical protein	0,422	4,15E-25
HG001_02054	-	hypothetical protein	0,425	1,05E-14
HG001_01847	-	hypothetical protein	0,429	8,42E-17
HG001_01903	-	hypothetical protein	0,43	2,16E-16
HG001_01871	-	Phage terminase large subunit	0,433	7,27E-16
HG001_01885	-	hypothetical protein	0,434	6,14E-09
HG001_01870	-	Phage portal protein%2C SPP1 Gp6-like	0,442	4,00E-21
HG001_01851	-	hypothetical protein	0,445	7,19E-11
HG001_00223	-	hypothetical protein	0,452	1,04E-09
HG001_01371	-	Phage capsid family protein	0,464	6,45E-08
HG001_01902	-	Phage antirepressor protein KilAC domain prot	0,469	7,20E-10
HG001_00227	esxA	Virulence factor EsxA	0,472	3,64E-16
HG001_01892	-	hypothetical protein	0,473	7,40E-09
HG001_01893	-	hypothetical protein	0,479	9,89E-11
HG001_02520	-	hypothetical protein	0,479	2,41E-07
HG001_01872	-	Terminase small subunit	0,481	6,43E-10
HG001_02756	-	RsaG	0,484	2,43E-14
HG001_00249	focA	putative formate transporter 1	0,485	5,46E-09
HG001_00550	-	putative ABC transporter permease protein	0,487	4,55E-10
HG001_00169	pflB	Formate acetyltransferase	0,491	2,91E-08
HG001_01869	-	Phage Mu protein F like protein	0,493	2,76E-10
HG001_00170	pflA	Pyruvate formate-lyase-activating enzyme	0,495	7,70E-07
HG001_00911	qoxA	putative quinol oxidase subunit 2 precursor	0,495	1,43E-06
HG001_01880	-	hypothetical protein	0,496	1,82E-07
HG001_01899	-	hypothetical protein	0,5	1,61E-08





## Des ARN non-codants au cœur du métabolisme des sucres : Nouveaux mécanismes et impact sur l'adaptation et la virulence.

Thèse soutenue par **Delphine MEGE BRONESKY**, le 21 septembre 2017

*Staphylococcus aureus* est une bactérie pathogène opportuniste de l'homme qui se distingue par son extraordinaire facilité à coloniser différents tissus et organes de l'hôte. *S. aureus* provoque de nombreuses maladies, allant des plus bénignes comme les impétigos, à des maladies plus graves tel que des pneumonies, ou encore des endocardites. Le pouvoir pathogène de *S. aureus* est dû à l'expression de nombreux facteurs de virulence, mais aussi à sa capacité de s'adapter à son environnement. En pénétrant dans nos tissus *S. aureus* doit, pour survivre, faire face aux changements environnementaux et à la disponibilité des nutriments. L'expression des gènes impliqués dans ces réponses adaptatives, est soumise à une régulation fine, apportée par les systèmes à deux composants, les facteurs de transcription et les ARNnc (small ARN). Les ARNnc sont des régulateurs souvent impliqués dans les processus adaptatifs qui requièrent une réponse cellulaire rapide. Dans cette étude, j'ai identifié les fonctions d'un ARNnc, appelé RsaI, qui est réprimé lorsque la concentration de glucose extérieur est forte. RsaI, réprime la traduction, de plusieurs ARNm impliqués dans le métabolisme carboné, incluant un transporteur majeur du glucose, et également IcaR, le répresseur de la production de exopolysaccharides requis pour la synthèse de biofilms. Il participe à l'inhibition de plusieurs enzymes de la voie de synthèse des pentoses phosphates. De plus, RsaI joue le rôle d'un ARNnc « éponge » afin de réguler l'action d'autre ARNnc, répondant quant à lui au glucose 6P et interagit avec un autre ARNnc, activé lors d'un stress NO (l'oxyde nitrique) qui est produit lors de l'internalisation de *S. aureus* par les macrophages. Cet ARN multifonctionnel est un véritable senseur du taux de glucose extérieur engendrant ainsi un *switch* métabolique, nécessaire à la réponse adaptative de *S. aureus* en conditions infectieuses. Cet ARNnc illustre bien le lien étroit entre le métabolisme et la virulence de *S. aureus*.

*Staphylococcus aureus* is a human opportunist pathogenic bacterium that differentiates itself by its extraordinary capability to colonize different host tissues and organs. *S. aureus* generates multiple infectious conditions, from benign, as an impetigo, to more serious conditions, such as pneumonias or endocarditis. *S. aureus's* pathogenic power is due to the expression of multiple virulence factors, and by its ability to adapt to the environment. Once entered in human tissues, *S. aureus* must face environmental changes and the availability of nutriments to survive. Gene expressions implicated in these adaptive responses are submitted to a fine regulation, carried by two component systems, transcriptional factors, and sRNA (small RNA). sRNA are regulators that are often involved in the adapting processes that require a quick cellular response. In this study, I have identified the functions of a sRNA, called RsaI, which is repressed when the external concentration of glucose is at high levels. RsaI represses the translation of multiple mRNA implicated in the carbon metabolism, including a major glucose transporter, and IcaR, the repressor of production of PIA (polysaccharide intercellular adhesion), element required for the biofilms synthesis. RsaI participates in the inhibition of multiple enzymes involved in the pentose phosphate pathway. Furthermore, RsaI has the role of a ARNnc « sponge » regulating the actions of other sRNA. RsaI reacts to glucose 6P and interacts with another sRNA, activated with a NO (nitric oxide) stress, which is produced during the internalization of *S. aureus* by the macrophages. This multifunctional RNA is a real sensor of the external glucose levels, generating a metabolic *switch* that is necessary to ensure *S. aureus* adaptive response in infectious conditions. This sRNA illustrates the strong link between *S. aureus's* metabolism and virulence.