Régulations post-transcriptionnelles de l'expression génique de la cellule hôte en réponse à l'infection bactérienne

Alice Lebreton

▶ **To cite this version:**

Alice Lebreton. Régulations post-transcriptionnelles de l'expression génique de la cellule hôte en réponse à l'infection bactérienne. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris Diderot (Paris 7), 2015. tel-02471940v1

HAL Id: tel-02471940

https://theses.hal.science/tel-02471940v1

Submitted on 9 Feb 2020 (v1), last revised 18 Feb 2020 (v2)

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.

Habilitation à Diriger des Recherches

Université Paris 7 – Denis Diderot
UFR Sciences du vivant
Bâtiment Lamarck
35, rue Hélène Brion, 75013 Paris

Régulations post-transcriptionnelles de l'expression génique de la cellule hôte en réponse à l'infection bactérienne

Soutenue le 25 juin 2015 par

Dr. Alice LEBRETON

Chargée de recherche INRA

Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure
ENS, UMR CNRS 8197, Inserm 1024
Section Génomique Fonctionnelle
Équipe Infection Bactérienne et Devenir de l'ARN
46, rue d'Ulm
75005 Paris

Table des matières

Résumé **3**

Activités de recherche passées **4**

Stage de Licence – Étude histologique d'un modèle humain de la maladie de Parkinson **4**

Stage Erasmus – Transformation de l'isopropylamine en L-alaninol par *Pseudomonas*. **4**

Travaux de thèse – Dynamique de la biogenèse des ribosomes chez *Saccharomyces cerevisiae* **4**

Voies de biogenèse des ribosomes eucaryotes 4
Conservation et rôle de Nsa2 dans la biogenèse de la grande sous-unité ribosomique 6
Scénario d'assemblage des particules pré-60S 6
Dernier point de contrôle de la biogenèse des ribosomes et recyclage des facteurs navettes 8
Conclusions 9

Travaux de post-doctorat – Activité et régulation de l'exosome eucaryote **10**

Mécanismes nucléaires de contrôle-qualité des ARN eucaryotes 10
Rôle de l'hélicase Mtr4 dans la voie TRAMP-exosome chez *Saccharomyces cerevisiae* 12
Caractérisation de l'homologue humain de TRAMP 13
Activité endonucléolytique de l'exosome eucaryote 13
Caractérisation des substrats physiologiques de l'exosome 14

Travaux de CR2 INRA – Régulation de l'expression des gènes de l'hôte par *L. monocytogenes* **14**

LntA, un facteur de virulence de *Listeria* ciblant un complexe chromatinien pour réguler les gènes de l'hôte 15
Composition et activité du complexe chromatinien associé à BAHD1 18
Réponse IFN-III des cellules épithéliales à l'infection bactérienne 21
Projet secondaire : réponse microARN intestinale à l'infection par *Listeria* 21

Projets : Infection bactérienne & Devenir de l'ARN cellulaire **23**

Problématique et objectifs **23**

Résumé de la question de l'art en 2015 **24**

Projet secondaire : Suivi de la sécrétion des facteurs de virulence de *Listeria monocytogenes* grâce à une nouvelle protéine fluorescente **25**

Conclusions **26**

Bibliographie **27**

Résumé

Listeria monocytogenes est un pathogène fréquent du bétail et l'agent de la listériose humaine, une maladie grave pour les femmes enceintes, les personnes âgées ou immunodéprimées. La prolifération de cette bactérie dans les cellules qu'elle infecte s'accompagne d'une reprogrammation de l'expression génique et des fonctions cellulaires.

Après un doctorat sous la direction de Micheline Fromont-Racine (groupe d'Alain Jacquier) à l'Institut Pasteur sur la biogenèse des ribosomes, mes travaux de post-doctorat dans le groupe dirigé par Bertrand Séraphin au Centre de Génétique Moléculaire (Gif-sur-Yvette) ont mis en évidence une nouvelle activité enzymatique – une endonucléase – dans l'un des complexes de dégradation des ARN eucaryotes les plus étudiés, l'exosome.

Recrutée à l'INRA en tant que chargée de recherche en 2008, j'ai rejoint jusqu'en 2014 l'équipe dirigée par Pascale Cossart à l'Institut Pasteur. J'y ai étudié comment la bactérie pathogène *Listeria monocytogenes* détourne la machinerie de répression chromatinienne des cellules qu'elle infecte, pour moduler certaines réponses immunitaires.

Je dirige depuis octobre 2014 à l'Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure (IBENS) une équipe de recherche qui étudie les mécanismes post-transcriptionnels régulant les ARNm eucaryotes en réponse à l'infection par *Listeria monocytogenes*. Nous travaillons sur quatre problématiques principales : L'infection conduit-elle à une dégradation globale ou spécifique des ARNm ? La machinerie et l'efficacité de la traduction sont-elles perturbées ? Quels effecteurs moléculaires de la bactérie ou de l'hôte sont impliqués dans ces processus ? Quelles en sont les conséquences patho-physiologiques ?

Ces travaux, reposant sur des technologies haut débit adaptées à l'étude du devenir des ARNm, ainsi que sur des approches plus classiques de microbiologie cellulaire, permettront de mieux comprendre les impératifs de l'adaptation mutuelle entre la bactérie et son hôte, d'identifier de nouveaux facteurs de virulence, et d'explorer les voies de contrôle traductionnel eucaryotes dans un contexte d'infection.

Pour des raisons de confidentialité, ce manuscrit déposé en archive ouverte est une version allégée. Une partie des travaux non publiés, les projets de recherche détaillés de l'équipe Infection & Devenir de l'ARN, ainsi que le curriculum vitae et la liste de publications de l'auteur, sujets à obsolescence, ne figurent donc pas dans ce document.

Activités de recherche passées

Stage de Licence – Étude histologique d'un modèle humain de la maladie de Parkinson

Ma première expérience de recherche remonte à l'été 1999 où j'ai effectué un stage de deux mois au sein de l'unité *Mécanismes et conséquences de la mort neuronale* à l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière sous la direction de Rita Raisman-Vozari. Le projet qui m'avait été confié était de comparer, par marquage immunohistochimique sur des coupes de cerveaux, le nombre d'astrocytes dans la substance noire d'un modèle de souris développé par l'équipe et reproduisant certains symptômes de la maladie de Parkinson.

Cette initiation au monde de la recherche m'a confirmée dans ma décision de continuer dans cette voie, avec quelques nuances concernant le domaine de recherche, dans lequel je ne me projetais pas à long terme. J'étais en particulier très critique sur deux points. L'un concernait la démarche expérimentale : on m'avait confié trois animaux mutants et deux contrôles, avec un mélange des deux sexes, ce qui empêchait toute conclusion faute de statistiques. L'autre portait sur une prise en compte trop légère des préoccupations éthiques en expérimentation animale et des mesures de sécurité lors de la manipulation de produits dangereux.

Stage Erasmus – Transformation de l'isopropylamine en L-alaninol par *Pseudomonas*.

Au second semestre de mon année de Maîtrise, j'ai eu la chance de pouvoir participer au programme Erasmus, et effectuer un stage de six mois à plein temps dans le laboratoire dirigé par Thomas Leisinger, à l'institut de Microbiologie de l'École Polytechnique Fédérale (ETH) de Zurich. J'y ai participé aux travaux d'une étudiante en thèse, Susana de Azevedo-Wäsch, qui avait pour but de caractériser une nouvelle voie métabolique d'une espèce de *Pseudomonas* capable d'utiliser l'isopropylamine, à des fins biotechnologiques (de Azevedo Wäsch *et al*. 2002). Son objectif était de pouvoir détourner cette voie pour produire à coût réduit le L-alaninol, un composé de synthèse utilisé en pharmacologie.

Au cours de ce stage, j'ai produit et caractérisé du point de vue enzymologique l'une des enzymes de la voie, IpuF. Il s'agit d'une γ-glutamylamide hydrolase à spectre large, qui catalyse l'étape finale de conversion d'un intermédiaire réactionnel, le γ-glutamyl-L-alaninol, en L-alaninol.

Ce stage était ma première rencontre avec la microbiologie expérimentale, et m'a passionnée, non seulement pour les recherches elles-mêmes, mais aussi pour les interactions dont j'ai pu bénéficier au sein du laboratoire, qui travaillait sur des sujets très divers (biologie des archées, étude des phages, etc.). Cette expérience m'a conduite à me spécialiser en microbiologie lors de mon DEA.

Travaux de thèse – Dynamique de la biogenèse des ribosomes chez *Saccharomyces cerevisiae*

J'ai effectué mon stage de DEA, puis mes travaux de thèse, sous la direction de Micheline Fromont-Racine, dans l'équipe *Génétique des Interactions Macromoléculaires* dirigée par Alain Jacquier à l'Institut Pasteur. J'y ai étudié la dynamique des facteurs pré-ribosomiques au cours de la biogenèse de la grande sous-unité ribosomique chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Voies de biogenèse des ribosomes eucaryotes

Le processus d'assemblage des ribosomes est très conservé chez les eucaryotes, étroitement régulé en réponse aux stress environnementaux et aux conditions de croissance cellulaire. Il consomme, dans les cellules eucaryotes en prolifération, plus de 50% de l'énergie produite. Cette voie métabolique débute dans le nucléole, se poursuit dans le nucléoplasme et s'achève dans le cytoplasme (**Erreur ! Référence non valide pour un signet.**).

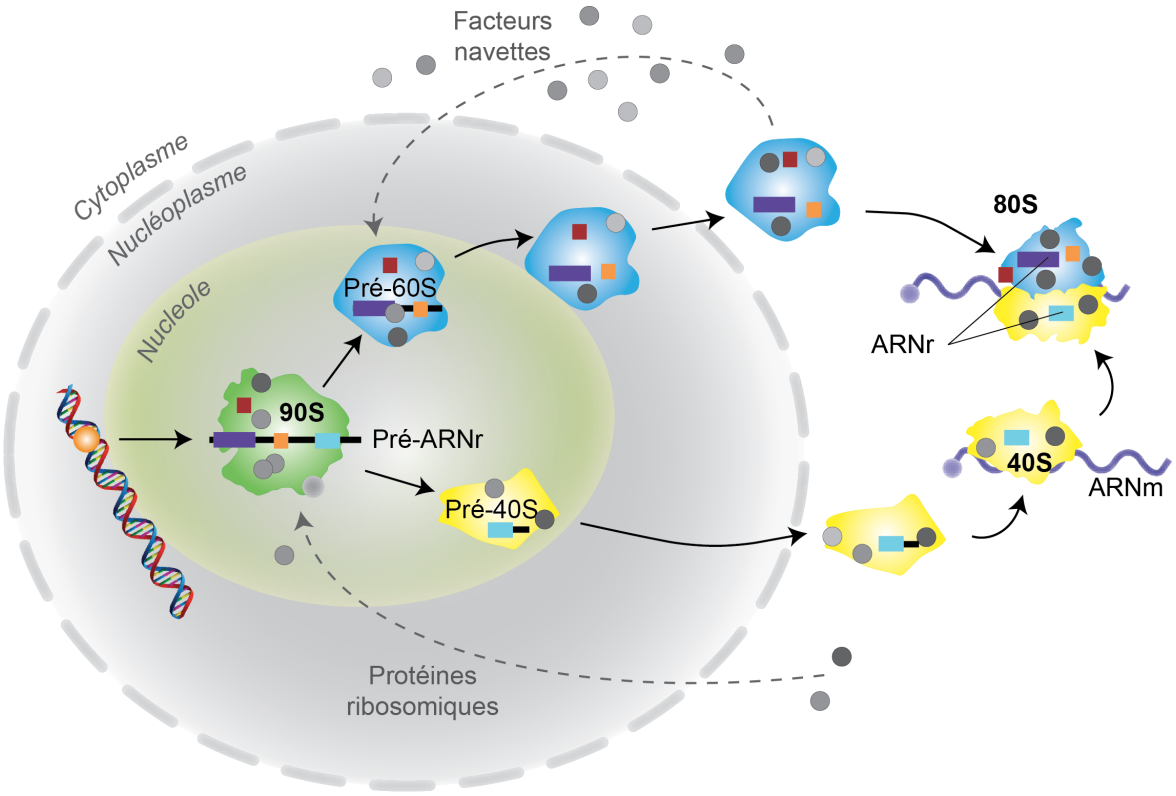

Figure 1. Un aperçu de la biogenèse des ribosomes chez *Saccharomyces cerevisiae*. Les ARN polymérases I et III transcrivent le précurseur d'ARN ribosomique (ARNr) 35S et l'ARNr 5S, qui s'associent dans le nucléole aux protéines ribosomiques et aux facteurs pré-ribosomiques pour former la particule 90S. La biogenèse suit ensuite deux voies distinctes, la pré-60S qui produira la grande sous-unité ribosomique, et la pré-40S qui conduira à la petite. Une séquence ordonnée de réactions de maturation des ARNr, conjointe à l'association et à la dissociation de facteurs protéiques, accompagne le transport des particules vers le nucléoplasme, puis le cytoplasme, où deux sous-unités matures s'associent à un ARN messager (ARNm) pour former un ribosome 80S lors de la traduction.

Les sous-unités ribosomiques 40S et 60S sont des structures ribonucléoprotéiques complexes : les protéines ribosomiques s'associent à deux transcrits précurseurs, le 5S et le 35S. Ce dernier est maturé par élimination de séquences ETS (External Transcribed Spacer) et ITS (Internal Transcribed Spacer), pour donner les ARNr matures 18S, 5,8S et 25S (**Erreur ! Référence non valide pour un signet.**).

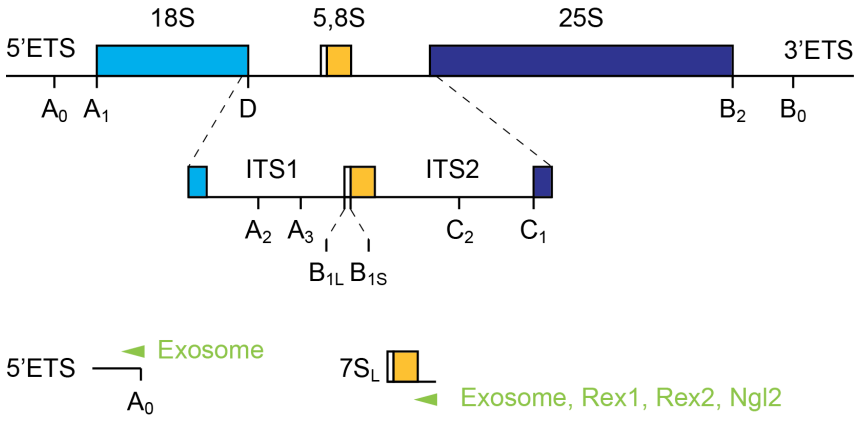

Figure 2. Principaux sites de clivage du précurseur 35S lors de la maturation des ARNr 18S, 5,8S et 25S.

La biogenèse nécessite l'intervention d'un grand nombre de facteurs, dits « pré-ribosomiques », spécifiques aux cellules eucaryotes. En effet, chez les procaryotes, les ARNr matures et les protéines ribosomiques peuvent s'auto-assembler *in vitro*, en présence d'une source de chaleur, pour former des

ribosomes fonctionnels (Traub and Nomura 1969). Chez les eucaryotes, la compartimentation, ainsi que l'importance accrue du rôle des protéines ribosomiques dans la structure finale du ribosome, ont conduit à une complexification du processus d'assemblage. Depuis le début des années 2000, de nombreux travaux ont permis de mieux cerner la composition des particules pré-ribosomiques eucaryotes (Nissan *et al*. 2002; Krogan *et al*. 2004; Gavin *et al*. 2006) ; l'analyse fonctionnelle du rôle de chacun des facteurs identifiés se poursuit, mais une grande part des mécanismes moléculaires mis en jeu reste obscure (Fromont-Racine *et al*. 2003).

Les facteurs pré-ribosomiques ne participent que temporairement à la biogenèse, et ne se retrouvent pas dans l'architecture finale des ribosomes matures. Ils exercent leurs fonctions catalytiques, régulatrices ou de transport des particules selon une chronologie bien précise, puis sont libérés, pour être potentiellement recyclés. Au cours de mon DEA, j'ai participé à une étude montrant que l'ordre d'assemblage des protéines sur les particules pré-60S s'opérait de manière séquentielle et reposait, au moins en partie, sur des interactions protéine-protéine (Saveanu *et al*. 2003).

Les travaux que j'ai réalisés au cours de ma thèse ont permis la caractérisation fonctionnelle de nouveaux facteurs participant à deux points de contrôle de la biogenèse de la grande sous-unité ribosomique, l'un dans le noyau, l'autre dans le cytoplasme. Par l'utilisation de techniques très diverses (purifications par affinité en tandem, microscopie, cribles génomiques, analyse de polysomes, reconstitution d'interactions *in vitro*, protéomique semi-quantitative, etc.), j'ai cherché à approfondir les aspects dynamiques de la biogenèse, en essayant d'établir l'ordre d'assemblage, de dissociation et de recyclage de ces facteurs pré-60S, tout au long de la voie métabolique.

Conservation et rôle de Nsa2 dans la biogenèse de la grande sous-unité ribosomique

La protéine nucléaire-nucléolaire Nsa2 a été identifiée dans plusieurs complexes pré-ribosomiques, et est essentielle à la maturation de la grande sous-unité ribosomique (Lebreton *et al*. 2006a). Il s'agit de l'une des protéines les plus conservées entre la levure et les eucaryotes supérieurs. L'expression en *trans* de l'orthologue humain, *TINP1* (TGFβ-Inducible Protein 1), est capable de complémenter, bien que très partiellement, le phénotype de souches de levure où *NSA2* est invalidé.

Par des cribles génétiques et des purifications de complexes nucléoprotéiques, j'ai montré que Nsa2 était un partenaire physique et fonctionnel privilégié de la GTPase Nog1. Toutes deux sont nécessaires pour une étape clé de l'assemblage de la grande sous-unité ribosomique dans le noyau : le clivage C2, qui permet l'élimination de l'ITS2, une séquence d'ARN précurseur comprise entre les ARNr 5,8S et 25S (Figure 2).

En l'absence de Nsa2, Nog1 est associée à des complexes pré-ribosomiques dont la maturation est bloquée. En revanche, en l'absence de Nog1, Nsa2 disparaît des complexes pré-60S. Plus généralement, l'abondance de Nsa2 dans les cellules dépend de l'activité de la biogenèse des ribosomes : lorsque la voie métabolique est bloquée en amont du point d'action de Nsa2, ce facteur disparaît, sans que la quantité de l'ARNm correspondant soit affectée. Ceci suggère que la quantité de Nsa2 dans les cellules est étroitement régulée ; de façon intéressante, cette caractéristique est partagée avec l'orthologue humain, qui est surexprimé en réponse au TGFβ.

Scénario d'assemblage des particules pré-60S

Si certains facteurs pré-ribosomiques restent associés aux sous-unités en cours de maturation du nucléole jusqu'au cytoplasme, d'autres au contraire s'associent de manière très transitoire pour accomplir leur fonction. En raison de cette évolution constante de la composition des particules pré-ribosomiques, les complexes protéiques purifiés par chromatographie d'affinité en tandem sont des mélanges de plusieurs complexes distincts, chacun reflétant une étape précise de la biogenèse. À la suite de nos travaux sur l'ordre d'assemblage des sous-unités ribosomiques (Saveanu *et al*. 2003), nous avons souhaité mieux définir les états successifs de la grande sous-unité ribosomique au cours de sa maturation, en purifiant des complexes homogènes grâce à l'utilisation de mutants.

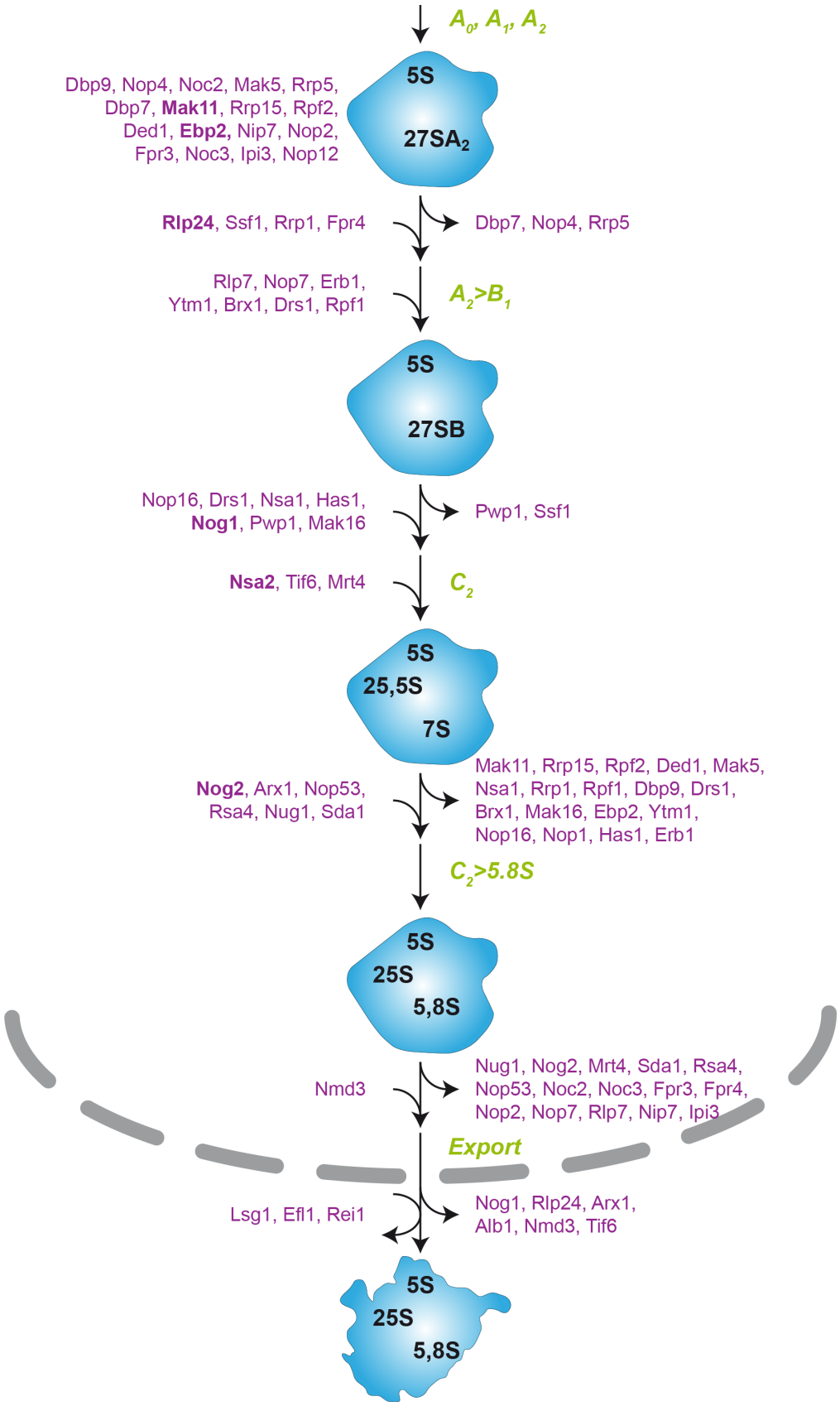

Figure 3. Modèle envisagé pour l'assemblage et la dissociation des facteurs pré-ribosomiques sur les particules pre-60S. Ce modèle a été établi d'après les données issues de notre étude, et en cohérence avec les travaux préalablement publiés dans le domaine. Les facteurs indiqués en caractères gras sont ceux ayant servis d'appâts ou de mutants clés dans notre étude.

Pour ceci, nous avons choisi plusieurs couples de facteurs, dont l'un est utilisé comme appât de chromatographie d'affinité en tandem, tandis que l'autre est réprimé. Il est ainsi possible d'isoler des sous-complexes pré-ribosomiques caractéristiques d'une étape donnée de la biogenèse des ribosomes. Ces complexes sont comparés à ceux purifiés dans un contexte sauvage, par la technique de SILAC[1].

Les six couples de facteurs utilisés jalonnent la voie de biogenèse de la grande sous-unité. Nous avons ainsi pu établir des groupes de facteurs intervenant précocement ou tardivement dans la biogenèse, par rapport au point d'action de chacun des facteurs réprimé (Figure 3). Grâce à ces résultats, nous disposons désormais d'un aperçu assez complet du scénario d'assemblage de la grande sous-unité ribosomique, du nucléole au cytoplasme (Lebreton *et al*. 2008a).

Dernier point de contrôle de la biogenèse des ribosomes et recyclage des facteurs navettes

Les étapes finales de fabrication de la grande sous-unité ribosomique sont encore assez mal définies : dans le cytoplasme, les derniers facteurs pré-ribosomiques, dits « navettes », sont décrochés des particules pré-60S, recyclés vers le noyau, et réutilisés pour un nouveau cycle de biogenèse. Quelques protéines exclusivement cytoplasmiques sont impliquées dans ce processus. Par une combinaison d'approches *in vivo* et *in vitro*, j'ai mis en évidence le rôle crucial d'un réseau d'interactions fonctionnelles, à la transition entre la fin de la biogenèse de la grande sous-unité ribosomique et l'initiation de la traduction (Lebreton *et al*. 2006b) (Figure 4).

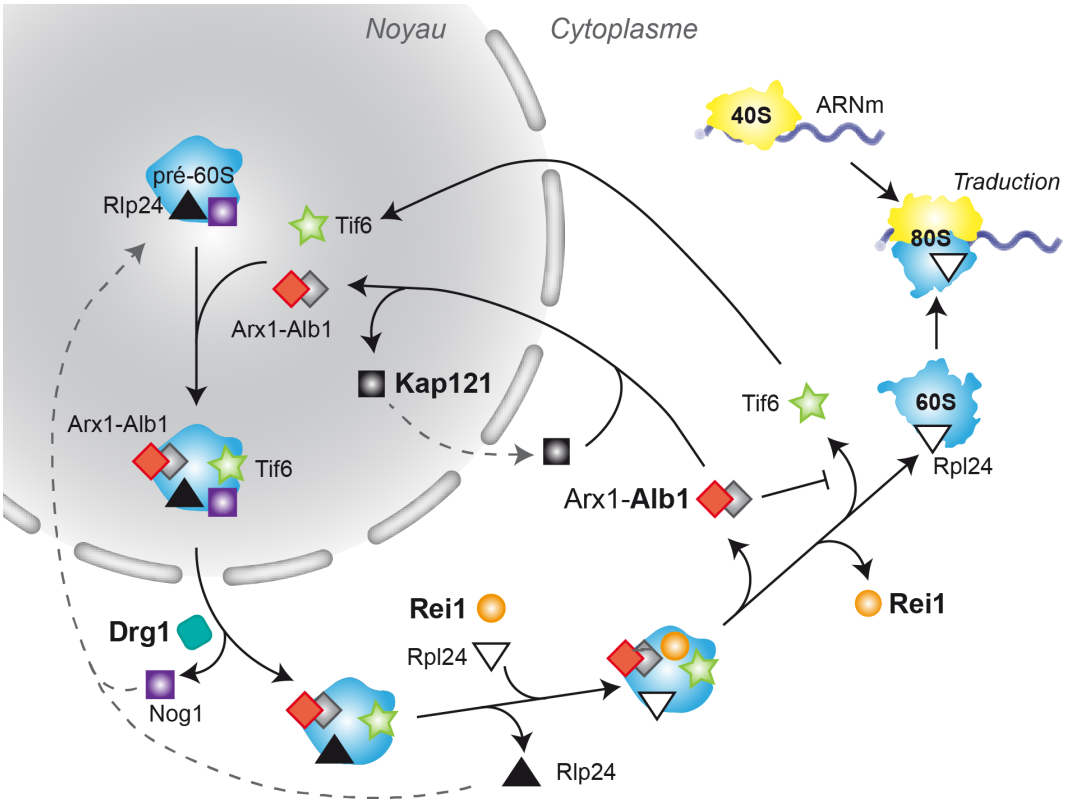

Figure 4. Contrôle de maturation de la sous-unité 60S à la fin de la biogenèse. Lors des étapes cytoplasmiques de la biogenèse des particules 60S, le recyclage des facteurs navettes est couplé au dernier contrôle-qualité de la grande sous-unité ribosomique avant la traduction.

Le facteur pré-60S cytoplasmique Ybr267w/Rei1 est lié génétiquement et physiquement à la protéine ribosomique Rpl24, qui ne s'associe que tardivement à la grande sous-unité ribosomique. Paradoxalement, l'absence de ce facteur strictement cytoplasmique se traduit par un blocage nucléaire de la maturation des

[1] Stable Isotope Labelling with Amino acids in Cell culture. Cette technique permet des analyses semi-quantitatives par spectrométrie de masse de la composition protéique des complexes purifiés, grâce à un marquage différentiel à la leucine deutérée de l'un des échantillons.

ARNr. Dans des souches où *REI1* est invalidé, l'import vers le noyau de trois facteurs navettes au moins est affecté : Arx1, Tif6 et une protéine auparavant non caractérisée, Yjl122w/Alb1. Arx1 et Alb1 forment un dimère, dont le retour au noyau dépend d'une β-karyophérine spécifique, Kap121.

En l'absence de Rei1, l'accumulation cytoplasmique du dimère Arx1-Alb1 inhibe le décrochage de Tif6 des particules pré-ribosomiques, et son recyclage vers le noyau. Le déficit nucléaire de Tif6 expliquerait les défauts de maturation des ARNr observés. Tif6 étant précédemment décrit comme un facteur inhibant l'association entre la petite et la grande sous-unité ribosomique (Senger *et al*. 2001), nous avons proposé un modèle dans lequel Rei1 coordonne la dissociation et le recyclage des derniers facteurs pré-60S, permettant l'entrée des grandes sous-unités ribosomiques matures dans la traduction.

La poursuite de la caractérisation de ce réseau d'interactions a donné lieu une collaboration avec l'équipe d'Helmut Bergler, de l'Institut de Biologie Moléculaire, à Graz en Autriche (Pertschy *et al*. 2007). Nous avons montré que l'AAA-ATPase cytoplasmique Drg1 était essentielle à la maturation des grandes sous-unités ribosomiques et au recyclage d'un nouveau facteur navette, la GTPase Nog1, que l'on pensait jusque là exclusivement nucléaire. L'activité d'ATPase de Drg1 est nécessaire à sa fonction. Elle intervient très rapidement après l'export des particules, et en amont de Rei1, définissant une nouvelle étape dans la maturation des ribosomes eucaryotes.

Conclusions

Chez les eucaryotes, la maturation des sous-unités ribosomiques est couplée à leur transport entre les différents compartiments cellulaires, et nécessite une régulation quantitative qualitative fine. Mes travaux de thèse ont permis d'affiner les connaissances sur le scénario d'assemblage des particules et de préciser le rôle de facteurs pré-ribosomiques impliqués à deux points de contrôle de la biogenèse de la grande sous-unité.

À la fin de ma thèse, de nombreuses questions restaient ouvertes concernant les mécanismes moléculaires régulant cette voie métabolique complexe. En particulier, la nature du signal permettant la discrimination entre les particules pré-ribosomiques et les sous-unités ribosomiques matures était encore hypothétique. Le facteur Tif6, qui peut inhiber l'association entre les sous-unités 40S et 60S, est un bon candidat pour jouer ce rôle, mais le mécanisme moléculaire réel des dernières étapes de la biogenèse restait à établir.

Depuis 2006, les recherches dans le domaine ont considérablement progressé, et il me semble important de souligner ici l'évolution des connaissances sur plusieurs points en rapport direct avec mes travaux de thèse.

Structures des ribosome eucaryotes et des particules pré-60S cytoplasmiques

L'un des principaux écueils rencontrés lors de l'étude de l'assemblage du ribosome eucaryote a longtemps été l'absence d'informations structurales concernant le ribosome mature. Afin de comprendre comment les protéines ribosomiques s'enchâssent les unes par rapport aux autres, nous avons longtemps raisonné en nous basant sur la structure connue du ribosome de l'archae *Thermus thermophilus* (Yusupov *et al*. 2001). Ceci nous a régulièrement conduits à des hypothèses erronées, et s'avère insuffisant pour l'étude des régions du ribosome spécifiques des eucaryotes. En 2010, une avancée majeure dans le domaine a été la publication de la première structure du ribosome de levure (Ben-Shem *et al*. 2010). Elle fut suivie de plusieurs structures raffinées, ou de complexes avec d'autres protéines.

Plusieurs études structurales ont permis d'obtenir la structure des particules pré-60S tardives, encore liées aux facteurs Arx1, Alb1, Tif6, Rei1 et Jjj1 (Gartmann *et al*. 2010; Klinge *et al*. 2011; Bradatsch *et al*. 2012; Greber *et al*. 2012, 2015). Le dimère Arx1-Alb1 est positionné à proximité immédiate du canal de sortie du peptide naissant, confirmant une hypothèse reposant sur des données stériques, et sur l'homologie d'Arx1 avec des protéines de la famille des méthionine-aminopeptidases (Hung and Johnson 2006). Cette position bloquerait le recrutement de certains facteurs de traduction tant que la particule est immature. Rei1 est localisé à proximité immédiate. Jjj1, un autre facteur caractérisé par l'équipe de Micheline Fromont-Racine (Demoinet *et al*. 2007) constitue l'interface entre Rei1 et Arx1. Tif6 occupe l'interface entre la petite et la grande sous-unité ribosomique, et bloque donc l'interaction entre particules immatures, comme les études fonctionnelles précédentes le laissaient supposer.

Rôle de Rei1 dans le recyclage d'Arx1

Lors de la publication de nos travaux sur le réseau Rei1-Arx1-Alb1-Tif6 (Lebreton *et al*. 2006b), les données d'un autre groupe sont apparues en contradiction avec nos résultats (Hung and Johnson 2006). Nous avions montré qu'en l'absence de Rei1, Arx1 et Alb1 sont dissociées des particules pré-60S et demeurent dans le cytoplasme sous la forme d'un petit complexe qui inhibe le recyclage de Tif6. Au contraire, Hung et Johnson étaient parvenus à la conclusion que Rei1 est nécessaire au retour d'Arx1 vers le noyau, mais qu'Arx1 reste associée aux particules pré-60S cytoplasmiques en l'absence de Rei1.

Je supposais à l'époque que cette incohérence pouvait provenir, soit du fond génétique des souches que nous utilisions, soit d'une différence de salinité des tampons lors de la séparation de polysomes sur gradients de saccharose (Lebreton 2006). Une réponse à ce problème a été apportée par une étude très rigoureuse reproduisant les deux résultats (Meyer *et al*. 2010) : la différence de sédimentation s'explique par une concentration en $MgCl_2$ de 30 mM dans notre étude, contre 5 mM pour l'autre groupe – une concentration plus proche de celle rencontrée dans le cytosol. Cette explication satisfaisante conduit les auteurs à conclure que Rei1, ainsi que Jjj1, participent à l'extraction de Arx1 de la sous-unité pré-60S.

Fonction de l'homologue humain de Nsa2

Depuis 2006, quatre articles ont été publiés concernant le rôle de NSA2/TINP1 humain (Zhang *et al*. 2010; Shahni *et al*. 2012; 2013; Li *et al*. 2013), principalement dans des journaux de biologie médicale. Ces études rapportent une localisation nucléolaire de la protéine humaine, identique à son homologue de levure, et un rôle dans le contrôle de la prolifération cellulaire, comme attendu aussi bien d'un facteur limitant pour la biogenèse des ribosomes que d'une protéine dont la production est régulée par le TGFβ. Enfin, l'expression du TGFβ, ainsi que de p21 et p53, est perturbée lorsque *NSA2* est réprimé ou surexprimé. Le rôle de NSA2 humain dans la biogenèse des ribosomes n'a pas été prouvé. Cependant, l'étude de l'homologue humain des protéines impliquées dans la biogenèse des ribosomes fait désormais l'objet d'études systématiques, qui devraient dans les prochaines années permettre de transposer aux eucaryotes supérieurs de nombreux résultats obtenus chez la levure (Tafforeau *et al*. 2013).

Travaux de post-doctorat – Activité et régulation de l'exosome eucaryote

J'ai effectué mon post-doctorat dans l'équipe dirigée par Bertrand Séraphin au *Centre de Génétique Moléculaire* (CNRS, Gif-sur-Yvette). J'y ai étudié la fonction l'exosome, un complexe de dégradation des ARN chez la levure, et la régulation de son activité par le complexe cofacteur TRAMP.

Mécanismes nucléaires de contrôle-qualité des ARN eucaryotes

L'accumulation physiologique de macromolécules anormales peut, au cours du temps, devenir dommageable à la survie cellulaire ; leur élimination est par conséquent essentielle. Le métabolisme de l'ARN produit une grande diversité de substrats à dégrader, comme des sous-produits d'épissage (introns) ou de maturation des ARNr, des ARNm non fonctionnels, des ARN non codants mal repliés, ou encore des transcrits en fin de vie. La dégradation de ces ARN constitue un mécanisme d'ébouage cellulaire, éliminant des transcrits inutiles et encombrants, voire potentiellement toxiques s'ils entrent dans les voies métaboliques mais ne sont pas fonctionnels. De plus, les nucléotides issus de la dégradation peuvent être recyclés pour synthétiser de nouveaux acides nucléiques.

Plusieurs mécanismes distincts sont impliqués dans la dégradation de ces espèces, qui s'effectue majoritairement par digestion exonucléolytique, soit de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', soit de 3' vers 5' (Isken and Maquat 2007). Un complexe multi-protéique appelé exosome assure la majeure partie des dégradations 3'-5'. Dans le cytoplasme, son activité contribue à la « voie de dégradation mineure » des ARNm (Anderson and Parker 1998), participe au *non-stop decay* (NSD), un processus de dégradation des ARNm dépourvus de codon stop (van Hoof *et al*. 2002) et au *nonsense-mediated decay* (NMD), qui élimine les ARNm portant un codon stop précoce (Mitchell and Tollervey 2003). Dans le noyau, l'exosome est requis pour la maturation des ARNr, ainsi que des petits ARN nucléaires et nucléolaires (Allmang *et al*. 1999), et constitue le principal acteur des mécanismes de contrôle-qualité qui s'exercent sur les transcrits naissants.

Chez *S. cerevisiae*, le contrôle-qualité nucléaire des ARN oriente certains transcrits aberrants vers une dégradation 3'-5' par l'exosome (Houseley *et al*. 2006; Schmidt and Butler 2013). Une part de ces transcrits correspond à des ARN dont la maturation est anormale. Ce sont principalement des ARN de transfert (ARNt), des petits ARN nucléaires (snARN) et nucléolaires (snoARN) mal repliés, ainsi que des précurseurs d'ARNr aberrants. Une autre part correspond à une catégorie d'ARN instables appelés CUT (*Cryptic Unstable Transcripts*). Il s'agit d'ARN produits dans les régions intergéniques du génome à partir de promoteurs cryptiques, n'ayant pas de site consensuel de terminaison de transcription et de polyadénylation par Pap1, ne codant aucun produit polypeptidique. Leur principale vocation connue à ce jour semble d'être dégradés, et l'essentiel de leurs fonctions reste en conséquence mal caractérisé ; cependant, ils pourraient intervenir dans certaines régulations de l'expression génique (Colin *et al*. 2011).

La reconnaissance spécifique de ces ARN fait intervenir un complexe de polyadénylation appelé TRAMP (Trf4/5-Air1/2-Mtr4 Polyadenylation complex). Trf4 et Trf5 appartiennent à une nouvelle famille de poly(A)-polymérases non canoniques ; les queues poly(A) ajoutées par ces enzymes sont plus courtes que celles synthétisées par Pap1 en 3' des ARNm, et n'ont pas d'effet stabilisateur ; au contraire, les substrats polyadénylés par TRAMP sont ensuite pris en charge par l'exosome nucléaire, qui assure leur dégradation dans le sens 3'-5' (Figure 5).

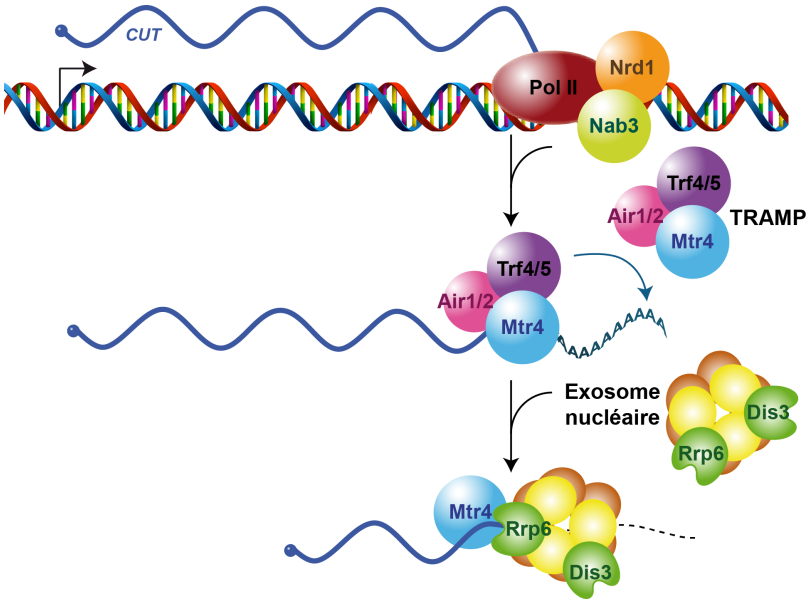

Figure 5. Modèle de recrutement du complexe TRAMP et de l'exosome sur les transcrits aberrants. Les ARN anormaux sont rapidement détectés après une terminaison dépendante du complexe Nrd1/Nab3, polyadénylés par Trf4 ou Trf5, puis dégradés par les RNases de l'exosome à partir de l'extrémité 3'.

Outre Trf4 ou Trf5, le complexe TRAMP de levure est constitué des protéines de liaison à l'ARN Air1 ou Air2 et de Mtr4, protéine de la famille des hélicases à boîte DExD/H, qui participe entre autres à la maturation des ARNr (la Cruz *et al*. 1998). Mtr4 interagit également avec l'exosome nucléaire, et constitue ainsi une interface protéique entre les complexes impliqués dans la reconnaissance et la dégradation des substrats.

L'exosome est un complexe protéique nucléo-cytoplasmique doté d'activités exonucléases 3'-5' (Figure 6). Il est constitué d'un cœur de 10 sous-unités ; neuf d'entre elles forment une structure en anneau apparentée à la PNPase bactérienne ou à l'exosome d'archées (Liu *et al*. 2006), mais dépourvu d'activité ; la dixième sous-unité, Dis3/Rrp44, possède un site RNase II exerçant une activité exoribonucléolytique 3'-5' (Dziembowski *et al*. 2007). Dans le noyau, une autre RNase 3'-5', Rrp6, s'associe à ce complexe avec son cofacteur Rrp47.

Sous la bannière d'un mécanisme général, plusieurs voies distinctes coexistent pour dégrader les divers types de transcrits aberrants. De nombreux cofacteurs, dont TRAMP, sont connus pour leurs fonctions activatrices de l'exosome nucléaire, et chacun d'entre eux présente un spectre de substrats caractéristique. Un grand nombre de questions reste en suspens concernant la nature des signaux qui orientent certains transcrits vers la dégradation, le mode de reconnaissance spécifique de chaque substrat, et le rôle précis du complexe de polyadénylation dans la stimulation de l'exosome (Lebreton and Séraphin 2008).

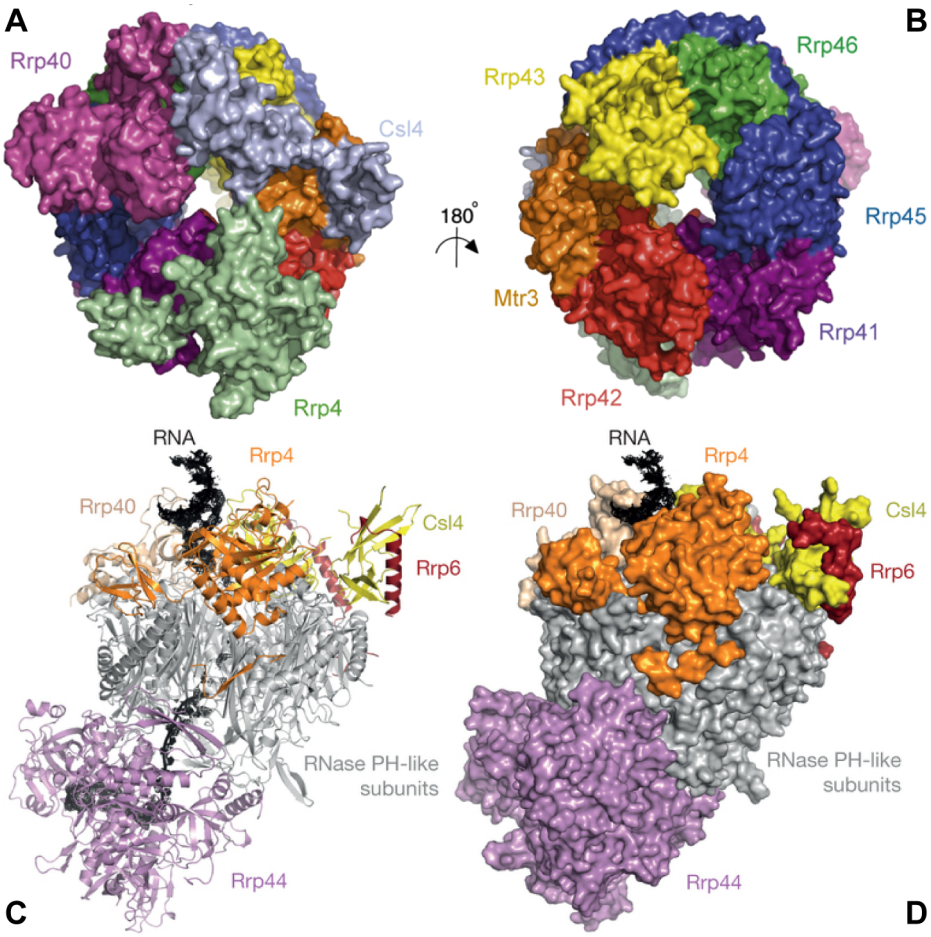

Figure 6. Structure de l'exosome eucaryote. Les neuf sous-unités de la structure en anneau sont représentées en vue de dessus **(A)** ou de dessous **(B)** et ménagent un canal central (Liu *et al.* 2006). **(C-D)** Le site d'interaction de Dis3/Rrp44 est positionné sur la face inférieure, à la sortie du canal qui achemine le substrat ARN depuis la face supérieure (Makino *et al.* 2013). Le dimère Rrp6-Rrp47 vient se positionner sur la face supérieure, à l'entrée du canal d'accès (seule une partie de Rrp6 apparaît ici).

Au cours de mon post-doctorat, j'ai développé plusieurs projets : j'ai cherché à apporter une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires mis en jeu chez *S. cerevisiae*, et à caractériser une machinerie de dégradation similaire chez les eucaryotes supérieurs, ainsi que ses substrats éventuels.

Rôle de l'hélicase Mtr4 dans la voie TRAMP-exosome chez *Saccharomyces cerevisiae*

Le rôle précis de Mtr4 dans le complexe TRAMP restait mal connu. Plusieurs hypothèses étaient envisageables : Une activité ARN-hélicase de Mtr4 sur les structures secondaires des ARN facilitant l'action de l'exosome ; une participation directe au recrutement direct de l'exosome via des interactions protéine-protéine ; et/ou une fonction de translocase permettant le déplacement de Trf/Air du substrat ARN lors de la dégradation par l'exosome.

Afin de mieux comprendre la fonction de cette protéine *in vivo*, j'ai analysé les effets de différents mutants de *MTR4* sur la dégradation de CUT et de précurseurs d'ARNr. Ces mutations conduisent à une très forte accumulation de certains transcrits, dont certains sont polyadénylés – notamment les CUT. Ceci suppose une fonction de Mtr4 après la polyadénylation et avant la dégradation. D'après la quantité très importante de transcrits accumulés en comparaison avec les mutants des poly(A)-polymérases (Trf4 ou Trf5) ou des exonucléases (Rrp6 ou Dis3), **Mtr4 apparaît comme une sorte de goulet d'étranglement vers lequel convergent des substrats recrutés par différentes voies** (y compris des voies Trf-indépendantes), avant une dégradation qui pourrait être réalisée par différentes exonucléases 3'-5'.

Ces travaux n'ont pas été publiés. Un autre groupe a depuis montré que les activités ATPase et de fusion des duplexes ARN-ARN sont requises pour la fonction de Mtr4, et qu'elle intervient après la

polyadénylation des substrats par Trf4, et avant leur dégradation par l'exosome (Wang *et al*. 2008b). Le même groupe a ensuite confirmé le rôle crucial de Mtr4 dans le contrôle de l'activité du complexe TRAMP (Jia *et al*. 2011), nécessitant entre autres le déroulement des substrats ARN (Jia *et al*. 2012).

Caractérisation de l'homologue humain de TRAMP

Si l'étude de la machinerie nucléaire de dégradation des ARN aberrants était bien avancée chez la levure, aucun mécanisme analogue n'avait été décrit chez les eucaryotes supérieurs. Cependant, des intermédiaires polyadénylés d'ARNr anormaux et de pré-ARNm tronqués avaient été identifiés dans les cellules humaines (Slomovic *et al*. 2006; West *et al*. 2006). Ceci laissait penser qu'une activité similaire à celle de TRAMP existe dans les cellules humaines et peut, comme chez la levure, orienter les ARN aberrants vers une dégradation par l'exosome. Le deuxième volet de mon projet de recherche était la caractérisation fonctionnelle de l'homologue humain de TRAMP et de ses substrats.

Par similitude de séquence, nous avons identifié des homologues humains des constituants de TRAMP, suggérant que la machinerie de polyadénylation nucléaire des ARN aberrants est conservée. L'exosome est également retrouvé chez les eucaryotes supérieurs (Sloan *et al*. 2012).

Avec l'aide d'une assistante-ingénieure, Marie-Élisabeth Dufour, nous avons cloné, exprimé sous forme recombinante et purifié un homologue humain d'Air1/2, trois homologues de Trf4/5, ainsi que l'homologue de l'hélicase Mtr4. Deux des homologues de Trf4/5 interagissent *in vitro* avec l'homologue d'Air1/2, et l'un des complexes ainsi formés présente une activité de polyadénylation sur des ARN transcrits *in vitro*. En outre, ce dimère recombinant est capable de stimuler la dégradation d'un substrat par l'exosome de levure.

J'ai également observé la localisation de fusions de chacun des homologues aux protéins fluorescentes GFP ou DsRed dans des cellules HeLa et HEK-293, en transfections transitoires ou dans des lignées stables. Tous les candidats étudiés présentaient une localisation majoritairement nucléaire (Figure 7).

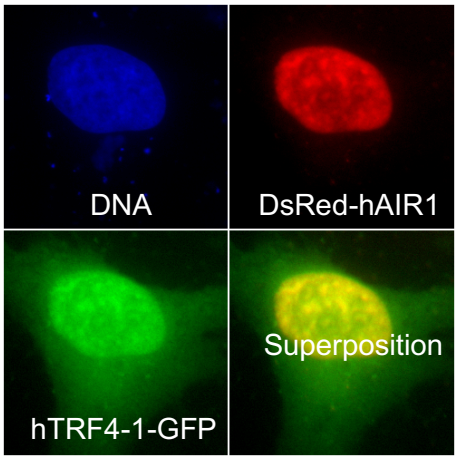

Figure 7. Co-localisation nucléaire de deux constituants du complexe TRAMP humain.

Ces travaux n'ont pas été publiés. Le complexe TRAMP humain a depuis été caractérisé par d'autres groupes (Fasken *et al*. 2011; Lubas *et al*. 2011).

Activité endonucléolytique de l'exosome eucaryote

L'exonucléase principale de l'exosome de levure Dis3/Rrp44 porte, en plus de son principal domaine catalytique, un domaine PIN essentiel et de fonction inconnue (Lors de l'expression d'un mutant du domaine RNase II dépourvu d'activité exonucléolytique, de nouveaux sites de clivage sont révélés dans certains substrats de Dis3, en particulier dans les CUT et les précurseurs d'ARNr. Ces sites de clivage disparaissent chez un double mutant du domaine PIN et du site exonucléase ; le transcrit précurseur s'accumule alors fortement. Le domaine PIN exerce par conséquent un rôle dans la dégradation de certains ARN, indépendamment de l'activité exonucléolytique de Dis3.

). Afin de mieux cerner son rôle, j'ai construit différents mutants ponctuels ciblant des acides aminés très conservés dans les différentes régions de Dis3. Les protéines mutées sont incorporées sont produites et incorporées à la structure de l'exosome de levure avec la même efficacité que la protéine sauvage. Ces mutants ne complémentent toutefois pas le défaut de croissance observé en l'absence de Dis3, indiquant un rôle physiologique des domaines ciblés par la mutagenèse.

Lors de l'expression d'un mutant du domaine RNase II dépourvu d'activité exonucléolytique, de nouveaux sites de clivage sont révélés dans certains substrats de Dis3, en particulier dans les CUT et les précurseurs d'ARNr. Ces sites de clivage disparaissent chez un double mutant du domaine PIN et du site exonucléase ; le transcrit précurseur s'accumule alors fortement. Le domaine PIN exerce par conséquent un rôle dans la dégradation de certains ARN, indépendamment de l'activité exonucléolytique de Dis3.

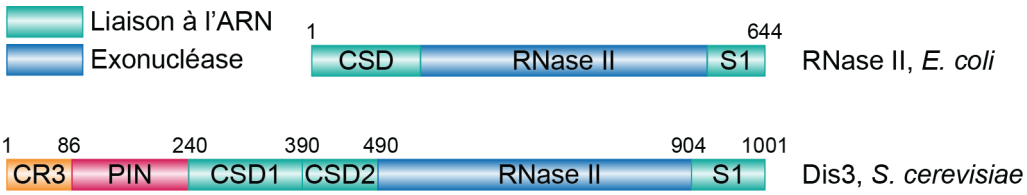

Figure 8. Répartition des différents domaines fonctionnels le long de la séquence de Dis3, comparée à la RNase II procaryote. CR3, domaine de fonction inconnue, contenant 3 résidus cystéine ; PIN, homologie au domaine N-terminal de PilT (activité endonucléase) ; CSD, Cold Shock Domain (OB-fold) ; S1, similaire au domaine de liaison à l'ADN de la protéine ribosomique S1 (OB-fold). Les deux domaines CR3 et PIN, sont spécifiques à la protéine eucaryote.

J'ai caractérisé par extension d'amorces et circular-RACE[2] les intermédiaires accumulés par le mutant du domaine RNase II pour l'un des substrats de Dis3. Ils recouvrent l'ensemble de la séquence du transcrit précurseur, et possèdent des extrémités 5' et 3' bien définies, localisées dans des régions non appariées. Ces données nous ont permis de déduire que **le domaine PIN exerce dans les cellules eucaryotes une fonction d'endoribonucléase simple brin** (Lebreton *et al*. 2008b). Par ailleurs, des travaux réalisés *in vitro* par nos collaborateurs Rafal Tomecki et Andrzej Dziembowski (Département de Génétique et Biotechnologies, Université de Varsovie, Pologne) ont confirmé l'existence de cette activité. Deux autres groupes sont peu après parvenus à des conclusions similaires (Schaeffer *et al*. 2009; Schneider *et al*. 2009).

La protéine Dis3 de levure est ainsi devenue la première représentante de protéines portant les deux activités, exonucléase et endonucléase, dans des domaines distincts. Ces résultats se sont également avérés critiques pour les travaux ultérieurs de caractérisation structurale et fonctionnelle de l'exosome. En effet, l'obtention d'une version mutante de l'exosome totalement dépourvue d'activité ribonucléolytique était un prérequis pour établir la structure du complexe avec un substrat ARN, et ainsi cartographier les canaux moléculaires acheminant l'ARN vers les sites actifs (Makino *et al*. 2013).

Caractérisation des substrats physiologiques de l'exosome

En observant l'incidence de mutations touchant Rrp6 ou Dis3 sur différents substrats (précurseurs d'ARNr, CUT et snARN), j'ai constaté, malgré la redondance fonctionnelle des deux nucléases, une préférence relative pour certains types de transcrits. Ces données laissaient penser que les substrats pourraient être orientés au sein de l'exosome vers différentes voies de dégradation, prédéfinies en amont par des cofacteurs comme TRAMP.

Afin de mieux comprendre les mécanismes coopératifs de dégradation des ARN et de leur rôle physiologique, nous avons poursuivi, en collaboration avec les équipes d'Alain Jacquier et Domenico Libri, l'étude de la contribution des différentes activités endo- et exo-nucléolytiques de l'exosome à l'élimination des précurseurs d'ARN (Gudipati *et al*. 2012). Cette étude a confirmé la redondance fonctionnelle partielle de Dis3 et Rrp6 pour la dégradation de différentes classes de substrats, comme par exemple des transcrits immatures avant leur épissage. De façon surprenante, une grande quantité de précurseurs d'ARNt est également **dégradée en l'absence de tout défaut de maturation**. Ceci suggère que la machinerie de dégradation entre en compétition cinétique avec les voies de maturation des ARN cellulaires, permettant une surveillance de l'efficacité de la maturation, mais conduisant également à l'élimination précoce de nombreux transcrits.

Travaux de CR2 INRA – Régulation de l'expression des gènes de l'hôte par *L. monocytogenes*

Les recherches menées dans l'unité des *Interactions Bactéries-Cellules* dirigée par Pascale Cossart sont tournées vers l'étude du pathogène opportuniste *Listeria monocytogenes*. Cette bactérie intracellulaire est

[2] Circular-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) : Technique permettant de cartographier les extrémités 5' et 3' de fragments d'ARN. Les intermédiaires d'ARN porteurs d'extrémités 5'-OH (absence de coiffe) et 3'-P sont circularisés par la RNA ligase. Après transcription inverse de la jonction 5'-3' à l'aide d'une amorce spécifique, les ADN complémentaires sont clonés et séquencés.

responsable d'infections alimentaires graves dont le taux de mortalité atteint 30 %. Elle se caractérise par sa capacité à traverser les barrières intestinale, hémato-encéphalique ou fœto-placentaire et à envahir de nombreux types de cellules dans lesquelles elle se multiplie. Les travaux de l'unité portent sur la compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu lors de l'interaction entre cette bactérie et les cellules ou les tissus de l'hôte, au cours de l'infection.

Dans cette unité, le groupe *Microbiologie nucléaire* animé par Hélène Bierne de 2006 à 2013 étudiait la perturbation des processus nucléaires lors de l'infection par *L. monocytogenes*. Les études post-génomiques menées par H. Bierne avaient révélé que de nouveaux facteurs de virulence modifient les voies de signalisation et programmes nucléaires de la cellule hôte, avec des conséquences aussi bien sur la division cellulaire que sur la transcription. Mon recrutement avait pour but de renforcer ce groupe, en développant l'étude des **régulations chromatiniennes de l'expression des gènes humains par la bactérie pathogène *Listeria monocytogenes***.

À mon arrivée dans l'unité des interactions bactéries cellules fin 2008, j'ai enrichi ma palette de qualifications, acquis les méthodes d'étude spécifiques à *Listeria,* suivi une formation à l'expérimentation animale, et comblé quelques lacunes théoriques en assistant à des colloques et séminaires dans les domaine de la microbiologie cellulaire et de l'épigénétique. J'ai ainsi pu aborder dans les meilleures conditions les projets détaillés ci-dessous.

Durant cette période, j'ai également contribué à la rédaction de deux revues de synthèse sur l'étude des mécanismes de virulence de *Listeria monocytogenes* (Cossart and Lebreton 2014; Lebreton *et al*. 2015), ainsi que d'un article de vulgarisation sur les stratégies moléculaires employées par *Listeria monocytogenes* pour détourner les fonctions de son hôte (Lebreton *et al*. 2012a).

LntA, un facteur de virulence de *Listeria* ciblant un complexe chromatinien pour réguler les gènes de l'hôte

Parmi les protéines de *L. monocytogenes* auxquelles s'intéressait notre groupe, **LntA** a été sélectionnée pour ses caractéristiques de facteur de virulence. La virulence chez la souris d'une souche Δ*lntA* est atténuée. Le gène est présent chez l'espèce pathogène *L. monocytogenes* mais absent chez les *Listeria* non pathogènes *L. innocua* et *L. welshimeri*, et la région promotrice de *lntA* contient des séquences de liaison des principaux régulateurs des gènes de virulence de *Listeria*. *In vivo*, le groupe de D. Cabanes (IMCB, Porto) a montré que l'expression de *lntA* était accrue dans la rate de souris infectées.

Grâce à un peptide signal, LntA est sécrétée vers le cytoplasme des cellules infectées. Cette petite protéine basique est adressée au noyau, où elle interagit avec un nouveau régulateur chromatinien spécifique des vertébrés, **BAHD1**. En l'absence d'infection, H. Bierne a montré que BAHD1 réprime l'expression de certains gènes en recrutant au niveau de leurs promoteurs un complexe contenant des enzymes de modification de la chromatine et induisant une condensation locale de la chromatine (Bierne *et al*. 2009).

En parallèle, une étude du transcriptome de cellules épithéliales infectées par des bactéries sécrétant ou non LntA a mis à jour un **effet stimulateur de LntA sur l'expression** d'une panoplie de gènes appelés **ISG** (*Interferon Stimulated Genes*) et impliqués dans la défense contre les pathogènes intracellulaires. De plus, ce transcriptome a révélé que **l'infection de cellules épithéliales par *L. monocytogenes* stimule la production d'interférons de type III** (IFN-λ ou IFN-III), jusqu'ici uniquement décrits dans le contexte d'infections virales.

De 2009 à 2013, mes travaux ont porté principalement sur la caractérisation de LntA et de son interaction fonctionnelle avec BAHD1, de l'échelle moléculaire aux conséquences physio-pathologiques lors de l'infection. LntA est le premier facteur bactérien connu pour interagir directement avec un complexe répresseur chromatinien, et réguler ainsi les gènes de l'hôte impliqués dans la réponse interféron (Erreur ! Référence non valide pour un signet.). Les résultats de ces études ont été publiés (Lebreton *et al*. 2011; 2014), et mis en perspective dans une revue (Lebreton *et al*. 2012b).

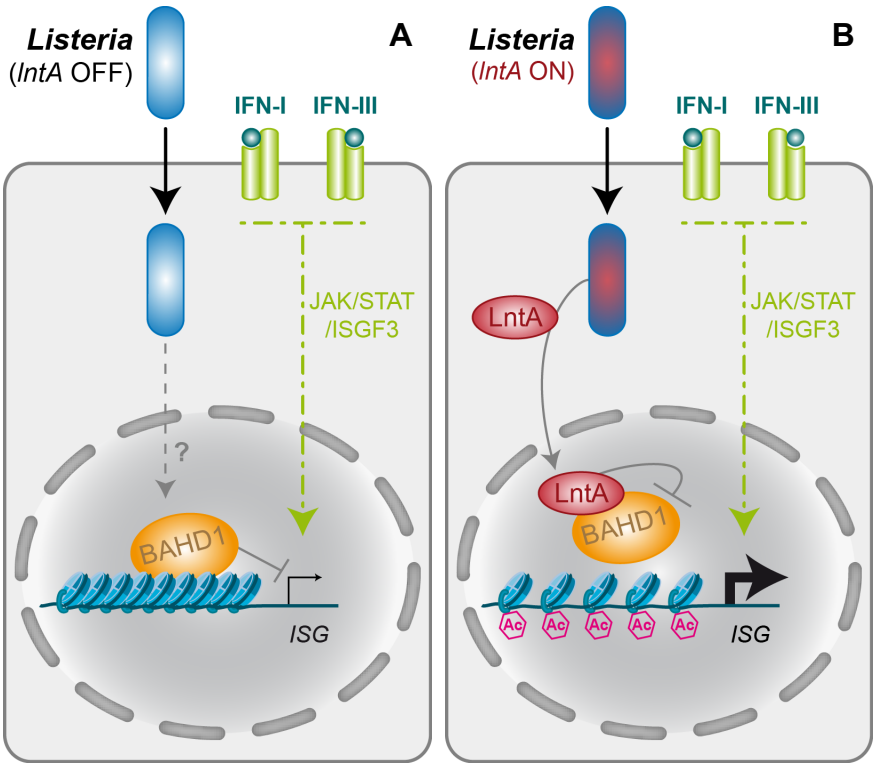

Figure 9. Contrôle de la réponse interféron par BAHD1 et LntA (d'après Lebreton *et al.* 2011). (A) Lors de l'infection de cellules épithéliales par *Listeria monocytogenes*, l'expression des interférons de type I et III est induite. Cependant, en aval de la voie de signalisation JAK/STAT, l'expression des gènes stimulés par l'interféron (ISGs) est réprimée par un complexe chromatinien comp-renant le co-répresseur BAHD1. **(B)** Lorsque *Listeria* sécrète LntA, ce facteur de virulence est adressé au noyau, interagit avec BAHD1 et conduit à son éviction du promoteur des ISGs. L'état de compaction de la chromatine est modifié, la région devient trans-criptionnellement active et l'ex-pression des ISGs est stimulée.

Expression de *lntA* par *Listeria monocytogenes*

Avant d'aborder les questions fonctionnelles concernant LntA, la compréhension de la régulation de son expression était nécessaire. Dans des conditions de culture standard, *lntA* est un gène très faiblement exprimé, et la protéine correspondante n'est pas détectable. Les souches sauvages de *Listeria monocytogenes* se comportent donc comme des souches Δ*lntA* (par la suite, *lntA*$^-$). J'ai montré par transcription inverse suivie de PCR quantitative (RT-qPCR) que *lntA* était sous contrôle de deux régulateurs transcriptionnels associés à la virulence, σ^B et PrfA. J'ai testé différentes conditions de stress connues pour activer σ^B et PrfA, sans noter d'effet sur la production de la protéine.

L'expression de *lntA* est donc particulièrement contrôlée, probablement pour limiter l'induction des ISG à une fenêtre spatio-temporelle précise au cours de l'infection. Afin de comprendre pourquoi LntA confère un avantage dans la virulence de *Listeria*, et de cibler l'étude de sa fonction pathogénique sur sa niche réelle, un point critique était de définir les conditions et mécanismes d'expression de *lntA* par les bactéries. J'ai mis en œuvre différentes approches pour tenter de répondre à cette question :

- Comparer les divergences de séquence, de régulation et d'expression de *lntA* entre souches de *Listeria*.
- Disséquer les motifs régulateurs agissant en *cis* sur l'expression de *lntA* – entre autres, un site potentiel d'atténuation transcriptionnelle via la laison du régulateur PyrR (Turner *et al*. 1994) – grâce à des fusions transcriptionnelles de la région promotrice avec un rapporteur *LacZ*.
- Suivre *in vivo* la cinétique et la topographie d'induction de *lntA* au cours de la listériose murine, grâce à une fusion transcriptionnelle du promoteur de *lntA* avec un rapporteur luminescent.

Cette partie de mes travaux est toutefois demeurée à l'état préliminaire (construction de plasmides et souches, et accumulation de résultats négatifs). À l'heure actuelle, nous ne connaissons donc pas les signaux qui pourraient induire la production de LntA lors d'une infection.

Pour étudier le rôle de LntA lors d'infections cellulaires, nous avons utilisé des bactéries exprimant *lntA* sous contrôle d'un promoteur hétérologue, à partir de plasmides multicopies, ou intégrés à un locus chromosomique. Les deux outils (par la suite, *lntA*$^+$) ont un effet similaire sur l'induction des ISG.

Rôle du complexe BAHD1 dans la répression des ISG lors de l'infection

Suite à l'analyse transcriptomique mentionnée plus haut, nous avons cherché à mieux décrire la réponse IFN-λ de cellules épithéliales à l'infection par *L. monocytogenes*. Lors de l'infection par des souches *lntA*$^-$,

j'ai confirmé par RT-qPCR que l'expression des gènes des IFN-λ était induite. Cependant les ISG, habituellement induits en réponse aux IFN de type I ou III, restaient peu exprimés. En raison de la capacité de BAHD1 à réprimer certains gènes de l'hôte, nous avons supposé que ce facteur chromatinien pourrait participer à la répression des ISG lors de l'infection.

En collaboration avec les équipes d'Alexis Gautreau (LEBS, CNRS, Gif-sur-Yvette) et de Slimane Ait-Si-Ali (CNRS-Université Paris 7, Paris), nous avons isolé le complexe protéique associé à BAHD1 par chromatographies d'affinité en tandem (TAP) à partir de la fraction chromatinienne d'une lignée cellulaire exprimant stablement BAHD1, en fusion avec un double tag. Les constituants de ce complexe ont été caractérisés par spectrométrie de masse et validés par immunoblot. Nous avons identifié, outre des partenaires de BAHD1 précédemment identifiés par un crible double-hybride (Bierne *et al.* 2009), plusieurs facteurs chromatiniens impliqués dans la régulation des ISG, dont KAP1, HP1 et HDAC1/2 (Figure 10).

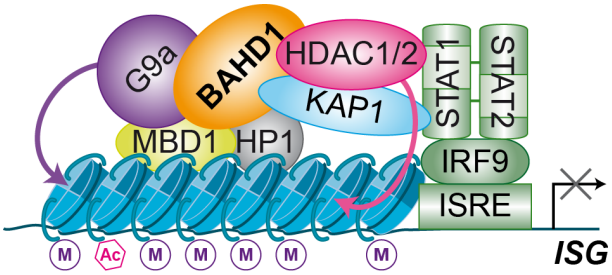

Figure 10. Composition partielle du complexe chromatinien nucléé par BAHD1 au promoteur des ISG. KAP1 et les histones déacétylases HDAC1/2 sont connues pour interagir avec ISGF3 (l'hétérotrimère STAT1/2/IRF9) ; HP1γ et l'histone méthyltransférase G9a pour se lier aux promoteurs des ISG. Tous ces composants sont impliqués dans la régulation transcriptionnelle des ISG.

Pour vérifier le rôle répresseur de ce complexe, j'ai réprimé l'expression de *BAHD1*, ou de *KAP1*, par traitement siRNA des cellules avant l'infection. Dans ces conditions, une souche *lntA*⁻ stimule l'expression des ISG. **Le complexe chromatinien associé à BAHD1 réprime donc *de facto* les ISG lors de l'infection**.

Rôle direct de LntA dans l'inhibition de l'activité répressive de BAHD1

Étant données, d'une part, la capacité de LntA à interagir avec BAHD1 dans le noyau des cellules hôtes, et d'autre part, son aptitude à induire l'expression des ISG lors de l'infection, nous avons émis l'hypothèse que LntA puisse entraver le rôle de répresseur de BAHD1 au promoteur des gènes cibles.

Par immunoprécipitations de chromatine (ChIP) dans des cellules infectées par des souches *lntA*⁻ ou *lntA*⁺, j'ai mis en évidence une diminution du recrutement de *BAHD1* aux promoteurs d'ISG. Elle s'accompagne d'une augmentation de l'acétylation de la lysine 9 des histones H3, une marque caractéristique de chromatine active et ôtée par les histones déacétylases comme HDAC1/2. **LntA a donc un rôle antagoniste de BAHD1 lors de l'infection** : Elle empêche la condensation de chromatine au promoteur des ISG, et active ainsi la voie de signalisation dépendante des IFN-λ.

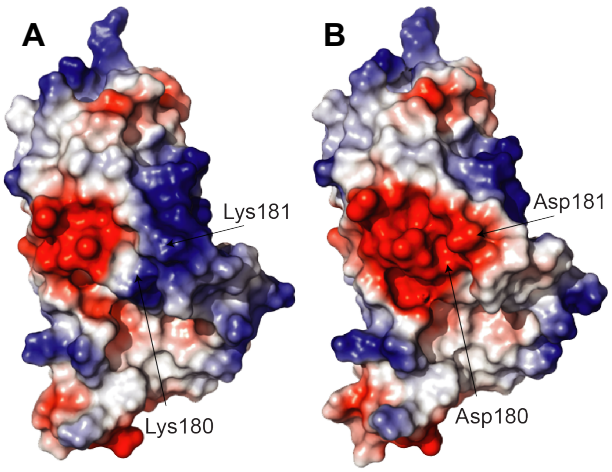

Figure 11. Structure de LntA. (A) Forme sauvage. **(B)** Forme mutée (K180D/K181D), n'interagissant plus avec BAHD1 et inactive.

Nous avons ensuite cherché à définir les bases structurales de l'interaction fonctionnelle entre LntA et BAHD1, en collaboration avec l'équipe d'Andréa Dessen (IBS, Grenoble). Nos collaboratrices ont élucidé la structure tridimensionnelle de LntA, révélant un repliement compact sous forme d'hélices α (Figure 11A). Viviana Job a reconstitué *in vitro* l'interaction entre LntA et un fragment de BAHD1 ; malheureusement, la structure tri-dimensionnelle du co-complexe n'a pu être résolue. Elle a toutefois obtenu et cristallisé un mutant de LntA incapable d'interagir *in vitro* avec le fragment de BAHD1 purifié (Figure 11B) ; j'ai montré que ce mutant n'interagissait plus avec la protéine BAHD1 entière, obtenue à partir d'extraits cellulaires chromatiniens.

Une souche de *Listeria* sécrétant ce mutant perd sa capacité à stimuler l'expression des ISG dans les cellules infectées. Bien que toujours nucléaire, la protéine mutée n'est plus co-localisée avec une fusion BAHD1-YFP. Les résidus lysines 180 et 181, qui bordent un sillon de surface, semblent donc nécessaires à l'interaction fonctionnelle entre les protéines. De plus, ces résidus sont universellement conservés chez *L. monocytogenes* (nous avons séquencé 188 souches représentatives de l'espèce à ce locus), suggérant une forte pression de conservation sur l'interaction fonctionnelles entre LntA et BAHD1. Ces travaux récemment publiés valident l'hypothèse selon laquelle **l'interaction directe entre LntA et BAHD1 est nécessaire à la fonction de LntA**, comme inhibiteur de BAHD1 et ainsi stimulateur de l'expression des ISG.

Conséquences du dialogue BAHD1-LntA sur la physiopathologie de la listériose

Les IFN-λ ont été caractérisés comme des acteurs de la défense antivirale des cellules hôtes, principalement aux muqueuses. Leur influence sur la défense antibactérienne n'a pas spécifiquement été étudiée, et est susceptible d'être ambivalente. En effet, alors que la production par l'hôte d'IFN de type II (IFN-γ) a clairement un effet antibactérien, la réponse interféron de type I endogène (dont les voies de signalisation sont proches de celles des IFN-λ) est défavorable à l'hôte dans un modèle de listériose murine (Decker *et al*. 2005). En revanche, un traitement exogène précoce par l'IFN-β a un effet antibactérien (Pontiroli *et al*. 2012), suggérant que la fenêtre temporelle et l'aspect quantitatif de la réponse interféron sont des paramètres importants à prendre en compte.

De façon frappante, nous avons observé que l'expression constitutive de *lntA* par *L. monocytogenes* était défavorable à la colonisation des organes dans un modèle de listériose murine – plus encore que la délétion de *lntA*. De plus, les concentrations d'IFN-λ sont accrues de façon significative dans les tissus des animaux infectés par les souches *lntA*$^{+}$. Nous attribuons cet effet antibactérien à une exacerbation de la réponse immunitaire innée à *Listeria* par la sécrétion non contrôlée de LntA. En parallèle, l'Institut Clinique de la Souris (Strasbourg) a généré des souris hétérozygotes *BAHD1*$^{+/-}$. Elles présentent une résistance accrue à la listériose par rapport à des animaux *BAHD1*$^{+/+}$, reproduisant les phénotypes observés lors de l'expression constitutive de *lntA*.

Ces données mettent en lumière un rôle de BAHD1 dans la régulation de la réponse immunitaire innée à l'infection bactérienne. Nous pensons que **le dialogue entre BAHD1 et LntA permet de moduler finement la réponse tissulaire des cellules hôtes aux IFN-λ induits par l'infection**.

Conclusions

Au-delà de la caractérisation fonctionnelle de LntA, ce projet a participé à l'émergence d'un nouveau champ d'étude de la pathogénie bactérienne : celui de l'influence des micro-organismes sur les régulations chromatiniennes de leur hôte, ou patho-épigénétique (Minàrovits 2009; Bierne *et al*. 2012a). L'une des questions clefs est désormais de savoir si les effets observés sont transitoires, ou peuvent persister bien au-delà de la durée d'une infection, sous forme de marques épigénétiques inscrites dans la chromatine. Si cette dernière hypothèse s'avérait fondée, il en résulterait probablement des retombées majeures sur notre compréhension des conséquences à moyen et long terme d'une infection sur la physiologie des patients.

En parallèle de ce projet principal, j'ai travaillé sur deux projets concernant, d'une part LntA, d'autre part BAHD1, indépendamment de leur rôle en duo. Le premier, non publié, n'est pas inclus dans ce document. Le second est décrit dans la partie qui suit.

Composition et activité du complexe chromatinien associé à BAHD1

Dans le cadre du programme blanc EpiLis coordonné par Hélène Bierne et financé par l'ANR, nous avons souhaité mieux comprendre la fonction de BAHD1 dans les cellules, indépendamment de l'infection. J'ai pour ceci cherché à mieux caractériser le complexe protéique associé à BAHD1, ainsi que ses cibles sur la chromatine. En parallèle, d'autres membres du consortium étudiaient le rôle de BAHD1 dans la méthylation de l'ADN, et enfin ses fonctions physiologiques, dans un modèle de souris knockouts. Deux manuscrits récapitulant les résultats que je détaille ci-dessous sont en cours de rédaction (Libertini *et al*. 2015; Lakisic *et al*. 2016).

Composition protéique du complexe chromatinien associé à BAHD1

Nous avions précédemment identifié plusieurs composants protéiques du complexe chromatinien associé à BAHD1 par chromatographie d'affinité en tandem (Lebreton *et al*. 2011). Nous avons reproduit cette expérience afin de mieux définir la composition du complexe « core » associé à BAHD1 sur la chromatine, et en adaptant le protocole de sorte à isoler également la fraction ADN du complexe (voir ci-dessous). J'ai encadré Goran Lakisic, ingénieur en CDD (ANR EpiLis), pour valider des candidats les plus solides de ce complexe par co-immunoprécipitation.

Nous avons ainsi établi que la composition protéique du complexe associé à BAHD1 est très similaire à celle de complexes co-répresseurs associés à des histones déacétylases de classe 1, comme le complexe NurD (Millard *et al*. 2013). Outre des histones déacétylases, ces complexes contiennent des protéines portant des domaines BAH, ELM2 et SANT, caractéristiques de facteurs liés à la chromatine (Figure 12A-C). Les domaines ELM2 et SANT forment l'interface avec les histones déacétylases (Millard *et al*. 2013), avec des histones méthyltransférases ou avec des facteurs de transcription (Ding *et al*. 2004; Wang *et al*. 2008a), tandis que le domaine BAH est considéré comme un module d'adressage à la chromatine, via son interaction avec les nucléosomes (Callebaut *et al*. 1999; Armache *et al*. 2011). Dans la plupart des complexes co-répresseurs ce de type, les trois domaines BAH, ELM2 et SANT sont portés par la même protéine (Millard *et al*. 2013) (Figure 12D). En revanche, BAHD1 ne contient que le domaine BAH ; les domaines ELM2 et SANT semblent être apportés par un autre membre du complexe, MIER1 ou 3.

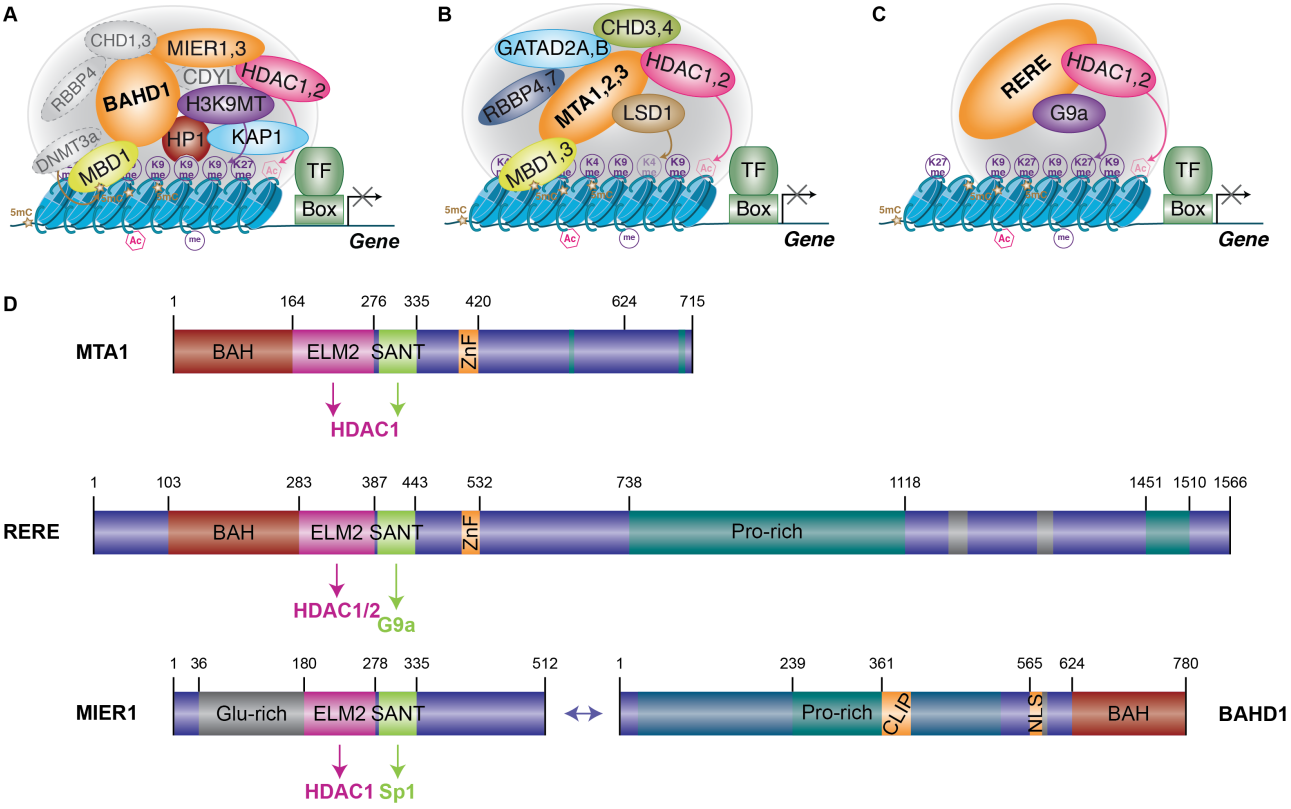

Figure 12. Composition des complexes co-répresseurs à activité histone-déacétylase. Les protéines portant des domaines BAH, ELM2 et/ou SANT sont en orange. **(A)** Complexe associé à BAHD1. **(B)** Complexe NuRD (Nucleosome Remodelling Deacetylase. **(C)** Complexe associé à RERE/Atrophine2. **(D)** Protéines à domaines BAH, ELM2 et SANT dans les complexes co-répresseurs. BAH, « Bromo-Adjacent Homology » ; ELM2, « Egl-27 and MTA1 homology 2 » ; SANT, acronyme de « Swi3, Ada2, N-Cor, and TFIIIB ».

En accord avec cette hypothèse, j'ai observé que l'interaction entre BAHD1 et MIER1/3 au sein du complexe était particulièrement stable.

Par ailleurs, la surexpression de BAHD1 induit un recrutement de MIER1 à la chromatine, visible par fractionnement cellulaire, et un marquage en immunofluorescence accru de MIER1 aux chromosomes X inactivés (Figure 13), un site connu d'enrichissement de BAHD1 lorsqu'il est surexprimé dans des cellules femelles (Bierne *et al*. 2009). Ces observations sont des arguments forts en faveur d'une interaction directe entre BAHD1 et MIER1, ce qui reste cependant à démontrer.

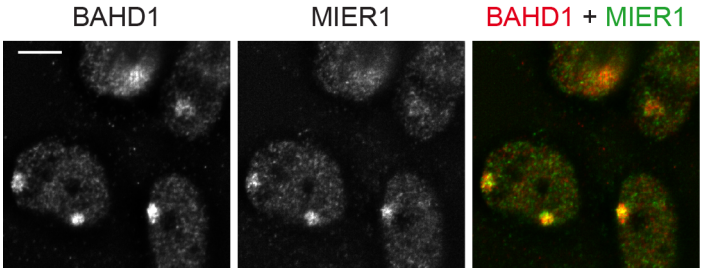

Figure 13. Co-localisation de BAHD1 et MIER1. Immunofluorescences sur une lignée stable surexprimant BAHD1 en fusion avec un double tag His-PC. La lignée dérive de HEK293 et contient 3 chromosomes X, dont 2 inactivés.

Cibles génomiques du complexe chromatinien associé à BAHD1

Afin de cartographier les sites de liaisons de BAHD1 sur le génome humain de façon exhaustive, j'ai adapté notre technique de TAP pour isoler la fraction ADN contenue dans la chromatine associée au complexe. Contrairement aux expériences de ChIP classiques, cette méthode permet de travailler sur un complexe natif, sans pontage au formaldéhyde. L'ADN purifié a été utilisé pour un séquençage haut débit (Illumina) ; la normalisation et l'analyse poussée ont été effectuées par Emanuele Libertini (post-doctorant, ANR EpiLis) à la plateforme *Transcriptome et Épigénome* de l'Institut Pasteur. Cette étude révèle plusieurs loci d'intérêt où BAHD1 se lie physiquement, et un très fort enrichissement du signal provenant du chromosome X[3]. Cet enrichissement est particulièrement frappant dans une région s'étendant de part et d'autre du centre d'inactivation du chromosome X (XIC), caractérisée par l'expression de plusieurs gènes impliqués dans l'inactivation du X, comme le long ARN non codant *XIST* (Figure 14). J'ai de plus montré par ChIP que MIER1 se liait à certaines cibles génomiques de BAHD1, ce qui confirme un lien privilégié de ces deux facteurs.

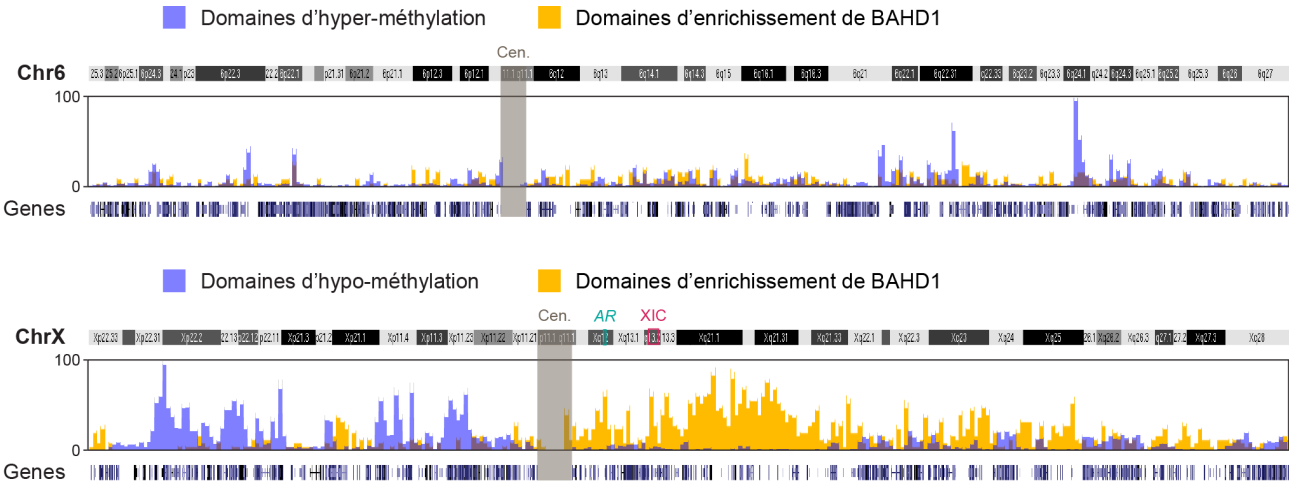

Figure 14. Sites de liaison de BAHD1 et marques de méthylation. Les signaux d'enrichissement de BAHD1 (en jaune) et d'hyper– ou hypo– méthylation induite par la surexpression de BAHD1 (en bleu) révélés par notre analyse ont été groupés par fenêtres de 0,5 Mb et reportés le long des chromosomes 6 et X. *AR*, gène codant pour le récepteur des androgènes ; XIC, centre d'inactivation du X. L'échelle est arbitraire.

Le complexe associé à BAHD1 contient une protéine se liant à l'ADN méthylé (MBD1), ainsi qu'une méthyltransférase impliquée dans la méthylation de novo de l'ADN (DNMT3A) ; sur cette base, nous avons

[3] Pour toutes les expériences de TAP, ChIP natif, BS-Seq et leurs validations, nous avons utilisé des cellules femelles dérivées de HEK293, surexprimant BAHD1 en fusion avec un double tag His-PC. Ces cellules contiennent trois chromosomes X dont deux inactivés (Figure 13).

émis l'hypothèse que BAHD1 pourrait induire une répression chromatinienne durable en stimulant la méthylation de l'ADN. Anupam Paliwal (post-doctorant, Ligue contre le cancer) et Emanuele Libertini ont analysé par BS-Seq (séquençage du génome après traitement au bisulfite) la méthylation de l'ADN dans la lignée cellulaire surexprimant BAHD1 qui a servi pour l'étude de ChIP natif, en comparaison à une lignée contrôle correspondante. La surexpression de BAHD1 s'accompagne d'une hyper-méthylation sur les autosomes, prédominante aux sites d'hérétochromatine constitutive (Figure 14, *haut*). Inversement, le chromosome X est sujet à une hypo-méthylation, principalement localisée aux sites où BAHD1 ne se lie pas (Figure 14, *bas*).

Nous avons également généré les transcriptomes de cellules où BAHD1 est surexprimé ou réprimé. L'intersection de ces données avec le ChIP-Seq met en lumière plusieurs sites sur lesquels la liaison de BAHD1 a un effet répresseur sur la transcription. Parmi les candidats étudiés, certains gènes contrôlés par BAHD1 ont potentiellement un rôle dans la réponse immunitaire à l'infection bactérienne, comme *IL29* (codant pour IFN-λ1) ; d'autres cibles sont impliquées dans le métabolisme, le développement ou les régulations hormonales (*e.g. AR* et *ESR1,* codant respectivement pour les récepteurs des androgènes et des œstrogènes). Ces données concordent avec le phénotype de souris BAHD1$^{-/-}$, qui souffrent de défauts métaboliques, particulièrement notables dans la période pré-natale en raison d'une atrophie placentaire, et se poursuivant à l'âge adulte par une maigreur prononcée accompagnée d'hypocholestérolémie. Ces souris présentent aussi une résistance accrue à l'infection par *Listeria monocytogenes* (injection intraveineuse) ou *Mycobacterium tuberculosis* (insufflation intranasale).

J'ai confirmé plusieurs des cibles de BAHD1 par ChIP suivie de PCR quantitative et mesures d'expression dans des cellules où *BAHD1* est réprimé ou surexprimé. Entre autres, l'expression de *XIST* est sensible à la répression ou la surexpression de BAHD1. De façon surprenante, la déplétion constitutive de BAHD1 conduit à une multiplication du nombre de chromosomes X inactivés dans notre modèle de cellules HEK293 (jusqu'à 5 chromosomes X par cellule, dont 4 inactifs). *In vivo*, nous observons un déficit prononcé des naissances de souris BAHD1$^{-/-}$ femelles par rapport aux mâles, ce qui nous laisse penser que la fonction de BAHD1 dans l'inactivation du chromosome X joue un rôle important dans le développement précoce de l'embryon femelle.

Nos données conduisent à proposer que BAHD1 contribue à l'établissement et/ou à la maintenance de loci condensés sous forme d'hétérochromatine, ainsi qu'à la stabilité du chromosome X inactif.

Réponse IFN-III des cellules épithéliales à l'infection bactérienne

Dans la continuité des travaux décrits plus haut (Lebreton *et al*. 2011), H. Bierne a souhaité mieux décrire la réponse IFN-III lors de l'infection de cellules épithéliales par *L. monocytogenes, in vitro et in vivo,* et étendre ces résultats à d'autres pathogènes (Bierne *et al*. 2012b). Je l'ai épaulée dans ce travail, en participant à la mesure de l'expression des gènes IFN-λ dans différentes conditions d'infection. J'ai également participé à la réflexion initiale sur la problématique et la démarche expérimentale à mettre en œuvre, l'analyse des résultats et la rédaction. Je n'ai pas été impliquée dans la partie de l'étude sur modèle animal.

Projet secondaire : réponse microARN intestinale à l'infection par *Listeria*

Enfin, j'ai participé à une étude de la réponse transcriptionnelle de l'hôte à l'infection, dont la porteuse principale était Christel Archambaud, alors post-doctorante au laboratoire et désormais chargée de recherche à l'INRA, Jouy-en-Josas. Le but de ce projet était de corréler l'expression des ARNm dans l'intestin de souris infectées par *Listeria* à des dérégulations de microARN. L'influence du microbiote sur la réponse transcriptionnelle intestinale a également été prise en compte, par une comparaison entre des souris conventionnelles et des souris axéniques.

Cette étude a révélé que le microbiote module le transcriptome de l'hôte en réponse à l'infection. Non seulement l'expression de gènes codant pour des protéines est affectée, mais également celle d'un certain nombre de microARN. Ceci qui nous a conduit à définir un réseau prédictif des régulations pouvant exister entre ces microARNs et leurs cibles ARNm potentielles lors de l'infection (Archambaud *et al*. 2013). Cette étude demeure toutefois descriptive ; une validation fonctionnelle des liens entre les microARN identifiés et leurs cibles putatives, ainsi que la preuve d'un rôle régulateur lors de l'infection, restent à établir.

Ces travaux font partie du faible nombre d'études s'intéressant aux régulations post-transcriptionnelles de l'hôte lors de l'infection par *Listeria*, et ma participation à leur réalisation a amorcé une transition avec les projets que je développe actuellement (voir partie suivante). J'ai validé dans deux lignées de cellules épithéliales humaines le rôle régulateur de certains des microARN lors de l'infection (que nous avions identifiés dans le modèle murin), en quantifiant l'abondance en ARNm et protéines des cibles régulées. J'ai également pris modestement part à la discussion scientifique du projet et des résultats, ainsi qu'à la rédaction.

Projets : Infection bactérienne & Devenir de l'ARN cellulaire

La bactérie *Listeria monocytogenes*, contaminant alimentaire fréquent, est l'agent pathogène responsable de la listériose chez les animaux sauvages, le bétail et l'homme. Bien que l'incidence de la maladie soit faible (deux à cinq par million d'habitants), elle représente 18% ces causes identifiées d'infections alimentaires en France et aux Etats-Unis (Allerberger and Wagner 2010; Mateus *et al*. 2013). La listériose touche principalement les personnes âgées et les individus immunodéprimés, causant des cas sévères de méningites ou de septicémies souvent létales (20 à 30% des cas). L'infection par *L. monocytogenes* est également une préoccupation importante en cas d'infections de femmes enceintes, chez qui elle se traduit par des avortements ou des bactériémies néonatales graves ; le taux de mortalité chez les nouveaux-nés est élevé, et les nourrissons survivants développent souvent des complications neurologiques sévères. *L. monocytogenes* peut franchir les barrières intestinale, fœto-placentaire et hémato-encéphalique, et se propager ainsi à l'ensemble de l'organisme.

Le nombre de cas de contaminations répertoriées dans les filières agroalimentaires, déclenchant des épidémies de listériose, reste anormalement élevé dans les pays industrialisés (Ferreira *et al*. 2003; Nakari *et al*. 2014; Popovic *et al*. 2014). *Listeria* devient un problème récurrent de sécurité alimentaire, ce qui justifie le besoin de stratégies efficaces pour lutter contre ce pathogène, renforcer la surveillance, éradiquer les contaminations à la source, sensibiliser les consommateurs aux différents moyens de prévention, améliorer les méthodes de diagnostique précoce et comprendre la biologie de l'infection.

Après l'ingestion d'aliments contaminés, *L. monocytogenes* a la capacité d'entrer et de se multiplier dans le cytoplasme de la plupart des types cellulaires. Pour ceci, un arsenal de facteurs de virulence ciblant différents constituants cellulaires lui permet de détourner les fonctions de la cellule hôte à son profit (Cossart 2011).

Problématique et objectifs

L'une des principales conséquences du dialogue entre la bactérie et son hôte lors de l'infection est le **remaniement de leurs programmes d'expression génique**. La bactérie met ainsi en place une stratégie de virulence, et adapte son métabolisme à la vie intracellulaire. Du côté de l'hôte, le paysage transcriptionnel est remanié par différents mécanismes, dont certains profitent à l'hôte, d'autres à la bactérie :

- La perception de pathogènes intracellulaires par des senseurs cellulaires conduit à l'activation des voies d'inflammation et de défense immunitaire innée (Eitel *et al*. 2010) ;
- Certaines voies de signalisation cellulaires sont modulées par des facteurs de virulence de *Listeria* (Copp *et al*. 2003; Gouin *et al*. 2010) ;
- La transcription des gènes de l'hôte est régulée au niveau de la chromatine (Bierne *et al*. 2012a; Lebreton *et al*. 2015).

Cette reprogrammation conditionne la **physiologie bactérienne, la survie cellulaire, la réponse immunitaire tissulaire, et détermine *in fine* l'issue patho-physiologique de l'infection**. Cependant, les régulations mentionnées ci-dessus ne couvrent pas l'ensemble des niveaux de contrôle possibles de l'expression génique de l'hôte (Figure 15). Le niveau post-transcriptionnel, c'est-à-dire les mécanismes affectant la vie de l'ARNm entre sa transcription et sa traduction, ont été relativement peu étudiés dans ce contexte. Les connaissances concernant le **devenir des ARNm de l'hôte en réponse à une infection bactérienne** restent limitées, le plus souvent à des études transcriptomiques. L'étude des **différents niveaux de régulations et de leur dynamique** est néanmoins essentielle pour comprendre dans quelle mesure les fonctions cellulaires de base sont perturbées par l'infection. Nous nous proposons d'aborder cette question et d'étudier les mécanismes moléculaires sous-jacents.

Le projet de l'équipe *Infection et devenir de l'ARN* porte sur l'étude des **régulations post-transcriptionnelles affectant l'expression génique** des cellules épithéliales humaines, lors de l'infection par *Listeria monocytogenes*. Nos études portent sur quatre questions clefs :

1. L'infection s'accompagne-t-elle de dégradations globales ou spécifiques des ARNm cellulaires ?
2. La traduction des ARNm est-elle affectée par l'infection ?
3. Quels mécanismes moléculaires de la bactérie ou de l'hôte sont impliqués dans ces processus ?
4. Quelles en sont les conséquences sur la viabilité cellulaire ou la prolifération bactérienne ?

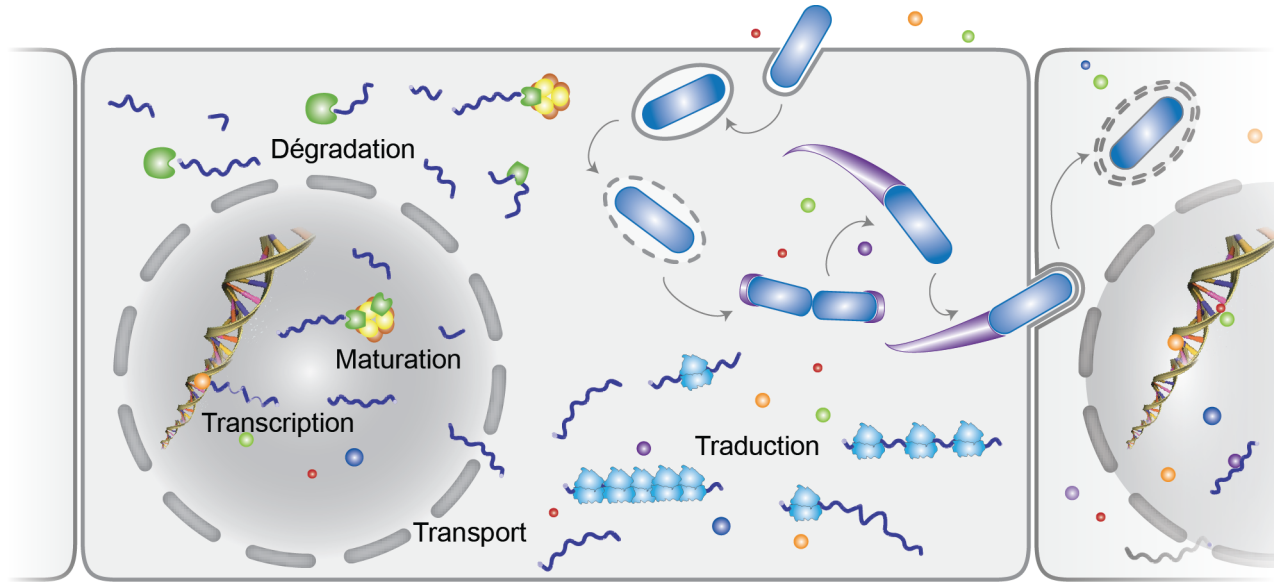

Figure 15. Illustration des différents points de contrôle pouvant affecter l'expression génique dans une cellule infectée par *Listeria monocytogenes*. La bactérie entre dans les cellules épithéliales en induisant son endocytose. Après sa sortie de la vésicule d'internalisation, elle se multiplie dans les cellules, et se déplace en stimulant la polymérisation de comètes d'actine. Non seulement la transcription, mais également la maturation, le transport, la dégradation et la traduction des ARNm sont susceptibles d'être perturbés lors de l'infection, soit par des mécanismes de réponse de l'hôte, soit via l'activité de facteurs de virulence de la bactérie. Les cibles de ces régulations pourraient participer aux défenses de l'hôte, ou d'être utilisées par la bactérie pour promouvoir son cycle intracellulaire.

Résumé de l'état de l'art en 2015

À ce jour, la plupart des études sur la réponse de l'hôte à l'infection bactérienne se sont concentrées sur deux aspects : soit le transcriptome, *i.e.* la quantité d'ARNm présente à un temps donné après l'infection, soit la sécrétion de cytokines. Cependant, l'abondance des transcrits et des protéines correspondantes sont souvent faiblement corrélées (Nagaraj *et al.* 2011). De plus, ces études ne tiennent en général pas compte de la complexité dynamique des transcriptomes, qui sont la résultante de la transcription, de la maturation et de la dégradation des ARNm.

À la différence des travaux de virologie s'intéressant aux mécanismes d'extinction (« *shutoff* ») de l'expression génique, les connaissances concernant le **devenir des ARNm de l'hôte en réponse à une infection bactérienne** restent limitées. L'étude des **différents niveaux de régulations et de leur dynamique** est néanmoins essentielle pour comprendre dans quelle mesure les fonctions cellulaires de base sont perturbées par l'infection. Des travaux pionniers sur la bactérie phytopathogène *Pseudomonas syringae* ont montré que des effecteurs bactériens sécrétés interfèrent avec les réponses immunitaires de l'hôtes à une étape de régulation post-transcriptionnel (Staiger *et al.* 2013). Plusieurs autres rapports indiquent que des bactéries (*Legionella pneumophila* chez le nématode et dans des macrophages murins ; *Pseudomosas entomophila* chez la drosophile) ciblent la traduction de l'hôte et modulent ainsi – positivement ou négativement) la production de protéines participant aux défenses de l'hôte (Mohr and Sonenberg 2012).

Dans le cas de l'infection d'hôtes mammifères par des bactéries intracellulaires, les données concernant ce niveau de régulations sont plus éparses. L'activation de voies de réponse au stress, la sécrétion d'effecteurs bactériens, ainsi que la signalisation interféron, conduisent à l'activation des eIF2α-kinases et inhibent ainsi l'initiation de la traduction (Mohr and Sonenberg 2012). Comme pour les infections virale, ce mécanisme promeut les défenses antibactériennes dans les cellules infectées ou avoisinantes (Fontana *et al*. 2011). La réponse interféron affecte également différentes étapes de l'élongation de la traduction. Par ailleurs, un nombre croissant de travaux rapporte un rôle clef des régulations par des microARN au cours d'infections bactériennes (Eulalio *et al*. 2012; Staedel and Darfeuille 2013). Des effets plus spécifiques induits par des effecteurs bactériens sécrétés ont été rapportés, tels que la disparition des *P-bodies* dans des cellules humaines infectées par les bactéries entéropathogènes *Salmonella enterica* ou *Shigella flexneri* (Eulalio *et al*. 2011).

Lors de l'infection par *L. monocytogenes*, l'ultrastructure cellulaire est perturbée, y compris la morphologie nucléaire et l'association des ribosomes au réticulum endoplasmique (Siddique *et al*. 1978) ; ceci implique, au minimum, une réallocation de l'équipement traductionnel cellulaire vers la production de protéines cytosoliques, au détriment des voies de sécrétion. Comme évoqué plus haut pour d'autres pathogènes, eIF2α est phosphorylée ; de plus, des cellules déficientes pour l'activité d'eIF2 sont hypersensibles à l'invasion bactérienne (Shrestha *et al*. 2012). L'ajout de listériolysine O (LLO) purifiée à des cellules en culture est suffisante pour induire la phosphorylation d'eIF2α et un arrêt traductionnel transitoire (Gonzalez *et al*. 2011) ; toutefois, ce n'est probablement pas le seul facteur agissant sur cette voie dans des conditions d'infection.

Divers arguments indiquent que l'infection affecte également la stabilité des ARN : Plusieurs enzymes de dégradation des ARN sont dérégulées, ainsi que certains constituants de la machinerie d'interférence ARN (données personnelles non publiées). Une réponse microARN spécifique de l'infection est également mise en place, dans des cellules épithéliales en culture (Izar *et al*. 2012) comme dans les tissus intestinaux dans un modèle de listériose orale chez la souris (Archambaud *et al*. 2012; 2013).

Enfin, la voie de signalisation mTOR – le coordinateur central du métabolisme cellulaire – est affectée négativement par la carence nutritionnelle et le stress liés à l'infection (Tattoli *et al*. 2012; 2013), mais aussi positivement par certains effecteurs bactériens comme l'invasine InlB (Jiwani *et al*. 2012). La combinaison de ces signaux positifs et négatifs devrait conduire à une dérégulation, variable dans le temps, de fonctions cellulaires centrales telles que la biogenèse des ribosomes (Malik *et al*. 2012). En lien plus direct avec l'infection, mTOR module également la réponse inflammatoire à *L. monocytogenes*, en agissant sur les voies NF-κB et STAT3 (Weichhart *et al*. 2008).

Projet secondaire : Suivi de la sécrétion des facteurs de virulence de *Listeria monocytogenes* grâce à une nouvelle protéine fluorescente

Un obstacle majeur à l'étude dynamique de la sécrétion des facteurs de virulence et de leur localisation dans la cellule hôte au cours de l'infection est la difficulté d'obtenir des protéines de fusion fluorescentes pouvant être sécrétées. Notre collaborateur Arnaud Gautier (ENS, département de Chimie) a récemment développé le système FAST (Plamont *et al*. 2016), qui pallie les principaux défauts des autres stratégies en couplant une taille réduite, un repliement de la forme fonctionnelle suffisamment rapide pour permettre des études en temps réel, et une faible sensibilité à l'inactivation par la lumière. En collaboration avec Arnaud Gautier et Nicolas Desprat (ENS, département de Physique), nous adaptons cette nouvelle molécule pour développer des outils de suivi de la sécrétion des effecteurs bactériens sur cellules vivantes.

Depuis début 2015, nous avons transposé FAST dans le modèle *Listeria* afin d'estimer sa performance par rapport aux méthodes existantes. Nous avons pu obtenir une protéine fluorescente sécrétée et observer en microscopie son accumulation dans le cytoplasme de cellules vivantes infectées. Nous utiliserons dans un premier temps ce système pour des études fonctionnelles de la sécrétion de la LLO. Nous envisageons ensuite de développer une technique similaire pour d'autres systèmes de sécrétion, par exemple l'appareil de sécrétion de type III de bactéries Gram$^-$. Nous utiliserons également ce rapporteur lors de l'étude de nouveaux facteurs de virulence de *Listeria* intéressants pour les autres projets de l'équipe.

Un système permettant de détecter par fluorescence les protéines sécrétées et leur accumulation dans le cytoplasme de cellules infectées présente un intérêt immédiat pour le suivi direct et quantitatif de l'infection par microscopie ou FACS. Nous pourrons également observer en temps réel la localisation de ces effecteurs dans la cellule, et ainsi approfondir leur étude fonctionnelle.

Conclusions

Le projet de notre équipe aborde une question fondamentale en biologie cellulaire, dans un contexte d'infection, où nous explorerons aussi bien le fonctionnement de la cellule saine que pathologique, sous des angles descriptifs et mécanistiques. En intégrant **tous les niveaux de contrôle de l'expression génique**, ces travaux devraient générer **une image plus pertinente, complète et dynamique** de la reprogrammation cellulaire que des études transcriptomiques classiques, et ainsi permettre d'approfondir notre compréhension du scénario d'adaptation de la cellule hôte à l'infection bactérienne.

Ce projet devrait produire les **premiers jeux de données —omiques concernant la stabilité et la traduction des ARNm** de **cellules épithéliales infectées par une bactérie**. À ma connaissance, ces approches et leur analyse n'ont jamais été mises en œuvre dans ce contexte, et constituent en soi un défi technologique. La corrélation des données de transcriptome, de stabilité et de traduction nous permettra à terme de **modéliser les flux d'information génétique, et les circuits de régulation** à l'œuvre dans les cellules infectées. Nos travaux devraient également nous conduire à caractériser des facteurs de virulence dont la fonction est inconnue. Ils pourraient aussi révéler des **mécanismes inexplorés de régulations post-transcriptionnelles** spécifiques à certains ARNm.

Notre modèle d'étude étant l'agent de la listériose, nos recherches s'inscrivent dans la lutte médicale contre ce pathogène, ou d'autres. En permettant de mieux comprendre comment l'expression génique de l'hôte se traduit en termes de défenses des cellules non immunitaires, elles pourraient révéler de nouvelles cibles thérapeutiques, par exemple pour contrer la réponse inflammatoire à l'infection en l'attaquant à un nouveau point de contrôle.

Enfin, *Listeria monocytogenes* étant un contaminant alimentaire pour l'homme et le bétail, ces recherches pourraient également avoir un intérêt agro-alimentaire, bien que notre but direct ne soit pas de développer des stratégies antibactériennes ou diagnostiques dans les filières de production. Au-delà de l'étude de *Listeria*, j'aimerais souligner que le concept n'est pas restrictif, et je souhaite par la suite étendre nos résultats à d'autres bactéries, non seulement d'autres pathogènes intracellulaires mais aussi potentiellement des commensaux intestinaux et, éventuellement, des symbiontes.

Bibliographie

1. Allerberger F, Wagner M. 2010. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clin Microbiol Infect* **16**: 16–23.
2. Allmang C, Kufel J, Chanfreau G, Mitchell P, Petfalski E, Tollervey D. 1999. Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *EMBO J* **18**: 5399–5410.
3. Anderson JS, Parker R. 1998. The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3“ to 5” exonucleases of the exosome complex. *EMBO J* **17**: 1497–1506.
4. Archambaud C, Nahori M-A, Soubigou G, Bécavin C, Laval L, Lechat P, Smokvina T, Langella P, Lecuit M, Cossart P. 2012. Impact of lactobacilli on orally acquired listeriosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 16684–16689.
5. Archambaud C, Sismeiro O, Toedling J, Soubigou G, Bécavin C, Lechat P, Lebreton A, Ciaudo C, Cossart P. 2013. The intestinal microbiota interferes with the microRNA response upon oral *Listeria* infection. *MBio* **4**: e00707–13.
6. Armache K-J, Garlick JD, Canzio D, Narlikar GJ, Kingston RE. 2011. Structural basis of silencing: Sir3 BAH domain in complex with a nucleosome at 3.0 Å resolution. *Science* **334**: 977–982.
7. Ben-Shem A, Jenner L, Yusupova G, Yusupov M. 2010. Crystal structure of the eukaryotic ribosome. *Science* **330**: 1203–1209.
8. Bierne H, Hamon MA, Cossart P. 2012a. Epigenetics and bacterial infections. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**: a010272–a010272.
9. Bierne H, Tham TN, Batsche E, Dumay A, Leguillou M, Kernéis-Golsteyn S, Regnault B, Seeler JS, Muchardt C, Feunteun J, *et al*. 2009. Human BAHD1 promotes heterochromatic gene silencing. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 13826–13831.
10. Bierne H, Travier L, Mahlakõiv T, Tailleux L, Subtil A, Lebreton A, Paliwal A, Gicquel B, Staeheli P, Lecuit M, *et al*. 2012b. Activation of type III interferon genes by pathogenic bacteria in infected epithelial cells and mouse placenta. *PLoS ONE* **7**: e39080.
11. Bradatsch B, Leidig C, Granneman S, Gnädig M, Tollervey D, Böttcher B, Beckmann R, Hurt E. 2012. Structure of the pre-60S ribosomal subunit with nuclear export factor Arx1 bound at the exit tunnel. *Nat Struct Mol Biol* **19**: 1234–1241.
12. Callebaut I, Courvalin JC, Mornon JP. 1999. The BAH (bromo-adjacent homology) domain: a link between DNA methylation, replication and transcriptional regulation. *FEBS Lett* **446**: 189–193.
13. Colin J, Libri D, Porrua O. 2011. Cryptic transcription and early termination in the control of gene expression. *Genet Res Int* **2011**: 653494–10.
14. Copp J, Marino M, Banerjee M, Ghosh P, van der Geer P. 2003. Multiple regions of internalin B contribute to its ability to turn on the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* **278**: 7783–7789.
15. Cossart P. 2011. Illuminating the landscape of host-pathogen interactions with the bacterium *Listeria monocytogenes*. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 19484–19491.
16. Cossart P, Lebreton A. 2014. A trip in the “New Microbiology” with the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes*. *FEBS Lett* **588**: 2437–2445.
17. de Azevedo Wäsch SI, van der Ploeg JR, Maire T, Lebreton A, Kiener A, Leisinger T. 2002. Transformation of isopropylamine to L-alaninol by *Pseudomonas* sp. strain KIE171 involves N-glutamylated intermediates. *Appl Environ Microbiol* **68**: 2368–2375.
18. Decker T, Muller M, Stockinger S. 2005. The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection. *Nat Rev Immunol* **5**: 675–687.
19. Demoinet E, Jacquier A, Lutfalla G, Fromont-Racine M. 2007. The Hsp40 chaperone Jjj1 is required for the nucleo-cytoplasmic recycling of preribosomal factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* **13**: 1570–1581.
20. Ding Z, Gillespie LL, Mercer FC, Paterno GD. 2004. The SANT domain of human MI-ER1 interacts with Sp1 to interfere with GC box recognition and repress transcription from its own promoter. *J Biol Chem* **279**: 28009–28016.
21. Dziembowski A, Lorentzen E, Conti E, Séraphin B. 2007. A single subunit, Dis3, is essentially responsible for yeast exosome core activity. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 15–22.
22. Eitel J, Suttorp N, Opitz B. 2010. Innate immune recognition and inflammasome activation in *Listeria monocytogenes* infection. *Frontiers in Microbiology* **1**: 149.
23. Eulalio A, Fröhlich KS, Mano M, Giacca M, Vogel J. 2011. A candidate approach implicates the secreted *Salmonella* effector protein SpvB in P-body disassembly. *PLoS ONE* **6**: e17296.
24. Eulalio A, Schulte LN, Vogel J. 2012. The mammalian microRNA response to bacterial infections. *RNA biology* **9**: 742–750.

25. Fasken MB, Leung SW, Banerjee A, Kodani MO, Chavez R, Bowman EA, Purohit MK, Rubinson ME, Rubinson EH, Corbett AH. 2011. Air1 zinc knuckles 4 and 5 and a conserved IWRXY motif are critical for the function and integrity of the Trf4/5-Air1/2-Mtr4 polyadenylation (TRAMP) RNA quality control complex. *J Biol Chem* **286**: 37429–37445.
26. Ferreira A, Sue D, O'Byrne CP, Boor KJ. 2003. Role of *Listeria monocytogenes* sigma(B) in survival of lethal acidic conditions and in the acquired acid tolerance response. *Appl Environ Microbiol* **69**: 2692–2698.
27. Fontana MF, Banga S, Barry KC, Shen X, Tan Y, Luo Z-Q, Vance RE. 2011. Secreted bacterial effectors that inhibit host protein synthesis are critical for induction of the innate immune response to virulent *Legionella pneumophila*. *PLoS Pathog* **7**: e1001289.
28. Fromont-Racine M, Senger B, Saveanu C, Fasiolo F. 2003. Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene* **313**: 17–42.
29. Gartmann M, Blau M, Armache J-P, Mielke T, Topf M, Beckmann R. 2010. Mechanism of eIF6-mediated inhibition of ribosomal subunit joining. *J Biol Chem* **285**: 14848–14851.
30. Gavin A-C, Aloy P, Grandi P, Krause R, Boesche M, Marzioch M, Rau C, Jensen LJ, Bastuck S, Dümpelfeld B, *et al*. 2006. Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature* **440**: 631–636.
31. Gonzalez MR, Bischofberger M, Frêche B, Ho S, Parton RG, van der Goot FG. 2011. Pore-forming toxins induce multiple cellular responses promoting survival. *Cell Microbiol* **13**: 1026–1043.
32. Gouin E, Adib-Conquy M, Balestrino D, Nahori M-A, Villiers V, Colland F, Dramsi S, Dussurget O, Cossart P. 2010. The *Listeria monocytogenes* InlC protein interferes with innate immune responses by targeting the IκB kinase subunit IKKα. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 17333–17338.
33. Greber BJ, Boehringer D, Montellese C, Ban N. 2012. Cryo-EM structures of Arx1 and maturation factors Rei1 and Jjj1 bound to the 60S ribosomal subunit. *Nat Struct Mol Biol* **19**: 1228–1233.
34. Gudipati RK, Xu Z, Lebreton A, Séraphin B, Steinmetz LM, Jacquier A, Libri D. 2012. Extensive degradation of RNA precursors by the exosome in wild-type cells. *Mol Cell* **48**: 409–421.
35. Houseley J, LaCava J, Tollervey D. 2006. RNA-quality control by the exosome. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 529–539.
36. Hung N-J, Johnson AW. 2006. Nuclear recycling of the pre-60S ribosomal subunit-associated factor Arx1 depends on Rei1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **26**: 3718–3727.
37. Isken O, Maquat LE. 2007. Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes Dev* **21**: 1833–1856.
38. Izar B, Mannala GK, Mraheil MA, Chakraborty T, Hain T. 2012. microRNA response to *Listeria monocytogenes* infection in epithelial cells. *Int J Mol Sci* **13**: 1173–1185.
39. Jia H, Wang X, Anderson JT, Jankowsky E. 2012. RNA unwinding by the Trf4/Air2/Mtr4 polyadenylation (TRAMP) complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 7292–7297.
40. Jia H, Wang X, Liu F, Guenther U-P, Srinivasan S, Anderson JT, Jankowsky E. 2011. The RNA helicase Mtr4p modulates polyadenylation in the TRAMP complex. *Cell* **145**: 890–901.
41. Jiwani S, Wang Y, Dowd GC, Gianfelice A, Pichestapong P, Gavicherla B, Vanbennekom N, Ireton K. 2012. Identification of components of the host type IA phosphoinositide 3-kinase pathway that promote internalization of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **80**: 1252–1266.
42. Klinge S, Voigts-Hoffmann F, Leibundgut M, Arpagaus S, Ban N. 2011. Crystal structure of the eukaryotic 60S ribosomal subunit in complex with initiation factor 6. *Science* **334**: 941–948.
43. Krogan NJ, Lam MHY, Fillingham J, Keogh M-C, Gebbia M, Li J, Datta N, Cagney G, Buratowski S, Emili A, *et al*. 2004. Proteasome involvement in the repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell* **16**: 1027–1034.
44. la Cruz de J, Kressler D, Tollervey D, Linder P. 1998. Dob1p (Mtr4p) is a putative ATP-dependent RNA helicase required for the 3' end formation of 5.8S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **17**: 1128–1140.
45. Lakisic G, Lebreton A, Pourpre R, Wendling O, Libertini E, Radford EJ, Le Guillou M, Champy M-F, Wattenhofer-Donzé M, Soubigou G, *et al*. 2016. Role of the BAHD1 Chromatin-Repressive Complex in Placental Development and Regulation of Steroid Metabolism. ed. P. Wade. *PLoS Genet* **12**: e1005898.
46. Lebreton A. 2006. Dynamique des facteurs pré-ribosomiques au cours de la biogenèse de la grande sous-unité ribosomique chez *S. cerevisiae*. Mémoire de thèse. Université Paris 7 - Denis Diderot.
47. Lebreton A, Bierne H, Cossart P. 2012a. Les multiples stratégies de *Listeria*. *Pour la science* 42–49.
48. Lebreton A, Cossart P, Bierne H. 2012b. Bacteria tune interferon responses by playing with chromatin. *Virulence* **3**: 87–91.
49. Lebreton A, Job V, Ragon M, Le Monnier A, Dessen A, Cossart P, Bierne H. 2014. Structural basis for the inhibition of the chromatin repressor BAHD1 by the bacterial nucleomodulin LntA. *MBio* **5**: e00775–13.
50. Lebreton A, Lakisic G, Job V, Fritsch L, Tham TN, Camejo A, Matteï P-J, Regnault B, Nahori M-A,

Cabanes D, *et al*. 2011. A bacterial protein targets the BAHD1 chromatin complex to stimulate type III interferon response. *Science* **331**: 1319–1321.

51. Lebreton A, Rousselle J-C, Lenormand P, Namane A, Jacquier A, Fromont-Racine M, Saveanu C. 2008a. 60S ribosomal subunit assembly dynamics defined by semi-quantitative mass spectrometry of purified complexes. *Nucleic Acids Res* **36**: 4988–4999.
52. Lebreton A, Saveanu C, Decourty L, Jacquier A, Fromont-Racine M. 2006a. Nsa2 is an unstable, conserved factor required for the maturation of 27 SB pre-rRNAs. *J Biol Chem* **281**: 27099–27108.
53. Lebreton A, Saveanu C, Decourty L, Rain J-C, Jacquier A, Fromont-Racine M. 2006b. A functional network involved in the recycling of nucleocytoplasmic pre-60S factors. *J Cell Biol* **173**: 349–360.
54. Lebreton A, Séraphin B. 2008. Exosome-mediated quality control: substrate recruitment and molecular activity. *Biochim Biophys Acta* **1779**: 558–565.
55. Lebreton A, Stavru F, Cossart P. 2015. Organelle targeting during bacterial infection: insights from *Listeria*. *Trends Cell Biol* **25**: 330–338.
56. Lebreton A, Tomecki R, Dziembowski A, Séraphin B. 2008b. Endonucleolytic RNA cleavage by a eukaryotic exosome. *Nature* **456**: 993–996.
57. Li W, Song A-P, Zhao F, Hu Y-M, Hua M. 2013. A novel human TINP1 gene promotes cell proliferation through inhibition of p53 and p21 expression. *Oncol Rep* **30**: 1848–1852.
58. Libertini E, Lebreton A, Lakisic G, Dilliès M-A, Beck S, Coppée J-Y, Cossart P, Bierne H. 2015. Overexpression of the Heterochromatinization Factor BAHD1 in HEK293 Cells Differentially Reshapes the DNA Methylome on Autosomes and X Chromosome. *Front Genet* **6**: 339.
59. Liu Q, Greimann JC, Lima CD. 2006. Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome. *Cell* **127**: 1223–1237.
60. Lubas M, Christensen MS, Kristiansen MS, Domanski M, Falkenby LG, Lykke-Andersen S, Andersen JS, Dziembowski A, Jensen TH. 2011. Interaction profiling identifies the human nuclear exosome targeting complex. *Mol Cell* **43**: 624–637.
61. Makino DL, Baumgärtner M, Conti E. 2013. Crystal structure of an RNA-bound 11-subunit eukaryotic exosome complex. *Nature* **495**: 70–75.
62. Malik AR, Urbanska M, Macias M, Skalecka A, Jaworski J. 2012. Beyond control of protein translation: What we have learned about the non-canonical regulation and function of mammalian target of rapamycin (mTOR). *Biochim Biophys Acta*.
63. Mateus T, Silva J, Maia RL, Teixeira P. 2013. *Listeriosis* during Pregnancy: A Public Health Concern. *ISRN Obstet Gynecol* **2013**: 851712–6.
64. Meyer AE, Hoover LA, Craig EA. 2010. The cytosolic J-protein, Jjj1, and Rei1 function in the removal of the pre-60 S subunit factor Arx1. *J Biol Chem* **285**: 961–968.
65. Millard CJ, Watson PJ, Celardo I, Gordiyenko Y, Cowley SM, Robinson CV, Fairall L, Schwabe JWR. 2013. Class I HDACs share a common mechanism of regulation by inositol phosphates. *Mol Cell* **51**: 57–67.
66. Minàrovits J. 2009. Microbe-induced epigenetic alterations in host cells: the coming era of patho-epigenetics of microbial infections. A review. *Acta Microbiol Immunol Hung* **56**: 1–19.
67. Mitchell P, Tollervey D. 2003. An NMD pathway in yeast involving accelerated deadenylation and exosome-mediated 3“-->5” degradation. *Mol Cell* **11**: 1405–1413.
68. Mohr I, Sonenberg N. 2012. Host translation at the nexus of infection and immunity. *Cell Host Microbe* **12**: 470–483.
69. Nagaraj N, Wisniewski JR, Geiger T, Cox J, Kircher M, Kelso J, Pääbo S, Mann M. 2011. Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. *Mol Syst Biol* **7**: 548.
70. Nakari U-M, Rantala L, Pihlajasaari A, Toikkanen S, Johansson T, Hellsten C, Raulo SM, Kuusi M, Siitonen A, Rimhanen-Finne R. 2014. Investigation of increased listeriosis revealed two fishery production plants with persistent *Listeria* contamination in Finland in 2010. *Epidemiol Infect* **142**: 2261–2269.
71. Nissan TA, Bassler J, Petfalski E, Tollervey D, Hurt E. 2002. 60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm. *EMBO J* **21**: 5539–5547.
72. Pertschy B, Saveanu C, Zisser G, Lebreton A, Tengg M, Jacquier A, Liebminger E, Nobis B, Kappel L, van der Klei I, *et al*. 2007. Cytoplasmic recycling of 60S preribosomal factors depends on the AAA protein Drg1. *Mol Cell Biol* **27**: 6581–6592.
73. Plamont M-A, Billon-Denis E, Maurin S, Gauron C, Pimenta FM, Specht CG, Shi J, Quérard J, Pan B, Rossignol J, *et al*. 2016. Small fluorescence-activating and absorption-shifting tag for tunable protein imaging *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* **113**: 497–502.
74. Pontiroli F, Dussurget O, Zanoni I, Urbano M, Beretta O, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P, Cossart P, Foti M. 2012. The Timing of IFNβ Production Affects Early Innate Responses to *Listeria monocytogenes* and Determines the Overall Outcome of Lethal Infection. *PLoS ONE* **7**: e43455.
75. Popovic I, Heron B, Covacin C. 2014. *Listeria*: an Australian perspective (2001-2010). *Foodborne Pathog Dis* **11**: 425–432.
76. Saveanu C, Namane A, Gleizes P-E, Lebreton A, Rousselle J-C, Noaillac-Depeyre J, Gas N, Jacquier A, Fromont-Racine M. 2003. Sequential protein association with nascent 60S ribosomal particles. *Mol Cell Biol* **23**: 4449–4460.

77. Schaeffer D, Tsanova B, Barbas A, Reis FP, Dastidar EG, Sanchez-Rotunno M, Arraiano CM, van Hoof A. 2009. The exosome contains domains with specific endoribonuclease, exoribonuclease and cytoplasmic mRNA decay activities. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 56–62.
78. Schmidt K, Butler JS. 2013. Nuclear RNA surveillance: role of TRAMP in controlling exosome specificity. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **4**: 217–231.
79. Schneider C, Leung E, Brown J, Tollervey D. 2009. The N-terminal PIN domain of the exosome subunit Rrp44 harbors endonuclease activity and tethers Rrp44 to the yeast core exosome. *Nucleic Acids Res* **37**: 1127–1140.
80. Senger B, Lafontaine DLJ, Graindorge JS, Gadal O, Camasses A, Sanni A, Garnier JM, Breitenbach M, Hurt E, Fasiolo F. 2001. The nucle(ol)ar Tif6p and Efl1p are required for a late cytoplasmic step of ribosome synthesis. *Mol Cell* **8**: 1363–1373.
81. Shahni R, Czajka A, Mankoo BS, Guvenel AK, King AJ, Malik AN. 2013. Nop-7-associated 2 (NSA2), a candidate gene for diabetic nephropathy, is involved in the TGFβ1 pathway. *Int J Biochem Cell Biol* **45**: 626–635.
82. Shahni R, Gnudi L, King A, Jones P, Malik AN. 2012. Elevated levels of renal and circulating Nop-7-associated 2 (NSA2) in rat and mouse models of diabetes, in mesangial cells *in vitro* and in patients with diabetic nephropathy. *Diabetologia* **55**: 825–834.
83. Shrestha N, Bahnan W, Wiley DJ, Barber G, Fields KA, Schesser K. 2012. Eukaryotic initiation factor 2 (eIF2) signaling regulates proinflammatory cytokine expression and bacterial invasion. *J Biol Chem* **287**: 28738–28744.
84. Siddique IH, McKenzie BE, Sapp WJ, Rich P. 1978. Light and electron microscopic study of the livers of pregnant mice infected with *Listeria monocytogenes*. *Am J Vet Res* **39**: 887–892.
85. Sloan KE, Schneider C, Watkins NJ. 2012. Comparison of the yeast and human nuclear exosome complexes. *Biochem Soc Trans* **40**: 850–855.
86. Slomovic S, Laufer D, Geiger D, Schuster G. 2006. Polyadenylation of ribosomal RNA in human cells. *Nucleic Acids Res* **34**: 2966–2975.
87. Staedel C, Darfeuille F. 2013. MicroRNAs and bacterial infection. *Cell Microbiol* **15**: 1496–1507.
88. Staiger D, Korneli C, Lummer M, Navarro L. 2013. Emerging role for RNA-based regulation in plant immunity. *New Phytol* **197**: 394–404.
89. Tafforeau L, Zorbas C, Langhendries J-L, Mullineux S-T, Stamatopoulou V, Mullier R, Wacheul L, Lafontaine DLJ. 2013. The complexity of human ribosome biogenesis revealed by systematic nucleolar screening of pre-rRNA processing factors. *Mol Cell* **51**: 539–551.
90. Tattoli I, Sorbara MT, Vuckovic D, Ling A, Soares F, Carneiro LAM, Yang C, Emili A, Philpott DJ, Girardin SE. 2012. Amino acid starvation induced by invasive bacterial pathogens triggers an innate host defense program. *Cell Host Microbe* **11**: 563–575.
91. Tattoli I, Sorbara MT, Yang C, Tooze SA, Philpott DJ, Girardin SE. 2013. *Listeria* phospholipases subvert host autophagic defenses by stalling pre-autophagosomal structures. *EMBO J* **32**: 3066–3078.
92. Traub P, Nomura M. 1969. Structure and function of *Escherichia coli* ribosomes. VI. Mechanism of assembly of 30 s ribosomes studied *in vitro*. *J Mol Biol* **40**: 391–413.
93. Turner RJ, Lu Y, Switzer RL. 1994. Regulation of the Bacillus subtilis pyrimidine biosynthetic (pyr) gene cluster by an autogenous transcriptional attenuation mechanism. *J Bacteriol* **176**: 3708–3722.
94. van Hoof A, Frischmeyer PA, Dietz HC, Parker R. 2002. Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science* **295**: 2262–2264.
95. Wang L, Charroux B, Kerridge S, Tsai C-C. 2008a. Atrophin recruits HDAC1/2 and G9a to modify histone H3K9 and to determine cell fates. *EMBO Rep* **9**: 555–562.
96. Wang X, Jia H, Jankowsky E, Anderson JT. 2008b. Degradation of hypomodified tRNA(iMet) *in vivo* involves RNA-dependent ATPase activity of the DExH helicase Mtr4p. *RNA* **14**: 107–116.
97. Weichhart T, Costantino G, Poglitsch M, Rosner M, Zeyda M, Stuhlmeier KM, Kolbe T, Stulnig TM, Hörl WH, Hengstschläger M, *et al*. 2008. The TSC-mTOR signaling pathway regulates the innate inflammatory response. *Immunity* **29**: 565–577.
98. West S, Gromak N, Norbury CJ, Proudfoot NJ. 2006. Adenylation and exosome-mediated degradation of cotranscriptionally cleaved pre-messenger RNA in human cells. *Mol Cell* **21**: 437–443.
99. Yusupov MM, Yusupova GZ, Baucom A, Lieberman K, Earnest TN, Cate JHD, Noller HF. 2001. Crystal structure of the ribosome at 5.5 A resolution. *Science* **292**: 883–896.
100. Zhang H, Ma X, Shi T, Song Q, Zhao H, Ma D. 2010. NSA2, a novel nucleolus protein regulates cell proliferation and cell cycle. *Biochem Biophys Res Commun* **391**: 651–658.