



**HAL**  
open science

# Etude fonctionnelle et cibles d'un ARN régulateur exprimé par le pathogène humain *Staphylococcus aureus* et impliqué dans l'internalisation des bactéries par les cellules humaines

Simon Raynaud

## ► To cite this version:

Simon Raynaud. Etude fonctionnelle et cibles d'un ARN régulateur exprimé par le pathogène humain *Staphylococcus aureus* et impliqué dans l'internalisation des bactéries par les cellules humaines. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Rennes, 2020. Français. NNT: 2020REN1B011 . tel-03082005

**HAL Id: tel-03082005**

**<https://theses.hal.science/tel-03082005v1>**

Submitted on 18 Dec 2020

**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.

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 605

*Biologie Santé*

Spécialité : « Biologie Moléculaire et Structurale, Biochimie »

Par

**Simon RAYNAUD**

**Étude fonctionnelle et cibles d'un ARN régulateur exprimé par le pathogène humain *Staphylococcus aureus* et impliqué dans l'internalisation des bactéries par les cellules humaines.**

Thèse présentée et soutenue à l'Université de Rennes 1, le 30 juin 2020

Unité de recherche : Inserm U1230 – ARN régulateurs Bactériens et Médecine (BRM)

Thèse N° :

## Rapporteurs avant soutenance :

Hélène Bierne

Directeur de recherche – Université Paris Saclay – MICALIS, INRAE

Anne Blanc-Potard

Directeur de recherche CNRS – Université de Montpellier - LPHI

## Composition du Jury :

Président : Reynald Gillet

Professeur – Université de Rennes - IGDR

Examineurs : Lalaouna David

Chercheur – Université de Strasbourg

Dir. de thèse : Brice Felden

Professeur – Université de Rennes 1 - U1230 - BRM

Co-dir. de thèse : Hélène Le Pabic

MCU – Université de Rennes 1 - U1230 - BRM

# REMERCIEMENTS

La thèse est un long fleuve **tranquille**, semé d'embûches marquant à la fois l'aboutissement d'un travail de longue haleine ainsi que le commencement d'une nouvelle aventure. J'ai eu le plaisir durant ces quatre années de côtoyer de nombreuses personnes que je tiens à remercier ici.

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse, **Hélène Bierne**, **Anne-Béatrice Blanc-Potard**, **David Lalaouna** et **Reynald Gillet** d'avoir accepté de juger ce travail de thèse. Je remercie également la **Fondation pour la Recherche Médicale** ainsi que la **Faculté des Sciences Pharmaceutique et Biologiques de l'Université de Rennes 1** pour m'avoir financé au cours de ces dernières années.

Un grand merci à **Brice Felden** pour m'avoir donné l'opportunité de travailler au sein de son laboratoire de recherche et m'avoir fait découvrir le monde des ARNs régulateurs. De plus, j'ai pu étudier, durant ces nombreuses années, ce remarquable pathogène qu'est le Staphylocoque doré et essayer d'apporter, à mon niveau, une des pierres menant à son éradication.

Je tiens maintenant à remercier du fond du cœur **Hélène Le Pabic** pour m'avoir tout d'abord permis de participer à son projet de recherche et cela dès le Master 1. Depuis ce jour, ce cher SprC n'a cessé de jalonné mon quotidien. Je tiens à te témoigner toute ma reconnaissance pour ta confiance sans faille, ta disponibilité et ton encadrement au cours de cette thèse.

Outre le travail accompli, une véritable thèse ne peut se faire sans de « Super Collègues » et je ne pouvais passer à côté des doctorants avec qui j'ai eu plaisir à partager mon bureau. Grâce à vous, cela a toujours été un plaisir de venir travailler à vos côtés dans la bonne humeur et l'entraîne qui nous a toujours caractérisé. Ces sorties mensuelles à l'extérieur du labo me manqueront beaucoup quand elles seront définitivement finies. Tout d'abord un grand merci à **Julie Bronsard**, la Super Collègue par excellence, qui malgré sa petite taille, sera toujours grande dans mon estime et pourra toujours compter sur mon amitié. Tu auras été là du début à la « fin » et cette thèse n'aurait sûrement pas eu la même saveur sans toi. Un grand merci également à **Camille Riffaud**, dont le sérieux et l'organisation de travail m'aura toujours impressionné. Toi qui a toujours eu la capacité mystérieuse à mes yeux à garder ton bureau

parfaitement rangé, contrairement au mien. Ta gentillesse et ton attention me manque depuis ton départ pour ce grand état lointain qu'est le Nebraska. Enfin, un grand merci à **KimBoi Le Huyen**, notre « jaune », grâce à qui les expressions de la langue française n'auront jamais été la cause d'autant de fou rire. « Tu fous ma gueule » restera à jamais associé à ton image. Des stagiaires ont également croisé la route de ce bureau, pour des durées plus ou moins longue. Je tiens tout d'abord à remercier **Steven Crété**, qui malgré nous avoir lâchement abandonné, m'aura permis d'ajouter un peu de testostérone dans ce groupe de jeunes beaucoup trop féminin. Je tiens également à remercier **Julie « Bis » Legros** et **David Luque Paz** qui auront eu le malheur d'être en stage pendant le contexte particulier de cette épidémie au COVID-19.

Je tiens également à remercier énormément **Astrid Rouillon** et **Yoann Augagneur**, qui m'ont accepté au sein de la team « **Golden Staph** » et avec qui j'ai toujours pris plaisir à aller courir chaque semaine. Cela va me manquer et j'espère pouvoir trouver de futurs collègues avec qui perpétuer cette habitude. Yoann, tu vas enfin pouvoir récupérer la place de numéro 1 qui t'aura échappé pendant ces longues années. Je te remercie également au passage pour tout ce que tu auras fait pour moi pendant cette thèse (analyse bio-infos, corrections de l'anglais et soutien dans les moments difficiles). Astrid, j'ai appris à te connaître en dehors de la relation enseignant-étudiant et à respecter ton professionnalisme et ta gentillesse. Je me rappellerai toujours de ma première pause café ainsi que des nombreux mots fléchés réalisés en ta compagnie.

Un merci tout particulier à Marc Hallier, grâce à qui ce projet de thèse a pu voir le jour. Merci pour la réalisation du MAPS, du RNAseq ainsi que de tous les conseils que tu m'as prodigué au cours de ces années. J'admire tes connaissances qui m'ont longtemps paru infinies et espère arriver un jour à un tel niveau d'expertise scientifique. Merci également pour ton apport incessant au fonctionnement du laboratoire.

Je tiens aussi à remercier Nathalie Ramage pour son apport incommensurable à la laverie et dont le travail ingrat n'est apprécié à sa juste valeur que lorsqu'elle n'est pas là pour le faire. Merci pour m'avoir fait sourire avec tes problèmes d'ordinateur/téléphone et d'être toujours là pour nous en cas de besoin. Dans le même registre, je tiens à dire un grand merci à Noëlla Amiot pour tout ce que tu fais pour le laboratoire et sans qui il ne serait pas une machine aussi bien rodée. Les pauses café avec toi vont me manquer ainsi que ta gentillesse et ta bonne humeur.

Je remercie également tous les membres du laboratoire actuels et passés pour leur accueil chaleureux et avec qui j'ai partagé plus ou moins de choses durant ces années. Merci à Lorraine Adam, Valérie Bordeau, Régine Brielle, Vincent Cattoir, Svetlana Chabelskaya, Loren Desjoies, Pierre-Yves Donnio, Cintia Gonzales, Killian Le Neindre, Annick Lefèvre, Guillaume Ménard, Charlotte Oriol, Gaëtan Pascreau, Marie-Laure Pinel-Marie, Sophie Reissier, Aude Réveillard, Matthieu Revest, Mohammed Sassi et Nadège Thuya en espérant n'avoir oublié personne.

Avant de finir, je tiens à remercier tous mes amis, extérieurs au laboratoire, récents ou de longues dates qui seraient bien trop nombreux à remercier mais pour qui j'ai une pensée. Vous avez tous, à votre façon contribué à la réussite de cette thèse et au plaisir que j'ai pris pendant ces longues années d'étude et dont la thèse marque la fin. Je suis sûr que je vous aurais à mes côtés pendant un nombre d'année encore plus grand.

Un merci tout particulier à ma famille et notamment à mes parents pour leur soutien sans limite et pour les sacrifices qu'ils ont fait pour me permettre de réaliser de longues études et sans qui rien n'aurait été possible.

Enfin, mes dernières pensées, mais non des moindres, vont à toi **ANAIS**. De simples mots couchés sur le papier n'auront jamais assez de poids pour exprimer tous mes sentiments et toute ma gratitude envers toi. Merci pour ton soutien indéfectible durant ces dernières années ainsi que tous ces bons petits plats mitonnés avec amour durant cette longue période de rédaction.



# TABLE DES MATIÈRES

<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>1</b>
<b>LISTES DES FIGURES .....</b>	<b>7</b>
<b>LISTES DES TABLEAUX.....</b>	<b>11</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>12</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>16</b>
<b>I] <i>Staphylococcus aureus</i> .....</b>	<b>17</b>
A/ Découverte et Classification.....	17
B/ Caractéristiques d'espèce .....	18
1- Caractéristiques morphologiques et métaboliques .....	18
2- Génome .....	19
a) Core génome.....	20
b) Génome accessoire .....	20
c) Acquisition du génome accessoire .....	21
d) Éléments génétiques mobiles de la souche Newman .....	25
1- <i>S. aureus</i> : un commensal doublé d'un pathogène redoutable .....	27
a) Habitats.....	27
b) Une diversité d'infections.....	28
c) Un important pathogène nosocomial.....	31
<b>II] <i>S. aureus</i> et antibiotique : traitements et adaptation .....</b>	<b>33</b>
A/ Définition générale et historique de leurs découvertes .....	33
B/ Résistances aux antibiotiques.....	37
1- Définitions.....	37
a) Résistances naturelles .....	38
b) Résistances acquises .....	39
2- Mécanisme de résistance aux antibiotiques .....	39
3- Causes et conséquences de l'émergence de résistances .....	41
4- Épidémiologie et prévisions .....	43
C/ Adaptation aux traitements antibiotiques : le parfait exemple de <i>S. aureus</i> .....	45
1- Pénicilline et méticilline.....	45
2- Vancomycine.....	46
3- Fluoroquinolones.....	47
D/ Alternatives aux traitements antibiotiques .....	48

1-	La phagothérapie .....	48
2-	Peptides antimicrobiens.....	49
3-	Stratégies anti-virulentes .....	50
<b>III]</b>	<b>Facteurs de virulence de <i>S. aureus</i>.....</b>	<b>53</b>
A/	Facteurs impliqués dans l'adhésion et la colonisation .....	53
1-	Protéines ancrées à la paroi cellulaire (CWA) .....	53
a)	Les molécules de matrice adhésive reconnaissant les composants de surface microbienne (MSCRAMMs).....	54
b)	La famille des protéines au motif NEAT.....	56
c)	La protéine A staphylococcique (SpA) .....	57
d)	Les protéines ayant un motif répété de cinq résidus Glycine (G5-E).....	57
2-	Molécules adhésives ayant un répertoire de sécrétion élargi (SERAM).....	59
a)	Coagulase et protéine de liaison au facteur de von Willebrand .....	59
b)	La protéine de liaison à la matrice extracellulaire (Emp).....	60
c)	La protéine de liaison au fibrinogène extracellulaire (Efb) .....	60
d)	La protéine d'adhérence extracellulaire (Eap).....	61
B/	Facteurs impliqués dans l'invasion et la dissémination .....	62
1-	Toxines .....	62
a)	Toxines formant des pores.....	63
b)	Toxines exfoliatrices.....	67
c)	Toxines superantigéniques (SAGs) .....	68
2-	Enzymes sécrétées.....	70
a)	La Staphylokinase.....	70
b)	La nucléase .....	71
c)	Les protéases.....	72
d)	Les hyaluronidases .....	75
e)	Les lipases.....	76
f)	L'enzyme de modification des acides gras (FAME) .....	77
C/	Facteurs impliqués dans l'internalisation .....	79
1-	Mécanisme impliquant les protéines liant la fibronectine (FnBPs) .....	80
2-	Mécanisme impliquant l'autolysine .....	82
3-	Autres facteurs impliqués dans l'internalisation bactérienne.....	83
<b>IV]</b>	<b>Phagocytose et échappement immunitaire de <i>S. aureus</i> .....</b>	<b>85</b>
A/	Les cellules phagocytaires.....	86

1-	Monocytes et macrophages .....	87
a)	Les monocytes .....	87
b)	Les macrophages .....	88
2-	Polynucléaires neutrophiles.....	90
a)	Recrutement et activation des neutrophiles .....	90
b)	Granules et dégranulations .....	93
c)	Pièges extracellulaires des neutrophiles .....	95
3-	Cellules dendritiques .....	97
B/	Mécanisme moléculaire de la phagocytose .....	98
1-	Reconnaissance des particules à phagocyter .....	99
a)	Les récepteurs de corps apoptotiques .....	99
b)	Les récepteurs de particules étrangères .....	100
2-	Internalisation des particules .....	102
a)	Signalisation des récepteurs Fcγ .....	102
b)	Signalisation des récepteurs du complément.....	103
c)	Signalisation des récepteurs de reconnaissance de formes.....	105
d)	Formation du phagosome .....	105
3-	Formation du phagolysosome .....	106
a)	Phagosome précoce .....	107
b)	Phagosome tardif .....	108
c)	Le phagolysosome et son arsenal d'effecteurs microbicides .....	109
4-	Le zinc comme stratégie antibactérienne .....	112
C/	Échappement immunitaire de <i>S. aureus</i> .....	113
1-	Évitement de l'opsonisation et de la phagocytose .....	113
a)	Inhibition du complément.....	113
b)	Inhibition de la reconnaissance par les IgG .....	114
c)	Échappement de la phagocytose .....	115
2-	Survie intracellulaire de <i>S. aureus</i> .....	116
a)	Petites colonies variantes (SCV) et persistance intracellulaire de <i>S. aureus</i> .....	116
b)	Résistance aux stratégies antimicrobiennes des phagocytes .....	118
3-	Échappement du phagolysosome et lyse des cellules .....	119
<b>V]</b>	<b>Régulation des facteurs de virulence .....</b>	<b>121</b>
A/	Les facteurs de transcription .....	121
1-	Les facteurs de transcriptions sigma .....	121

2-	Les facteurs de transcription de la famille Sar .....	123
B/	Les systèmes à deux composants (TCS) .....	126
1-	Le système Agr (régulateur de gène accessoire) .....	127
2-	Le système SaeRS .....	129
3-	Le système SrrAB .....	130
4-	Le système ArlRS .....	130
5-	Le système LytRS .....	131
6-	Le système WalkR .....	131
C/	Cas particulier des ARNs régulateurs : des régulateurs à multiples facettes .....	134
1-	Généralités .....	134
2-	Différents mécanismes d'actions des ARNs régulateurs .....	135
a)	ARNs régulateurs interagissant avec d'autres ARNs .....	135
b)	ARNs régulateurs interagissant avec des protéines .....	140
c)	Riboswitchs .....	142
3-	ARNs régulateurs de <i>S. aureus</i> .....	144
a)	L'ARNI .....	144
b)	L'ARNIII: un ARN à double fonction .....	145
c)	La famille des ARNs régulateurs Rsa .....	148
d)	La famille des ARNs régulateurs Spr .....	153
	<b>CONTEXTE DE LA THÈSE .....</b>	<b>159</b>
	<b>RESULTATS .....</b>	<b>162</b>
I]	<b>Recherche et études de cibles de l'ARN SprC .....</b>	<b>165</b>
A/	Recherche de cibles directes de SprC à l'aide de la technologie MAPS .....	165
1-	Cinétique d'expression de SprC .....	165
2-	Construction de l'appât et validation de son expression .....	166
3-	Cibles protéiques identifiées par MAPS .....	168
4-	Cibles ARN identifiées par MAPS .....	169
B/	Étude des interactions entre SprC et les différentes cibles sélectionnées .....	173
1-	Prédictions d'interaction entre SprC et ses cibles putatives .....	173
2-	Vérification <i>in vitro</i> des interactions prédites entre SprC et ses cibles putatives 176	
3-	Caractérisation de l'interaction putative entre SprC et <i>czrA</i> .....	180
4-	Vérification « <i>in vivo</i> » des interactions prédites entre SprC et ses cibles putatives .....	182

C/ Étude de la régulation de l'opéron <i>czrAB</i> par l'ARN SprC .....	185
1- Étude du niveau de transcrits <i>czrAB</i> .....	185
2- Étude de la stabilité du transcrit <i>czrAB</i> en fonction de l'expression de SprC ..	188
3- Étude de l'application d'un stress lié au zinc sur les bactéries .....	190
<b>II] Étude du lien entre SprC et les cibles validées dans un contexte d'interactions hôte-pathogène.....</b>	<b>197</b>
A/ Article 1: Selective recovery of RNAs from bacterial pathogens after their internalization by human host cells .....	199
1- Choix des billes d'extraction.....	199
2- Comparaison de l'efficacité des billes de zirconium par rapport aux billes de verre	199
a) Extractions d'ARNs à partir des échantillons témoins.....	200
b) Extractions d'ARNs à partir des bactéries internalisées.....	200
3- Contrôle de la qualité des ARNs extraits .....	201
a) Contrôle de la qualité de l'extraction des ARNs de <i>S. aureus</i> .....	201
b) Contrôle de la qualité de l'extraction des ARNs de <i>S. typhimurium</i> .....	201
4- Étude de l'expression des gènes eucaryotes et procaryotes dans les ARNs extraits .....	202
B/ Étude des cibles ARNm de SprC validées au cours de l'internalisation.....	216
C/ Étude de l'effet du milieu de culture des monocytes THP1 sur <i>S. aureus</i> .....	222
D/ Étude du milieu de culture des THP1-différenciés en macrophages sur <i>S. aureus</i>	224
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>227</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>242</b>
<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES .....</b>	<b>244</b>
<b>I] Matériels.....</b>	<b>244</b>
A/ Souches bactériennes, plasmides, conditions de croissances.....	244
1- Souches bactériennes utilisées.....	244
2- Purification d'ADN plasmidique et transformation .....	244
B/ Constructions réalisées au cours de cette étude.....	245
1- Constructions pour le MAPS.....	245
2- Constructions pour le système rapporteur à double plasmides .....	246
C/ Culture cellulaire .....	246
<b>II] Méthodes .....</b>	<b>247</b>
A/ Extraction des ARNs totaux .....	247

B/ Northern blot .....	247
1- Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et transfert sur membrane de nylon .....	247
2- Électrophorèse sur gel d'agarose en conditions dénaturantes et transfert sur membrane de nylon .....	248
C/ Identification des cibles d'un ARN régulateur par MAPS.....	249
1- Préparation de la résine d'amylose.....	249
2- Induction de l'expression de l'appât MS2-SprC et lyse des bactéries .....	250
3- Purification des lysats bactériens pour isoler les protéines et les ARNs par affinité avec l'appât .....	250
4- Identification des ARNm isolés par séquençage haut débit des ARNs.....	251
D/ RT-qPCR.....	252
E/ Retard sur gel : étude des interactions ARN-ARN <i>in vitro</i> .....	252
1- Transcription <i>in vitro</i> .....	252
2- Marquage des sondes .....	253
3- Réaction de fixation .....	253
F/ Système rapporteur à double plasmides : étude des interactions ARN-ARN « <i>in vivo</i> » .....	254
G/ Étude de la stabilité du transcrit <i>czrAB</i> .....	254
H/ Étude de la toxicité du zinc .....	254
1- Cinétique de croissance en microplaques.....	254
2- Effet du zinc sur les niveaux de transcrits <i>czrA</i> , <i>czrB</i> et SprC.....	255
3- Étude de l'effet de l'expression de SprC sur la résistance des bactéries à un stress lié au zinc.....	255
4- Étude de toxicité sur boîtes de petri .....	256
I/ Expériences d'internalisation .....	256
J/ Effet du milieu des monocytes et des macrophages THP1 sur <i>S. aureus</i> .....	257
K/ Analyse statistique des données .....	257
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>266</b>

## LISTES DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Sir Alexander Ogston.....	17
<b>Figure 2</b> : Observation de <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	18
<b>Figure 3</b> : Représentation du Pangénome de <i>S. aureus</i> . ....	19
<b>Figure 4</b> : Schéma représentant les différents mécanismes de transfert horizontal de gènes. .....	21
<b>Figure 5</b> : Représentation circulaire du chromosome de la souche Newman de <i>S. aureus</i> . ....	26
<b>Figure 6</b> : Principaux sites de portages de <i>S. aureus</i> chez l'Homme.....	27
<b>Figure 7</b> : Diversité des infections humaines à <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	28
<b>Figure 8</b> : Principaux mécanismes d'actions des antibiotiques.....	34
<b>Figure 9</b> : Sir Alexander Fleming, Ernst B. Chain et Sir Howard Florey lors de la remise de leur prix Nobel de Physiologie ou Médecine.....	35
<b>Figure 10</b> : Frise chronologique représentant l'Histoire des antibiotiques.....	36
<b>Figure 11</b> : Antibiogramme de la souche <i>S. aureus</i> . ....	38
<b>Figure 12</b> : Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques mis en place par les bactéries. ....	39
<b>Figure 13</b> : Principales causes de morts dans le monde actuellement.....	44
<b>Figure 14</b> : Représentation structurale des différentes protéines ancrées à la paroi cellulaire (CWA).....	58
<b>Figure 15</b> : Mécanisme d'action des toxines formant des pores. ....	63
<b>Figure 16</b> : Mécanisme d'action des SAGs. ....	69
<b>Figure 17</b> : Récapitulatif des nombreuses toxines et enzymes sécrétées par <i>S. aureus</i> . ....	78
<b>Figure 18</b> : Différents récepteurs et mécanismes impliqués dans l'internalisation de <i>S. aureus</i> dans des cellules phagocytaires non professionnelles. ....	80
<b>Figure 19</b> : Morphologie des différentes cellules phagocytaires professionnelles. ....	86
<b>Figure 20</b> : Recrutement des neutrophiles au niveau du site d'infection et mécanismes de mise à mort. ....	93
<b>Figure 21</b> : Différentes étapes de la phagocytose aboutissant à la destruction des bactéries. .	98
<b>Figure 22</b> : Transduction du signal lors de la phagocytose médié par les récepteurs FcγR. .	103
<b>Figure 23</b> : Transduction du signal lors de la phagocytose médié par les récepteurs du complément CR3. ....	104
<b>Figure 24</b> : Maturation des phagosomes et biogénèse des phagolysosomes. ....	108

<b>Figure 25</b> : Facteurs de virulence de <i>S. aureus</i> impliqués dans l'inhibition de l'opsonisation et dans l'échappement à la phagocytose. ....	116
<b>Figure 26</b> : Photographie illustrant la différence de taille entre une colonie classique de <i>S. aureus</i> et de SCV. ....	117
<b>Figure 27</b> : Facteurs de virulence exprimés par <i>S. aureus</i> pour combattre les stratégies de mise à mort des cellules phagocytaire. ....	120
<b>Figure 28</b> : Inter-régulation des facteurs de transcription de la famille Sar. ....	123
<b>Figure 29</b> : Organisation génétique et expression du système de quorum sensing Agr. ....	128
<b>Figure 30</b> : Mécanismes d'action des ARNs régulateurs exerçant une action directe sur leurs cibles ARNm. ....	136
<b>Figure 31</b> : ARN régulateur agissant en <i>cis</i> . ....	136
<b>Figure 32</b> : Organisation génétique et mécanisme d'action d'un système toxine-antitoxine de type I. ....	138
<b>Figure 33</b> : Représentation du locus et du mécanisme d'action d'un excludon. ....	139
<b>Figure 34</b> : ARN régulateur agissant en <i>trans</i> . ....	139
<b>Figure 35</b> : Mécanismes de régulation de l'expression des gènes par les riboswitchs. ....	143
<b>Figure 36</b> : Représentation schématique de la structure de l'ARN III. ....	145
<b>Figure 37</b> : Réseau de régulations impliquant les facteurs de virulence autour de l'ARN III chez <i>S. aureus</i> . ....	147
<b>Figure 38</b> : Localisation génétiques des Spr présents au sein de différents îlots de pathogénie. ....	154
<b>Figure 39</b> : Profil d'expression de l'ARNrég SprC en fonction de la croissance bactérienne. ....	165
<b>Figure 40</b> : Quantification de l'expression de l'ARNrég SprC au cours de la croissance bactérienne. ....	166
<b>Figure 41</b> : Contrôle de l'induction et de l'accrochage du construit MS2_SprC sur la résine d'amylose. ....	167
<b>Figure 42</b> : Analyse par gel SDS-PAGE des protéines purifiées par MAPS après 2H30 de croissance bactérienne. ....	168
<b>Figure 43</b> : Prédictions d'interactions <i>in silico</i> entre SprC et les trois premières cibles choisies. ....	174
<b>Figure 44</b> : Prédictions d'interactions <i>in silico</i> entre SprC et les deux transcrits du système Agr. ....	175
<b>Figure 45</b> : Retard sur gel ne montrant pas de complexe entre SprC et ses cibles putatives. ....	176

<b>Figure 46</b> : Retard sur gel démontrant la formation d'un complexe entre SprC et ses cibles putatives. ....	177
<b>Figure 47</b> : Retard sur gel utilisant une forme longue des transcrits cibles. ....	178
<b>Figure 48</b> : Retard sur gel utilisant un mutant de délétion de SprC pour la zone d'interaction prédite <i>deoD</i> et <i>agrB</i> . ....	179
<b>Figure 49</b> : Retard sur gel utilisant des mutants de délétion de SprC et de <i>czrB</i> pour leurs zones d'interaction prédite respectivement. ....	180
<b>Figure 50</b> : Caractérisation de l'interaction putative entre SprC et <i>czrA</i> . ....	181
<b>Figure 51</b> : Schéma représentant le principe du système rapporteur à double plasmides. ....	182
<b>Figure 52</b> : Vérification des interactions SprC- <i>agrC</i> et SprC- <i>czrA</i> avec le système rapporteurs à double plasmides. ....	183
<b>Figure 53</b> : Confirmation des interactions SprC-cibles démontrées <i>in vitro</i> en utilisant un système rapporteur à double plasmides. ....	184
<b>Figure 54</b> : Profil du niveau de transcrits de l'opéron <i>czrAB</i> au cours de la croissance bactérienne de la souche Newman sauvage. ....	186
<b>Figure 55</b> : Profil du niveau de transcrits de l'opéron <i>czrAB</i> au cours de la croissance bactérienne de la souche Newman délétée pour <i>sprC</i> . ....	187
<b>Figure 56</b> : Comparaison du niveau de transcrits de l'opéron <i>czrAB</i> au cours de la croissance bactérienne dans les souches Newman sauvage et <i>ΔsprC</i> . ....	188
<b>Figure 57</b> : Étude de la stabilité du transcrit <i>czrAB</i> en fonction de l'expression de SprC. ...	189
<b>Figure 58</b> : Cinétique de croissance en présence d'un stress zinc. ....	190
<b>Figure 59</b> : Effet du zinc sur les niveaux relatifs de transcrits <i>czrA</i> , <i>czrB</i> et SprC. ....	191
<b>Figure 60</b> : Cinétique de croissance en présence d'un stress zinc (6mM de ZnSO <sub>4</sub> ). ....	192
<b>Figure 61</b> : Cinétique de croissance après induction d'un stress zinc. ....	193
<b>Figure 62</b> : Expériences de toxicité sur boîtes. ....	194
<b>Figure 63</b> : Schéma récapitulatif des régulations de SprC sur ses cibles. ....	196
<b>Figure 64</b> : Protocole utilisé lors de l'étude du niveau de transcrits des gènes cibles lors de l'internalisation. ....	216
<b>Figure 65</b> : Vérification de l'inoculum et de l'efficacité du traitement à la gentamycine. ....	217
<b>Figure 66</b> : Étude de l'expression de SprC lors de l'internalisation. ....	218
<b>Figure 67</b> : Étude du niveau de transcrits de l'opéron <i>czrAB</i> lors de l'internalisation. ....	219
<b>Figure 68</b> : Étude du niveau de transcrits <i>agrB</i> et <i>agrC</i> lors de l'internalisation. ....	220
<b>Figure 69</b> : Étude du niveau de transcrits <i>deoD</i> lors de l'internalisation. ....	220

<b>Figure 70</b> : Étude du niveau de transcrits de <i>czrB</i> et <i>agrB</i> lors de l'internalisation en fonction de l'expression de SprC.....	221
<b>Figure 71</b> : Cinétique de croissance comparant le milieu RPMI et le milieu de culture des THP1. ....	222
<b>Figure 72</b> : Étude de l'effet du milieu des THP1 sur le niveau de transcrits de SprC, <i>agrB</i> et <i>agrC</i> .....	223
<b>Figure 73</b> : Cinétique de croissance comparant le milieu RPMI et le milieu de culture des THP1. ....	224
<b>Figure 74</b> : Étude de l'effet du milieu des macrophages THP1 sur le niveau de transcrits de SprC, <i>czrB</i> , <i>agrB</i> et <i>deoD</i> .....	225
<b>Figure 75</b> : Localisation de la protéine S2 au sein du ribosome. ....	229

## LISTES DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Récapitulatifs des différents systèmes à deux composants impliqué dans la virulence de <i>S. aureus</i> . .....	132
<b>Tableau 2</b> : Récapitulatif des différents ARNs Rsa découverts. ....	149
<b>Tableau 3</b> : Liste des protéines identifiées par Spectrométrie de masse dans la bande protéique d'intérêt de poids apparent de 30kDa.....	169
<b>Tableau 4</b> : Liste des cibles ARNm putatives enrichies lors de l'expression de l'appât MS2_SprC.....	169
<b>Tableau 5</b> : Pourcentage de l'inoculum restant après un traitement à la gentamycine à 100mg/mL. ....	217
<b>Tableau 6</b> : Liste des souches utilisées au cours de cette étude. ....	258
<b>Tableau 7</b> : Liste des constructions utilisées au cours de cette étude. ....	260
<b>Tableau 8</b> : Liste des constructions utilisées au cours de cette étude. ....	261

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>μmax</b>	Vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle	<b>CD</b>	Marqueur de Différenciation
<b>2D-DIGE</b>	Électrophorèse Bidimensionnelle quantitative	<b>CIP</b>	Phosphatase alcaline de l'intestin de veau
<b>5'UTR</b>	Séquence 5' non traduite	<b>CifA/B</b>	Facteur d'aggrégation A/B
<b>Å</b>	Ångström	<b>CMB</b>	Croissance Minimale Bactéricide
<b>Aap</b>	Protéine associée à l'Accumulation	<b>CMH</b>	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
<b>ACAMP</b>	Motif moléculaire associé aux Cellules Apoptotiques	<b>CMI</b>	Croissance Minimale Inhibitrice
<b>ADN</b>	Acide DésoxyriboNucléique	<b>CNA</b>	Protéine liant le collagène
<b>ADNc</b>	ADN complémentaire	<b>CO<sub>2</sub></b>	Dioxyde de Carbone
<b>ADNe</b>	ADN extracellulaire	<b>Coa</b>	Coagulase
<b>Agr</b>	Régulateur de gène accessoire	<b>CPA</b>	Cellule Présentatrice d'Antigènes
<b>AIP</b>	Peptide Auto-Inducteur	<b>CR</b>	Récepteur du Complément
<b>AMP</b>	Peptide AntiMicrobiens	<b>Ct</b>	Seuil de Cycle (Cycle threshold)
<b>APS</b>	PerSulfate d'Ammonium	<b>C-terminal</b>	Carboxyl-terminal
<b>Arl</b>	Locus régulant l'Autolyse	<b>CWA</b>	Protéines ancrées à la paroi cellulaire
<b>ARN</b>	Acide RiboNucléique	<b>DAG</b>	DiAcylGlycéride
<b>ARNdb</b>	ARN double brin	<b>DC</b>	Cellule Dendritique
<b>ARNm</b>	ARN messenger	<b>DLL</b>	Dock, Lock et Latch
<b>ARNp</b>	Transcrit de l'ARN 6S	<b>DNase</b>	DésoxyriboNucléase
<b>ARNr</b>	ARN ribosomal	<b>DO<sub>600nm</sub></b>	Densité Optique à 600nm
<b>ARNrég</b>	ARN régulateur	<b>Domaine AM</b>	Domaine Amidase
<b>ARNt</b>	ARN de transfert	<b>Domaine GL</b>	Domaine Glucosamidinase
<b>Arp2/3</b>	Complexe protéique 2/3 lié à l'Actine	<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>Atl</b>	Autolysine	<b>Eap</b>	Protéine d'adhérence Extracellulaire
<b>ATP</b>	Adénosine TriPhosphate	<b>EDTA</b>	Acide Éthylène-Diamine-Tétra-acétique
<b>ATPase</b>	Hydrolases des ATP	<b>Efb</b>	Protéine de liaison au Fibrinogène
<b>Aur</b>	Auréolysine	<b>EGM</b>	Éléments Génétiques Mobiles
<b>BEC</b>	Bactérie ExtraCellulaire	<b>EGTA</b>	Acide EGTazique
<b>BHI</b>	Bouillon cœur-cervelle	<b>Emp</b>	Protéine de liaison à la matrice Extracellulaire
<b>BMR</b>	Bactérie Multi-résistante aux antibiotiques		
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcium		
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Chlorure de Calcium		

*Abréviations en anglais traduites en français*

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>ESKAPE</b>	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Enterobacter spp.</i>	<b>KCl</b>	Chlorure de Potassium
<b>ET</b>	Toxine Épidermoïtique	<b>Kd</b>	Constante de dissociation
<b>Fak</b>	Kinase d'adhésion Focale	<b>kDa</b>	kiloDalton
<b>FAME</b>	Enzyme de Modification des Acides Gras	<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	DiHydrogéoPhosphate de Potassium
<b>Fc</b>	Fraction constante	<b>Kpb</b>	kilo paire de bases
<b>FcγR</b>	Récepteur de Fcγ	<b>LAMP</b>	Protéine Membranaire Associée aux lysosomes
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration	<b>lasARN</b>	Long ARN antisens
<b>Fe</b>	Fer	<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>Fn</b>	Fibronectine	<b>LPS</b>	LipoPolySaccharide
<b>FnBP</b>	Protéine liant la Fibronectine	<b>M. tuberculosis</b>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>FPR2</b>	Récepteur 2 du Formyl-Peptide	<b>MAPK</b>	Protéine Kinase Activée par le Mitogène
<b>FT</b>	Facteur de Transcription	<b>MAPS</b>	Purification par affinité avec MS2 couplée au séquençage ARN
<b>G</b>	Temps de génération	<b>MBP</b>	Protéine liant le Maltose
<b>GFP</b>	Protéine Fluorescente Verte	<b>mDIA1</b>	Formine 1 diaphane apparentée aux mammifères
<b>GTP</b>	Guanosine TriPhosphate	<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Chlorure de Magnésium
<b>GTPase</b>	Hydrolases des GTP	<b>MnCl<sub>2</sub></b>	Chlorure de Manganèse
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxyde d'hydrogène	<b>MOI</b>	Multiplicité d'Infection
<b>HA</b>	Acide Hyaluronique	<b>MOPS</b>	Acide 3-MOrpholino-1-Propane Sulfonique
<b>HCl</b>	Chlorure d'Hydrogène	<b>Motif NEAT</b>	Motif proche des transporteurs de fer
<b>HEPES</b>	Acide 4-(2-HydroxyÉthyl)-1- Pipérazine Éthane Sulfonique	<b>MSCRAMM</b>	Molécule de Matrice Adhésive Reconnaissant les Composants de la Surface Microbienne
<b>HK</b>	Histidine Kinase	<b>MT</b>	Métallothionéine
<b>HIA</b>	Hémolysine-α ou toxine α	<b>NaCl</b>	Chlorure de sodium
<b>HIB</b>	Hémolysine-β ou toxine β	<b>NADPH</b>	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (forme oxydée)
<b>ICAM</b>	Molécule d'Adhésion InterCellulaire	<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	DiHydrogéoPhosphate de Sodium
<b>IFN-γ</b>	Interféron γ	<b>NET</b>	Piège Extracellulaire des Neutrophiles
<b>Ig</b>	Immunoglobuline	<b>NFκB</b>	Facteur Nucléaire κB
<b>IL</b>	InterLeukine	<b>NO</b>	Monoxyde d'Azote ou Oxyde Nitrique
<b>iNOS</b>	NOS inductible	<b>NO·</b>	Oxyde nitreux
<b>Isd</b>	Protéine de surface régulée par le fer		
<b>ITAM</b>	Motif d'Activation à base de Tyrosine des Immuno-récepteur		
<b>K<sup>+</sup></b>	Potassium		

*Abréviations en anglais traduites en français*

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>NOS</b>	NO Synthase	<b>PS</b>	PhosphatidylSérine
<b>NOX</b>	NADPH oxydase	<b>PSGL-1</b>	Ligand Glycoprotéique de la Sélectine P
<b>NRAMP1</b>	Protéine 1 Macrophagique Associée à la Résistance Naturelle	<b>PSM</b>	Moduline Soluble dans le phénol
<b>N-terminal</b>	Amino-terminal	<b>qPCR</b>	PCR quantitative
<b>NTP</b>	Nucléotides TriPhosphate	<b>QS</b>	Quorum Sensing
<b>Nuc</b>	Nucléase	<b>RBS</b>	Site de fixation du Ribosome
<b>OH<sup>·</sup></b>	Radical hydroxyle	<b>RIN</b>	Indice d'Intégrité de l'ARN
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé	<b>RNase</b>	RiboNucléase
<b>ONOO<sup>·</sup></b>	Peroxynitrite	<b>RNS</b>	Espèces Réactives de l'Azote
<b>ORF</b>	Cadre ouvert de lecture	<b>ROS</b>	Espèces Réactives de l'Oxygène
<b><i>P. aeruginosa</i></b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<b>Rpm</b>	Rotation par minutes
<b>PAC</b>	Peptides Antimicrobiens Cationiques	<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>PAI</b>	Îlot de Pathogénie	<b>RR</b>	Régulateur de Réponse
<b>PAMP</b>	Motif moléculaire associé aux pathogènes	<b>Rsa</b>	ARN de <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>PBS</b>	Tampon Phosphate Salin	<b>RT-qPCR</b>	Reverse transcriptase qPCR
<b>PCR</b>	Réaction de Polymérisation en Chaîne	<b><i>S. aureus</i></b>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b>Pdb</b>	Paire de bases	<b><i>S. typhimurium</i></b>	<i>Salmonella enterica</i> serovar typhimurium
<b>PFT</b>	Toxine Formant des Pores	<b>Sae</b>	Expression des exo-protéines de <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>pH</b>	Potentiel Hydrogène	<b>SAGs</b>	Toxines SuperAntigéniques
<b>PIPES</b>	Acide PIPérazine-N,N'-bis(2-EthaneSulfonique)	<b>Sak</b>	Staphylokinase
<b>PLP</b>	Protéine liant les Pénicillines	<b>SAL</b>	Lipase de <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>PMA</b>	Phorbol 12-Myristate 13-Acétate	<b>SaPI</b>	Îlot de Pathogénie de <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>PolyU</b>	PolyUridine	<b>Sar</b>	Régulateur accessoire Staphylococcique
<b>Pompe SRD</b>	Résistance multiple aux médicaments	<b>SARM</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> Résistant à la méticilline
<b>Pompe SRD</b>	Résistance spécifique aux médicaments	<b>SasG</b>	Protéine de surface G
<b>Protéine Hsc</b>	Protéine apparentée aux protéines de choc thermique	<b>Sbi</b>	Protéine de liaison aux Immunoglobulines
<b>Protéine Hsp</b>	Protéine de choc thermique	<b>SCC</b>	Cassette Chromosomique Staphylococcique
<b>PRR</b>	Récepteur de Reconnaissance de Forme	<b>SCIN</b>	Inhibiteur du Complément Staphylococcique
		<b>SepA</b>	Staphopaine A

*Abréviations en anglais traduites en français*

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>SCV</b>	Petites Colonies Variantes	<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Facteur de Nécrose Tumorale $\alpha$
<b>SD</b>	Shine-Dalgarno	<b>TSB</b>	Bouillon Tryptone Caséine Soja
<b>SDS</b>	Sodium Dodécyl Sulfate	<b>TSST-1</b>	Toxine 1 du syndrome de choc toxique
<b>SDS-PAGE</b>	Électrophorèse sur Gel de PolyAcrylamide	<b>UFC</b>	Unité Formant Colonie
<b>SE</b>	Entérotoxine Staphylococcique	<b>V-ATPase</b>	ATPase vésiculaire de pompage des protons
<b>SE-I</b>	Entérotoxine Staphylococcique- <i>like</i>	<b>VISA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> à résistance Intermédiaire à la Vancomycine
<b>SERAM</b>	Molécule Adhésive ayant un Spectre de Sécrétion Élargi	<b>VRE</b>	Entérocoque Résistant à la Vancomycine
<b>SI</b>	Séquence d'Insertion	<b>VRSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> Résistant à la Vancomycine
<b>SOB</b>	Bouillon Super Optimal	<b>vWbp</b>	Protéine de liaison au facteur de von Willebrand
<b>Spa</b>	Protéine A Staphylococcique	<b>WASP</b>	Protéines du Syndrome de Wiskott-Aldrich
<b>SpI</b>	Sérine protéase- <i>like</i>	<b>ZnSO<sub>4</sub></b>	Sulfate de zinc
<b>Spr</b>	ARNs des petits îlots de pathogénie		
<b>SRD</b>	Base de Données des ARNs régulateurs de Staphylococcus		
<b>Srr</b> Staphylococcique	Régulateur respiratoire		
<b>SSC</b>	Citrate de Sodium Salin		
<b>SspB</b>	Staphopaine B		
<b>SSSS</b>	Syndrome d'exfoliation généralisée ou Syndrome de la peau échaudée par les Staphylocoques		
<b>STT</b>	Syndrome de choc Toxique Staphylococcique		
<b>SVF</b>	Sang de Veau Foetal		
<b>Système TA</b>	Système Toxine-Antitoxine		
<b>T4PNK</b>	PolyNucléotides Kinase T4		
<b>TBE</b>	Tris Borate EDTA		
<b>TCA</b>	Acide TriChloroAcétique		
<b>TCS</b>	Système à deux composants		
<b>TEMED</b>	TÉtraMéthylÉthylèneDiamine		
<b>TGF<math>\beta</math></b>	Facteur de croissance tumorale $\beta$		
<b>TIA</b>	Toxi-Infection Alimentaire		
<b>TLR</b>	Récepteur Toll-Like		
<b>Tn</b>	Transposon		
<b>TNFR1</b>	Récepteur 1 du TNF $\alpha$		

*Abréviations en anglais traduites en français*

# INTRODUCTION

# INTRODUCTION

## I] *Staphylococcus aureus*

### A/ Découverte et Classification

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) est l'un des premiers agents pathogènes bactériens à avoir été décrit à la fin du XIX<sup>e</sup> siècle. Tout d'abord, en 1878, Robert Koch fut le premier à l'observer grâce à l'étude de pus de furoncles au microscope lui révélant des « amas de grains », suivie par Louis Pasteur deux ans plus tard (Le Loir Y., *et al.*, 2010). Cependant, c'est à Sir Alexander Ogston (Figure 1) que l'on doit l'isolement de la bactérie après l'analyse microscopique d'une centaine de prélèvements de pus provenant d'abcès humains (Ogston A., 1882 ; Krakauer T., *et al.*, 2016). Il réussit à reproduire l'infection chez l'animal et, devant l'observation de microcoques s'agrégeant en amas comme des œufs de poissons, leur donna le nom de *Staphylococcus* (Newson S.W.B., 2008). Ce nom fut ensuite accepté par Anton Rosenbach, qui fut le premier à cultiver le staphylocoque *in vitro* sur milieu solide lui permettant d'en différencier deux types en fonction de leur pigmentation. Jaune pour le premier appelé *Staphylococcus pyogenes aureus* (du latin aurum pour or) et blanche pour le deuxième appelé *Staphylococcus pyogenes albus* (du latin albus pour blanc) maintenant appelé *Staphylococcus epidermidis* (Newson S.W.B., 2008). D'un point de vue taxonomique, cette bactérie appartient au règne des Procaryotes, au Phylum des Firmicutes, à la classe des Bacilli et à l'ordre des Bacillales. Dans la famille des Staphylococaceae qu'elle partage avec quatre genres moins connus (*Gemella*, *Jeotgalicoccus*, *Macrocooccus* et *Salinicoccus*) elle représente le genre le plus important (Le Loir Y., *et al.*, 2010). Actuellement, le genre *Staphylococcus* regroupe une cinquantaine d'espèces identifiées principalement chez l'animal (18 chez l'Homme), dont les 4 principales chez l'Homme sont *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus intermedius* et *Staphylococcus hyicus*.

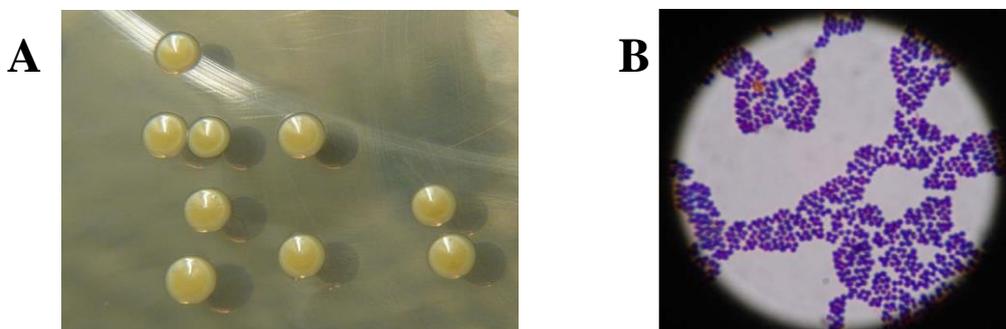


**Figure 1 : Sir Alexander Ogston (BMJ, 1929).**

## B/ Caractéristiques d'espèce

### 1- Caractéristiques morphologiques et métaboliques

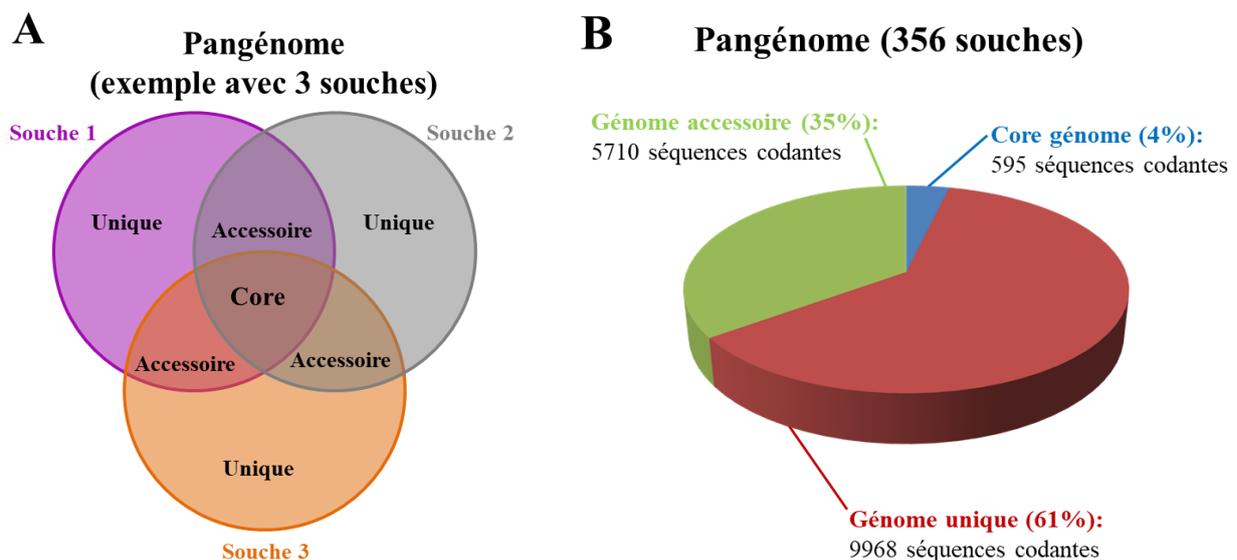
Les staphylocoques sont des bactéries à Gram positif, c'est-à-dire qu'ils possèdent une paroi cellulaire composée de plusieurs couches de peptidoglycanes empilées sur la membrane plasmique, représentant chez cette souche 50% en poids des constituants de cette paroi (Li Z., *et al.*, 2015). A l'échelle macroscopique, les colonies apparaissent lisses, rondes, opaques et d'un diamètre de 1-3mm. Leur couleur dorée caractéristique (Figure 2-A) est due à la synthèse d'un pigment caroténoïde, la staphyloxanthine. Ce pigment possède des propriétés oxydantes conférant un avantage à la bactérie dans la lutte contre les espèces réactives de l'oxygène produites par l'hôte (Liu G.Y., *et al.*, 2009). A l'échelle microscopique on observe une morphologie caractéristique en forme de cocci d'environ 0,8-1µm de diamètre, regroupé en amas qualifiés de « grappe de raisins » (Figure 2-B) comme l'indique leur nom (« staphyle » signifie grappe de raisin en Grec et « coccus » signifie grain ou baie) (Le Loir Y., *et al.*, 2010). Les staphylocoques sont des bactéries aérobies-anaérobies facultatives, immobiles, non sporulées, positives à la catalase, négatives à l'oxydase et fermentant le glucose sans gaz. Ce sont des bactéries mésophiles (croissance optimale à 37°C), neutrophiles (pH 7 optimal) et halophiles (se développent à de fortes concentrations en NaCl). Ce dernier caractère étant mis à profit en bactériologie alimentaire pour l'isoler grâce à des milieux sélectifs (milieu de Chapman) (Le Loir Y., *et al.*, 2010). De plus, cette bactérie possède la capacité de croître dans des conditions hostiles avec des températures de 7 à 48°C ou un pH compris entre 4 et 10 (Valero A., *et al.*, 2009). *S. aureus* se distingue des autres membres du genre par sa capacité à produire une coagulase ce qui permet notamment son identification vis-à-vis des souches potentiellement non pathogènes. En effet cette coagulase lui permet de lutter contre les anticorps opsonisants et la phagocytose (Le Loir Y., *et al.*, 2010).



**Figure 2 : Observation de *Staphylococcus aureus*.** (A) Isolement de colonies dorées de *S. aureus* sur gélose BHI (Bouillon cœur-cervelle). (B) Observation d'une coloration de Gram au microscope (Joshi L.R. *et al.*, 2014).

## 2- Génome

L'étude du génome de *S. aureus* est la première étape dans la compréhension de sa pathogénie et c'est en partant de ce postulat que Kuroda M. et ses collaborateurs séquencèrent pour la première fois le génome complet de deux souches de *S. aureus* : N315 et Mu50 (Kuroda M., *et al.*, 2001). Par la suite le séquençage de nombreuses autres souches y compris celle utilisée pour ce travail de thèse, à savoir la souche Newman (Baba T., *et al.*, 2008), fut réalisé. Actuellement, on recense 465 génomes complets et annotés (NCBI 1) pour une taille d'environ 2.8 millions de paires de bases, comprenant environ 2700 séquences codant pour des protéines et un pourcentage GC de 32.7% (NCBI 2). D'un point de vue définition, l'analyse comparative de plusieurs génomes a permis de montrer une diversité dans la présence de gènes qui peuvent être divisés en 3 catégories (Figure 3): (i) le core génome regroupant un ensemble de gènes fortement conservés et virtuellement partagés par toutes les souches de l'espèce, (ii) le génome accessoire regroupant un ensemble de gènes présents chez certaines souches et (iii) le génome unique regroupant des gènes présents uniquement chez un membre de l'espèce (Bosi E., *et al.*, 2016).



**Figure 3 : Représentation du Pangénome de *S. aureus*.** (A) Exemple de génomique comparative avec 3 souches différentes. (B) Génomique comparative de 356 souches séquencées représentant un pangénome de 16273 gènes totaux, un core génome de 595 séquences codantes (4% du pangénome), un génome accessoire de 5710 séquences (35% du pangénome) et un génome unique de 9968 séquences codantes (61% du pangénome) (Sassi M., données non publiées).

**a) Core génome**

Le génome d'une souche de *S. aureus* comprend en moyenne 2800 gènes dont environ 20% font partie du core génome. Cependant, au regard de l'ensemble de l'espèce *S. aureus*, ce chiffre tombe à seulement 4% du pangénome. Le core génome est composé principalement de gènes de ménage, essentiels à la bactérie ce qui explique que ceux-ci soient retrouvés dans toutes les souches d'une espèce. Ces gènes incluent notamment les fonctions impliquées dans le métabolisme et la synthèse des acides nucléiques (Malachowa N., *et al.*, 2010 ; Bosi E., *et al.*, 2016).

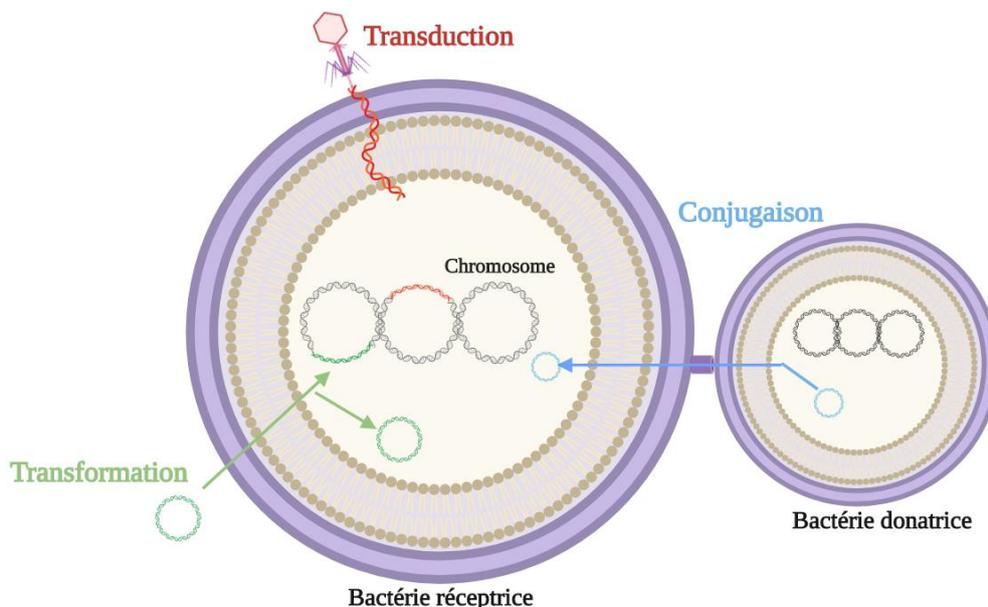
**b) Génome accessoire**

Le génome accessoire quant à lui représente la diversité à l'intérieur d'une espèce bactérienne en codant les protéines requises pour l'adaptation de la bactérie aux différentes niches écologiques (résistance, facteurs de virulence, adaptation à l'hôte, toxines). Ces gènes sont associés aux éléments génétiques mobiles (EGM), représentant 70 à 80% du génome d'une souche donnée de *S. aureus* mais seulement 35% si l'on prend en compte l'ensemble des souches de l'espèce. Ils sont acquis par transfert horizontal (Bosi E., *et al.*, 2016) et ont été décrits pour la première fois dans les années 50 par Barbara McClintock (McClintock B., 1950) mais le travail sur les EGM ne s'accéléra qu'à partir des années 70 avec la révolution technologique en biologie moléculaire (Arkhipova I.P., *et al.*, 2016). Les EGM sont définis comme des fragments d'ADN capables de coder un ou plusieurs facteurs de virulence ou de résistance incluant les enzymes permettant leur propre transfert et intégration dans un autre génome (Malachowa N., *et al.*, 2010 ; Alibayov B., *et al.*, 2014). Typiquement ces gènes possèdent un pourcentage GC différent du core génome puisqu'ils proviennent d'autres espèces bactériennes. Ils ont un rôle crucial dans le brassage génétique ainsi que dans la plasticité génomique permettant une adaptation rapide à un nouvel environnement (Malachowa N., *et al.*, 2010 ; Lindsay J.A., 2014). Parmi les éléments génétiques mobiles, on retrouve les bactériophages (phages), les îlots génomiques et de pathogénies, les cassettes chromosomiques, les plasmides et les transposons (Tn) ainsi que les séquences d'insertion (SI) (Lindsay J.A., *et al.*, 2004 ; Malachowa N., *et al.*, 2010 ; Alibayov B., *et al.*, 2014).

### c) Acquisition du génome accessoire

Le génome accessoire peut être acquis par trois mécanismes différents (Figure 4) :

- **La transduction** : qui fait référence au transfert d'ADN d'une cellule à une autre, par le biais de bactériophages, et à son intégration dans le chromosome bactérien. Cette intégration est généralement stable et transmissible à la cellule fille lors de la réplication. Il s'agit d'un mécanisme courant chez *S. aureus* permettant le transfert d'ADN d'une taille de 45kpb (Lindsay J.A., 2014).
- **La conjugaison** : qui implique le transfert d'ADN d'une cellule à une autre par contact direct via des pores ou des pili (Grohman E., *et al.*, 2003). *S. aureus* ne possédant pas de pili, on suppose que des pores sont formés entre les deux cellules. Ici l'élément transféré est généralement d'une taille supérieure à 45kpb comme de grands plasmides (Lindsay J.A., 2014).
- **La transformation** : qui est considérée comme le premier type de transfert horizontal. L'ADN libre est acquis directement dans son environnement par la bactérie via des protéines de compétence bactérienne formant des structures ressemblant à des pores dans la membrane bactérienne (Lindsay J.A., 2014 ; Blokesch M., *et al.*, 2016). Les études ont montré une faible efficacité de transfert par ce mécanisme chez *S. aureus*.



**Figure 4 : Schéma représentant les différents mécanismes de transfert horizontal de gènes.** L'acquisition d'éléments génétiques mobiles par la bactérie peut se faire par trois grands mécanismes : la transduction, la transformation et la conjugaison (réalisée grâce au site Biorender.com).

➤ Les bactériophages:

Ils représentent les entités les plus abondantes de la biosphère et sont littéralement des « mangeurs de bactéries ». Ce sont des virus capables d'infecter et de se répliquer au sein de la bactérie, et sont classifiés en 3 groupes : (i) lytique, (ii) modéré et (iii) chronique (Malachowa N., *et al.*, 2010 ; Alibayov B., *et al.*, 2014). Les phages lytiques ont été utilisés en thérapie puisqu'ils provoquent la destruction des bactéries. En effet, ils vont utiliser la machinerie cellulaire de leur hôte pour se répliquer, puis, détruire la bactérie en lysant la cellule afin de libérer de nouvelles particules phagiques (Malachowa N., *et al.*, 2010 ; Lindsay J.A., 2014 ; Penades J.R., *et al.*, 2015). Les phages chroniques quant à eux, vont relarguer de nouvelles particules phagiques sans tuer leur hôte ce qui permet à la bactérie de continuer à croître (Malachowa N., *et al.*, 2010). Enfin, les phages tempérés (les plus nombreux) vont intégrer leur génome (appelé prophage) au sein du génome bactérien et se répliquer comme une partie de ce chromosome sans former de particule ni lyser la cellule hôte (Malachowa N., *et al.*, 2010 ; Lindsay J.A., 2014 ; Penades J.R., *et al.*, 2015). Cependant en condition de stress induisant une réponse SOS, le prophage est induit et le cycle lytique est activé. La transduction par les phages est la voie majeure de transfert horizontal chez *S. aureus* participant ainsi à la plasticité génomique et à l'adaptation du pathogène aux différentes conditions rencontrées lors de l'infection d'un hôte (Goerke C., *et al.*, 2006 ; Malachowa N., *et al.*, 2010 ; McCarthy A.J., *et al.*, 2012). Pour initier une infection, les phages doivent se fixer sur des cibles spécifiques à la surface bactérienne de sorte que chacun d'entre eux cible une gamme étroite de souches d'une même espèce bactérienne (Penadés J.R., *et al.*, 2015).

➤ Les plasmides:

Les plasmides sont des petites molécules d'ADN capables de s'auto-répliquer au sein d'un hôte approprié. La majorité des souches de *S. aureus* renferment un ou plusieurs plasmides de 1 à 60 kpb classés en trois grands groupes : (i) les petits plasmides (1.3-4.6kpb) à multiple copies (10-55/cellule) portant un seul facteur de résistance, (ii) les grands plasmides (15-46 kpb) à faible copies (4-6/cellule) portant généralement plusieurs facteurs de résistance et (iii) les plasmides conjugatifs multi-résistants (30-60kpb) (Malachowa N., *et al.*, 2010 ; Alibayov B., *et al.*, 2014). Les plasmides possèdent principalement des gènes de résistance aux antibiotiques ( $\beta$ -lactamines, macrolides, glycopeptides, aminosides) et aux antiseptiques, des gènes impliqués dans la résistance à des métaux lourds (cadmium, mercure, arsenic) ainsi que des gènes codant pour des

toxines (Lindsay J.A., *et al.*, 2004 ; Malachowa N., *et al.*, 2010 ; Alibayov B., *et al.*, 2014). Les plasmides sont ainsi responsables de la dissémination de ces gènes au sein d'une espèce mais également entre des espèces différentes (Smalla K., *et al.*, 2015).

➤ Les îlots génomiques et les îlots de pathogénies :

Les îlots génomiques sont de grandes régions d'ADN (10-200kpb) acquis par transfert horizontal. Ils promeuvent l'évolution des bactéries en leurs fournissant des ensembles de gènes impliqués dans des caractéristiques communes comme la résistance aux antibiotiques ou des gènes de virulence par exemple (Juhas M., *et al.*, 2009 ; Alibayov B., *et al.*, 2014 ; Soares S.C., *et al.*, 2016). Selon les gènes qu'ils portent, ils sont décrits comme îlots de pathogénie, de symbiose, métabolique, de fitness ou de résistance. Du fait de leurs acquisitions par transfert horizontal, ils possèdent un pourcentage GC différent du reste du génome (signature de la souche donatrice) ainsi qu'une fréquence d'usage de codon différente. Ils sont souvent flanqués de séquences répétées de 16-20 pb, vestiges de leur intégration à un site spécifique et pouvant agir comme des séquences de reconnaissance pour leur excision enzymatique. Leur intégration a souvent lieu à proximité des gènes d'ARN de transfert. Chez *S. aureus*, les îlots génétiques sont divisés en 3 familles nommées vSA $\alpha$ , vSA $\beta$  et vSA $\gamma$  (Juhas M., *et al.*, 2009 ; Alibayov B., *et al.*, 2014 ; Soares S.C., *et al.*, 2016).

Les îlots génomiques possédant des gènes de virulence sont appelés îlots de pathogénie (PAI) et ont été décrits la première fois par Hacker J. et ses collaborateurs (Hacker J., *et al.*, 1990). De ce fait, ils sont présents dans le génome de bactéries pathogènes et absents des non pathogènes, participant ainsi à l'augmentation du pouvoir pathogène des bactéries. Du fait de leur importance dans l'évolution bactérienne, ils sont transférés avec une grande fréquence à l'aide de phages dit « helper » (Alibayov B., *et al.*, 2014). Cependant, ils présentent souvent une grande instabilité provoquant également une perte des fonctions de virulence plus fréquente que la normale (Schmidt H., *et al.*, 2004). La même mécanique génétique permet à la fois la distribution des PAI par transfert horizontal de gènes ainsi que la détermination de leur instabilité génétique (Schmidt H., *et al.*, 2004). Les PAI chez *S. aureus* s'intègrent au niveau d'un des six sites chromosomiques spécifiques « att $c$  », implantés dans le génome et restent quiescents sous le contrôle d'un répresseur (Alibayov B., *et al.*, 2014).

➤ Les éléments transposables:

Le génome de *S. aureus* contient également des éléments génétiques mobiles hétérogènes incluant les séquences d'insertion (SI), les transposons (Tn) et les éléments transposons-like. Ces éléments peuvent être trouvés dans le chromosome ou associés avec d'autres éléments génétiques mobiles en simple ou multiple copies (Alibayov B., *et al.*, 2014). Les SI sont des éléments transposables portant uniquement les informations génétiques nécessaires à leur transposition. Bien qu'elles ne codent pour aucun gène de résistance, elles sont responsables de la recombinaison et de la stabilisation de nombreux gènes de résistance. Leur présence est importante dans l'évolution du génome bactérien puisqu'elles induisent des changements dans l'expression des gènes. Les SI peuvent inactiver plusieurs gènes par insertion directe ou grâce à des effets polaires sur la transcription de gènes proches (Malachowa N., *et al.*, 2010 ; Alibayov B., *et al.*, 2014). Si elles sont connues pour ne pas transporter de gènes, certaines SI peuvent déplacer des gènes de résistances dans le cadre d'un transposon composite. Ces transposons sont des régions bordées par deux copies de la même SI ou liées à une même SI, et pouvant être déplacées comme une seule entité (Partridge S.R., *et al.*, 2018). Les transposons sont généralement petits et présents en multiples copies dans le génome staphylococcique, soit insérés dans le chromosome soit dans des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides ou les cassettes chromosomiques (Malachowa N., *et al.*, 2010). Plus rarement on retrouve de grands transposons (>18kpb) présents en simple copie (Malachowa N., *et al.*, 2010 ; Alibayov B., *et al.*, 2014).

➤ Les cassettes chromosomiques staphylococciques (SCC) :

Les SCCs sont de grands fragments d'ADN qui s'insèrent toujours au sein du gène *rlmH* (anciennement *orfX*) sur le chromosome de *S. aureus* (Partridge S.R., *et al.*, 2018). Les SCCs peuvent coder des gènes de résistance aux antibiotiques ou de virulence. Parmi les SCCs, certaines portent le gène *mec*, responsable de l'expression de la résistance aux  $\beta$ -lactames à large spectre. Cela explique leur classification en deux groupes : les SCC $mec$  et les SCC $non-mec$  (Malachowa N., *et al.*, 2010 ; Alibayov B., *et al.*, 2014).

Les SCC $mec$  sont identifiées grâce à plusieurs caractéristiques communes (Shore A.C., *et al.*, 2013) :

- elles s'intègrent à un site spécifique *attB* (aussi appelé ISS)
- elles sont flanquées par des séquences répétées inverses

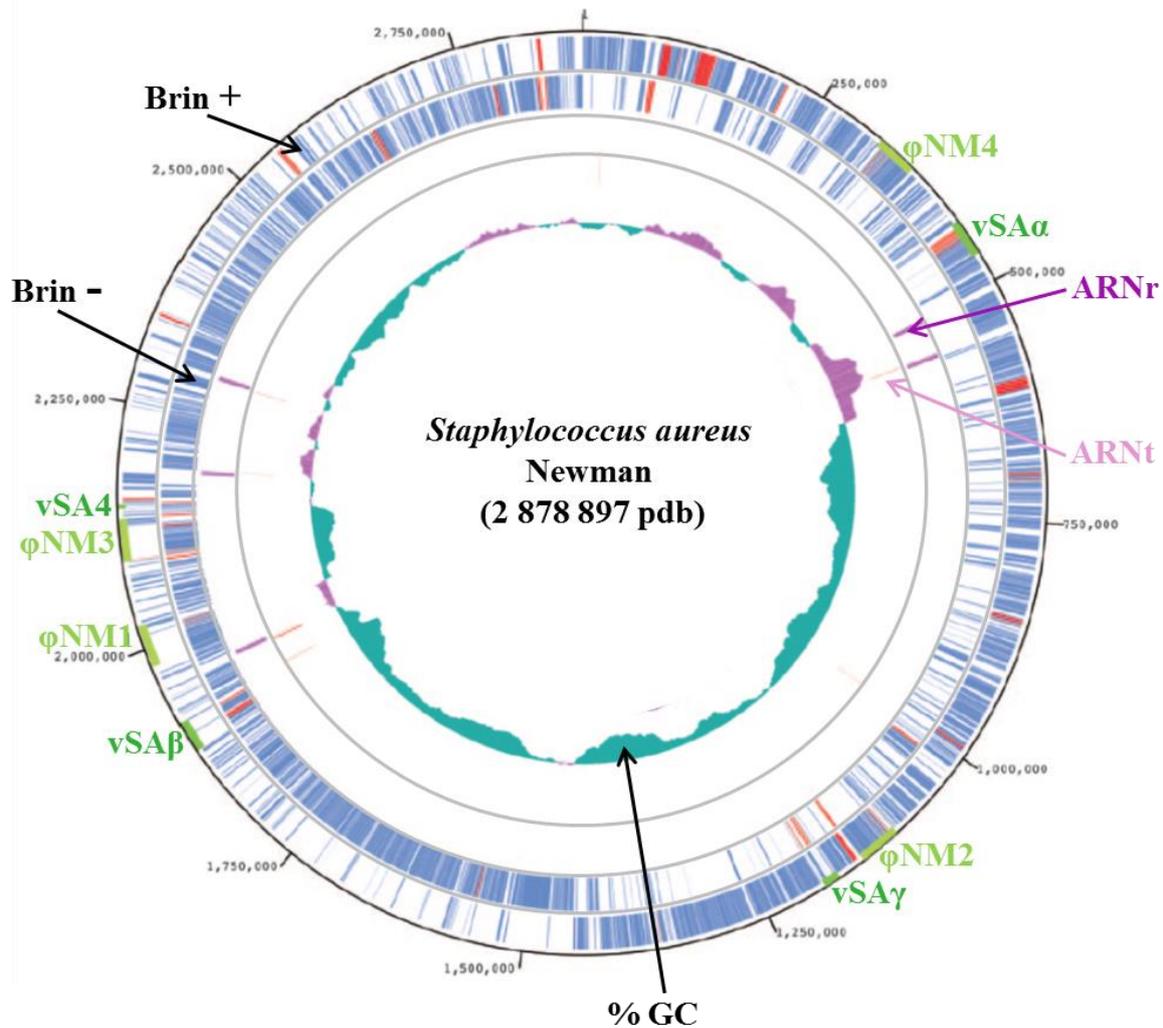
- elles portent une recombinase du complexe génique *ccr* (*ccrA*, *B* et *C*) permettant l'intégration et l'excision de la cassette au niveau 3' de *rlmH*
- elles portent le complexe génique *mec* composé du gène *mec* et, quand ils sont présents, de régulateurs, à savoir *mecRI* (le senseur) et *mecI* (le répresseur)

Actuellement, 12 types de SCC*mec* ont été identifiés grâce à leur diversité structurale. Elles sont classées en fonction de la combinaison unique de *mec* (5 types de A à E) et de *ccr* (8 types). A cela on peut ajouter différents sous-types, basés sur la structure des trois régions de jonction (J1, J2 et J3) (Malachowa N., *et al.*, 2010 ; Alibayov B., *et al.*, 2014 ; Partridge S.R., *et al.*, 2018). Cependant, certaines SCC sont plus complexes et non limitées à la résistance à la pénicilline, on parle alors de SCC*non-mec*. Généralement, ces cassettes n'ont pas de gènes *mec* mais portent souvent d'autres gènes de résistance aux antibiotiques. A cela s'ajoute des gènes de virulence ou de fitness/survie. Pour leur nomenclature, on ajoute le suffixe du gène qu'elles portent comme SCC*fus* (portant le gène de résistance à l'acide fusidique) ou SCC*Hg* (portant l'opéron de résistance au mercure) (Malachowa N., *et al.*, 2010 ; Shore A.C., *et al.*, 2013 ; Alibayov B., *et al.*, 2014).

#### **d) Éléments génétiques mobiles de la souche Newman**

La souche utilisée pour cette étude est la souche Newman, isolée en 1952 à partir d'une ostéomyélite tuberculeuse (Duthie E.S., *et al.*, 1952). Cette souche est massivement utilisée dans les modèles animaux d'infections staphylococciques du fait de la robustesse de son phénotype virulent (Baba T., *et al.*, 2008). En effet, l'utilisation d'une sélection de 1736 mutants, réalisés par insertion de transposons de *bursa aurealis*, a permis l'identification de 71 gènes impliqués dans la virulence de *S. aureus* Newman ainsi que 30 gènes nécessaires à sa pathogénie (Bae T., *et al.*, 2004). Cette souche a été entièrement séquencée par Baba T. et ses collaborateurs en 2008 (Baba T., *et al.*, 2008), qui ont pu mettre en évidence un génome de 2 878 897 paires de bases codant pour 2614 cadres ouverts de lecture (Figure 5). *S. aureus* Newman possède quatre prophages intégrés ( $\phi$ NM1-  $\phi$ NM4), contrairement aux autres souches de *S. aureus* qui n'en possèdent pas plus de trois. De plus, ils ont également pu montrer que les variants de *S. aureus* Newman ayant perdu l'un (ou plusieurs) de ces prophages, présentaient une réduction drastique de leur capacité à former des abcès sur modèles murins d'infections, suggérant l'importance de leur rôle dans la pathogénie des infections staphylococciques (Baba T., *et al.*, 2008). *S. aureus* Newman possède également

quatre îlots de pathogénie ( $vSa\alpha$ ,  $vSa\beta$ ,  $vSa\gamma$  et  $vSa4$ ) dont la combinaison  $vSa\alpha$  et  $vSa\beta$  est similaire à *S. aureus* COL, NTC8325 et USA300. Enfin, la souche Newman ne porte que de rares séquences d'insertion par rapport aux souches hospitalières résistantes à la méticilline et ne présente pas de gène de résistance aux antibiotiques (Baba T., *et al.*, 2008).

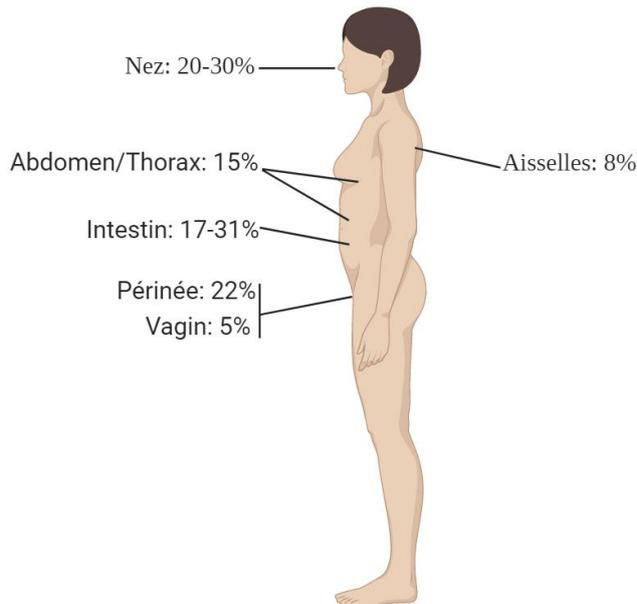


**Figure 5 : Représentation circulaire du chromosome de la souche Newman de *S. aureus* (adapté de Baba T., *et al.*, 2008).** Sur le 1<sup>er</sup> cercle extérieur on retrouve les quatre prophages intégrés ( $\phi$ NM1- $\phi$ NM4 ; segments vert clair) ainsi que les quatre îlots génomiques ( $vSa\alpha$ ,  $vSa\beta$ ,  $vSa\gamma$  et  $vSa4$  ; segments vert foncé). Le 2<sup>ème</sup> et le 3<sup>ème</sup> cercle indiquent les cadres ouverts de lecture orientés respectivement dans le sens positif et dans le sens négatif. Le 4<sup>ème</sup> cercle indique la localisation des ARNs ribosomiaux (ARNr) et le 5<sup>ème</sup> celle des ARNs de transfert (ARNt). Enfin le 6<sup>ème</sup> et dernier cercle indique les valeurs du pourcentage GC avec les domaines verts représentant les teneurs en GC inférieures à 50% et les domaines violets les teneurs GC supérieures à 50%.

## 1- *S. aureus* : un commensal doublé d'un pathogène redoutable

### a) Habitats

Les réservoirs naturels de *Staphylococcus aureus* sont les mammifères, dont l'Homme, certains animaux à sang chaud ainsi que les oiseaux (Le Loir Y., *et al.*, 2010). C'est une bactérie à laquelle nous sommes quotidiennement exposés mais seulement certaines personnes sont porteuses sur de longues périodes. *S. aureus* colonise la surface et les glandes de la peau ainsi que les muqueuses et on le retrouve préférentiellement au niveau de



**Figure 6: Principaux sites de portages de *S. aureus* chez l'Homme (réalisée sur le site Biorender.com).**

de résistance aux stress (osmotique, carences nutritives, thermique) lui permettant de survivre dans de nombreux écosystèmes, explique pourquoi *S. aureus* est ubiquitaire et retrouvé partout dans l'environnement (Le Loir Y., *et al.*, 2010).

l'épithélium malpighien humide des fosses nasales antérieures (Sollid J.U.E., *et al.*, 2014). Dans la population générale adulte, on peut retrouver *S. aureus* au niveau des aisselles (8%), de la poitrine / abdomen (15%), du périnée (22%), de l'intestin (17-31%) ou du vagin (5%) (Figure 6) (Sollid J.U.E., *et al.*, 2014). La présence de staphylocoques au niveau nasal permet une dissémination plus facile par aérosol notamment lors d'éternuements. Ajouter à cela de fortes capacités d'adaptation et

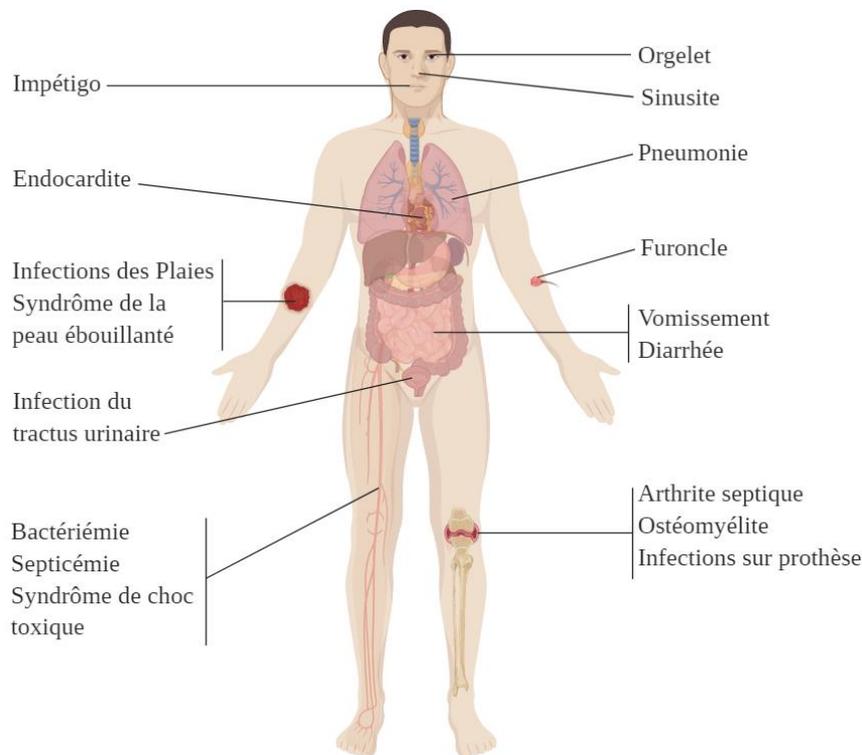
Parmi la population, on retrouve trois types de portages avec les porteurs persistants (20%), les porteurs intermittents (60%) et les non porteurs (20%) (Nair N., *et al.*, 2014). Ces types sont définis par deux cultures nasales obtenues à une semaine d'intervalle et donnant deux cultures positives à *S. aureus* (= persistant), une culture positive (= intermittent) ou aucune culture positive (= non porteur) (Sollid J.U.E., *et al.*, 2014). Le portage asymptomatique est un facteur de risque de développement d'une infection à *S. aureus* puisque cette bactérie est également considérée comme un pathogène opportuniste.

Différents cas de figure peuvent aboutir au déclenchement d'une infection (Institut Pasteur):

- lors de la rupture de la barrière cutanée (blessure): *S. aureus* peut alors se développer au niveau de la lésion et provoquer une infection cutanée.
- lors d'une intervention chirurgicale pouvant provoquer une contamination interne par *S. aureus* provenant de la flore propre du patient.
- au cours de pathologies ou de traitements provoquant un affaiblissement des défenses immunitaires propice au développement de *S. aureus*.

### b) Une diversité d'infections

*S. aureus* est une bactérie commensale et pathogène qui est responsable d'un large spectre d'infections que ce soit en termes de diversité mais également de gravité (Figure 7). Physio-pathologiquement, on discerne deux grands types d'infection chez l'Homme : les infections suppuratives et les syndromes toxiques, auxquels on peut ajouter les toxi-infections alimentaires (TIA).



**Figure 7 : Diversité des infections humaines à *Staphylococcus aureus* (réalisée grâce au site Biorender.com).**

➤ Infections suppuratives :

Elles sont liées à la multiplication bactérienne et à l'expression de multiples facteurs de virulence responsables de l'invasion et de la destruction des tissus de l'hôte (Le Loir Y., *et al.*, 2010). Parmi ces infections, on retrouve les infections cutanées (impétigos, furoncles), généralement bénignes, pouvant être à l'origine d'infections des tissus mous sous-jacents (fasciite nécrosante). Ces dernières sont associées à des symptômes généraux comme la fièvre et sont beaucoup plus grave du fait de l'évolution en profondeur de l'infection. *S. aureus* est également le pathogène le plus retrouvé dans les infections osseuses et articulaires (30-60% des ostéomyélites) et pose notamment de gros problèmes lors d'infection au niveau des prothèses articulaires (Le Loir Y., *et al.*, 2010 ; Tong S.Y.C., *et al.*, 2015). *S. aureus* est responsable d'infections associées à une bactériémie et est retrouvé dans 20 à 25% des hémocultures positives. Ces infections sont les mieux décrites et surviennent généralement chez des patients ayant des facteurs prédisposant tels que la colonisation à *S. aureus*, du diabète, l'utilisation de traitements immunosuppresseurs ou de corticoïdes ou encore la présence d'un cathéter central. De plus, l'âge est un facteur déterminant puisqu'on observe une plus grande fréquence de bactériémies aux âges extrêmes, ainsi qu'en cas de toxicomanie (Tong S.Y.C., *et al.*, 2015). Parmi ces infections on retrouve les endocardites infectieuses (*S. aureus* est la cause la plus importante d'endocardites dans le monde industrialisé), les infections métastatiques ainsi que les sepsis et chocs septiques (Le Loir Y. *et al.*, 2010 ; Tong S.Y.C., *et al.*, 2015). Enfin, *S. aureus* est également un pathogène responsable de nombreuses pneumonies tant au niveau communautaire qu'hospitalier (Tong S.Y.C., *et al.*, 2015).

➤ Syndromes toxiniques :

Dans ces syndromes, la production de toxines est majoritairement responsable des symptômes cliniques. Les deux principaux syndromes toxiques sont le syndrome de choc toxique staphylococcique (STT) et le syndrome d'exfoliation généralisée (SSSS). Le STT est dû à une famille de toxines appelée superantigène et caractérisée par un syndrome de surcharge de la réponse inflammatoire systémique, se manifestant par un choc septique et des défaillances d'organes (Tong S.Y.C., *et al.*, 2015). Le SSSS quant à lui est provoqué par des toxines épidermolytiques (ETA et ETB) et touche principalement l'enfant de

moins de 5 ans. L'action de ces toxines va provoquer un aspect « ébouillanté » avec une séparation de la peau et un état clinique correct et stable (Mockenhaupt M., *et al.*, 2005).

➤ Toxi-infections alimentaires (TIA) :

Les TIAs à staphylocoques sont considérées comme les principales TIAs dans le monde. Typiquement, une TIA à staphylocoque a un début rapide après l'ingestion d'aliments contaminés (3 - 5 heures) (Kadariya J., *et al.*, 2014). Elle est due à la production d'entérotoxines staphylococciques, toxines préformées dans les aliments et produites par le staphylocoque pendant la croissance à une température permissive (Kadariya J., *et al.*, 2014). Cependant le temps d'incubation dépend de la quantité de toxines ingérées. Il a été montré qu'une toute petite quantité d'entérotoxines (0,5ng/mL) ayant contaminé du lait au chocolat a été capable de déclencher une grande épidémie (Kadariya J., *et al.*, 2014). Les symptômes incluent des nausées, des vomissements et des crampes abdominales avec ou sans diarrhées, la maladie se résolvant généralement en 24 – 48 heures sans traitement antibiotique. Elle peut être sévère, mais uniquement chez les personnes fragiles c'est-à-dire les enfants, les personnes âgées ainsi que les patients immunodéprimés (Kadariya J., *et al.*, 2014).

*S. aureus* est également responsable d'infections chez l'animal, avec la mammite, pathologie la plus connue et fréquemment retrouvée chez les ruminants laitiers. On estime que *S. aureus* représente un tiers des mammites chez les ruminants, causant de grosses pertes économiques dans l'industrie laitière (Li T., *et al.*, 2017). En effet, on estime qu'en France, une mammite provoque une perte de 78€ par vache et par an, due à la diminution de la production de lait mais également au coût des traitements (Seegers H., *et al.*, 2003). Les mammites causent une augmentation du nombre de cellules somatiques dans le lait ce qui impacte sa qualité et provoque une inflammation de la mamelle entraînant une diminution de la quantité de lait produite (Kant R., *et al.*, 2015 ; Li T., *et al.*, 2017 ; Ruegg P.L., 2017). En plus des mammites, *S. aureus* est également connu pour provoquer des infections chez les lapins, se manifestant par une septicémie mortelle, chez les volailles ainsi que chez les moutons (De la Fuente R., *et al.*, 1985 ; Aiello S.E., 2002).

### c) Un important pathogène nosocomial

Les infections nosocomiales sont causées par une grande variété d'organismes comprenant les bactéries, les champignons, les virus, les parasites et autres agents pathogènes. Ces infections peuvent être dérivées de sources exogènes ou endogènes et transférées par contact direct ou indirect entre patients, personnels soignants, objets contaminés, visiteurs ou même via des sources environnementales variées (Santajit S., *et al.*, 2016). En France, il est admis qu'environ 6 à 7% des hospitalisations débouchent sur une infection nosocomiale. Cependant, sa définition n'est pas si simple puisqu'elle diffère si l'on parle de diagnostic et de traitement ou s'il s'agit de surveillance épidémiologique (Comité Technique des Infections Nosocomiales, 1999). De manière générale, une infection nosocomiale est définie comme une infection contractée au cours ou à la suite d'une hospitalisation, à condition qu'aucune infection antérieure du même site n'ait été présente ou en incubation à l'admission (Joly-Guillou M.L., *et al.*, 2005). En pratique, il faut considérer un délai de 48 heures, exception faite de certains pathogènes possédant un temps d'incubation supérieur. Dans ce cas, le délai correspondra au temps d'incubation spécifique de ce pathogène comme les virus par exemple. De plus, il existe également quelques cas particuliers, comme les infections d'une plaie opératoire où on considère comme nosocomiale une infection survenant dans les 30 jours, et même, pour les prothèses et implants, une infection survenant dans l'année (Comité Technique des Infections Nosocomiales, 1999 ; INSERM, 2019). En effet, lors d'une hospitalisation, de nombreux facteurs de risque existent pouvant aboutir à une infection nosocomiale. On retrouve tout d'abord les facteurs liés aux soins invasifs (chirurgie, intubation, cathéter, sonde urinaire) ainsi que les méthodes de diagnostics invasives (endoscopie, prise de sang). En effet, ces conditions vont provoquer une effraction de la peau favorisant la pénétration d'un pathogène ou permettre la mise en place d'un dispositif externe pouvant favoriser la colonisation et la croissance de bactéries. De plus, on peut associer à ces actes de soins, les facteurs liés à l'état du patient qui peuvent également favoriser les infections nosocomiales. Les personnes aux âges extrêmes (nourrissons et personnes âgées), les personnes enceintes, les personnes immunodéprimées ainsi que les personnes souffrant de maladies chroniques (diabète, obésité) sont plus à risque d'infection. De plus, un mauvais respect des règles d'hygiène peut permettre la transmission de pathogènes par d'autres personnes (personnels soignants, familles et visiteurs, autres patients). Enfin, l'origine de ces infections peut aussi être due à une contamination des réseaux d'eau ou d'air des locaux ainsi qu'à une mauvaise stérilisation des outils et équipements de soins.

D'un point de vue épidémiologique, en croisant les données de l'« enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé (France, Mai-Juin 2017) » (ENP, 2018) et du site de l'INSERM (INSERM, 2019), on estime qu'un patient sur 20 est concerné par les infections nosocomiales et ce chiffre est stable depuis 2006. Cela représente environ 750 000 cas/an en France dont environ 4000 décès directs et 9000 si on ajoute les décès indirects (INSERM, 2018). De plus, les infections nosocomiales causent une augmentation de la durée d'hospitalisation (une quinzaine de jours en moyenne) et un surcoût dans le traitement des patients. De nombreuses études ont étudié ces surcoûts mais il est difficile de compiler l'ensemble de ces données du fait des différences méthodologiques et de systèmes de soins étudiés (Defez C., *et al.*, 2008 ; Stone P.W., 2009 ; Zimlichman E., *et al.*, 2013 ; Badia J.M., *et al.*, 2017 ; Rapport SÉNAT). De plus, ces surcoûts varient énormément en fonction du type d'infection, du pathogène impliqué, du service hospitalier où a lieu l'infection ainsi que de l'état du patient infecté (facteurs de risques et pathologies pré-existantes). On estime que ces surcoûts varient entre 500€ pour une infection urinaire et 40 000€ pour une bactériémie en service de réanimation (Rapport SÉNAT). Les principales infections retrouvées sont les infections du tractus urinaire (plus de 25%), les infections du site opératoire (1 cas sur 6), les pneumonies (1 cas sur 6) et les bactériémies (plus de 10%) (ENP, 2018). Si l'on considère maintenant les agents pathogènes responsables d'infections nosocomiales, *S. aureus* se classe 2<sup>ème</sup> avec 13,8% des cas derrière *Escherichia coli* (23,6% des cas) et devant *Enterococcus faecalis* (6,5% des cas) et *Pseudomonas aeruginosa* (6,3% des cas) qui à eux quatre représentent 50% de ces infections (ENP, 2018). Une autre caractéristique de ces infections nosocomiales pose un problème, il s'agit du fait que les pathogènes responsables de ces infections sont souvent résistants à un ou plusieurs antibiotiques rendant le traitement d'autant plus difficile.

## II] *S. aureus* et antibiotique : traitements et adaptation

### A/ Définition générale et historique de leurs découvertes

Bien que ce soit Pasteur et Joubert qui, les premiers, démontrèrent l'antibiose de bactéries saprophytes sur la bactérie charbonneuse (Pasteur L., *et al.*, 1877), c'est à Vuillemin, en 1889, qu'on doit la première notion d'antibiotique. Il décrit l'antibiose par « principe actif d'un organisme vivant qui détruit la vie des autres pour protéger sa propre vie » (Vuillemin P., 1889). Selon Waksman en 1941, un antibiotique est « une substance produite par un micro-organisme et qui a le pouvoir d'inhiber la croissance d'autres micro-organismes et même de les détruire » (Waksman S.A., *et al.*, 1942). Comme on peut le voir, cette définition générale concernait tous les micro-organismes avant d'évoluer pour se limiter aux substances à activité antibactérienne. La plupart des antibiotiques actuels sont des molécules hémi-synthétiques issues de la modification de molécules naturelles produites par des micro-organismes. Ces molécules agissent sur les bactéries en interrompant une ou plusieurs voies de synthèse et/ou en déstabilisant la paroi ou la membrane. Les antibiotiques ont deux effets principaux à dose thérapeutique : un effet bactériostatique ou un effet bactéricide (Donnio P.-Y., 2010).

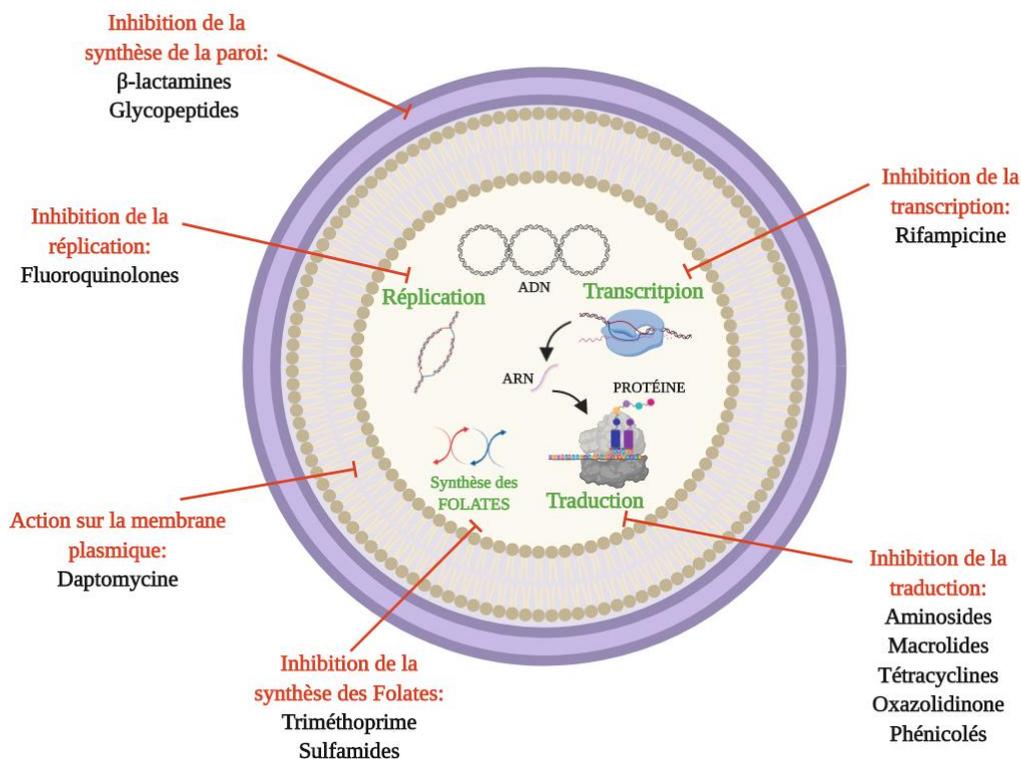
- Bactériostase : elle correspond à l'action d'une molécule antibiotique capable d'inhiber la croissance d'une population bactérienne sans perte de viabilité. Pour mesurer son effet, on détermine la croissance minimale inhibitrice (CMI), c'est-à-dire la plus petite concentration d'antibiotique capable visuellement d'inhiber la croissance de cette population bactérienne (Donnio P.-Y., 2010).
- Bactéricidie : elle correspond à l'action d'une molécule antibiotique capable de provoquer la mort de la cellule bactérienne. Pour mesurer son effet, on détermine la concentration minimale bactéricide (CMB), c'est-à-dire la plus petite concentration d'antibiotique entraînant l'élimination de 99,99% d'un inoculum bactérien (Donnio P.-Y., 2010).

Pour les antibiotiques bactéricides, la valeur de la CMI et de la CMB sont similaires alors que pour les antibiotiques bactériostatiques, la valeur de la CMB est supérieure à celle de la CMI. De manière générale, on commence par déterminer la CMI en déterminant la concentration à partir de laquelle on observe une inhibition de la croissance bactérienne en milieu solide (absence de colonie bactérienne visible) ou en milieu liquide (absence de trouble

dans le milieu). On détermine ensuite la CMB à partir de la CMI précédemment calculée en estimant la viabilité de la population bactérienne (Donnio P.-Y., 2010).

De manière plus spécifique, les antibiotiques agissent sur trois cibles principales (Figure 8):

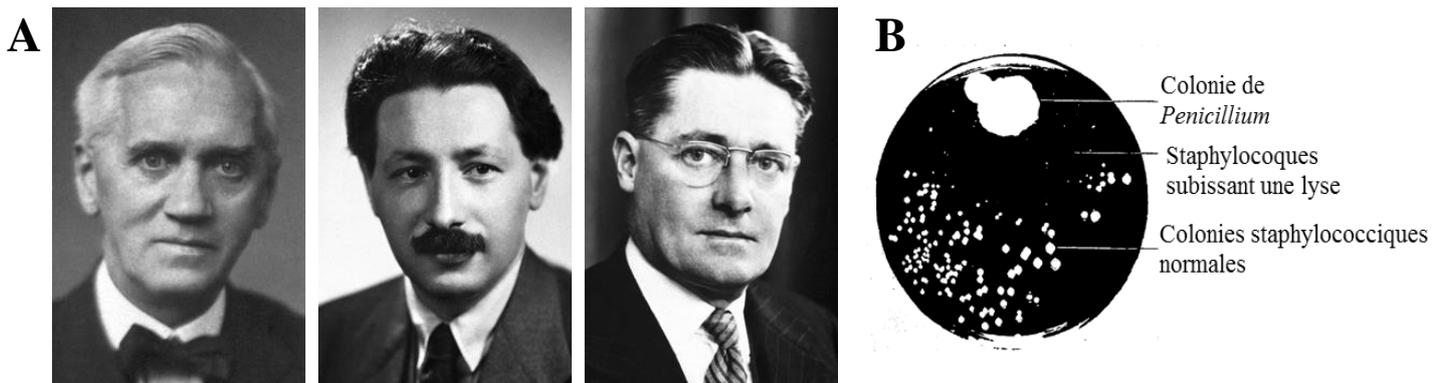
- la paroi bactérienne, dont l'altération entraîne la lyse de la bactérie.
- l'ensemble des processus de synthèse d'acides nucléiques et de protéines impliqués dans les phénomènes de croissances et de divisions cellulaires (synthèse d'ADN ; transcription de l'ADN en ARN ; traduction de l'ARNm en protéine).
- les voies métaboliques essentielles comme la synthèse des folates.



**Figure 8 : Principaux mécanismes d'action des antibiotiques.** Les antibiotiques agissent sur trois cibles principales : (i) la paroi et la membrane plasmique, (ii) l'ensemble des voies de synthèse des acides nucléiques ainsi que des protéines et (iii) les voies métaboliques essentielles. Pour chaque mécanisme, les antibiotiques impliqués sont précisés (réalisée grâce au site Biorender.com).

Avant de développer un peu plus les différentes classes d'antibiotiques existant de nos jours, un petit retour en arrière s'impose. Contrairement à ce qui est généralement connu, on doit la découverte du premier antibiotique à Paul Erlich en 1909 avec l'arsphénamine commercialisé en 1909 sous le nom de Salvarsan® (Jones H.W., 1911 ; Durand G.A., *et al.*, 2019). Cependant, Alexander Fleming fut en quelque sorte le père des antibiotiques par sa

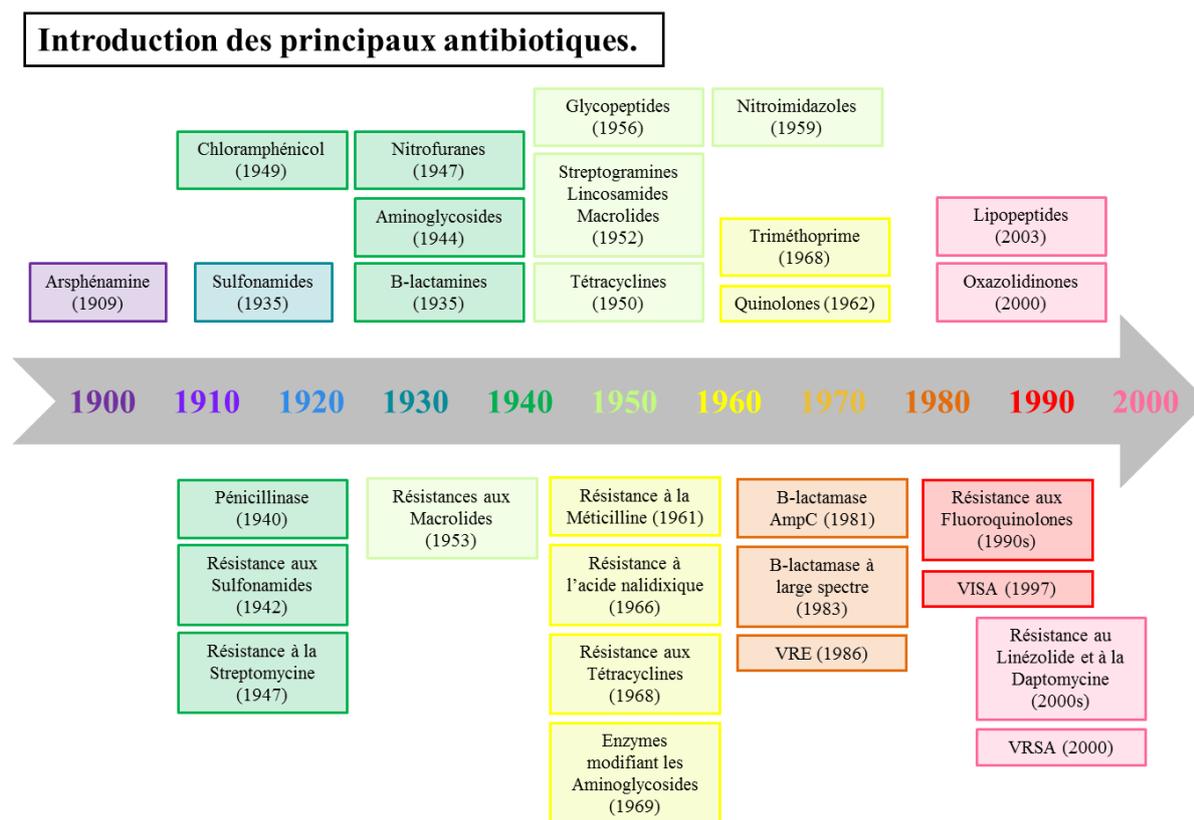
découverte de la pénicilline qui marqua le début de l'ère des antibiotiques. Comme beaucoup de grandes découvertes ayant révolutionné notre monde, Fleming ainsi que le monde scientifique, doivent la découverte de la pénicilline au fruit du hasard et à un peu de chance. Il déclara d'ailleurs lors de la remise de son prix Nobel en 1945 (Figure 9-A) « Cela aurait été incorrect et je préfère dire la vérité, la pénicilline commença grâce au hasard d'une observation. Mon seul mérite est de ne pas avoir négligé l'observation et d'avoir donné suite à ce sujet comme un bactériologiste » (Fleming A., 1945). En effet, de retour de vacances en août 1928, Fleming constata qu'une des boîtes de pétri qu'il avait oublié sur sa paillasse et qui contenait des cultures de staphylocoques, était contaminée par le champignon *Penicillium notatum* (Figure 9-B). De plus, aucun staphylocoque ne se développait à proximité de ce champignon (Ligon B.L., 2004). Cependant, il fallut attendre 1940 pour que Chain et Florey réussissent à purifier la pénicilline là où Fleming échoua par absence de compétence en chimie. S'en suivit une production industrielle à partir de 1942 et une utilisation massive notamment lors du débarquement en Normandie lors de la 2<sup>nd</sup> guerre mondiale.



**Figure 9 :** (A) Sir Alexander Fleming, Ernst B. Chain et Sir Howard Florey lors de la remise de leur prix Nobel de Physiologie ou Médecine pour la découverte, l'isolement et l'emploi thérapeutique de la pénicilline en 1945 (Nobel, 1945). (B) Photographie d'une culture sur boîte montrant la lyse de colonies staphylococciques à proximité du champignon *Penicillium notatum* (Fleming A., 1945).

Le succès de la pénicilline a ensuite conduit à la découverte et la commercialisation de plusieurs types d'antibiotiques, au cours d'une période que l'on peut appeler l'âge d'or des antibiotiques (Figure 10). Selman Waksman fut le premier à effectuer une recherche systématique de l'activité antimicrobienne de 10 000 cultures de bactéries du sol et développa des techniques de cultures et des stratégies appelées « plateforme de Waksman » (Waksman S.A., 1952). Ces recherches aboutirent à la découverte en 1943 de la streptomycine, le premier antibiotique actif sur le bacille de Koch, permettant ainsi le traitement de la tuberculose (Waksman S.A., *et al.*, 1953). Elle permit également la découverte d'autres

antibiotiques et notamment la clavicine, la néomycine (1949), la griséine (1946) et bien d'autres encore. L'utilisation de la plateforme de Waksman permit la découverte de la plupart des antibiotiques actuels entre les années 40 et 70 (Durand G.A., *et al.*, 2019). Durant cette période, plus de 20 classes d'antibiotiques ont été découvertes à partir d'une douzaine d'espèces de bactéries et de champignons (Durand G.A., *et al.*, 2019). L'âge d'or des antibiotiques a expiré au milieu des années 1960 et, depuis 1987, aucun antibiotique n'a été découvert avec de nouveaux mécanismes d'action. Presque tous les antibiotiques utilisés aujourd'hui appartiennent à des classes découvertes avant 1970. En effet, l'industrie pharmaceutique a longtemps privilégié le développement d'autres médicaments, non seulement parce que les antibiotiques sont généralement administrés en cure courte et offrent donc un rendement économique moindre que les traitements à long terme. Mais également parce que le développement inévitable de la résistance des microbes rend difficile la prédiction des mécanismes d'action antimicrobiens sur lesquels se concentrer pour développer de nouveaux antibiotiques (Yazdankhah S., *et al.*, 2013).



**Figure 10 : Frise chronologique représentant l'Histoire des antibiotiques.** On retrouve au-dessus de la frise l'introduction des principales classes d'antibiotiques et en dessous l'apparition des principales résistances. VRE = Entérocoques Résistants à la Vancomycine ; VISA = *S. aureus* à sensibilité diminuée à la Vancomycine ; VRSA = *S. aureus* résistant à la Vancomycine

## B/ Résistances aux antibiotiques

### 1- Définitions

La résistance aux antibiotiques est un terme relatif puisqu'il existe de nombreuses définitions en fonction du critère sur lequel on se base (génétique, biochimique, microbiologique ou clinique) (Muylaert A., *et al.*, 2012). Elle est fréquemment définie d'un point de vue clinique par l'existence d'une forte probabilité d'échec thérapeutique au cours d'une antibiothérapie conduite aux posologies validées. Au contraire, on parle de sensibilité lorsqu'il existe une forte probabilité de succès thérapeutique aux posologies validées. Ici, la résistance dépend de nombreux paramètres tels que la localisation de la bactérie, le dosage et le mode d'administration de l'antibiotique ainsi que l'état immunitaire du patient (Muylaert A., *et al.*, 2012). L'Organisation Mondiale de la Santé utilise le critère microbiologique en définissant une bactérie comme étant résistante, lorsqu'elle supporte des concentrations d'antibiotiques plus élevées que celle qu'il est possible d'atteindre *in vivo* après administration, ou que celle qui inhibe le développement de la majorité des souches de la même espèce (OMS, 1961). Ici, on ne peut étudier la résistance que par comparaison d'au moins deux souches dont l'une de référence (= souche sauvage) (Muylaert A., *et al.*, 2012). La méthode normalisée et utilisée en routine en milieu hospitalier afin de caractériser la résistance d'une souche bactérienne est l'antibiogramme (Figure 11). Elle consiste à ensemencer un inoculum normalisé d'une souche bactérienne sur un milieu de culture défini et à placer différents disques contenant une concentration précise d'antibiotique. Ceci permet ensuite de déterminer la CMI pour chaque antibiotique testé et de classer la souche en 3 catégories (SFM, 2019):

➤ S = Sensible à posologie standard :

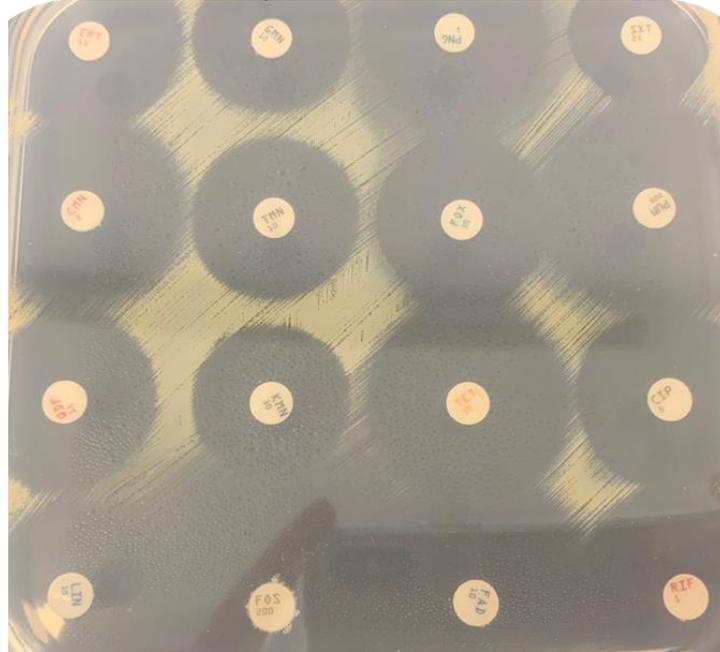
Une bactérie est catégorisée comme sensible à posologie standard lorsqu'il y a une probabilité élevée de succès thérapeutique à la posologie standard de l'antibiotique (SFM, 2019).

➤ R = Résistant :

Une bactérie est catégorisée comme résistante lorsqu'il y a une forte probabilité d'échec thérapeutique même en cas de forte exposition de la bactérie à l'antibiotique (SFM, 2019).

➤ I: Sensible à forte posologie (anciennement Intermédiaire) :

Une bactérie sera catégorisée comme sensible à forte posologie lorsqu'il y a une forte probabilité de succès thérapeutique due au fait que l'exposition de la bactérie à l'antibiotique est augmentée par l'utilisation de posologies élevées ou par la concentration spontanément élevée de l'antibiotique au site infectieux en raison de ses caractéristiques pharmacocinétiques (SFM, 2019).



**Figure 11 : Antibiogramme de la souche *S. aureus* Newman** (réalisé par Legros J., stagiaire en master 1, 2019) montrant une sensibilité à tous les antibiotiques de cette souches. ERY: Érythromycine, GMN: Gentamicine, PNG: Pénicilline G, SXT: Triméthoprim/sulfaméthoxazole, CMN: Clindamycine, TMN: Tobramycine, FOX: Céfoxitine, PUM: Pseudouridimycine, QDF: Quinupristin-Dalfopristin, KMN: Kanamycine, TET: Tétracycline, CIP: Ciprofloxacine, LIN: Lincomycine, FOS: Fosfomycine, FAD: Acide fusidique, RIF: Rifampicine

Il existe deux types de résistance portée par la bactérie, les résistances naturelles ou intrinsèques et les résistances acquises qui sont beaucoup plus fréquentes.

**a) Résistances naturelles**

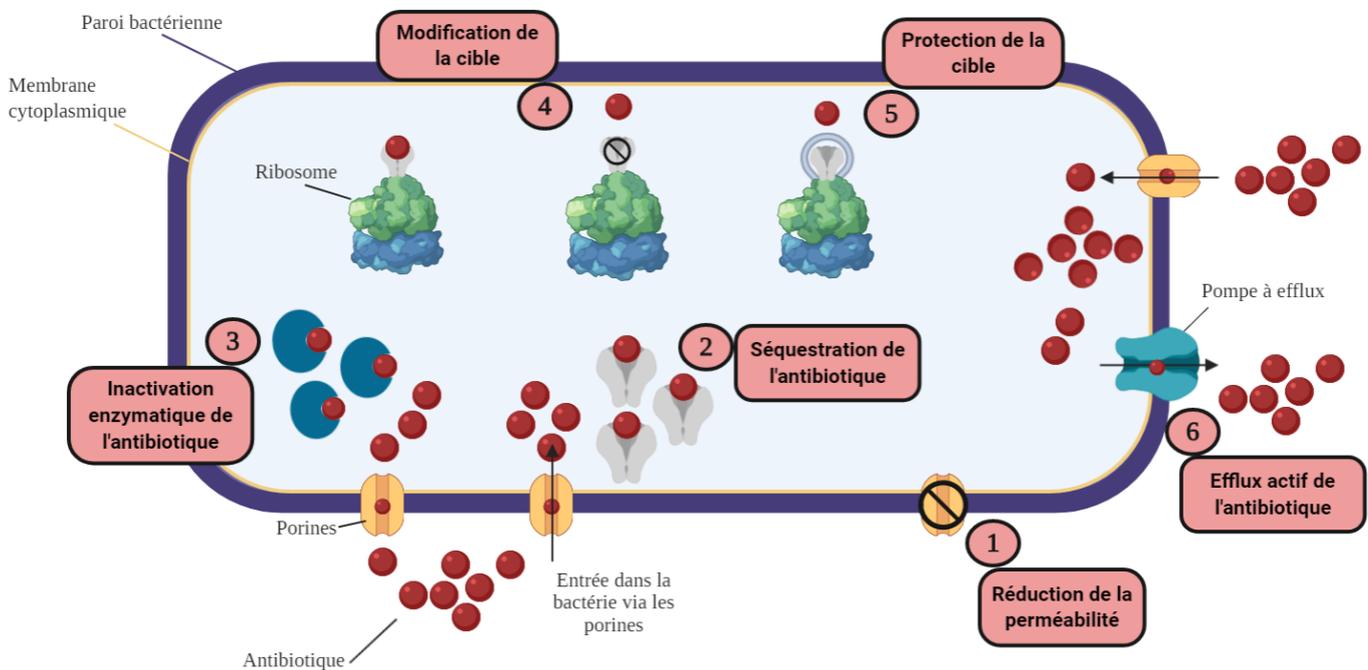
On parle de résistance naturelle lorsque celle-ci est caractéristique d'une espèce bactérienne. Elle est portée par le chromosome ce qui lui permet d'être stable et transmissible à la descendance. Elle représente également un caractère d'identification des bactéries et permet de définir le phénotype « sauvage » d'une bactérie. En ce qui concerne *S. aureus*, peu de résistances naturelles existent, elles concernent seulement l'aztréonam, des quinolones de 1<sup>ère</sup> génération, ainsi que des peptides cycliques (polymixine B et E et colistine) (Donnio P.-Y., 2010 ; Muylaert A., *et al.*, 2012).

## b) Résistances acquises

La résistance acquise, contrairement aux résistances naturelles, est propre à certaines souches de l'espèce et a la particularité de se propager de façon importante. Elle peut être portée par le chromosome suite à une mutation ayant lieu spontanément pendant la réplication ou par les éléments génétiques mobiles acquis par la bactérie, ce qui est le plus fréquent. Cette résistance constitue un caractère épidémiologique et permet ici de définir un phénotype de résistance acquise des bactéries (Muylaert A., *et al.*, 2012).

### 2- Mécanisme de résistance aux antibiotiques

Il existe quatre grands types de mécanismes de résistance aux antibiotiques (Figure 12) :



**Figure 12 : Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques mis en place par les bactéries (adaptée de Muylaert A., *et al.*, 2012 et réalisée sur Biorender.com).**

➤ la modification de l'incorporation : Ce type de résistance touche les phases de transport de l'antibiotique jusqu'à son site d'action.

La bactérie peut :

- empêcher un antibiotique de rentrer par mutation au niveau des porines conduisant à leur perte, à une réduction de leur taille ou à une diminution de leur expression (exemple de OmpF chez *Escherichia coli* entraînant une réduction de sensibilité aux quinolones,  $\beta$ -lactamines, tétracyclines et chloramphénicol) (Muylaert A., *et al.*, 2012)

ou par déficit d'un transport actif (exemple d'un déficit de transport du glycérol-3-phosphate et résistance à la phosphomycine).

- forcer la sortie de l'antibiotique par surexpression de pompes à efflux. Certaines sont très spécifiques (les pompes SRD pour Résistance spécifique aux médicaments) et d'autres agissent sur une multitude de molécules (les pompes MDR pour Résistance multiple aux médicaments, comme MexAB-OprM chez *Pseudomonas aeruginosa* ou QacA chez *S. aureus*) (Muylaert A., *et al.*, 2012).
  - piéger l'antibiotique en augmentant la production de sa cible ou en produisant une autre molécule avec une affinité pour ce dernier. Cela entraîne une diminution de l'antibiotique à l'état libre au niveau de la cible comme la résistance de bas niveau aux glycopeptides chez certaines souches de *S. aureus* (Muylaert A., *et al.*, 2012).
- l'inactivation enzymatique : Cette résistance touche les familles majeures d'antibiotiques ( $\beta$ -lactamines, aminosides, phénicolés) et résulte obligatoirement de l'acquisition de matériel génétique exogène. Le gène acquis code ainsi pour une enzyme inactivant l'antibiotique par clivage ou addition d'un groupement chimique, empêchant ainsi la fixation sur sa cible et provoquant une perte d'activité. L'enzyme peut également modifier directement sa cible d'action même si cela est plus rare (Nikaido H., 2009 ; Donnio P.-Y., 2010 ; Muylaert A., *et al.*, 2012).
- la modification de la cible : la modification de la conformation des molécules cibles entraînera une diminution de l'affinité de l'antibiotique pour sa cible (exemple de résistance à la méticilline, à la rifampicine ou aux fluoroquinolones) (Le Loir Y., *et al.*, 2010). On parle également de protection notamment contre les tétracyclines où la résistance est due ici à un encombrement stérique au niveau du ribosome (Muylaert A., *et al.*, 2012).
- le contournement métabolique : Ce mécanisme est décrit pour les antibiotiques agissant par blocage d'un point précis d'une voie métabolique. Il consiste notamment en un détournement des voies métaboliques visées par un apport de métabolites exogènes par exemple (Donnio P.-Y., 2010).

### 3- Causes et conséquences de l'émergence de résistances

A l'inverse de la plupart des idées reçues, ce ne sont pas les antibiotiques qui créent les résistances. En effet, les gènes de résistances aux antimicrobiens ainsi que les mécanismes de transfert associés sont probablement antérieurs à l'introduction des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire. Des bactéries résistantes vieilles de plus de 2000 ans ont ainsi pu être isolées d'un glacier canadien des régions arctiques hautes (Muylaert A., *et al.*, 2012). De plus, des microorganismes résistants ont pu être identifiés dans des collections de souches réalisées avant l'ère des antibiotiques. Comme cela a été décrit précédemment, une bactérie peut devenir résistante à un antibiotique par mutation sur le chromosome ou par acquisition de gènes de résistance exogènes. Cependant il s'agit bien de l'utilisation de l'antibiotique en question qui fait émerger cette résistance en sélectionnant les mutants possédant un facteur de résistance et en exerçant une pression de sélection à même de maintenir le gène de résistance au sein de la population mutante (Levy S.B., *et al.*, 2004 ; Muylaert A., *et al.*, 2012). De plus, on peut même dire que c'est le mésusage des antibiotiques qui en est la première cause. Ce mésusage peut se traduire par différentes situations :

- une prescription inutile d'antibiotiques comme cela a pu être fait pour traiter les infections virales avant les campagnes de préventions « Les antibiotiques c'est pas automatique ».
- la prescription d'antibiotiques à large spectre au lieu d'utiliser des thérapeutiques ciblées et à l'inverse l'utilisation d'antibiotiques à spectre étroit dans de mauvaises indications.
- de mauvaises posologies de traitement ou un traitement tardif pour des patients atteints d'infections sévères ou encore une durée de traitement non adaptée.

Cependant, à ce mésusage dû au praticien on peut ajouter l'automédication de certains patients qui, n'ayant pas utilisé l'ensemble des comprimés de leur prescription, vont l'utiliser plus tard dans une mauvaise indication. En dehors du secteur médical, un autre domaine favorise l'émergence de résistances, il s'agit du monde agricole. En effet tout comme pour le mésusage des antibiotiques chez l'Homme, il existe également un mésusage en médecine vétérinaire avec notamment une administration de médicaments sans information sur l'agent pathogène cible ou sur la sensibilité aux antibiotiques, des durées prolongées de traitements ainsi que des co-expositions à plusieurs antibiotiques. Cependant, contrairement aux soins de santé, il existe peu de programmes ou de réglementations pour améliorer ces conditions. De plus, l'utilisation d'antibiotiques à faible dose en tant que facteurs de croissance dans

l'élevage intensif a grandement contribué à la sélection de mutants résistants (Muylaert A., *et al.*, 2012). Cet usage est désormais interdit au sein de l'Union Européenne depuis le 1<sup>er</sup> Janvier 2006, et seule l'utilisation en prophylaxie ou en thérapeutique est autorisée (UE, 2005). Enfin, la dernière cause de l'émergence de résistances est due aux activités humaines telles que la production industrielle de médicaments, les rejets hospitaliers ou des stations d'épuration ainsi que le traitement insuffisant des systèmes d'assainissement qui ont entraîné, au cours du temps, le rejet dans l'environnement de molécules antibiotiques en quantités importantes. Les antibiotiques ainsi que leurs métabolites et leurs produits de dégradation sont détectables dans tous les compartiments de l'environnement (eaux, sols...), en qualité et quantité extrêmement variables. La persistance dans l'environnement des molécules antibiotiques est, elle aussi, extrêmement variable, en fonction de la quantité rejetée, du milieu récepteur et des propriétés intrinsèques des molécules (biodégradabilité, hydrophobicité, capacité d'absorption). Les stations d'épuration classiques ne sont pas conçues pour éliminer les antibiotiques. Si certains sont dégradés, leurs métabolites ou leurs produits de dégradation peuvent être rejetés dans les eaux, d'autres s'adsorbent sur la matière particulaire et peuvent rejoindre les sols en cas d'épandage. La présence de molécules d'antibiotiques, de leurs métabolites ou de leurs produits de dégradation exerce une pression de sélection sur les micro-organismes favorisant la persistance de bactéries résistantes (ANSM, 2018).

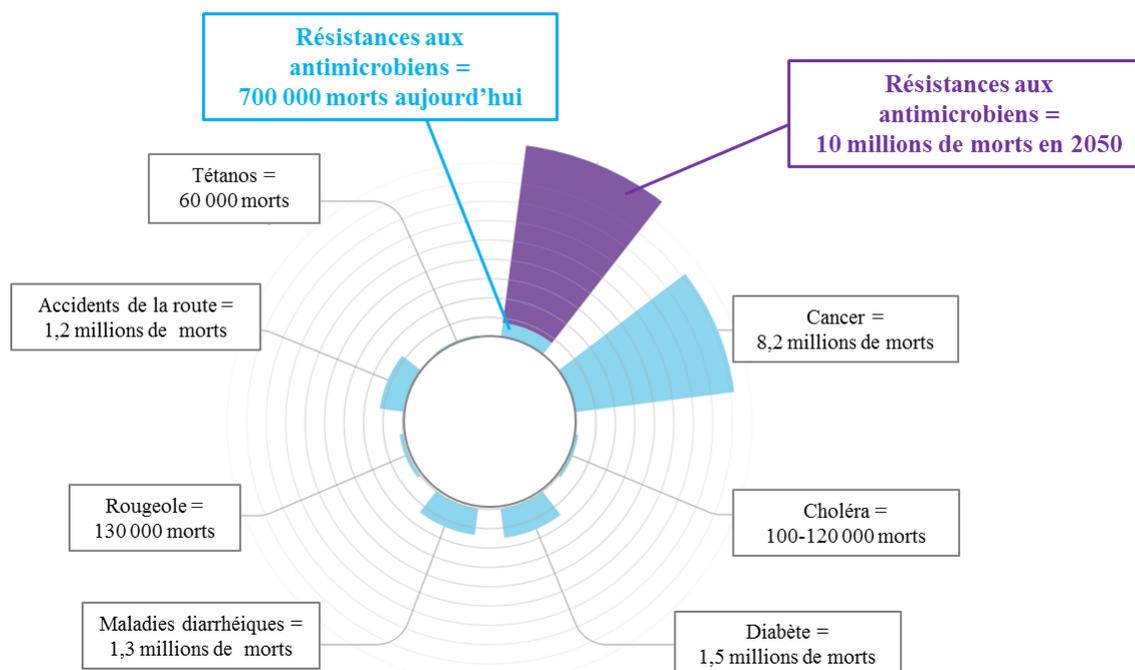
L'usage à long terme des antibiotiques modifie l'écologie microbiologique en faveur des éléments les moins sensibles de la population bactérienne. Cela conduit ainsi à la prédominance des bactéries résistantes, que celles-ci soient commensales ou opportunistes, au niveau de la flore normale (Levy S.B., *et al.*, 2004 ; Muylaert A., *et al.*, 2012). Ensuite, la propagation de ces mutants résistants ainsi que de leurs déterminants de résistances à d'autres hôtes et d'autres localisations géographiques aggravent le problème. Porter et répliquer des gènes de résistance qui ne sont plus nécessaires est défavorable pour la bactérie ce qui devrait normalement, en absence de pression de sélection, avantager les bactéries sensibles et permettre un retour à un niveau de sensibilité global (Muylaert A., *et al.*, 2012). Dans les faits, ce n'est pas aussi simple puisqu'on observe le regroupement de plusieurs gènes de résistances sur les éléments génétiques mobiles permettant ainsi une co-sélection de ces gènes. De plus ces gènes peuvent également se retrouver liés à d'autres gènes avantageux pour la bactérie comme des gènes de virulence ou de résistance à des antiseptiques, désinfectants ou métaux lourds (Levy S.B., *et al.*, 2004 ; Muylaert A., *et al.*, 2012). La prédominance de ces souches dans la flore commensale va entraîner un risque accru de déclencher des infections avec des

souches résistantes et engendrer des problèmes de santé publique. Tout d'abord, on pourra observer un retardement ou un échec du traitement classique par mauvais choix d'antibiotiques conduisant à une diminution des chances de guérison suivie de possibles complications voir du décès du patient. De plus, la plupart des traitements antibiotiques de seconde intention sont souvent moins efficaces et engendrent plus d'effets indésirables que ceux de première intention. A ces problèmes thérapeutiques on peut ajouter un problème économique puisque les traitements de seconde intention sont souvent plus onéreux. De plus, les éventuelles complications qui doivent être prises en charge ainsi que l'augmentation du temps d'hospitalisation font encore augmenter les dépenses de santé liées à la résistance aux antibiotiques.

#### **4- Épidémiologie et prévisions**

Pour souligner l'importance de ces résistances aux antibiotiques, et sensibiliser les politiques sur ce problème majeur de santé publique, plusieurs études ont été réalisées donnant lieu à deux rapports principaux : (i) un rapport portant sur les chiffres de la résistance aux antimicrobiens au niveau mondial (O'Neil J., 2016) et (ii) le rapport du groupe de travail spécial pour la préservation des antibiotiques axé sur les chiffres pour la France (Rapport France 2015).

Pour commencer, le rapport O'Neil se base sur une étude de 19 mois et la compilation de 8 documents, chacun se concentrant sur un aspect spécifique de la résistance aux antimicrobiens. Dans ce rapport, il précise qu'actuellement, une estimation basse fait état de 700 000 morts par an dans le monde du fait de la résistance aux antimicrobiens (antibiotiques, antifongiques, antiviraux et antiparasitaires). De plus, si nous ne changeons pas de direction face à la montée de la résistance aux antibiotiques, O'Neil J. a estimé, sur la base de scénarios d'augmentation de la résistance aux médicaments pour six agents pathogènes jusqu'en 2050, que celle-ci représenterait 10 millions de morts par an dans le monde, soit 25% de plus que le cancer actuellement (Figure 13). En effet, en plus des morts directs, certaines procédures médicales clés (telles que les chirurgies thoraciques et intestinales, les césariennes, les remplacements articulaires et les traitements qui dépriment le système immunitaire, comme la chimiothérapie pour cancer) pourrait devenir trop dangereuse à exécuter. Ajouter à ces problèmes « humains », il est estimé que la résistance aux antimicrobiens coûterait 100 000 milliards de dollars à l'économie mondiale.



**Figure 13 : Principales causes de morts dans le monde actuellement (adapté de O'Neil J., 2016).**

Le rapport du groupe de travail spécial pour la préservation des antibiotiques nous donne quant à lui un aperçu de la résistance aux antibiotiques au niveau national. Dans ce rapport, ils se sont tout d'abord appuyés sur les chiffres du rapport Burden BMR de l'Institut de veille sanitaire (InVS, 2015). Ce rapport a été effectué en s'intéressant à 8 couples Bactérie-Antibiotique faisant partie des ESKAPE :

- *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM)
- *Enterococcus faecium* et *Enterococcus faecalis* résistants aux glycopeptides (ERG)
- *Escherichia coli* résistants aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (*E.coli*C3GR)
- *Klebsiella Pneumoniae* résistants aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (*Kp*C3GR)
- *Pseudomonas aeruginosa* résistants aux carbapénèmes (PyoRC)
- *Klebsiella Pneumoniae* résistants aux carbapénèmes (KpRC)
- *Acinetobacter spp.* résistants à l'imipénème (AciRC)

Ils ont ainsi estimé à environ 158 000 le nombre d'infections provoquées par des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques (BMR) en France en 2012. La majorité de ces infections sont des infections à SARM (33% des cas), à *E. coli* résistant aux C3G (32% des cas) et à *Pseudomonas aeruginosa* résistant aux carbapénèmes (23% des cas). De plus, le

nombre de morts imputables à ces BMR sur cette période est estimé à 12 500. La majorité étant attribuable aux infections à *Pseudomonas aeruginosa* résistant aux carbapénèmes (53% des décès), à SARM (18% des décès) et à *E. coli* résistant aux C3G (16% des décès). De plus, le rapport du groupe de travail spécial pour la préservation des antibiotiques, qui s'appuie sur les chiffres du centre européen de prévention et de contrôle des maladies (ECDC, 2009), évalue le coût sociétal de l'antibiorésistance à 1,5 milliards d'euro par an en Europe. Ce coût est tout d'abord lié à la prise en charge médicale des patients (910 millions) ainsi qu'à la perte de productivité des patients infectés (600 millions). Pour ce qui est des pertes économiques au niveau national, une étude française a calculé que le surcoût lié aux infections à bactérie résistante s'élève à 1100 € en moyenne par séjour hospitalier, ce qui conduit à estimer pour l'ensemble de la population un surcoût annuel de près de 290 millions d'euros (Touat M., *et al.*, 2019).

### **C/ Adaptation aux traitements antibiotiques : le parfait exemple de *S. aureus***

L'importance de *S. aureus* en pathologie humaine et vétérinaire n'est plus à démontrer de nos jours. Cependant, l'introduction au cours du siècle dernier des antibiotiques aurait dû permettre de traiter les infections staphylococciques de manière relativement simple du fait du peu de résistances naturelles de cette espèce bactérienne. Mais c'était sans compter sur la capacité d'adaptation de *S. aureus* qui a su développer des mécanismes de résistance grâce notamment à la grande plasticité génomique de cette espèce. L'étude de quelques exemples illustre de façon criante la rapidité d'adaptation de *S. aureus* vis-à-vis des traitements antimicrobiens.

#### **1- Pénicilline et méticilline**

La découverte de la pénicilline en 1928 puis son développement en 1940 a marqué le début de « l'ère des antibiotiques ». La pénicilline, comme toutes les  $\beta$ -lactamines, est définie par la présence d'un anneau  $\beta$ -lactame essentiel à son activité (Vestergaard M., *et al.*, 2019). Pour faire simple, les  $\beta$ -lactamines inhibent la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane en bloquant la formation des ponts inter-peptidiques via une interaction avec les protéines liant les pénicillines (PLP). Cela est rendu possible grâce à l'analogie de structure entre la pénicilline et le précurseur du peptidoglycane, le dipeptide terminal D-Ala-D-Ala (Vestergaard M., *et al.*, 2019). L'inhibition de la synthèse de ce peptidoglycane conduit ensuite à un arrêt de la croissance

bactérienne. De plus, on observe également un effet bactéricide qui semble plus complexe que la simple inhibition de l'activité des PLP. En effet la pénicilline induit un dysfonctionnement toxique de l'appareil de biosynthèse de la paroi qui implique un cycle continu de synthèse et d'autolyse (Foster T.J., 2017). Cependant, aussitôt après son introduction, en 1942, les premiers cas de résistance à la pénicilline sont observés (Rammelkamp C.H., *et al.*, 1942). La prévalence de ces bactéries résistantes à la pénicilline a ensuite augmenté de manière spectaculaire si bien que, 10 ans après son introduction, environ 80% des souches isolées étaient résistantes (Schito G.C., 2006 ; Vestergaard M., *et al.*, 2019). Cette résistance est due à l'acquisition par les bactéries du gène *blaZ*. Ce gène code pour une  $\beta$ -lactamase qui inactive la pénicilline en venant hydrolyser son cycle  $\beta$ -lactame (Schito G.C., 2006 ; Foster T.J., 2017 ; Vestergaard M., *et al.*, 2019).

Afin de contrecarrer cette épidémie de résistance, la méticilline, une  $\beta$ -lactamine semi-synthétique et résistante aux  $\beta$ -lactamases, a été développée et introduite en pratique clinique en 1961 (Schito G.C., 2006 ; Vestergaard M., *et al.*, 2019). Malheureusement, un peu plus tard cette même année, les premiers cas de résistances étaient rapportés, marquant le début de la guerre contre les *S. aureus* résistants à la méticilline (SARM) (Jevons M.P., 1961 ; Barber M., 1961). Cette résistance est due à l'acquisition du gène *mecA* codant pour une PLP2a, une transpeptidase alternative possédant une faible affinité pour les  $\beta$ -lactamines (Schito G.C., 2006 ; Foster T.J., 2017 ; Vestergaard M., *et al.*, 2019). En effet, le site actif de cette PLP2a est situé dans une poche rendant son accès inaccessible à la méticilline (Foster T.J., 2017).

## 2- Vancomycine

Initialement conçu pour lutter contre les bactéries résistantes à la pénicilline, la vancomycine a été découverte en 1952 mais introduite en 1958 après avoir été approuvée par la Food and Drug Administration (FDA) (Geraci J.E., *et al.*, 1956 ; Levine D.P., 2006 ; Schito G.C., 2006). Cependant avec l'arrivée de la méticilline, elle fut seulement utilisée pour les cas d'allergie sévère aux  $\beta$ -lactamines (Levine D.P., 2006). Cependant, avec l'émergence des SARM et notamment leur propagation à travers le monde dans les années 1980, la vancomycine devint le traitement de référence (Levine D.P., 2006 ; Vestergaard M., *et al.*, 2019). Ce glycopeptide empêche le renouvellement du peptidoglycane en se liant au dimère terminal D-alanyl-D-alanine. Mais l'accélération de l'utilisation de la vancomycine provoqua l'apparition inévitable de souches résistantes chez *S. aureus* (VRSA) en 2002. Ces souches furent cependant précédées par des bactéries à résistance intermédiaire (VISA) dès 1996 au Japon (Hiramatsu K., *et al.*, 1997 ; Schito G.C., 2006). Fait intéressant, aucune des deux

souches n'a dérivé de l'autre, elles ont chacune acquis un mécanisme de résistance propre. Pour ce qui concerne les VISA, la diminution de la sensibilité à la vancomycine est due à une accumulation de mutation conduisant à un ou plusieurs phénotypes caractéristiques (Vestergaard M., *et al.*, 2019). Cela inclut une augmentation de l'épaisseur de la paroi cellulaire et une modification de son architecture empêchant une bonne diffusion de la vancomycine. A cela s'ajoute une synthèse accrue de peptidoglycanes exposant plus de résidus D-Ala-D-Ala permettant la fixation et le piégeage de la vancomycine (Schito G.C., 2006 ; Foster T.J., 2017 ; Vestergaard M., *et al.*, 2019). Dans le cas des VRSA, ils ont acquis un mécanisme de résistance issu des entérocoques résistants à la vancomycine (VRE) codé par l'opéron *vanA*. Cet opéron code pour des gènes provoquant la synthèse d'un précurseur modifié de peptidoglycane possédant un D-alanyl-D-lactate en lieu et place du D-alanyl-D-alanine et l'hydrolyse de ce dernier, empêchant ainsi l'inhibition de la synthèse de la paroi par la vancomycine (Schito G.C., 2006 ; Foster T.J., 2017 ; Vestergaard M., *et al.*, 2019).

### 3- Fluoroquinolones

Les fluoroquinolones, développées dans les années 1980, sont la 2<sup>nd</sup> génération de quinolones et représentent la classe d'antibiotiques entièrement synthétique la plus efficace (Ito A., *et al.*, 1980 ; Foster T.J., 2017). Elles sont caractérisées par la présence d'un fluor en C6 permettant une amélioration du spectre d'action et de l'efficacité par rapport à la 1<sup>ère</sup> quinolone, l'acide nalidixique découvert en 1962 (Atlas E., *et al.*, 1969) . Chez *S. aureus*, les cibles des fluoroquinolones sont (i) les topoisomérases de type IV, favorisant la séparation des chromosomes filles entrelacés après la réplication et (ii) l'ADN gyrase, essentielle pour la viabilité car elle supprime les super-bobines positives qui s'accumulent pendant la réplication (Foster T.J., 2017 ; Vestergaard M., *et al.*, 2019). On parle ici d'antibiotiques bactéricides puisque le blocage de la réplication entraîne la mort des bactéries. Cependant, ici aussi, l'introduction de la ciprofloxacine en 1985 dans le but d'éradiquer la colonisation par les SARM (Mulligan M.E., *et al.*, 1987 ; Piercy E.A., *et al.*, 1989) a été rapidement suivie de résistances observées dans les années qui suivirent (Mulligan M.E., *et al.*, 1987 ; Piercy E.A., *et al.*, 1989 ; Maple P., *et al.*, 1989 ; Blumberg H.M., *et al.*, 1991). Ces résistances sont de deux types : (i) des mutations au niveau du site de fixation sur les topoisomérases de types IV et sur l'ADN gyrase et (ii) une augmentation de l'expression des pompes à efflux endogènes (Foster T.J., 2017 ; Vestergaard M., *et al.*, 2019). Les mutations ont lieux préférentiellement sur le gène *gyrA* (pour la gyrase) et sur le gène *grrA* (pour la topoisomérase de type IV) et une combinaison des deux provoque une synergie avec des niveaux de résistances plus élevés

(Vestergaard M., *et al.*, 2019). En ce qui concerne les pompes à efflux, trois d'entre elles peuvent évacuer les fluoroquinolones, NorA pour les molécules hydrophiles (norfloxacin et ciprofloxacine); NorB et NorC pour les molécules hydrophobes (sparfloxacine et morfloxacine). La surexpression de ces pompes conduit à une sensibilité diminuée aux fluoroquinolones (Foster T.J., 2017 ; Vestergaard M., *et al.*, 2019).

Grâce à ces trois exemples pris parmi tant d'autres, associés à la difficulté actuelle à mettre au point de nouvelles molécules antibiotiques efficaces ainsi que le faible nombre de nouveaux antibiotiques mis sur le marché ces dernières années, on comprend l'importance de ce fléau pour le traitement des infections ainsi que la nécessité de trouver de nouvelles thérapeutiques alternatives.

## **D/ Alternatives aux traitements antibiotiques**

En 2014, l'OMS déclarait que la résistance aux antimicrobiens était une priorité de santé publique. En effet, si aucune mesure n'était prise, la résistance aux antimicrobiens tuerait plus de personnes que le cancer d'ici 2050. C'est pourquoi le développement de thérapies alternatives pour le traitement des infections aux bactéries multi-résistantes aux antibiotiques est nécessaire. Certaines stratégies à l'étude actuellement et ayant obtenues des résultats plus ou moins importants sont développées ci-dessous.

### **1- La phagothérapie**

La phagothérapie, comme son nom l'indique, consiste à utiliser les bactériophages pour tuer les bactéries pathogènes. Cette technique est étudiée depuis la première moitié du 20<sup>ème</sup> siècle et notamment depuis la découverte officielle du premier phage en 1917 par Félix D'Herelle (D'Herelle F., 1917 ; Kutateladze M., *et al.*, 2008). Cependant, avec l'avènement des antibiotiques, seule l'Union soviétique et notamment l'institut Eliava en Georgie a continué à l'étudier et a réussi à traiter des milliers de personnes pour des infections cutanées (Kutateladze M., *et al.*, 2008). La phagothérapie présente de nombreux avantages tels qu'une production à bas prix, une forte spécificité (prévient les dommages collatéraux sur les bactéries commensales et les cellules eucaryotes) ainsi qu'une rapide prolifération dans la bactérie (Fernebro J., 2011 ; Allen H.K., *et al.*, 2014 ; Mulani M.S., *et al.*, 2019). De plus, l'avantage des phages est qu'ils développent de nouveaux cycles permettant de prendre le dessus sur les bactéries pendant qu'ils mutent aux côtés de leur hôte. Cependant, quelques points sont à prendre en compte pour le développement à grande échelle de la phagothérapie.

Tout d'abord la spécificité qui est un avantage peut aussi être considérée comme un inconvénient puisqu'il faut avoir bien identifié la bactérie responsable de l'infection pour pouvoir la traiter efficacement. Une des solutions possibles est l'utilisation de cocktails de phages appartenant à différentes familles ou groupes, permettant une action sur différentes souches ou espèces. De plus, cela permettrait également de limiter l'émergence de bactéries résistantes aux bactériophages (Fernebrot J., 2011 ; Allen H.K., *et al.*, 2014 ; Mulani M.S., *et al.*, 2019). Une autre solution envisagée serait de combiner l'utilisation des phages avec celles des antibiotiques afin d'obtenir un effet synergique ce qui a déjà pu être montré *in vitro* (Lin Y., *et al.*, 2018). Pour le moment l'utilisation de phages en médecine est indiquée pour le traitement des infections cutanées ainsi que des infections des plaies (Fernebrot J., 2011 ; Allen H.K., *et al.*, 2014 ; Mulani M.S., *et al.*, 2019). Ils sont également utilisés aux USA pour le traitement de pathogènes responsables d'infections alimentaires chez l'animal (Fernebrot J., 2011).

## 2- Peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens (AMPs) sont des composants essentiels de l'immunité innée. Ils sont généralement petits, chargés positivement et produits par tous les organismes luttant contre des bactéries (protozoaires, bactéries, archées, champignons, plantes et animaux) (Mulani M.S., *et al.*, 2019). Leur capacité à interagir et lyser les membranes cellulaires bactériennes ainsi que leur large spectre d'action en fait une bonne alternative pour combattre les bactéries multi-résistantes (Allen H.K., *et al.*, 2014 ; Mulani M.S., *et al.*, 2019). De plus, comme ces AMPs créent des dommages cellulaires, le risque de développer des résistances est limité contrairement aux antibiotiques. Malheureusement, leur utilisation thérapeutique est limitée pour un certain nombre du fait de leur toxicité pour les cellules eucaryotes à fortes concentrations ainsi que de leur demi-vie réduite dans les fluides corporels humains (Fernebrot J., 2011 ; Allen H.K., *et al.*, 2014 ; Mulani M.S., *et al.*, 2019 ; Nicolas I., *et al.*, 2019). Certains, en revanche échappent à ces problèmes comme les bactériocines issues de bactéries dont la plus connue est la Nisine utilisée dans la conservation des aliments ou les Mangainines produites par des grenouilles (Fernebrot J., 2011 ; Allen H.K., *et al.*, 2014). Cependant, l'utilisation de certaines bactériocines comme la thuricine a montré l'apparition de résistances. L'usage de mélange de bactériocines, comme pour la phagothérapie, est envisagé pour limiter l'apparition de ces résistances (Allen H.K., *et al.*, 2014). Une autre stratégie pour lutter contre la toxicité des AMPs, consiste à les modifier chimiquement afin de diminuer leur toxicité tout en augmentant leur activité bactéricide, dans ce cas on parle de

peptidomimétiques (Nicolas I., *et al.*, 2019). Ainsi, au laboratoire, un peptide toxique de *S. aureus* a été modifié chimiquement afin d'augmenter son effet bactéricide contre les *S. aureus* résistants à la méticilline, contre *Pseudomonas aeruginosa* et contre *Escherichia coli* (Nicolas I., *et al.*, 2019). Dans le même temps, ces modifications ont également permis de diminuer la toxicité envers les érythrocytes humains. Les doses utilisées sont ainsi 50 fois plus faibles que celles provoquant des signes de toxicité (Nicolas I., *et al.*, 2019). Actuellement, les AMPs sont indiqués comme traitements topiques, conservateurs alimentaires mais également pour le traitement d'infections à bactéries multi-résistantes comme les entérocoques résistants à la vancomycine (VRE), *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* (Fernebrot J., 2011 ; Allen H.K., *et al.*, 2014). Pour résumer, en raison de leurs activités antibactériennes à large spectre les AMPs offrent une alternative pleine d'espoir aux traitements antibiotiques. Cependant, des travaux restent nécessaires pour approfondir la compréhension de leur structure et de leur interaction avec les cellules bactériennes (Mulani M.S., *et al.*, 2019).

### 3- Stratégies anti-virulentes

Les stratégies anti-virulentes représentent une stratégie totalement différente des autres puisqu'ici, le but n'est plus d'interférer avec les processus vitaux de la bactérie afin de l'éliminer mais plutôt de la désarmer. Ainsi, en sabotant la fonction des facteurs associés à la virulence pendant l'infection, les bactéries envahissantes sont potentiellement laissées dans un état sensible à la clairance immunitaire ou à la destruction par les antibiotiques (Fernebrot J., 2011 ; Totsika M., 2016 ; Johnson B.K., *et al.*, 2018). Les premiers exemples de l'approche anti-virulente comprennent principalement l'inactivation des toxines bactériennes, retrouvées par exemple dans le tétanos, le botulisme et la diphtérie, par administration d'anticorps neutralisants aux patients après l'exposition (Totsika M., 2016). Les toxines sont des cibles évidentes pour les thérapies anti-virulentes puisqu'elles sont généralement produites par des espèces pathogènes et sont des médiateurs clés de la pathologie des maladies graves. Une fois ces toxines éliminées de l'équation, la défense immunitaire est capable de gérer l'infection (Fernebrot J., 2011 ; Totsika M., 2016). A l'inverse, il a également été émis comme hypothèse que certains peptides naturels, produits par les bactéries, et possédant des effets anti-virulents, pourraient être utilisés comme alternatives aux antibiotiques ou comme adjuvants à ces derniers. C'est notamment le cas des deux exemples : le peptide KdpF et le peptide MgtR. Il a tout d'abord été montré que la surproduction constitutive du peptide membranaire KdpF entraînait une altération de la morphologie en cordon de *Mycobacterium bovis* BCG ainsi qu'une réduction de sa croissance intramacrophagique (Gannoun-Zaki L., *et al.*, 2013). Il a

ensuite été montré que cette diminution de croissance intramacrophagique était due à une augmentation de la sensibilité au stress nitrosant plutôt qu'à une modification de la perméabilité membranaire de *M. bovis* (Rosas Olvera M., *et al.*, 2017). Enfin, l'incubation de *M. bovis* avec un peptide synthétique KdpF entraîne une sensibilité au stress nitrosant et une réduction de la réplication bactérienne intramacrophagiques similaires à celles observées par la surproduction endogène de KdpF. Bien que préliminaire ces résultats semblent prometteurs pour le développement d'une molécule anti-virulente efficace (Rosas Olvera M., *et al.*, 2017). Le peptide MgtR quant à lui, a été proposé comme stratégie anti-virulente car il cible le facteur MgtC, conservé dans plusieurs pathogènes bactériens (Alix E., *et al.*, 2007 ; Belon C., *et al.*, 2014 ; Belon C., *et al.*, 2015 ; Belon C., *et al.*, 2015). Ce facteur, décrit pour la première fois chez *Salmonella enterica* serovar typhimurium, est un facteur critique pour la survie intramacrophagique de divers agents pathogènes intracellulaires (*Salmonella spp.*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella suis* et *Burkholderia cenocepacia*) (Alix E., *et al.*, 2007 ; Alix E., *et al.*, 2008 ; Belon C., *et al.*, 2015 ; Rosas Olvera M., *et al.*, 2019), ainsi que de certains pathogènes extracellulaires pouvant résider temporairement dans les cellules tels que *Yersinia pestis* et *Pseudomonas aeruginosa* (Belon C., *et al.*, 2015 ; Belon C., *et al.*, 2016 ; Moussouni M., *et al.*, 2019). Comme dans l'étude précédente, l'utilisation de peptides synthétiques de *S. typhimurium*, ajoutés dans le milieu de culture, conduit également à une diminution de la réplication intramacrophagique de *S. typhimurium* (Rosas Olvera M., *et al.*, 2017). De plus, cet effet est également observé lors de l'ajout de peptides synthétiques de *S. typhimurium* dans le milieu de culture de *M. tuberculosis* et surtout, de *P. aeruginosa*, ne possédant pas naturellement le gène *mgtR* (Belon C., *et al.*, 2015 ; Belon C., *et al.*, 2016 ; Belon C., *et al.*, 2016b ; Moussouni M., *et al.*, 2019). Ces résultats indiquent ainsi qu'un peptide hydrophobe synthétique, issu d'un peptide bactérien naturel, pourrait limiter la pathogénèse chez plusieurs espèces bactériennes différentes (Alix E., *et al.*, 2007 ; Alix E., *et al.*, 2008 ; Belon C., *et al.*, 2014 ; Belon C., *et al.*, 2015 ; Belon C., *et al.*, 2016 ; Moussouni M., *et al.*, 2019 ; Rosas Olvera M., *et al.*, 2019).

Les autres cibles principalement étudiées de la recherche anti-virulente sont l'inhibition de l'adhésion et de la colonisation bactérienne, la régulation de la virulence passant par le Quorum-Sensing et l'inhibition de la production de biofilms (Fernebro J., 2011 ; Totsika M., 2016 ; Brannon J.R., *et al.*, 2016 ; Johnson B.K., *et al.*, 2018). Lors de leur introduction dans une niche, les agents pathogènes sont confrontés au défi de rester « sur place » assez longtemps pour établir une infection. L'adhésion au niveau des cellules hôtes étant une étape critique dans la colonisation bactérienne, elle représente une cible

prometteuse. Pour cela, les stratégies sont notamment (i) de cibler les systèmes de régulation régissant l'expression des adhésines, (ii) de perturber la sécrétion des adhésines et leur assemblage, ou (iii) de bloquer la liaison entre l'adhésine bactérienne et le récepteur de la cellule hôte (Fernebro J., 2011 ; Brannon J.R., *et al.*, 2016 ; Johnson B.K., *et al.*, 2018). L'établissement d'une infection réussie de l'hôte par des bactéries pathogènes nécessite également des actions coordonnées entre les membres de la population bactérienne infectante afin notamment d'éviter les dépenses métaboliques excessives. Ces actions synchronisées peuvent être réalisées grâce à des systèmes de communication entre les bactéries et sont, par conséquent, des cibles attrayantes pour le développement de stratégies thérapeutiques anti-virulentes (Brannon J.R., *et al.*, 2016 ; Johnson B.K., *et al.*, 2018 ; Martínez O.F., *et al.*, 2019). Le système de Quorum Sensing (QS) est le plus étudié et le plus distribué parmi les bactéries. Il est basé sur la production et la sécrétion dans le milieu externe de molécules de signalisation chimique (appelées auto-inducteurs), qui vont s'accumuler jusqu'à atteindre un seuil de concentration détecté par les bactéries. Une fois ce seuil atteint, un changement dans le profil d'expression des gènes a lieu en réponse aux molécules de signalisation détectées. Les stratégies de perturbation et de manipulation des réseaux de QS visent à interférer dans la biosynthèse ou la détection du signal, ou à l'inactiver (Brannon J.R., *et al.*, 2016 ; Martínez O.F., *et al.*, 2019). L'avantage de cette stratégie est qu'elle ne se trouve pas dans les cellules de mammifères, limitant les effets potentiels hors cible contre les facteurs associés à l'hôte. De plus, l'inhibition du QS va aveugler le pathogène dans la détection et la coordination d'une réponse adaptative aux signaux de l'hôte, le rendant sensible aux traitements antibiotiques et à la clairance immunitaire (Johnson B.K., *et al.*, 2018). L'inhibition du QS permet également d'empêcher la formation de biofilms par les bactéries, diminuant ainsi leur capacité à devenir plus résistantes aux antibiotiques et aux réponses immunitaires de l'hôte (Fernebro J., 2011).

Pour conclure, ces stratégies anti-virulentes ont l'avantage de ne pas perturber la croissance des agents pathogènes, ce qui permet d'éviter ou de minimiser le développement de résistances en exerçant une faible pression de sélection (Totsika M., 2016). Leur but est d'imposer aux agents pathogènes un coût métabolique trop important pour qu'ils puissent établir une infection. En outre, il est peu probable que les bactéries commensales produisent les cibles de ces stratégies réduisant ainsi les dommages collatéraux imposés au microbiote de l'hôte (Brannon J.R., *et al.*, 2016). Cet axe de recherche antibactérien a de beau jour devant lui quand on voit le nombre de facteurs de virulence développés par les bactéries au cours de l'infection.

### III] Facteurs de virulence de *S. aureus*

*S. aureus* est une bactérie pouvant être à la fois un commensal de l'Homme mais également un redoutable pathogène. Sa pathogénie est définie par un arsenal de facteurs de virulence dont l'expression, finement régulée, est dépendante de l'étape d'infection : la colonisation de l'hôte, l'invasion des tissus, l'internalisation dans les cellules ou encore l'évasion du système immunitaire.

#### A/ Facteurs impliqués dans l'adhésion et la colonisation

L'adhérence et la colonisation de l'hôte ou de surface inerte est une étape essentielle dans le développement d'une infection. Dans ce but, *S. aureus* peut exprimer un large éventail de protéines de surface appelées adhésines. Ces adhésines peuvent être divisées en deux grandes familles : (i) les protéines de surface liées de manière covalente au peptidoglycane, connues sous le nom de protéines ancrées à la paroi cellulaire (CWA) (Foster T.J., *et al.*, 2014) et (ii) les adhésines sécrétées, appelées SERAM (Molécules adhésives ayant un répertoire de sécrétion élargi) (Paharik A.E., *et al.*, 2016).

##### 1- Protéines ancrées à la paroi cellulaire (CWA)

Le répertoire des protéines ancrées à la paroi cellulaire (CWA) exprimées par *S. aureus* est limité à 24, c'est pourquoi celles-ci ont évolué afin de remplir plusieurs fonctions (Foster T.J., *et al.*, 2014). Beaucoup de ces protéines peuvent remplir plusieurs fonctions. De plus, ces protéines présentent une redondance fonctionnelle puisqu'au moins cinq CWA se lient au fibrinogène plasmatique et plusieurs d'entre elles favorisent l'adhésion aux cellules épithéliales squameuses (Foster T.J., *et al.*, 2014 ; Lacey K.A., *et al.*, 2016). Toutes les CWA possèdent une structure proche avec des domaines conservés entre les différentes protéines (Figure 14, page 58). Il y a tout d'abord un peptide signal « S » situé en N-terminal, clivé au cours de la sécrétion et permettant l'adressage des protéines traduites vers l'appareil de sécrétion (Sec) au niveau de la membrane (Foster T.J., *et al.*, 2014 ; Paharik A.E., *et al.*, 2016 ; Foster T.J., 2019). Au niveau C-terminal, on retrouve un domaine d'ancrage à la paroi bactérienne « W », riche en prolines et glycines ou composé d'une répétition du dipeptide Ser-Asp. On retrouve également le domaine d'ancrage à la membrane bactérienne « M », riche en acides aminés hydrophobes et chargés positivement. Ces deux domaines sont séparés par un motif consensus LPXTG reconnu par une transpeptidase spécifique, la Sortase A.

Celle-ci va cliver la liaison amide entre la Thréonine et la Glycine permettant ainsi de catalyser la liaison covalente des CWA au peptidoglycane. Les CWA sont divisées en quatre groupes en fonction de la présence de motifs définis par l'analyse structure-fonction (Foster T.J., *et al.*, 2014 ; Foster T.J., 2019) : (a) les molécules de matrice adhésive reconnaissant les composants de surface microbienne (MSCRAMMs), (b) les protéines au motif proche des transporteurs de fer (NEAT), (c) la protéine A et (d) les protéines ayant un motif répété de cinq résidus Glycine (G5-E).

#### a) **Les molécules de matrice adhésive reconnaissant les composants de surface microbienne (MSCRAMMs)**

A l'origine, les MSCRAMMs ont été définies comme une large catégorie de protéines associées à la surface cellulaire et capables d'interagir avec la matrice extracellulaire de l'hôte (Patti J.M., *et al.*, 1994). Cependant, de nombreuses protéines de surface bactérienne ne sont pas des MSCRAMMs et certaines MSCRAMMs ont des fonctions supplémentaires autres que la promotion de l'adhésion c'est pourquoi Foster T.J. et ses collaborateurs ont proposé une nouvelle définition. Ainsi, le terme MSCRAMM fait référence à une famille de protéines sur la base de similitudes structurelles (Figure 14-A) et d'un mécanisme commun pour la liaison de ligands, médiée par deux sous-domaines adjacents contenant des repliements de type IgG et appelé « Dock, Lock et Latch » (DLL) (Foster T.J., *et al.*, 2014). Dans ce mécanisme, le ligand se fixe dans un premier temps à la protéine MSCRAMM dont la structure est dite « ouverte ». Cette liaison entraîne un changement conformationnel de la structure vers un état « fermé » emprisonnant le ligand (Foster T.J., *et al.*, 2014). Chez *S. aureus*, l'archétype des MSCRAMMs est représenté par les facteurs d'agrégation A (ClfA) et B (ClfB) (Foster T.J., *et al.*, 2014) qui font partie de la famille Clf-Sdr (ClfA, ClfB, SdrC, SdrD et SdrE). Parmi les MSCRAMMs on retrouve aussi les FnBPs (Protéines liant la Fibronectine) et la protéine liant le collagène CNA (Foster T.J., *et al.*, 2014).

- La famille Clf-Sdr : comprend les facteurs d'agrégations ClfA et ClfB ainsi que les protéines Sdr. En plus des repliements de type Immunoglobuline G (=IgG) N1, N2 et N3, leur structure contient un domaine de répétition sérine-aspartate appelé région SD (Figure 14-A). ClfA et ClfB sont des protéines de liaison au fibrinogène chez *S. aureus*, interagissant respectivement avec les chaînes  $\alpha$  et  $\gamma$  du fibrinogène. ClfA est impliquée dans l'agrégation plaquettaire et l'agglutination des bactéries dans le plasma. C'est un

facteur de virulence important de *S. aureus* et sa contribution à la pathogenèse a été démontrée dans plusieurs modèles animaux d'infection, notamment l'endocardite, l'arthrite et la septicémie (Lacey K.A., *et al.*, 2016). ClfB quant à lui, favorise la colonisation nasale grâce à sa liaison à la cytokératine 10, composant dominant de l'intérieur des cellules squameuses, et à la loricine, protéine la plus abondante de l'enveloppe cornifiée des squames (Lacey K.A., *et al.*, 2016). En ce qui concerne les protéines Sdr, elles sont codées par un seul locus et présentent une organisation structurale similaire à ClfA et ClfB. De plus, SdrC, SdrE et SdrD contiennent respectivement deux, trois et cinq domaines répétés B de 110 à 113 résidus, séparant la région A de la région SD (Figure 14-A) (O'Brien L., *et al.*, 2002 ; Foster T.J., *et al.*, 2014 ; Paharik A.E., *et al.*, 2016). Il a été montré que SdrC pouvait se lier à un ligand hôte ou s'auto-associer pour favoriser la formation de biofilms (Paharik A.E., *et al.*, 2016). SdrD quant à lui, permet l'adhésion aux cellules épithéliales nasales desquamées humaines. Enfin, SdrE induit une agrégation plaquettaire et inhibe l'activation du complément ainsi que l'opsonisation et la phagocytose médiées par la voie du complément classique (Paharik A.E., *et al.*, 2016).

- Les protéines liant la Fibronectine : FnBP A et B contiennent une région N-terminale formant des repliements de type IgG et permettant une liaison au fibrinogène et à l'élastine. De plus, elles ont une région de 10 à 11 répétitions en tandem permettant la reconnaissance de la fibronectine (Figure 14-A). La fixation à la fibronectine permet ensuite une interaction avec les récepteurs de la fibronectine au niveau de la cellule hôte, les intégrines  $\alpha 5 \beta 1$ . Cette interaction permet ainsi à *S. aureus* d'adhérer et d'envahir une large gamme de types cellulaires différents, y compris les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les fibroblastes, les ostéoblastes et les kératinocytes (Paharik A.E., *et al.*, 2016 ; Lacey K.A., *et al.*, 2016). Cependant, il existe une souche de *S. aureus*, la souche Newman, qui possède les gènes des FnBPs, mais produit une forme tronquée au niveau C-terminal de ces deux protéines les rendant inactives (Grundmeier M., *et al.*, 2004).
- La protéine de liaison au collagène (CNA) : présente une structure similaire à toutes les MSCRAMMs avec plusieurs sites de liaison au collagène au niveau de la région A et d'un domaine contenant des répétitions B suggéré comme jouant un rôle dans la stabilité et la fonction de la région A (Figure 14-A) (Foster T.J., *et al.*, 2014 ; Herman-Bausier P., *et al.*, 2016 ; Paharik A.E., *et al.*, 2016 ; Madani A., *et al.*, 2017). La caractérisation de la structure cristalline de l'interaction CNA-collagène a suggéré un modèle d'interaction

nommé «collagen hug», une variation du schéma de liaison du ligand « Dock, Lock and Latch » (Paharik A.E., *et al.*, 2016 ; Herman-Bausier P., *et al.*, 2016). Il a été montré que la CNA avait une influence sur l'établissement et la progression des infections bactériennes dans divers modèles animaux. Les CNA permettent aux bactéries d'adhérer suffisamment fortement aux structures tissulaires contenant leur ligand afin de résister à la clairance par le système de défense de l'hôte. La CNA représente notamment un facteur de virulence dans l'arthrite septique, où la force d'adhésion au collagène est en corrélation avec la pathogenèse de la maladie. De plus, les CNA se lient à la protéine C1q du complément et empêche la voie classique de fixation du complément. Ainsi, la CNA contribue à la virulence des kératites à *S. aureus*, des ostéomyélites, des endocardites et des mammites démontrant que la capacité d'interagir avec le collagène offre un avantage général aux bactéries dans la pathogenèse (Patti J.M., *et al.*, 1994 ; Herman-Bausier P., *et al.*, 2016 ;Paharik A.E., *et al.*, 2016 ; Madani A., *et al.*, 2017).

#### **b) La famille des protéines au motif NEAT**

Les protéines de surface régulées par le fer (Isd) sont des protéines liées à la membrane, qui contiennent un ou plusieurs motifs proches des transporteurs de fer (NEAT) (Figure 14-B). Ce motif NEAT de 120 acides aminés tire son nom de sa structure secondaire conservée et similaire à celle des protéines voisines des transporteurs ABC putatifs de fer des bactéries à Gram-positif (Grigg J.C., *et al.*, 2010). Ces protéines impliquées dans la capture de l'hème ou de l'hémoglobine aident les bactéries à survivre dans un environnement restreint en fer, caractéristique d'une interaction hôte-pathogène (Foster T.J., *et al.*, 2014 ; Paharik A.E., *et al.*, 2016 ; Lacey K.A., *et al.*, 2016). Le génome de *S. aureus* code pour neuf protéines directement impliquées dans l'absorption de l'hème par le système Isd dont IsdA, IsdB, IsdC et IsdH qui sont des récepteurs de surface ancrés à la paroi cellulaire (Grigg J.C., *et al.*, 2010). Ces protéines sont impliquées dans l'acquisition du fer et dans la survie sur la peau et les muqueuses mais seules IsdA et IsdB jouent un rôle dans l'adhésion en favorisant respectivement l'adhésion bactérienne à la matrice extracellulaire et aux cellules épithéliales nasales desquamées (Zapatoczna M., 2012), et l'adhésion aux cellules hôtes et aux plaquettes (Zapatoczna M., 2013).

### c) **La protéine A staphylococcique (SpA)**

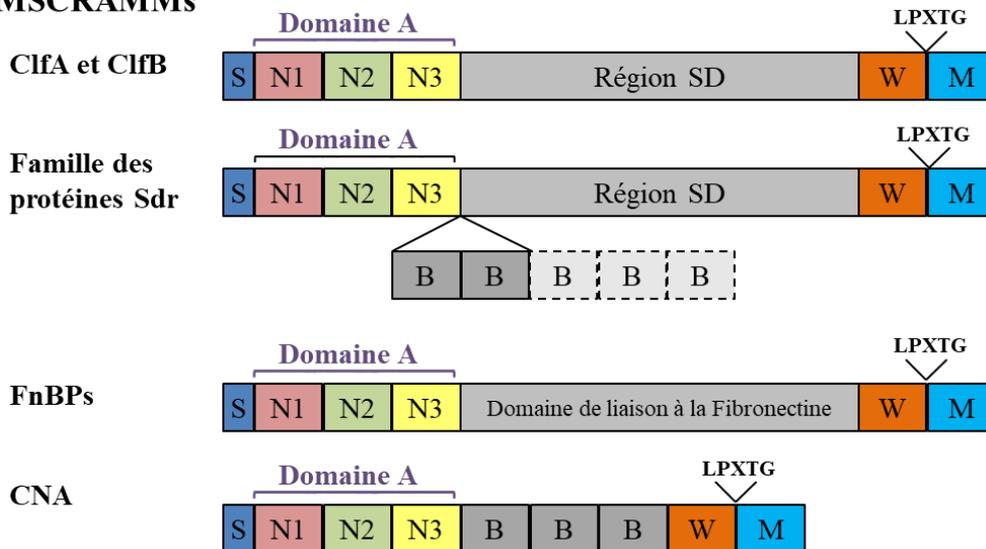
La protéine A est une protéine de 42kDa, conservée, pléiotropique et omniprésente chez *S. aureus*. La variation de séquence de sa région Xr est utilisée pour le typage des souches (Spa typing) (Le Loir Y., *et al.*, 2010 ; Foster T.J., *et al.*, 2014 ; Paharik A.E., *et al.*, 2016). De plus, elle a la particularité d'être à la fois ancrée à la surface de la bactérie et sécrétée dans le milieu (Le Loir Y., *et al.*, 2010). Au niveau structural (Figure 14-C), elle est caractérisée par la présence de 5 domaines homologues (E, D, A, B et C), chacun se composant d'un faisceau tri-hélicoïdal replié permettant la liaison à plusieurs ligands distincts (Foster T.J., *et al.*, 2014 ; Paharik A.E., *et al.*, 2016 ; Lacey K.A., *et al.*, 2016). Elle possède un certain nombre de traits immunosuppresseurs et représente l'un des mécanismes les plus importants d'évasion immunitaire de *S. aureus* en se liant notamment aux IgG, aux récepteurs 1 du TNF $\alpha$  (TNFR1) et aux facteurs de von Willebrand (Lacey K.A., *et al.*, 2016). Sa liaison à la portion Fc $\gamma$  des IgG, va permettre à la bactérie de recouvrir sa surface avec ces IgG liées dans une orientation incorrecte entraînant une diminution de la reconnaissance et de l'opsonisation par les neutrophiles et, par conséquent, une évasion de la phagocytose. La SpA peut également être pro-inflammatoire grâce à sa liaison au TNFR1 entraînant une stimulation de son expression à la surface ainsi que son excrétion par la cellule. Cette interaction conduit à l'activation des MAP kinases, se traduisant par l'expression d'IL-8 et d'autres cytokines chimio-attractantes, provoquant finalement le recrutement des neutrophiles. L'inflammation provoquée est délétère pour l'épithélium respiratoire et perturbe ses fonctions (Le Loir Y. *et al.*, 2010 ; Lacey K.A., *et al.*, 2016). Enfin, la protéine A possède des propriétés d'adhésines par sa fixation au facteur de von Willebrand intervenant dans l'adhésion plaquettaire au niveau de l'endothélium lésé et joue ainsi un rôle important dans l'endocardite infectieuse (Le Loir Y., *et al.*, 2010).

### d) **Les protéines ayant un motif répété de cinq résidus Glycine (G5-E)**

Les protéines ayant un motif répété G5-E sont ainsi nommées en raison des cinq résidus Glycine conservés dans chaque répétition. Il s'agit de la protéine de surface G (SasG) chez *S. aureus* (Figure 14-D) et de son homologue, la protéine associée à l'accumulation (Aap) chez *S. epidermidis* (Foster T.J., *et al.*, 2014 ; Paharik A.E., *et al.*, 2016). Elles ont des structures similaires et fonctionnent de manière similaire dans l'adhésion et la formation de biofilms. Elles possèdent chacune un domaine A au niveau N-terminal permettant la liaison avec les surfaces abiotiques et avec les hôtes via des ligands inconnus (Paharik A.E., *et al.*,

2016). De plus, la protéine SasG de *S. aureus* favorise l'attachement aux cellules épithéliales nasales desquamées humaines via son domaine A (Paharik A.E., *et al.*, 2016).

#### A/ MSCRAMMs



#### B/ Famille des protéines au motif NEAT



#### C/ Famille des protéines possédant des faisceaux tri-hélicoïdal



#### D/ Famille des protéines ayant un motif répété G5-E



**Figure 14 : Représentation structurale des différentes protéines ancrées à la paroi cellulaire (CWA) (adapté de Foster T.J., *et al.*, 2014).** Les CWA possèdent trois domaines en commun : un peptide signal « S » au niveau N-terminal, un domaine d'ancrage à la paroi bactérienne « W » et un domaine d'ancrage à la membrane bactérienne « M » au niveau C-terminal. Ces deux derniers sont séparés par un motif consensus LPXTG. Les CWA sont ensuite classées en quatre familles structurellement différentes. **(A)** Les MSCRAMMs avec un domaine A contenant 2 ou 3 domaines repliés (N1, N2, N3). Les protéines Clf et Sdr possèdent un domaine de répétition sérine-aspartate (SD), séparé du domaine A par une région de 2 à 5 répétitions de domaine B dans le cas des Sdr. Les FnBPs possèdent un domaine de liaison à la fibronectine, répétés en tandem à la place de la région SD. Enfin, les CNA contiennent un domaine de répétition B. **(B)** La Famille des protéines au motif NEAT est caractérisé par la présence d'un (pour IsdA), deux (pour IsdB) ou trois (pour IsdH) motifs NEAT de liaison à l'hémoglobine ou à l'hème ainsi qu'un domaine C. **(C)** La Protéine A contient cinq domaines de faisceau tri-hélicoïdal (E,A,B,C et D) suivis par la région Xr contenant des répétitions et de la région Xc non répétitive. **(D)** La famille des protéines ayant une répétition G5-E est caractérisée, comme son nom l'indique par une alternance de répétitions d'un domaine de 5 glycines (G5) et d'un domaine E, reliant le domaine A en N-terminal aux domaines W et M en C-terminal.

## 2- Molécules adhésives ayant un répertoire de sécrétion élargi (SERAM)

Les SERAMs regroupent un autre type d'adhésines ayant la particularité d'être sécrétées et de se fixer de manière non covalente aux protéines de la matrice extracellulaire telles que le fibrinogène, la fibronectine, la prothrombine ou encore le collagène (Chavakis T., *et al.*, 2005). Ces adhésines sont non apparentées structurellement, contrairement aux CWA, mais possèdent des propriétés communes. Parmi ces fonctions partagées, on peut citer la liaison à des facteurs, des cellules et des tissus de l'hôte liée à leur fonction d'adhésine mais également des propriétés immunomodulatrices. Ce terme de SERAM regroupe (a) la coagulase et la protéine de liaison au facteur de von Willebrand (vWbp), (b) la protéine de liaison à la matrice extracellulaire (Emp), (c) la protéine de liaison au fibrinogène extracellulaire (Efb) et (d) la protéine d'adhérence extracellulaire (Eap) (Chavakis T., *et al.*, 2005).

### a) Coagulase et protéine de liaison au facteur de von Willebrand

Une des caractéristiques de *S. aureus* est sa capacité à former des caillots lorsqu'il est inoculé dans du plasma ou dans du sang humain (McAdow M., *et al.*, 2012). Ce phénotype est lié à la sécrétion de coagulase et a été décrit depuis plus d'un siècle (Loeb L., 1903 ; McAdow M., *et al.*, 2012). La forme mature de la coagulase est constituée de domaines D1 et D2 hélicoïdaux en position N-terminal, permettant l'association et l'activation de la prothrombine (Chavakis T., *et al.*, 2005 ; McAdow M., *et al.*, 2012 ; Liesenborghs L., *et al.*, 2017). Au niveau C-terminal, on retrouve la région de répétition (R), composée de répétitions en tandem d'un peptide de 27 acides aminés se liant au fibrinogène. Le complexe prothrombine-coagulase convertit alors le fibrinogène soluble en fibrine insoluble, formant le réseau maillé d'un caillot (Chavakis T., *et al.*, 2005 ; McAdow M., *et al.*, 2012 ; Liesenborghs L., *et al.*, 2017). Cette coagulation localisée conduit à un emprisonnement des bactéries dans un abcès les protégeant de l'action des cellules immunitaires de l'hôte et des traitements antimicrobiens (McAdow M., *et al.*, 2012). En 2004, une autre protéine capable de se lier à la prothrombine afin de convertir le fibrinogène en fibrine a été découverte, il s'agit de la protéine de liaison au facteur de von Willebrand (vWbp) (Bjerketorp J., *et al.*, 2004 ; McAdow M., *et al.*, 2012). Cette protéine présente une homologie de séquence avec les domaines D1 et D2 de la coagulase mais son domaine C-terminal diffère. En effet, le domaine R est remplacé par un site de fixation pour le facteur de von Willebrand et pour le fibrinogène (McAdow M., *et al.*,

2012 ; Liesenborghs L., *et al.*, 2017). Ces deux coagulases diffèrent également par leur affinité avec la prothrombine et le fibrinogène. En effet, la coagulase possède une affinité plus élevée pour la prothrombine (5 nM) et le fibrinogène (33 nM) que celle observée pour la vWbp (98 nM et 271 nM respectivement) (Cheng A.G., *et al.*, 2010). La sécrétion de coagulases et de vWbp chez *S. aureus* représente une stratégie de virulence clé favorisant la pathogénèse par la formation d'abcès et d'infections persistantes ainsi que de septicémies et d'endocardites. Elle va également permettre l'agglutination de *S. aureus* en présence de plasma, entraînant ainsi des lésions thromboemboliques et participant à la dissémination bactérienne et à la formation d'endocardites, favorisant l'issue létale d'une bactériémie staphylococcique (McAdow M., *et al.*, 2012).

### **b) La protéine de liaison à la matrice extracellulaire (Emp)**

La protéine de liaison à la matrice extracellulaire peut comme son nom l'indique, se lier aux éléments de la matrice extracellulaire tels que la fibronectine, le fibrinogène, le collagène et la vitronectine (Chavakis T., *et al.*, 2005). Les propriétés adhésives de l'Emp se situent à l'extrémité C-terminale qui semble être fortement conservée au sein de différentes espèces de staphylocoques. Cette extrémité est notamment composée de nombreux résidus histidine qui pourraient être des résidus clés pour les caractéristiques adhésives de l'Emp (Geraci J., *et al.*, 2017). L'Emp semble interagir préférentiellement avec des composants de la matrice habituellement enfouis dans des suprastructures, devenant disponibles après un traitement protéolytique. Cette situation peut notamment se produire pendant l'infection, lorsque des facteurs cytotoxiques des agents pathogènes et du système immunitaire de l'hôte endommagent la plupart des matrices de l'hôte et que les composants de la matrice interne se retrouvent exposés (Geraci J., *et al.*, 2017). L'Emp contribue à la virulence dans un modèle d'abcès mais aucun rôle n'a pu être déterminé dans les infections intravasculaires (Chavakis T., *et al.*, 2005 ; Liesenborghs L., *et al.*, 2017). De plus, il a été suggéré que les propriétés structurales de l'Emp, notamment sa forte teneur en histidine, pourraient jouer un rôle dans un nouveau mécanisme d'évasion immunitaire de *S. aureus* (Geraci J., *et al.*, 2017).

### **c) La protéine de liaison au fibrinogène extracellulaire (Efb)**

La protéine de liaison au fibrinogène extracellulaire peut interagir avec le fibrinogène et les plaquettes (Chavakis T., *et al.*, 2005 ; Posner M.G., *et al.*, 2016). La région N-terminale de l'Efb permet la liaison avec la chaîne  $\alpha$  du fibrinogène via deux domaines répétés, homologues de la région de répétitions de la coagulase de *S. aureus* (Chavakis T., *et al.*,

2005 ; Posner M.G., *et al.*, 2016). Cette interaction inhibe ainsi l'agrégation plaquettaire. De plus, elle peut également se lier aux plaquettes par le biais de mécanismes de liaison dépendant du fibrinogène ou indépendant tel que la voie mettant en jeu les récepteurs plaquettaires GPIIb / IIIa (Chavakis T., *et al.*, 2005). L'inhibition de l'activation plaquettaire et la formation de thrombus par l'Efb ont été suggérées pour faciliter la survie de *S. aureus* dans le sang et ainsi aggraver l'infection à *S. aureus* (Posner M.G., *et al.*, 2016). De plus, la région C-terminale en faisceau tri-hélicoïdal semble jouer un rôle immunosuppresseur en interférant avec le système du complément (Chavakis T., *et al.*, 2005 ; Posner M.G., *et al.*, 2016). En effet, l'Efb permet à *S. aureus* de se recouvrir de fragment C3b du complément et de se dissimuler grâce au fibrinogène, empêchant ainsi la phagocytose par les neutrophiles (Liesenborghs L., *et al.*, 2017). De plus, l'Efb bloque également le motif de liaison du récepteur des leucocytes  $\alpha_M\beta_2$ , empêchant ainsi les leucocytes d'adhérer à la capsule de fibrine entourant *S. aureus* (Liesenborghs L., *et al.*, 2017).

#### **d) La protéine d'adhérence extracellulaire (Eap)**

La protéine d'adhérence extracellulaire également appelée « protéine analogue du CMH de classe II » ou P70, est une des SERAMs les plus étudiées (Chavakis T., *et al.*, 2005). Elle possède un très large spectre d'interactions aux composants de l'hôte tels que la prothrombine, le fibrinogène, la fibronectine, la thrombospondine, la sialoprotéine osseuse, la vitronectine, l'ostéopontine et le fragment C4b du complément (Chavakis T., *et al.*, 2005 ; Liesenborghs L., *et al.*, 2017 ; Palankar R., *et al.*, 2018). Cette protéine est exprimée par plus de 96% des souches de *S. aureus* (Chavakis T., *et al.*, 2005) et est sécrétée en grande quantité dans le milieu extracellulaire. Selon le fond génétique de la souche de *S. aureus*, cette protéine se compose de quatre à six répétitions similaires mais non identiques, d'environ 100 résidus d'acides aminés chacune appelée module EAP, qui sont connectées par de courtes régions de liaison longues de 9 à 12 résidus (Eisenbeis J., *et al.*, 2018). Elle a également la particularité de pouvoir se lier à nouveau à la paroi cellulaire bactérienne via la phosphatase neutre liée à la surface et probablement d'autres molécules de paroi cellulaire encore inconnues (Eisenbeis J., *et al.*, 2017). Cette liaison à la surface de *S. aureus* permet à la protéine de jouer le rôle de facteur de pontage bactérien dans la médiation de l'adhésion de *S. aureus* à la paroi vasculaire via ICAM-1 (Molécule d'Adhésion InterCellulaire) tout en empêchant le recrutement de neutrophiles (Chavakis T., *et al.*, 2005 ; Liesenborghs L., *et al.*, 2017).

En raison de ses caractéristiques de liaison polyvalentes, l'Eap est capable de moduler la réponse inflammatoire de l'hôte par des interactions directes ou indirectes avec les cellules eucaryotes contribuant ainsi à l'adhésion, à l'internalisation et à la colonisation des cellules hôtes par *S. aureus*. De plus, l'Eap améliore l'adhésion et l'internalisation de *S. aureus* par les kératinocytes, modulant ainsi la migration des kératinocytes et interférant ainsi avec le processus de cicatrisation des plaies (Palankar R., *et al.*, 2018). De plus, l'Eap présente de puissantes propriétés anti-inflammatoires et anti-angiogéniques en empêchant le recrutement de neutrophiles et de leucocytes, en bloquant l'adhésion des leucocytes, en inhibant l'activation de NFκB (Facteur Nucléaire κB) et en interférant avec la prolifération des lymphocytes B et T (Palankar R., *et al.*, 2018). Ainsi, l'Eap constitue un puissant facteur de virulence au cours des infections à staphylocoque, en complétant les stratégies d'évasion immunitaire et d'adaptabilité aux niches environnementales développées par *S. aureus*.

## **B/ Facteurs impliqués dans l'invasion et la dissémination**

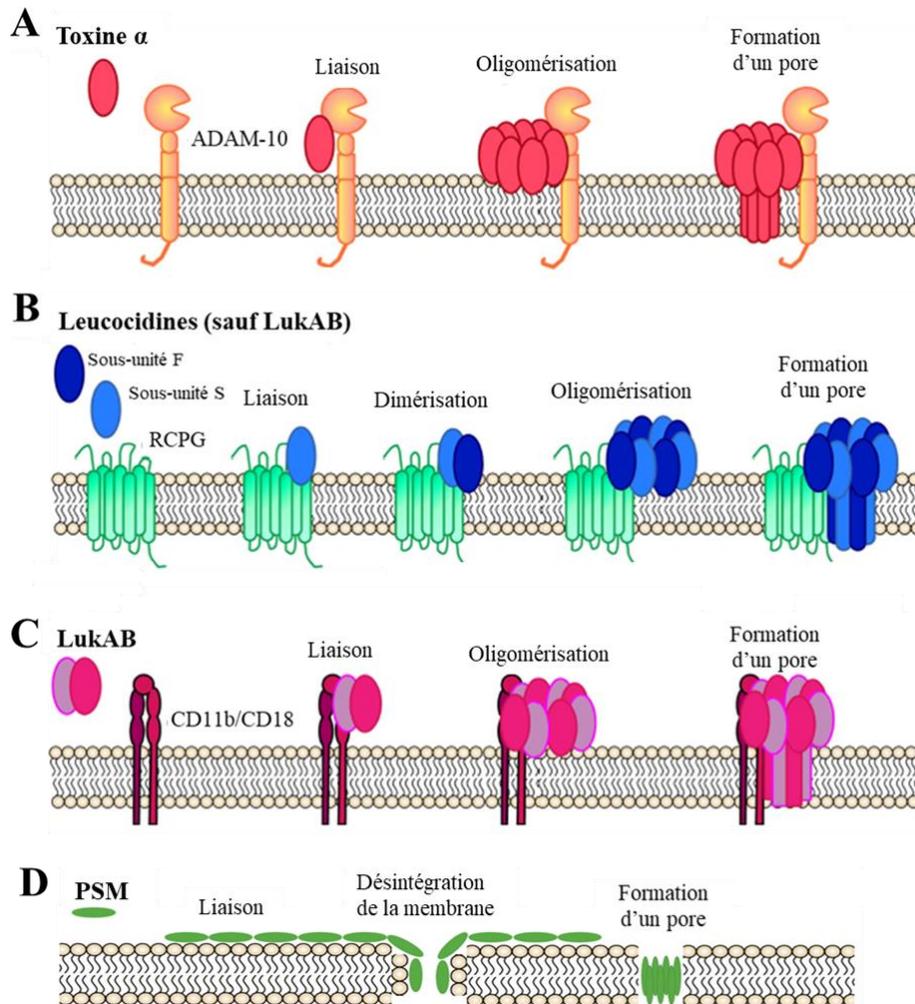
Après la réussite de la colonisation de l'hôte par *Staphylococcus aureus*, celui-ci va pouvoir l'envahir et disséminer en son sein. Pour y arriver, *S. aureus* va devoir modifier l'expression de ses facteurs de virulence. Il va ainsi réprimer les facteurs d'adhésion dont il n'a plus l'utilité, au profit des toxines et des enzymes sécrétées, plus adaptées à l'extension de l'infection.

### **1- Toxines**

Les toxines sont généralement définies comme des substances toxiques, sécrétées dans la matrice extracellulaire par l'organisme producteur au cours des phases post-exponentielles et stationnaires précoces et interférant directement avec l'hôte (Otto M., 2014a ; Kong C., *et al.*, 2016). Ces protéines sont généralement impliquées dans la pénétration tissulaire et permettent aux bactéries d'envahir leur hôte. Elles sont également cytolytiques et aident à la croissance bactérienne par l'acquisition de nutriments essentiels tels que le fer des cellules lysées (Kong C., *et al.*, 2016). Les principales toxines de *S. aureus* peuvent être divisées en trois grands groupes: (a) les toxines formant des pores (PFT), (b) les toxines exfoliatrices (ET) et (c) les toxines superantigéniques (SAGs) (Oliveira D., *et al.*, 2018). Ce système de production de protéines répond à un large éventail de conditions et la compréhension de ce mécanisme permettra un meilleur contrôle des infections à staphylocoque (Oliveira D., *et al.*, 2018).

### a) Toxines formant des pores

Les toxines formant des pores (PFT) (Figure 15) représentent une classe commune de facteurs de virulence bactérienne, retrouvées chez de nombreux agents pathogènes humains, y compris *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (Seilie E.S., *et al.*, 2017). Ces toxines peuvent être divisées en quatre types: (i) l'hémolysine- $\alpha$  (HIA ou toxine  $\alpha$ ), (ii) l'hémolysine- $\beta$ , (iii) les leucocidines et (iv) les modulines solubles dans le phénol (PSMs) (Oliveira D., *et al.*, 2018).



**Figure 15 : Mécanismes d'action des toxines formant des pores (adaptée de Tam K., *et al.*, 2019 et de Oliveira D., *et al.*, 2018 ; réalisée sur Biorender.com).** (A) La toxine  $\alpha$  est sécrétée sous forme de monomère. En se liant au récepteur ADAM-10 de l'hôte, les monomères s'oligomérisent pour former un pré-pore heptamérique. Puis les tiges du pré-pore s'étendent pour former un pore perçant la membrane de la cellule cible. (B) et (C) Les **Leucocidines** sont également sécrétées sous forme de monomères (sauf LukAB, sécrétée sous forme de dimères). La sous-unité S reconnaît la cellule cible en se liant aux récepteurs cellulaires (sauf LukPQ dont il s'agit de la sous-unité F). Ces récepteurs sont généralement des récepteurs couplés aux protéines G (sauf pour LukAB, qui se lie à l'intégrine CD11b). Lors de la liaison au récepteur, la sous-unité S se dimérise avec la sous-unité F, puis ce dimère s'oligomérise avec trois autres dimères pour former un pré-pore octamérique. Finalement, de manière semblable à la toxine  $\alpha$ , les tiges de ce pré-pore s'étendent pour former un pore. (D) Les **PSMs** se fixent à la membrane de manière non spécifique, entraînant sa désintégration puis, les PSMs s'oligomérisent pour former un pore transitoire.

### **i. Hémolysine $\alpha$ (HIA)**

L'hémolysine  $\alpha$ , un polypeptide de 33 kDa codé par le gène *hla*, est présente en simple copie dans le chromosome bactérien et sécrétée sous forme de monomère par 95% des souches cliniques de *S. aureus* (Grumann D., *et al.*, 2014; Seilie E.S., *et al.*, 2017 ; Oliveira D., *et al.*, 2018). Il s'agit du membre le plus étudié des hémolysines staphylococciques (Vandenesch F., *et al.*, 2012 ; Otto M., 2014a ; Kong C., *et al.*, 2016). Les monomères hydrosolubles d'hémolysine  $\alpha$  sont non toxiques séparément. Cependant, leur liaison au niveau du récepteur cellulaire ADAM-10, où ils vont s'assembler en un homo-heptamère pour former un pré-pore, les rend dangereux (Vandenesch F., *et al.*, 2012 ; Grumann D., *et al.*, 2014 ; Otto M., 2014a ; Kong C., *et al.*, 2016 ; Seilie E.S., *et al.*, 2017 ; Oliveira D., *et al.*, 2018 ; Tam K., *et al.*, 2019). En effet, le pré-pore se transforme ensuite en un pore transmembranaire mature, conduisant ainsi à la formation d'un canal transmembranaire hydrophile de 14 Å de diamètre à travers la bicouche. Ce pore permet le transport de molécules inférieures à 2 kDa, notamment un afflux de  $\text{Ca}^{2+}$  et un efflux de  $\text{K}^+$ , entraînant une perturbation de l'homéostasie et conduisant à la mort des cellules (Vandenesch F., *et al.*, 2012 ; Grumann D., *et al.*, 2014 ; Otto M., 2014a ; Kong C., *et al.*, 2016 ; Seilie E.S., *et al.*, 2017 ; Oliveira D., *et al.*, 2018 ; Tam K., *et al.*, 2019). L'hémolysine  $\alpha$  présente une spécificité d'espèce et de type cellulaire. Alors que les érythrocytes de lapin sont très sensibles à la lyse médiée par l'hémolysine  $\alpha$ , les érythrocytes humains sont 1000 fois moins sensible (Dinges M.M., *et al.*, 2000 ; Vandenesch F., *et al.*, 2012). Cependant, elle peut lyser plusieurs types cellulaires comme les plaquettes, les monocytes et macrophages, les cellules épithéliales et les cellules endothéliales (Grumann D., *et al.*, 2014 ; Seilie E.S., *et al.*, 2017). De plus, la sensibilité à la lyse est différente en fonctions des types cellulaires puisque les lymphocytes et les monocytes montrent une lyse maximale à 100 ng/ml, contrairement aux granulocytes chez qui on n'observe aucune lyse à 10  $\mu\text{g/ml}$  (Vandenesch F., *et al.*, 2012).

### **ii. Hémolysine $\beta$ (HIB)**

L'hémolysine  $\beta$  est une toxine de 33kDa codée par le gène *hIb* et qui, contrairement aux autres hémolysines, n'exerce pas son activité via la formation de pore dans la membrane mais grâce à une activité sphingomyélinase. Il s'agit d'une sphingomyélinase de type C, découverte en 1935 par Glenny et Stevens (Glenny A.T., *et al.*, 1935), qui va hydrolyser la sphingomyéline, un lipide membranaire présent à la surface d'une variété de cellules hôtes, en céramide et phosphorylcholine. Cela entraînerait une modification de la fluidité membranaire associé à une déstabilisation de la bicouche lipidique conduisant à une lyse cellulaire

(Vandenesch F., *et al.*, 2012 ; Otto M., 2014a ; Kong C., *et al.*, 2016 ; Oliveira D., *et al.*, 2018 ; Tam K., *et al.*, 2019). L'hémolysine  $\beta$  présente une activité hémolytique dépendante de l'espèce et est en corrélation avec la quantité de sphingomyéline contenue dans les érythrocytes : les érythrocytes de mouton, de vache et de chèvre sont très sensibles à la toxine, les érythrocytes de lapin et d'homme présentent une sensibilité intermédiaire, et les érythrocytes murin et canin sont résistants (Oliveira D., *et al.*, 2018 ; Tam K., *et al.*, 2019). En plus de son action sur les érythrocytes, elle provoque également la lyse des kératinocytes, des monocytes, des lymphocytes T et des leucocytes polynucléaires chez l'homme ainsi que des cellules épithéliales bovines (Tam K., *et al.*, 2019 ; Oliveira D., *et al.*, 2018). Elle est également appelée hémolysine « chaud-froid » du fait de son activité accrue lors d'un passage d'une température de 37°C à une température basse (Vandenesch F., *et al.*, 2012 ; Tam K., *et al.*, 2019). Ceci s'explique tout d'abord par le fait qu'à 37°C, les céramides issus de l'hydrolyse, sont maintenus ensemble dans la membrane par des forces cohésives. Puis, le passage à basse température provoque une séparation de phase qui condense ces céramides et fait s'effondrer la bicouche lipidique (Tam K., *et al.*, 2019).

### **iii. Leucocidines**

Les leucocidines sont des toxines synergohyménotropiques apparentées à l'hémolysine  $\alpha$  puisqu'elles possèdent une homologie structurale ainsi qu'un mécanisme de formation de pores similaire. Cependant, contrairement à l'hémolysine  $\alpha$ , les leucocidines sont hétéro-oligomériques et nécessitent deux sous-unités: la sous-unité F (= à élution rapide) et la sous-unité S (= à élution lente), nommées d'après leur comportement en chromatographie en phase liquide (Vandenesch F., *et al.*, 2012 ; Seilie E.S., *et al.*, 2017 ; Tam K., *et al.*, 2019 ; Oliveira D., *et al.*, 2018). Le modèle actuel de formation de pores des leucocidines suggère que la sous-unité S confère une spécificité de type cellulaire en se liant aux récepteurs de surface sur la cellule cible. Puis, suite à cette liaison, un changement de conformation permet le recrutement de la sous-unité F et la dimérisation des deux sous-unités. Enfin s'en suit une oligomérisation en série avec trois dimères supplémentaires, alternant les deux composés jusqu'à la formation d'un pré-pore octamérique sur la membrane cellulaire cible. L'hétéro-octamère mature forme ensuite un pore transmembranaire à travers la membrane plasmique, conduisant à la lyse des cellules hôtes. (Vandenesch F., *et al.*, 2012 ; Seilie E.S., *et al.*, 2017 ; Tam K., *et al.*, 2019 ; Oliveira D., *et al.*, 2018). Parmi les leucocidines, cinq sont connues pour être associées à des infections humaines: (i) LukSF-PV (initialement connue sous le nom de leucocidine de Panton-Valentine), les hémolysines  $\gamma$  (ii) HlgAB et (iii) HlgCB

correspondant à deux combinaisons d'un composant S (HlgA ou HlgC) avec un composant F (HlgB), (iv) LukED et (v) LukAB (également connu sous le nom de LukHG) (Vandenesch F., *et al.*, 2012 ; Otto M., 2014a ; Kong C., *et al.*, 2016 ; Seilie E.S., *et al.*, 2017 ; Tam K., *et al.*, 2019 ; Oliveira D., *et al.*, 2018). Ces leucocidines lysent les cellules de la lignée leucocytaire et elles sont également connues pour tuer les neutrophiles alors que seule les hémolysines  $\gamma$  et LukED ont démontré une activité lytique contre les globules rouges (Vandenesch F., *et al.*, 2012 ; Seilie E.S., *et al.*, 2017).

#### **iv. Modulines solubles dans le phénol (PSMs)**

Les modulines solubles dans le phénol (PSMs) appartiennent à une famille de peptides amphipathiques en hélice que l'on trouve uniquement chez les staphylocoques, découverte en 1999 par Mehlin C. et ses collaborateurs (Mehlin C., *et al.*, 1999). Chez *S. aureus*, les PSMs sont codées en trois loci dans le génome principal: (i) l'opéron *psma* codant pour les PSM $\alpha$ 1-4, (ii) l'opéron *psm $\beta$*  codant pour les PSM $\beta$ 1-2 et (iii) *hld* codant l'hémolysine  $\delta$  et situé dans la séquence codante de l'ARNIII (Vandenesch F., *et al.*, 2012 ; Peschel A., *et al.*, 2013 ; Grumann D., *et al.*, 2014 ; Otto M., 2014b ; Tam K., *et al.*, 2019 ; Oliveira D., *et al.*, 2018). Les PSMs sont classées en fonction de leur longueur : (i) les PSMs de type  $\alpha$  et l'hémolysine  $\delta$  sont formées de 20 à 25 acides aminés, la plupart ayant une charge nette positive ou neutre pour l'hémolysine  $\delta$  et (ii) les PSMs de type  $\beta$ , plus longs, de 43 à 45 acides aminés, la plupart ayant une charge nette négative (Vandenesch F., *et al.*, 2012 ; Grumann D., *et al.*, 2014 ; Tam K., *et al.*, 2019 ; Oliveira D., *et al.*, 2018). De plus, certains staphylocoques résistants à la pénicilline expriment la PSM-mec, codée par *psm-mec* dans la cassette *SSCmec* (Tam K., *et al.*, 2019). Les PSMs ont de multiples rôles dans la pathogénèse de *S. aureus*, y compris la lyse cellulaire, la formation de biofilms et la modulation immunitaire (Peschel A., *et al.*, 2013 ; Otto M., 2014b ; Tam K., *et al.*, 2019 ; Oliveira D., *et al.*, 2018). La capacité à lyser les cellules eucaryotes est sans doute la contribution la plus importante des PSMs dans la pathogénie de *S. aureus*. Cette capacité est indépendante des récepteurs, ce qui permet de cibler pratiquement toutes les membranes cytoplasmiques. Cela apporte une spécificité à ces PSMs contrairement aux autres toxines (hémolysine  $\alpha$ , leucocidines), qui sont souvent très spécifiques pour un type de cellule et une espèce hôte particulière (Peschel A., *et al.*, 2013 ; Tam K., *et al.*, 2019). Cependant, les PSMs présentent une activité lytique différente. En effet, les peptides PSM $\alpha$  ont une capacité prononcée à lyser les leucocytes et les érythrocytes humains (les PSM $\alpha$ 3 ayant de loin la plus forte activité), l'hémolysine  $\delta$  a une activité cytolitique modérée et les peptides PSM $\beta$  sont non cytolitiques (Peschel A., *et al.*, 2013 ;

Otto M., 2014b). Il a été considéré que la composition des phospholipides et la charge membranaire sont importantes pour la sensibilité des cellules aux PSMs (Peschel A., *et al.*, 2013 ; Oliveira D., *et al.*, 2018). Les PSMs provoquent une cytolysse à des concentrations de l'ordre du micromolaire, mais à des concentrations beaucoup plus faibles, de l'ordre du nanomolaire, ils provoquent des réactions inflammatoires (Peschel A., *et al.*, 2013 ; Otto M., 2014b). En effet, à ces concentrations, les PSMs attirent et stimulent les neutrophiles, provoquant une libération spécifique de cytokines comme l'IL-8 (Peschel A., *et al.*, 2013 ; Otto M., 2014b ; Tam K., *et al.*, 2019). Ici, contrairement à la cytolysse, les effets immunomodulateurs sont médiés par l'interaction avec le récepteur 2 du formyl-peptide (FPR2). Une autre activité importante dans la pathogénie de *S. aureus* est la capacité des PSMs à structurer les biofilms grâce à leurs propriétés physico-chimiques. De plus, leur capacité de perturbation des cellules peut également conduire à la dispersion du biofilm, c'est-à-dire au détachement de cellules ou d'amas cellulaires des biofilms, ce qui est un mécanisme clé conduisant à la dissémination systémique de l'infection par les biofilms (Peschel A., *et al.*, 2013 ; Otto M., 2014b). Enfin, les souches de *S. aureus* très virulentes, en particulier les souches de SARM, ont montré une grande capacité à lyser les neutrophiles après la phagocytose. Toutefois, les mécanismes sous-jacents à ce phénotype sont encore mal compris (Peschel A., *et al.*, 2013 ; Otto M., 2014b).

### **b) Toxines exfoliatrices**

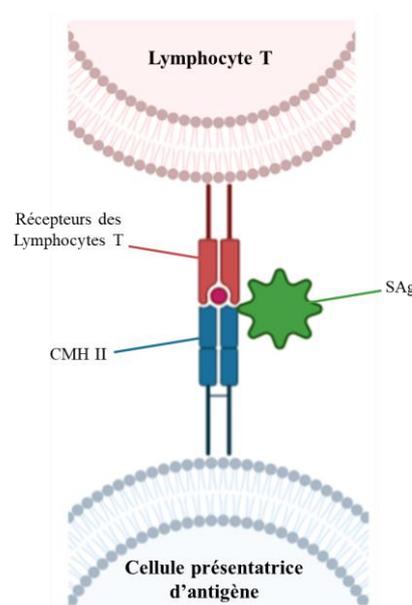
Les toxines exfoliatrices (ET), aussi appelées toxines épidermolytiques existent au nombre de cinq chez *S. aureus* : ETA, ETB, ETC, ETD et ETE (Tam K., *et al.*, 2019 ; Oliveira D., *et al.*, 2018 ; Imanishi I., *et al.*, 2019). L'ETA et l'ETB sont les plus impliquées dans les lésions cutanées humaines et les mieux caractérisées. L'ETC a été isolée d'une infection de cheval et qu'aucun lien avec une maladie humaine n'a été trouvé (Oliveira D., *et al.*, 2018). Enfin l'ETD et l'ETE n'ont été identifiées que plus récemment, respectivement en 2002 dans un échantillon clinique de *S. aureus* (Oliveira D., *et al.*, 2018) et en 2019 dans des souches de *S. aureus* isolées de mastites ovines (Imanishi I., *et al.*, 2019). Les toxines exfoliatrices appartiennent à une famille de protéases à sérine extrêmement spécifiques sécrétées par *S. aureus*. Elles présentent une spécificité de substrat et vont reconnaître et hydrolyser les cadhérines et les desmosomes dans les couches superficielles de la peau. Ainsi, elles sont associées au clivage des jonctions des kératinocytes, pouvant induire la desquamation de la peau et la formation d'ampoules (Tam K., *et al.*, 2019 ; Oliveira D., *et al.*, 2018 ; Imanishi I., *et al.*, 2019). Les ETs sont les agents responsables du syndrome de la peau

échaudée par les staphylocoques (SSSS), notamment la maladie de Ritter, la nécrose épidermique toxique, l'impétigo bulleux et certains cas d'érythème. Les symptômes du SSSS se caractérisent par la formation de cloques et une desquamation superficielle, n'impliquant que la couche superficielle de la peau (Tam K., *et al.*, 2019). Bien que le SSSS ait été initialement décrit en 1878 par Ritter von Rittershain (Ritter von Rittershain B.G., 1878), son association avec les infections à *S. aureus* n'a été suggérée pour la première fois qu'en 1967 par Lyell A. (Lyell A., 1967) Ce retard est dû au fait que le liquide vésiculaire et les régions exfoliées sont souvent exemptes de staphylocoques cultivables, car la toxine est distribuée par le sang à partir de sites d'infection éloignés (Bukowski M., *et al.*, 2010 ; Tam K., *et al.*, 2019 ; Oliveira D., *et al.*, 2018).

### c) **Toxines superantigéniques (SAGs)**

A l'origine, les toxines superantigéniques (SAGs) étaient appelées entérotoxines staphylococciques (SE) car elles provoquaient des symptômes typiques d'une intoxication alimentaire à *S. aureus* (vomissements et diarrhées) (Lina G., *et al.*, 2004 ; Oliveira D., *et al.*, 2018 ; Tam K., *et al.*, 2019). Cependant, le Comité international de la nomenclature a donné cette nouvelle nomenclature aux SE en 2004 suite à l'identification récente de certaines de ces toxines ne présentant pas ces propriétés (Lina G., *et al.*, 2004 ; Oliveira D., *et al.*, 2018 ; Tam K., *et al.*, 2019). Les SAGs sont uniques parce qu'elles sont résistantes à la chaleur, à la protéolyse et à la dessiccation. De plus, du fait de leur extrême stabilité et de leur haute toxicité chez l'homme, certaines d'entre elles sont classées comme agents de sélection pour le bioterrorisme (comme l'entérotoxine B staphylococcique) (Tam K., *et al.*, 2019). Ces toxines semblent principalement impliquées dans l'échappement immunitaire et leur mécanisme d'action a été décrit pour la première fois par Bernhard Fleischer en 1988 (Fleischer B., 1988). Depuis lors, il est admis que les SAGs activent simultanément une grande partie des lymphocytes T. Pour cela, elles font interagir directement les domaines V $\beta$  du récepteur des lymphocytes T, possédant des structures conservées, avec des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) présentes sur les cellules présentatrices d'antigène (Figure 16) (Oliveira D., *et al.*, 2018 ; Tam K., *et al.*, 2019). Les SAGs libérées agissent de manière systémique, déclenchant la production massive de cytokines pro-inflammatoires (IL-2, IFN- $\gamma$  et TNF) par un grand nombre de lymphocytes T, provoquant ainsi la manifestation de symptômes (par exemple, une forte fièvre, des éruptions cutanées, une desquamation, des vomissements, une diarrhée, une hypotension et parfois une défaillance multi-organes) (Oliveira D., *et al.*, 2018). Cette prolifération des lymphocytes T et la production massive de

cytokines induisent par la suite un état d'anergie des lymphocytes T. Cette absence de réponse se caractérise par une absence de prolifération ou de sécrétion d'IL-2 voire une mort cellulaire par apoptose. Cela suggère que les SAg sont des immunogènes puissants, manipulant le système immunitaire de l'hôte pour empêcher la génération de l'immunité adaptative (Kong C., *et al.*, 2016 ; Oliveira D., *et al.*, 2018 ; Tam K., *et al.*, 2019). Une trentaine de SAg staphylococciques sont décrites et divisées en trois groupes : (i) les entérotoxines staphylococciques (SE), (ii) les entérotoxine staphylococciques-like (SE-l) et (iii) la toxine 1 du syndrome de choc toxique (TSST-1) (Kong C., *et al.*, 2016 ; Oliveira D., *et al.*, 2018 ; Tam K., *et al.*, 2019).



**Figure 16 : Mécanisme d'action des SAg (adaptée de Oliveira D., *et al.*, 2018 ; réalisée sur Biorender.com).** Les SAg se lient aux molécules du CMH de classe II et à une région variable du récepteur des cellules T, ce qui entraîne la stimulation de nombreuses cellules T.

- Les entérotoxines staphylococciques: sont retrouvées au nombre de 18 (SEA à SEE, SEG à SEJ, SEL à SEQ et SER à SET) et provoquent des vomissements et des diarrhées, caractéristiques clés des intoxications alimentaires staphylococciques (Kong C., *et al.*, 2016 ; Oliveira D., *et al.*, 2018 ; Tam K., *et al.*, 2019). L'activité émétique des SEs est corrélée à la présence d'une boucle disulfure longue de 9 à 19 acides aminés dans la protéine (Tam K., *et al.*, 2019). Les toxines sont sécrétées par les souches entérotoxiques de *S. aureus* dans les aliments, elles sont stables à la chaleur et ne sont pas dégradées par les processus de cuisson (Kong C., *et al.*, 2016).

- Les entérotoxine staphylococciques-like (SE-l): sont retrouvées aux nombres de 11 (SE-IK à SE-IQ, SE-IU à SE-IX) (Oliveira D., *et al.*, 2018). Les SE-ls comprennent tous les SAGs nouvellement identifiées qui sont des mitogènes des lymphocytes T mais dont l'activité émétique n'est pas prouvée. Ainsi, certains SE-ls ne possèdent pas la boucle disulfure associée au vomissement (Tam K., *et al.*, 2019).
- La toxine 1 du syndrome de choc toxique : est codée par le gène *tst*, présent dans plusieurs îlots de pathogénicité, dont SaPI1, SaPI2, et SaPIbov1 (Tam K., *et al.*, 2019). La TSST-1 était à l'origine connue sous le nom d'entérotoxine staphylococcique F avant d'être renommée en 1984, pour refléter l'absence d'activité émétique et souligner son association au syndrome de choc toxique (Kong C., *et al.*, 2016 ; Tam K., *et al.*, 2019). La sécrétion de TSST-1 entraîne une morbidité et une mortalité graves, par exemple dans les cas de TSST-1 associés aux tampons. Contrairement aux autres SAGs, la létalité de la TSST-1 ne semble pas dépendante de la prolifération des lymphocytes T, mais impliquerait d'autres types de récepteurs cellulaires. L'activation des cellules immunitaires renforcerait l'inflammation et provoquerait une barrière de cellules muqueuses permettant une plus grande interaction de la toxine avec les cellules T et les macrophages, conduisant au syndrome de choc toxique (Kong C., *et al.*, 2016).

## 2- Enzymes sécrétées

En plus des toxines, *S. aureus* produit un grand nombre de facteurs de virulence ayant des propriétés enzymatiques. Ces enzymes, bien que possédant des substrats et des mécanismes d'action différents, vont agir pour décomposer les molécules bactériennes de l'hôte et permettre l'acquisition de nutriments ainsi que la survie et la diffusion des bactéries (Tam K., *et al.*, 2019). Parmi ces enzymes, on peut citer (a) la staphylokinase, (b) les nucléases, (c) les protéases, (d) la hyaluronidase, (e) les lipases et enfin (f) l'enzyme de modification des acides gras (FAME).

### a) La Staphylokinase

La staphylokinase (Sak) est une protéine de 136 acides aminés codée par un prophage et exprimée par les souches lysogéniques de *S. aureus*. La Sak est à la fois sécrétée dans l'environnement extracellulaire et associée à la surface cellulaire des staphylocoques (Bokarewa M.I., *et al.*, 2006 ; Pietrocola G., *et al.*, 2017 ; Tam K., *et al.*, 2019). La

staphylokinase est un cofacteur qui détourne la plasmine de l'hôte permettant ainsi une dégradation de la fibrine et la dissémination des bactéries (Tam K., *et al.*, 2019). La Sak n'a aucune activité protéolytique mais elle agit en formant un complexe stœchiométrique 1:1 avec la plasmine. Cette liaison entraîne une orientation du site actif de la plasmine afin de favoriser le clivage de la boucle d'activation du plasminogène et favoriser la conversion du plasminogène en plasmine. Cette conversion du plasminogène en plasmine à la surface de la bactérie induit une thrombolyse spécifique de la fibrine dans le plasma humain et conduit à la dégradation de deux opsonines, l'Immunoglobuline G (IgG) et le fragment C3b du complément (Pietrocola G., *et al.*, 2017 ; Tam K., *et al.*, 2019). De plus, il a été montré que la Sak neutralise l'activité bactéricide des défensines  $\alpha$  ce qui permet aux staphylocoques de résister à l'immunité innée de l'hôte et renforce notamment la résistance des bactéries à la phagocytose. Enfin, la Sak réduit la formation de biofilms et facilite le détachement du biofilm mature par clivage de la fibrine, un des composants principal du biofilm (Bokarewa M.I., *et al.*, 2006 ; Pietrocola G., *et al.*, 2017 ; Tam K., *et al.*, 2019).

### **b) La nucléase**

La nucléase staphylococcique, initialement connue sous le nom de DNase micrococcale, a été identifiée dans les surnageants de culture de *S. aureus* par Cunningham L. et ses collaborateurs en 1956 (Cunningham L., *et al.*, 1956 ; Tam K., *et al.*, 2019). La nucléase staphylococcique est également connue sous le nom de thermonucléase, du fait de sa résistance à l'inactivation par la chaleur (Cunningham L., *et al.*, 1956 ; Cuatrecasas P., *et al.*, 1967 ; Tam K., *et al.*, 2019). On retrouve deux gènes de nucléases staphylococciques, *nuc* et *nuc2* (Tang J., *et al.*, 2008 ; Tam K., *et al.*, 2019), produisant chacun une protéine dans une localisation différente. En effet, Nuc est une enzyme sécrétée avec deux isoformes (NucA et NucB) tandis que Nuc2 est liée à la surface (Tam K., *et al.*, 2019). La plupart des connaissances actuelles sur les nucléases proviennent d'études réalisées sur Nuc. Il a été montré que les nucléases fonctionnent à la fois comme une endo- et une exo-nucléase, qui décompose les substrats d'ADN et d'ARN à travers le clivage de la liaison 5'-phosphorylester (Tam K., *et al.*, 2019). Deux rôles principaux des nucléases ont pu être mis en évidence dans la virulence de *S. aureus*. Tout d'abord, les nucléases régulent la formation de biofilms par clivage de l'ADN extracellulaire (ADNe) et préviennent l'initiation des biofilms (Kiedrowski M.R. *et al.*, 2014 ; Tam K., *et al.*, 2018). Les nucléases permettent également l'évasion des bactéries des pièges extracellulaires des neutrophiles (NETs) (Kiedrowski M.R. *et al.*, 2014 ; Tam K., *et al.*, 2019). Les NETs sont un mécanisme de défense immunitaire inné par lequel

l'ADN libéré des neutrophiles mourants immobilise et facilite l'élimination des agents pathogènes envahissants. Ainsi, les nucléases, en dégradant l'ADN de ces NETs permettent à *S. aureus* de s'échapper. De plus, la dégradation de l'ADN des NETs, produit des nucléotides monophosphates, le substrat de l'adénosine synthase A. Cette adénosine synthase A convertit l'ADN dégradé en désoxy-adénosine, induisant une activation de la caspase-3, conduisant à l'apoptose des macrophages entourant l'abcès ou le NET et favorisant ainsi la survie de *S. aureus* (Tam K., *et al.*, 2019).

### c) Les protéases

*S. aureus* sécrète également une famille d'enzymes appelées protéases dont on pensait auparavant qu'elles contribuaient à l'acquisition de nutriments. Il est maintenant connu qu'elles sont également impliquées dans la dissémination bactérienne et l'évasion immunitaire (Pietrocola G., *et al.*, 2017 ; Tam K., *et al.*, 2019 ; Singh V., *et al.*, 2019). Actuellement, *S. aureus* est connu pour produire 12 protéases: (i) une métalloprotéase (l'auréolysine), (ii) deux cystéine-protéases (staphopaine A et B) (III) et neuf protéases à sérine. Ces protéases à sérine comprennent la protéase SspA, les protéases à sérine-like (SpIA à SpIF), l'ETA et l'ETB (Pietrocola G., *et al.*, 2017 ; Tam K., *et al.*, 2019 ; Singh V., *et al.*, 2019).

#### i. L'auréolysine

L'auréolysine est une métalloprotéase dépendante du zinc qui appartient à la famille des thermolysines. Également connue sous le nom de protéase III, elle a été identifiée dans le surnageant de culture de la souche V8 par Arvidson S. et ses collaborateurs en 1972 (Arvidson S., *et al.*, 1972 ; Arvidson S., 1973 ; Pietrocola G., *et al.*, 2017 ; Tam K., *et al.*, 2019 ; Singh V., *et al.*, 2019). L'auréolysine s'auto-active par auto-protéolyse grâce au clivage du propeptide N-terminal (Tam K., *et al.*, 2019). La large spécificité de substrat de l'auréolysine lui permet de cibler une variété de substrats, notamment d'autres protéines de *S. aureus* qui sont importantes pour la virulence mais également des protéines de l'hôte, importantes pour la défense (Tam K., *et al.*, 2019). L'auréolysine peut par exemple inhiber de manière active la phagocytose et la destruction des bactéries par les neutrophiles en réprimant les voies classiques et alternatives du système du complément (Pietrocola G., *et al.*, 2017 ; Tam K., *et al.*, 2019 ; Singh V., *et al.*, 2019). De plus, par clivage et inactivation du peptide antimicrobien LL37, l'auréolysine participe directement à l'évasion immunitaire de *S. aureus* et à sa diffusion, promouvant ainsi sa survie (Pietrocola G., *et al.*, 2017 ; Tam K., *et al.*, 2019 ; Singh V., *et al.*, 2019). Enfin, l'auréolysine peut cliver ClfB, dont un rôle dans le

détachement des cellules bactériennes au niveau des sites colonisés est supposé, contribuant à la propagation de l'infection chez l'hôte (Tam K., *et al.*, 2019 ; Singh V., *et al.*, 2019). Ainsi les différents rôles de l'auréolysine dans la modulation du protéome de *S. aureus* et des molécules de défense innées de l'hôte suggèrent un rôle important dans la promotion de la survie et la dissémination de la bactérie *in vivo*.

## **ii. Les staphopâines**

La staphopâine A (ScpA) a été la première cystéine protéase identifiée chez *S. aureus* par Arvidson S. et ses collaborateurs en 1973 (Arvidson S., *et al.*, 1973). Par la suite, la staphopâine B (SspB) a été identifiée sous le nom de ORFX en 1998 par Chan P.F. et ses collaborateurs (Chan P.F., *et al.*, 1998). Les ScpA et SspB sont sécrétées sous forme de zymogènes puis la Pro-SspB est activée par l'action protéolytique de la SspA (médiée par l'auréolysine cité précédemment), tandis que la pro-ScpA subit une auto-protéolyse rapide (Tam K., *et al.*, 2019 ; Singh V., *et al.*, 2019). Ces deux staphopâines possèdent des structures tridimensionnelles presque identiques malgré le partage d'une identité de séquence primaire limitée (Pietrocola G., *et al.*, 2017 ; Tam K., *et al.*, 2019 ; Singh V., *et al.*, 2019). De plus, *S. aureus* produit les inhibiteurs spécifiques contre les staphopâines, connus sous le nom de staphostatines. Ces staphostatines occupent le même site de liaison que le substrat, et sont donc des inhibiteurs compétitifs (Tam K., *et al.*, 2019 ; Singh V., *et al.*, 2019).

- **La ScpA** : dégrade l'élastine, le collagène, le fibrinogène, la fibronectine et le kininogène présents dans les tissus. La ScpA affecte de manière significative les neutrophiles en altérant leur mobilité vers les chimiokines CXC ainsi que leur activation en clivant le récepteur aux chimiokines CXCR2 au niveau N-terminal (Pietrocola G., *et al.*, 2017 ; Tam K., *et al.*, 2019 ; Singh V., *et al.*, 2019). La ScpA inhiberait également les voies classiques et alternatives du complément (Singh V., *et al.*, 2019). Enfin, la ScpA et la SspB sont toutes deux impliquées dans la modulation de la formation de biofilms. Leur expression est réprimée pendant la formation du biofilm, et leur production entraîne la dispersion des biofilms (Tam K., *et al.*, 2019).
- **La SspB** : dégrade tout d'abord le peptide antimicrobien LL37, favorisant ainsi la survie des bactéries. SspB clive également les CD11b et CD31, des protéines de surface importantes pour l'activation et la survie des phagocytes, provoquant ainsi un déséquilibre de l'homéostasie des cellules immunitaires de l'hôte dans le tissu inflammé (Pietrocola G.,

*et al.*, 2017 ; Tam K., *et al.*, 2019 ; Singh V., *et al.*, 2019). La SspB entrave également la réponse antibactérienne des monocytes en réprimant leur activité chimiotactique et en formant un dimère de SspB conjugué aux monocytes. Ces monocytes conjugués à la SspB sont ensuite phagocytés par des macrophages entraînant un affaiblissement supplémentaire du système immunitaire et une colonisation vigoureuse des bactéries (Pietrocola G., *et al.*, 2017 ; Singh V., *et al.*, 2019). Enfin, la SspB est aussi un puissant activateur de la chimérine, un chimio-attracteur pour les cellules dendritiques et les macrophages permettant ensuite à *S. aureus* de pénétrer à l'intérieur de ces cellules et d'y prospérer. Par conséquent, la SspB semble promouvoir le mode de vie intracellulaire de *S. aureus* pour les infections persistantes (Pietrocola G., *et al.*, 2017 ; Singh V., *et al.*, 2019).

### **iii. Les protéases à sérine**

Actuellement, *S. aureus* peut exprimer neuf protéases à sérine, la protéase SspA et les protéases à sérine-like (SplA à SplF), mais également l'ETA et l'ETB qui ont été développées dans la partie « toxines » (Pietrocola G., *et al.*, 2017 ; Tam K., *et al.*, 2019 ; Singh V., *et al.*, 2019).

- **La protéase SspA :** aussi appelée protéase V8 ou GluV8, est codée par le gène *sspA* et fait partie de l'opéron sérine protéase staphylococcique (*ssp*). SspA a été identifié dans les surnageants de culture de la souche V8 par Drapeau G.R. et ses collaborateurs en 1972 (Drapeau G.R., *et al.*, 1972 ; Tam K., *et al.*, 2019 ; Singh V., *et al.*, 2019). La SspA est une glutamyl-endopeptidase sécrétée comme un précurseur inactif, activée et maturée par l'auréolysine. Cette protéase clive préférentiellement les liaisons peptidiques du côté C-terminal du glutamate (et plus rarement de l'aspartate) de toutes les classes d'immunoglobulines. La préférence pour les résidus chargés négativement comme substrats à pH neutre est due à l'extrémité N-terminale de la protéine chargée positivement. La structure cristalline de la SspA a montré que la protéine est dépourvue des liaisons disulfures, retrouvé couramment dans les autres protéines de cette famille comme les protéases à sérine pancréatiques. Cependant, elle présente une similarité avec d'autres protéases à sérine telles que les toxines exfoliatrices et la trypsine (Pietrocola G., *et al.*, 2017 ; Tam K., *et al.*, 2019 ; Singh V., *et al.*, 2019). La SspA contribue à l'évasion immunitaire de *S. aureus* en dégradant les protéines de l'organisme de l'hôte. La SspA clive notamment les facteurs de liaison au fibrinogène à la surface de *S. aureus* et réduit ainsi l'adhésion des bactéries tout en améliorant leur diffusion au sein de l'hôte (Tam K.,

*et al.*, 2019). De plus, la dégradation de la région Fc des immunoglobulines perturbe la fonction de l'effecteur et entraîne une perte partielle des déterminants antigéniques des anticorps. Elle bloque et altère l'interaction, par l'intermédiaire des immunoglobulines, des antigènes de surface bactériens avec les cellules effectrices du système immunitaire (Pietrocola G., *et al.*, 2017 ; Singh V., *et al.*, 2019).

- Les protéases à sérine-like (Sp/s): sont sécrétées au nombre de 6 (Sp/A-Sp/F) et codées dans l'îlot de pathogénicité vSaβ. Toutes les Sp/s partagent une forte homologie de séquence et sont spécifiques à *S. aureus*. Elles sont appelées protéases à sérine-like car elles présentent une homologie importante en acides aminés avec la protéase SspA et les ETs (Pietrocola G., *et al.*, 2017 ; Tam K., *et al.*, 2019 ; Singh V., *et al.*, 2019). Les Sp/s possèdent une activité protéasique unique, car elles ciblent des protéines impliquées dans les interactions hôte-pathogène plutôt que dans l'acquisition de nutriments. Les Sp/s déclenchent la réponse TH2 et provoquent la production d'anticorps IgE en réponse aux allergènes (Pietrocola G., *et al.*, 2017 ; Tam K., *et al.*, 2019 ; Singh V., *et al.*, 2019). De plus, les Sp/s seraient actives dans diverses maladies chroniques courantes, telles que l'asthme et la pneumonie, où elles provoqueraient des dommages aux poumons. En effet, ces protéases, ainsi que les hémolysines α conduisent à un dysfonctionnement de la barrière épithéliale facilitant ainsi l'invasion des allergènes et les réponses aux allergies (Singh V., *et al.*, 2019). Cependant, le rôle des Sp/s dans la pathogénie de *S. aureus* reste flou.

#### **d) Les hyaluronidases**

Les hyaluronidases (également appelées hyaluronate lyase) sont un groupe d'enzymes dégradant l'acide hyaluronique (HA) et retrouvées chez les vertébrés, les invertébrés et les bactéries (Hart M.E., *et al.*, 2013 ; Tam K., *et al.*, 2019). Parmi les staphylocoques, seuls *S. aureus* et *S. hyicus* sont connus pour produire cette enzyme (Tam K., *et al.*, 2019). L'acide hyaluronique (HA) est un polysaccharide linéaire composé d'unités répétitives de N-acétylglucosamine et d'acide glucuronique liés par des liaisons glycosidiques alternées β-1,3 et β-1,4. C'est un composant essentiel des matrices extracellulaires chez les vertébrés (liquide amniotique, cartilage articulaire, sang, cerveau, foie, plasma, peau, liquide synovial), assurant l'homéostasie et l'intégrité structurelle des cellules et des tissus (Hart M.E., *et al.*, 2013 ; Tam K., *et al.*, 2019). De plus, c'est également un composant impliqué dans de nombreux processus physiologiques tels que la prolifération, la différenciation, la migration et l'adhésion

des cellules, ainsi que l'inflammation et la cicatrisation des blessures (Hart M.E., *et al.*, 2013). De plus, la hyaluronidase est importante pour la régulation immunitaire et à un rôle de facteur de propagation bactérienne en lysant l'HA dans les matrices extracellulaires et les biofilm permettant aux bactéries de disséminer (Tam K., *et al.*, 2019).

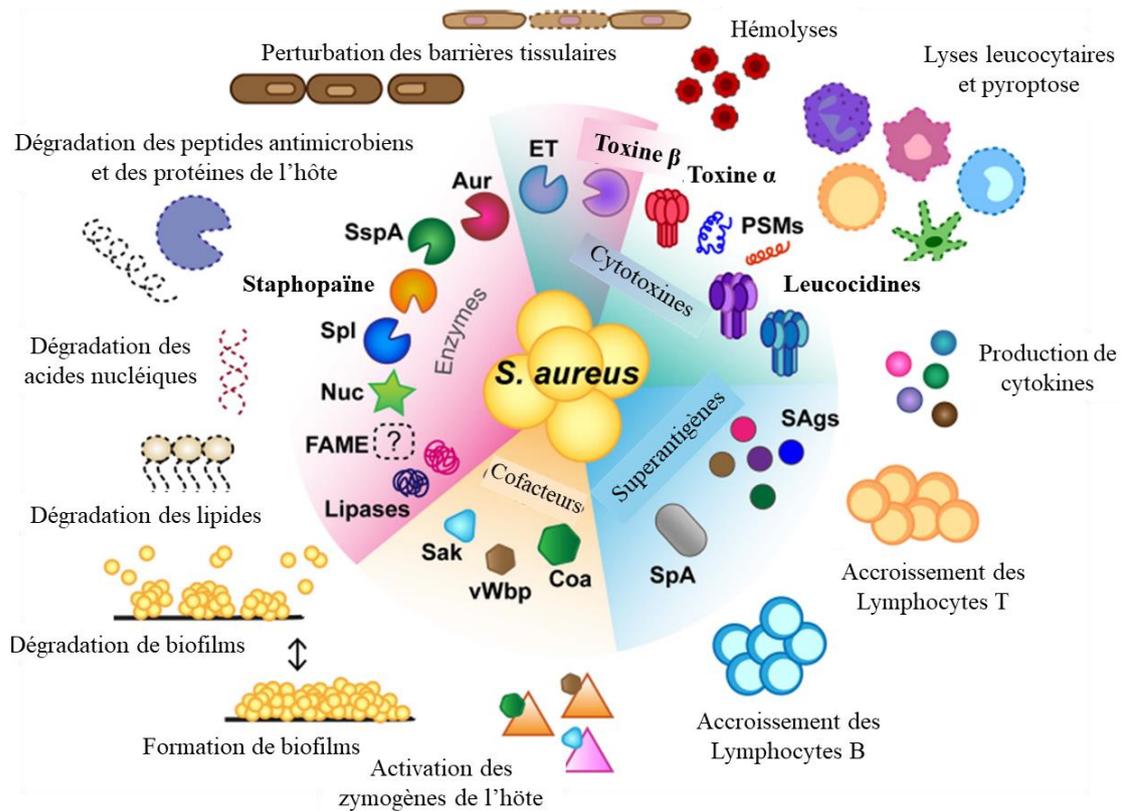
### e) Les lipases

Depuis que la première activité lipolytique a été décrite chez les staphylocoques par Eijkmann C. en 1901 (Eijkmann C., 1901), diverses lipases staphylococciques ont été purifiées et leurs propriétés biochimiques étudiées (Nguyen M.T., *et al.*, 2018). La structure des précurseurs de toutes les lipases staphylococciques étudiées jusqu'à présent est toujours la même : elles sont organisées en pré-protéines divisées en un peptide signal de 35 à 38 acides aminés, un pro-peptide de 207 à 321 acides aminés (globalement hydrophile) et d'un peptide mature comprenant 383 à 396 acides aminés (Nguyen M.T., *et al.*, 2018 ; Tam K., *et al.*, 2019). Chez *S. aureus*, les lipases sont produites sous la forme pré-pro-enzyme avant le clivage du peptide signal par la peptidase signal I, permettant sa sécrétion. Le peptide sécrété pro-enzyme est ensuite clivé par l'auréolysine pour donner la lipase mature (Nguyen M.T., *et al.*, 2018 ; Tam K., *et al.*, 2019). La plupart des souches de *S. aureus* contiennent deux gènes de lipase: les lipases 1 et 2 de *S. aureus* (SAL1 et SAL2) dont les gènes sont parfois annotés respectivement comme *gehA* et *gehB* pour « hydrolase d'ester de glycérol » (Nguyen M.T., *et al.*, 2018 ; Tam K., *et al.*, 2019). Bien que partageant le même mécanisme catalytique, SAL1 et SAL2 diffèrent sur le plan biochimique et ont des préférences différentes en matière de substrat. En effet, SAL1 fonctionne de manière optimale à un pH de 6, est stable sous des conditions acides mais est inactivée lorsque le pH est supérieur à 10. En revanche, SAL2 fonctionne de manière optimale autour d'un pH de 8 et est inactive dans des conditions acides (Tam K., *et al.*, 2019). De plus les analyses biochimiques et moléculaires ont montré que le  $\text{Ca}^{2+}$  stabilise la structure de SAL1 et augmente son activité, permettant aux chélateurs, tels que l'EDTA et l'EGTA, d'inhiber son activité. A l'inverse, la présence de  $\text{Ca}^{2+}$  ne renforce pas l'activité de SAL2 et les chélateurs ont des effets minimes sur son activité (Tam K., *et al.*, 2019). Enfin, SAL1 a une forte préférence pour les triglycérides à chaîne courte et ne peut pas hydrolyser les triglycérides à chaîne longue alors que SAL2 préfère les triglycérides à chaîne longue comme substrats mais peut également hydrolyser les triglycérides, monoglycérides et diglycérides à chaîne courte dans une moindre mesure (Nguyen M.T., *et al.*, 2018 ; Tam K., *et al.*, 2019). La conservation des lipases chez les espèces staphylococciques implique une importance évolutive, cependant, leur contribution dans la virulence n'est pas claire. Il a été

montré que des isolats cliniques de *S. aureus* provenant d'infections des tissus profonds produisaient plus de lipases que des isolats provenant d'infections superficielles (Tam K., *et al.*, 2019). Il a également été décrit que de faibles concentrations de lipase étaient fortement chimiotactiques alors que des concentrations plus élevées de lipase immobilisaient les granulocytes et impactaient la destruction phagocytaire de *S. aureus* en raison de la diminution de l'absorption bactérienne (Nguyen M.T., *et al.*, 2018 ; Tam K., *et al.*, 2019). Paradoxalement, l'hydrolyse des triglycérides par les lipases libère des acides gras libres bactéricides pouvant interférer avec la pathogénicité. Heureusement, la plupart des souches productrices de lipases produisent également une enzyme modifiant les acides gras (FAME) (Tam K., *et al.*, 2019).

#### **f) L'enzyme de modification des acides gras (FAME)**

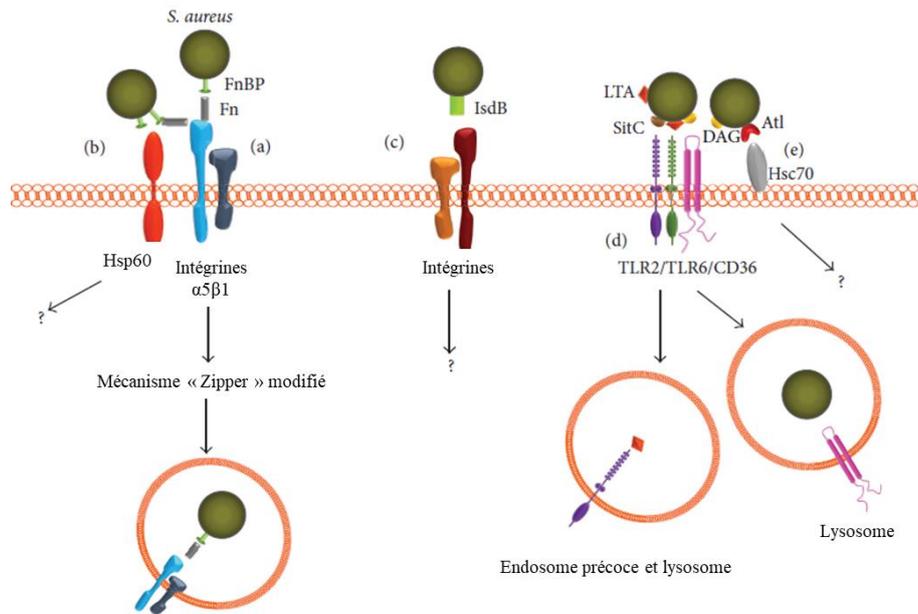
La FAME a été décrite pour la première fois en 1992 par Mortensen J.E et ses collaborateurs en observant que les filtrats de culture de *S. aureus* contenaient une enzyme extracellulaire qui contrecarrait l'activité bactéricide des lipides de l'hôte dans les abcès (Mortensen J.E., *et al.*, 1992 ; Lu T., *et al.*, 2012 ; Tam K., *et al.*, 2019). Bien que 80 % des souches de *S. aureus* et de *S. epidermidis* produisent cette enzyme et que son activité puisse être détectée expérimentalement, le gène codant pour la FAME ainsi que la protéine ne sont pas encore identifiés (Lu T., *et al.*, 2012 ; Tam K., *et al.*, 2019). Dans un abcès, les acides gras microbicides font partie de la première ligne de défense de l'hôte contre les agents pathogènes envahissants. Ainsi, la FAME favorise la survie des staphylocoques en estérifiant les acides gras libres bactéricides avec un substrat alcoolique pour former des esters d'alcool. Le cholestérol étant son substrat préférentiel puisqu'il est présent en abondance dans l'abcès (Lu T., *et al.*, 2012 ; Tam K., *et al.*, 2019). Cependant, l'activité enzymatique de la FAME est inhibée par les di- et triglycérides avec des chaînes latérales d'acides gras insaturés. Ainsi, on pense que dans les abcès, les lipases et les FAME se complètent pour améliorer la survie des staphylocoques. En effet, l'activité des lipases décomposent les triglycérides, des inhibiteurs de la FAME, libérant des acides gras libres que la FAME estérifie, protégeant ainsi les staphylocoques (Lu T., *et al.*, 2012 ; Tam K., *et al.*, 2019). Cette hypothèse est corroborée par l'observation que la plupart des souches de *S. aureus* qui portent des gènes codant pour les lipases ont des activités FAME et qu'elles sont en corrélation avec le caractère invasif de la bactérie *in vivo* (Lu T., *et al.*, 2012 ; Tam K., *et al.*, 2019).



**Figure 17 : Récapitulatif des nombreuses toxines et enzymes sécrétées par *S. aureus* (adaptée de Tam K., et al., 2018).** Les superantigènes sont des protéines possédant des propriétés mitogènes élevées, provoquant un accroissement des Lymphocytes B et T. Cette expansion entraîne une délétion clonale et une production massive de cytokines. Les cytotoxines, telles que **la toxine  $\alpha$**  et **les leucocidines**, provoquent la production de cytokines, l'hémolyse et la mort des leucocytes en ciblant des récepteurs de surface cellulaire spécifiques. **Les PSMs** servent de médiateurs à la cytolyse en s'insérant dans la bicouche lipidique des membranes cellulaires. Des enzymes, telles que **la toxine  $\beta$**  et **les toxines exfoliatrices**, provoquent une cytotoxicité entraînant la mort cellulaire, l'inflammation et la rupture des barrières tissulaires. D'autres enzymes, dont diverses **protéases** et **nucléases**, sont les médiateurs de la dégradation des protéines de l'hôte, contrecarrant de nombreuses molécules importantes du système immunitaire de l'hôte. Ces enzymes peuvent également dégrader les biofilms en vue de la dissémination bactérienne. **Les lipases** et **les FAME** travaillent en synergie pour dégrader les lipides dans l'environnement afin d'obtenir des nutriments. Les cofacteurs, dont **la coagulase**, **le facteur de von Willebrand** et **la staphylokinase**, se lient et activent les zymogènes du système de coagulation de l'hôte pour faciliter la formation et la dissolution des caillots. Ensemble, ces toxines et ces enzymes fournissent des nutriments essentiels (c'est-à-dire du fer et du carbone) importants pour la croissance et la survie des bactéries. Elles ciblent divers aspects des défenses immunitaires de l'hôte, contribuant ainsi à la virulence globale de *S. aureus* pendant les infections.

### **C/ Facteurs impliqués dans l'internalisation**

*S. aureus* a longtemps été décrit comme un pathogène extracellulaire, mais l'apparition et l'étude de nouvelles souches invasives a révélé le rôle de l'internalisation dans les cellules hôtes pour la pathogénie. Il est ainsi prouvé que plusieurs souches de *S. aureus* ont la capacité d'envahir et de persister dans les cellules phagocytaires non professionnelles, telles que les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les ostéoblastes et les fibroblastes mais également dans les cellules immunitaires comme les lymphocytes T, les macrophages et les neutrophiles (Alva-Murillo N., *et al.*, 2014 ; Foster T.J., 2016 ; Josse J., *et al.*, 2017). Cette capacité permet à la bactérie d'échapper au système immunitaire inné de l'hôte et de survivre à l'intérieur d'une grande variété de cellules. Les bactéries ont besoin d'une étape initiale d'adhésion à la membrane cellulaire et aux substrats de la matrice extracellulaire (collagène, vitronectine, fibrinogène, et surtout fibronectine) par l'intermédiaire de protéines de surface et sont ensuite internalisées. Par conséquent, l'adhésion et l'invasion dans les cellules eucaryotes sont des étapes majeures de la lutte contre les bactéries. *S. aureus* a ainsi développé différents mécanismes moléculaires impliquant différents récepteurs afin de pénétrer dans ces cellules (Figure 18) (Alva-Murillo N., *et al.*, 2014). L'activation de ces récepteurs eucaryotes tels que les intégrines déclenche souvent une internalisation par l'intermédiaire du récepteur facilitant ainsi l'accès à une niche intracellulaire protégée et favorisant la réplication bactérienne (Alva-Murillo N., *et al.*, 2014).



**Figure 18 : Différents récepteurs et mécanismes impliqués dans l'internalisation de *S. aureus* dans des cellules phagocytaires non professionnelles (adaptée de Alva-Murillo N., *et al.*, 2014).** (a) Le premier mécanisme décrit implique les intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  cellulaires et les FnBPs bactériennes via la Fibronectine (Fn) comme molécule de liaison. Cette voie entraîne l'endocytose bactérienne par un mécanisme de type « Zipper » modifié. (b) Les FnBP interagissent directement avec l'Hsp60 de l'hôte ou avec l'intégrine et l'Hsp60 comme corécepteur via un pont Fn. Le mécanisme d'endocytose reste cependant inconnu. (c) Le déterminant de surface B régulé par le fer (IsdB) contribue à l'invasion, et interagit très probablement avec les intégrines qui se lie à leurs ligands. Cependant, ici aussi la voie d'endocytose n'a pas été déterminée. (d) Le TLR2 est impliquée dans l'internalisation avec le CD36 qui agit comme un corécepteur et est capable de reconnaître les diacylglycérides. Les dimères TLR2/TLR6 quant à eux reconnaissent différents PAMPs, tels que LTA et SitC. (e) L'Hsc70 se lie directement à l'autolysine (Atl) et facilite l'internalisation de *S. aureus*, mais les voies d'endocytose restent encore une fois non caractérisées.

### 1- Mécanisme impliquant les protéines liant la fibronectine (FnBPs)

Le premier mécanisme d'internalisation met en jeu la fibronectine (Fn), qui va permettre la création d'un pont entre les FnBPs à la surface de la bactérie et les intégrines  $\alpha 5 \beta 1$  à la surface de la cellule hôte (Hoffmann C., *et al.*, 2011 ; Fraunholz M., *et al.*, 2012 ; Alva-Murillo N., *et al.*, 2014 ; Foster T.J., 2016 ; Josse J., *et al.*, 2017). Ce mécanisme est largement reconnu comme étant le principal processus d'internalisation. Ce pont met en jeu le domaine N-terminal de la fibronectine, qui se lie au FnBP, et le motif RGD de son domaine C-terminal, qui se lie aux intégrines. *S. aureus* exprime deux isoformes de FnBP (FnBPA et FnBPB), présentes dans la majorité des isolats associés à une maladie invasive (Hoffmann C., *et al.*, 2011 ; Alva-Murillo N., *et al.*, 2014 ; Josse J., *et al.*, 2017). Bien que la FnBPA contribue davantage aux symptômes et aux maladies que la FnBPB, les deux FnBPs semblent nécessaires pour le développement d'infections graves (Josse J., *et al.*, 2017). De plus, il

semble que la coopération entre les deux FnBPs est nécessaire pour une forte adhésion cellulaire ou pour déclencher efficacement l'internalisation *in vivo* (Josse J., *et al.*, 2017). L'activation et le regroupement des intégrines  $\alpha 5\beta 1$  va déclencher une internalisation par endocytose grâce à un mécanisme « zipper » modifié, proche de la phagocytose. Elle met en jeu des voies de signalisation particulières entraînant le recrutement de protéines (l'actinine, la paxilline, la zyxine, et la tensine) et de kinases (la kinase d'adhésion focale (FAK) et la Src kinase). L'étape cruciale dans ces événements de signalisation est la polymérisation de l'actine. Cette polymérisation provient de l'association de la cortactine et du complexe Arp2/3, aboutissant à une réorganisation du cytosquelette d'actine et à l'endocytose. En aval de la voie FAK-Src, l'activation de la PI3K et de l'Akt est également importante pour l'internalisation de *S. aureus*, bien que la voie moléculaire est encore loin d'être entièrement comprise (Alva-Murillo N., *et al.*, 2014 ; Josse J., *et al.*, 2017). Ce mécanisme semble être un processus actif du côté cellulaire puisque l'absorption bactérienne est observée avec des bactéries tuées par la chaleur. Cependant, il a également été montré que *S. aureus* peut stimuler sa propre absorption en régulant à la hausse l'expression des intégrines  $\beta 1$  par sécrétion d'hémolysine  $\alpha$ . Dans ce cas, la bactérie doit être viable car le processus nécessite une activité cellulaire et bactérienne (Josse J., *et al.*, 2017). Dans ce modèle, la protéine Eap joue également un rôle important puisqu'elle permet une agglutination des bactéries et améliore ainsi leur internalisation.

Un deuxième mécanisme mettant en jeu les FnBPs a été mis en évidence. Ce mécanisme implique, cette fois ci, une interaction directe entre les FnBPs à la surface des bactéries et la protéine de choc thermique Hsp60 à la surface cellulaire (Dziewanowska K., *et al.*, 2000 ; Alva-Murillo N., *et al.*, 2014). Les protéines de choc thermique (Hsp) sont des molécules hautement conservées au cours de l'évolution, exprimées à la fois par les cellules procaryotes et eucaryotes. Ces protéines remplissent des fonctions intracellulaires importantes en ce qui concerne le repliement et le transport des protéines (Alva-Murillo N., *et al.*, 2014). Dziewanowska K. et ses collaborateurs ont tout d'abord montré que la Hsp60 interagissait avec la FnBP mais également qu'un prétraitement des cellules épithéliales avec un anticorps monoclonal spécifique de la Hsp60 eucaryote réduisait significativement l'internalisation de *S. aureus* (Dziewanowska K., *et al.*, 2000 ; Alva-Murillo N., *et al.*, 2014). Cependant, le rôle précis de l'Hsp60 doit encore être élucidé. En effet, deux hypothèses sont envisagées, à savoir soit l'Hsp60 agit comme un co-récepteur pour renforcer la liaison des complexes FnBPs-Fn aux intégrines, soit elle est impliquée directement dans la transduction du signal (Dziewanowska K., *et al.*, 2000 ; Josse J., *et al.*, 2017). De plus, il est tout à fait possible que

ces deux mécanismes soient complémentaires, avec la protéine Hsp60 qui agirait comme un co-récepteur afin de compenser la faible affinité existant entre la fibronectine et les intégrines (Dziewanowska K., *et al.*, 2000).

## 2- Mécanisme impliquant l'autolysine

La voie d'internalisation passant par les FnBPs et les intégrines est le mécanisme principal d'invasion des cellules hôtes mais il existe également des voies secondaires. En effet, il a été montré que cette voie ne fonctionne pas pour toutes les souches de staphylocoques. Chez *S. aureus*, la souche Newman possède les gènes des FnBPs, mais suite à une mutation ayant introduit un codon stop dans leur séquence, elle produit une forme tronquée des FnBPs au niveau C-terminal (Grundmeier M., *et al.*, 2004). Cette mutation empêche l'ancrage de manière covalente à la paroi cellulaire par absence du motif consensus LPXTG. Par conséquent, cela conduit à une perte des fonctions dépendantes des FnBPs, telles que la forte adhésion à la fibronectine immobilisée, la liaison du fibrinogène et l'invasion des cellules hôtes. Cependant, une invasion indépendante de ces FnBPs a quand même été observée chez *S. aureus* Newman (Fraunholz M., *et al.*, 2012). En effet, cette souche possède une autre protéine permettant son internalisation, la protéine Autolysine (Atl). Cette internalisation passe par la fixation directe à un récepteur cellulaire, la protéine apparentée aux protéines de choc thermique 70 (Hsc70), identifié par Hirschhausen N. et ses collaborateurs au niveau des cellules endothéliales humaines (Hirschhausen N., *et al.*, 2010). Cependant, les mécanismes exacts découlant de cette interaction n'ont pas encore été élucidés. L'Atl est une peptidoglycane hydrolase bifonctionnelle (138 kDa) avec un domaine amidase (AM) en position N-terminal et un domaine Glucosaminidase (GL) en position C-terminal, séparés par trois répétitions directes R1, R2 et R3 (Porayath C., *et al.*, 2018 ; Grilo I.R., *et al.*, 2013). Le gène *atl* est traduit en un seul propeptide, sécrété et clivé de manière protéolytique pour donner les deux formes matures AM (~63 kDa) et GL (~51 kDa) (Grilo I.R., *et al.*, 2013 ; Porayath C., *et al.*, 2018). La forme AM est associée aux motifs répétés R1 et R2 tandis que la forme GL est associée à R3. Ces domaines répétés n'ont aucune activité lytique mais sont responsables de la fixation et de la reconnaissance du substrat (Grilo I.R., *et al.*, 2013 ; Porayath C., *et al.*, 2018). Il est intéressant de noter que cette internalisation via l'Atl nécessite à la fois une activité bactérienne et cellulaire puisque l'efficacité de ce mécanisme dépend de l'expression du ligand bactérien et du récepteur cellulaire. En effet, la production de Hsc70 sur les cellules EA.hy 926 est stimulée par l'infection par *S. aureus* (Hirschhausen N., *et al.*, 2010 ; Josse J., *et al.*, 2017). L'Atl est également impliquée dans le

renouvellement de la paroi cellulaire et dans la division cellulaire des bactéries. Durant ce processus, elle va permettre le clivage du peptidoglycane de la paroi bactérienne et ainsi libérer les deux cellules fille. Cependant, elle n'a aucun effet sur la croissance bactérienne (Grilo I.R., *et al.*, 2013). Des mutations dans le gène *atl* conduisent à diverses altérations phénotypiques : une division désordonnée, la formation de grands groupes de cellules indiquant une séparation cellulaire défectueuse et une surface extérieure rugueuse (Grilo I.R., *et al.*, 2013). Enfin, un rôle dans la formation des biofilms a également été décrit ainsi qu'une activité lytique du domaine amidase (Biswas R., *et al.*, 2006 ; Hirschhausen N., *et al.*, 2010 ; Houston P., *et al.*, 2011 ; Bose J.L., *et al.*, 2012 ; Grilo I.R., *et al.*, 2013 ; Josse J., *et al.*, 2017)

### 3- Autres facteurs impliqués dans l'internalisation bactérienne

Les FnBPs et les autolysines sont les deux facteurs bactériens majeurs dans le mécanisme d'internalisation de *S. aureus* dans les cellules de l'hôte. Cependant, d'autres facteurs ont été décrits comme co-récepteurs ou facilitateurs de l'internalisation bactérienne.

- L'IsdB: fait partie de la famille des déterminants de surface régulés par le fer décrit précédemment dans la partie « famille des protéines au motif NEAT » (page 56). Ce facteur a été décrit comme permettant l'adhésion de *S. aureus* aux plaquettes via les intégrines  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  (Zapatoczna M., 2013 ; Alva-Murillo N., *et al.*, 2014). De plus, l'expression d'IsdB favorise l'invasion de *S. aureus* dans les cellules de la lignée 293T (HEK 293 = cellules humaines embryonnaires de reins) et dans les cellules de la lignée cancéreuse humaine HeLa. Il a été montré des niveaux accrus d'invasion par *S. aureus* Newman et SH1000 cultivés dans des conditions limitées en fer, en présence ou en absence de FnBP ou de fibronectine plasmatique. Ces résultats suggèrent que l'IsdB pourrait fournir un mécanisme d'absorption de secours (Zapatoczna M., 2013). Cependant, l'interaction entre l'IsdB et les intégrines requiert une conformation spécifique de l'intégrine permettant une grande affinité. Il est postulé que de l'IsdB soluble pourrait se fixer aux intégrines et les maintenir dans une conformation active. Ce changement conformationnel améliorerait ou stabiliserait la fixation des intégrines à leur ligand, promouvant ainsi l'internalisation des bactéries (Zapatoczna M., 2013).

- L'Eap: est une protéine sécrétée de *S. aureus* se liant aux composants extracellulaires de la matrice et décrit précédemment dans la partie « Eap » (page 61). Il a été montré que l'Eap participe au processus d'internalisation bactérienne puisqu'en son absence, une réduction de l'adhésion et de l'internalisation de *S. aureus* dans les fibroblastes et les cellules épithéliales a pu être observée (Haggar A., *et al.*, 2003). De plus, après la pré-incubation des bactéries avec l'Eap, on a constaté que l'adhésion et l'internalisation par les cellules eucaryotes étaient améliorées (Haggar A., *et al.*, 2003 ; Bur S., *et al.*, 2013 ; Alva-Murillo N., *et al.*, 2014). Il est suggéré que ce processus d'invasion pouvait être influencé par la phosphatase neutre se trouvant à la surface de la bactérie et se liant à l'Eap même si actuellement, aucun rapport n'a encore décrit l'identification d'un récepteur cellulaire pour l'Eap (Alva-Murillo N., *et al.*, 2014). L'Eap semble provoquer un effet fort et indépendant de la FnBP sur l'invasion staphylococcique des kératinocytes, effet qui ne semble pas lié à un mécanisme d'ancrage des bactéries à la surface des cellules eucaryotes. De plus, l'Eap sécrétée par *S. aureus* améliore également l'internalisation d'autres bactéries pathogènes (Entérobactéries et Staphylocoques à coagulase négative) fréquemment rencontrées dans le contexte des infections cutanées polymicrobiennes (Bur S., *et al.*, 2013). Il a également été suggéré que l'Eap pourrait améliorer l'assimilation de *S. aureus* par les kératinocytes via un mécanisme semblable à celui des FnBPs et induisant une invasion par endocytose grâce à un mécanisme « zipper » modifié. En revanche, contrairement aux FnBPs, l'Eap exogène pourrait induire ce mécanisme d'absorption même si la bactérie n'est pas directement liée à l'intégrine, augmentant ainsi l'absorption des cellules bactériennes qui, elles, sont fixées aux kératinocytes par d'autres molécules de la matrice de la cellule hôte (Bur S., *et al.*, 2013).
  
- Les Toll-Like Récepteurs (= TLR) : sont des récepteurs permettant la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes (=PAMPs), et permettent l'induction de réponses spécifiques contre les micro-organismes. Durant les infections à *S. aureus*, le TLR-2 est le principal récepteur impliqué, et des études ont montré sa participation dans l'internalisation par des cellules phagocytaires non professionnelles (Alva-Murillo N., *et al.*, 2014). En effet, il a été montré que le blocage de ces TLR-2 par des anticorps entraînaient une diminution du nombre de bactéries internalisées par les mastocytes dérivés du sang du cordon (Rocha-de-Souza C.M., *et al.*, 2008) ainsi que par des cellules épithéliales mammaires bovines (Alva-Murillo N., *et al.*, 2014). Cependant, il reste à préciser si cette internalisation médiée par les TLR-2 est la conséquence de la

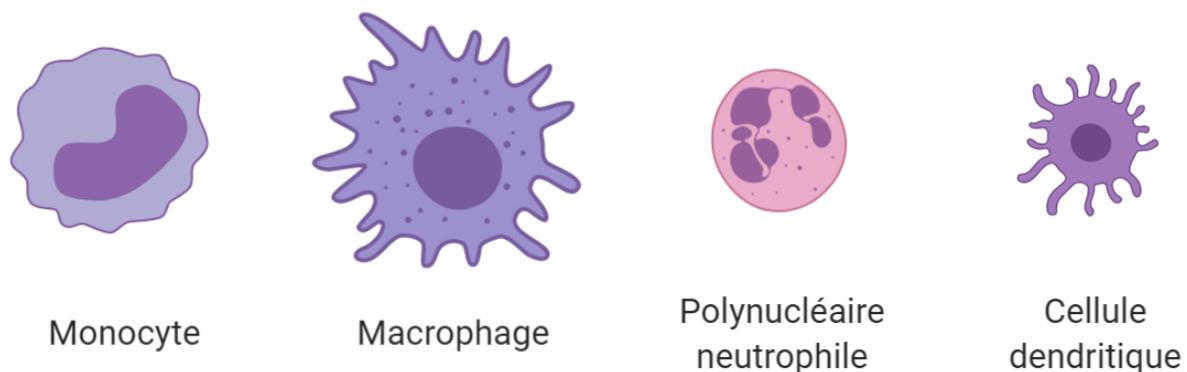
signalisation de ce récepteur ou si la reconnaissance des PAMPs bactériens est une étape clé de l'endocytose. De plus, il semblerait que dans ce mécanisme, le CD36 intervienne comme un facilitateur ou un co-récepteur. Ce CD36 aide pour la reconnaissance du diacylglycéride à travers le complexe TLR-2/TLR-6 conduisant ainsi à l'invasion bactérienne primaire des cellules phagocytaires (Alva-Murillo N., *et al.*, 2014)

Comme on peut le voir, de nombreux mécanismes permettent à *S. aureus* de pénétrer dans une vaste gamme de cellules de l'hôte afin notamment de se protéger du système immunitaire, favoriser sa survie et sa dissémination. Cependant, l'hôte a mis en place des stratégies afin de reconnaître et d'éliminer les micro-organismes pathogènes.

#### **IV] Phagocytose et échappement immunitaire de *S. aureus***

La phagocytose a été décrite pour la première fois par Elie Metchnikoff il y a plus de 100 ans, après l'observation au microscope du processus phagocytaire, d'abord dans les cellules amiboïdes de l'éponge marine, puis dans les espèces supérieures (Metchnikoff E., 1884). Depuis lors, elle a été reconnue comme un élément essentiel des réponses immunitaires innées et adaptatives aux agents pathogènes (Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Gordon S., *et al.*, 2016). Afin de protéger leur corps dans son ensemble, les organismes doivent pouvoir éliminer les particules indésirables. Ces particules peuvent être d'origine exogène telles que les pathogènes (bactéries, champignons et protistes pathogènes) ou les débris polluants (particules d'amiante et de silicate), ou endogène à l'organisme telles que les cellules apoptotiques et sénescents (Gray M., *et al.*, 2016). Afin de traiter ces menaces, de nombreuses cellules ont développé la capacité d'engloutir les particules et de les décomposer, permettant ainsi leur élimination (Gray M., *et al.*, 2016). Ce processus est une forme spécialisée d'endocytose qui consiste en la reconnaissance et l'ingestion de particules de plus de 0,5µm de diamètre dans une vésicule dérivée de la membrane plasmique, connue sous le nom de phagosome (Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Gray M., *et al.*, 2016 ; Gordon S., *et al.*, 2016 ; Rosales C., *et al.*, 2017). Cependant, la phagocytose est un mécanisme impliquant la reconnaissance et la fixation des proies par des récepteurs à la surface des cellules (Flannagan R.S., *et al.*, 2012). Les corps étrangers tels que les bactéries ou les champignons peuvent être éliminés des sites d'infection par des phagocytes professionnels tels que les neutrophiles, les macrophages, les monocytes et les cellules dendritiques (Figure 19). De plus, certaines

cellules comme les fibroblastes, les cellules épithéliales et les cellules endothéliales peuvent également effectuer une phagocytose. Cependant, même si ces phagocytes non professionnels ne peuvent pas ingérer les micro-organismes, ils sont importants pour éliminer les corps apoptotiques (Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Gray M., *et al.*, 2016 ; Rosales C., *et al.*, 2017 ; Lim J.J., *et al.*, 2017). L'histoire de la recherche sur la phagocytose a progressé parallèlement à l'évolution de nos connaissances sur la biologie des macrophages et des neutrophiles et à son importance dans divers processus biologiques. Ceux-ci comprennent le développement, l'inflammation, le remodelage et la réparation des tissus, l'immunité innée et acquise ainsi que l'élimination des cellules sénescents, apoptotiques et nécrotiques (Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Gordon S., *et al.*, 2016 ; Rosales C., *et al.*, 2017).



**Figure 19 : Morphologie des différentes cellules phagocytaires professionnelles (réalisée sur Biorender.com).** Les monocytes sont de grandes cellules possédant un noyau volumineux, de petites expansions cytoplasmiques ainsi que des grains azurophiles. Les macrophages sont les cellules les plus grandes, caractérisées par des expansions cytoplasmiques et possédant un appareil vacuolaire développé. Les polynucléaires neutrophiles sont caractérisés par un noyau unique présentant plusieurs lobes de formes diverses ainsi que par la présence de différents types de granules dans leur cytoplasme. Les cellules dendritiques sont caractérisées par des prolongements cytoplasmiques appelés dendrites.

## A/ Les cellules phagocytaires

Les cellules phagocytaires (ou phagocytes), appartiennent à l'immunité innée et jouent un rôle essentiel dans le développement des tissus, l'homéostasie et la réparation des tissus blessés (Ogle M.E., *et al.*, 2016). De plus, elles représentent la première ligne de défense contre les agents pathogènes envahisseurs grâce notamment à un arsenal d'effecteurs antimicrobiens (Weiss G., *et al.*, 2015). Cette immunité innée permet à l'organisme de se défendre de manière instantanée et non spécifique puisqu'elle possède les mêmes mécanismes d'action pour tous les pathogènes rencontrés. Elles ont pour rôles de phagocyter les micro-organismes, de les dégrader et d'alerter d'autres cellules immunitaires spécialisées (les

lymphocytes), appartenant elles, à l'immunité acquise, et représentant la deuxième ligne de défense de l'organisme. La coopération de ces deux systèmes de défense permet ainsi un meilleur contrôle de l'infection. Les cellules phagocytaires comprennent les polynucléaires neutrophiles, les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques immatures (Figure 19) (Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Rosales C., *et al.*, 2017 ; Gray M., *et al.*, 2017 ; Lim J.J., *et al.*, 2017).

## 1- Monocytes et macrophages

Les monocytes et les macrophages appartiennent au système phagocytaire mononucléé originaire de la lignée myéloïde (Van Furth R., *et al.*, 1972).

### a) Les monocytes

Les monocytes sont des éléments immatures du sang circulant, représentant 4 à 10% des leucocytes sanguins, qui vont migrer vers les différents organes où ils se différencieront en macrophages résidents (Collin M., *et al.*, 2016). Ils sont grand (12 à 20 µm) avec un noyau volumineux, central ou périphérique, réniforme ou indenté. De plus, leur cytoplasme est caractérisé par des expansions cytoplasmiques et par la présence de grains azurophiles (Figure 19). Le monocyte est issu de plusieurs étapes de différenciation. Tout d'abord, le monoblaste apparaît dans la moelle osseuse, avant de donner naissance au promonocyte puis au monocyte. Puis, ce dernier quitte la moelle au bout d'une quinzaine d'heures (Bongrand P., 2014). Les monocytes humains sont hétérogènes dans leur expression des CD14 et CD16, et cela a été utilisé pour les diviser en sous-populations. Ils se différencient en (i) monocytes classiques (environ 90%) avec une forte expression de CD14 (protéine de liaison au LPS) et une faible expression de CD16 (récepteur Fc-gamma III) et en (ii) monocytes non classiques avec une faible expression de CD14 et une forte expression de CD16 (Radzun H.-J., 2015 ; Collin M., *et al.*, 2016). En outre, on distingue un type de monocyte intermédiaire avec une expression élevée de CD14 et une expression modérée de CD16 (Radzun H.-J., 2015). Ces populations de monocytes sanguins peuvent avoir différents stades de différenciation : les monocytes quittent la moelle osseuse en tant que monocytes classiques et peuvent se différencier dans le sang par le stade intermédiaire en monocytes non classiques. Les monocytes classiques peuvent également être recrutés au niveau des tissus inflammatoires où ils se différencieront en macrophages inflammatoires pour répondre à l'invasion de pathogène. En revanche, les monocytes non classiques vont être recrutés dans les tissus non inflammatoires où ils

deviendront des macrophages sanguins résidents différenciés (Ginhoux F., *et al.*, 2014 ; Radzun H.-J., 2015 ; Collin M., *et al.*, 2016)

### **b) Les macrophages**

Les macrophages, issus des monocytes, sont des cellules ayant une taille plus importante, ayant développé un appareil vacuolaire (vésicules d'endocytose, endosomes, lysosomes primaires, phagosomes) et possédant des expansions cytoplasmiques formant de véritables pseudopodes (Figure 19). Les macrophages jouent de nombreux rôles, tant dans la réponse immunitaire innée qu'adaptative, et sont donc ubiquitaires au sein de l'organisme. Ils sont ainsi présents dans tous les organes, où ils représentent 10 à 20% des cellules, et sont nommés différemment en fonction de leur localisation. Ainsi, on parlera de macrophages dans la rate et les cavités pleurales, péritonéales ou péricardiques, de cellules de Kupffer dans le foie, de microgliocytes dans les tissus nerveux, de macrophages alvéolaires dans les poumons, d'histiocytes dans les tissus conjonctifs ou encore d'ostéoclastes dans les os (Bongrand P., 2014 ; Radzun H.-J., 2015). Contrairement aux monocytes sanguins, les macrophages représentent des cellules non migratrices à longue durée de vie et sont les premières cellules à rencontrer le pathogène (Radzun H.-J., 2015 ; Gordon S., *et al.*, 2017). En condition d'homéostasie, le maintien des macrophages résidents dans les tissus est indépendant des monocytes circulants et est assuré par leur capacité d'auto-renouvellement (Radzun H.-J., 2015 ; Ogle M.E., *et al.*, 2016 ; Davies L.C., *et al.*, 2016 ; Gordon S., *et al.*, 2017). Cependant, une stimulation inflammatoire massive provoque un afflux de monocytes classiques dans le tissu, complétant et soutenant ainsi les macrophages résidents en tant que macrophages inflammatoires. Cela a conduit à la notion de polarisation des macrophages en deux phénotypes les macrophages M1 ou M2 sur le même type que la polarisation des lymphocytes T en TH1 et TH2.

- Les macrophage M1 (ou inflammatoires): représentent le sous-ensemble des macrophages « activés classiquement », provenant des monocytes classiques et activés par des stimuli microbiens tels que les lipopolysaccharides (LPS) et/ou par des cytokines inflammatoires telles que le TNF $\alpha$  ou l'interféron  $\gamma$  des cellules TH1 (Abrial C., 2014 ; Radzun H.-J., 2015 ; Ogle M.E., *et al.*, 2016 ; Davies L.C., *et al.*, 2016 ; Gordon S., *et al.*, 2017). Ces cellules jouent principalement un rôle dans l'initiation et le maintien de l'inflammation, par la production de nombreuses cytokines inflammatoires, d'espèces réactives de l'oxygène et de facteurs de croissance (Radzun H.-J., 2015 ; Ogle M.E., *et al.*,

2016 ; Abrial C., 2014). Les cytokines inflammatoires produites par les macrophages M1 soutiennent la défense de l'hôte par le biais de l'élimination des agents pathogènes, de l'élimination des tissus nécrotiques et de l'activation de populations immunitaires supplémentaires (Abrial C., 2014 ; Radzun H.-J., 2015 ; Ogle M.E., *et al.*, 2016).

- Les macrophages M2 (ou anti-inflammatoires) : sont également connus sous le nom de macrophages "alternativement activés" en raison des signaux d'activation différents par rapport au sous-ensemble M1 (Abrial C., 2014 ; Radzun H.-J., 2015 ; Ogle M.E., *et al.*, 2016 ; Davies L.C., *et al.*, 2016 ; Gordon S., *et al.*, 2017). Ce groupe de macrophages peut être subdivisé en M2a, M2b et M2c en fonction des signaux d'activation, des récepteurs de surface cellulaire et de leur diversité fonctionnelle. Les macrophages M2a aussi appelés macrophages de cicatrisation sont activés par l'IL-4 ou l'IL-13. Ils expriment des niveaux élevés d'arginase-1, permettant de générer des précurseurs du collagène et du facteur de stimulation des fibroblastes, et jouent un rôle dans le dépôt de la matrice extracellulaire et dans la fermeture des plaies (Abrial C., 2014 ; Radzun H.-J., 2015 ; Ogle M.E., *et al.*, 2016). Les macrophages M2b quant à eux sont activés par des complexes immuns associés à des agonistes des Toll-Like Récepteurs (= TLR) ou des récepteurs de l'IL-1 alors que les macrophages M2c sont générés par stimulation avec des glucocorticoïdes, l'IL-10 ou le TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ) (Abrial C., 2014 ; Ogle M.E., *et al.*, 2016). Ces deux derniers sous-types contribuent à supprimer l'inflammation par la sécrétion d'IL-10. Enfin, ces macrophages M2 conservent une grande plasticité et sont censés pouvoir passer par divers états de transition entre M2a-b-c. Une meilleure compréhension de leurs fonctions spécifiques dans les tissus a été difficile en raison de la complexité de l'intégration des signaux *in vivo* et de l'absence d'un ensemble défini de marqueurs distinctifs pour chaque classe de macrophages (Ogle M.E., *et al.*, 2016).

Pour conclure, sur les différents états de polarisation des macrophages, ceux-ci sont polarisés vers un état M1 pour participer à l'activité microbicide et pro-inflammatoire, polarisés vers un état M2a pour participer aux phénomènes de réparation et de cicatrisation des tissus et enfin, sont activés en phénotype M2b et M2c pour une action régulatrice et anti-inflammatoire permettant le retour à l'homéostasie (Abrial C., 2014)

## 2- Polynucléaires neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles sont des cellules phagocytaires très mobiles ayant un rôle primordial dans la défense innée contre les pathogènes envahissants. Ce sont les premières cellules à arriver sur le site de l'infection, attirées par les chimiokines libérées par les macrophages et les autres cellules présentes, où elles jouent un rôle essentiel dans la résolution de cette infection. Chez l'homme, environ 100 milliards de neutrophiles entrent et sortent chaque jour du sang circulant et constituent la population leucocytaire dominante dans la circulation (50-70%). Les patients atteints de déficiences congénitales en neutrophiles souffrent d'infections récurrentes graves qui sont souvent mortelles (Spaan A.N., *al.*, 2013 ; Leliefeld P.H.C., *et al.*, 2016 ; Teng T.-S., *et al.*, 2017 ; Liew P.X., *et al.*, 2019). Les neutrophiles naissent et mûrissent quotidiennement dans la moelle osseuse et sont ensuite libérés dans le système vasculaire périphérique, où ils possèdent une courte durée de vie allant de 10 à 12 heures dans la circulation sanguine à 2-3 jours dans les tissus. La production peut être multipliée par 10, jusqu'à  $10^{12}$  cellules par jour en période d'infection ce qui explique que 55 à 60% de la moelle est spécifiquement dédié à la production de ces neutrophiles (Liew P.X., *et al.*, 2019). Les neutrophiles sont produits à partir d'un myéloblaste qui se différencie progressivement en promyélocytes, en myélocytes et en métamyélocytes pour enfin donner les polynucléaires neutrophiles. Au niveau morphologique, les neutrophiles matures ont une taille de 7-10 $\mu$ m et sont caractérisés par un noyau unique qui présente plusieurs lobes de formes diverses, ayant pu faire croire, à tort, qu'ils étaient multinucléés, d'où leur nom de « polynucléaires » (Figure 19). De plus, ils possèdent différents types de granules dans leur cytoplasme (primaires, secondaires et tertiaires) ainsi que des vésicules sécrétoires (Spaan A.N., *al.*, 2013 ; Teng T.-S., *et al.*, 2017).

### a) Recrutement et activation des neutrophiles

Au cours de l'inflammation, la cascade initiale de recrutement des neutrophiles est mise en mouvement par des altérations à la surface des cellules endothéliales, suite à la libération de médiateurs inflammatoires (telles que les cytokines) par les leucocytes résidant dans les tissus et ayant rencontré des agents pathogènes. Ce recrutement des neutrophiles du système sanguin vers les tissus, suit généralement 3 grandes étapes: (i) l'adhérence aux cellules endothéliales et le roulement, (ii) l'attachement ferme à l'endothélium et enfin (iii) la transmigration à travers la barrière endothéliale (Figure 20) (Amulic B., *et al.*, 2012 ; Teng T.-S., *et al.*, 2017 ; Liew P.X., *et al.*, 2019).

### **i. L'adhérence lâche aux cellules endothéliales et le roulement**

Ces deux étapes ont lieu après l'activation des cellules endothéliales par les pathogènes, provoquant une surexpression des sélectines P et E ainsi que des intégrines ICAMs. Ces cellules endothéliales sont situées dans des veinules post-capillaires où l'espace restreint et le flux important favorisent leur rencontre avec les neutrophiles circulants. À la surface de ces neutrophiles, on retrouve deux protéines constitutivement exprimées pour la reconnaissance des signaux inflammatoires endothéliaux : le ligand glycoprotéique 1 de la sélectine P (PSGL-1) et la sélectine L (Amulic B., *et al.*, 2012 ; Teng T.-S., *et al.*, 2017 ; Liew P.X., *et al.*, 2019). L'interaction qui en découle conduit à la fixation lâche des neutrophiles aux cellules endothéliales et leur permet de commencer à rouler dans le sens du flux sanguin à la surface de l'endothélium (Amulic B., *et al.*, 2012 ; Teng T.-S., *et al.*, 2017 ; Liew P.X., *et al.*, 2019).

### **ii. L'attachement ferme aux cellules endothéliales**

Pendant le roulement, l'interaction avec les sélectines, avec les chimio-attracteurs, avec les cytokines et avec les produits bactériens entraîne l'activation et le regroupement des intégrines de la famille  $\beta 2$  (LFA-1 et Mac-1), constitutivement exprimées à la surface des neutrophiles. Les intégrines  $\beta 2$  engagent alors leurs ligands endothéliaux, ICAM-1 et ICAM-2, entraînant l'arrêt du roulement des neutrophiles et l'attachement ferme de ceux-ci à la surface endothéliale (Amulic B., *et al.*, 2012 ; Teng T.-S., *et al.*, 2017 ; Liew P.X., *et al.*, 2019). Cet attachement entraîne une activation cellulaire et un changement rapide de la morphologie des neutrophiles qui s'aplatissent et réorganisent leur cytosquelette d'actine, entraînant ainsi une polarisation de la cellule (Leick M., *et al.*, 2014). Ici, les neutrophiles commencent à présenter un lamellipode envahissant à l'avant de la cellule et un uropode à l'arrière (Amulic B., *et al.*, 2012 ; Liew P.X., *et al.*, 2019).

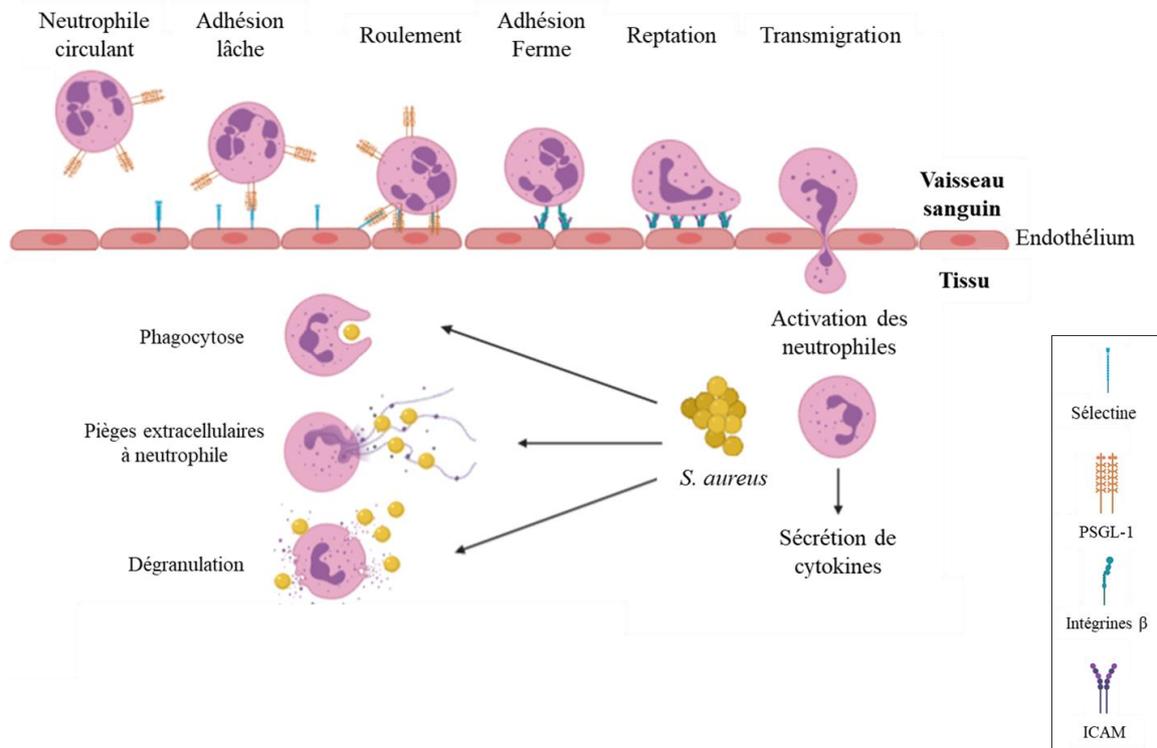
### **iii. Transmigration à travers la barrière endothéliale**

L'adhésion des neutrophiles à l'endothélium est un élément essentiel de la cascade de recrutement qui prépare le neutrophile pour la transmigration dans les tissus. Cependant, la transmigration des neutrophiles ne se produit pas toujours sur le site initial de fixation

endothéliale. Au lieu de cela, les neutrophiles adhérents mettent en place un processus de reptation le long de la face luminale de l'endothélium, sur des distances allant jusqu'à 60  $\mu\text{m}$  ou plus, pour trouver un site privilégié de transmigration. Cette reptation active dépend de l'interaction des intégrines Mac-1 exprimées par les neutrophiles avec les ICAM-1 exprimées sur les cellules endothéliales (Amulic B., *et al.*, 2012 ; Liew P.X., *et al.*, 2019). Les neutrophiles présentent un comportement de sondage durant lequel ils s'allongent et envoient continuellement des pseudopodes aux alentours. Ils rampent généralement de manière perpendiculaire au flux sanguin, leur permettant de trouver les jonctions entre les cellules endothéliales, et de transmigrer plus rapidement et plus efficacement. On parle ici de migration paracellulaire (entre les cellules endothéliales) mais une voie transcellulaire (à travers une cellule endothéliale) existe également. Les neutrophiles migrent préférentiellement par la voie paracellulaire, en mettant environ 2 à 5 minutes pour traverser l'endothélium, puis 5 à 15 minutes pour traverser la membrane basale (Liew P.X., *et al.*, 2019). Cette transmigration met en jeu des interactions complexes entre les intégrines des neutrophiles et leurs partenaires endothéliaux d'une part, ainsi que des protéines de surface des neutrophiles et diverses molécules de jonction endothéliale de l'autre (Amulic B., *et al.*, 2012 ; Liew P.X., *et al.*, 2019). Les cellules endothéliales jouent également un rôle actif dans cette migration puisqu'elles doivent rapidement, désassembler puis réassembler leurs jonctions après la transmigration des neutrophiles, afin d'empêcher une augmentation de la perméabilité. Pour cela, la partie inférieure de l'endothélium forme une ouverture permettant aux neutrophiles de passer à travers sans perte excessive de plasma. Ensuite, les structures initiales d'amarrage des cellules endothéliales, commencent à s'étendre le long des côtés du neutrophile jusqu'à former un dôme complet autour, permettant ainsi de perturber la membrane basolatérale sans créer de brèche dans l'endothélium (Liew P.X., *et al.*, 2019 ).

Une fois la barrière endothéliale franchie, le neutrophile se retrouve dans un milieu inflammatoire très différent, inondé d'une soupe de chimioattracteurs et de stimulants inflammatoires, à la fois dérivés de l'hôte et d'origine pathogène. Ces composés jouent un rôle essentiel dans le guidage des neutrophiles vers la sortie du système vasculaire pour se diriger vers une cible finale, telles qu'un site d'infection localisé ou une blessure stérile. Dans l'espace interstitiel, le neutrophile va suivre des gradients chimiotactiques le rapprochant de sa cible. Une fois arrivé, le neutrophile s'arrête et commence à mettre en œuvre son régime de mise à mort microbienne avec l'exécution des programmes de phagocytose, de dégranulation et de

pièges extracellulaires des neutrophiles (NET) (Amulic B., *et al.*, 2012 ; Liew P.X., *et al.*, 2019).



**Figure 20 : Recrutement des neutrophiles au niveau du site d'infection et mécanismes de mise à mort (adaptée de Amulic B., *et al.*, 2012 ; réalisée sur Biorender.com).** A proximité du site infectieux, les cellules endothéliales stimulées exposent une classe de molécules, les sélectines, qui servent à capturer les neutrophiles circulants et à les attacher temporairement à l'endothélium via leur PSGL-1. Ensuite, un roulement médié par les sélectines est enclenché, majoré par un gradient chimio-attractif, jusqu'à l'adhésion ferme à l'endothélium. Cette adhésion met en jeu les intégrines sur la surface du neutrophile et les ICAMs endothéliales. Le neutrophile va ensuite ramper afin de trouver un passage et enclenché la transmigration à travers l'endothélium pour atteindre le site de l'infection dans le tissu. Il est ensuite dirigé par un gradient chimiotactique vers les staphylocoques envahisseurs afin de les éliminer. Pour cela il va mettre en place plusieurs mécanismes : la phagocytose qui permet l'internalisation et la destruction intracellulaire des staphylocoques, la formation de pièges extracellulaires permettant la capture et la mort des staphylocoques extracellulaires et la libération de molécules antimicrobiennes au niveau extracellulaire par dégranulation.

### b) Granules et dégranulations

Le neutrophile doit transporter en toute sécurité une pléthore de substances dangereuses dans la circulation sanguine, puis les déployer correctement au moment opportun. Pour cela, les neutrophiles ont développé un organe de stockage spécialisé, le granule. Cependant, ces granules sont bien plus que de simples organes de stockage puisqu'ils représentent un des participants actifs et indispensables dans presque toutes les activités des

neutrophiles pendant l'inflammation (Amulic B., *et al.*, 2012). Ces granules sont au nombre de quatre: (i) les granules primaires (ou azurophiles), (ii) les granules secondaires (ou spécifiques), (iii) les granules tertiaires (ou de gélatinase) et (iv) les vésicules sécrétoires (Amulic B., *et al.*, 2012 ; Spaan A.N., *al.*, 2013 ; Liew P.X., *et al.*, 2019 ; Teng T.-S., *et al.*, 2017).

- Les granules primaires : représentent environ 20% du total des granules. Ce sont les premiers à être produits au cours de la maturation du neutrophile et ce sont également les plus gros avec une taille d'environ 0,3µm (Amulic B., *et al.*, 2012 ; Teng T.-S., *et al.*, 2017). Ils sont constitués de protéines antimicrobiennes telles que la myeloperoxydase, les protéines augmentant la perméabilité bactérienne, le lysozyme et les défensines ainsi que des protéases à sérine comme l'élastase, la protéinase 3, la cathepsine G et la protéase à sérine 4 des neutrophiles (Spaan A.N., *al.*, 2013 ; Liew P.X., *et al.*, 2019 ; Teng T.-S., *et al.*, 2017).
- Les granules secondaires : sont les granules majoritaires (60-80%). Ils sont formés après les granules primaires et sont plus petits, avec une taille d'environ 0,1µm (Amulic B., *et al.*, 2012 ; Teng T.-S., *et al.*, 2017). Ces granules sont caractérisés par la présence de la lactoferrine et ils contiennent également d'autres composés antimicrobiens comme le lysozyme, la calprotectine, la lipocaline associée à la gélatinase des neutrophiles, ainsi que des protéines antimicrobiennes cationiques (Liew P.X., *et al.*, 2019 ; Spaan A.N., *al.*, 2013 ; Teng T.-S., *et al.*, 2017 ; Amulic B., *et al.*, 2012).
- Les granules tertiaires : sont encore plus petits et sont formés en dernier pendant la maturation des neutrophiles. Ils contiennent peu d'antimicrobiens et sont composés essentiellement de métalloprotéases, dont la gélatinase et la leucolysine (Amulic B., *et al.*, 2012 ; Spaan A.N., *al.*, 2013 ; Liew P.X., *et al.*, 2019 ; Teng T.-S., *et al.*, 2017).
- Les vésicules sécrétoires : sont aussi communément considérées comme faisant partie de la famille des granules des neutrophiles. Contrairement aux autres granules, ces vésicules ne bourgeonnent pas du Golgi, mais sont plutôt formées par endocytose dans les derniers stades de la maturation des neutrophiles (Amulic B., *et al.*, 2012). C'est pourquoi elles contiennent principalement des protéines dérivées du plasma, telles que l'albumine ainsi que des cytokines préformées (Amulic B., *et al.*, 2012 ; Liew P.X., *et al.*, 2019). De plus,

la membrane de ces vésicules sert de réservoir pour un certain nombre de molécules liées à la membrane importantes et utilisées pendant la migration des neutrophiles (Amulic B., *et al.*, 2012).

Les différentes classes de granules présentent des propensions variables à la mobilisation en réponse à des signaux inflammatoires. Ainsi, les granules primaires sont les plus difficiles à mobiliser, suivis des granules secondaires, des granules tertiaires et enfin des vésicules sécrétoires (Amulic B., *et al.*, 2012). En raison de cette disposition variable à la mobilisation, chaque sous-ensemble de granules a été traditionnellement associé à un stade particulier de l'activation des neutrophiles. Tout d'abord, le contact avec l'endothélium ainsi que la stimulation par les sélectines et les chémo-attracteurs induisent la mobilisation des vésicules sécrétoires dont les membranes sont riches en facteurs clés nécessaires à l'activation continue du neutrophile, dont, entre autres, les intégrines  $\beta 2$  (Amulic B., *et al.*, 2012 ; Liew P.X., *et al.*, 2019). Cette étape permet l'adhésion ferme au niveau de l'endothélium. Ensuite, au cours de la reptation le long de l'endothélium, les neutrophiles sont exposés à d'autres signaux d'activation déclenchant la mobilisation des granules tertiaires et la libération des métalloprotéases. Enfin, au niveau du site inflammatoire, l'activation complète du neutrophile provoque la mobilisation des granules secondaires puis primaires (Amulic B., *et al.*, 2012 ; Liew P.X., *et al.*, 2019). Les granules secondaires vont ainsi fusionner avec la membrane plasmique, en libérant leurs puissants antimicrobiens dans le milieu extracellulaire tandis que les granules primaires vont fusionner avec le phagosome et déverser leurs composés antimicrobiens à l'intérieur. Cette libération contrôlée, par étapes, permet ainsi de neutraliser les agents pathogènes tout en limitant l'exposition des cellules hôtes aux molécules cytotoxiques (Amulic B., *et al.*, 2012 ; Liew P.X., *et al.*, 2019).

### **c) Pièges extracellulaires des neutrophiles**

Les neutrophiles jouent un rôle clé dans la lutte contre les infections bactériennes par le biais de la phagocytose des pathogènes et de la destruction dépendante des enzymes libérées lors de la dégranulation. De plus, les neutrophiles exercent également une activité antibactérienne par le biais de pièges extracellulaires des neutrophiles (NETs), décrits pour la première fois par Brinkmann V. et ses collaborateurs en 2004 (Brinkmann V. *et al.*, 2004 ; Leliefeld P.H.C., *et al.*, 2016 ; de Buhr N., *et al.*, 2016 ; Teng T.-S., *et al.*, 2017 ; Liew P.X., *et al.*, 2019). Lors de la détection de bactéries dans le sang, les neutrophiles peuvent libérer leur ADN dans une configuration semblable à un filet. Les mailles de ce filet sont composées

d'un mélange d'ADN/histones et parsemées de peptides et d'enzymes antimicrobiennes dérivées des granules, créant des pièges appelés "NET" (de Buhr N., *et al.*, 2016 ; Teng T.-S., *et al.*, 2017 ; Liew P.X., *et al.*, 2019). Le phénomène de libération de NETs, appelé NETosis, est décrit comme une forme de mort cellulaire active induite par un agent pathogène, donnant aux neutrophiles la possibilité de lutter contre les microbes après leur mort. La NETose est décrite comme une nouvelle mort cellulaire caractérisée par la rupture de la membrane nucléaire permettant le mélange des composants nucléaires et granulaires, libérés sous forme de fibres (de Buhr N., *et al.*, 2016 ; Leliefeld P.H.C., *et al.*, 2016). L'induction de la NETosis est déclenchée par différents stimuli pro-inflammatoires dont l'IL-8, le TNF $\alpha$  et les lipopolysaccharides. L'activation des neutrophiles déclenche un burst oxydatif qui dégrade l'enveloppe nucléaire et libère l'ADN dans la cellule. Ensuite, les élastases des neutrophiles vont réguler la décondensation initiale de l'ADN en dégradant partiellement les histones (Teng T.-S., *et al.*, 2017 ; Liew P.X., *et al.*, 2019). Cependant, il semble que certains neutrophiles soient capables de former des NETs tout en maintenant l'intégrité de leur membrane, restant ainsi viables et capables de phagocytose. En effet, en 2012, une étude a montré que des neutrophiles avaient libéré des NETs au cours d'une infection par *Staphylococcus aureus*, tout en restant viables et capables de phagocytose et de reptation (Yipp B.G., *et al.*, 2012 ; de Buhr N., *et al.*, 2016). Ainsi, cette NETose vitale a pu être différenciée de la NETose suicidaire. Elle est caractérisée par une libération vésiculaire rapide de l'ADN nucléaire en quelques minutes suite à la stimulation des neutrophiles (de Buhr N., *et al.*, 2016 ; Liew P.X., *et al.*, 2019). De plus, dans la NETosis vitale, l'ADN contenant des vésicules est concentré près de la membrane plasmique et permet leur libération sans perturbation de la membrane plasmique (de Buhr N., *et al.*, 2016 ; Liew P.X., *et al.*, 2019).

La fonction principale des NETs est le piégeage des pathogènes dans le réseau de chromatine collant puis leur élimination. En effet, les NETs facilitent l'exposition des agents pathogènes à des peptides et des enzymes antimicrobiennes hautement concentrés, et favorisent le potentiel d'action synergique de ces agents antimicrobiens. De plus, en piégeant les bactéries, les NETs préviennent leur dissémination au sein de l'hôte (de Buhr N., *et al.*, 2016 ; Teng T.-S., *et al.*, 2017 ; Liew P.X., *et al.*, 2019). Cependant, le revers de la médaille est que la cytotoxicité des NETs peut s'avérer nocive pour l'hôte si leur libération est contrôlée de manière inappropriée. En effet, bien que les histones aient une puissante activité antimicrobienne, elles endommagent et tuent aussi les cellules endothéliales et les cellules

épithéliales. Le large spectre de l'élastase des neutrophiles est un autre cas de nocivité potentielle puisque, lorsqu'elle est liée à l'ADN, son activité n'est pas inhibée et peut causer des lésions importantes à l'hôte (Liew P.X., *et al.*, 2019). De plus, la formation excessive de NETs est liée à diverses pathologies à médiation neutrophile (notamment la vascularite systémique, la septicémie, le lupus érythémateux et le lupus néphrétique auto-immuns) et contribue notamment au déclenchement de maladies auto-immunes. C'est pourquoi un équilibre délicat entre la formation et la dégradation des NETs est nécessaire pour obtenir des effets protecteurs pendant l'infection et l'inflammation (Leliefeld P.H.C., *et al.*, 2016 ; de Buhr N., *et al.*, 2016 ; Teng T.-S., *et al.*, 2017 ; Liew P.X., *et al.*, 2019).

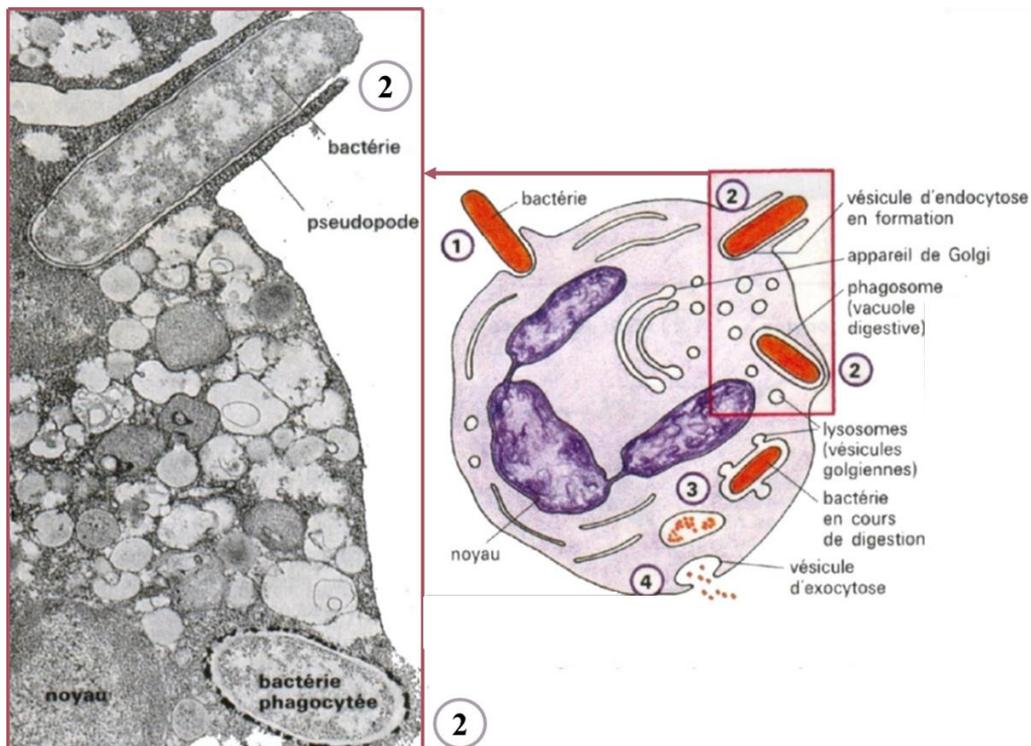
### 3- Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC) sont les dernières à être entrées dans le club exclusif des phagocytes professionnels (Steinman R.M., *et al.*, 1973 ; Steinman R.M., *et al.*, 1974 ; Savina A., *et al.*, 2007). Contrairement aux autres phagocytes, les DC ne sont pas directement impliquées dans la suppression immédiate des pathogènes. De ce point de vue, elles ne peuvent pas être considérées comme des effecteurs "classiques" de l'immunité innée (Savina A., *et al.*, 2007). En effet, les DC comptent parmi les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) les plus efficaces du système immunitaire et ont ainsi développé une voie phagocytaire dédiée et régulée qui sert principalement au traitement et à la présentation des antigènes sur les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Alloatti A., *et al.*, 2016). Elles expriment un large éventail de récepteurs phagocytaires et présentent une forte activité phagocytaire en tant que cellules immatures puis elles changent leur fonction pour la production de cytokines au fur et à mesure de leur maturation (Savina A., *et al.*, 2007 ; Geissmann F., *et al.*, 2010). Les DC sont de puissantes cellules présentatrices d'antigènes et ce sont les seules capables d'activer les lymphocytes T. Cette activation aboutit au déclenchement de réponses immunitaires adaptatives et à la production de cellules immunitaires mémoires. Après l'absorption d'agents pathogènes, de cellules infectées ou de cellules apoptotiques, les DC transforment les antigènes dérivés de ces particules en peptides et les chargent sur les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I ou de classe II (Savina A., *et al.*, 2007 ; Alloatti A., *et al.*, 2016). Bien que les autres phagocytes soient également capables de présenter des antigènes sur les molécules du CMH, ils le font de manière inefficace et ne sont pas capables d'initier des réponses immunitaires adaptatives. Les DC quant à elles absorbent les pathogènes dans les tissus périphériques,

subissent des programmes de maturation en réponse aux différents pathogènes rencontrés et migrent au niveau des organes lymphoïdes. Dans ces organes ils vont pouvoir présenter les antigènes aux lymphocytes T afin de déclencher les réponses immunitaires spécifiques à chaque antigène. Ainsi, les DC sont les seules cellules de l'immunité innée spécialisées dans la liaison entre les réponses innées et adaptatives, plutôt que dans l'élimination directe des agents pathogènes (Savina A., *et al.*, 2007).

## B/ Mécanisme moléculaire de la phagocytose

La phagocytose est un élément essentiel des réponses immunitaires innées et adaptatives aux agents pathogènes comme on a pu le dire précédemment. Le rôle principal de ce mécanisme est de protéger le corps dans son ensemble en éliminant toutes les molécules potentiellement nocives pour l'organisme. La phagocytose nécessite une suite d'étapes spécifiques amenant à l'élimination des particules indésirables qui vont être décrites ci-dessous (Figure 21).



**Figure 21 : Différentes étapes de la phagocytose aboutissant à la destruction des bactéries (adaptée de Raynaud S., 2016).** (1) Reconnaissance et fixation des bactéries, (2) internalisation des bactéries dans une vacuole (phagosome), (3) maturation du phagosome en phagolysosome et destruction du pathogène et (4) rejet des débris bactériens au niveau extracellulaire et présentation des antigènes via le complexe majeur d'histocompatibilité.

## 1- Reconnaissance des particules à phagocyter

La première étape de la phagocytose est la détection des particules indésirables par les phagocytes, réalisée par des récepteurs spécialisés sur la membrane cellulaire (Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Rosales C., *et al.*, 2017 ; Lim J.J., *et al.*, 2017). Étant donné que de nombreuses particules différentes peuvent être prises en charge par les phagocytes, il n'est pas surprenant de trouver de nombreux types de récepteurs coopérant ensemble dans ce processus. Ainsi on va retrouver deux grands types de récepteurs : (a) les récepteurs impliqués dans l'incorporation des corps apoptotiques (endogènes) et (b) ceux impliqués dans la phagocytose des corps étrangers (Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Gray M., *et al.*, 2016 ; Rosales C., *et al.*, 2017).

### a) Les récepteurs de corps apoptotiques

Au sein d'un individu en bonne santé, plus de 10 milliards de cellules meurent par apoptose chaque jour donnant naissance à des corps apoptotiques devant être éliminés. La reconnaissance de ces corps apoptotiques met en jeu une combinaison complexe de signaux. Tout d'abord, les cellules en cours d'apoptose libèrent diverses molécules n'existant normalement pas dans le milieu extracellulaire. Ces molécules solubles, telles que l'ATP ou la lysophosphatidylcholine, fonctionnent comme des chimio-attracteurs recrutant des phagocytes à proximité de ces cellules mourantes (Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Rosales C., *et al.*, 2017). De plus, les cellules apoptotiques présentent à leur surface des molécules normalement absentes des cellules saines, agissant comme un signal « mangez-moi ». Ces molécules sont appelées motifs moléculaires associés aux cellules apoptotiques (ACAMP). La plus étudiée est la phosphatidylsérine (PS), un phospholipide présent dans le feuillet interne de la membrane cellulaire des cellules viables. Au début de l'apoptose, les mécanismes qui maintiennent la PS sur le feuillet interne sont inhibés, ce qui lui permet de basculer vers le feuillet externe. La phosphatidylsérine peut alors être reconnue par une variété de récepteurs à la surface du phagocyte tels que BAI-1, TIM-1 et 4 ou encore MerTK, chacun d'eux signalant l'initiation de la phagocytose (Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Gray M., *et al.*, 2016 ; Rosales C., *et al.*, 2017). Dans d'autres cas, des molécules extracellulaires solubles se lient aux PS et aux récepteurs de surface, servant d'éléments de liaison. L'une de ces molécules, MFG-E8, relie la PS aux intégrines  $\alpha V\beta 3$ , qui sont des récepteurs phagocytaires efficaces. De même, des molécules telles que Gas6 et la protéine S peuvent établir un pont entre la PS et les récepteurs phagocytaires de la famille TAM (Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Rosales C., *et al.*, 2017). Cependant la PS n'est pas totalement absente de la surface des cellules saines qui peuvent en

exprimer une certaine quantité. Or l'apoptose augmente jusqu'à 300 fois la quantité de PS exposée à la surface des cellules apoptotiques créant ainsi un seuil qui empêche la phagocytose des cellules normales (Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Rosales C., *et al.*, 2017).

### **b) Les récepteurs de particules étrangères**

La détection et l'élimination des corps étrangers, tels que les microbes infectieux, ont été les premières fonctions reconnues de la phagocytose. Ces processus impliquent une variété de récepteurs qui détectent les molécules de surfaces microbiennes soit directement, soit par l'intermédiaire d'opsonines (Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Gray M., *et al.*, 2016 ; Rosales C., *et al.*, 2017).

#### ➤ Les récepteurs de reconnaissance de formes (=PRRs) :

Les particules étrangères telles que les bactéries, les champignons et les parasites possèdent, tout comme les cellules apoptotiques, un ensemble de molécules uniques qui permettent aux phagocytes de les reconnaître comme étant étrangers à l'organisme. Ces molécules sont appelées motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) et comprennent des composants de la paroi, de la membrane et de la flagelline bactérienne, de l'ARN double brin viral (ARNdb) mais également des composants de la paroi des levures. Les PAMPs sont reconnus par des PRRs adaptés à chaque type de ligand, permettant ainsi la reconnaissance de l'agent pathogène (Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Gray M., *et al.*, 2016 ; Rosales C., *et al.*, 2017). Les polysaccharides présents à la surface de certaines cellules de levure se fixent au récepteur du mannose ou à la Dectine-1 par exemple. Le lipopolysaccharide des bactéries à Gram négatif est quant à lui détecté par le récepteur scavenger A et par les « Toll-like récepteurs » (TLR), qui sont également capables de reconnaître un large éventail de PAMPs (Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Gray M., *et al.*, 2016 ; Rosales C., *et al.*, 2017). Certains de ces récepteurs, comme la Dectine 1, sont suffisant pour déclencher la phagocytose. En effet, lorsqu'elle est exprimée dans des cellules hétérologues incapables de réaliser une phagocytose, elle leur donne des capacités phagocytaires. Dans d'autres cas, la contribution des récepteurs des PAMPs à la phagocytose est controversée et peut se produire indirectement, en permettant la fixation des proies à la surface des cellules ou en amorçant une réponse phagocytaire médiée par d'autres récepteurs (Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Gray M., *et al.*, 2016 ; Rosales C., *et al.*, 2017).

➤ Les récepteurs opsoniques :

Les particules étrangères peuvent également être reconnues par les phagocytes grâce à des molécules solubles circulant dans le sang et dans les fluides interstitiels. Une fois à la surface de la particule cible, ces molécules, appelées opsonines, sont à leur tour reconnues par des récepteurs spécifiques sur la membrane des phagocytes. De cette manière, les opsonines fonctionnent comme un pont entre le phagocyte et la particule à ingérer et permettent à un plus petit nombre de récepteurs de reconnaître un large spectre d'agents pathogènes (Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Gray M., *et al.*, 2016 ; Rosales C., *et al.*, 2017). Les Immunoglobulines G (IgG) et les composants du complément sont des opsonines importantes qui induisent une phagocytose efficace, et leurs récepteurs ont été largement étudiés. Les récepteurs Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ R) sont une famille de glycoprotéines exprimées sur la membrane des leucocytes, capables de fixer la fraction constante (Fc) des molécules d'IgG. Les récepteurs du complément (CR) comme leurs noms l'indiquent, reconnaissent les composants du complément, déposés à la surface des cibles phagocytaires. Ces récepteurs, se lient au fragment iC3b du complément, déposé sur les agents pathogènes pour favoriser leur phagocytose, après l'activation du complément (Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Gray M., *et al.*, 2016 ; Rosales C., *et al.*, 2017).

Cependant, pour une reconnaissance efficace des particules cibles, de multiples ligands doivent être engagés par plusieurs récepteurs à la surface du phagocyte. L'efficacité de l'interaction entre ces récepteurs et leurs ligands est dictée par leur affinité mutuelle ainsi que par leur densité à la surface du phagocyte. Cependant, bien que cette affinité pour le ligand soit essentielle, d'autres propriétés des récepteurs, telles que leur dynamique à la surface du phagocyte, influencent également cette interaction. En effet, les récepteurs phagocytaires sont activés lorsqu'ils s'agrègent entre eux, ainsi, seuls les récepteurs capables d'une diffusion latérale rapide sont susceptibles d'être activés. De plus, cette agrégation des récepteurs est favorisée par l'état actif des phagocytes, qui forment constamment des projections membranaires pour sonder leur environnement à la recherche de particules. Ainsi, la reconnaissance des particules par liaison aux récepteurs, longtemps considérée comme purement passive, s'avère être un processus très actif (Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Rosales C., *et al.*, 2017).

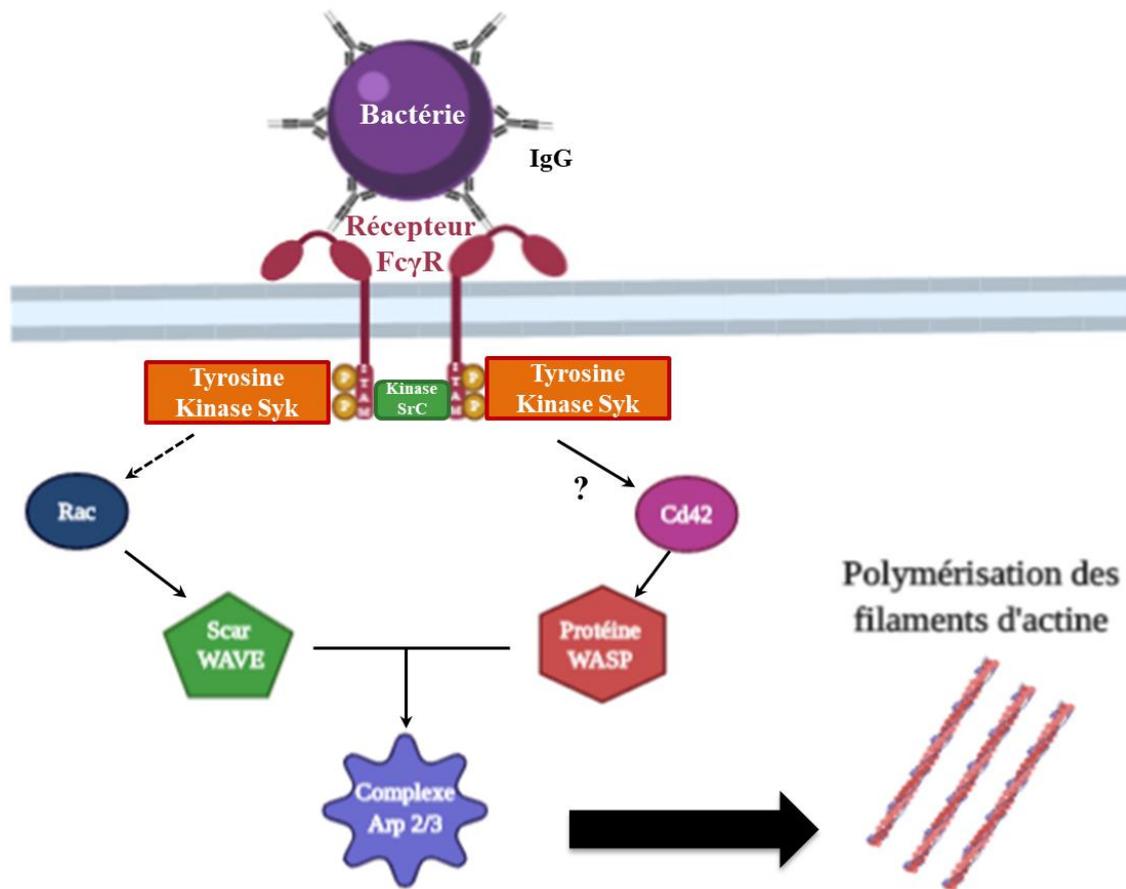
## 2- Internalisation des particules

Après la reconnaissance de la particule cible, les récepteurs phagocytaires vont initier des cascades de signalisation pour activer la phagocytose. Ces cascades vont permettre le remodellement des lipides membranaires et la régulation du cytosquelette d'actine conduisant à la formation de pseudopodes autour de la particule. Au point de contact, une dépression de la membrane, appelée coupe phagocytaire, est formée. Puis, la membrane entoure la particule cible et, en quelques minutes, elle se referme à l'extrémité distale, laissant place à un phagosome. Ces cascades de signalisation sont connues dans les moindres détails pour les récepteurs Fc $\gamma$  et les récepteurs du complément, puisque ces sont les récepteurs phagocytaires les mieux étudiés (Rosales C., *et al.*, 2017).

### a) Signalisation des récepteurs Fc $\gamma$

Les récepteurs Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ Rs), comme précisé précédemment, sont activés lorsqu'ils s'agrègent, suite à la liaison à leurs ligands IgG recouvrant la particule à ingérer. Ainsi, la liaison récepteur-ligand et le regroupement latéral des Fc $\gamma$ Rs permet de rapprocher les domaines cytoplasmiques de plusieurs récepteurs à proximité les uns des autres (Figure 22). Ces domaines englobent une région connue sous le nom de motif d'activation à base de tyrosine des immuno-récepteurs (ITAM). Ce domaine est caractérisé par un motif tandem YxxI/L pouvant être phosphorylé par les tyrosine kinases de la famille Src, en particulier Lyn, Lck et Hck (Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Gray M., *et al.*, 2016 ; Rosales C., *et al.*, 2017). Suite à l'activation du récepteur, les tyrosine kinases de la famille Src sont activées par déphosphorylation, leur permettant ensuite d'adopter une conformation active et de phosphoryler les régions ITAM. De plus, il est important de noter que les deux tyrosines du domaine ITAM doivent être phosphorylées pour la signalisation et la phagocytose dépendante des Fc $\gamma$ Rs. Cette phosphorylation des régions ITAM crée ainsi un site d'ancrage pour les domaines SH2 de la tyrosine kinase Syk (Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Gray M., *et al.*, 2016 ; Rosales C., *et al.*, 2017). La tyrosine kinase Syk est nécessaire à la phagocytose puisqu'elle est responsable de l'activation de plusieurs protéines de signalisation, recrutées dans le complexe de signalisation Fc $\gamma$ R. Syk va notamment activer des membres de la famille des petites GTPases Rho, en particulier Rac1/2 (Rac) et Cdc42. Leurs activations entraînent un assemblage et un renouvellement concertés des structures d'actine filamenteuse conduisant à la formation de pseudopodes permettant d'internaliser la particule. Pour cela, Rac et Cdc42 stimulent respectivement le facteur Scar/WAVE et les membres de la famille des protéines du

syndrome de Wiskott-Aldrich (WASP). Ces protéines stimulent ensuite le complexe protéique 2/3 liée à l'actine (Arp2/3) favorisant finalement la polymérisation des filaments d'actine (Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Gray M., *et al.*, 2016 ; Rosales C., *et al.*, 2017).

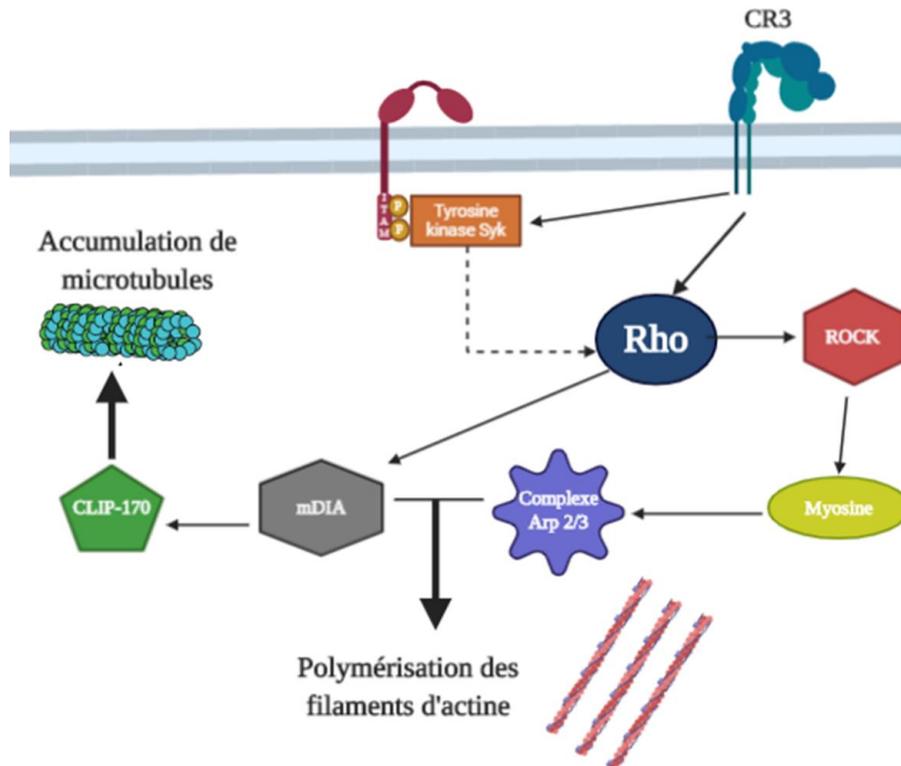


**Figure 22 : Transduction du signal lors de la phagocytose médiée par les récepteurs Fc $\gamma$ R (adaptée de Rosales C., *et al.*, 2017 ; réalisée sur Biorender.com).** Les bactéries opsonisées par les IgG active la transduction du signal liée aux récepteurs Fc $\gamma$ R. Cela induit l'activation des kinases de la famille Src, qui phosphoryle ensuite les domaines ITAM des Fc $\gamma$ R au niveau de résidus tyrosines. Cette phosphorylation de deux tyrosines crée un site d'ancrage pour les tyrosine kinases Syk. Syk va alors activer de manière indirecte la petite GTPase Rac et par un mécanisme inconnu la petite GTPase Cds42. Ensuite ces deux GTPases vont activer respectivement, le facteur Scar/WAVE et les protéines WASP. Ces protéines vont ensuite induire la polymérisation des filaments d'actine via le complexe Arp 2/3. P représente un groupement phosphate, la flèche en pointillé représente une activation indirecte.

### b) Signalisation des récepteurs du complément

Le CR3, également connu sous le nom d'intégrine  $\alpha$ M $\beta$ 2 ou Mac-1, est le récepteur phagocytaire le mieux étudié après le Fc $\gamma$ R et présente des cascades de signalisation nettement différentes. Depuis longtemps, il est reconnu que l'engagement de CR3 sur les macrophages déclenche une forme distincte de phagocytose, caractérisée par un "enfouissement" de la particule dans la cellule, sans formation des pseudopodes caractéristiques

de la phagocytose dépendante des Fc $\gamma$ R. Cependant, cette idée a été remise en question par des observations microscopiques montrant des protubérances membranaires encerclant les cibles pendant la phagocytose médiée par CR3 (Bohdanowicz M., *et al.*, 2010 ; Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Rosales C., *et al.*, 2017). Au cours de cette phagocytose, l'accumulation d'actine F et l'absorption des particules sont dépendantes de RhoA. RhoA permet ensuite l'activation de la polymérisation de l'actine par deux mécanismes distincts (Figure 23).



**Figure 23 : Transduction du signal lors de la phagocytose médiée par les récepteurs du complément CR3 (adaptée de Rosales C., *et al.*, 2017 ; réalisée sur Biorender.com).** Le récepteur du complément (CR3) se lie au fragment du complément iC3b et déclenche une cascade de signalisation activant Rho, soit indépendamment des tyrosine kinases (dans les macrophages), soit par l'intermédiaire de Syk, qui est recruté par un domaine ITAM (comme vu précédemment avec le récepteur Fc $\gamma$ R). Syk activera ensuite Rho de manière indirecte. Rho, à son tour, conduit à la polymérisation de l'actine par deux mécanismes : (i) il active la Rho kinase ROCK, qui phosphorylera et activera la myosine II, induisant l'accumulation d'Arp2/3 et l'assemblage d'actine au niveau de la coupe phagocytaire et (ii) il induit l'accumulation de mDia1, favorisant la polymérisation de l'actine. De plus, le mDia1 se lie directement à la protéine associée aux microtubules CLIP-170 fournissant un lien avec le cytosquelette du microtubule. P représente un groupe phosphate, la flèche en pointillé représente une activation indirecte.

Tout d'abord, il active la Rho kinase ROCK, permettant la stimulation de la myosine II par phosphorylation de sa chaîne légère. Il est intéressant de noter que l'inhibition de ROCK ou de la chaîne légère de la myosine annule le recrutement de l'Arp2/3 et l'assemblage de la coupe phagocytaire. Dans un second temps, RhoA peut induire une accumulation de mDia1 (formine 1 diaphane apparentée aux mammifères) et d'actines polymérisées dans la coupe

phagocytaire. De plus, mDia1 se lie directement à la protéine CLIP-170 associée aux microtubules et induit son accumulation dans la coupe phagocytaire (Lewkowicz E., *et al.*, 2008), permettant ainsi d'établir un lien avec le cytosquelette des microtubules. Par conséquent, les microtubules et les filaments d'actine semblent fonctionner en coopération dans la phagocytose à médiation CR3 (Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Rosales C., *et al.*, 2017). Cependant, les mécanismes conduisant à l'activation de RhoA ne sont pas encore entièrement compris. Il est connu que deux régions du domaine cytoplasmique de la sous-unité  $\beta 2$  du récepteur CR3 sont importantes pour l'activation Rho, mais on ne sait pas clairement comment l'intégrine est activée (Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Rosales C., *et al.*, 2017).

### c) **Signalisation des récepteurs de reconnaissance de formes**

La phagocytose initiée par les PRRs conduit aux mêmes changements dans le cytosquelette d'actine que ceux initiés par la phagocytose de Fc $\gamma$ R, bien que les voies qui les provoquent puissent différer. La voie phagocytaire liée aux PRRs la plus étudiée est celle de la Dectine-1, une lectine de type C reconnaissant les  $\beta$ -glucanes présents dans la paroi des cellules fongiques (Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Gray M., *et al.*, 2016). La Dectine-1, contient un motif ITAM-like dans son domaine cytoplasmique, proche de celui des Fc $\gamma$ Rs, bien qu'elle diffère car elle nécessite seulement la phosphorylation d'une des deux tyrosines par les tyrosine kinases de la famille Src. Cette phosphorylation entraîne donc la nécessité d'un regroupement des récepteurs pour permettre l'activation de Syk par liaison à deux tyrosines phosphorylées. Après l'activation de Syk par la Dectine-1, un grand nombre de signaux utilisés par Fc $\gamma$ Rs pour induire la phagocytose sont produits, tels que l'activation de Rac et Cdc42, aboutissant finalement au remodelage de l'actine (Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Gray M., *et al.*, 2016). Cependant, d'autres PRRs induisent un réarrangement du cytosquelette d'actine par des moyens indépendants des ITAM et de Syk.

### d) **Formation du phagosome**

L'ensemble de ces récepteurs et voies de signalisation, bien que différents, aboutissent dans tous les cas à la formation d'une vacuole membranaire appelée phagosome. La dernière étape de cette formation est caractérisée par l'élimination de l'actine F à la base de la coupe phagocytaire, juste avant que les protubérances de la membrane ne fusionnent à l'autre extrémité afin de sceller le phagosome naissant (Rosales C., *et al.*, 2017). Cependant, le mécanisme par lequel l'actine est éliminée du phagosome en formation a été mal défini et des recherches beaucoup plus approfondies sont nécessaires dans ce domaine. Le mécanisme

d'élimination de l'actine F doit inclure l'arrêt de la polymérisation de l'actine ainsi que le détachement et la dépolymérisation des filaments existants. Ces deux étapes semblent être contrôlées par les phosphoinositides, en particulier le PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, produit par la PI-3 kinase. En effet, ce PI(3,4,5)P<sub>3</sub> peut ensuite réguler les myosines, qui elles, exercent une activité contractile facilitant la fermeture des phagosomes (Rosales C., *et al.*, 2017 ; Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Gray M., *et al.*, 2016). De plus, les myosines IC, II et IXb ont été détectées lors de la formation du phagosome, suggérant qu'elles jouent un rôle dans l'internalisation. Il a également été démontré de façon convaincante que la myosine X quant à elle, participait à la formation du phagosome puisqu'elle a été détectée autour des phagosomes naissants et semble être requise pour l'achèvement de l'ingestion (Flannagan R.S., *et al.*, 2012). Récemment, le processus de formation et de fermeture des phagosomes a été réexaminé et a révélé un rôle important de la dynamine-2 (Marie-Anaïs F., *et al.*, 2016 ; Rosales C., *et al.*, 2017). La dynamine-2, qui intervient dans la scission des vésicules endocytaires, a été recrutée en même temps que l'actine pendant la formation du phagosome, puis, la dépolymérisation de l'actine a entraîné une altération du recrutement ou de l'activité de la dynamine-2. De plus, la dynamine-2 s'est également accumulée sur le site de fermeture du phagosome, semblant indiquer qu'il existe un dialogue entre l'actine et la dynamine pour la formation et la fermeture du phagosome avant que l'action de scission de cette dernière ne se mette en place (Marie-Anaïs F., *et al.*, 2016 ; Rosales C., *et al.*, 2017).

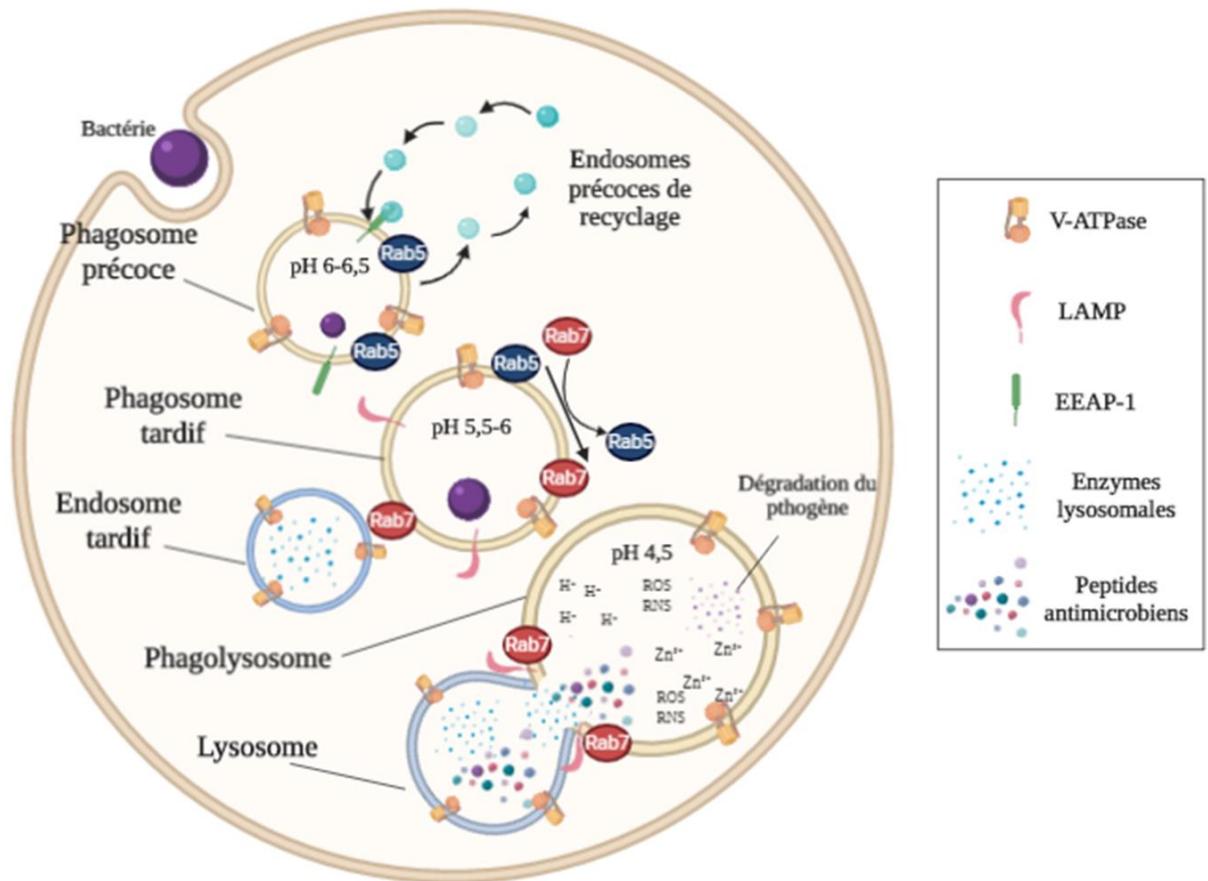
### 3- Formation du phagolysosome

Immédiatement après la scission de la membrane de surface, le phagosome nouvellement formé est non microbicide, car sa membrane limitante ressemble à la membrane plasmique dont il est issu. De plus, la lumière de la vacuole naissante est le reflet de la phase liquide extracellulaire. On comprend donc pourquoi la phagocytose en tant que telle est insuffisante pour assurer la destruction des microbes. Cependant, la scission est suivie d'une succession rapide de modifications biochimiques convertissant le phagosome naissant en un puissant organite microbicide, essentiel à l'immunité innée et adaptative (Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Flannagan R.S., *et al.*, 2015). Ce processus de remodelage, appelé maturation du phagosome, se déroule selon une série ordonnée d'événements de fusion et de fission membranaires, strictement chorégraphiés, modifiant radicalement la composition du phagosome, tout en maintenant sa taille presque constante (Figure 24). À bien des égards, la séquence d'événements aboutissant à la formation de phagolysosomes matures à une

progression parallèle à celle de la maturation endosomale. Ces événements peuvent ainsi être divisés en (a) phagosomes précoces (environ 10 minutes après l'absorption), (b) phagosomes tardifs (10 à 30 minutes après l'absorption) et en (c) phagolysosomes (plus de 30 minutes après l'absorption) (Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Weiss G., *et al.*, 2015 ; Gray M., *et al.*, 2016 ; Rosales C., *et al.*, 2017).

#### a) Phagosome précoce

La maturation du phagosome est initiée par la conversion du phagosome nouvellement formé en un phagosome précoce, partageant les mêmes caractéristiques que les premiers endosomes. Le phagosome précoce, dépourvu de l'ATPase vésiculaire de pompage des protons (V-ATPase), se caractérise donc par un pH légèrement acide de 6 à 6,5. Le nouveau phagosome acquiert ensuite rapidement les propriétés des premiers endosomes, en fusionnant avec les endosomes de tri et de recyclage. Ces événements de fusion membranaire entre le phagosome et les premiers endosomes sont régulés par la petite GTPase Rab5. Cette GTPase membranaire est nécessaire pour la transition entre un phagosome précoce et un phagosome tardif par le recrutement d'une variété d'autres effecteurs faisant avancer le processus de maturation des phagosomes (Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Weiss G., *et al.*, 2015 ; Gray M., *et al.*, 2016 ; Rosales C., *et al.*, 2017). Les premiers phagosomes deviennent ainsi biochimiquement distincts de leurs prédécesseurs, les phagosomes naissants, par le biais de ces événements de fusion. Mais malgré des cycles répétés de fusion vésiculaire, la surface du phagosome en cours de maturation reste sensiblement constante, impliquant qu'une partie de la membrane phagosomale doit être enlevée en même temps. Cela est dû à la récupération des vésicules vers les endosomes et de l'effet du réseau trans-Golgi (Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Rosales C., *et al.*, 2017). La récupération des protéines des premiers phagosomes est améliorée par la protéine de couplage Rab, qui peut se lier directement à Rab4 et Rab1. De plus, l'importance de ce processus ne doit pas être sous-estimée, puisque l'altération du recyclage inhibe profondément la capacité des phagocytes à ingérer des cibles phagocytaires opsonisées par des IgG ou à traiter les cellules apoptotiques ingérées. Enfin, une acidification de la lumière du phagosome est ensuite observée, résultant de l'accumulation progressive de V-ATPases actives sur la membrane phagosomale (Flannagan R.S., *et al.*, 2012).



**Figure 24 : Maturation des phagosomes et biogénèse des phagolysosomes (réalisée sur Biorender.com).** Le phagosome est remodelé pendant sa maturation, gagnant et perdant des protéines et des marqueurs lipidiques par fusion avec les endosomes et les lysosomes. Le phagosome précoce est caractérisé par l'acquisition de la petite GTPase Rab5, nécessaire aux recrutements de nombreux facteurs et à la transition vers le phagosome tardif. Elle permet notamment le recrutement de EEAP1, favorisant la fusion avec les endosomes précoces. Le phagosome précoce est légèrement acidifié par l'acquisition de la pompe à protons V-ATPase. La conversion du phagosome précoce en phagosome tardif est caractérisée par la transition de Rab5 à Rab7 à la surface du phagosome. Le phagosome tardif est encore acidifié par l'acquisition de copies supplémentaires de V-ATPases provenant de la fusion avec les endosomes tardifs. Cette fusion procure également les premières enzymes lysosomales synthétisées. La fin de la maturation du phagosome tardif est caractérisée par l'acquisition des protéines LAMP. Enfin, la fusion avec les lysosomes permet de construire le phagolysosome, un organelle hautement acide, protéolytique et antimicrobien permettant la dégradation des pathogènes internalisés.

### b) Phagosome tardif

Une fois que le phagosome précoce a éliminé les protéines excédentaires, qui seront recyclées ou dégradées, il continue sa maturation en un phagosome tardif. Par rapport aux phagosomes précoces, les phagosomes tardifs sont plus acides (pH 5,5-6,0), ce qui est une conséquence de l'acquisition de pompes à protons V-ATPases supplémentaires. L'acidification est nécessaire à la fonction de la plupart des hydrolases lysosomales ayant un pH optimal

faible. Certaines d'entre elles, comme la cathepsine D, dépendent d'un traitement supplémentaire par d'autres protéases et/ou par autocatalyse pour générer les formes enzymatiques actives. Le phagosome tardif se définit également par l'acquisition de marqueurs biochimiques distincts, dont la petite GTPase Rab7, avec la perte concomitante des marqueurs précoces tels que Rab5 (Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Weiss G., *et al.*, 2015 ; Gray M., *et al.*, 2016 ; Rosales C., *et al.*, 2017). La protéine Mon1a/b est un nouvel effecteur Rab5, interagissant uniquement avec la forme active de Rab5 afin de faciliter l'acquisition et l'activation de Rab7. Rab7 et ses effecteurs sont ensuite essentiels pour l'achèvement de la maturation des phagosomes. De plus, l'étape phagosomale tardive est caractérisée par l'acquisition des protéines membranaires associées aux lysosomes (LAMP1 et 2) à partir des endosomes ainsi que des enzymes lysosomales nouvellement synthétisées. Les enzymes délivrées aux endosomes tardifs comprennent les cystéine protéases, les sérine protéases et les aspartate protéases (telles que les cathepsines B, L, et D), les peptidases, les glycosidases (telles que la N-acétylglycosaminidase, la  $\beta$ -glucuronidase et la  $\beta$ -galactosidase) ainsi que les (phospho-) lipases (Weiss G., *et al.*, 2015 ; Rosales C., *et al.*, 2017).

### **c) Le phagolysosome et son arsenal d'effecteurs microbicides**

La dernière étape du processus de maturation implique la fusion des phagosomes tardifs avec les lysosomes, pour devenir des phagolysosomes. Le phagolysosome représente l'organite microbicide ultime, grâce aux nombreux mécanismes sophistiqués dont il est doté et destinés à éliminer et à dégrader les micro-organismes. Ces mécanismes comprennent entre autre (i) l'acidification de la lumière, (ii) la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) et (iii) les protéines et peptides antimicrobiens (Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Weiss G., *et al.*, 2015 ; Gray M., *et al.*, 2016 ; Rosales C., *et al.*, 2017).

#### **i. L'acidification de la lumière du phagolysosome**

L'acidification de la lumière du phagolysosome se fait grâce aux V-ATPases et aux transporteurs d'ions, entraînant une diminution de pH aux alentours de 4,5 dans les macrophages (Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Weiss G., *et al.*, 2015 ; Gray M., *et al.*, 2016 ; Rosales C., *et al.*, 2017). Cependant, les phagolysosomes des cellules dendritiques, dont la fonction première est la présentation des antigènes, sont considérablement plus alcalins (pH  $\approx$  6,0) (Flannagan R.S., *et al.*, 2012). Le pompage des protons et l'acidification qui en résulte servent de multiples objectifs dans le contexte de la physiologie des phagolysosomes. L'acidité limite directement la croissance microbienne et renforce indirectement la capacité de

dégradation du phagolysosome en activant plus d'une soixantaine d'enzymes hydrolytiques telles que les protéases, les peptidases, les phosphatases, les nucléases, les glycosidases, les sulfatases et les lipases. Chacune d'entre-elles dégrade un sous-ensemble de macromolécules aboutissant à la digestion de la particule internalisée (Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Weiss G., *et al.*, 2015 ; Gray M., *et al.*, 2016 ; Rosales C., *et al.*, 2017). De plus, le gradient de proton à travers la membrane limite également la croissance microbienne en stimulant la protéine 1 macrophagique associée à la résistance naturelle (NRAMP1), un transporteur de métaux divalents. Ce transporteur utilise le gradient de protons comme source d'énergie pour éjecter les métaux, privant ainsi les bactéries de cofacteurs essentiels pour leur survie et leur prolifération. Les protons intraluminaux participent également à la production d'espèces réactives de l'oxygène, une autre composante importante de l'arsenal antimicrobien des phagocytes (Flannagan R.S., *et al.*, 2012).

## **ii. La production de ROS et de RNS**

- L'importance de la production de ROS : dans l'immunité innée a été fermement établie une fois que la base moléculaire de la maladie granulomateuse chronique a été révélée. En effet, les patients souffrant de cette maladie, sont particulièrement sensibles aux infections bactériennes et fongiques. Ces infections s'avèrent potentiellement mortelles en raison d'une capacité réduite à assembler une isoforme fonctionnelle de la NADPH oxydase, la NOX2, responsable de la production de ROS (Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Flannagan R.S., *et al.*, 2015). En effet, la NOX catalyse la formation d'anions superoxydes ( $O_2^-$ ) hautement instables qui déclenche diverses réactions chimiques générant des ROS nocifs. Alors que l' $O_2^-$  contribue directement à la destruction des bactéries, dans les conditions acides du phagosome il peut se transformer rapidement en  $H_2O_2$  ou réagir avec l'oxyde nitrique (NO) pour former du peroxyde nitrique ( $ONOO^-$ ), deux agents puissants qui endommagent les cellules (Lam G.Y., *et al.*, 2010). De plus, la libération de métaux de transition tels que le fer à partir des protéines du phagosome peut entraîner la chimie de Fenton et la production de radicaux hydroxyles toxiques ( $OH^-$ ). Il est également intéressant de noter que la production d' $O_2^-$  peut être détectée dans la coupe phagocytaire, avant même que la fusion des pseudopodes n'ait eu lieu, indiquant que l'assemblage de ce complexe se produit très rapidement. Ce burst oxydatif a pour but de s'assurer que toute proie microbienne soit morte avant de tenter de la traiter au sein du phagolysosome (Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Flannagan R.S., *et al.*, 2015).

- Les espèces réactives de l'azote (RNS) : contribuent également à l'éradication des agents pathogènes en endommageant de manière non sélective les protéines cellulaires, les lipides et les acides nucléiques, et constituent un élément important de l'arsenal antimicrobien des phagocytes (Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Flannagan R.S., *et al.*, 2015). La formation d'oxyde nitreux ( $\text{NO}^-$ ) dans les phagocytes est catalysée par l'oxyde nitreux synthase 2, également appelé NOS inductible (iNOS). Contrairement aux ROS, la production de RNS est retardée parce que les cellules n'expriment pas la iNOS en condition basale. En effet, l'induction de l'expression de la iNOS nécessite la détection par le phagocyte de cytokines pro-inflammatoires comme le  $\text{TNF}\alpha$  et/ou de molécules conservées associées à des pathogènes telles que le LPS et l'acide lipoteichoïque, par leurs récepteurs apparentés (Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Flannagan R.S., *et al.*, 2015).

### **iii. Les protéines et peptides antimicrobiens**

Les phagocytes ont à leur disposition un ensemble impressionnant de protéines et de peptides antagonisant la capacité microbienne à partir de l'intérieur du phagolysosome. Les neutrophiles sont particulièrement bien équipés, grâce à leurs granules contenant un large spectre de protéines bactéricides et dégradantes, dont certaines sont également exprimées par les macrophages. Ces facteurs antimicrobiens peuvent agir comme des effecteurs, tuant les agents pathogènes ingérés, ou peuvent entraver la croissance des microbes internalisés en les privant de nutriments essentiels (Flannagan R.S., *et al.*, 2012). Le fer est un métal essentiel qui fonctionne comme un cofacteur dans plusieurs processus bactériens, ce qui implique que les bactéries disposent de systèmes spécialisés facilitant son acquisition. Les neutrophiles s'efforcent donc de limiter la disponibilité du fer luminal par l'apport de lactoferrines, des protéines de liaison du fer. De plus, la lactoferrine est une protéine antimicrobienne réduisant également la survie des agents pathogènes par interaction directe avec la surface microbienne (Flannagan R.S., *et al.*, 2012). Les phagocytes expriment également une pléthore de protéines antimicrobiennes réagissant directement avec les protéines, les membranes ou les glucides des micro-organismes ingérés, compromettant directement leur intégrité structurelle. Parmi ces protéines on peut tout d'abord citer le lysozyme, qui hydrolyse les liaisons  $\beta$ -1-4-glycosidiques entre l'acide N-acétylmuramique et la N-acétyl-D-glucosamine du peptidoglycane bactérien, compromettant ainsi l'intégrité des bactéries à Gram positif (Flannagan R.S., *et al.*, 2012 ; Flannagan R.S., *et al.*, 2015). Dans le cas des bactéries à Gram négatif, la membrane extérieure leur confère une protection contre ce lysozyme. Cependant,

les phagocytes expriment également des peptides antimicrobiens cationiques (PAC), tels que les défensines, pouvant perméabiliser la membrane extérieure. Ces PAC sont généralement très toxiques et tuent les bactéries grâce à un large spectre de mécanismes d'action (Flannagan R.S., *et al.*, 2012).

#### 4- Le zinc comme stratégie antibactérienne

Les ions métalliques représentent une classe de micronutriments essentielle pour les cellules de l'hôte ainsi que pour les bactéries. Ces nutriments sont importants pour la croissance et la survie des bactéries. Cependant, de fortes concentrations provoquent également une toxicité vis-à-vis des bactéries. Il est donc essentiel pour elle de réguler parfaitement les concentrations en métaux. Parmi ces métaux, le zinc est un composant essentiel des processus enzymatiques bactériens et intervient dans la défense immunitaire innée et adaptative (Ong C.L.Y., *et al.* 2018 ; Gao H., *et al.*, 2018). Tout d'abord, au cours d'une infection, une immunité nutritionnelle peut avoir lieu, comme pour le fer, avec une séquestration empêchant les bactéries d'utiliser le zinc pour leur fonctionnement (Ong C.L.Y., *et al.* 2018). Ainsi, la séquestration du zinc par la calprotectine peut inhiber la croissance de divers agents pathogènes humains, dont *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Cependant, une forte augmentation de zinc est observé dans les macrophages et les neutrophiles après la phagocytose de pathogènes, suggérant bien un rôle antimicrobien du zinc (Botella H., *et al.*, 2011 ; Botella H., *et al.*, 2012 ; Hasan R., *et al.*, 2012 ; Niederweis M., *et al.*, 2015 ; Ong C.L.Y., *et al.* 2018 ; Gao H., *et al.*, 2018). Cette libération de zinc provient des compartiments endosomaux précoces et tardifs et atteint le phagosome et le phagolysosome. En effet, un excès de zinc est délétère pour les bactéries mais également pour les cellules. C'est pourquoi on retrouve peu de zinc à l'état libre dans la cellule, celui-ci est complexé à des métallothionéines (MTs) au sein des compartiments intracellulaires de l'hôte (Botella H., *et al.*, 2011 ; Botella H., *et al.*, 2012 ; Niederweis M., *et al.*, 2015 ; Gao H., *et al.*, 2018). Lors de l'entrée du pathogène, le déclenchement du burst oxydatif, ayant pour but de l'éliminer, entraîne également la dissociation des complexes zinc-MT et la libération du zinc au niveau cytoplasmique. Le zinc pénètre ensuite dans les phagosomes et les phagolysosomes pour aider à la destruction des pathogènes. De plus, il a également été montré que le zinc était essentiel à la formation de NETs par les neutrophiles, jouant aussi un rôle supplémentaire dans l'élimination des bactéries (Hasan R., *et al.*, 2012). Pour conclure, on peut voir que les cellules immunitaires ont mis en place deux mécanisme complémentaire afin d'éliminer les pathogène. Tout d'abord, au niveau extracellulaire, on observe une séquestration du zinc

empêchant les bactéries de croître et impactant leur survie ainsi qu'une augmentation de la formation de NETs. Ensuite, une fois à l'intérieur des phagocytes, la libération d'un excès de zinc vient suppléer le burst oxydatif ainsi que les différentes stratégies visant à éliminer les pathogènes.

## **C/ Échappement immunitaire de *S. aureus***

La phagocytose, comme décrite précédemment, est un élément essentiel de l'immunité antimicrobienne. Cependant, les bactéries ont su s'adapter afin de lutter contre les acteurs du système immunitaire et survivre au sein de l'hôte. Pour cela, elles vont tout d'abord essayer d'empêcher l'opsonisation et intervenir dans le processus de phagocytose. Après avoir été ingéré elles vont mettre en place différents mécanismes pour survivre face aux stratégies de mort des cellules phagocytaires et se multiplier. Enfin, elles peuvent tuer les cellules de l'intérieur afin de s'échapper et disséminer à travers l'organisme.

### **1- Évitement de l'opsonisation et de la phagocytose**

La première étape pour éviter à la bactérie d'être phagocytée est d'empêcher l'opsonisation par les IgG et le complément. En effet, l'évasion de la phagocytose des pathogènes non opsonisés n'a pas encore été décrite (Flanagan R.S., *et al.*, 2015). Cependant, plusieurs facteurs ont été identifiés, permettant à la bactérie d'interférer avec l'opsonisation par les IgG et par le complément (Figure 25) afin de la rendre moins appétantes pour les récepteurs opsoniques exprimés par les macrophages. Cela entraîne ainsi un retard ou une réduction de la réponse immunitaire et crée une situation permettant à la bactérie de survivre et de se multiplier au sein de son hôte (de Jong N.W.M., *et al.*, 2019).

#### **a) Inhibition du complément**

Les pathogènes peuvent tout d'abord éviter le complément afin d'inhiber la reconnaissance immunitaire, par le biais de la production de plusieurs facteurs de virulence ciblant différentes étapes du système du complément (Guerra F.E., *et al.*, 2017). *S. aureus* peut par exemple produire l'inhibiteur du complément staphylococcique (SCIN), se liant spécifiquement aux convertases C3 humaines pour les inhiber (Figure 25). Cette liaison empêche la génération du fragment C3b et donc l'opsonisation de *S. aureus* (Flanagan R.S., *et al.*, 2015 ; Thammavongsa V., *et al.*, 2015 ; McGuinness W.A., *et al.*, 2016 ; Guerra F.E., *et*

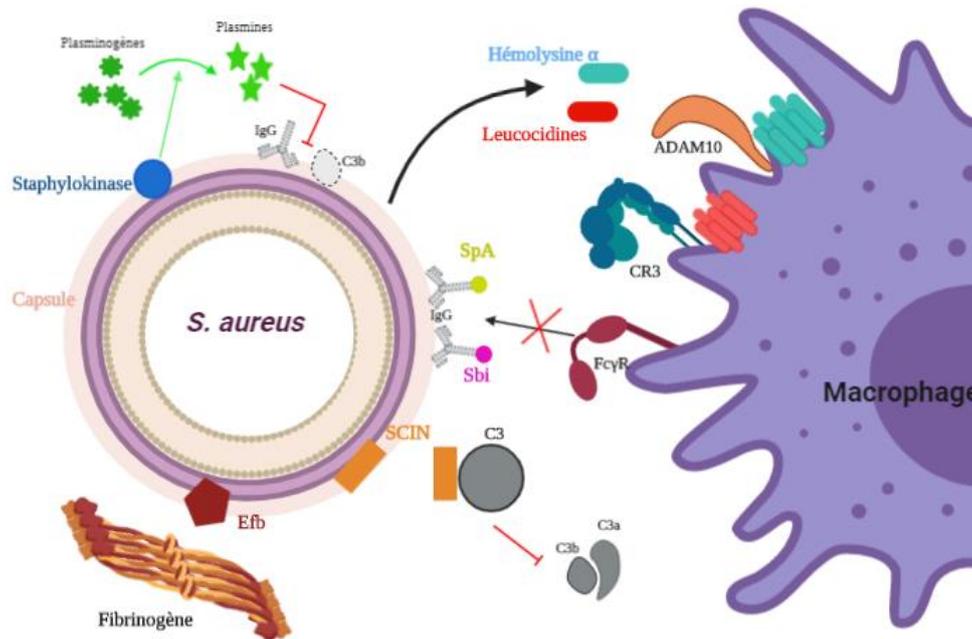
*al.*, 2017 ; de Jong N.W.M., *et al.*, 2019 ; Nasser A., *et al.*, 2019). La staphylokinase interfère également avec l'opsonisation par le complément en activant le plasminogène en plasmine. La plasmine ainsi activée va ensuite dégrader le fragment C3b du complément (Figure 25) afin d'empêcher son dépôt à la surface bactérienne. Mais *S. aureus* exprime un large éventail de facteurs impliqués dans l'évasion de l'opsonisation par le complément comme l'Efb, l'Eap, l'aurolysine, la CNA pour n'en citer que quelques uns (Flannagan R.S., *et al.*, 2015 ; Thammavongsa V., *et al.*, 2015 ; McGuinness W.A., *et al.*, 2016 ; Guerra F.E., *et al.*, 2017 ; de Jong N.W.M., *et al.*, 2019 ; Nasser A., *et al.*, 2019).

### **b) Inhibition de la reconnaissance par les IgG**

Le complément et les immunoglobulines, comme expliqué précédemment, fonctionnent comme des opsonines afin d'améliorer la reconnaissance des pathogènes et leur ingestion par les phagocytes. Bien que *S. aureus* produise de nombreux facteurs inhibant la voie du complément, l'efficacité de ces facteurs *in vivo* est largement controversée puisque l'opsonisation par les immunoglobulines semble jouer un rôle prépondérant dans la phagocytose médiée par les opsonines (Guerra F.E., *et al.*, 2017). La protéine Spa, décrite dans la partie protéine A staphylococcique (page 57) est l'un des facteurs inhibant la phagocytose (Figure 25) les mieux caractérisés. Spa se lie à la région constante Fc $\gamma$  de l'IgG par le biais d'un de ces cinq domaines de liaison aux immunoglobulines, empêchant ainsi l'engagement correct des récepteurs Fc $\gamma$ R sur les phagocytes et la reconnaissance des antigènes (Flannagan R.S., *et al.*, 2015 ; Guerra F.E., *et al.*, 2017 ; de Jong N.W.M., *et al.*, 2019 ; Nasser A., *et al.*, 2019). *S. aureus* produit une deuxième protéine de liaison des immunoglobulines (appelée Sbi pour Protéine de liaison aux Immunoglobulines de *S. aureus*) qui se lie également à l'IgG afin d'inhiber la phagocytose (Figure 25). Comme Spa, Sbi est également exprimée à la surface des cellules staphylococciques et est sécrétée pendant la croissance bactérienne (Flannagan R.S., *et al.*, 2015 ; Guerra F.E., *et al.*, 2017 ; de Jong N.W.M., *et al.*, 2019 ; Nasser A., *et al.*, 2019). Bien entendu, ces deux protéines ne sont pas les seuls facteurs impliqués dans l'inhibition de la reconnaissance par les IgG puisqu'on peut également citer les exoprotéines de type superantigène 7 et 10 (SSL7 et SLL10), la sérine protéase v8 qui clive les Immunoglobulines mais également la staphylokinase, décrite précédemment dans l'inhibition du complément, qui a donc un double effet (Flannagan R.S., *et al.*, 2015 ; Thammavongsa V., *et al.*, 2015 ; Guerra F.E., *et al.*, 2017 ; de Jong N.W.M., *et al.*, 2019 ; Nasser A., *et al.*, 2019).

### c) **Échappement de la phagocytose**

En plus d'inhiber l'opsonisation afin d'empêcher la reconnaissance et l'élimination des bactéries par le système immunitaire de l'hôte, la production d'une capsule a été suggérée comme stratégie d'évasion de la phagocytose (Thammavongsa V., *et al.*, 2015 ; Flannagan R.S., *et al.*, 2015 ; Guerra F.E., *et al.*, 2017 ; de Jong N.W.M., *et al.*, 2019). En effet, la meilleure façon pour la bactérie de résister à la phagocytose est de cacher les protéines antigéniques ou immunogènes présentes à sa surface avec une capsule de polysaccharide. On estime qu'environ 75% des isolats cliniques de *S. aureus* possèdent une capsule (ou une microcapsule), contenant soit le polysaccharide capsulaire 5 (CP5) soit le polysaccharide capsulaire 8 (CP8) (O'Riordan K., *et al.*, 2004). Ces bactéries cultivées dans des conditions optimales de production de capsules ont montré une résistance à la phagocytose médiée par l'opsonisation et donc à la mort. Cependant, la capsule de *S. aureus* ne bloque pas complètement le dépôt des composants du complément à la surface de la bactérie ou la fixation d'anticorps spécifiques. D'autres bactéries, comme *Streptococcus pneumoniae* en revanche, produisent une capsule très épaisse les protégeant plus efficacement (Flannagan R.S., *et al.*, 2015). Une autre stratégie des bactéries pour éviter d'être phagocytées est d'intoxiquer les cellules hôtes avant d'être ingérées (Figure 25). En effet, les phagocytes professionnels qui sont morts ou mourants, ne sont plus capables de phagocytose et ne seront donc pas microbicides. Ainsi, comme décrit dans la partie toxines, *S. aureus* peut élaborer une multitude de toxines formant des pores et endommageant la membrane afin de provoquer la mort de la cellule hôte. Ces toxines favorisent la perte de l'intégrité membranaire et la lyse des cellules affectées. Ces toxines, appelées collectivement leucocidines parce qu'elles tuent les leucocytes, comprennent les leucocidines bi-composantes (par exemple, LukAB), l'hémolysine  $\alpha$  (Hla) et la famille des modulines solubles dans le phénol (PSM) (Flannagan R.S., *et al.*, 2015 ; de Jong N.W.M., *et al.*, 2019).



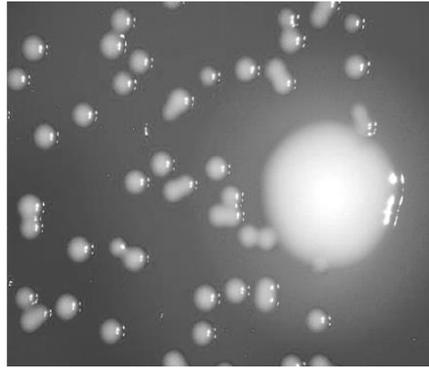
**Figure 25 : Facteurs de virulence de *S. aureus* impliqués dans l'inhibition de l'opsonisation et dans l'échappement à la phagocytose (adaptée de Uribe-Querol E., *et al.*, 2017 et de Foster T.J., 2005 ; réalisée sur Biorender.com).** La capsule polysaccharidique peut compromettre l'accès des macrophages aux compléments et aux IgG. La staphylokinase active le plasminogène en plasmine ce qui conduit à la dégradation des fragments C3b du complément et des IgG. *S. aureus* sécrète des toxines, notamment les leucocidines et les hémolysines  $\alpha$ , qui induisent la perméabilité de la membrane cellulaire en formant des pores. La protéine A (SpA) et la protéine Sbi se lie spécifiquement à la région Fc de l'IgG, bloquant l'engagement et l'activation des récepteurs Fc $\gamma$ R. L'inhibiteur du complément staphylococcique (SCIN) empêche l'activation du complément en se fixant aux convertases C3 empêchant ainsi la génération du fragment C3b et donc l'opsonisation. Enfin, l'Efb se lie aux fibrinogènes, créant ainsi un bouclier protéique recouvrant les opsonines liées à la surface pour empêcher leurs reconnaissances.

## 2- Survie intracellulaire de *S. aureus*

### a) Petites colonies variantes (SCV) et persistance intracellulaire de *S. aureus*

Une fois internalisé par les cellules hôtes (phagocytaires ou non), *S. aureus* peut résider dans les cellules pendant des périodes plus ou moins longue, ce qui est suggéré comme facteur favorisant la chronicité des infections à *S. aureus* (Horn J., *et al.*, 2018). Les bactéries récupérées sur des sites d'infections à long terme possèdent généralement une activité métabolique réduite accompagnée de taux de croissance lents et d'une résistance accrue aux antibiotiques. Ces bactéries sont appelées petites colonies variantes (SCV) et se caractérisent par un phénotype particulier (Figure 26) lié à des changements distincts dans le transcriptome et le protéome du pathogène (Horn J., *et al.*, 2018). Ces SCV sont souvent non hémolytiques, non cytotoxiques, faiblement pigmentés et présentent une paroi cellulaire épaisse. Cependant, les mécanismes du switch phénotypique réversible vers les SCV ainsi que dans quelle mesure

les SCV survivent dans les phagosomes ou dans le cytosol des cellules ne sont pas encore complètement résolus (Horn J., *et al.*, 2018). *Listeria monocytogenes*, est un autre exemple de bactéries capables de réduire son activité métabolique et de passer dans un état lent, non répliatif au sein de vacuoles (Kortebi M., *et al.*, 2017). De plus, dans ces vacuoles, elles sont également protégées contre certains traitements antibiotiques, et notamment la gentamicine, ce qui est problématique au niveau clinique puisqu'il s'agit du traitement de référence (Kortebi M., *et al.*, 2017).



**Figure 26 : Photographie illustrant la différence de taille entre une colonie classique de *S. aureus* et une SCV (Bayston R., *et al.*, 2007).**

De plus, il a également été montré que *S. aureus* survit et prolifère à l'intérieur des phagocytes professionnels tels que les neutrophiles et les monocytes en s'échappant du phagosome. Ainsi, *S. aureus* a également été décrit comme résidant à l'intérieur de vacuoles de macrophages dérivés de monocytes humains pendant 3 à 4 jours (Kubica M., *et al.*, 2008 ; Horn J., *et al.*, 2018), et à l'intérieur d'ostéoblastes jusqu'à 5 à 7 jours (Hamza T., *et al.*, 2014 ; Horn J., *et al.*, 2018) avant de s'échapper dans le cytoplasme. De plus, une fois internalisé, *S. aureus* induit des mécanismes cytoprotecteurs en régulant à la hausse les facteurs anti-apoptotiques dans les macrophages, prolongeant ainsi sa résidence intracellulaire. Il s'en suit une lyse cellulaire des macrophages infectés, libérant des bactéries viables pouvant ensuite être ingérées par d'autres macrophages. Ainsi, on observe un cycle continu de lyse et d'absorption maintenant un pool de bactéries intracellulaires viables au fil du temps et conduisant à la persistance de *S. aureus* au niveau intracellulaire (Horn J., *et al.*, 2018). *S. aureus* peut se servir de ces phagocytes comme des chevaux de Troie afin d'atteindre des sites d'infection éloignés. Cependant, afin de survivre aux nombreuses stratégies des phagocytes pour le tuer, *S. aureus* a dû développer des facteurs lui permettant d'y échapper. Ainsi, *S. aureus* va pouvoir résister aux stratégies de destructions liées au stress oxydant ainsi qu'aux peptides antimicrobiens.

### b) Résistance aux stratégies antimicrobiennes des phagocytes

Une fois phagocytés, les staphylocoques sont exposés à une variété de produits toxiques qui tuent et dégradent les bactéries: peptides antimicrobiens, espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) et de nombreuses enzymes protéolytiques. Cependant, mis à part la persistance, *S. aureus* a développé un certain nombre de stratégies pour survivre dans cet environnement inhospitalier (Figure 27).

#### ➤ Résistance à la destruction oxydative :

L'activation des phagocytes conduit à l'assemblage de la NADPH oxydase suivi du burst oxydatif entraînant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les bactéries ingérées sont donc exposées à une forte concentration de ROS dans le phagosome impliquant que celles-ci soit prêtes à les contrer (Flannagan R.S., *et al.*, 2015 ; Guerra F.E., *et al.*, 2017 ; de Jong N.W.M., *et al.*, 2019). Le nom de l'espèce *S. aureus* est dérivé du pigment doré emblématique, résultat d'un caroténoïde antioxydant appelé staphyloxanthine. Cette staphyloxanthine sert d'antioxydant et est protectrice contre l' $\text{H}_2\text{O}_2$  et l' $\text{O}_2^-$ , expliquant pourquoi les bactéries dépourvues de staphyloxanthine ont montré une altération de la survie *in vitro* et *in vivo* (Flannagan R.S., *et al.*, 2015 ; Guerra F.E., *et al.*, 2017 ; de Jong N.W.M., *et al.*, 2019). De plus, *S. aureus* produit deux superoxydes dismutases (sodA et sodM) et une catalase (KatA) qui agissent en synergie pour le protéger des ROS. En effet, les superoxydes dismutases vont convertir l' $\text{O}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  et en  $\text{O}_2$  puis KatA va convertir  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  et  $\text{O}_2$ . Cependant, une résistance complète aux dommages causés par les ROS est peu probable, impliquant la mise en place de systèmes de réparation des protéines staphylococciques endommagées, contribuant également à la résistance aux ROS. Par exemple, les gènes codant pour les méthionine sulfoxyde réductases (Msr) qui réparent les résidus de méthionine oxydés dans les protéines, sont régulés à la hausse dans les phagosomes des neutrophiles et probablement aussi dans les macrophages (Flannagan R.S., *et al.*, 2015 ; Guerra F.E., *et al.*, 2017 ; de Jong N.W.M., *et al.*, 2019 ; Nasser A., *et al.*, 2019).

#### ➤ Résistance à la destruction non oxydative:

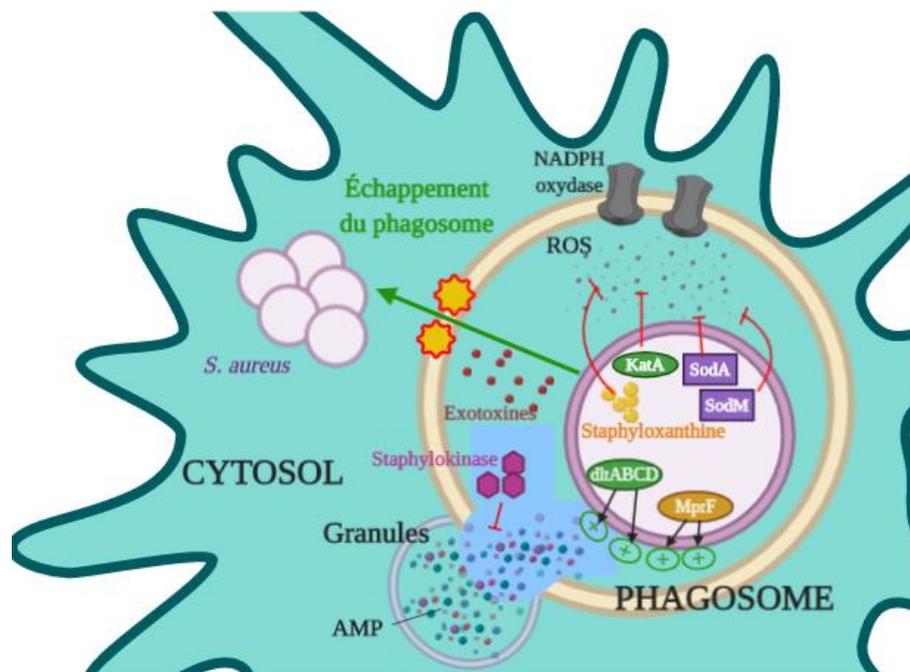
Outre la destruction par les ROS, les phagocytes produisent une grande quantité de peptides antimicrobiens cationiques (AMPs) comme les défensines  $\alpha$ . Pour repousser l'attaque de ces AMPs, *S. aureus* peut modifier les lipides phosphatidylglycérol de sa

membrane cytoplasmique, chargés négativement, en incorporant la L-lysine, chargée positivement, grâce à l'enzyme MprF. De plus, il peut également modifier les acides teichoïques de la paroi cellulaire en incorporant des résidus D-alanine, par expression des produits de l'opéron *dltABCD*. Ces modifications permettent de résister aux AMPs en rendant la surface bactérienne moins anionique, diminuant ainsi les interactions électrostatiques avec les AMPs cationiques (Flannagan R.S., *et al.*, 2015 ; Guerra F.E., *et al.*, 2017 ; de Jong N.W.M., *et al.*, 2019 ; McGuinness W.A., *et al.*, 2016 ; Nasser A., *et al.*, 2019). C'est deux enzymes ne sont que deux exemples des multiples enzymes exprimées par *S. aureus* pour résister aux nombreux peptides antimicrobiens produits par les phagocytes.

### 3- Échappement du phagolysosome et lyse des cellules

La dernière étape de la lutte contre la phagocytose et donc de la destruction est de s'échapper de l'environnement hostile du phagolysosome afin de se multiplier dans le cytoplasme puis de lyser la cellule pour s'échapper. Des agents pathogènes intracellulaires tels que *Shigella*, *Francisella*, *Listeria* et *Rickettsia*, s'échappent du phagosome dans le cytosol de la cellule hôte en quelques minutes après l'invasion par sécrétion de facteurs de virulence endommageant la membrane. Ainsi, *Listeria monocytogenes*, l'un des pathogènes intracytosoliques les mieux caractérisés, est connue pour s'échapper rapidement des vacuoles primaires et secondaires grâce à la Listeriolysine O, une toxine formant des pores, en coopération avec deux phospholipases C (Bierne H., *et al.*, 2018). De même, certaines souches de *S. aureus* possèdent également la capacité de s'échapper du phagosome. Cependant, contrairement aux autres agents pathogènes, il s'échappe à un moment assez tardif, environ 2,5 heures après l'infection. Cette fuite phagosomale est attribuée à des facteurs régulés par le système Agr ainsi qu'à l'hémolysine  $\alpha$  bien que les mécanismes par lesquels ces facteurs favoriseraient une résidence prolongée dans le phagosome soient non élucidés (Flannagan R.S., *et al.*, 2015 ; Horn J., *et al.*, 2018). La fuite des phagosomes et l'entrée dans le cytosol semble être une des conditions préalables à la réplication, impliquant qu'un facteur lytique produit par la bactérie, comme une toxine, doit être actif dans ce compartiment. Cependant, aucun consensus n'existe sur la toxine responsable de la dissolution de la membrane phagosomale (Flannagan R.S., *et al.*, 2015). Pour les neutrophiles, il est généralement admis que la production de LukAB et des PSM- $\alpha$  favorisent la destruction des phagocytes de l'intérieur. Au contraire, *S. aureus* commence à se répliquer alors qu'il est

confiné dans des vacuoles membranaires phosphatidylsérines positives qui sont enrichies par le marqueur phagosomal LAMP-1 (Flannagan R.S., *et al.*, 2015b). Il est évident qu'avec une répllication soutenue, la membrane phagosomale limitante éclaterait, mais la sortie du phagosome et l'accès au cytosol ne semblent pas nécessaires pour la répllication de *S. aureus* dans les macrophages (Flannagan R.S., *et al.*, 2015). Enfin, une fois dans le cytosol, *S. aureus* va induire la lyse des cellules via les PSMs et les différentes toxines qu'il exprime afin de pouvoir disséminer dans l'organisme. Cependant, si la cellule hôte infectée ne parvient pas à éradiquer sa charge microbienne, elle peut mettre en place des voies de signalisation de mort cellulaire dans le cadre d'un mécanisme de défense immunitaire intrinsèque. Ainsi, l'apoptose constitue une forme programmée de mort cellulaire, essentielle à la croissance et à l'homéostasie cellulaire d'un organisme multicellulaire, favorisant l'éradication du pathogène sans provoquer de réponse inflammatoire. Elle induit une réponse immunitaire protectrice après internalisation de corps apoptotiques contenant des bactéries par des phagocytes professionnels (Horn J., *et al.*, 2018).



**Figure 27 : Facteurs de virulence exprimés par *S. aureus* pour combattre les stratégies de mise à mort des cellules phagocytaires (adaptée de McGuinness W.A., *et al.*, 2016 ; réalisée sur Biorender.com).** *S. aureus* produit deux superoxydes dismutases (SodA et SodM) ainsi que la catalase KatA pour combattre les ROS du burst oxydatif. De plus, le pigment caractéristique de *S. aureus*, la staphyloxanthine, est un puissant antioxydant lui permettant aussi de lutter contre ces ROS. Il exprime également MprF et l'opéron *dltABCD*, lui permettant de rendre sa surface moins anionique pour lutter contre les AMP. De plus, la staphylokinase inhibe les défensines des neutrophiles. Enfin, l'hémolysine  $\alpha$  va dégrader la membrane du phagosome conduisant à l'échappement de *S. aureus* dans le cytosol.

A toutes les étapes de l'infection, les bactéries pathogènes vont s'adapter pour survivre et être le plus efficace. Chez l'hôte humain, elles ont ainsi développé diverses stratégies de virulence pour surmonter l'immunité innée et adaptative. Ces stratégies de virulence comprennent le camouflage de la surface à l'aide d'une capsule pour éviter la reconnaissance immunitaire, l'adaptation à un mode de vie intracellulaire pour se cacher du système immunitaire et la sécrétion de petites protéines inhibant des éléments spécifiques du système immunitaire. On comprend donc, à la vue de l'éventail de facteurs de virulence exprimés par la bactérie, ainsi que de la coordination nécessaire aux fonctions des différents stades de l'infection, que les bactéries aient développé de nombreux mécanismes de régulation de l'expression de ses gènes.

## **V] Régulation des facteurs de virulence**

*Staphylococcus aureus* est une bactérie dont l'adaptation aux différents stress rencontrés ainsi que la pathogénie sont liés à de nombreux facteurs nécessitant une régulation fine. Pour cela, elle a développé différents systèmes lui permettant de moduler l'expression de son génome en intervenant à différents niveaux. Le premier niveau de contrôle a lieu au niveau de l'ADN, on parlera de régulation transcriptionnelle avec notamment les facteurs de transcription (FT) et les systèmes à deux composants (TCS). Ensuite, les régulateurs peuvent intervenir au niveau ARN ou protéique et on parlera alors de régulation traductionnelle ou post-traductionnelle, faisant principalement intervenir les ARNs régulateurs (ARNrég).

### **A/ Les facteurs de transcription**

La transcription représente la première étape de l'expression génique que ce soit chez les procaryotes ou les eucaryotes. Ainsi, il existe de nombreux régulateurs agissant à ce niveau pour coordonner l'expression des gènes de *S. aureus* au cours d'une infection dont les facteurs de transcription, comme leur nom l'indique, sont des acteurs clefs.

#### **1- Les facteurs de transcriptions sigma**

Les facteurs sigma sont impliqués dans l'initiation de la transcription et sont notamment nécessaires à la spécificité de l'ARN polymérase pour les promoteurs des gènes (Bischoff M., *et al.*, 2004 ; Jenul C., *et al.*, 2018). On retrouve quatre facteurs sigma chez *S.*

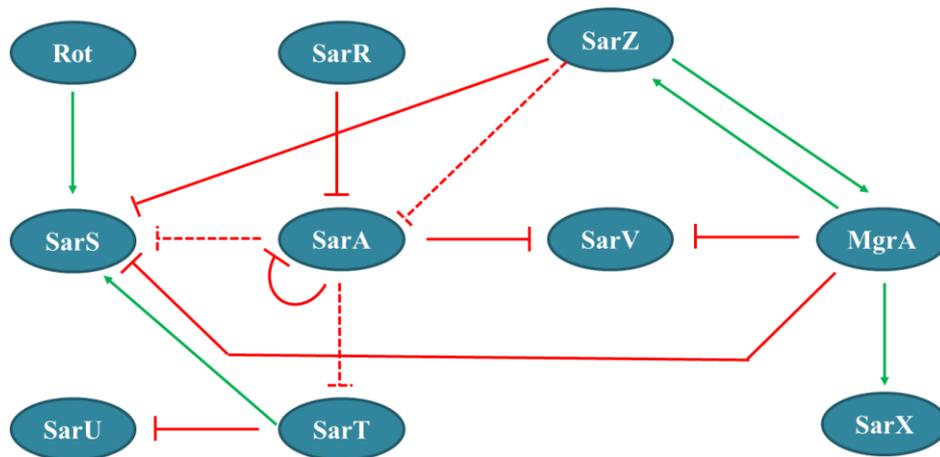
*aureus* ( $\sigma^A$ ,  $\sigma^B$ ,  $\sigma^S$  et  $\sigma^H$ ), permettant la reconnaissance de promoteurs spécifiques et donc l'expression de gènes distincts.

- Le facteur  $\sigma^A$ : est nécessaire à l'expression des gènes de ménage de la bactérie tandis que les trois autres ( $\sigma^B$ ,  $\sigma^S$  et  $\sigma^H$ ) sont liés à l'expression des gènes permettant à la bactérie de s'adapter aux différents environnements rencontrés (Bischoff M., *et al.*, 2004 ; Jenul C., *et al.*, 2018).
- Le facteur  $\sigma^S$ : contribue à l'adaptation aux stress environnementaux et à la survie de la bactérie. Il permet une meilleure résistance à la lyse par le Triton X-100, un détergent, et est également essentiel à la virulence de *S. aureus* (Shaw L.N., *et al.*, 2008).
- Le facteur  $\sigma^H$ : conduit à une compétence naturelle de *S. aureus*, lui permettant d'acquérir de l'ADN exogène, bien qu'avec une efficacité très faible (Morikawa K., *et al.*, 2012 ; Jenul C., *et al.*, 2019). En effet, certains gènes connus pour être impliqués dans la compétence naturelle d'autres espèces bactériennes sont régulés par  $\sigma^H$  (Morikawa K., *et al.*, 2003 ; Fagerlund A., *et al.*, 2013 ; Jenul C., *et al.*, 2018). Il stabilise également l'état lysogénique des prophages de *S. aureus* (Tao L., *et al.*, 2010). De plus, comme les prophages sont souvent porteurs de gènes de virulence,  $\sigma^H$  pourrait jouer un rôle dans la virulence de *S. aureus* (Jenul C., *et al.*, 2018).
- Le facteur  $\sigma^B$ : a été identifié par homologie de séquence avec le facteur alternatif  $\sigma^B$  de *Bacillus subtilis* (Wu S., *et al.*, 1996). Il est issu d'un opéron de quatre gènes, les gènes *rsbU*, *rsbV*, *rsbW* et *sigB* dont la co-expression est réalisée de manière constitutive par l'ARN polymérase associée à  $\sigma^A$ .  $\sigma^B$  est régulé au niveau post-transcriptionnel par les protéines Rsb (régulation de sigma B). En absence de stimuli environnementaux,  $\sigma^B$  est lié et maintenu inactif par la protéine RsbW. Cependant, en condition de stress, la phosphatase RsbU va déphosphoryler RsbV qui va alors entrer en compétition avec  $\sigma^B$  pour la liaison de RsbW. Cela permet ainsi la libération de  $\sigma^B$  qui pourra s'associer à l'holoenzyme ARN polymérase et ainsi initier la transcription (Jenul C., *et al.*, 2018).  $\sigma^B$  est connu pour répondre à différents stress et régule en conséquence les protéines de réponse au stress. Chez *S. aureus*, il contrôle directement et indirectement environ 200 gènes, dont des gènes ayant des fonctions dans la virulence, dans la formation de biofilms, dans la persistance, dans l'internalisation des cellules, dans le transport membranaire et dans la résistance aux antibiotiques (Bischoff M., *et al.*, 2004 ; Jenul C., *et al.*, 2018).

Plusieurs de ces fonctions de régulation sont assurées par la régulation de régulateurs de virulence connus, comme agr et SarA (Bischoff M., *et al.*, 2004 ; Jenul C., *et al.*, 2018).

## 2- Les facteurs de transcription de la famille Sar

Les facteurs de transcription de la famille Sar (Régulateur accessoire staphylococcique) sont au nombre de 11 : SarA, SarR, SarS, SarT, SarU, SarV, SarX, SarY, SarZ, MgrA et Rot. Ces protéines peuvent être séparées en deux groupes en fonction de leur taille : (i) les protéines de petite taille, agissant en dimère (SarA, SarR, SarT, SarV, SarX, SarZ, MgrA et Rot) et (ii) les protéines de plus grosse taille (SarS, SarU et SarY), agissant en monomères (Cheung A.L., *et al.*, 2008 ; Mauro T., 2017). L'ensemble de ces facteurs a la particularité d'avoir une structure tridimensionnelle en « winged-helix », composée de 3 hélices  $\alpha$  et de 3 feuillets  $\beta$ , permettant la liaison de la protéine sur les acides nucléiques (Cheung A.L., *et al.*, 2008 ; Mauro T., 2017). De plus, ils régulent l'expression de nombreux gènes, ils s'auto-régulent et se régulent entre eux (Figure 28).



**Figure 28 : Inter-régulation des facteurs de transcription de la famille Sar (adaptée de Mauro T., 2017).** Les flèches vertes représentent une activation et les flèches interrompues rouges une répression. Les flèches interrompues en pointillée représentent des régulations indirectes.

- **SarA** : représente le prototype de la famille des protéines Sar et a été mis en évidence par Cheung A.L. et ses collaborateurs (Cheung A.L., *et al.*, 1992). Les autres membres de la famille ont ensuite été identifiés par homologie de séquence avec lui. Le gène *sarA* est sous le contrôle de trois promoteurs différents (P1, P2 et P3) entraînant la transcription de trois transcrits mais aboutissant à la production constitutive d'une seule protéine (Cheung A.L., *et al.*, 2008 ; Mauro T., 2017 ; Jenul C., *et al.*, 2018). SarA est régulée négativement par les protéines SarR et SarV ainsi que par le facteur sigma alternatif  $\sigma_B$ . La protéine SarA exerce sa fonction de régulation globale de manière indirecte en activant la

transcription du système Agr par fixation sur ses promoteurs P2 et P3, se traduisant par une expression accrue des toxines, comme les hémolysines, et la répression de la protéine A. De plus, SarA régule de nombreux gènes de virulence de manière directe. Il va ainsi réprimer la transcription de protéases et d'adhésines, et activer la transcription de l'hémolysine  $\alpha$ , de la toxine 1 du syndrome de choc toxique et des FnBPA et B (Cheung A.L., *et al.*, 2008 ; Jenul C., *et al.*, 2018). L'étude transcriptomique de SarA réalisée par Dunman P.M. et ses collaborateurs a montré que plus de 120 gènes seraient régulés par SarA (Dunman P.M., *et al.*, 2001). Enfin, un dernier point intéressant dans la régulation de SarA, est la répression de deux ARNs régulateurs, *Srn\_3610\_SprC* connus pour atténuer la virulence de *S. aureus* dans un modèle d'infection animale ainsi que l'internalisation des bactéries par les macrophages humains (Le Pabic H., *et al.*, 2015) et *Srn\_9340* (Mauro T., *et al.*, 2016).

- SarR : est capable de se fixer au niveau des trois promoteurs de *sarA* afin de réprimer son expression. De plus, ces deux facteurs de transcription ont souvent des rôles opposés quant à l'expression de gènes. Ainsi, lorsque SarA active l'expression du promoteur P2 du système *agr*, SarR, quant à lui, se substitue à SarA pour réprimer l'expression du système en phase post-exponentielle de croissance (Manna A.C., *et al.*, 2006a ; Cheung A.L., *et al.*, 2008 ; Mauro T., 2017 ; Jenul C., *et al.*, 2018). De plus, SarA, comme décrit précédemment, réprime la transcription de protéases de *S. aureus* quand SarR, au contraire active leur transcription (Mauro T., 2017).
- SarT et SarU : sont codés par deux gènes adjacents et transcrits de manière divergente. La transcription de SarT est réprimée par *agr* et SarA. Une fois activé, SarT semble exercer un rétrocontrôle négatif sur *agr*. De plus, il régule à la hausse SarS et réprime SarU et l'hémolysine  $\alpha$  (Schmidt K.A., *et al.*, 2001 ; Cheung A.L., *et al.*, 2004 ; Cheung A.L., *et al.*, 2008 ; Jenul C., *et al.*, 2018). SarU quant à lui possède l'effet inverse sur le système Agr puisqu'on observe une diminution de l'activité des promoteurs P2 et P3 dans un mutant SarU (Manna A.C., *et al.*, 2003 ; Cheung A.L., *et al.*, 2004 ; Cheung A.L., *et al.*, 2008 ; Jenul C., *et al.*, 2018).
- SarS : est un facteur activant la protéine A et réprimant la transcription de l'hémolysine  $\alpha$ . De plus il est fortement réprimé par SarA et par le système *agr*, et activé par SarT et MgrA. SarS joue également un rôle dans l'expression de la toxine exfoliatrice A (ETA) et

dans la propagation de la résistance aux antibiotiques via les cassettes SCC*mec*. En effet, SarS régule à la hausse les recombinases de cassettes chromosomiques A et B, responsables de l'excision de SCC*mec* et pouvant conduire à son transfert horizontal (Cheung A.L., *et al.*, 2001 ; Cheung A.L., *et al.*, 2004 ; Oscarsson, J., *et al.*, 2006 ; Cheung A.L., *et al.*, 2008 ; C., Jenul *et al.*, 2018).

- SarV : est faiblement exprimé, voir quasi indétectable dans des conditions de croissance *in vitro*, mais il est considérablement augmenté dans des mutants *mgrA* et *sarA*, ce qui correspond à sa répression par MgrA et SarA. Ce facteur est impliqué dans la régulation des gènes de l'autolyse puisqu'un mutant *sarV* rend *S. aureus* plus résistant à la lyse par le Trion-X100 tandis que la surexpression de SarV conduit à une augmentation de la mort par lyse (Manna A.C., *et al.*, 2004 ; Cheung A.L., *et al.*, 2008).
- SarX : est activé par MgrA et agit comme un répresseur de *agr* (Manna A.C., *et al.*, 2006b ; Cheung A.L., *et al.*, 2008). De plus, SarX joue un rôle dans la stimulation du biofilm en inhibant le répresseur *icaR* permettant d'activer l'expression de l'opéron *icaADBC* (Cue D., *et al.*, 2013).
- SarZ : est activé par le facteur MgrA et régule des gènes impliqués dans la formation du biofilm et régule également l'expression de la protéase SspA. Il active également *agr* et réprime SarS (Kaito C., *et al.*, 2006 ; Cheung A.L., *et al.*, 2008 ; Tamber S., *et al.*, 2009).
- MgrA : est un membre important de la famille des protéines MarR/SarA. MgrA est transcrit à partir de deux promoteurs (P1 et P2). Il s'agit d'un régulateur global puisqu'il régule positivement 175 gènes et négativement 180 gènes dans la souche Newman de *S. aureus*, comme le montre une étude par micropuces (Luong T.T., *et al.*, 2006 ; Jenul *et al.*, 2018). Parmi ces gènes régulés, plusieurs codent pour des facteurs de virulence, notamment l'hémolysine  $\alpha$ , la coagulase, la protéine A, les nucléases et les sérine protéases extracellulaires (Luong T.T., *et al.*, 2003 ; Jenul *et al.*, 2018). MgrA régule également l'expression de SarZ, de SarS et du système *agr*. De plus, MgrA joue un rôle clé dans la régulation des pompes d'efflux NorA et NorB, conférant une résistance à plusieurs antibiotiques. Ainsi, la forme phosphorylée de MgrA est capable de se lier au promoteur NorB, agissant comme un répresseur tandis que sa forme déphosphorylée se lie au promoteur NorA, agissant comme un activateur (Truong-Bolduc Q.C., *et al.*, 2005 ; Jenul

*et al.*, 2018). Enfin, comme pour SarA, MgrA est régulé par un ARN régulateur, RsaA, qui le réprime en interagissant avec son site de fixation du ribosome (Romilly C., *et al.*, 2014 ; Jenul *et al.*, 2018).

- **Rot** : la protéine « répresseur de toxines » est un membre de la famille des SarA-like, affectant la transcription de 168 gènes (Said-Salim B., *et al.*, 2003 ; Jenul *et al.*, 2018). Parmi eux, Rot réprime notamment l'entérotoxine B, la toxine  $\alpha$  ainsi que des protéases. De plus, Rot régule à la hausse certains facteurs de virulence comme la protéine A et SarS. Le régulateur Rot est un antagoniste du système Agr permettant un rétrocontrôle négatif en bloquant sa traduction, via l'ARNIII, en phase stationnaire de croissance. De plus, Rot est également réprimé par la liaison directe de SarA sur son promoteur ainsi que par le facteur  $\sigma^B$  pendant la croissance stationnaire (Jenul *et al.*, 2018).

## **B/ Les systèmes à deux composants (TCS)**

Chez *S. aureus*, la régulation des facteurs de virulence est soumise à un réseau complexe qui intègre les signaux de l'hôte et de l'environnement dans une réponse coordonnée. Ainsi, les bactéries ont besoin de détecter et de relayer ces signaux, pour réussir à s'adapter aux changements rencontrés. L'une des stratégies la plus répandue et la plus efficace pour y parvenir est le système de transduction de signaux à deux composants (TCS), constituant un mécanisme permettant de percevoir les changements environnementaux et de les transformer en un programme de régulation. Un TCS typique se caractérise par une histidine kinase (HK) liée à la membrane (bien que dans de rares cas, cette kinase puisse être cytosolique) et d'une protéine régulatrice de la réponse (RR) cytosolique nécessaire pour induire l'adaptation transcriptionnelle. L'acquisition du stimulus extérieur entraîne l'activation de l'histidine kinase par autophosphorylation et la phosphorylation ultérieure du régulateur de réponse. La phosphorylation du régulateur de réponse déclenche des changements de conformation modulant l'affinité du RR pour son motif spécifique de liaison à l'ADN (Haag A.F., *et al.* 2015 ; Jenul *et al.*, 2018). La plupart des souches de *S. aureus* codent pour 16 TCS différents dont l'un, WalKR, est essentiel à la survie de *S. aureus*. Ces TCS sont impliqués dans la détection de divers stimuli environnementaux tels que la concentration en nutriments, la densité cellulaire, le pH, la force ionique et les contraintes membranaires. La quantité de TCS présente contribue à la capacité de *S. aureus* à s'adapter aux divers micro-environnements qu'il rencontre au cours de son cycle de vie. Parmi eux, cinq ont été décrits

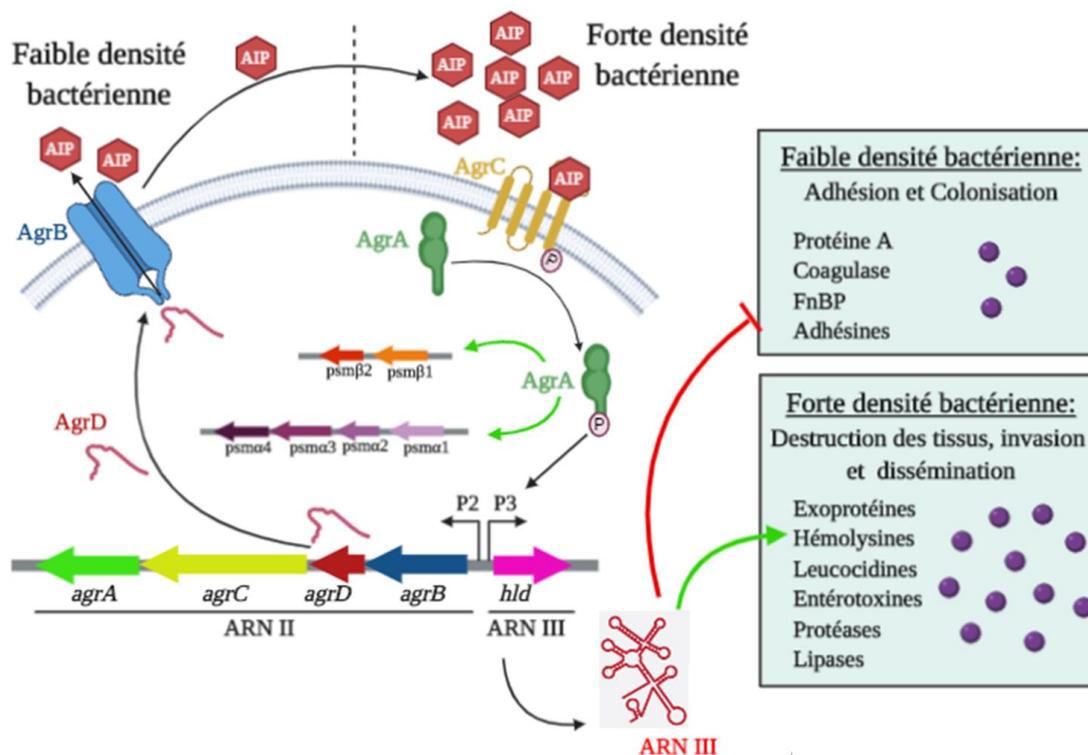
comme impliqués dans la virulence et seront développés par la suite : les systèmes Agr (le plus étudié d'entre eux), SaeRS, SrrAB, ArlRS et LytRS (Jenul *et al.*, 2018 ; Haag A.F., *et al.* 2015)

### 1- Le système Agr (régulateur de gène accessoire)

Le système Agr, a été découvert en 1986 à l'aide d'un mutant créé avec le transposon Tn551 et présentant une expression réduite des hémolysines, entre autres, et une expression accrue de la protéine A (Recsei P., *et al.*, 1986 ; Haag A.F., *et al.* 2015). C'est un TCS particulier puisqu'il représente le principal système de Quorum Sensing (QS) de *S. aureus*. Il s'agit d'un mode de signalisation bactérienne reposant sur la production, la sécrétion et la détection de petites molécules médiatrices appelées auto-inducteurs et produites en phase exponentielles de croissance dans le but de réguler l'expression des gènes. Cette régulation est ainsi corrélée à la densité de bactéries présente dans l'environnement et permet à un groupe de bactéries de coordonner l'expression de leurs gènes.

Le locus *agr*, de 3,5kb, est constitué de deux transcrits adjacents, appelés ARNII et ARNIII, dont l'expression est dirigée par les promoteurs P2 et P3 respectivement. L'ARNII est un opéron de 4 gènes, *agrBDCA*, codant le système de QS tandis que l'ARNIII est le principal effecteur régulant l'expression de la plupart des gènes *agr*-dépendant (Figure 29). AgrA et AgrC correspondent au système à deux composants alors que AgrB et AgrD permettent la synthèse du peptide auto-inducteur nécessaire au système de Quorum Sensing (Haag A.F., *et al.* 2015 ; Jenul *et al.*, 2018 ; Tan L., *et al.*, 2018). Le transcrit *agrD* code pour un peptide précurseur de 46-47 acides aminés représentant le signal extracellulaire du Quorum Sensing (QS), c'est-à-dire le peptide auto-inducteur (AIP). La forme mature de l'AIP, obtenue après une double digestion protéolytique successive, possède 7 à 9 acides aminés de long et contient un anneau de thiolactone conservé nécessaire à son activité. Le produit du gène *agrB* est une endopeptidase transmembranaire responsable de la modification de la thiolactone, du clivage de l'extrémité C-terminale ainsi que de l'export de l'AIP dans le milieu extracellulaire. Au cours de la croissance, l'AIP va ainsi s'accumuler dans le milieu extracellulaire jusqu'à atteindre un seuil de concentration lui permettant d'activer le système AgrAC (Figure 28). AgrC correspond à l'histidine kinase senseur, transmembranaire et phosphorylée par la fixation de l'AIP tandis que AgrA correspond au régulateur de réponse associé (Haag A.F., *et al.* 2015 ; Jenul *et al.*, 2018 ; Tan L., *et al.*, 2018).). Une fois activé par la phosphorylation dépendante de AgrC, AgrA se lie à la région intergénique entre les promoteur P2 et P3 par reconnaissance de 2 séquences répétées inverses (Koenig R.L., *et al.*,

2004). Ainsi, l'expression de l'ARNII, permet à *S. aureus* de produire facilement des exoprotéines, même si la croissance est ralentie. De plus, AgrA se fixe également sur les promoteur d'autres gènes afin de les activer directement, comme les PSMs  $\alpha$  et  $\beta$  (Haag A.F., *et al.* 2015 ; Jenul *et al.*, 2018 ; Tan L., *et al.*, 2018). L'ARNIII quant à lui est un ARN régulateur agissant directement ou non sur l'expression de gènes associés à la virulence et sera traité dans la partie suivante consacrée aux ARNs régulateurs. Cependant, mis à part l'AIP, de nombreux autres facteurs peuvent influencer sur l'expression du système agr. Tout d'abord, comme décrit précédemment, certains membres de la famille des facteurs de transcription Sar peuvent réguler agr, notamment SarA et MgrA (positivement) ainsi que d'autre régulateur comme CodY (négativement). Les autres système à deux composants influencent également agr notamment SaeRS et SrrAB (Yarwood J.M., *et al.*, 2003). De plus, certains facteurs environnementaux influencent également agr comme le pH acide, une forte concentration en sel, ou encore les ROS (Yarwood J.M., *et al.*, 2003 ; Haag A.F., *et al.* 2015 ; Jenul *et al.*, 2018).



**Figure 29 : Organisation génétique et expression du système de Quorum Sensing Agr (réalisée sur Biorender.com).** Le système est composé de deux transcrits adjacents l'ARN II et l'ARN III contrôlés par deux promoteurs P2 et P3 respectivement. L'ARN II est un opéron de 4 gènes *agrBDCA* dont *agrBD* constitue le système de QS et *agrCA* le système à deux composants. AgrD est un pro-AIP qui va être clivé en AIP mature et exporté dans le milieu extracellulaire par AgrB. Quand la concentration en AIP passe un seuil, il se fixe sur le senseur AgrC qui va activer le régulateur de réponse AgrA par phosphorylation. AgrA va ensuite activer les promoteurs P2 et P3 aboutissant à une amplification du système et à la transcription de l'ARN III. AgrA peut aussi activer les promoteurs des PSMs. Enfin, l'ARN III va permettre le passage de l'étape de colonisation à l'étape d'invasion en réprimant l'expression des adhésines et en activant la production de toxines et d'exotoxines.

Le système Agr est l'un des principaux régulateurs de la virulence de *S. aureus* et impacte le niveau d'expression d'une centaine de gènes. Ainsi, Dunman P.M. et ses collaborateurs ont montré par analyse de puces à ADN que le système Agr semblait réguler à la hausse l'expression de 104 et à la baisse l'expression de 34 gènes dans une cellule en fonction de la densité (Dunman P.M., *et al.*, 2001 ; Haag A.F., *et al.* 2015 ; Jenul *et al.*, 2018). La régulation positive des toxines et des exo-enzymes de dégradation ainsi que la répression des composants de surface, dépendantes du système agr, sont supposées refléter les différentes exigences temporelles de régulation des facteurs de virulence au cours d'une infection bactérienne. En effet, au début d'une infection, la densité cellulaire est faible et par conséquent une faible expression du système Agr résulte en une forte expression des composants de surface requis pour la colonisation initiale des tissus. Une fois que cette colonisation est effectuée, les bactéries vont se développer à des densités plus importantes, nécessitant des sources alimentaires supplémentaires ainsi qu'une protection accrue contre les défenses de l'hôte, ce qui est accompli par la régulation positive des toxines et des exo-enzymes de dégradation. De plus, le système Agr est impliqué dans la survie intracellulaire puisque son expression est diminuée dans les SCV mais est augmentée à la sortie du phagolysosome ou lors de la lyse de la cellule hôte (Flannagan R.S., *et al.*, 2015 ; Horn J., *et al.*, 2018). Enfin, la régulation positive des facteurs de virulence par le système Agr est nécessaire à la progression de la maladie dans plusieurs modèles animaux d'infection aiguë, comme l'endocardite infectieuse, les infections cutanées et des tissus mous, la pneumonie, l'ostéomyélite et l'arthrite septique (Yarwood J.M., *et al.*, 2003 ; Le K.Y., *et al.*, 2015 ; Jenul *et al.*, 2018).

## 2- Le système SaeRS

Le locus sae (expression des exoprotéines de *S. aureus*), codant pour le TCS SaeRS, a été identifié par Giraud A.T. et ses collaborateurs, lors de la caractérisation d'un mutant Tn551 pour son défaut dans la production d'exoprotéines (Giraud A.T., *et al.*, 1994 ; Haag A.F., *et al.*, 2015 ; Liu Q., *et al.*, 2016 ; Jenul *et al.*, 2018). L'opéron codant pour le système SaeRS contient quatre gènes, saeP, saeQ, saeR et saeS. L'expression de saeR et saeS est commandée par le promoteur constitutif P3, tandis que le promoteur P1 est auto-induit par saeRS et conduit à l'expression des quatre gènes. SaeR et SaeS sont respectivement le régulateur de la réponse et le senseur histidine kinase du système, alors que les deux autres produits géniques, SaeP (lipoprotéine putative) et SaeQ (protéine transmembranaire), sont

présents en amont de *saeRS* et sont vraisemblablement importants pour la fonctionnalité de l'opéron *sae* (Haag A.F., *et al.*, 2015 ; Liu Q., *et al.*, 2016 ; Jenul *et al.*, 2018). Outre sa régulation auto-inductrice, le système SaeRS est régulé par des signaux environnementaux et des signaux spécifiques à l'hôte. Un faible pH (5,5) ainsi qu'une forte concentration en sel (NaCl 1M) inhibent l'activité du promoteur P1. De plus, les métaux, en particulier le cuivre et le zinc, interfèrent avec la transduction du signal de SaeS à SaeR en inhibant l'activité de la kinase SaeS. En revanche, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la calprotectine et les défensines  $\alpha$  induisent le système (Cho H., *et al.* 2015 ; Haag A.F., *et al.*, 2015 ; Liu Q., *et al.*, 2016 ; Jenul *et al.*, 2018). Ce système est important pour l'expression d'un grand nombre de facteurs de virulence dont principalement des exotoxines et des adhésines. De plus, il est impliqué dans la régulation de la formation du biofilm (Haag A.F., *et al.*, 2015 ; Liu Q., *et al.*, 2016 ; Jenul *et al.*, 2018).

### 3- Le système SrrAB

Le système à deux composants SrrAB (régulateur respiratoire staphylococcique), a d'abord été décrit comme un régulateur mondial de la production de facteurs de virulence dans des conditions de faible teneur en oxygène (Yarwood J.M., *et al.*, 2001 ; Haag A.F., *et al.* 2015 ; Jenul *et al.*, 2018). Le locus *srrAB* code une histidine kinase SrrB et le régulateur de réponse apparié SrrA. Le système SrrAB a différents rôles en fonction de la concentration en oxygène. En effet, en condition aérobie, il va conférer une résistance à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ainsi qu'au stress nitrosant et augmente les niveaux de TSST-1, du système agr, de la protéine A et du régulateur *icaR*. A l'inverse, en condition anaérobie, SrrA se lie aux promoteurs *agr*, *spa*, *tsst*, *srr* et *icaR* et réprime leur transcription. Enfin, SrrAB est essentiel à la survie de *S. aureus* dans un modèle d'ostéomyélite ainsi que pour la formation de biofilms (Ulrich M., *et al.*, 2007 ; Kinkel T.L. *et al.*, 2013 ; Haag A.F., *et al.* 2015 ; Jenul *et al.*, 2018).

### 4- Le système ArlRS

Le TCS ArlRS (locus régulant l'autolyse) a d'abord été décrit comme un régulateur négatif du processus autolytique et agit comme un répresseur d'*agr* en régulant à la baisse l'expression des ARNII et ARNIII (Fournier B., *et al.*, 2000 ; Fournier B., *et al.*, 2001 ; Haag A.F., *et al.* 2015 ; Jenul *et al.*, 2018). Le TCS est composé du senseur histidine kinase ArlS et du régulateur de réponse ArlR. Le signal environnemental permettant l'activation de ce TCS est actuellement inconnu. Ce système est un répresseur de l'autolyse par inhibition de

l'hydrolyse du peptidoglycane et pourrait être impliqué dans la croissance et la division cellulaire ainsi que dans le contrôle de l'attachement de la bactérie aux surfaces. De plus, il serait un régulateur positif de l'activité protéolytique extracellulaire, en particulier de l'activité des sérine protéases (Fournier B., *et al.*, 2001 ; Haag A.F., *et al.* 2015 ; Jenul *et al.*, 2018). Enfin, une étude du transcriptome de la souche délétée pour ce TCS a permis de mettre en évidence que plus de 100 gènes seraient régulés, directement ou indirectement par ce système. Pour réguler ces gènes, ArlRS pourrait notamment interagir avec d'autres régulateurs globaux comme Agr, Rot ou encore MgrA (Liang X., *et al.*, 2005).

### 5- Le système LytRS

Le TCS LytRS a été identifié en 1996 et, comme ArlRS, il est impliqué dans l'autolyse de la paroi (Brunskill E.W., *et al.* 1996). LytS est le senseur et LytR le régulateur de réponse et ces deux gènes sont co-transcrits (Haag A.F., *et al.* 2015). LytRS régule positivement l'expression des gènes *lrgA* et *lrgB*, localisés immédiatement en aval, entraînant l'inhibition de l'activité hydrolase du peptidoglycane. Cela a pour conséquence de diminuer la résistance des bactéries aux pénicillines (Haag A.F., *et al.* 2015). Le système LytRS a également été mis en évidence pour jouer un rôle dans le développement des biofilms. En effet, il est suggéré que la régulation des IrgAB et donc l'autolyse de la bactérie conduirait à la libération d'ADN génomique, qui deviendrait alors un composant structurel important de la matrice du biofilm (Sharma- Kuinkel B.K., *et al.*, 2009 ; Haag A.F., *et al.* 2015).

### 6- Le système WalKR

Le système à deux composants WalKR, le seul qui soit essentiel à la survie de *S. aureus*, est composé de WalK, le senseur du système et de WalR son régulateur de réponse apparenté. Ce TCS est très bien conservé et semble être spécifique aux bactéries à Gram positif possédant un faible pourcentage GC. WalR se lie à une séquence de reconnaissance consensuelle trouvée en amont de 13 gènes de *S. aureus* dont cinq sont impliqués dans la virulence (Dubrac S., *et al.*, 2004 ; Haag A.F., *et al.* 2015). De plus, WalRK contrôle positivement l'activité autolytique, et en particulier celle des deux principales autolysines de *S. aureus*, Atl et LytM. De plus, le rôle régulateur de WalRK sur le renouvellement de la paroi cellulaire et l'autolyse a un effet positif sur la formation de biofilms (Dubrac S., *et al.*, 2007 ; Haag A.F., *et al.* 2015). Il a également été montré que la substitution d'un seul nucléotide au

sein de Walk ou de WalR entraînait une co-résistance à la vancomycine et à la daptomycine et provoquent l'épaississement typique de la paroi cellulaire observé chez les isolats cliniques résistants (Howden B.P., *et al.*, 2011 ; Haag A.F., *et al.* 2015). WalkR est également capable de réguler positivement 24 gènes de virulence en modifiant ou en induisant l'expression du TCS SaeRS. Ces gènes codent pour des protéines d'interaction et de dégradation de la matrice de l'hôte, pour des toxines et pour des molécules d'évasion de la réponse immunitaire innée (Delaune A., *et al.*, 2012 ; Haag A.F., *et al.* 2015).

**Tableau 1 : Récapitulatifs des différents systèmes à deux composants impliqués dans la virulence de *S. aureus*.** QS = Quorum Sensing TCS = Système à deux composants

Stimulis environnementaux	Fonction(s)	Cibles ou processus régulés	Références
<b>AgrBDCA : Régulateur de gènes accessoires</b>			
- <b>Densité bactérienne</b> <b>agrBD : QS</b> <b>agrAC : TCS</b>	- Transition Colonisation / infection - Survie intracellulaire - Infections (cutanées + tissus mous / endocardites / pneumonies / arthrites septiques / ostéomyélites)	 ≈ 100 gènes dont des toxines et enzymes de dégradation  ≈ 34 gènes dont des composants de la surface bactérienne	Recsei P., <i>et al.</i> , 1986 Dunman P.M., <i>et al.</i> , 2001 Yarwood J.M., <i>et al.</i> , 2003 Koenig R.L., <i>et al.</i> , 2004 Le K.Y., <i>et al.</i> , 2015 Haag A.F., <i>et al.</i> 2015 Jenul <i>et al.</i> , 2018 Tan L., <i>et al.</i> , 2018
<b>SaeRS : Expression des exoprotéines de <i>S. aureus</i></b>			
- <b>Auto-régulation</b> - <b>pH acide (5,5)</b> - <b>Forte concentration en sel (NaCl 1M)</b> - <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, calprotectine et AMP</b> <b>SaeRS : TCS</b> <b>SaeP : lipoprotéine</b> <b>SaeQ : protéine transmembraniare</b>	- Adhésion - Évasion du système immunitaire - Virulence - Formation de biofilms	 exotoxines et adhésines	Giraud A.T., <i>et al.</i> , 1994 Haag A.F., <i>et al.</i> 2015 Cho H., <i>et al.</i> 2015 Liu Q., <i>et al.</i> , 2016 Jenul <i>et al.</i> , 2018
<b>SrrAB : Régulateur respiratoire staphylococcique</b>			
- <b>Disponibilité en O<sub>2</sub></b>	<b>Aérobie</b> : Résistance H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> et stress nitrosant <b>Anaérobie</b> : Formation de biofilm Infections (ostéomyélites)	<b>Aérobie</b> :  Agr, TSST-1, SpA et icaR <b>Anaérobie</b> :  <i>agr, tsst, spa, srr</i> et <i>icaR</i>	Ulrich M., <i>et al.</i> , 2007 Kinkel T.L. <i>et al.</i> , 2013 Haag A.F., <i>et al.</i> 2015 Jenul <i>et al.</i> , 2018

ArlRS : locus régulant l'autolyse			
<b>Inconnu</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Régulation de l'autolyse</li> <li>- Virulence</li> <li>- Croissance bactérienne</li> <li>- Division cellulaire</li> <li>- Attachement des bactéries sur les surfaces</li> </ul>	<p>≈ 100 gènes</p> <p>⊕ MgrA</p> <p>⊖ Toxines, protéases, lipases, SpA, agr</p>	<p>Fournier B., <i>et al.</i>, 2000</p> <p>Fournier B., <i>et al.</i>, 2001</p> <p>Liang X., <i>et al.</i>, 2005</p> <p>Haag A.F., <i>et al.</i> 2015</p> <p>Jenul <i>et al.</i>, 2018</p>
LytRS			
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Régulation de l'autolyse</li> <li>- Diminution de la résistance à la pénicilline</li> <li>- Favorise la formation du biofilm</li> </ul>	<p>⊕ <i>IrgA</i> et <i>IrgB</i></p>	<p>Brunskill E.W., <i>et al.</i> 1996</p> <p>Sharma- Kuinkel B.K., <i>et al.</i>, 2009</p> <p>Haag A.F., <i>et al.</i> 2015</p>
WalKR			
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Seul TCS essentiel à la survie de <i>S. aureus</i></li> <li>- Régulation de l'autolyse</li> <li>- Renouvellement de la paroi bactérienne</li> <li>- Favorise la formation du biofilm</li> </ul>	<p>⊕ directement 13 gènes dont <i>atl</i> et <i>lytM</i></p> <p>⊕ indirectement 24 gènes (via SaeRS) dont des protéines d'interaction et de dégradation, des toxines et des molécules d'évasion du système immunitaire</p>	<p>Dubrac S., <i>et al.</i>, 2004</p> <p>Dubrac S., <i>et al.</i>, 2007</p> <p>Howden B.P., <i>et al.</i>, 2011</p> <p>Delaune A., <i>et al.</i>, 2012</p> <p>Haag A.F., <i>et al.</i> 2015</p>

Jusqu'au début des années 2000, ces régulateurs interagissant principalement avec l'ADN afin de jouer sur la transcription des gènes étaient majoritairement étudiés. Cependant, avec l'avènement du séquençage à haut débit, une nouvelle classe de régulateurs, les Acides Ribonucléiques (ARN) régulateurs, a été identifié.

## C/ Cas particulier des ARNs régulateurs : des régulateurs à multiples facettes

### 1- Généralités

Dans le monde de la biologie, il existe trois principaux types d'ARNs « classiques »: les ARNs messagers (ARNm), les ARNs de transfert (ARNt) et les ARNs ribosomiaux (ARNr). Les ARNm sont traduits en protéines, alors que les ARNt et les ARNr ont des rôles lors de la traduction de cet ARNm. Les ARNt et les ARNr ont la particularité d'être non codants, c'est-à-dire qu'ils ne possèdent pas les informations nécessaires à la synthèse d'une protéine. Cependant, un autre type d'ARN non codant a pu être mis en évidence, il s'agit des ARNs régulateurs (ARNrég). Comme leur nom l'indique, ces ARNrég existent dans le but de permettre à la bactérie de réguler l'expression de ces gènes afin de pouvoir s'adapter à son environnement.

Historiquement, le premier ARNrég à avoir été identifié est l'ARN 6S de *E. coli* (Hindley J., 1967), bien que son rôle dans la séquestration de la sous-unité  $\sigma 70$  de l'ARN polymérase n'a été mis en évidence que plus tardivement (Wassarman K.M., *et al.*, 2000 ; Bronsard J., 2019). La découverte de cet ARN a été suivie par celle de Spot42 chez *E. coli*, le premier ARN interagissant avec un ARNm, *galK*, par appariement de bases et jouant un rôle dans le métabolisme central (Ikemura T., *et al.*, 1973 ; Bækkedal C., *et al.*, 2015 ; Bronsard J., 2019). On recensera également au début des années 1980, la découverte de l'ARNI (Stougaard P., *et al.*, 1981 ; Tomizawa J., *et al.*, 1981 ; Bronsard J., 2019), le premier découvert chez *S. aureus* (Novick R.P., *et al.*, 1989) ainsi que celle de MicF en 1984 (Mizuno T., *et al.*, 1984 ; Bronsard J., 2019). Actuellement, 575 ARNrég ont été identifiés chez *S. aureus*, dont 159 validés expérimentalement et regroupés au sein d'une base de données, appelée SRD, sous une dénomination commune « Srn » (Sassi M., *et al.*, 2015). Cependant, peu d'entre eux ont une fonction connue et peuvent véritablement être qualifiés de « régulateurs ».

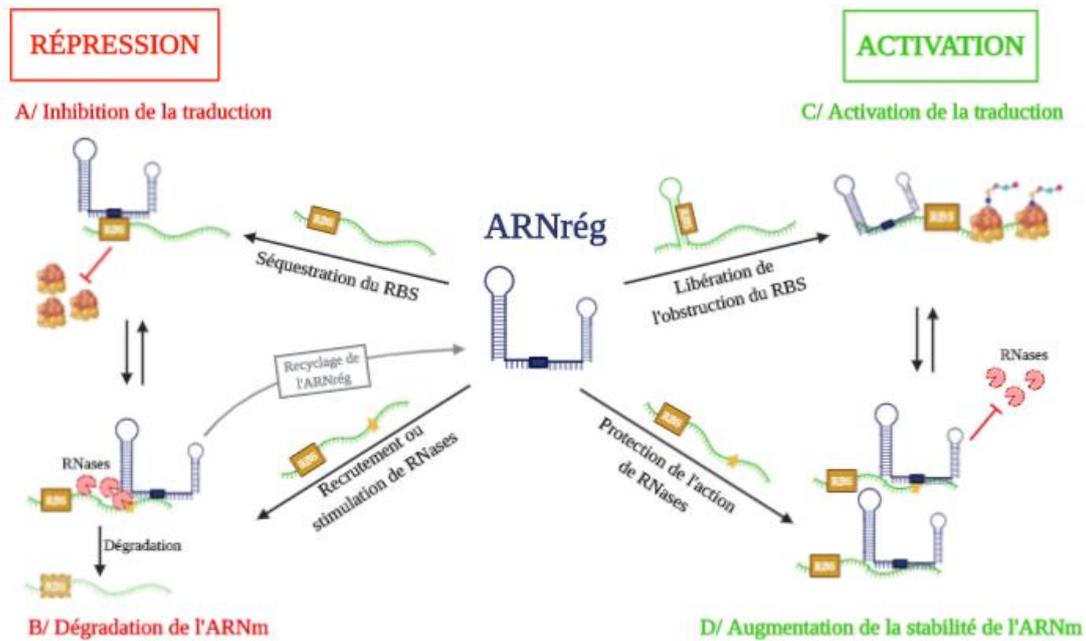
L'étude de ces ARNrég a permis de mettre en évidence plusieurs caractéristiques communes. Tout d'abord ce sont généralement de petites molécules d'ARN de 50 à 500 nucléotides, même si certains peuvent atteindre 700 à 3500 nucléotides (Georg J., *et al.*, 2011). Ils sont connus pour être très structurés, avec notamment plusieurs tiges boucles, et sont plus stables que les ARNm. Ils sont généralement non codants, même s'il existe des

exceptions comme l'ARNIII, codant pour l'hémolysine  $\delta$ , et sont localisés dans les régions intergéniques. Chez les bactéries à Gram négatif, l'intervention d'une protéine chaperonne est parfois nécessaire pour favoriser l'interaction entre l'ARNrég et sa cible. La première à avoir été identifiée est la protéine Hfq chez *E. coli* (Franze de Fernandez M.T., *et al.*, 1968; Moller T., *et al.*, 2002) et on peut également citer les protéines FinO et ProQ (Westermann A.J., *et al.*, 2018). Les mécanismes par lesquels fonctionnent ces petits ARNs régulateurs comprennent en grande majorité, la liaison à des cibles ARNm et la modification de leurs stabilités ou de leurs traductions. Cependant, ils peuvent également se lier à des cibles protéiques et ainsi modifier leurs fonctions.

## 2- Différents mécanismes d'actions des ARNs régulateurs

### a) ARNs régulateurs interagissant avec d'autres ARNs

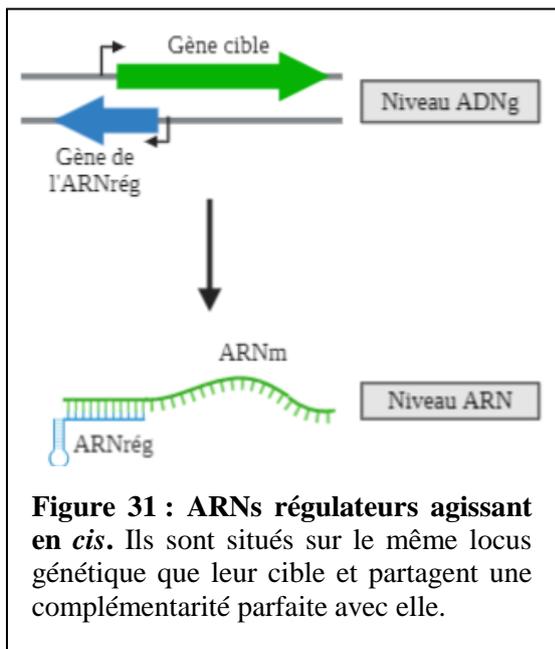
Les ARNs régulateurs s'appariant aux ARNm sont les ARNrég les plus caractérisés actuellement et sont divisés en deux sous-classes, les ARN *cis*- ou *trans*-régulateurs (Waters L.S., *et al.*, 2009 ; Svensson S.L., *et al.*, 2016). Ces ARNrég agissent par appariement de bases et peuvent avoir un effet positif ou négatif sur l'expression des gènes en modulant la traduction et / ou la stabilité de l'ARNm (Figure 30). En effet, la fixation de l'ARNrég sur ou à proximité du site de fixation du ribosome (RBS) de l'ARNm prévient la reconnaissance par le ribosome et donc la traduction ultérieure de cet ARNm (Bouloc P., *et al.*, 2011). Cependant, certains ARNm possèdent naturellement une région d'initiation de la traduction avec une structure secondaire séquestrant le RBS ce qui empêche le ribosome de se fixer et donc de traduire cet ARNm. Dans ce cas, la fixation de l'ARNrég, va permettre une modification de la structure secondaire de l'ARNm, libérant ainsi le RBS pour permettre l'initiation de la traduction (Bouloc P., *et al.*, 2011). Lorsqu'un ARNm est traduit activement, l'action successive des ribosomes protège l'ARN contre la dégradation et le recyclage dus à l'action des ribonucléases (RNase) comme la RNase E ou la RNase III. Ainsi, la fixation de l'ARNrég, en empêchant la liaison des ribosomes, va mettre à nu l'ARN qui pourra être soumis à l'action de la RNase E et être dégradé. De plus, la fixation de l'ARNrég crée une zone bicaténaire sensible à l'action de la RNase III, clivant spécifiquement au moins 75% des ARNm (Lasa I., *et al.*, 2011). Enfin, un ARNrég peut se fixer sur son ARNm cible et ainsi prévenir la dégradation par les RNases, stabilisant ainsi l'ARNm (Bouloc P., *et al.*, 2011).



**Figure 30 : Mécanismes d'action des ARNs régulateurs exerçant une action directe sur leurs cibles ARNm (adaptée de Svensson S.L., et al., 2016 ; réalisée sur Biorender.com).** (A) Les ARNrég peuvent inhiber la traduction par appariement de bases au niveau du RBS de leur ARNm cible. (B) De plus ils peuvent induire la dégradation de l'ARNm en recrutant ou stimulant l'action des RNases. (C) Les ARNrég peuvent également activer la traduction en favorisant l'accessibilité du RBS initialement masqué ou (D) augmenter la stabilité de l'ARNm en le préservant de l'action des RNases.

### i. ARNrég agissant en *cis*

Ils sont codés sur le même locus génétique que leur ARNm cible mais sur le brin antisens à celui-ci. C'est pourquoi ils partagent une complémentarité complète et souvent



**Figure 31 : ARNs régulateurs agissant en *cis*.** Ils sont situés sur le même locus génétique que leur cible et partagent une complémentarité parfaite avec elle.

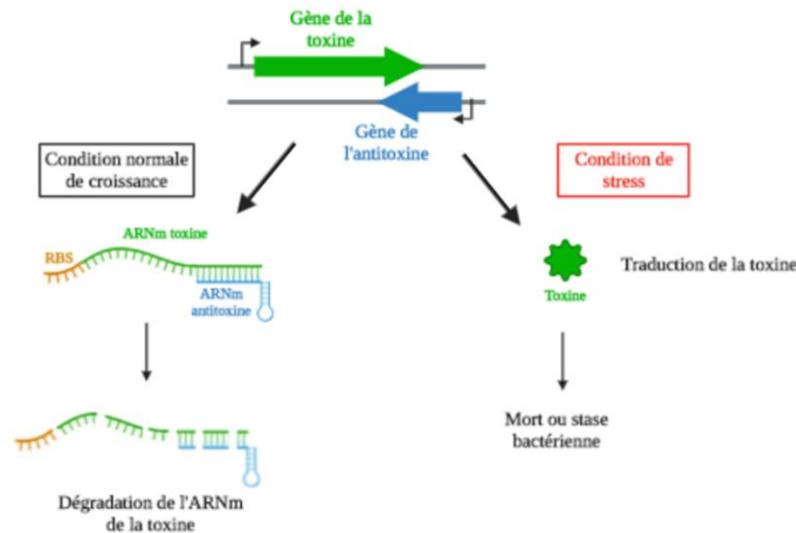
étendue (>75 nucléotides) avec leur cible (Figure 31). Pour les quelques cas où cela a été examiné, l'interaction initiale entre l'ARNrég et l'ARNm cible implique un appariement limité, bien que le duplex va être étendu ultérieurement. Les exemples les plus étudiés d'ARNrég codés en *cis* résident sur des plasmides ou sur d'autres éléments génétiques mobiles, comme les transposons ou les bactériophages, mais des versions chromosomiques sont également actives (Waters L.S., et al., 2009 ; Thomason M.K., et al., 2010 ; Svensson S.L., et al., 2016 ;

Westermann A.J., et al., 2018). Ils contrôlent ainsi le maintien et la stabilité des éléments génétiques mobiles en jouant, par exemple, sur l'inhibition de la maturation des amorces (pour

l'ARNI du plasmide ColE1 par exemple), sur l'atténuation transcriptionnelle (pour l'ARNIII et l'ARNm *rep* par exemple), sur la répression traductionnelle (exemple de FinP et de l'ARNm *traj*) ou encore sur l'induction de la dégradation ou du clivage des ARN (Svensson S.L., *et al.*, 2016 ; Westermann A.J., *et al.*, 2018).

➤ Systèmes toxine-antitoxine :

De nombreux ARN codés en *cis* sont des composants de systèmes toxine-antitoxine (TA) de type I (Waters L.S., *et al.*, 2009 ; Brantl S., *et al.*, 2015 ; Svensson S.L., *et al.*, 2016 ; Westermann A.J., *et al.*, 2018). Ce sont des éléments à deux gènes composés d'une toxine protéique stable (moins de 60 acides aminés) et d'une antitoxine ARN instable codée en *cis*, s'appariant avec l'ARNm de la toxine, inhibant ainsi sa traduction et entraînant sa dégradation (Figure 32) (Waters L.S., *et al.*, 2009 ; Brantl S., *et al.*, 2015 ; Svensson S.L., *et al.*, 2016). Alors que les systèmes TA de type I se sont avérés être impliqués initialement dans la stabilité et le maintien des plasmides, un nombre croissant de loci TA ont depuis été identifiés dans les chromosomes de nombreuses bactéries, y compris des agents pathogènes (Fozo E.M., *et al.*, 2010 ; Svensson S.L., *et al.*, 2016). La fonction de ces systèmes TA codés par les chromosomes reste énigmatique, mais ils peuvent servir de médiateurs pour l'adaptation du métabolisme lié au stress, la formation de cellules persistantes ou la résistance aux antibiotiques (Svensson S.L., *et al.*, 2016 ; Westermann A.J., *et al.*, 2018). TisB par exemple, est un peptide toxique induit par le système SOS, interagissant avec la membrane, dont il a été montré l'implication dans la formation de cellules persistantes, pouvant augmenter ainsi la résistance intrinsèque aux antibiotiques des populations bactériennes (Wagner E.G., *et al.*, 2012 ; Svensson S.L., *et al.*, 2016). Son antitoxine ARN, IstR, agit en séquestrant le site de liaison au ribosome sur l'ARNm de la toxine TisB, empêchant ainsi sa traduction (Darfeuille F., *et al.*, 2007 ; Svensson S.L., *et al.*, 2016).

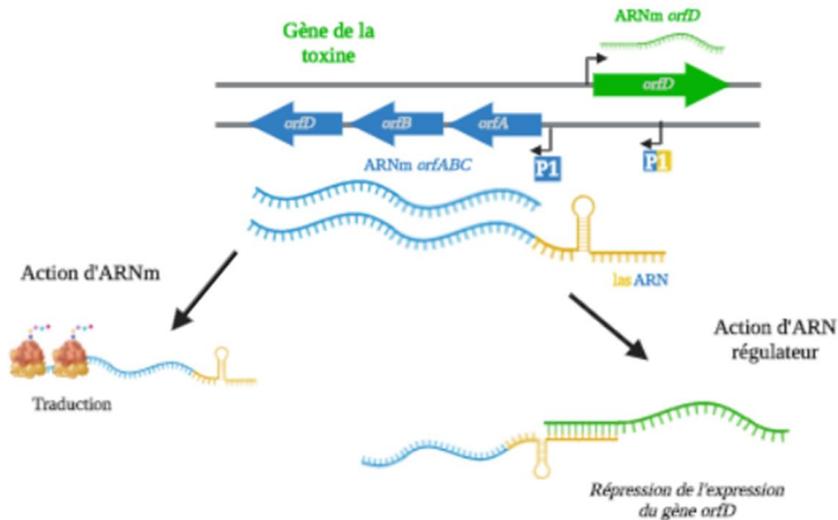


**Figure 32 : Organisation génétique et mécanisme d'action d'un système toxine-antitoxine de type I (adaptée de Brantl S., *et al.*, 2015).** Les systèmes toxine-antitoxine sont composés d'une antitoxine de type ARN qui vient dégrader l'ARNm de la toxine en condition normale de croissance. Cependant, en condition de stress, l'absence de dégradation de l'ARNm de la toxine conduit à sa traduction et à la mort ou à la stase bactérienne.

➤ Excludon :

Les études transcriptomiques de *Listeria spp.* ont permis l'identification d'une nouvelle classe d'espèces d'ARNrég exceptionnellement longs codés en *cis*, appelés long ARN antisens (lasARN) (Figure 33), et d'un nouveau concept de riborégulation, l'excludon (Sesto N., *et al.*, 2013 ; Svensson S.L., *et al.*, 2016 ; Westermann A.J., *et al.*, 2018). Les lasARN ont la particularité d'englober plusieurs cadres ouverts de lecture (ORF) et de s'étendre sur des gènes adjacents ayant des orientations divergentes, les définissant comme un groupe de transcrits avec un modèle de régulation unique (Sesto N., *et al.*, 2013). Ces gènes codés de manière divergente ont des fonctions apparentées ou, souvent, opposées. La transcription de ces lasARN est initiée par un promoteur situé en face d'une ORF spécifique, générant un produit antisens qui chevauche cet ORF. Cependant, la transcription ne se termine pas à l'extrémité du gène chevauchant, mais s'étend plus loin à travers le gène voisin orienté de manière divergente. Cela signifie que ce lasARN a une double fonction : (i) il agit comme un régulateur antisens d'une ORF ou d'un opéron et (ii) il possède la séquence 5'UTR et la séquence codante de l'ORF ou de l'opéron divergent adjacent. En d'autres termes, la composante antisens du lasARN va affecter négativement l'expression d'un gène, tandis que sa partie distale va fonctionner comme un ARNm et contribuer positivement à l'expression de l'ORF ou de l'opéron divergent adjacent (Figure ; Sesto N., *et al.*, 2013). Ainsi, une seule

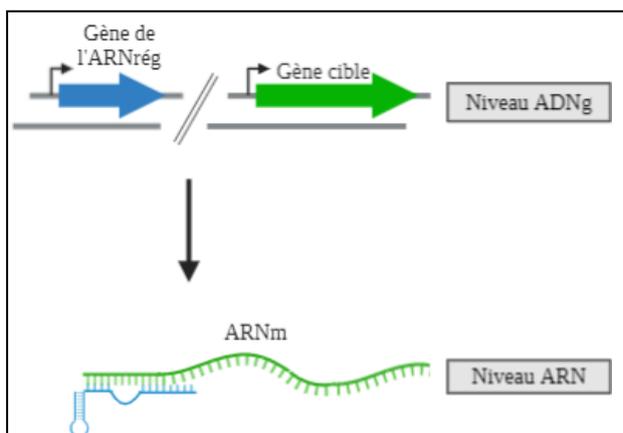
transcription régit l'expression mutuellement exclusive de deux gènes adjacents ayant des fonctions opposées. Cette organisation unique, garantissant que l'expression d'un des gènes entraîne la répression de l'autre, a été définie par le terme "excludon" (Sesto N., *et al.*, 2013).



**Figure 33 : Représentation du locus et du mécanisme d'action d'un excludon (adaptée de Sesto N., *et al.*, 2013).** Un excludon est généralement constitué de gènes orientés de manière divergente, chevauchés par un long ARN antisens (lasARN). Ce lasARN peut agir soit comme un régulateur négatif pour les gènes codés sur le brin opposé, soit être utilisé comme ARNm pour les gènes codés sur le même brin.

## ii. ARNrég agissant en *trans*

Les autres ARNrég agissant par appariement de bases sont les ARNrég codés en *trans*,



**Figure 34 : ARNs régulateurs agissant en *trans*.** Ils sont situés sur des loci génétiques éloignés de leur cible et ne partagent qu'une complémentarité limitée avec elle.

caractérisés par une localisation sur des loci génétiques éloignés de leurs cibles (Figure 34). De plus, contrairement à ceux codés en *cis*, ils ne partagent qu'une complémentarité limitée avec leurs ARNm cibles et interagissent généralement dans la région 5' de leur cible (Waters L.S., *et al.*, 2009 ; Svensson S.L., *et al.*, 2016 ; Westermann A.J., *et al.*, 2018). De plus, il s'agit de contacts rapides et de hautes affinités, par quelques nucléotides (parfois

seulement 6 ou 7) exposés dans les régions tige-boucle du régulateur, de la cible, ou des deux.

Du fait de cet appariement limité, la présence de la protéine chaperonne Hfq accroît la

probabilité d'une interaction productive entre l'ARNrég et sa cible (Waters L.S., *et al.*, 2009 ; Bouloc P., *et al.*, 2011 ; Svensson S.L., *et al.*, 2016).

La majorité de la régulation par les ARNrég codé en *trans* connue est négative. En effet, pour les quelques interactions ARNrég-ARNm caractérisées, l'inhibition de la liaison des ribosomes est le principal facteur contribuant à la réduction des niveaux de protéines, tandis que la dégradation ultérieure du duplex ARNrég-ARNm est censée augmenter la robustesse de la répression et rendre la régulation irréversible (Waters L.S., *et al.*, 2009). Pour les ARNrég codés en *trans*, il existe peu ou pas de corrélation entre la localisation chromosomique du gène de l'ARNrég et le gène cible de l'ARNm. Chaque ARNrég codé en *trans* peut réaliser des appariements de bases avec de multiples ARNm cibles. Cela est dû au fait que les ARNrég codés en *trans* nouent des contacts plus limités avec leurs ARNm cibles, en plaques discontinues, comme pour les microARN eucaryotes (Shabalina S.A., *et al.*, 2008 ; Waters L.S., *et al.*, 2009 ; Krol J., *et al.*, 2010 ; Svensson S.L., *et al.*, 2016). De plus, un ARNm peut également être ciblé par plusieurs ARNrég différents. Ainsi, un ARNrég peut moduler globalement une réponse physiologique particulière, de la même manière qu'un facteur de transcription, mais au niveau post-transcriptionnel (Waters L.S., *et al.*, 2009 ; Svensson S.L., *et al.*, 2016)

### **b) ARNs régulateurs interagissant avec des protéines**

Alors que les ARNrég codés en *cis* et en *trans* décrits ci-dessus agissent par des appariements de bases avec leurs cibles ARNm, certains ARNrég interagissent plutôt avec les protéines pour moduler leur activité (Pichon C., *et al.*, 2007). Pour cela, ils vont imiter et ainsi concurrencer les cibles ARN ou ADN naturelles de ces protéines. Chez les bactéries, deux familles d'ARNs régulateurs agissant en imitant d'autres acides nucléiques ont été caractérisées plus largement. La première, illustrée par (i) l'ARN 6S d'*E. coli*, imite un complexe ouvert du promoteur et interagit avec l'ARN polymérase. La seconde, (ii) les ARNs régulateurs CsrB et CsrC, régulent les protéines CsrA (régulateur du stockage du carbone), en entrant en compétition avec les cibles ARNm de CsrA.

### *i.* L'ARN 6S

L'ARN 6S, qui est un ARN très bien conservé et abondant, permet de moduler l'activité des protéines et peut également affecter la survie des pathogènes. Il a été montré que l'ARN 6S d'*E. coli* est une épingle à cheveux d'ARN double brin mimant structurellement un promoteur ouvert lors de l'initiation de la traduction. Cette structure lui permet de se lier étroitement à l'ARN polymérase contenant le facteur  $\sigma 70$  et d'inhiber ainsi l'activité de cette ARN polymérase *in vitro* (Barrick J.E., *et al.*, 2005 ; Wassarman K.M., *et al.*, 2006 ; Waters L.S., *et al.*, 2009 ; Svensson S.L., *et al.*, 2016 ; Westermann A.J., *et al.*, 2018). *In vivo*, lorsque l'ARN 6S est abondant, c'est-à-dire en phase stationnaire de croissance où il passe de 1000 à 10 000 copies, il peut se complexer avec l'ARN polymérase par liaison au  $\sigma 70$ , mais n'est pas capable de s'associer à l'ARN polymérase de la phase stationnaire par liaison à son facteur  $\sigma S$ . Cette interaction entre l'ARN 6S et l'holoenzyme  $\sigma 70$  inhibe la transcription de certains promoteurs  $\sigma 70$ -dépendant et régule ainsi négativement la transcription de nombreux gènes de ménage. Cela permet également d'augmenter la transcription de certains promoteurs  $\sigma S$ -dépendant, permettant ainsi l'expression préférentielle de gènes utiles en phase stationnaire (Barrick J.E., *et al.*, 2005 ; Wassarman K.M., *et al.*, 2006 ; Waters L.S., *et al.*, 2009 ; Svensson S.L., *et al.*, 2016). Ce mécanisme va permettre une meilleure adaptation de la bactérie à la phase stationnaire de croissance ainsi qu'aux différents stress environnementaux. Un autre élément prouvant que l'ARN 6S est capable d'imiter l'ADN est fournie par la découverte selon laquelle, à la fois *in vitro* et *in vivo*, l'ARN polymérase est capable de synthétiser un court transcrit de 14 à 20 nucléotides (ARN<sub>p</sub>) codé par cet ARN 6S. Il semblerait que la transcription de l'ARN 6S lorsque la concentration en nucléotides triphosphate (NTP) augmente peut être un moyen de libérer l'ARN polymérase  $\sigma 70$ -dépendant mais il n'y a aucune information sur une fonction propre de ce transcrit ARN<sub>p</sub> (Barrick J.E., *et al.*, 2005 ; Wassarman K.M., *et al.*, 2006 ; Waters L.S., *et al.*, 2009 ; Svensson S.L., *et al.*, 2016).

### *ii.* Les ARN<sub>rég</sub> CsrB et CsrC

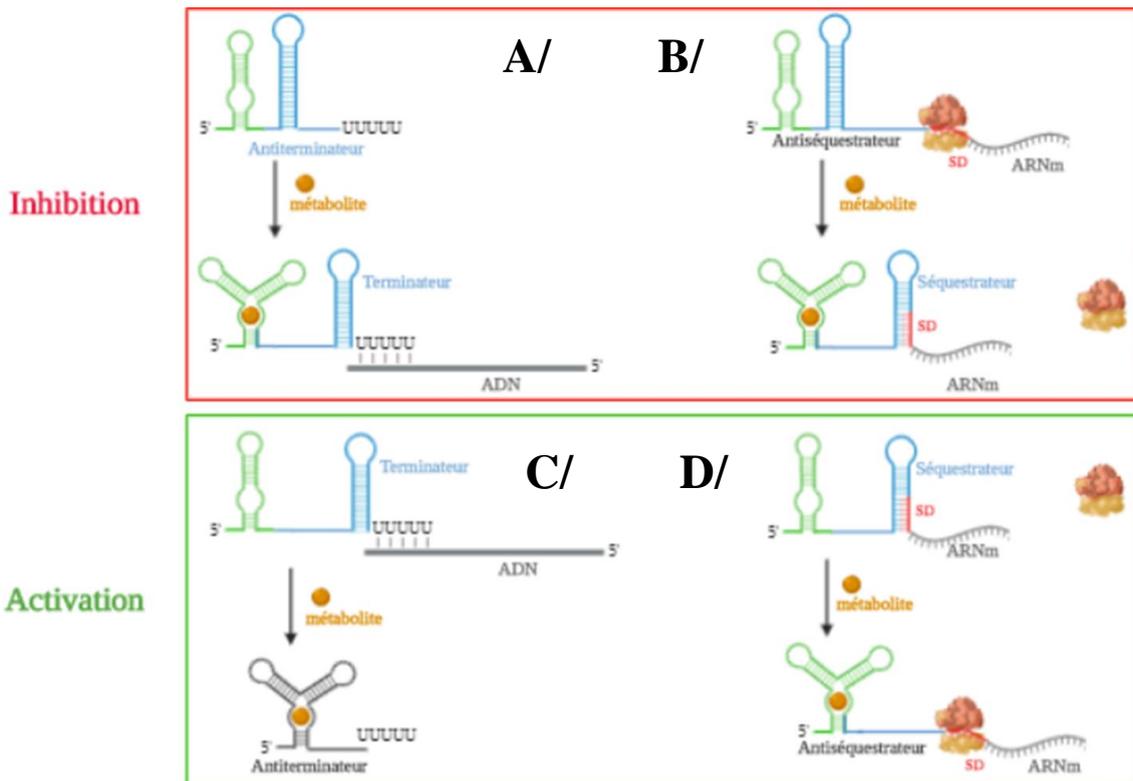
La deuxième famille d'ARN<sub>rég</sub> interagissant avec des protéines sont les ARN<sub>rég</sub> CsrB et CsrC qui agissent en contrecarrant les activités de la petite protéine CsrA (également appelée RsmA chez d'autres bactéries comme *P. aeruginosa*) (Svensson S.L., *et al.*, 2016 ; Westermann A.J., *et al.*, 2018). Cette protéine se lie à l'ARN<sub>m</sub> régulant l'utilisation du carbone et la motilité bactérienne lors de l'entrée en phase stationnaire ou lors de carences en nutriments (Babitzke P., *et al.*, 2007 ; Waters L.S., *et al.*, 2009 ; Svensson S.L., *et al.*, 2016 ;

Westermann A.J., *et al.*, 2018). La plupart des régulations par CsrA étudiées sont des régulations négatives, dans lesquelles la protéine, sous forme dimérique, inhibe la traduction des ARNm. Cette inhibition se fait généralement par liaison à proximité ou au niveau de leur RBS, bloquant ainsi la liaison du ribosome. Il a été montré que la protéine CsrA a une préférence de liaison pour le motif GGA dans la boucle en épingle à cheveux de l'extrémité 5'UTR des ARNm cibles (Waters L.S., *et al.*, 2009 ; Svensson S.L., *et al.*, 2016 ; Westermann A.J., *et al.*, 2018). Bien que l'expression des protéines CsrA puisse être modifiée par les conditions environnementales, la majeure partie de cette régulation semble être faite via l'inhibition par les ARNrég CsrB et CsrC. Ces deux ARNrég contiennent de nombreux motifs GGA (22 et 13 respectivement), spécifiques à CsrA. Ainsi, lorsque le niveau de ces ARNrég augmentent, ils vont séquestrer efficacement la protéine CsrA loin de l'ARNm cible permettant ainsi le rétablissement de la fixation du ribosome et donc de la traduction de l'ARNm cible en protéine (Waters L.S., *et al.*, 2009 ; Svensson S.L., *et al.*, 2016 ; Westermann A.J., *et al.*, 2018).

### c) Riboswitchs

Les riboswitchs naturels représentent une nouvelle classe d'éléments de régulation génétique agissant au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. Typiquement, les riboswitchs sont des éléments de contrôle génétique constitués de deux domaines :

- un domaine de détection (aptamère) qui se lie à une molécule ligand provoquant une modification de la conformation d'une plate-forme d'expression adjacente.
- un domaine de régulation (plate-forme d'expression) qui convertit la liaison du ligand en un changement dans l'expression des gènes par adoption d'une structure d'ARN alternatif (Tucker B.J., *et al.* 2005).



**Figure 35 : Mécanismes de régulation de l'expression des gènes par les riboswitchs (adaptée de Nudler E., *et al.*, 2004 et Breaker R.R., 2012).** Les riboswitchs, en réponse au changement de concentration en métabolite se fixant à l'aptamère, peuvent jouer sur la terminaison de la transcription en modulant la formation de terminateur de transcription (A) et (C). Ils peuvent également intervenir dans l'initiation de la traduction en modulant l'accessibilité des sites de fixation du ribosome (SD) (B) et (D).

La plate-forme d'expression de chaque riboswitch bactérien est généralement située en aval de l'aptamère, où elle évalue l'état de liaison du ligand sur l'aptamère et régule, en conséquence, l'expression génique. L'alternance de structures pliantes est commune pour l'ARN, et les différences de plis peuvent être exploitées pour influencer plusieurs processus différents qui contribuent à l'efficacité de l'expression des gènes. C'est pourquoi, les plates-formes d'expression ont tendance à être beaucoup moins conservées à travers l'évolution par rapport aux domaines aptamères (Breaker R.R., 2007 ; Breaker R.R., *et al.*, 2012). Les membres de toutes les classes de riboswitchs expérimentalement validés peuvent se lier à leur ligand cible sans nécessiter de facteurs protéiques. C'est-à-dire que l'ARN seul est suffisant pour effectuer la reconnaissance et le contrôle des actions moléculaires d'un gène, sans l'assistance obligatoire des facteurs protéiques (Breaker R.R., 2007 ; Breaker R.R., *et al.*, 2012). L'un des mécanismes les plus communs utilisés par les riboswitchs bactériens implique

la modulation de la terminaison de la transcription (Figure 35) par formation d'un terminateur (bloquant la polymérase) ou d'un anti-terminateur. De plus, les riboswitchs peuvent contrôler l'accès des ribosomes à leur site de fixation (Figure 35), en le séquestrant ou le rendant accessible, régulant ainsi l'initiation de traduction (Breaker R.R., 2007 ; Breaker R.R., *et al.*, 2012).

### 3- ARNs régulateurs de *S. aureus*

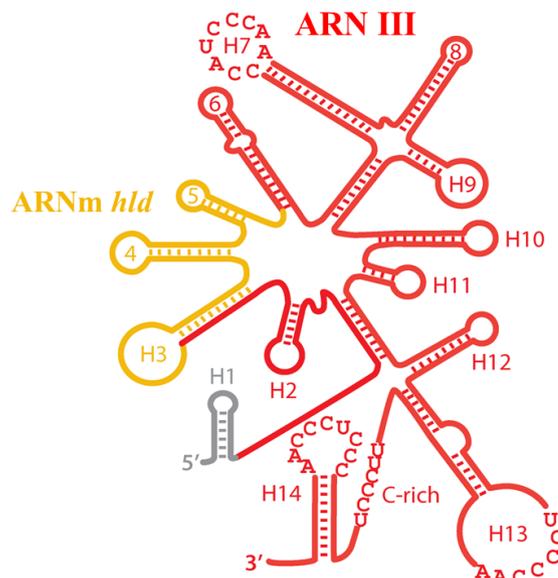
Chez *S. aureus*, de nombreux ARNs régulateurs ont pu être identifiés au cours des dernières années même si peu d'entre eux ont une fonction connue. Parmi les ARN<sup>rég</sup> identifiés, on retrouve l'ARNI qui est le premier à avoir été découvert chez *S. aureus* (Novick R.P., *et al.*, 1989) ainsi que l'ARNIII qui a pu être identifié peu de temps après et qui est, à ce jour, le mieux étudié (Novick R.P., *et al.*, 1993). Il existe également deux familles d'ARNs ayant été découvertes, les Rsa comprenant 32 membres (Geissmann T., *et al.*, 2009 ; Marchais A., *et al.*, 2009 ; Bohn C., *et al.*, 2010 ) et les Spr qui sont aux nombres de 7 (Pichon C. *et al.*, 2005).

#### a) L'ARNI

L'ARNI est le premier ARN régulateur à avoir été découvert chez *S. aureus* (Novick R.P., *et al.*, 1989). Il s'agit d'un ARN<sup>rég</sup>, présent sur le plasmide pT181, qui régule l'expression de la protéine RepC en formant un terminateur de transcription. L'ARN<sup>m</sup> *repC* peut potentiellement adopter deux conformations distinctes en présence ou en absence de l'ARNI. Tout d'abord, en absence de l'ARNI le transcrit naissant de *repC* se forme dans une conformation permettant la transcription de tout l'ARN<sup>m</sup> et conduisant donc ensuite à la traduction de la protéine. Cependant, en présence de l'ARNI, celui-ci se lie à une structure tige boucle transitoire formée durant la transcription. Le complexe ainsi formé modifie ensuite le processus de repliement de l'ARN<sup>m</sup> pendant la transcription, de sorte qu'une structure terminatrice Rho-indépendante est stabilisée juste en amont du codon d'initiation, entraînant une interruption prématurée de la transcription. De plus, cette structure tige boucle séquestre également la séquence Shine-Dalgarno de *repC*, ce qui pourrait bloquer l'accès du ribosome (Novick R.P., *et al.*, 1989 ; Romilly C., *et al.*, 2012).

### b) L'ARNIII: un ARN à double fonction

L'ARNIII est l'un des premier ARN régulateur identifiés chez *S. aureus* (Novick R.P., *et al.*, 1993) et sûrement le plus étudié. Il s'agit également d'un des plus grand identifiés, avec un taille de 514 nucléotides, il est extrêmement structuré avec 14 tiges-boucles (Figure 36) mises en évidence par l'utilisation de sondes chimiques et enzymatiques (Benito Y., *et al.*, 2000). Il a rapidement été défini comme la molécule effectrice du système Agr (Novick R.P., *et al.*, 1993). Les tiges-boucles 7, 13 et 14 possèdent un motif consensus riche en cytosines, facilitant les interactions avec le RBS riche en guanines de ses ARNm cibles (Boisset S. *et al.*, 2007). De plus, la tige-boucle 1 permet la stabilité de l'ARNIII.



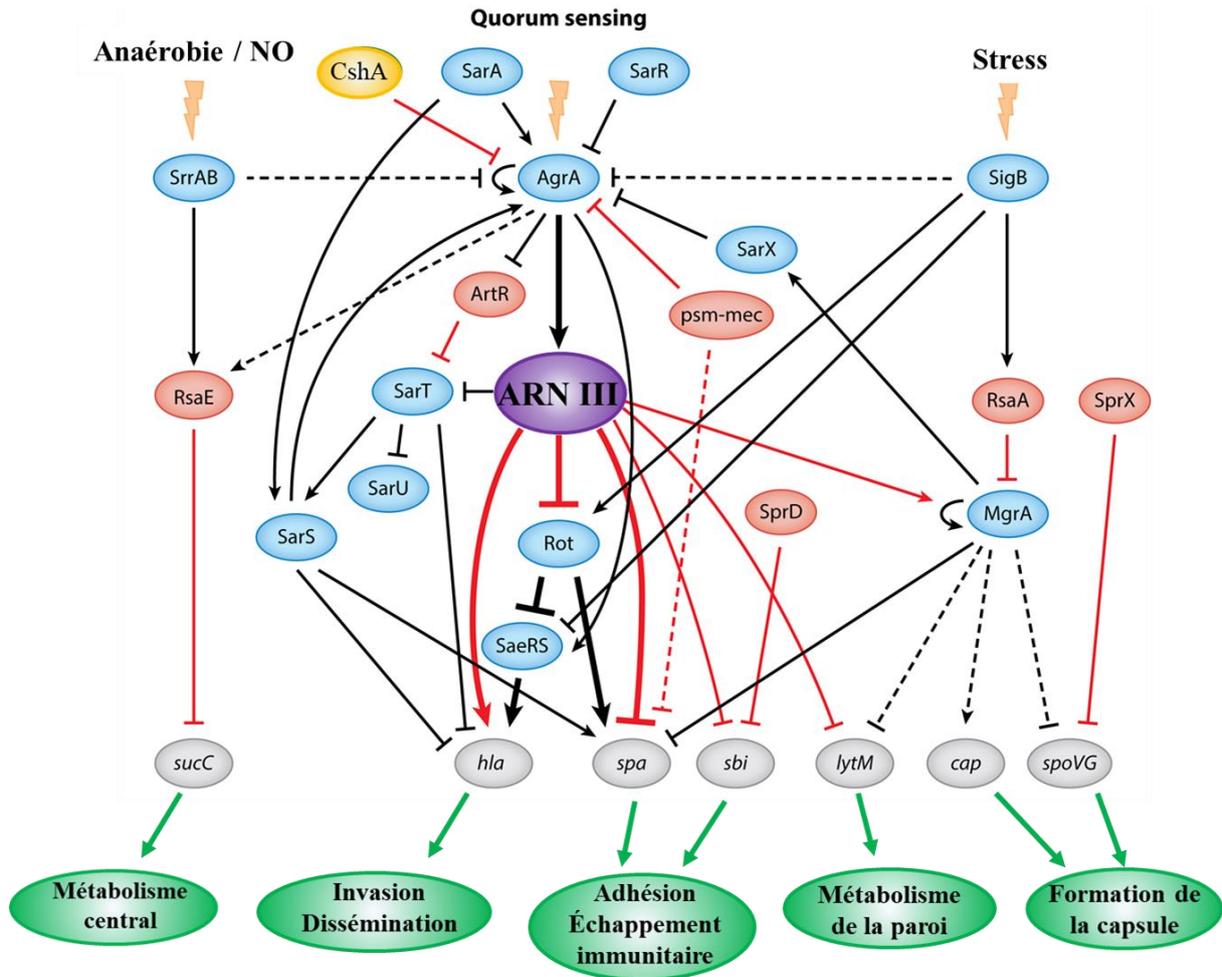
**Figure 36 : Représentation schématique de la structure de l'ARN III (adaptée de Bronesky D., *et al.*, 2016).** L'ARN III a une taille de 514 nucléotides et comprend 14 tiges-boucles. La tige-boucle 1 stabilise l'ARN, les tiges-boucles 3, 4 et 5 (en jaune) codent pour l'hémolysine  $\delta$  et les tiges-boucles 7, 13 et 14 possèdent le motif consensus riche en cytosine facilitant l'interaction avec ses cibles.

L'ARNIII, produit à la fin de la phase exponentielle de croissance, est responsable de la répression de la synthèse des gènes de virulence précoces et des protéines de surface (qui sont nécessaires lors d'une infection précoce) et de l'augmentation de la production des facteurs sécrétés et des toxines (qui sont nécessaires pour une infection tardive) (Novick R.P., *et al.*, 1993 ; Raina M., *et al.*, 2018). Presque tous les isolats cliniques de *S. aureus* provenant d'infections aiguës expriment l'ARNIII, ce qui souligne son importance en tant que régulateur central de la virulence. De manière générale, les tiges-boucles de la région 5'UTR de l'ARNIII sont impliquées dans l'activation des cibles tandis que les tiges-boucles de la région 3' sont

impliquées dans la répression des cibles, même si il existe des exceptions (Broneski D., *et al.*, 2016).

- Répression des cibles : Les appariements de bases de l'ARNIII avec ses cibles vont bloquer la liaison des ribosomes, empêchant ainsi l'initiation de la traduction et, dans certain cas, faciliter la dégradation de l'ARNm par la RNase III. Grâce à ce mécanisme, l'ARNIII réprime la synthèse de cibles multiples, ayant toutes une implication dans les premiers stades de l'infection. Ces cibles comprennent notamment les ARNm de la protéine de surface A (*spa*), de la coagulase (*coa*), de la protéine de liaison au fibrinogène (*sa1000*), des homologues de l'antigène sécrétoire staphylococcique SsaA (*sa2353* et *sa2093*), de la protéine de liaison aux immunoglobulines (*sbi*), de la synthase de l'acide lipoteichoïque (*ltaS*) et de l'autolysine de la paroi cellulaire principale (*lytM*). L'ARNIII réprime également une autre cible importante, l'ARNm *rot*, codant pour le facteur de transcription Rot (répresseur de toxines). Grâce à cette régulation de Rot, l'ARNIII est capable de contrôler indirectement la transcription de nombreuses cibles supplémentaires (Broneski D., *et al.*, 2016 ; Raina M., *et al.*, 2018).
  
- Activation des cibles : En plus de la répression de cibles, l'ARNIII est également capable d'activer 3 cibles : l'hémolysine  $\alpha$ , la protéine d'adhérence extracellulaire Map et le régulateur transcriptionnel MgrA. L'interaction de l'ARNIII avec la région 5'UTR de *hla* ou de *Map* libère la séquence Shine-Dalgarno favorisant ainsi le recrutement du ribosome et l'initiation de la traduction (Liu Y., *et al.*, 2011 ; Broneski D., *et al.*, 2016 ; Raina M., *et al.*, 2018). Plus récemment, il a été démontré que les extrémités 3' et 5' de l'ARNIII interagissent toutes deux avec le 5' UTR de l'ARN *mgrA*, prévenant ainsi l'ARNm contre la dégradation par une ribonucléase inconnue (Gupta R.K., *et al.*, 2015 ; Broneski D., *et al.*, 2016 ; Raina M., *et al.*, 2018). Bien que MgrA soit transcrit à partir de deux promoteurs, l'ARNIII ne stabilise que le plus grand transcrit et module l'expression de plusieurs gènes dépendants du MgrA. (Broneski D., *et al.*, 2016 ; Raina M., *et al.*, 2018).

L'ARNIII, grâce à son action régulatrice sur de multiples cibles de manière directe ou indirecte via Rot et MgrA, deux autres régulateurs globaux de l'expression des gènes, nous démontre son importance dans le processus infectieux de *S. aureus* (Figure 37). De plus, cela nous montre le niveau de complexité dans la régulation des gènes que la bactérie a su mettre en place afin de s'adapter.



**Figure 37 : Réseau de régulations impliquant les facteurs de virulence autour de l'ARN III chez *S. aureus* (adaptée de Bronesky D., et al., 2016).** Ce schéma ne comprend qu'une partie du réseau complexe de régulation de la virulence de *S. aureus*. L'ARN III est en violet, les régulateurs transcriptionnels protéiques sont en bleu, les ARN<sub>rég</sub> sont en rouge, l'hélicase CshA est en orange et les ARNm cibles sont en gris. Les lignes noires représentent des régulations au niveau transcriptionnel tandis que les lignes rouges correspondent à des régulations post-transcriptionnelles. Les lignes continues indiquent les régulations directes et celles en pointillées les régulations indirectes. Les effets aux niveaux des différents processus physiologiques sont ajoutés en vert.

En outre, l'ARNIII n'est pas uniquement un régulateur de l'expression des gènes puisqu'il a la particularité de posséder un cadre ouvert de lecture. Ce cadre ouvert de lecture est localisé au niveau des tiges-boucles 3, 4 et 5 de l'ARNIII et lui permet d'exprimer l'hémolysine  $\delta$ . Il est intéressant de noter que la traduction de *hld* est retardée d'une heure après la synthèse de l'ARNIII, et que ce retard est éliminé en supprimant la région 3'UTR (Balaban N., et al., 1995). Ces données suggèrent l'implication d'un facteur intermédiaire inconnu, agissant en *trans* et contrôlant la traduction de *hld* pendant la phase de croissance.

### c) La famille des ARNs régulateurs Rsa

La famille des ARNs régulateurs Rsa (ARN de *Staphylococcus aureus*) comprend 32 membres (Tableau 2) dont la plupart ont pu être identifiés grâce à des approches *in silico*. Ces identifications sont le fruit de trois études réalisées presque simultanément (Geissmann T., *et al.*, 2009 ; Marchais A., *et al.*, 2009 ; Bohn C., *et al.*, 2010). Tout d'abord, Marchais A. et ses collaborateurs ont étudié 422 génomes de façon bio-informatique et sortie une liste de 48 candidats potentiels. Parmi ces candidats, 24 ont été prédits dans des régions intergéniques et ont été testés expérimentalement aboutissant à la validation de 7 d'entre eux par Northern blot. Ils ont ensuite été nommés RsaOA à RsaOG pour « ARN de *S. aureus* Orsay (Marchais A., *et al.*, 2009). Geissmann T. et ses collaborateurs, après des approches *in silico*, ont quant à eux prédit 36 candidats dont 11 ont pu être validés expérimentalement par Northern blot. Ces 11 nouveaux ARNs ont été appelés RsaA à RsaK (Geissmann T., *et al.*, 2009).

Enfin, en 2010, Bohn C. et ses collaborateurs, contrairement aux deux autres équipes, ont utilisé une approche expérimentale basée sur l'étude transcriptomique après pyroséquençage d'une banque d'ADNs complémentaires (Bohn C., *et al.*, 2010). Les ARNs étudiés ont été extraits à partir de la souche N315 cultivée dans 6 conditions expérimentales différentes : tout d'abord dans un milieu riche (BHI) à trois différents temps de croissance (exponentielle, post-exponentielle et stationnaire) mais également après application de différents stress pendant 2 heures (NaCl 1,5M pour le stress osmotique, 45°C pour le stress thermique et 10mM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour le stress oxydatif) (Bohn C., *et al.*, 2010). Cette approche leur a permis d'identifier 30 ARN<sub>reg</sub> potentiels dont certains étaient déjà connus comme les six Spr (SprA, B, C, D, F et G) ou encore certains gènes de ménage (4.5S, ARN<sub>tm</sub>, RNase P, 6S). De plus, une vérification par Northern blot a également abouti à la validation de 14 d'entre eux, appelés RsaOH à RsaOW. Cependant, trois d'entre eux, RsaOI, RsaOK et RsaON, avaient déjà été identifiés par l'étude de Geissmann T. et de ses collaborateurs, respectivement RsaA, RsaH et RsaE (Geissmann T., *et al.*, 2009).

**Tableau 2 : Récapitulatif des différents ARNs Rsa découverts.**

	Nombre d'ARNs prédits	Nombre d'ARNs validés	Dénominations
<b>Marchais A., et al., 2009</b>	24 ARNs dans des régions intergéniques (422 génomes utilisés)	7 ARNs par Northern blot	RsaOA / RsaOB / RsaOC / RsaOD / RsaOE / RsaOF / RsaOG
<b>Geissmann T., et al., 2009</b>	36 ARNs dans des régions intergéniques (4 génomes utilisés)	11 ARNs par Northern blot	RsaA / RsaB / RsaC / RsaD / RsaE / RsaF / RsaG / RsaH / RsaI / RsaJ / RsaK
<b>Bohn C., et al., 2009</b>	30 ARNs après étude transcriptomique comparant 6 conditions expérimentales	14 ARNs par Northern blot	RsaOH / RsaOI / RsaOJ (= RsaA) / RsaOK (= RsaH) / RsaOL / RsaON (RsaE) / RsaOO / RsaOP / RsaOR / RsaOS / RsaOT / RsaOU / RsaV / RsaW

- RsaA : un ARNrég de 138 nucléotides, a été identifié par Geissmann T. et ses collaborateurs en 2009 (Geissmann T., et al., 2009). L'étude ultérieure de cet ARN a permis de montrer un motif consensus de fixation au promoteur  $\sigma$ B suggérant une régulation de RsaA par ce facteur en condition de stress (Romilly C., et al., 2014). De plus, il a été montré que RsaA, grâce à son motif UCCC conservé, se fixait au RBS de l'ARNm *mgrA* afin de réprimer sa traduction. De plus, il a également été montré que RsaA, via sa tige-boucle H1, interagissait avec la région codante de *mgrA*. Ces deux interactions sont essentielles à la régulation. L'inhibition de ce régulateur global aboutit à l'amélioration de la production de biofilms ainsi qu'à la diminution de la production de capsules entraînant ainsi une diminution de la protection contre la phagocytose dépendante de l'opsonisation (Geissmann T., et al., 2009). Des études sur deux modèles animaux (infection sur cathéter et bactériémie) ont permis de montrer une atténuation de la sévérité de ces infections par RsaA. RsaA est donc le premier ARNrég à montrer un effet anti-virulent suggérant une fonction favorisant un comportement de commensalisme de la bactérie dans le but d'éviter le système immunitaire de l'hôte (Romilly C., et al., 2014).

Afin d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes infectieux liés à cet ARN, une recherche de cibles a été mise en place à l'aide de la technique du MAPS (Purification par affinité avec MS2 couplée au séquençage ARN) (Saïd N., et al. 2009 ;

Lalaouna D., *et al.*, 2015 ; Tomasini A., *et al.*, 2017). Il s'agit d'une technique permettant d'identifier de manière globale les partenaires ARNs d'un appât dans une condition donnée. Les résultats de cette étude ont tout d'abord montré que la principale cible de RsaA est *mgrA*, ce qui concorde avec les études précédentes (Geissmann T., *et al.*, 2009 ; Tomasini A., *et al.*, 2017). De plus, cette étude a également permis de mettre en évidence d'autres cibles réprimées par RsaA, notamment *flipR* ainsi que quatre ARNm appartenant à la famille des enzymes SsaA (*ssaA2\_3*, *ssaA2\_4*, *ssaA2\_2* et *ssaA\_2*) (Tomasini A., *et al.*, 2017). La protéine sécrétée FLIPr intervient dans la défense de *S. aureus* contre le système immunitaire de l'hôte en interférant avec l'opsonisation via le complément et/ou les IgG. Encore une fois cela concorde avec les résultats précédents. Les enzymes SsaA quant à elles sont des endopeptidases impliquées dans le métabolisme du peptidoglycane, régulées notamment par le système à deux composants WalKR (Tomasini A., *et al.*, 2017).

En parallèle de ce MAPS, Tomasini A. et ses collaborateurs ont également réalisé une analyse protéomique comparative entre la souche sauvage et la souche délétée pour le gène *rsaA*. Outre la variation de MgrA et SsaA2\_3, dont l'interaction entre RsaA et leur ARNm respectif a été montrée par MAPS, cette étude a permis de montrer l'inhibition de plusieurs protéines de surface par RsaA. On retrouve notamment les protéines de la matrice extracellulaire EbH\_1 et 3, la protéine A, la protéine de surface SasG, les protéines StrC et D, l'amidase LytN et le facteur ClfB. L'ARNm de ces protéines n'ayant pas été identifié par MAPS, et l'absence de prédiction *in silico* de zone d'interaction leur a permis de suggérer une régulation indirecte de ces protéines par RsaA aboutissant à une favorisation de la formation de biofilm (Tomasini A., *et al.*, 2017). L'ensemble des données actuelles sur RsaA nous montre l'importance de cet ARN régulateur dans la virulence de *S. aureus* à travers un réseau complexe de régulations directes et indirectes.

- RsaC : est un ARN régulateur particulièrement grand dont la taille varie entre les souches. En effet, il possède une partie 3' conservée de 544 nucléotides mais sa partie 3', elle, est composée d'une variation de domaines répétés de 133 nucléotides. Ainsi, RsaC fait 850 nucléotides dans la souche Newman, 984 dans la souche MW2 et 1116 chez HG001 (Lalaouna D., *et al.*, 2019). Pour étudier RsaC, Lalaouna D. et ses collaborateurs ont réalisé la technique du MAPS afin d'identifier les cibles de cet ARNrég. La principale cible identifiée est *sodA*, codant pour une superoxyde dismutase impliquée dans la réponse

aux stress oxydatifs. De plus, d'autres cibles sont également impliquées dans la réponse au stress oxydant comme *sarA* et *rex* (Lalaouna D., *et al.*, 2019). Ils ont ensuite pu montrer que RsaC inhibait, via son domaine 3' conservé, la traduction de *sodA* par interaction avec le RBS. Cette interaction rend la bactérie plus sensible à la production de ROS ainsi qu'aux attaques des cellules immunitaires (Lalaouna D., *et al.*, 2019). De plus, RsaC est fortement exprimé en condition de carence en manganèse, associé à une diminution drastique de SodA, montrant que RsaC exerce ses fonctions dans des conditions physiologiques spécifiques (Lalaouna D., *et al.*, 2019). Chez *S. aureus*, en cas de perte de fonction de SodA, SodM prend le relais, ce qui a été confirmé en condition de carence en manganèse et de surexpression de RsaC. De plus, RsaC est co-transcrit avec le transporteur MntABC et ainsi réprimé en présence de manganèse ce qui concorde avec les effets précédents (Lalaouna D., *et al.*, 2019). Enfin, RsaC se fixe également à l'ARNm *sarA in vitro* et inhiberait donc sa traduction par fixation au niveau de la séquence Shine-Dalgarno. SarA étant un répresseur transcriptionnel de SodM, cela accentuerait les effets de RsaC sur l'activation de l'expression de cette dernière (Lalaouna D., *et al.*, 2019). Toutes ces données nous montrent le rôle de RsaC, interconnectant la biodisponibilité en manganèse et la détoxification en ROS, suggérant un rôle dans la résistance au burst oxydatif des cellules immunitaires via SodM.

- RsaE: est un ARNrég de 96 nucléotides particulièrement bien conservé chez les *Staphylococcaceae* et les *Bacillaceae* (Geissmann T., *et al.*, 2009). Après son identification, Geissmann T. et ses collaborateurs ont réalisé des analyses transcriptomiques et protéomiques pour aller plus loin dans sa caractérisation. Ainsi, de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme central et notamment le transport et le métabolisme des acides aminés, le métabolisme des lipides, le transport et le métabolisme des co-enzymes, le métabolisme des glucides et la production d'énergie (Geissmann T., *et al.*, 2009) sont régulés par RsaE. Parmi ces gènes, plusieurs sont fortement réprimés par RsaE comme les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de la succinyl-CoA synthase (impliquée dans le cycle de Krebs), la protéine bi-fonctionnelle FOLD et la tétrahydrofolate-formate ligase Fhs (impliquée dans la biosynthèse des folates) (Geissmann T., *et al.*, 2009 ; Bohn C., *et al.*, 2010). De plus, ils ont pu mettre en évidence que l'expression de RsaE était dépendante d'un des membres du système agr, à savoir AgrA (Geissmann T., *et al.*, 2009 ; Bohn C., *et al.*, 2010).

En 2015, une autre étude portant initialement sur l'homologue de RsaE chez *Bacillus subtilis*, RoxS, a permis de montrer que l'expression de RsaE était induite par la présence de monoxyde d'azote (NO). Cette régulation passe par le système à deux composants SrrAB (Durand S., *et al.*, 2015).

Plus récemment, en 2018, une étude combinant différentes approches a pu identifier des nouvelles cibles de RsaE impliquées dans le catabolisme de l'arginine (Rochat T., *et al.*, 2018). On peut notamment citer *rokF*, codant pour une arginase, réprimé de manière directe par RsaE. Ces données vont dans le même sens que les précédentes études suggérant un rôle de RsaE dans l'adaptation de la bactérie à différente condition de carence (Geissmann T., *et al.*, 2009 ; Bohn C., *et al.*, 2010 ; Rochat T., *et al.*, 2018).

Enfin, en 2019, une étude a montré une implication de RsaE dans la production de la matrice du biofilm ainsi que dans le contrôle de la mort cellulaire chez *S. epidermidis* (Schoenfelder S.M.K., *et al.*, 2019). Ainsi, RsaE est impliqué dans la synthèse de PIA dans le biofilm par l'intermédiaire de sa régulation négative de IcaR engendrant la dérepression de l'opéron *icaADBC*. De plus, RsaE favorise la lyse bactérienne en ciblant l'ARNm *IrgA* par fixation au RBS, diminuant ainsi sa traduction et donc son activité.

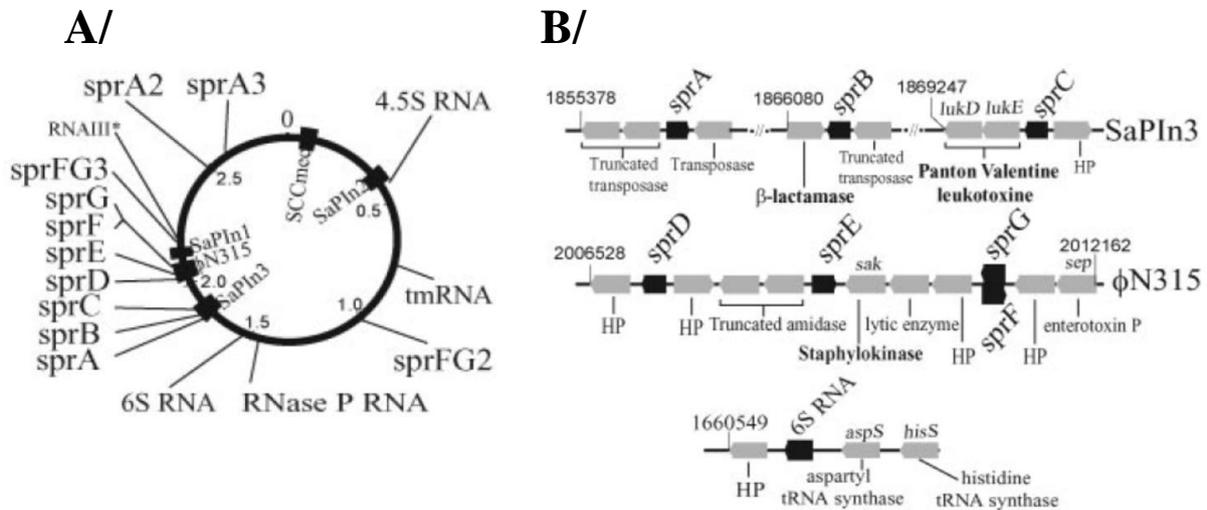
- **RsaI** : est un ARN régulateur de 144 nucléotides dont l'expression est réprimée au niveau transcriptionnel par CcpA en présence de glucose (Bronsky D., *et al.*, 2019). Bronsky D. et ses collaborateurs ont réalisé la technique du MAPS afin d'identifier les cibles directes de RsaI et ainsi mieux comprendre ses fonctions. Ils ont pu montrer que RsaI interagissait avec *glvU\_2*, une perméase du glucose, et *fn3K*, la kinase 3 du fructosamine pour les réprimer au niveau traductionnel (Bronsky D., *et al.*, 2019). Il est également intéressant de noter que plusieurs autres ARNs de la famille des Rsa (RsaD, RsaE et RsaG) ont pu être enrichis via leur fixation à RsaI lors de ce MAPS (Bronsky D., *et al.*, 2019). RsaG est également impliqué dans la voie d'utilisation préférentielle des sources carbonées puisqu'il est surexprimé en présence de glucose-6-phosphate. Cependant rien n'indique une régulation de RsaG sur les cibles de RsaI, ni si RsaI régule les fonctions de RsaG (Bronsky D., *et al.*, 2019). De plus une étude du transcriptome d'une souche surexprimant RsaI a pu montrer une induction du système à deux composants SrrAB, induisant à son tour des gènes requis pour le métabolisme anaérobie, des gènes de

biosynthèse des cytochromes (qoxABCD), des gènes de biosynthèse de l'hème et des gènes impliqués dans la détoxification des RNS (Bronsky D., *et al.*, 2019). Cela suggère une implication de RsaI dans l'adaptation métabolique à l'environnement immunitaire de l'hôte. Enfin, ils ont également montré que RsaI activait la synthèse de l'exopolysaccharide PIA-PNAG par diminution de la traduction de *icaR*, le répresseur transcriptionnel de l'opéron *icaADBC* (Bronsky D., *et al.*, 2019). Bien que les mécanismes soit inconnus, il est suggéré que RsaI inhiberait la traduction de *icaR* en stabilisant la circularisation de l'ARNm et/ou en s'opposant à la liaison d'un facteur d'activation de la traduction de l'ARNm.

Pour conclure, RsaI est un ARN régulateur jouant un rôle dans l'adaptation du métabolisme des bactéries afin de survivre après échappement aux cellules immunitaires de l'hôte ainsi que dans la formation du biofilm.

#### **d) La famille des ARNs régulateurs Spr**

En 2005, Pichon C. et ses collaborateurs, au sein de mon laboratoire d'accueil, se sont lancés dans la recherche de nouveaux ARNs régulateurs de *S. aureus*. Pour cela ils ont développé une approche basée sur des prédictions *in silico* associées à des vérifications expérimentales (Pichon C. *et al.*, 2005). Ils se sont tous d'abord focalisés sur l'analyse des régions intergéniques de la souche Mu50 en sélectionnant les régions conservées parmi 31 génomes. Puis ils ont affiné leurs résultats en s'intéressant aux régions riches en AT et possédant un pourcentage GC supérieur à 35%. Cette approche leur a permis de sortir une liste de 191 candidats potentiels. Puis expérimentalement, leur expression a tout d'abord été analysée par microarray avant d'être confirmée par Northern blot (Pichon C. *et al.*, 2005). Au final, ce travail a abouti à l'identification de 12 ARNs régulateurs dont 7 nouveaux appelés SprA à SprG (ARNs des petits îlots de pathogénie) (Figure 38 ; Pichon C. *et al.*, 2005) qui font l'objet d'études au sein du laboratoire. En effet, leur présence sur des îlots de pathogénie suggère qu'ils jouent un rôle potentiel dans la virulence de *S. aureus* puisque ces îlots sont d'anciens éléments mobiles et ont la particularité de regrouper de nombreux gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques. A ce jour, une fonction est connue pour chacun d'entre eux, excepté pour SprB. De plus, SprE s'est avéré ne pas être un ARN rég mais un fragment d'ARN ribosomique.



**Figure 38 : Localisation génétique des Spr présents au sein de différents îlots de pathogénie (Pichon C., *et al.*, 2005).** (A) Représentation schématique du génome de *S. aureus* N315 composé de trois îlots de pathogénie (SaPI-1, SaPI-2 et SaPI-3), de la cassette SSCmec et du bactériophage  $\phi$ N315. On retrouve indiqué la répartition des différents Spr. (B) Environnement génétique des Spr, les gènes impliqués dans la résistance ou les fonctions de résistances aux antibiotiques sont indiqués en gras. HP = Protéine Hypothétique.

- SprA/SprA<sub>AS</sub>: L'étude de SprA a révélée qu'il s'agit en fait d'un système toxine antitoxine de type I, composé d'une toxine stable de 31 acides aminée, PepA1 (codée par SprA1) et d'une antitoxine instable SprA1<sub>AS</sub> localisée sur le brin opposé (Sayed N., *et al.*, 2012a). PepA1 est une toxine possédant des activités hémolytiques et antibactériennes (Sayed N., *et al.*, 2012b). Récemment, une deuxième copie de ce système a été identifiée, le système SprA2/SprA2<sub>AS</sub>, avec un mécanisme d'action similaire et une activité principalement cytolytique (Germain-Amiot N., *et al.*, 2019). La comparaison des deux toxines PepA1 et PepA2 a montré un effet toxique 10 fois plus important de PepA2 sur les érythrocytes humains suggérant un effet de ce système dans la virulence de *S. aureus* (Germain-Amiot N., *et al.*, 2019).
- SprC: est un ARN rég de 147 nucléotides dont il a été montré, comme pour RsaA, un effet d'atténuation de la virulence dans un modèle murin d'infections (Le Pabic H., *et al.*, 2015). En effet, la souche délétée de SprC est plus virulente dans ce modèle que la souche sauvage. De plus, une autre fonction a pu être lui être associée puisque ce mutant de délétion est également plus internalisé par les monocytes THP1 et par les THP1

différenciés en macrophages. Après une étude protéomique comparative entre ce mutant et la souche parentale, une cible de SprC a pu être mise en évidence, la protéine autolysine. Ainsi, l'ARN régulateur, en inhibant directement la traduction de l'autolysine, diminuerait l'internalisation des bactéries par les cellules immunitaires (Le Pabic H., *et al.*, 2015). De plus, le mutant de délétion de *sprC* montre une meilleure tolérance face au stress oxydant lié à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pouvant expliquer une meilleure résistance lors de l'internalisation par les cellules immunitaires (Le Pabic H., *et al.*, 2015).

En 2017, Zhao H. et ses collaborateurs ont réalisé une étude protéomique comparative entre une souche délétée pour SprC et la souche parentale N315 (Zhao T., *et al.*, 2017). Cette étude a permis d'identifier 44 protéines dont l'expression est modifiée de manière directe ou indirecte par SprC. Ces protéines seraient principalement impliquées dans des processus métaboliques et cellulaires ainsi que dans des régulations cellulaires (Zhao T., *et al.*, 2017).

Enfin, une autre étude s'est intéressée plus particulièrement à la régulation de l'expression de SprC (Mauro T., *et al.*, 2016). Ils ont ainsi pu mettre en évidence que le facteur de transcription SarA inhibait la transcription de SprC ainsi que d'un autre ARN régulateur, Srn\_9340 (Mauro T., *et al.*, 2016).

- SprD : est un ARN régulateur de 142 nucléotides impliqué dans la virulence de *S. aureus* puisqu'il a pu être mis en évidence que l'expression de SprD permettait une infection efficace dans un modèle murin (Chabelskaya S., *et al.*, 2010). En effet, contrairement à la souche parentale N315 qui provoquait des abcès rénaux et la mort des souris, le mutant de délétion entraînait une absence de mortalité des souris (Chabelskaya S., *et al.*, 2010). Afin de mieux comprendre cet effet virulent, une étude protéomique par électrophorèse bidimensionnelle quantitative (2D-DIGE) entre la souche parentale et le mutant de délétion a été réalisée. Cela a permis d'identifier la protéine Sbi, une protéine impliquée dans les mécanismes d'évasion immunitaire, comme cible de SprD. Par la suite, des études *in vitro* ont permis de montrer que SprD inhibait la traduction de l'ARNm *sbi* par fixation au niveau de son RBS. Cependant, cette inhibition de Sbi n'explique pas à elle seule l'effet virulent de SprD. C'est pourquoi les études ont été poursuivies et ont permis de montrer en 2014 que Sbi était également réprimée par un autre ARN régulateur, l'ARNIII (Chabelskaya S., *et al.*, 2014). Fait intéressant, SprD est fortement exprimé en

début de croissance tandis que l'ARNIII est plutôt exprimé à partir de la fin de la phase exponentielle de croissance. Ainsi, ces deux ARNs régulateurs semblent agir en synergie afin de réguler l'expression de Sbi de manière efficace et est le premier exemple du genre (Chabelskaya S., *et al.* 2014).

- SprX : est un ARN régulateur de 150 nucléotides, identifié initialement en 2010 par Bohn C. et ses collaborateurs sous le nom de RsaOR (Bohn C., *et al.*, 2010). Il s'agit d'un ARNrég présentant un nombre de copies variables en fonction des souches puisqu'il est retrouvé en une seule copie dans la souche N315, deux copies dans la souche HG001 et trois copies dans la souche Newman. Les premières données sur cet ARNrég ont montré une implication dans la résistance aux antibiotiques (Eyraud A., *et al.*, 2014). En réalisant des études phénotypiques avec une souche surexprimant SprX ou au contraire délétée pour cet ARNrég, ils ont montré que SprX diminuait la résistance des bactéries aux glycopeptides, notamment la vancomycine et la teicoplanine (Eyraud A., *et al.*, 2014). Afin de mieux comprendre le mécanisme par lequel SprX modulait la résistance aux antibiotiques, une étude protéomique 2D-DIGE a été réalisée permettant d'identifier la protéine SpoVG comme cible de SprX. SpoVG est une protéine impliquée dans la formation de la capsule et dans la résistance à la méticilline et aux glycopeptides (Schulthess B., *et al.*, 2009 ; Eyraud A., *et al.*, 2014). Ainsi, en inhibant la traduction de l'opéron *yabJ-spoVG* via la fixation au niveau du site d'initiation de la traduction, SprX inhibe l'expression de SpoVG et diminue ainsi la résistance aux glycopeptides (Eyraud A., *et al.*, 2014).

En 2016, une seconde étude, portant sur une des copies de la souche Newman cette fois-ci (SprX1), a permis d'identifier plusieurs autres cibles de SprX (Kathirvel M., *et al.*, 2016). En effet, une surexpression de SprX1 induisait l'augmentation de l'expression de plusieurs facteurs de virulence comme l'hémolysine  $\delta$  et le facteur ClfB. De plus, SprX est impliqué dans l'adhérence des bactéries et dans la formation de biofilms ainsi que dans la virulence sur modèle murin montrant ainsi l'importance de cet ARNrég dans la pathogénie de *S. aureus*.

Enfin, en 2017, une étude utilisant un innovant système rapporteur à double plasmide a permis d'identifier une autre cible de SprX, la protéine extracellulaire de liaison au complément Ecb (Ivain L., *et al.*, 2017). Il s'agit d'une protéine sécrétée permettant la

protection des bactéries contre le système immunitaire de l'hôte par liaison au facteur H du complément. Ainsi, en inhibant la traduction de *ecb* par fixation au RBS, SprX diminue l'expression de Ecb et donc la protection des bactéries contre le système immunitaire (Ivain L., *et al.*, 2017).

- SprF/SprG : sont les deux derniers ARNs régulateurs de la famille des Spr, représentant ici aussi un système toxine antitoxine de type I découvert en 2014 (Pine-Marie M.L., *et al.*, 2014). Dans ce système, *sprG1* code pour deux peptides toxiques dont la traduction est réprimée par l'antitoxine SprF1. En absence d'antitoxines, les toxines sont traduites et vont s'accumuler au niveau de la membrane provoquant ainsi la mort des bactéries (Pine-Marie M.L., *et al.*, 2014). De plus, les toxines sont également sécrétées dans le milieu extracellulaire pour agir contre les autres bactéries ainsi que contre les érythrocytes humains. Récemment, trois autres copies ont pu être identifiées et étudiées : SprG2/SprF2, SprG3/SprF3 et SprG4/SprF4 (Riffaud C., *et al.*, 2019). De manière identique à SprG1/SprF1, *sprG2* et *sprG3* codent pour des toxines et sont neutralisées respectivement par leur antitoxine SprF2 et SprF3. De plus, des interactions croisées ont été suggérées entre ces différents systèmes (Riffaud C., *et al.*, 2019). Enfin, il a également été suggéré que ces systèmes pouvaient avoir un rôle dans l'entrée en persistance des bactéries.

# CONTEXTE DE LA THÈSE

## CONTEXTE DE LA THÈSE

*Staphylococcus aureus* est une bactérie à Gram positif ayant la capacité d'établir une relation commensale avec l'homme, sans causer de maladie mais en constituant un réservoir. Cependant, malgré le fait qu'il puisse coloniser l'homme de manière asymptomatique, il se révèle également être un pathogène opportuniste chez l'homme et chez l'animal, c'est-à-dire qu'il profite d'un affaiblissement du système immunitaire pour devenir virulent et provoquer des infections variées. Ces infections englobent un large éventail allant des infections cutanées bénignes jusqu'aux infections sévères pouvant être mortelles, comme les endocardites infectieuses ou encore les septicémies. A cela s'ajoute le fait qu'il représente, en termes de nombre de cas (14%), le deuxième pathogène responsable d'infections nosocomiales contractées au cours d'une hospitalisation en France après *E. coli* (24% des cas). De plus, le milieu hospitalier étant un environnement propice aux développements de résistances aux antibiotiques, cela pose un problème dans le traitement et la prévention des infections à *S. aureus*. Enfin, l'impact de *S. aureus* sur la santé publique est majoré par l'expression d'un arsenal de facteurs de virulence lui permettant de s'adapter à son environnement et de jouer un rôle important dans les infections à *S. aureus*. On comprend donc pourquoi *S. aureus* est aujourd'hui considéré comme un problème majeur de santé publique en France, mais également tout autour du globe, et fait l'objet de nombreux projets de recherche. En effet, il est nécessaire d'élucider les mécanismes d'action lui permettant de passer de cet état commensal à celui de pathogène afin de mieux les comprendre. De plus une meilleure compréhension de ces mécanismes est essentielle afin de combattre les infections à *S. aureus* mais également de pouvoir les prévenir.

Le commensalisme ainsi que la virulence de *S. aureus* sont dépendants d'une large gamme de facteurs dont la régulation de l'expression joue un rôle central dans la pathogenèse. Ces régulations se font grâce à plusieurs acteurs : les facteurs de transcription, les systèmes à deux composants mais également par le biais d'ARNs régulateurs (ARNrég). Ces ARNrég commencent à être connus pour leur rôle important dans l'adaptation des bactéries à leur environnement, incluant les différents stress qu'elles peuvent rencontrer. Il a ainsi été montré que ces ARNrég interviennent dans le métabolisme central énergétique (Geissmann T., *et al.*, 2009 ; Bohn C. *et al.*, 2010 ; Rochat T., *et al.*, 2018), dans la virulence (Chabelskaya S. *et al.*, 2010 ; Romilly C., *et al.*, 2014 ; Le Pabic H. *et al.*, 2016) ainsi que dans la résistance aux

antibiotiques (Eyraud A. *et al.*, 2014), par le biais de régulations exercées au niveau d'ARNs messagers cibles.

Actuellement, 575 ARNrég ont été identifiés chez *S. aureus*, dont 159 validés expérimentalement (Sassi M., *et al.*, 2015). Cependant, peu d'entre eux ont une fonction connue et peuvent véritablement être qualifiés de « régulateurs ». Le laboratoire d'accueil (BRM, INSERM U1230) a découvert 12 petits ARNs régulateurs exprimés par des souches cliniques grâce à des analyses bioinformatiques couplées à des validations expérimentales (Pichon C. *et al.*, 2005). Sept d'entre eux se trouvent dans les îlots de pathogénie de *S. aureus* (SaPI), qui sont des régions chromosomiques ayant des caractères particuliers associés à la pathogénicité. Les cinq autres sont situés dans la partie restante du génome (core). Les sept ARNrég situés dans les îlots de pathogénie sont appelés *sprA*, *B*, *C*, *D*, *F*, *G* et *X* (ARNs des petits îlots de pathogénie) (Pichon C. *et al.*, 2005). Leur localisation sur des îlots de pathogénie suggère qu'ils jouent un rôle potentiel dans la virulence de *S. aureus* puisque ces îlots sont d'anciens éléments mobiles et ont la particularité de regrouper de nombreux gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques. C'est pourquoi, le projet de recherche du laboratoire porte sur l'étude fonctionnelle et structurale de cette famille d'ARNrég chez *S. aureus*, dans le but de proposer, à long terme, des alternatives diagnostiques et thérapeutiques.

L'un d'entre eux, l'ARN régulateur Srn\_3610\_SprC (appelé SprC dans la suite de ce manuscrit) est impliqué dans la virulence de *S. aureus*. En 2015, Le Pabic H. et ses collaborateurs ont ainsi mis en évidence que SprC, intervenait dans la virulence et la propagation bactérienne chez un modèle animal de septicémie. En effet, une souche isogénique délétée de *sprC* devient plus virulente que la souche parentale, et une complémentation génétique de cet ARN restaure le phénotype sauvage (Le Pabic H. *et al.*, 2015). De plus, un rôle dans l'internalisation des bactéries par les cellules immunitaires de l'hôte a également été démontré. La surexpression de SprC réduit l'internalisation de *S. aureus* par les monocytes THP1 ainsi que par les THP1 différenciés en macrophages associée à une diminution de la résistance bactérienne à un stress oxydant (Le Pabic H. *et al.*, 2015). Dans le but de mieux comprendre le mécanisme par lequel SprC intervenait dans la virulence et l'internalisation des bactéries par les cellules immunitaires, Le Pabic H. et ses collaborateurs ont réalisé des études protéomiques comparatives entre différentes souches exprimant ou non SprC. Ainsi, ils ont pu montrer que SprC interférait avec le processus d'internalisation en partie par le contrôle de l'expression d'une protéine, l'autolysine,

impliquée dans l'internalisation des bactéries par les cellules endothéliales (Hirschhausen N., *et al.*, 2010 ; Le Pabic H. *et al.*, 2015). En effet, SprC régule négativement la production de l'autolysine en bloquant la traduction de son ARNm par inhibition directe. Cependant, cette interaction entre SprC et l'ARNm *atl* est faible ( $Kd = 35\mu\text{M}$ ) impliquant l'intervention potentielle de partenaires supplémentaires encore inconnus dans cette interaction.

Les objectifs de ce travail de thèse, sont dans un premier temps d'isoler et d'identifier de nouvelles cibles à la fois ARNs et protéiques de SprC. Dans ce but, une approche par la technique du MAPS (Purification par affinité MS2 couplée avec un séquençage des ARNs) a été choisie car elle permet d'obtenir une liste de cibles putatives directes de SprC, dans une condition donnée de croissance. Cette technique nous a permis d'identifier une protéine pouvant interagir avec SprC ainsi qu'une liste de 14 ARNm. Dans un deuxième temps, l'étude fonctionnelle de certaines de ces cibles pourrait nous permettre d'élucider le rôle joué par SprC dans les infections dues à *S. aureus*.

# RÉSULTATS

## RESULTATS

Au cours de ce travail de thèse, le premier objectif a été d'isoler et d'identifier de nouvelles cibles directes de l'ARN SprC dans le but de mieux comprendre son rôle à la fois dans la virulence de *S. aureus* mais également dans l'internalisation des bactéries par les cellules immunitaires et notamment les macrophages. Pour cela, il a été décidé d'appliquer la technique du MAPS (Purification par affinité avec MS2 couplée au séquençage ARN). Cette technique a été développée par Saïd N. et ses collaborateurs (Saïd N., *et al.*, 2009) et a ensuite été adaptée notamment dans notre laboratoire ainsi que dans d'autres (Lalaouna D., *et al.*, 2015 ; Tomasini A., *et al.*, 2017 ; Lalaouna D., *et al.*, 2019). Elle consiste en l'induction de l'expression de l'ARNrég étudié, en fusion avec l'ARN MS2, et sa purification par affinité grâce à l'utilisation d'une résine d'amylose chargée en protéine de fusion MBP-MS2 (Protéine liant le maltose-MS2). En effet, lors de la purification, l'ARNrég va se fixer, via son étiquette MS2, à la protéine MS2 elle-même fixée à la résine d'amylose via la protéine MBP. Ainsi, les cibles putatives directes de l'ARNrég, qu'elles soient de type ARN ou protéique, seront isolées grâce à leur fixation à l'ARNrég et pourront ensuite être identifiées (Saïd N., *et al.*, 2009). Cette technique a été mise au point chez *Salmonella enterica* serovar typhimurium (Saïd N., *et al.*, 2009) et a ensuite été adaptés à d'autres espèces bactériennes notamment *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

Tout d'abord, en 2015, Lalaouna D. et ses collaborateurs mirent en place une technologie MAPS chez *E. coli* où ils étudièrent les cibles ARNm des ARNrég RyhB et RybB. Ils identifièrent ainsi plusieurs cibles connues de ces deux ARNrég mais également de nouvelles cibles (Lalaouna D., *et al.*, 2015b). La même année, ils appliquèrent le MAPS à l'ARNrég DsrA qu'ils validèrent en retrouvant deux cibles connues, les ARNm *rpoS* et *hns* (Lalaouna D., *et al.*, 2015c). Il identifièrent également une nouvelle cible de DsrA, l'ARNm *rbsD*, régulé négativement par DsrA avec une interaction atypique située dans la séquence codante de *rbsD* provoquant sa dégradation (Lalaouna D., *et al.*, 2015c). De plus, ils ont également réussi à mettre en place un MAPS inversé, c'est-à-dire qu'ils ont utilisé un fragment d'ARNm comme appât pour identifier les ARNrég interagissant avec lui (Lalaouna D., *et al.*, 2015). Enfin, en 2018, ils ont utilisé la technique MAPS avec l'ARNrég GcvB permettant ainsi l'identification de sept nouvelles cibles régulées négativement par cet ARNrég (Lalaouna D., *et al.*, 2018).

En outre, mis à part notre laboratoire, la technique du MAPS a également été adaptée à la recherche d'ARNrég chez les pathogènes à Gram positif, notamment *S. aureus* à l'IBMC de Strasbourg (Lalaouna D., *et al.*, 2018b). En effet, une de leurs équipes travaille sur la caractérisation d'une famille d'ARNrég décrite précédemment dans la partie « ARNs régulateurs de *S. aureus* », les Rsa. Lors de l'étude de cette famille, la technique MAPS a été utilisée avec succès sur trois Rsa différents. Tout d'abord, en 2017, l'étude de RsaA a permis d'identifier une cible connue, à savoir l'ARNm *mgrA*, ainsi que de nouvelles cibles réprimées par RsaA, notamment *flipR* ainsi que quatre ARNm appartenant à la famille des enzymes SsaA (Tomasini A., *et al.*, 2017). De plus, en 2019, l'étude de RsaC quant à elle, permit d'identifier plusieurs cibles impliquées dans la réponse au stress oxydatif et notamment l'ARNm *sodA* (Lalaouna D., *et al.*, 2019). Enfin, cette même année, l'étude de RsaI permit tout d'abord l'identification de deux cibles réprimées au niveau traductionnel, une perméase du glucose, GlvU\_2, ainsi que la kinase 3 du fructosamine, Fn3K. De plus ils ont également identifié d'autres ARNrég de la famille Rsa (RsaD, RsaE et RsaG) enrichis grâce à leur interaction avec RsaI (Bronsky D., *et al.*, 2019).

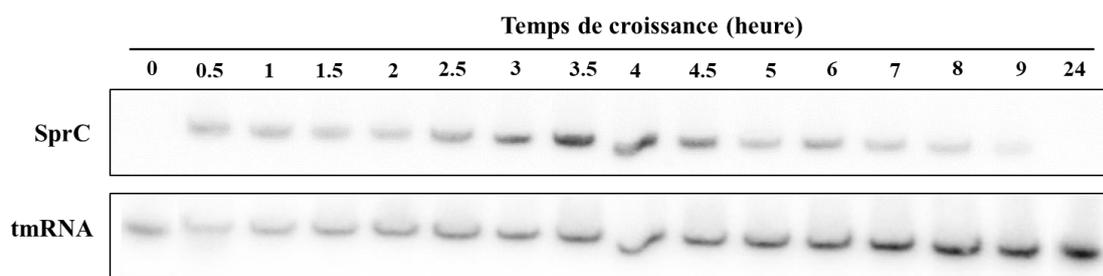
Ainsi, comme le montre ces nombreuses études, l'utilisation de la technique MAPS est un outil de premier ordre pour l'étude fonctionnelle des ARNrég. Cela permet tout d'abord l'identification globale de l'ensemble des partenaires putatifs directs de cet ARNrég dans une condition de croissance donnée. Ensuite la validation d'une ou plusieurs cibles permet d'élucider la fonction de l'ARNrég dans divers processus biologiques d'adaptation de la bactérie à son environnement.

## I] Recherche et études de cibles de l'ARN SprC

### A/ Recherche de cibles directes de SprC à l'aide de la technologie MAPS

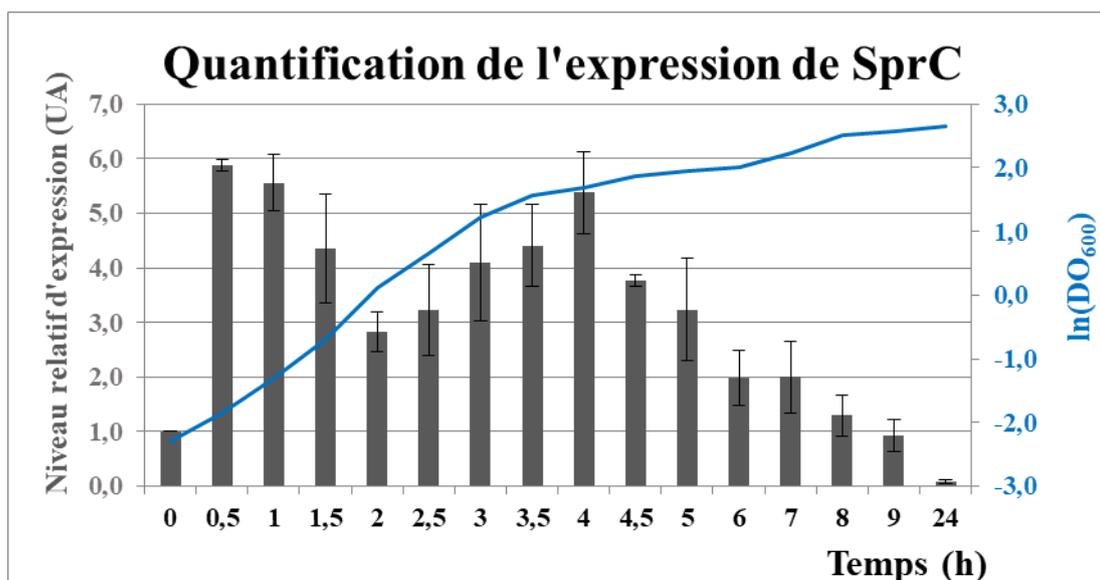
#### 1- Cinétique d'expression de SprC

La première étape afin d'identifier de nouvelles cibles d'un ARNrég est de connaître son profil d'expression. En effet, cela permet de réaliser la technique du MAPS dans des conditions de croissance où celui-ci est bien exprimé et où il exerce principalement son activité régulatrice. Pour cela nous avons donc réalisé une cinétique d'expression au cours de la croissance bactérienne en prélevant des culots bactériens à T=0, toutes les demi-heures pendant 5 heures, puis toutes les heures pendant 3 heures de plus avant un dernier prélèvement à 24 heures. Nous avons ensuite analysé l'expression de SprC par Northern blot (Figure 39). Ces résultats montrent un pic d'expression vers 3,5 - 4 heures de croissance ainsi qu'une absence d'expression à T=0 et T=24 heures.



**Figure 39 : Profil d'expression de l'ARNrég SprC en fonction de la croissance bactérienne.** Analyse du profil d'expression de SprC par Northern blot, en utilisant l'ARN $tm$  comme contrôle interne. Les données illustrent une expérience représentative parmi trois réplicats biologiques indépendants.

Pour vérifier cela, nous avons réalisé une quantification relative en fixant à un niveau égal à 1 le temps T=0 (Figure 40). Cette quantification permet de faire ressortir plusieurs points intéressants sur le profil d'expression de SprC. Tout d'abord, on observe un pic d'expression au tout début de la croissance bactérienne, après 0.5 - 1 heure de culture, avec une augmentation de l'expression de SprC d'un facteur 6 par rapport au contrôle. Ce pic est ensuite suivi d'une diminution d'un facteur 2 par rapport au 1<sup>er</sup> pic au bout de 2 heures de culture, avant un second pic d'expression à 3 - 4 heures de culture avec une augmentation d'un facteur  $\approx 5.5$  par rapport au contrôle. Enfin, ce 2<sup>ème</sup> pic est suivi d'une décroissance dépendante du temps avec une expression quasiment nulle (facteur 0.07) au bout de 24 heures.



**Figure 40 : Quantification de l'expression de l'ARNrég SprC au cours de la croissance bactérienne.** Quantification du niveau d'expression de SprC (barres grises) ramenée à la densité optique (courbe bleue), proportionnelle à la quantité de bactérie. Le temps T=0 a été pris comme témoin et fixé à 1 et les autres temps ont été normalisés par rapport à celui-ci en utilisant l'ARNtm comme normalisateur. Les données présentées sont la moyenne de trois expériences indépendantes.

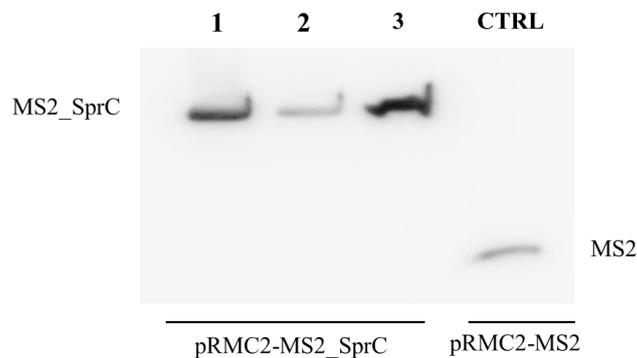
L'analyse de ce profil d'expression nous a permis de choisir deux temps de croissance pour réaliser les expériences de MAPS :

- 2,5 heures de culture bactérienne car ce temps correspond au début du second pic d'expression de SprC.
- 4 heures de culture car cela correspond au sommet du second pic d'expression de SprC.

## 2- Construction de l'appât et validation de son expression

La technique du MAPS se fait en plusieurs étapes successives dont (i) la première consiste à l'induction de notre ARNrég d'intérêt fusionné à une étiquette MS2 de 43 nucléotides (ARNrég-MS2). (ii) Après l'expression de ce construit dans *S. aureus*, les complexes entre l'ARNrég-MS2 et les protéines ou les ARNm cibles se feront dans la bactérie. (iii) Les ARN totaux ou les protéines totales seront ensuite extraits et purifiés par affinité. Cette purification se fait via la liaison de l'étiquette MS2 fusionnée à l'ARNrég avec le domaine MS2 des protéines MBP-MS2 préalablement chargées sur une résine d'amylose. (iv) Après purification et élution des complexes, les ARNm cibles seront séquencés par

RNAseq et les protéines identifiées par spectrométrie de masse. Nous avons ainsi décidé de réaliser cette fusion au niveau 5' de notre ARNrég dans le vecteur pRMC2 sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'anhydrotétracycline (Corrigan R.M. *et al.*, 2009). Nous avons ensuite vérifié l'expression et la fixation de notre appât MS2\_SprC sur la résine d'amylose chargée en protéines MBP-MS2 dans la souche *S. aureus* RN4220 par Northern blot (Figure 41). En parallèle nous avons utilisé le plasmide pRMC2 exprimant uniquement l'aptamère MS2 en contrôle. L'induction à l'anhydrotétracycline après 4 heures de croissance bactérienne a montré une bonne expression de notre construit dans les ARN totaux extraits (piste 1), une faible quantité dans les ARNs non fixés est observée (piste 2) associée à un enrichissement par fixation sur la colonne d'amylose (piste 3) (Figure 41).

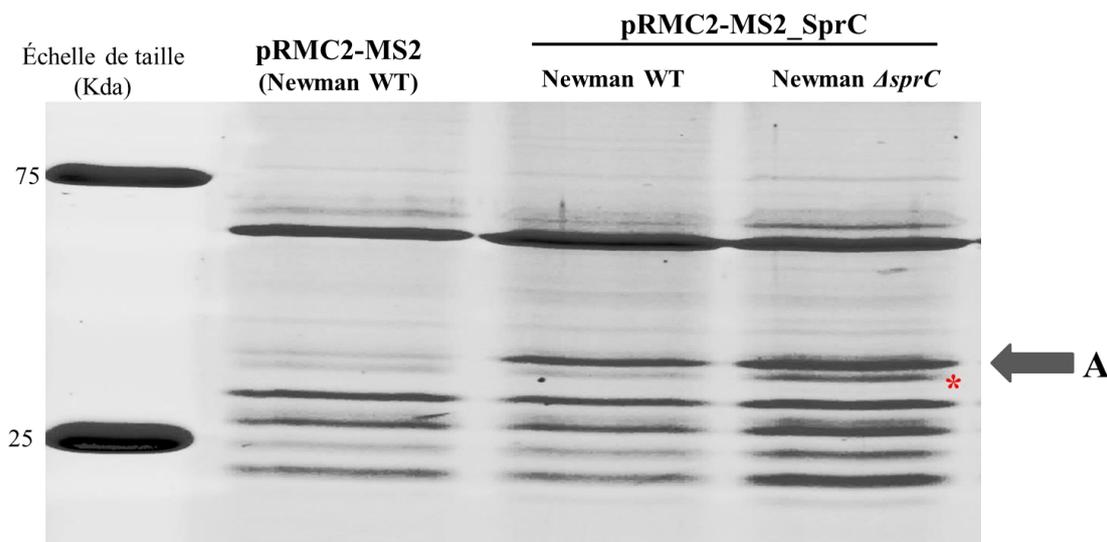


**Figure 41 : Contrôle de l'induction et de l'accrochage du construit MS2\_SprC sur la résine d'amylose.** Contrôle par Northern blot de (1) l'induction du construit MS2\_SprC dans la souche *S. aureus* RN4220 à l'aide d'une sonde ciblant l'aptamère MS2. Le dépôt (2) correspond aux ARNs passés sur la résine sans s'être fixés. (3) Contrôle de l'enrichissement au sein de l'éluat après fixation sur la résine. CTRL= induction de l'aptamère MS2 seul. Les données illustrent une expérience représentative parmi trois répliquats biologiques indépendants.

Après cette vérification, le plasmide pRMC2-MS2\_SprC a été transformé dans la souche d'étude, la souche *S. aureus* Newman ainsi que dans la souche isogénique délétée pour *sprC*. Dans cette dernière, l'absence d'expression endogène de SprC permet de s'affranchir d'un titrage potentiel des cibles. Ainsi la réalisation des expériences de MAPS sur les deux souches en parallèle peut faire ressortir certaines cibles de manière plus importante.

### 3- Cibles protéiques identifiées par MAPS

Le MAPS a tout d'abord été réalisé en induisant l'expression de notre appât MS2\_SprC après 2,5 heures et 4 heures de culture bactérienne dans le but d'identifier de nouvelles cibles protéiques de SprC. Pour cela, après élution des protéines purifiées par affinité grâce à leur interaction avec l'appât MS2\_SprC, une fraction de chacun de nos éluats a été étudiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE ; Figure 42). Nous avons ainsi déposé le contrôle MS2 issu de la souche Newman ainsi que les fractions éluées correspondant aux partenaires protéiques putatifs de SprC dans la souche Newman et dans la souche délétée pour *sprC*. L'induction après 2,5 heures de croissance nous montre une bande (A) d'environ 30kDa qui est enrichie par fixation à l'appât MS2\_SprC par rapport au contrôle MS2 (Figure 42). De plus, il est intéressant de constater que cette bande est également enrichie de manière plus importante dans la souche délétée pour *sprC*.



**Figure 42 : Analyse par gel SDS-PAGE des protéines purifiées par MAPS après 2H30 de croissance bactérienne.** Les fractions déposées ont été purifiées à partir de l'appât MS2 seul dans la souche Newman et servant de témoin ainsi que de l'appât MS2\_SprC dans la souche Newman WT et Newman délétée pour *sprC*. L'expérience a été réalisée en triplicat biologique. L'étoile rouge correspond à une bande non enrichie de manière reproductible au cours de ces triplicats.

De plus, la comparaison des protéines purifiées par les appâts après induction à 2,5 heures et à 4 heures de croissance, montre que cette protéine semble également être enrichie à 4 heures mais de manière beaucoup plus faible (données non présentées). Cette bande a ensuite été découpée du gel et envoyée à la plateforme protéomique de l'Université Paris

Descartes (Institut Cochin, Paris) afin d’être analysée par Spectrométrie de masse. De plus, la bande correspondante dans la fraction MS2 témoin et possédant la même taille apparente a également été envoyée afin de pouvoir définir quelle protéine est spécifique de l’ARN SprC puisqu’il semblerait que des protéines aspécifiques soient aussi présentes au niveau de cette bande. L’analyse par Spectrométrie de masse nous a fourni une liste de protéines identifiées à partir de la bande protéique d’un poids apparent de 30kDa isolée par gel SDS-PAGE dans la fraction MS2\_SprC (Tableau 3). La plupart de ces protéines ont été identifiées à la fois pour la bande prélevée au niveau de la fraction MS2\_SprC, mais également au niveau de la bande prélevée au niveau de la fraction MS2 témoin. Le candidat le plus probable pour la protéine se fixant fortement à SprC est la protéine ribosomale S2 (sous-unité 30S) puisqu’elle représente 64,75% des protéines identifiées au sein de la bande analysée. De plus, elle possède le nombre le plus élevé en termes de peptides identifiés par Spectrométrie de masse ainsi qu’en termes de « Total Score Ions ». Enfin, la masse moléculaire théorique concorde avec celle que nous avons estimée sur le gel d’électrophorèse (Figure 42).

**Tableau 3 : Liste des protéines identifiées par Spectrométrie de masse dans la bande protéique d’intérêt de masse moléculaire apparente de 30kDa.** Le Score Total d’Ions correspond à la somme des scores d’ions des peptides identifiés pour une protéine.

Nom des protéines identifiées	Total Score Ions	Nombre de peptides identifiés	Pourcentage d’abondance dans la bande analysée	Masse moléculaire théorique (kDa)
<b>Protéine ribosomale S2 (sous-unité 30S)</b>	<b>1204</b>	<b>15</b>	<b>65</b>	<b>29</b>
Protéine ribosomale L2 (sous-unité 50S)	496	9	19	30
Protéine ribosomale L25 (sous-unité 50S)	139	4	7,5	24
Facteur de virulence conservé B	137	4	4,5	34
Facteur d’élongation P	71	1	1,6	21

#### 4- Cibles ARN identifiées par MAPS

Pour l’étude des ARNm cibles putatifs de SprC nous avons décidé de réaliser le MAPS à 2,5 heures de croissance au vu des résultats des gels SDS-PAGE précédents. En effet, ceux-ci montrent un enrichissement plus important d’une protéine par liaison à SprC ainsi qu’un enrichissement supérieur à 2,5 heures par rapport à 4 heures. De plus, le MAPS ARNs a été effectué avant la réception des résultats de Spectrométrie de masse et nous ne négligions pas le fait d’avoir pu isoler une protéine chaperonne permettant de favoriser les

interactions ARNrég-ARNm cibles. Cela a donc conditionné notre choix pour ce temps de 2,5 heures de croissance. Après extraction des ARNs cibles putatifs purifiés lors du MAPS, nous avons réalisé des RT-qPCR afin d'apprécier l'enrichissement en ARNm *atl*, connu pour être une cible directe de SprC (Le Pabic H., *et al.*, 2015). Les expériences de MAPS n'ont pas permis de montrer un enrichissement de l'ARNm *atl* (données non présentées), ce qui était en partie attendu du fait de la faible quantité de transcrits *atl* à 2,5 heures de croissance bactérienne ainsi que de la faible affinité entre SprC et l'ARNm *atl* (Le Pabic H., *et al.*, 2015). Cependant, un contrôle interne utilisé en parallèle avec un construit MS2\_ARNIII nous a permis d'enrichir d'un facteur 8 l'ARNm du facteur de transcription Rot, cible connue de l'ARNIII (données non présentées).

Des bibliothèques d'ADNc indexées pour séquenceurs Illumina ont ensuite été faites à partir des ARNs issus du MAPS. Après une vérification de la qualité de nos échantillons sur puces à ADN par Bioanalyser®, ceux-ci ont été séquencés. Les données de séquençage ont ensuite été alignées sur le génome de la souche Newman et le niveau des ARNs isolés a été calculé avec le package DESeq (Anders S., *et al.*, 2010) au moyen d'un fichier d'annotation contenant tous les gènes et ARNs régulateurs connus.

L'induction de l'expression de notre appât MS2\_SprC a conduit à l'enrichissement de 14 ARNm, avec un facteur d'enrichissement >2 et une p. valeur ajustée pour les tests multiples <0,05 (Tableau 4). Tout d'abord, on remarque que notre appât a bien été exprimé puisqu'on le retrouve enrichi d'un facteur 32277. Les facteurs d'enrichissement des ARNs identifiés varient de 2,5 à 35,5. L'ARNm le plus enrichi est *deoD*, codant pour une purine nucléoside phosphorylase. Parmi les autres transcrits identifiés, plusieurs codent pour des protéines possédant des fonctions connues ou prédites. Ils comprennent des protéines ribosomales (*rpmA* et *rpmB*), des facteurs de transcription (*mgrA* et *fapR*), deux composants du système Agr (*agrB* et *agrC*) et une protéine de liaison à l'ADN (*hup*). Enfin, on retrouve aussi trois transcrits exprimant des systèmes de transport : un système consacré à l'efflux du zinc (*czrB*), un autre impliqué dans la résistance aux médicaments (*bcr/cflA*) et le dernier permettant le transport des acides aminés (*brnQ2*). Trois transcrits codant des protéines hypothétiques ont également été enrichis par la présence de notre appât sur la colonne.

**Tableau 4 : Liste des cibles ARNm putatives enrichies lors de l'expression de l'appât MS2\_SprC.** L'appât est représenté en rouge. Les résultats sont issus d'un triplicat biologique.

	Gènes	Fonctions	Enrichissement MS2_SprC/MS2	p. valeur
<i>Srn_3610</i>	<b>SprC</b>	<b>Appât</b>	<b>32277</b>	<b>7.2 E-34</b>
<i>NWMN_2042</i>	<i>deoD</i>	Purine nucléoside phosphorylase	35.5	3.2 E-33
<i>NWMN_0430</i>		Protéine hypothétique conservée	9.1	7 E-11
<i>NWMN_2050</i>	<i>cztB</i>	Transporteur impliqué dans l'efflux de cations	6.4	6.2 E-07
<i>NWMN_0655</i>	<i>mgrA</i>	Protéine de la famille des régulateurs MarR	6.2	2.4 E-15
<i>NWMN_2333</i>	<i>bcr/CflA</i>	Transporteur impliqué dans la résistance aux médicaments	4.8	1 E-05
<i>NWMN_1138</i>	<i>fapR</i>	Régulateur transcriptionnel de la biosynthèse des acides gras et des phospholipides	4.75	9.3 E-05
<i>NWMN_1547</i>	<i>rpmA</i>	Protéine ribosomale L27	4.2	1.3 E-10
<i>NWMN_1943</i>	<i>agrB</i>	Protéine B du système Agr	4.1	1.6 E-10
<i>NWMN_0402</i>		Protéine hypothétique	3.6	4.3 E-08
<i>NWMN_1548</i>		Protéine hypothétique	3.4	6.6 E-05
<i>NWMN_0248</i>	<i>brnQ2</i>	Protéine du système II du transport des acides aminés à chaîne ramifiée	3.3	6.6 E-05
<i>NWMN_1382</i>	<i>huP</i>	Protéine de liaison à l'ADN HU	3.2	2.1 E-08
<i>NWMN_1945</i>	<i>agrC</i>	Protéine C du système Agr	2.5	1.5E-05
<i>NWMN_1134</i>	<i>rpmB</i>	Protéine ribosomale L28	2.5	2.2 E-04

Parmi l'ensemble de ces cibles, nous avons choisi un certain nombre d'entre elles à étudier. Pour cela, nous nous sommes appuyés sur les fonctions connues de SprC, à savoir son implication dans la virulence et la phagocytose des bactéries par les cellules immunitaires (Le Pabic H., *et al.*, 2015).

(1) Nous avons tout d'abord sélectionné *deoD* car il s'agit de l'ARNm ayant le plus fort enrichissement. De plus, il code pour une purine nucléoside phosphorylase, enzyme clé de la voie de récupération des purines. Elle catalyse la phosphorylation réversible de la liaison glycosidique des ribo- et déoxyribo- nucléosides puriques et de leurs analogues. Cela aboutit à la formation de purines et de (déoxy) riboses-1-phosphate (Grenha R., *et al.*, 2005 ; Luo W. *et al.*, 2011 ; Dalberto P.F., *et al.*, 2018). Puisque le métabolisme des purines est une étape limitante dans la croissance de toutes les cellules, la capture de nucléosides à partir des

cellules hôtes afin de les ré-utiliser pour le métabolisme bactérien via *deoD*, pourrait être important pour la survie intracellulaire de *S. aureus*. Une étude de 2018 (Dalberto P.F., *et al.*, 2018) a également suggéré que dans des conditions de faible disponibilité énergétique, à l'intérieur des cellules hôtes par exemple, la voie de récupération pourrait être la principale source de maintien du stock de nucléotides, puisque la voie *de novo* est un processus à forte demande énergétique. Cependant ils n'ont pas pu mettre en évidence de rôle de *DeoD* dans l'invasion et la croissance de *M. tuberculosis* dans les macrophages. Ils ont émis l'hypothèse que ces résultats négatifs pouvaient être dus à la redondance des enzymes trouvées dans la voie de biosynthèse des nucléotides de *M. tuberculosis* pouvant ainsi compenser l'absence de *deoD* (Dalberto P.F., *et al.*, 2018).

(2) La 2ème cible choisie est *czrB*, un transporteur membranaire impliqué dans l'efflux du zinc, faisant parti de l'opéron *czrAB* (Kuroda M., *et al.*, 1999). En effet, les propriétés immunomodulatrices et antimicrobiennes du zinc dans les macrophages infectés par les bactéries intracellulaires (Stafford S.L., *et al.*, 2013) impliquent que le zinc doit être efficacement exporté de la bactérie internalisée pour prévenir la toxicité liée à un excès en zinc.

(3) La cible suivante est *mgrA*, un facteur de transcription caractérisé de régulateur global de la virulence de *S. aureus* puisqu'il régule 175 gènes de manière positive et réprime 180 autres gènes dans la souche Newman (Luong T.T., *et al.*, 2006). Parmi ces gènes régulés, plusieurs codent pour des facteurs de virulence, notamment l'hémolysine  $\alpha$ , la coagulase, la protéine A, les nucléases et les sérine protéases extracellulaires (Luong T.T., *et al.*, 2003 ; Luong T.T., *et al.*, 2006 ; Jenul *et al.*, 2018). De plus, il semble également impliqué dans la survie et la réplication de *S. aureus* au sein des cellules hôte (Truong-Bolduc Q.C., *et al.*, 2015 ; Favazzo L.J., *et al.*, 2019).

(4) Enfin, *agrB* et *agrC*, sont deux composants du système Agr dont l'implication dans la virulence de *S. aureus* n'est plus à démontrer. Comme décrit dans la partie « système Agr » précédente le concernant, AgrB permet la maturation et l'export de l'AIP tandis que AgrC est le senseur du système à deux composants (Jenul *et al.*, 2018 ; Haag A.F., *et al.* 2015 ; Tan L., *et al.*, 2018). Le système Agr est l'un des principaux régulateurs de la virulence de *S. aureus* par la régulation à la hausse l'expression de 104 gènes et à la baisse l'expression de 34 autres (Dunman P.M., *et al.*, 2001). De plus, le système Agr est également impliqué dans la survie intracellulaire puisque son expression est diminuée dans les SCV et augmentée à la sortie du

phagolysosome ou lors de la lyse de la cellule hôte, pour permettre notamment la production d'exo-protéines (Flannagan R.S., *et al.*, 2015 ; Horn J., *et al.*, 2018). Le système Agr est également essentiel à la survie intracellulaire de *S. aureus* puisqu'un mutant *agr* ne survie pas dans les macrophages dérivés de monocytes humains (Kubica M., *et al.*, 2008).

## **B/ Étude des interactions entre SprC et les différentes cibles sélectionnées**

Après avoir sélectionné les cibles que nous voulions étudier, il nous faut tout d'abord confirmer qu'elles interagissent avec SprC. Puis, pour celles dont ce sera le cas, étudier l'effet de SprC sur leur expression ainsi que leur rôle dans la pathogénie de la bactérie. Pour cela nous avons procédé en trois étapes : nous avons réalisé (1) des prédictions d'interactions entre SprC et les différentes cibles choisies par bio-informatique en utilisant IntaRNA (Mann M., *et al.*, 2017) puis avons vérifié ces interactions en utilisant deux techniques : (2) le retard sur gel et (3) la technique à double plasmides.

### **1- Prédictions d'interaction entre SprC et ses cibles putatives**

- L'interaction SprC-*deoD* (Figure 43-A): est située entre les nucléotides 53 et 68 de *deoD*, au début de sa séquence codante et constitue un appariement imparfait de 16 nucléotides avec SprC. Au niveau de SprC, cette interaction est située entre les nucléotides 68 et 83 de la tige-boucle H2. Enfin, cette interaction possède une énergie de -9.7kcal/mol.
- L'interaction SprC-*czrB* (Figure 43-B): est située entre les nucléotides 867 et 895 de la séquence codante de *czrB*, ce qui n'est pas courant puisque la plupart des interactions décrites avec des ARNrég se situent plutôt autour du codon d'initiation de la traduction et de la séquence Shine-Dalgarno. Cette interaction forme un appariement imparfait de 29 nucléotides avec SprC au niveau des nucléotides 66 et 92 de la tige-boucle H2 avec une énergie de -13.5kcal/mol.
- L'interaction SprC-*mgrA* (Figure 43-C): est située autour du codon d'initiation de la traduction de *mgrA* (nucléotides -2 à +7) et possède une énergie de -4.9kcal/mol. Elle forme un court appariement imparfait de 9 nucléotides situé entre les nucléotides 69 et 77 de la tige-boucle H2 de SprC.

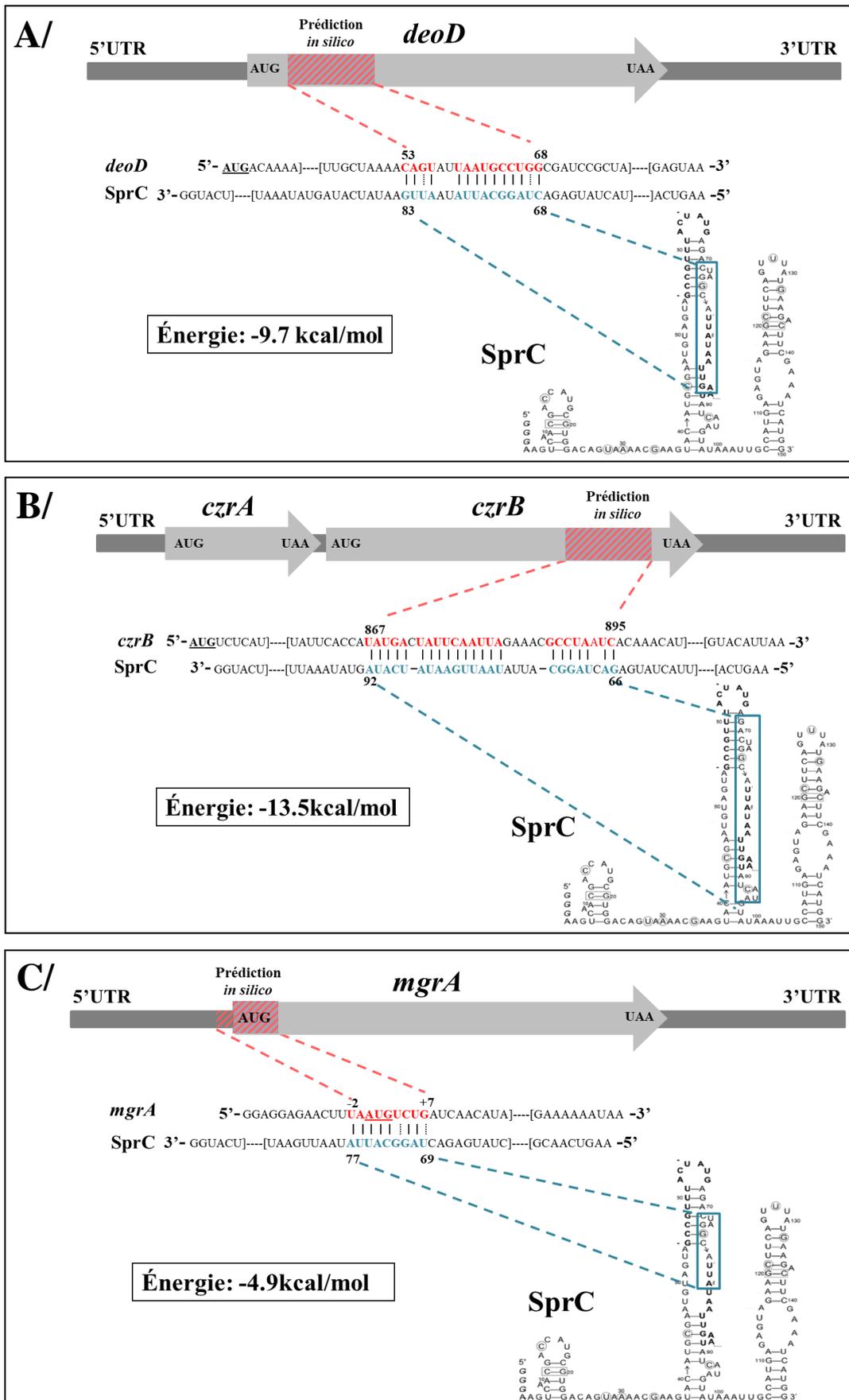


Figure 43 : Prédictions d'interactions *in silico* entre SprC et les trois premières cibles choisies (obtenues par IntaRNA). Interaction SprC-*deoD* (A), interaction SprC-*czrB* (B) et interaction SprC-*mgrA* (C).

- L'interaction SprC-*agrB* (Figure 44-A): est située entre les nucléotides 68 et 86 de *agrB*, au début de sa séquence codante et forme un appariement imparfait avec SprC de 21 nucléotides et possède une énergie de -7.4kcal/mol. Au niveau de SprC, l'interaction est située entre les nucléotides 67 et 87 de la tige-boucle H2.
- L'interaction SprC-*agrC* (Figure 44-B): est atypique puisqu'elle est située au milieu de la séquence codante de *agrC* (nucléotides 757 à 779). Elle forme un appariement imparfait de 23 nucléotides et de -9.4kcal/mol en énergie, avec la tige-boucle H2 de SprC (nucléotides 68 à 86).

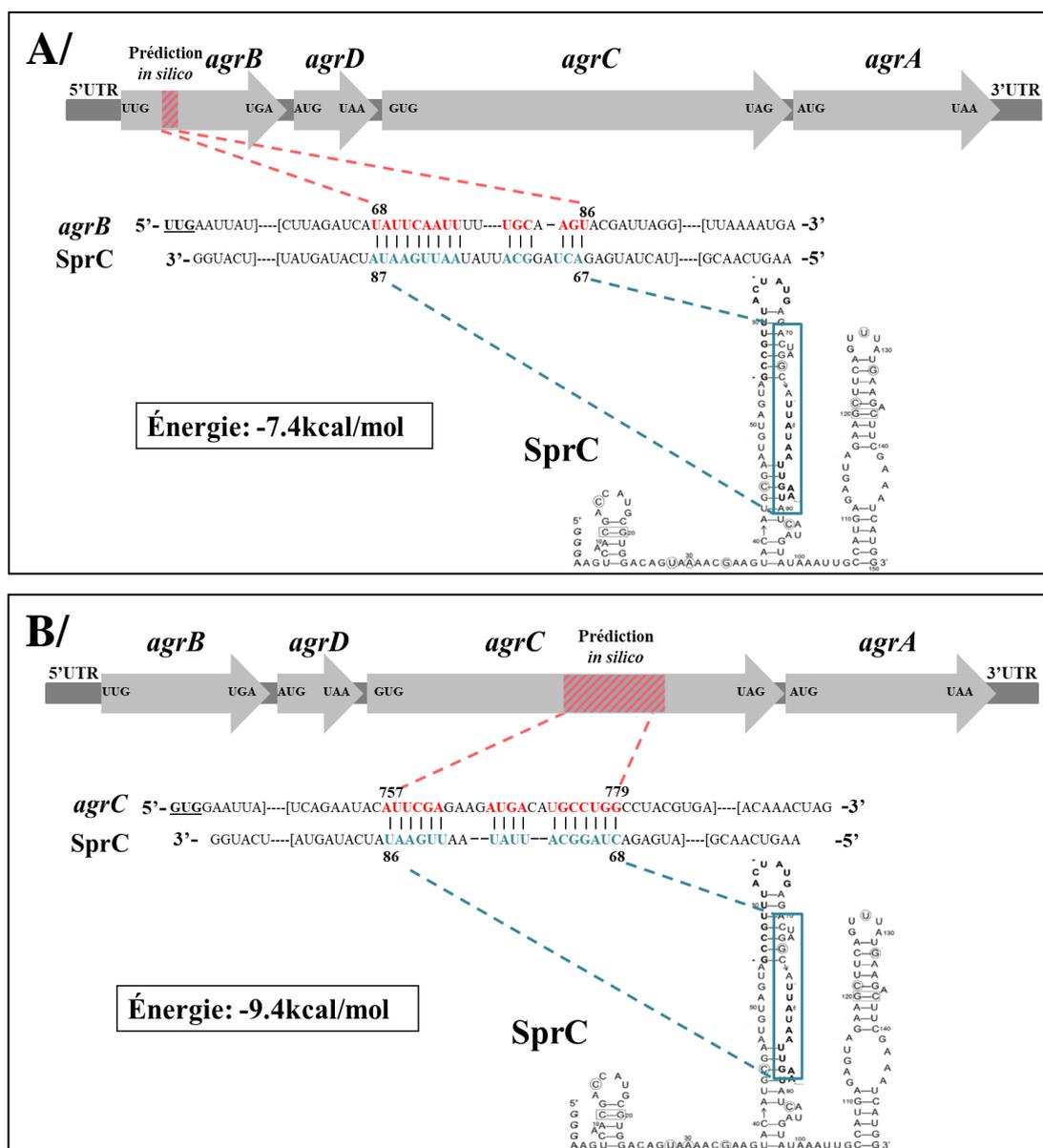
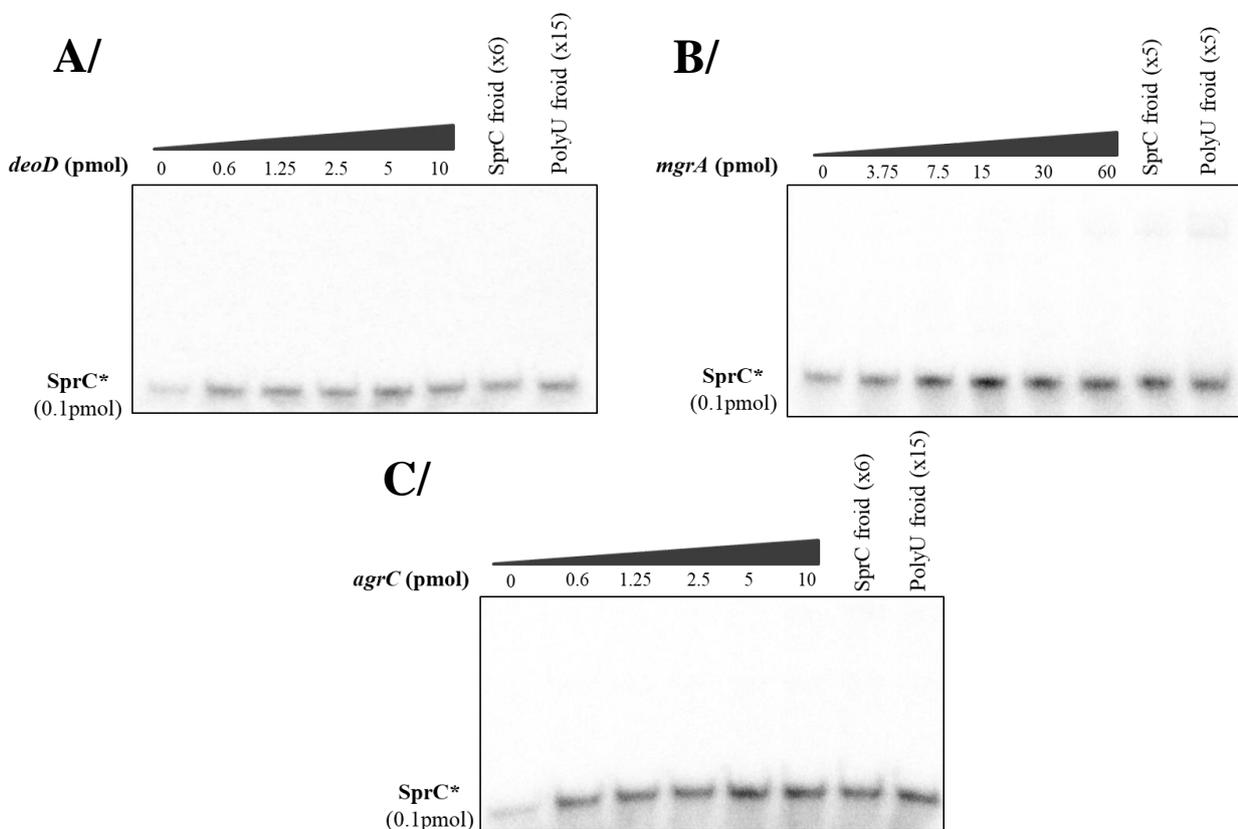


Figure 44 : Prédictions d'interactions *in silico* entre SprC et les deux transcrits du système Agr (obtenues par IntaRNA). Interaction SprC-*agrB* (A) et interaction SprC-*agrC* (B).

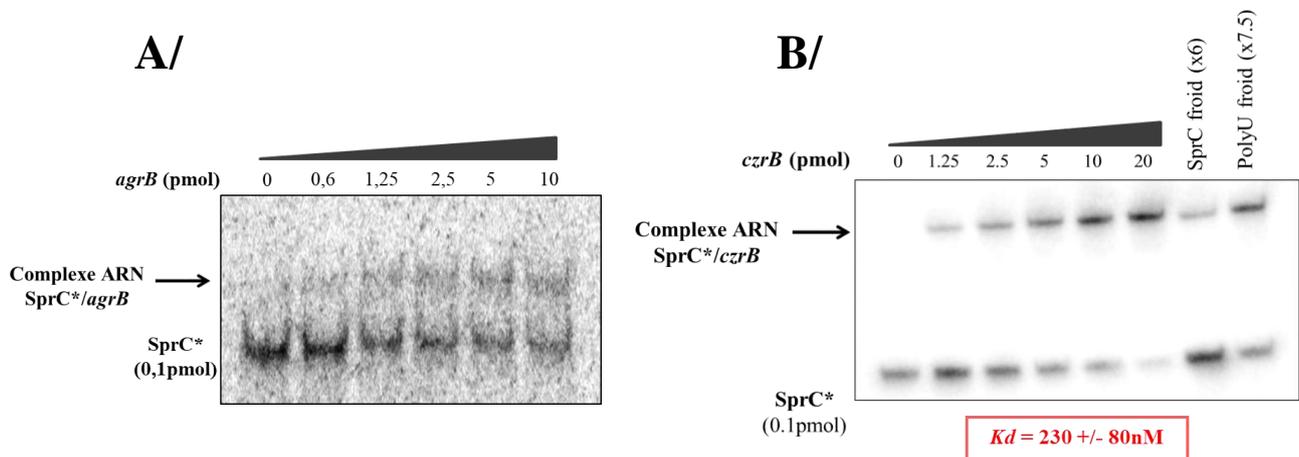
## 2- Vérification *in vitro* des interactions prédites entre SprC et ses cibles putatives

Suite à ces prédictions d'interaction, nous avons voulu les valider *in vitro* par retard sur gel. Pour cela, nous avons tout d'abord produit des transcrits centrés sur la zone d'interaction prédite pour chacune de nos cibles par transcription *in vitro*. En parallèle, nous avons également réalisé une transcription *in vitro* afin de produire l'ARNrég SprC que nous avons radiomarqué. Après ajout de quantités croissantes des ARNs cibles *deoD*, *mgrA* ou *agrC*, nous n'observons la formation d'aucun retard sur gel, témoin d'une éventuelle interaction SprC-Cible (Figures 45-A, B, C).



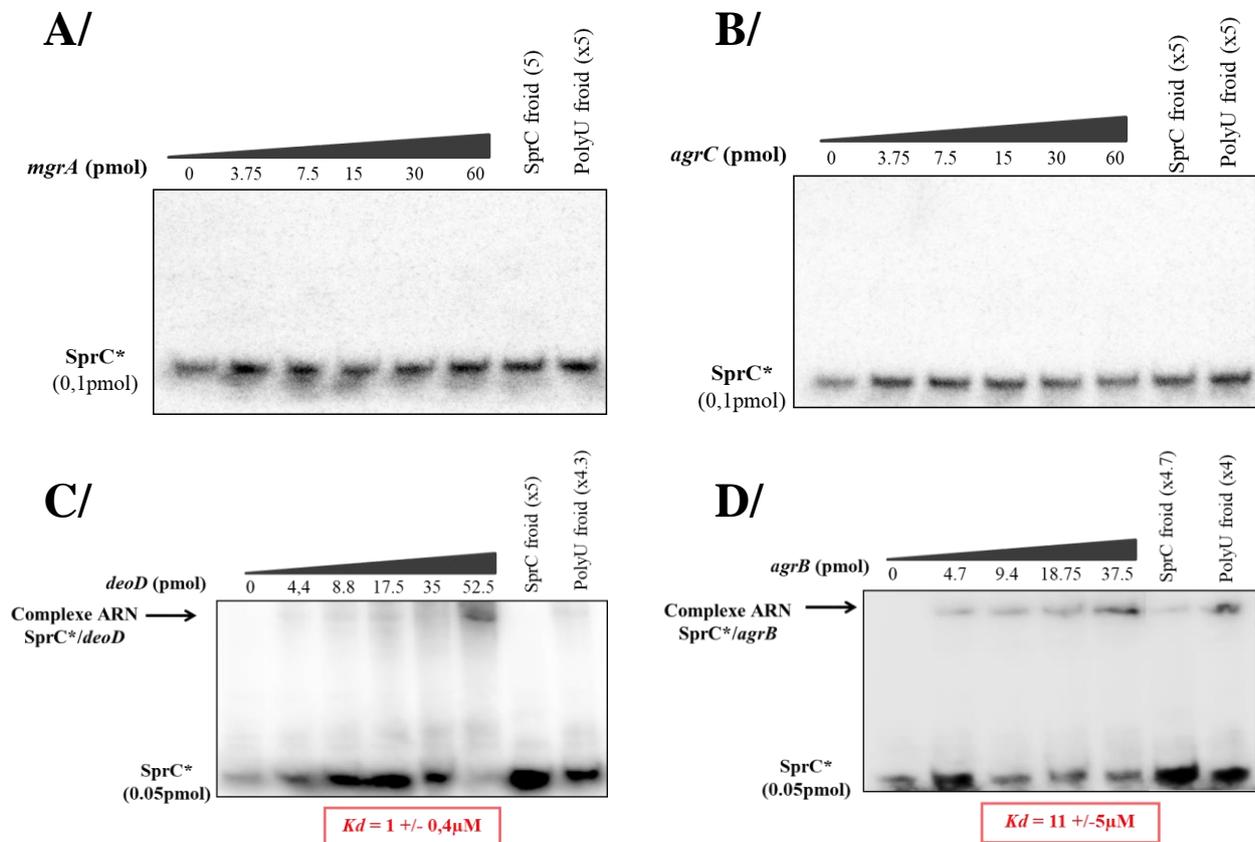
**Figure 45 : Retards sur gel ne montrant pas de complexe entre SprC et ses cibles putatives.** Les retards sur gel ont été effectués en utilisant le transcrit SprC radiomarqué et des quantités croissantes de transcrits *deoD* (A), de transcrits *mgrA* (B) et de transcrits *agrC* (C). La spécificité des complexes formés a été vérifiée par l'ajout d'un excès de transcrit SprC froid et de compétiteur non spécifique (polyU). Chaque retard sur gel a été réalisé en triplicat.

En revanche, lorsque l'on ajoute des quantités croissantes d'ARNs cibles *agrB* ou *czrB*, un retard sur gel se forme témoignant de la formation d'un complexe ARN avec SprC (Figures 46-A, B). Pour *czrB*, une constante de dissociation ( $K_d$ ) de 230 nM (+/-80) a été calculée.



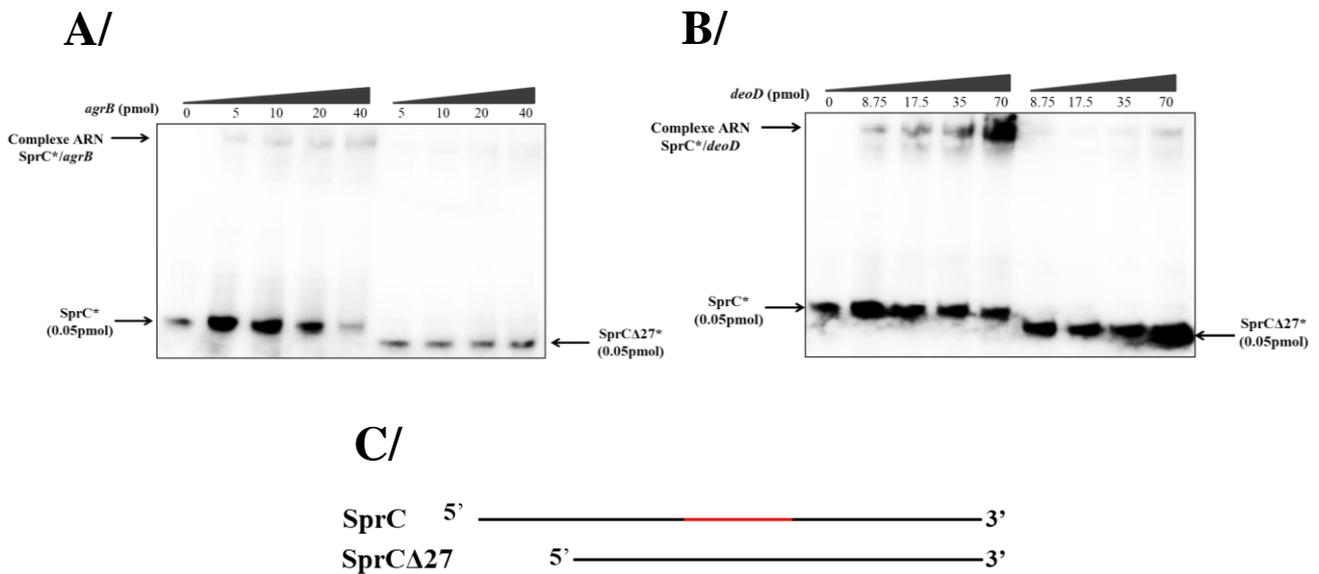
**Figure 46 : Retards sur gel démontrant la formation d'un complexe entre SprC et ses cibles putatives.** Les retards sur gel ont été effectués en utilisant le transcrit SprC radiomarqué et des quantités croissantes de transcrits *agrB* (A) et de transcrits *czrB* (B). La spécificité de complexe SprC-*czrB* formés a été vérifiée par l'ajout d'un excès de transcrit SprC froid et de compétiteur non spécifique (polyU).

Dans un second temps, étant donné que le retard sur gel formé entre SprC et *agrB* n'était pas très fort, nous avons voulu tester la forme complète du transcrit afin de voir si une meilleure conformation de *agrB* pouvait faciliter la formation de ce retard. Dans le même temps nous avons décidé de procéder de manière identique pour les trois transcrits n'ayant montré l'apparition d'aucun retard sur gel (*deoD*, *mgrA* et *agrC*). Après ajout de quantités croissantes de transcrits *mgrA* ou de transcrits *agrC*, nous n'observons toujours pas de formation de retard sur gel (Figures 47-A, B). En revanche, l'ajout de quantités croissantes d'une forme longue d'un transcrit *deoD* permet cette fois ci de former un retard sur gel témoignant d'une interaction SprC-*deoD* (Figure 47-C). Le  $K_d$  calculé pour cette interaction est de 1 $\mu$ M (+/- 0,4). De même, l'ajout de quantités croissantes d'une forme longue d'un transcrit *agrB* conduit à la formation d'un meilleur complexe SprC-*agrB* qu'avec une forme courte (Figure 47-D). Ce complexe a permis le calcul d'une constante de dissociation de 11 $\mu$ M (+/- 5 $\mu$ M).



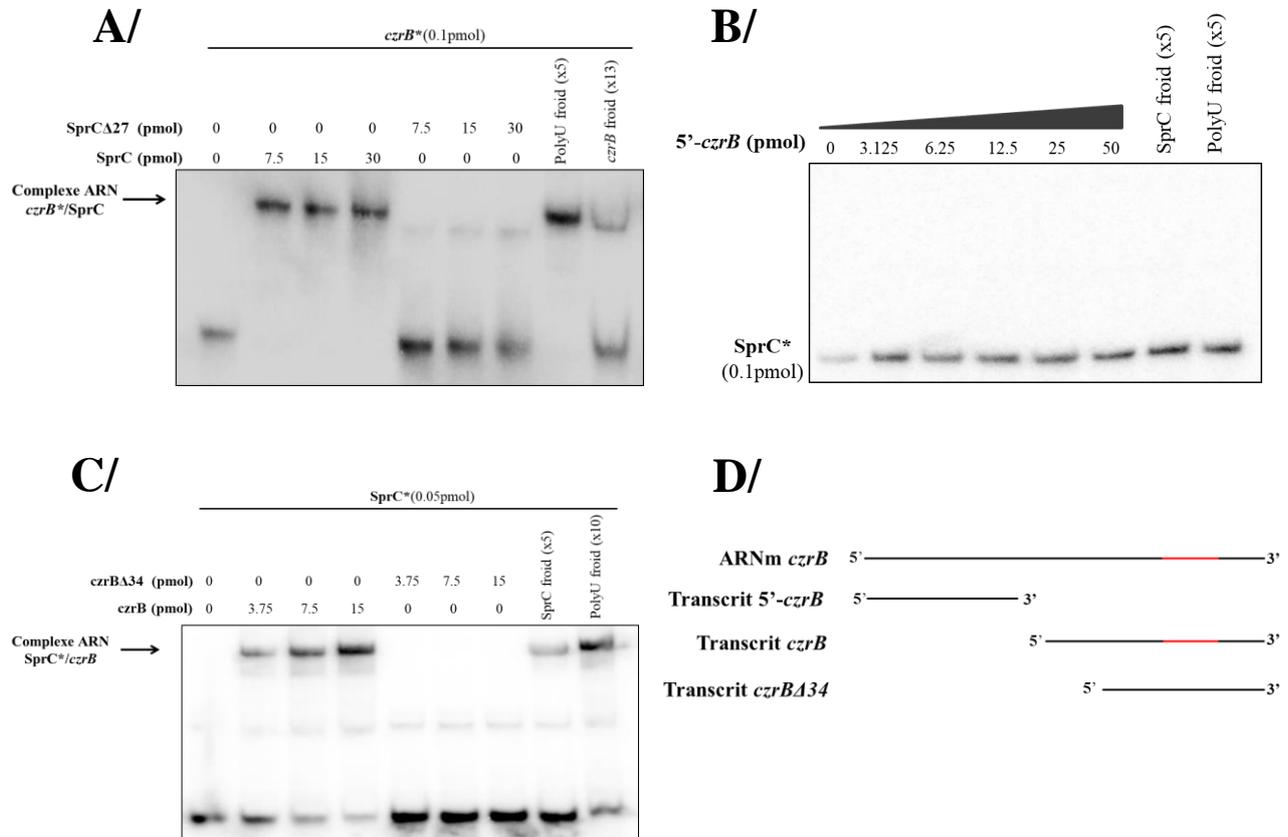
**Figure 47 : Retards sur gel utilisant une forme longue des transcrits cibles.** Les retards sur gel ont été effectués en utilisant le transcrit SprC radiomarqué et des quantités croissantes d’une forme longue des transcrits cibles. Aucune formation de complexe n’est observée pour *mgrA* (A) et *agrC* (B). Un retard sur gel se forme pour *deoD* (C) et *agrB* (D) démontrant une interaction avec SprC. La spécificité des complexes formés a été vérifiée par l’ajout d’un excès de transcrit SprC froid et de compétiteur non spécifique (polyU). Chaque retard sur gel a été réalisé en triplicat.

Afin de valider les interactions entre SprC et ses trois cibles putatives interagissant avec lui (*deoD*, *agrB* et *cztB*), nous avons construit un transcrit SprC délété pour la zone d’interaction prédite pour ces trois ARNm avec SprC (Figure 48-C). Ce transcrit, appelé SprC $\Delta$ 27, est délété pour les nucléotides G64 à A90 au niveau de la tige-boucle H2 de SprC. Ainsi, l’utilisation du transcrit SprC $\Delta$ 27 avec des quantités croissantes de transcrits *deoD* ou *agrB* montre une forte diminution du retard sur gel obtenu avec le transcrit SprC natif (Figures 48-A, B).



**Figure 48 : Retards sur gel utilisant un mutant de délétion de SprC pour la zone d'interaction prédite avec *deoD* et *agrB*.** Les retards sur gel ont été effectués en utilisant le transcrite SprC natif ou le mutant de délétion SprC $\Delta$ 27 radiomarqué et des quantités croissantes d'une forme longue des transcrits *agrB* (A) et *deoD* (B). Chaque retard sur gel a été réalisé en triplicat. (C) Représentation schématique des différents transcrits SprC utilisés. Le trait rouge correspond à la zone d'interaction prédite qui a été délétée.

On observe également une forte diminution du retard sur gel obtenu, après ajout de quantités croissantes de SprC $\Delta$ 27 radiomarqué à un transcrite *czrB*, par rapport à l'ajout de quantités croissantes de SprC natif radiomarqué (Figure 49-A). Pour confirmer la zone d'interaction prédite au niveau de l'ARN *czrB*, nous avons réalisé deux retards sur gel supplémentaires. Dans un premier temps, nous avons utilisé un transcrite contenant la moitié 5' de la séquence codante de *czrB* (Figure 49-D), n'interagissant pas avec SprC *in silico*. Dans un 2<sup>ème</sup> temps, nous avons construit un transcrite *czrB* délété pour la zone d'interaction prédite pour SprC avec *czrB* (Figure 49-D). Ce transcrite, appelé *czrB* $\Delta$ 34, est délété pour les nucléotides C864 à A898 sur *czrB*. Ainsi pour le deuxième retard sur gel, aucun complexe SprC-*czrB* n'est observé en utilisant la partie 5' de la séquence codante de *czrB* (Figure 49-B). De plus, l'ajout de quantités croissantes de *czrB* $\Delta$ 34 radiomarqué sur le troisième retard sur gel abolit totalement le complexe formé entre SprC et le transcrite *czrB* natif (Figure 49-C).

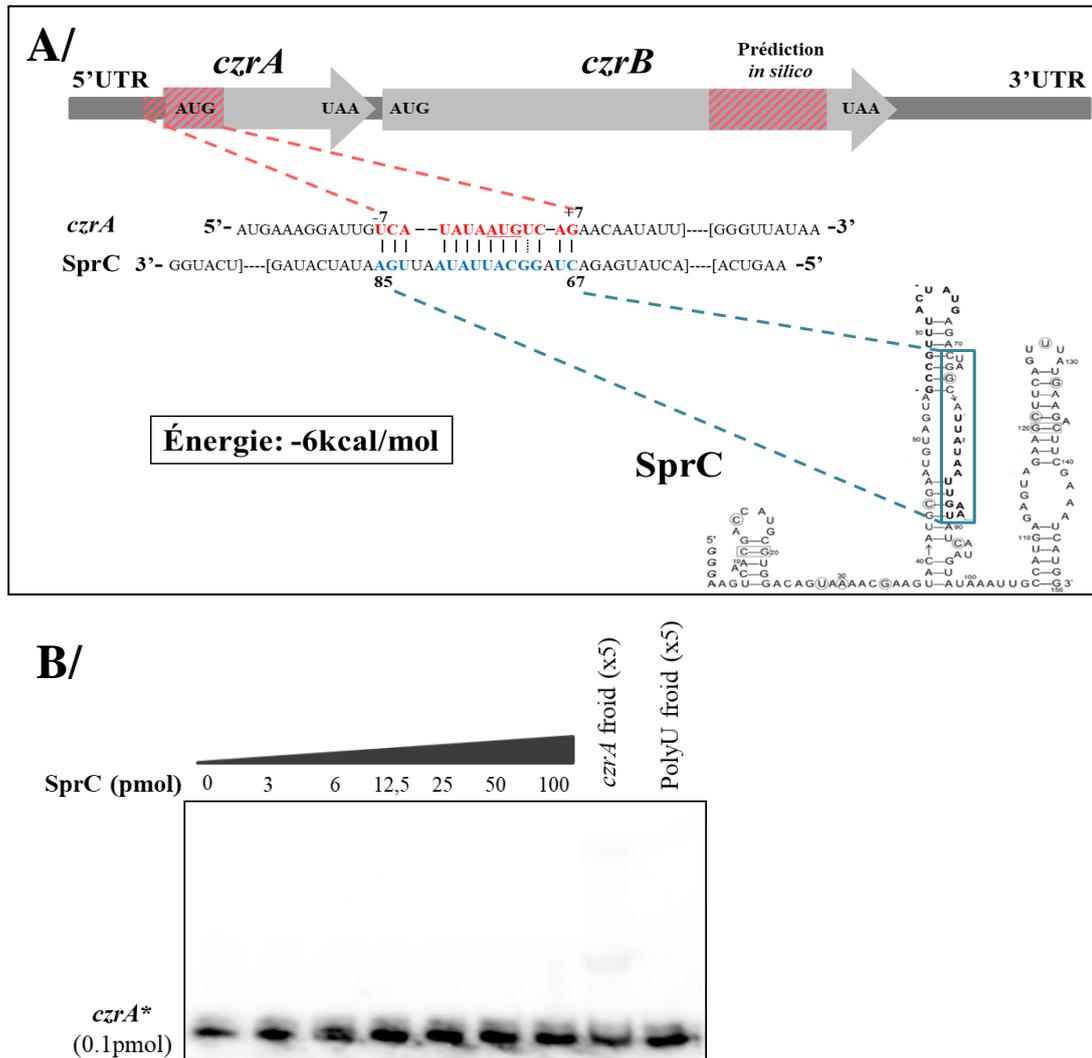


**Figure 49 : Retards sur gel utilisant des mutants de délétion de SprC et de *czrB* pour leur zone d'interaction respective.** Les retards sur gel ont été effectués en utilisant (A) des quantités croissantes de transcrits SprC natif ou du mutant de délétion SprC $\Delta$ 27 et le transcrit *czrB* radiomarqué, (B) des quantités croissantes de la moitié 5' de la séquence codante de *czrB* avec le transcrit SprC radiomarqué et (C) des quantités croissantes de transcrits *czrB* natif ou du mutant de délétion *czrB* $\Delta$ 34 et le transcrit SprC radiomarqué. La spécificité des complexes formés a été vérifiée par l'ajout d'un excès de transcrit SprC ou *czrB* froid et de compétiteur non spécifique (polyU). Chaque retard sur gel a été réalisé en triplicat. (D) Représentation schématique des différents transcrits *czrB* utilisés. Le trait rouge correspond à la zone d'interaction prédite qui a été délétée.

### 3- Caractérisation de l'interaction putative entre SprC et *czrA*

Pour aller plus loin dans la compréhension de l'interaction moléculaire entre SprC et *czrB*, nous avons regardé si l'autre membre de l'opéron, *czrA*, pouvait interagir avec SprC. La prédiction d'interaction *in silico* a ainsi montré une zone putative de fixation de *czrA* sur SprC (Figure 50-A). Cette interaction est située autour du codon d'initiation de la traduction de *czrA* (nucléotides -7 à +7) et possède une énergie de -6kcal/mol. Elle forme un appariement de bases imparfait de 14 nucléotides situé, ici aussi, au niveau de la tige-boucle H2 de SprC,

entre les nucléotides 67 et 85. Cependant, un retard sur gel utilisant des quantités croissantes de transcrits SprC avec un transcrit *czrA* radiomarqué, centré sur la prédiction d'interaction ne montre pas de formation de complexe entre les deux (Figure 50-B).



**Figure 50 : Caractérisation de l'interaction putative entre SprC et *czrA*.** (A) Prédiction d'interaction SprC-*czrA* (obtenue par IntaRNA). (B) Gel retard effectué en triplicat, en utilisant des quantités croissantes de transcrits SprC et un transcrit *czrA* radiomarqué.

Pour conclure, les données obtenues *in vitro* par retard sur gel, indiquent que l'ARNrég SprC se fixe avec une forte affinité à l'ARNm *czrB* ( $Kd = 230\text{nM} \pm 80$ ), mais semble interagir avec une affinité plus modeste avec l'ARNm *deoD* ( $Kd = 1\mu\text{M} \pm 0,4$ ) et avec une affinité encore moindre avec l'ARNm *agrB* ( $Kd = 11\mu\text{M} \pm 5$ ). En revanche, SprC n'interagit pas avec *mgrA*, *agrC* et *czrA* *in vitro*.

#### 4- Vérification « *in vivo* » des interactions prédites entre SprC et ses cibles putatives

Dans un deuxième temps, nous avons voulu étudier les interactions entre SprC et ses cibles putatives dans un contexte plus « *in vivo* », au sein de la bactérie. En effet, cela nous permettra d'obtenir des arguments forts pour confirmer les interactions démontrées précédemment *in vitro* avec *czrB*, *agrB* et *deoD*. De plus, pour *mgrA*, *agrC* et *czrA* qui n'interagissent pas *in vitro* avec SprC, nous n'excluons pas l'hypothèse que ces trois cibles potentielles aient besoin de la coopération d'un partenaire supplémentaire pour interagir avec SprC. Dans cette hypothèse, en ce mettant dans un contexte « *in vivo* » nous avons plus de chance de montrer une interaction avec SprC puisque ce partenaire putatif sera présent.

Dans ce but, nous avons utilisé un système rapporteur à double plasmides mis au point au laboratoire (Ivain L., *et al.*, 2017). Brièvement, cette technique consiste à transformer deux plasmides dans la souche *S. aureus* Newman que l'on étudie (Figure 51). Le premier plasmide, un vecteur à faible nombre de copies, contient une séquence contenant une partie du 5'UTR et le codon d'initiation de la traduction de notre cible ainsi que la zone d'interaction prédite suivie en phase de la séquence de la GFP (Green Fluorescent Protein). Le second, un vecteur à fort nombre de copies, contient la séquence de notre ARNreg, SprC, placée sous le contrôle de son promoteur endogène. Ainsi, s'il y a bien interaction entre SprC et sa cible ARNm, nous observerons une modification positive ou négative du niveau de fluorescence par rapport à un contrôle négatif ne surexprimant pas SprC. En plus de montrer une interaction directe entre SprC et la cible testée, cette technique présente également l'avantage de préciser le type de régulation, négative ou positive, exercée par SprC sur sa cible.

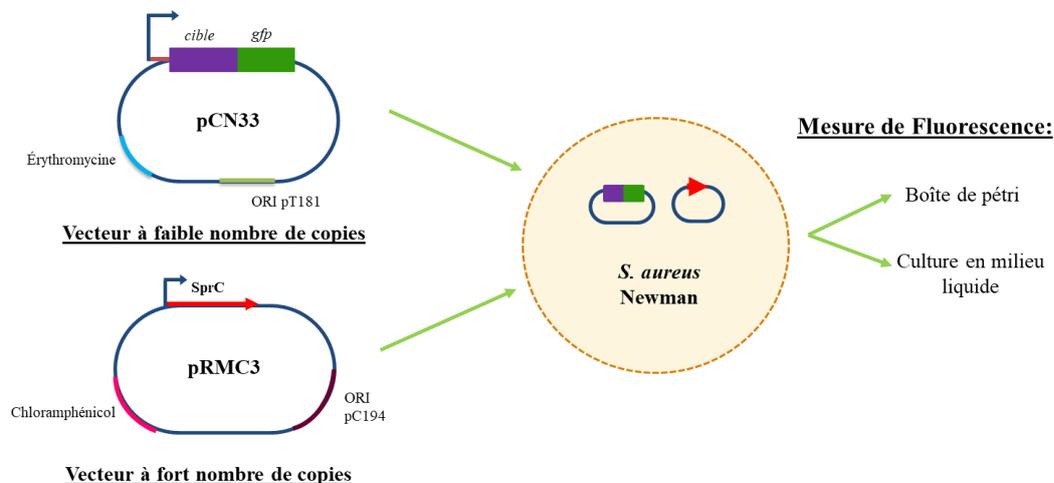
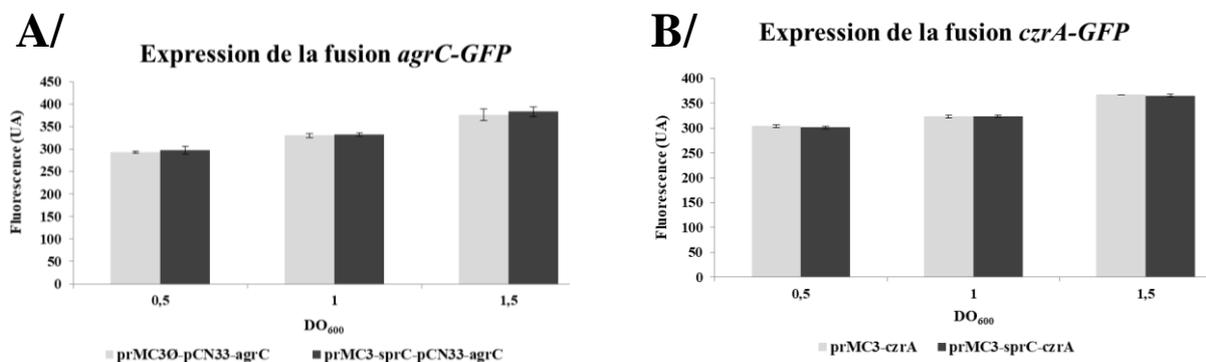


Figure 51 : Schéma représentant le principe du système rapporteur à double plasmides.

Pour commencer, nous avons utilisé le système rapporteur pour tester les cibles putatives pour lesquelles nous n'avons pas démontré d'interaction *in vitro*, c'est-à-dire *agrC* et *czrA*. Pour cela, les plasmides pCN33-*PamiA-agrC-gfp* et pCN33-*PamiA-czrAC-gfp* ont été respectivement co-transformés avec le plasmide pRMC3-SprC ou pRMC3 (vecteur contrôle) dans Newman. Pour *mgrA*, nous n'avons pas réussi à obtenir le plasmide de fusion pCN33-*PamiA-mgrA-gfp*. Les souches ont ensuite été mises en culture en microplaques et incubées pendant 22 heures, durant lesquelles l'absorbance à 600nm et la fluorescence (filtre d'excitation à 485/20nm et filtre d'émission à 528/20nm) ont été contrôlées toutes les 10 minutes. Comme on peut le voir sur la Figure 52, nous n'obtenons aucune différence de niveau de fluorescence pour ces deux cibles en présence ou en absence de SprC.

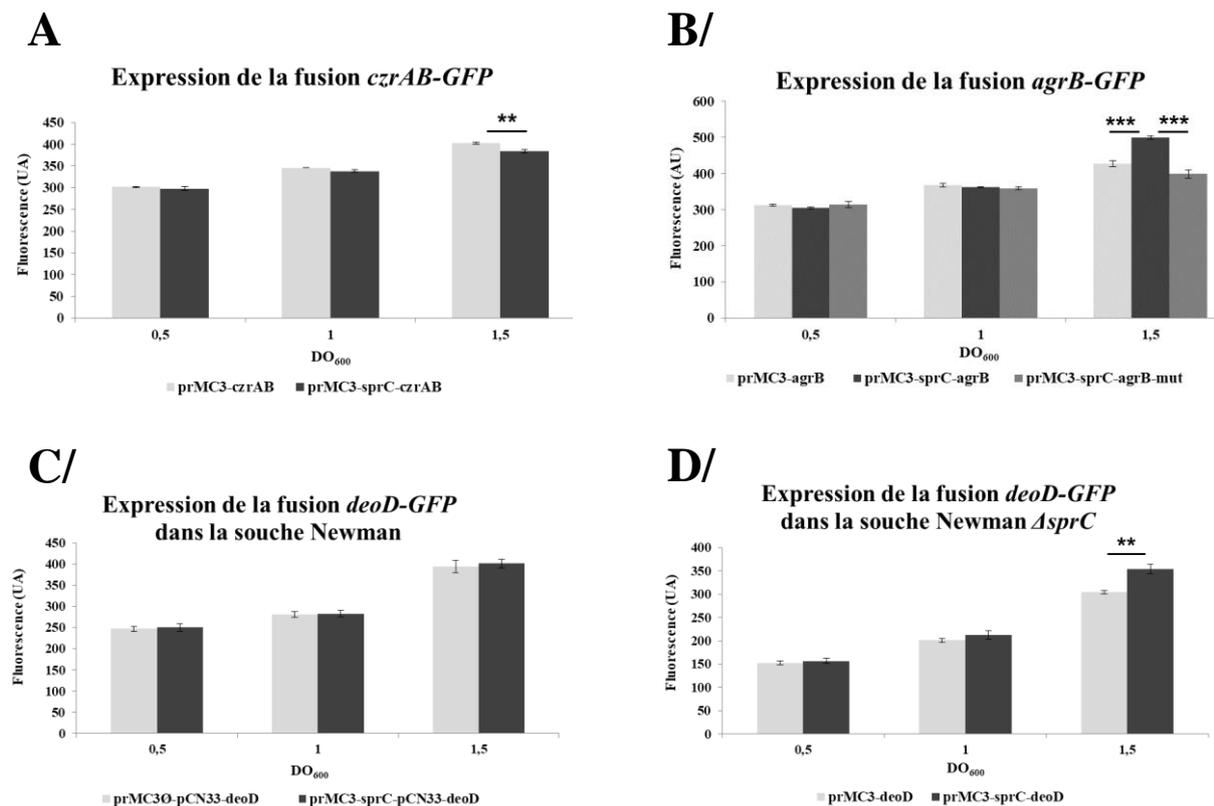


**Figure 52 : Vérification des interactions SprC-*agrC* et SprC-*czrA* avec le système rapporteurs à double plasmides.** Les souches co-transformées avec (A) pCN33-*PamiA-agrC-gfp* et pRMC3-SprC ou pRMC3 et celles co-transformées avec (B) pCN33-*PamiA-czrAC-gfp* et pRMC3-SprC ou pRMC3 ont été mises en culture. Les niveaux de fluorescence émis ont été normalisés par rapport à la DO<sub>600</sub>. Les données représentent la moyenne d'un triplicat biologique réalisé en triplicat technique.

Nous avons ensuite voulu confirmer les résultats obtenus *in vitro* montrant une interaction entre SprC et trois cibles : *czrB*, *deoD* et *agrB*. Pour cela, nous avons co-transformé les plasmides pCN33-*PamiA-agrB-gfp*, pCN33-*PamiA-czrAB-gfp* ou pCN33-*PamiA-deoD-gfp* avec le plasmide pRMC3-SprC ou le plasmide contrôle pRMC3 et suivi le niveau de fluorescence en culture en microplaques. Ainsi, la stimulation de l'expression de SprC diminue légèrement la fluorescence émise par les cellules contenant le pCN33-*PamiA-czrAB-gfp*, impliquant une régulation négative de sa traduction en phase stationnaire (Figure 53-A). En ce qui concerne *agrB*, la stimulation de l'expression de SprC active la traduction du transcrit *agrB-gfp* puisqu'on observe une augmentation du niveau de fluorescence dans les cellules contenant le pCN33-*PamiA-agrB-gfp* (Figure 53-B). Pour confirmer cet effet, nous

avons co-transformé le plasmide pCN33-*PamiA-agrB* $\Delta_{151-171}$ -*gfp* avec pRMC3-SprC ou pRMC3. Le pCN33-*PamiA-agrB* $\Delta_{151-171}$ -*gfp* exprime un transcrit déléte des nucléotides C<sub>151</sub> à A<sub>171</sub>, correspondant au domaine d'interaction avec SprC. Sur la Figure 53-B, on constate que la suppression de cette région sur *agrB* annule l'effet positif de SprC sur sa traduction, visible par le retour à un niveau basale de l'émission de fluorescence.

En revanche, l'expression de SprC n'a pas provoqué de modification du niveau de fluorescence des cellules ayant le pCN33-*PamiA-deoD-gfp* (Figure 53-C). Afin de s'affranchir du niveau basal de SprC pouvant interférer avec le système rapporteur, nous avons co-transformé pCN33-*PamiA-deoD-gfp* avec le pRMC3-SprC ou le pRMC3 dans une souche isogénique déléte pour *sprC*. Dans ces nouvelles souches, l'expression de SprC provoque une stimulation du niveau de fluorescence des cellules exprimant la fusion *deoD-gfp* témoin d'une régulation positive de SprC sur *deoD* (Figure 53-D).



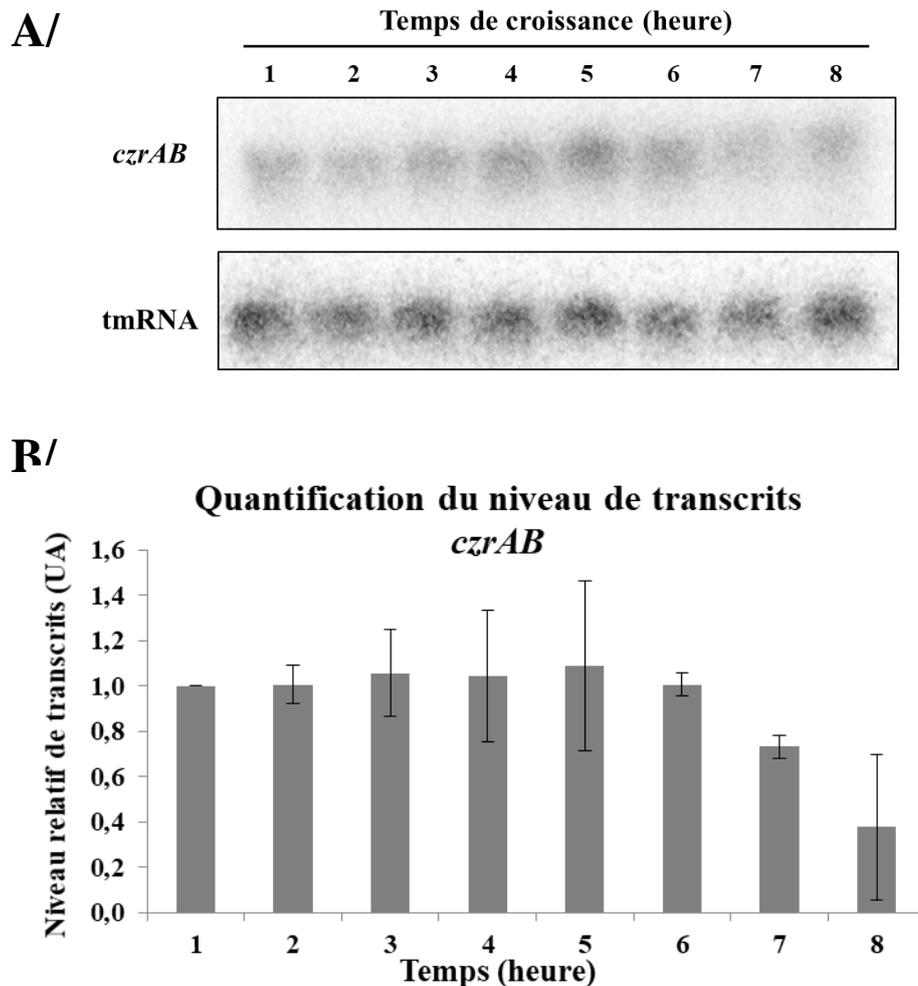
**Figure 53 : Confirmation des interactions SprC-cibles démontrées *in vitro* en utilisant un système rapporteur à double plasmides.** Les souches Newman exprimant (A) *czrAB-gfp*, (B) *agrB-gfp* ou *agrB* $\Delta_{151-171}$ -*gfp* et (C) *deoD-gfp* ainsi que (D) la souche isogénique déléte pour *sprC* exprimant *deoD-gfp* ont été mises en culture. Les niveaux de fluorescence émis ont été normalisés par rapport à la DO<sub>600</sub>. Les données représentent la moyenne d'un triplicat biologique réalisé en triplicat technique. Des tests-t de Student ont été réalisés pour déterminer les différences significatives (\*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001).

Pour la suite, nous avons décidé de nous focaliser plus attentivement sur l'étude de l'opéron *czrAB* pour plusieurs raisons. Tout d'abord, il s'agit de la cible pour laquelle nous avons obtenu la meilleure affinité *in vitro* par retard sur gel (Figure 46-B) avec un *Kd* de 230nM. De plus, en utilisant d'autres sites de prédictions de cibles d'ARN régulateurs comme RNA prédateur (Eggenhofer F., *et al.*, 2011) et Copra RNA (Wright P.R., *et al.*, 2014), pour chercher des cibles potentielles de SprC *in silico*, *czrB* est une des cibles que l'on retrouvait (données non présentées). De plus, il est connu que *czrAB* joue un rôle dans le transport du zinc à travers la membrane bactérienne afin de maintenir une concentration intracellulaire appropriée au mécanisme physiologique sans provoquer de toxicité (Kuroda M., *et al.*, 1999). De plus, il a été montré que lorsque la bactérie *M. tuberculosis* est internalisée par les macrophages, elle est confrontée à une explosion de zinc provenant des macrophages de l'hôte et atteignant le phagosome afin d'éliminer les micro-organismes intracellulaires (Botella H., *et al.*, 2011). Une telle explosion de zinc doit également se produire lors de l'invasion des macrophages humains par *S. aureus*. Cela permettrait d'expliquer le lien entre SprC et *czrB* dans un contexte intracellulaire. En effet, par une régulation négative de *czrB*, SprC pourrait diminuer l'efflux de zinc aboutissant à un stress toxique pour la bactérie et responsable de l'effet anti-virulent de SprC (Le Pabic H. *et al.*, 2015).

## **C/ Étude de la régulation de l'opéron *czrAB* par l'ARN SprC**

### **1- Étude du niveau de transcrits *czrAB***

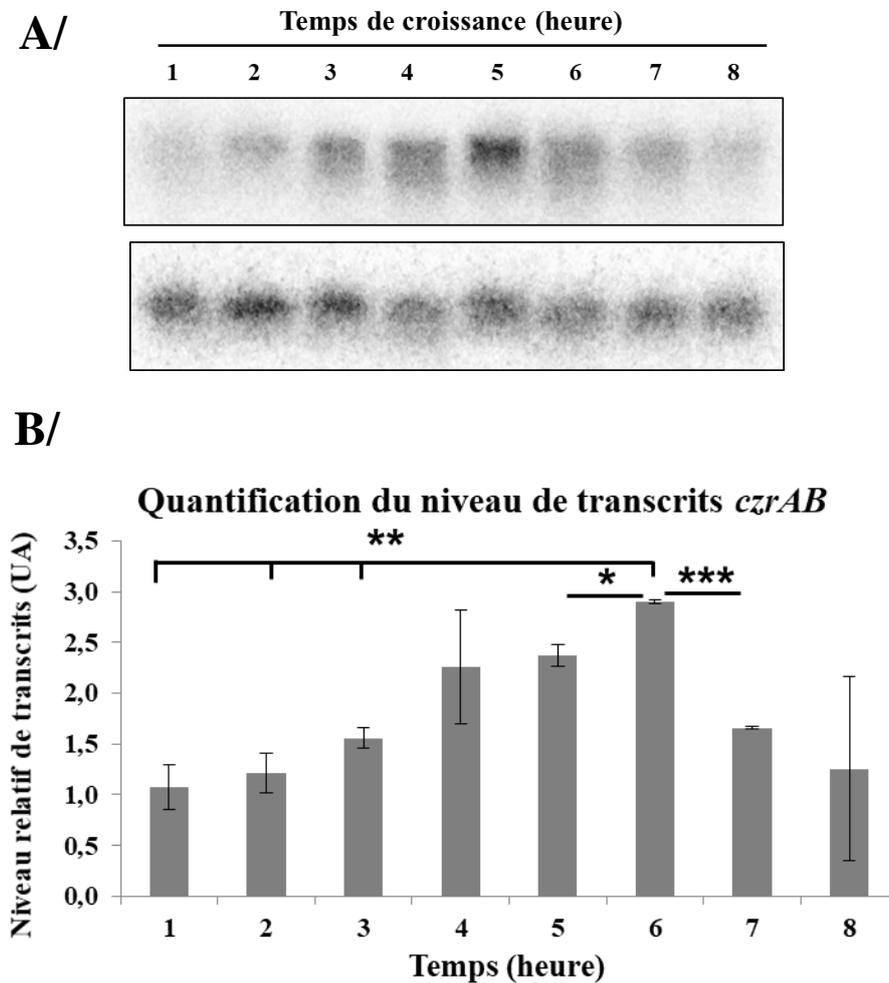
Pour l'étude de l'opéron *czrAB*, nous avons tout d'abord réalisé une cinétique bactérienne, en utilisant la souche Newman sauvage et la souche Newman délétée pour *sprC*, pendant laquelle nous avons prélevé des culots bactériens toutes les heures pendant 8 heures. Nous avons ensuite étudié le niveau de transcrits *czrAB* par Northern blot. Comme on peut le voir sur la Figure 54-A, le niveau de transcrits *czrAB* ne varie pas beaucoup dans la souche sauvage. Pour vérifier cela, nous avons réalisé une quantification relative du niveau de transcrits en fixant à 1 le temps T=1 heure (Figure 54-B). Cela nous a permis de constater que le niveau de *czrAB* est stable pendant les six premières heures de croissance avant de décroître.



**Figure 54 : Profil du niveau de transcrits de l'opéron *czrAB* au cours de la croissance bactérienne de la souche Newman sauvage. (A)** Analyse du niveau de transcrits de l'opéron *czrAB* par Northern blot, en utilisant l'*ARN<sub>tm</sub>* comme contrôle interne. Les données illustrent une expérience représentative parmi trois répliquats biologiques indépendants. **(B)** Quantification du niveau de transcrits de l'opéron *czrAB*. Le temps T=1 heure a été pris comme témoin et fixé à 1. Les autres temps ont été normalisés par rapport à celui-ci en utilisant l'*ARN<sub>tm</sub>* comme normalisateur. Les données présentées sont la moyenne de trois expériences indépendantes.

Dans la souche délétée de *sprC* (Figure 55-A), l'étude par Northern blot du profil d'expression montre un niveau basal de transcrits faible à 1 heure de croissance, suivi d'une augmentation pendant la phase exponentielle de croissance jusqu'à un pic à 5 heures de croissance. Ce pic est ensuite suivi d'une diminution du niveau de *czrAB* jusqu'à un niveau basal. Pour confirmer cela, nous avons réalisé, ici aussi, une quantification relative du niveau de transcrits en fixant à 1 le temps T=1 heure (Figure 55-B). Cette quantification nous permet de confirmer l'augmentation du niveau de transcrits avec un pic à 6 heures de croissance, d'un

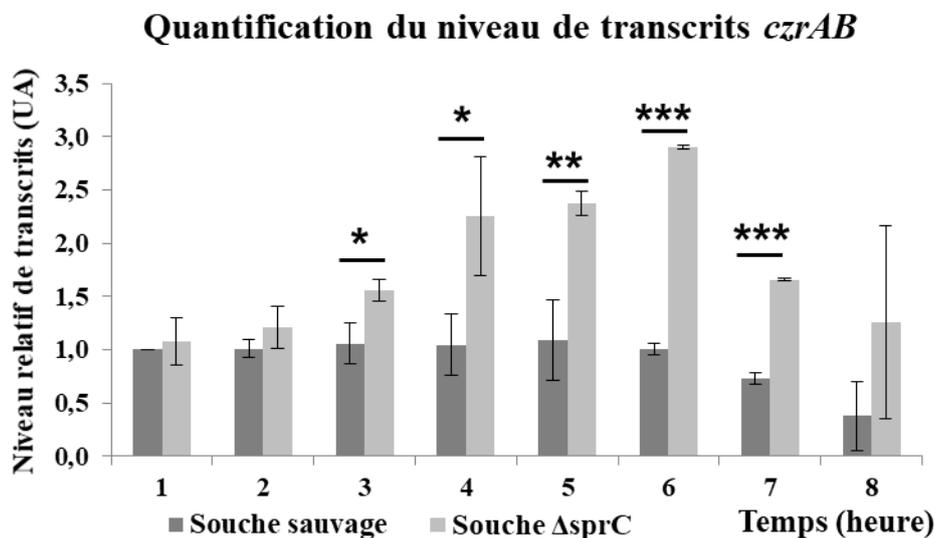
facteur 2,9 par rapport au témoin 1 heure, suivi d'une diminution à 7 heures d'un facteur 2 par rapport au pic.



**Figure 55 : Profil du niveau de transcrits de l'opéron *cztAB* au cours de la croissance bactérienne de la souche Newman délétée pour *sprC*.** (A) Analyse du niveau de transcrits de l'opéron *cztAB* par Northern blot, en utilisant l'*ARNtm* comme contrôle interne. Les données illustrent une expérience représentative parmi trois réplicats biologiques indépendants. (B) Quantification du niveau de transcrits de l'opéron *cztAB*. Le temps T= 1 heure a été pris comme témoin et fixé à 1. Les autres temps ont été normalisés par rapport à celui-ci en utilisant l'*ARNtm* comme normalisateur. Les données présentées sont la moyenne de trois expériences indépendantes. Des tests-t de Student pour données appariées ont été réalisés pour déterminer les différences significatives (\* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

En comparant les quantifications effectuées entre la souche sauvage et la souche délétée pour *sprC* ( $\Delta sprC$ ), on observe sur la Figure 56 que la présence de SprC provoque une diminution significative du niveau de transcrits de l'opéron *cztAB* entre 3 heures et 7 heures, avec des diminutions allant d'un facteur 1,5 (3 heures) à 2,9 (7 heures). SprC aurait donc un

effet répresseur sur la quantité de transcrits *czrAB* dans la souche sauvage, ce qui est en corrélation avec le léger effet observé lors de l'utilisation du système rapporteur à double plasmides (Figure 53-A).

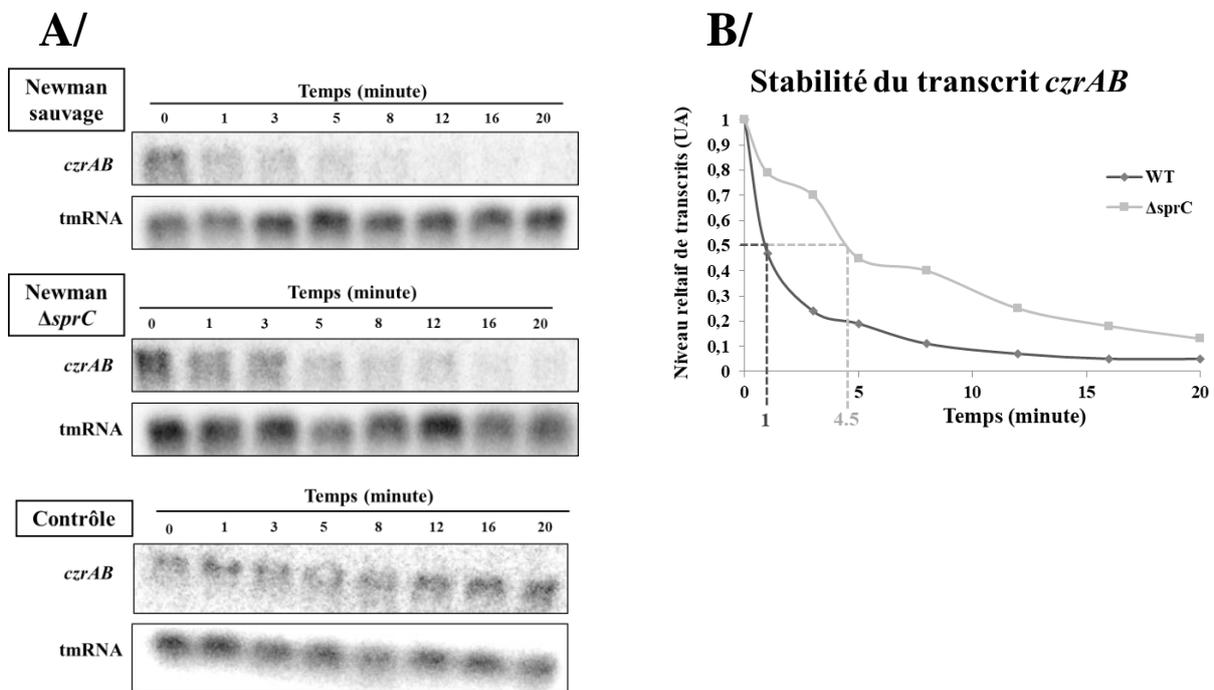


**Figure 56 : Comparaison du niveau de transcrits de l'opéron *czrAB* au cours de la croissance bactérienne dans les souches Newman sauvage et  $\Delta sprC$ .** Quantification du niveau de transcrits de l'opéron *czrAB* dans les souches Newman sauvage (en gris foncé) et  $\Delta sprC$  (en gris clair). Le temps T=1 heure de la souche sauvage a été pris comme témoin et fixé à 1. Les autres temps ont été normalisés par rapport à celui-ci en utilisant l'*ARNtm* comme normalisateur. Les données présentées sont la moyenne de trois expériences indépendantes. Des tests-t de Student ont été réalisés pour déterminer les différences significatives (\* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

## 2- Étude de la stabilité du transcrit *czrAB* en fonction de l'expression de SprC

L'étude du niveau de transcrits de *czrAB* au cours de la croissance nous a permis de montrer un effet répresseur de SprC sur cet opéron. De plus, compte tenu de l'interaction entre ces deux ARNs, située à la fin de la séquence codante de *czrB*, nous avons émis l'hypothèse que SprC pourrait réguler négativement l'opéron en jouant sur sa stabilité. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des expériences de stabilité. Pour cela, nous avons mis en culture une souche Newman sauvage et une souche Newman  $\Delta sprC$  pendant 3 heures. Ensuite, nous nous avons bloqué la transcription par ajout de rifampicine (200 $\mu$ g/mL) et avons prélevé des culots bactériens à différents temps de culture. De plus, nous avons réalisé un contrôle dans les mêmes conditions excepté que nous n'avons pas bloqué la transcription

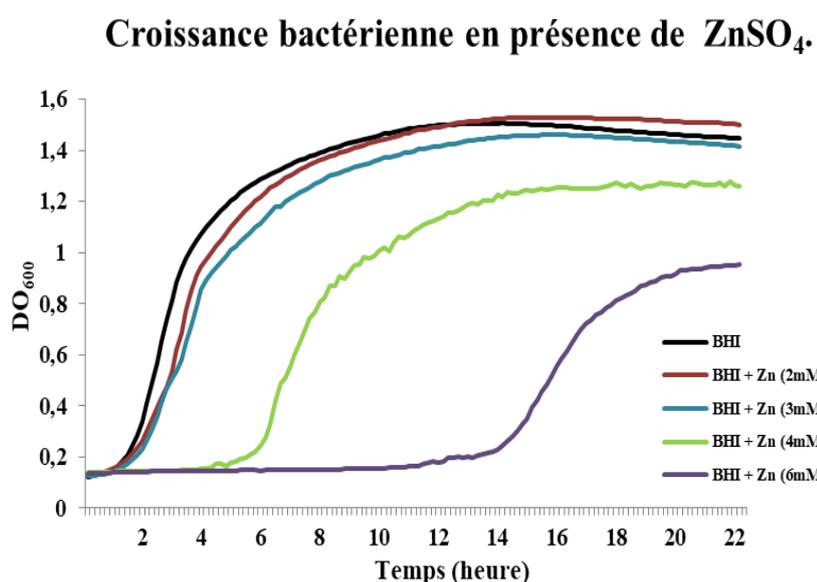
par ajout de rifampicine. L'étude de la stabilité par Northern blot (Figure 57-A) nous montre que la présence de SprC semble diminuer légèrement la demi-vie de l'opéron *czrAB* après ajout de rifampicine. Pour vérifier cela, nous avons réalisé une quantification relative de la quantité de transcrits en fixant à 1 le temps T=0 (Figure 57-B). Puis, nous avons calculé le temps pour obtenir une diminution de 50% du niveau de transcrits pour nos deux souches étudiées. Nous obtenons ainsi une demi-vie de 1,02 min (+/-0,14) pour *czrAB* dans la souche Newman sauvage tandis que dans la souche Newman  $\Delta sprC$ , elle passe à 5,96 min (+/-0,33). Ainsi, la délétion de SprC augmente la demi-vie de l'opéron *czrAB* d'un facteur 5,8 nous montrant ainsi que la régulation négative de SprC sur l'opéron *czrAB* s'effectue par une diminution de la stabilité de ce dernier.



**Figure 57 : Étude de la stabilité du transcrit *czrAB* en fonction de l'expression de SprC. (A)** Analyse du niveau de transcrits de l'opéron *czrAB* par Northern blot, en utilisant l'*ARNtm* comme contrôle interne. Les échantillons sont obtenus après ajout de rifampicine à 200 $\mu$ g/mL excepté pour le contrôle. Les données illustrent une expérience représentative parmi trois réplicats biologiques indépendants. **(B)** Quantification du niveau de transcrits de l'opéron *czrAB* dans les souches Newman sauvage (en gris foncé) et  $\Delta sprC$  (en gris clair). Le temps T=0 de chaque souche a été pris comme témoin et fixé à 1. Les autres temps ont été normalisé par rapport à celui-ci en utilisant l'*ARNtm* comme normalisateur. Les données présentées sont celles issues des calculs effectués pour les deux Northern blot de la Figure A.

### 3- Étude de l'application d'un stress lié au zinc sur les bactéries

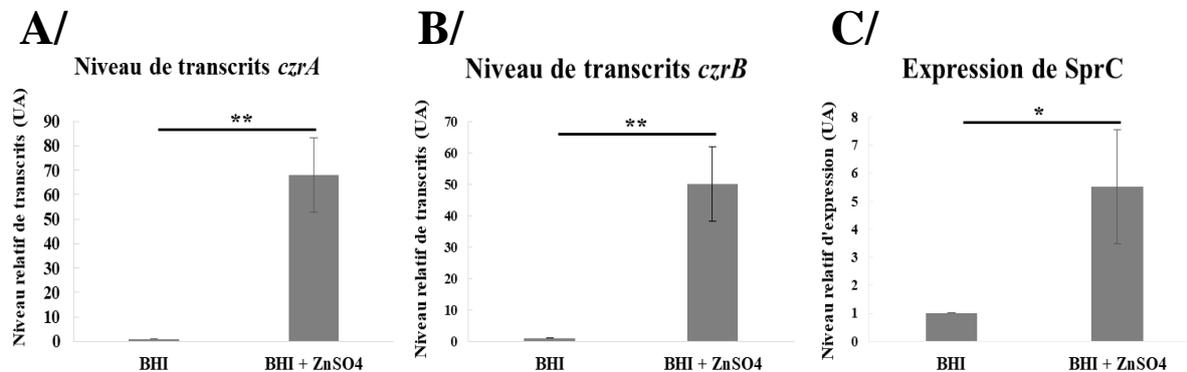
L'opéron *czrAB*, comme nous l'avons cité précédemment, est un transporteur connu pour jouer un rôle dans l'efflux de zinc et ainsi réguler l'homéostasie intracellulaire en zinc de la bactérie (Kuroda M., *et al.*, 1999). Nous avons donc décidé d'étudier l'effet d'un stress lié au zinc sur la croissance bactérienne. Nous avons tout d'abord réalisé des cinétiques de croissance en microplaques en présence de concentrations croissantes de  $\text{ZnSO}_4$  (Figure 58). On peut ainsi observer une toxicité temps-dépendant du zinc, avec un effet qui devient important entre 3mM et 4mM.



**Figure 58 : Cinétique de croissance en présence d'un stress lié au zinc.** *S. aureus* Newman a été mis en culture en microplaques en présence de concentrations croissantes de zinc (0, 2, 3, 4 et 6mM). Les données représentent la moyenne d'un triplicat biologique réalisé en triplicat technique.

Ensuite, nous avons voulu vérifier que la surexpression de l'opéron *czrAB* en présence de zinc, connue dans la littérature (Kuroda M., *et al.*, 1999), s'appliquait également dans notre souche *S. aureus* Newman. Pour cela, nous avons mis en culture la souche Newman dans du milieu BHI supplémenté en  $\text{ZnSO}_4$  (3mM) et nous avons prélevé un culot après 3 heures de croissance. Nous avons ensuite étudié par RT-qPCR la quantité de transcrits *czrA* et *czrB* (Figure 59). Nous nous sommes également intéressés à l'effet du zinc sur l'expression de *SprC* (Figure 59). Cela nous a permis de confirmer la forte surexpression de l'opéron en présence de zinc avec une augmentation du niveau de transcrits de *czrA* et *czrB* d'un facteur

68 (+/-15) et 50 (+/-12) respectivement (Figures 59-A, B). De plus, l'expression de SprC est également augmentée d'un facteur 5 (+/-2) en présence de zinc (Figure 59-C).

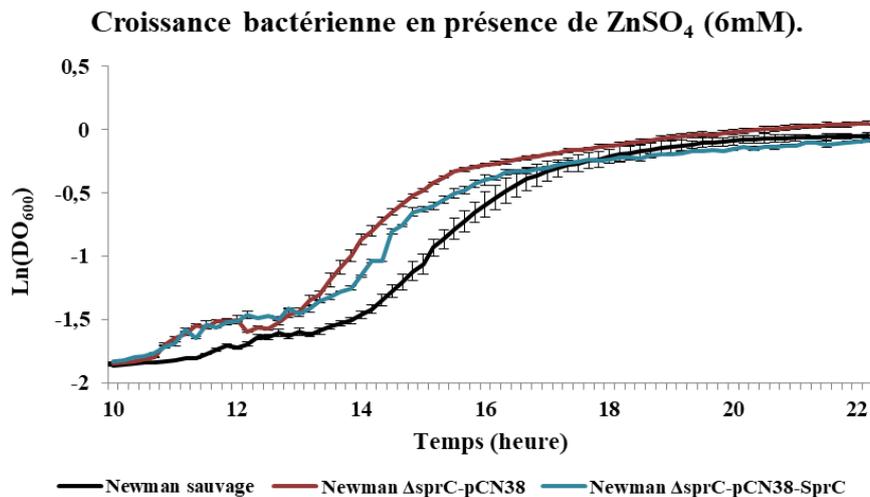


**Figure 59 : Effet du zinc sur les niveaux relatifs de transcrits *czrA*, *czrB* et SprC.** Les niveaux relatifs d'ADNc de *czrA* (A), *czrB* (B) et Sprc (C) ont été déterminés en utilisant l'*ARNtm* comme contrôle interne. Pour cela la souche Newman sauvage a été mise en culture pendant 3 heures dans du milieu BHI supplémenté ou non avec du zinc (3mM) Les données présentées sont la moyenne de quatre expériences indépendantes. Des tests de Welch ont été réalisés pour déterminer les différences significatives (\* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$ ).

Nous avons ensuite voulu voir si l'expression de SprC avait un impact sur la résistance des bactéries au stress lié au zinc. En effet, SprC régule négativement la quantité de transcrits *czrAB* ce qui doit se traduire par une diminution du transporteur *czrB* et donc d'un efflux du zinc moins important. Pour cela, nous avons tout d'abord réalisé des cinétiques de croissance en microplaques avec la souche Newman sauvage, la souche Newman  $\Delta sprC$  complétée avec le vecteur à faible nombre de copies pCN38-*sprC* et la souche Newman  $\Delta sprC$  possédant le vecteur pCN38 comme contrôle. La Figure 60 montre que l'absence de SprC permet à la souche Newman  $\Delta sprC$  de s'adapter plus rapidement au stress lié au zinc et de réduire sa phase de latence d'environ 2 heures. De plus, la biomasse est légèrement supérieure dans la souche  $\Delta sprC$  par rapport à la souche sauvage. Cependant, la souche  $\Delta sprC$  complétée avec le pCN38-*sprC* ne restaure que partiellement le phénotype.

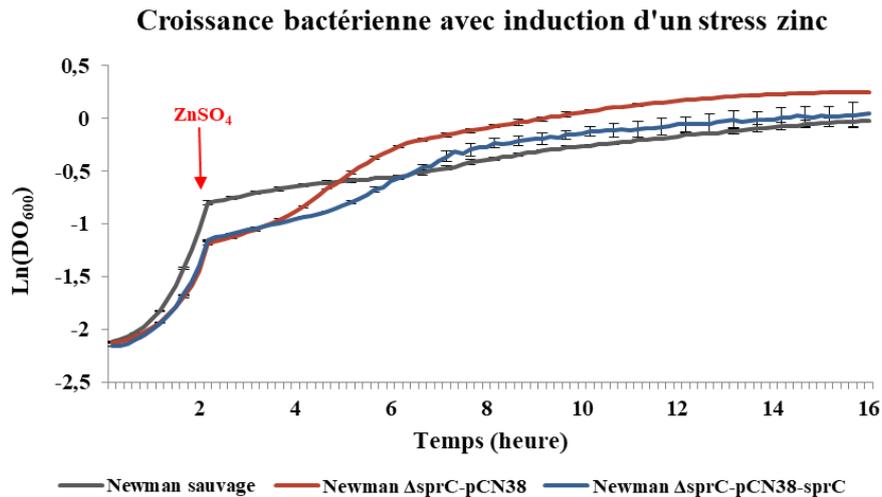
Pour aller plus loin dans la caractérisation des différences dans l'adaptation des souches Newman sauvage et Newman  $\Delta sprC$  au stress lié au zinc, nous avons calculé la vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle de croissance  $\mu_{max}$  pour nos trois souches ainsi que pour notre témoin Newman sans zinc, permettant ensuite le calcul du temps de génération G de chaque souche. La souche Newman sauvage possède un temps de

génération en présence de zinc de 8,8 min, c'est-à-dire deux fois plus que la souche sauvage en milieu BHI classique ( $G= 4,3$  min). De plus, la souche Newman  $\Delta sprC$ , en présence de zinc, diminue son temps de génération à 7 min alors que la souche  $\Delta sprC$  complétementée avec le plasmide pCN38- $sprC$  possède un temps de génération comparable à la souche sauvage ( $G= 9,1$ ). On voit donc que l'expression de  $SprC$  dans la souche sauvage entraîne une diminution du niveau de transcrits de la pompe d'efflux  $czrB$ , se traduisant par un temps de latence et un temps de génération plus important pouvant expliquer la résistance moindre vis-à-vis du stress lié au zinc.



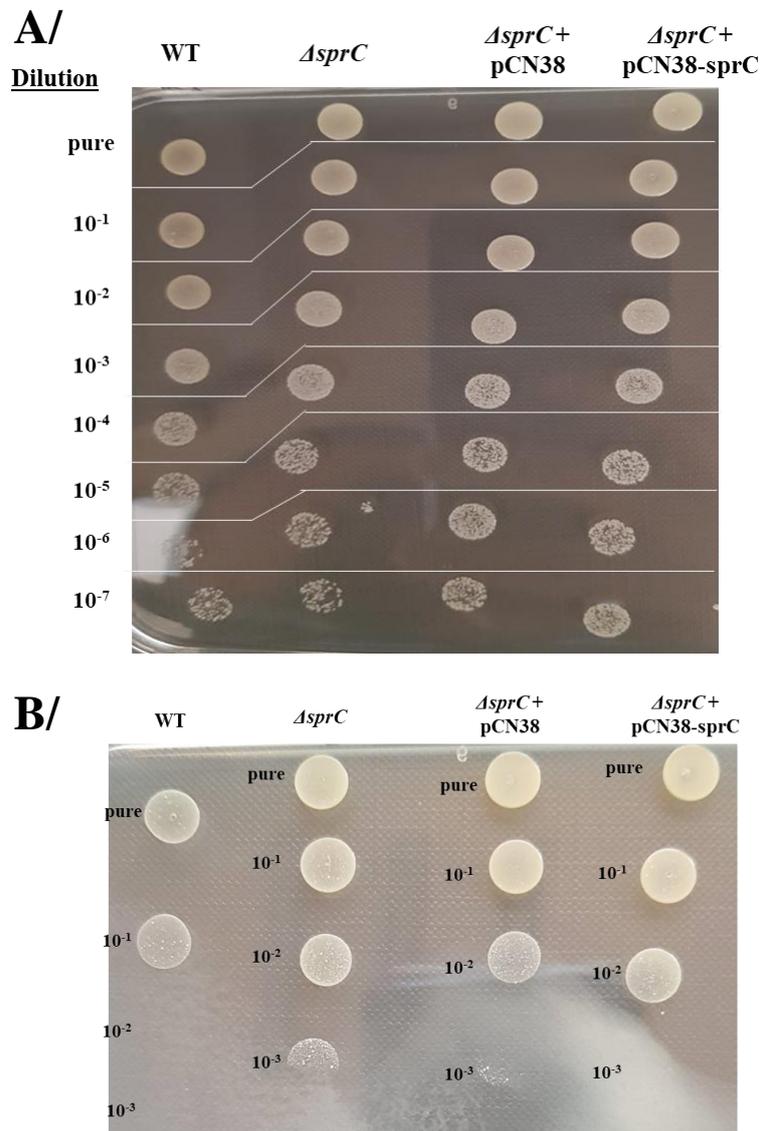
**Figure 60 : Cinétique de croissance en présence d'un stress lié au zinc (6mM de  $ZnSO_4$ ).** Les souches Newman sauvage (en noir), Newman  $\Delta sprC$  + pCN38 (en rouge) et Newman  $\Delta sprC$  + pCN38- $sprC$  (complémentation, en bleu) ont été mises en culture en microplaques dans du milieu BHI supplémenté en  $ZnSO_4$  (6mM). Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes réalisées en triplicat technique.

Dans un deuxième temps, nous avons laissé croître nos bactéries pendant 2 heures jusqu'à ce qu'elles soient en phase exponentielle de croissance avant d'appliquer le stress lié au zinc (Figure 61). L'induction du stress provoque une stase dans la croissance de la souche Newman sauvage. Dans le même temps, après une phase de latence, la souche Newman  $\Delta sprC$  entre dans une deuxième phase exponentielle de croissance. La biomasse finale est supérieure pour la souche  $\Delta sprC$  par rapport à la souche sauvage. De plus, la complémentation avec le plasmide pCN38- $sprC$  restaure le phénotype de croissance avec une atténuation de la biomasse malgré une courbe plus proche de celle de la souche  $\Delta sprC$  avec l'entrée dans une deuxième phase exponentielle, absente pour la souche sauvage.



**Figure 61 : Cinétique de croissance après induction d'un stress lié au zinc.** Les souches Newman sauvage (en noir), Newman  $\Delta sprC + pCN38$  (en rouge) et Newman  $\Delta sprC + pCN38-sprC$  (complémentation, en bleu) ont été mises en culture en microplaques dans du milieu BHI. Après 2H de croissance, un stress lié au zinc est appliqué par ajout de 6mM de  $ZnSO_4$  dans le milieu. Les données représentent la moyenne de deux expériences indépendantes réalisées en triplicat technique.

Pour finir, nous avons réalisé des expériences de toxicité sur boîte de pétri. Pour cela, nous avons procédé comme précédemment, c'est-à-dire que nous avons mis nos souches (Newman sauvage, Newman  $\Delta sprC$ , Newman  $\Delta sprC + pCN38$  et Newman  $\Delta sprC + pCN38-sprC$ ) en culture dans du milieu BHI. Après 2 heures de croissance, nous avons induit un stress par ajout de 6mM de  $ZnSO_4$  dans le milieu et, après 6 heures de croissance supplémentaire, nous avons dilué en cascade nos souches etensemencé une goutte (20 $\mu$ L) de chaque dilution sur boîte TSB (Bouillon tryptone caséine soja) et TSB + 6mM de  $ZnSO_4$ . Sur boîte TSB (Figure 62-A), on constate que nos quatre souches ont poussé et qu'il n'y a pas de différence visible entre elles. En revanche, lorsque nos souches sont mises sur boîte TSB+ 6mM de  $ZnSO_4$  (Figure 62-B), maintenant ainsi la pression de sélection liée au zinc, on remarque que la souche sauvage ne pousse que pour les deux premières dilutions (pure et  $10^{-1}$ ) alors que la souche  $\Delta sprC$  pousse jusqu'à la dilution  $10^{-3}$ . La souche  $\Delta sprC + pCN38$  a un profil similaire à celui de la souche  $\Delta sprC$  même si le spot à  $10^{-3}$  est moins important. Enfin, la souche de complémentation  $\Delta sprC + pCN38-sprC$  ne restaure pas le phénotype. On remarque également que les deux spots (pure et  $10^{-1}$ ) au niveau de la souche sauvage semblent moins denses que pour les trois autres souches suggérant un début de toxicité visible même pour le dépôt pur. Cette expérience n'a pu être effectuée qu'une seule fois et nécessitera d'être reproduite avant de pouvoir conclure.



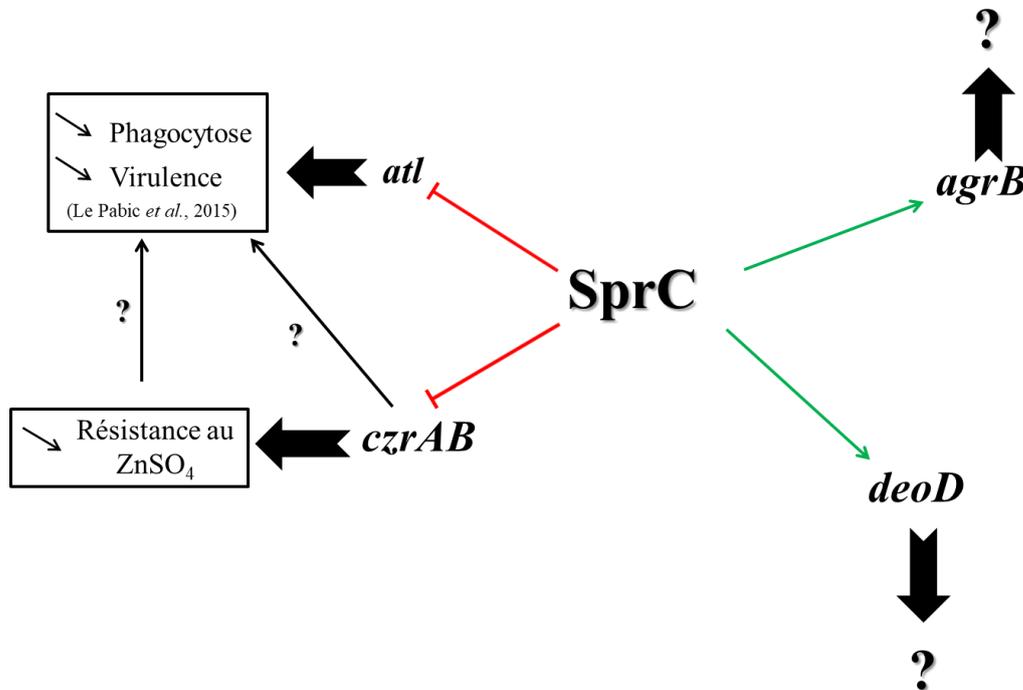
**Figure 62 : Expériences de toxicité sur boîtes.** Nos souches (Newman sauvage, Newman *ΔsprC*, Newman *ΔsprC* + pCN38 et Newman *ΔsprC* + pCN38-sprC) ont été mises en culture pendant 2 heures avant ajout de 6mM de de ZnSO<sub>4</sub>. Après 6H de culture supplémentaire, celles-ci ont été diluées en cascade et une goutte (20μL) de chaque dilution a été déposée **(A)** sur boîte TSB ou **(B)** sur boîte TSB + 6mM de de ZnSO<sub>4</sub>.

Dans cette partie I, nous avons identifié plusieurs cibles putatives de l'ARN régulateur SprC : la protéine ribosomale S2 (Figure 45 ; Tableau 3) au niveau protéique ainsi qu'une liste de 14 ARNm (Tableau 4) au niveau ARN. Suite à cette identification, nous avons sélectionné parmi ces cibles celles qui jouaient un rôle potentiel dans la virulence et/ou l'internalisation afin de les relier aux phénotypes de SprC et ainsi expliquer son rôle (Le Pabic H., *et al.*, 2015). Nous avons ensuite mis en évidence des interactions putatives entre ces cibles sélectionnées et SprC par prédictions *in silico* en utilisant IntaRNA (Mann M., *et al.*, 2017). Dans un deuxième temps nous avons validé *in vitro* à l'aide d'expériences de retard sur gel, les interactions SprC-*cztB* ( $K_d = 230\text{nM}$  ; Figure 46-B), SprC-*deoD* ( $K_d = 1\mu\text{M}$  ; Figure 47-C) et SprC-*agrB* ( $K_d = 11\mu\text{M}$  ; Figure 47-D). Dans le but de valider totalement ces interactions, nous avons utilisé un système rapporteur à double plasmides permettant de vérifier des interactions dans un contexte « *in vivo* » dans la bactérie. Cela nous a permis de montrer un léger effet négatif de SprC sur la traduction de *cztAB* (Figure 53-A), un effet positif de SprC sur la traduction de *agrB* et un effet positif de SprC (Figure 53-C) sur la traduction de *deoD*, observé uniquement dans une souche délétée pour *sprC* (Figure 53-D).

Nous nous sommes ensuite intéressés plus particulièrement à l'opéron *cztAB*, dont le rôle est de réguler l'homéostasie intracellulaire en zinc de la bactérie afin de lui permettre d'effectuer les processus physiologiques liés au zinc sans subir la toxicité d'un excès de ce dernier. Nous avons ainsi montré, dans un premier temps, que la régulation négative de SprC sur la traduction de l'opéron avait lieu au niveau ARNm, et notamment à partir de 3 heures de croissance (Figure 56). Cette régulation passe par une diminution de la stabilité de l'ARNm d'un facteur 5,8 lorsque SprC est exprimé (Figure 57). Par la suite, l'étude de l'effet du zinc sur la bactérie nous a permis de mettre en évidence que l'ARN SprC était surexprimé d'un facteur 5 en présence de zinc (Figure 59-C). De plus, l'expression de SprC augmente la sensibilité de la souche Newman à un stress lié au zinc comparé à la souche  $\Delta\text{sprC}$  (Figure 60-61-62).

Le zinc, en plus d'être essentiel aux processus enzymatiques bactériens, s'avère jouer un rôle important dans l'immunité innée et adaptative. En effet, celui-ci peut tout d'abord être séquestré afin d'empêcher les bactéries de l'utiliser (Ong C.L.Y., *et al.* 2018). De plus, une fois internalisées, les bactéries sont confrontées à une explosion de la concentration de zinc suggérant un rôle anti-bactérien de ce métal (Botella H., *et al.*, 2011 ; Botella H., *et al.*, 2012 ; Hasan R., *et al.*, 2012 ; Niederweis M., *et al.*, 2015 ; Ong C.L.Y., *et al.* 2018 ; Gao H., *et al.*,

2018). Cet effet du zinc ainsi que le rôle de SprC dans l'internalisation des bactéries par les macrophages humains nous a donc conduit à vouloir étudier le rôle de cet ARNm, ainsi que celui des autres cibles validées (*deoD* et *agrB*), dans un contexte intracellulaire.



**Figure 63 : Schéma récapitulatif des régulations de SprC sur ses cibles.** L'interaction de SprC avec l'ARNm *atl* induit une régulation négative de sa traduction conduisant à une diminution de la virulence et de la phagocytose des bactéries (Le Pabic H., *et al.*, 2015). L'interaction avec l'ARNm *cztAB* provoque une diminution de sa stabilité diminuant la résistance de la bactérie à un stress lié au zinc. L'interaction de SprC avec les ARNm *deoD* et *agrB* permet une régulation positive de leur traduction. Cependant, aucun effet physiologique n'a pu être mis en évidence pour ces deux cibles. Les flèches vertes indiquent des régulations positives, les flèches interrompues rouges indiquent des régulations négatives et les flèches noires correspondent aux effets physiologiques découlant de ces régulations

## II] Étude du lien entre SprC et les cibles validées dans un contexte d'interactions hôte-pathogène

SprC jouant un rôle dans l'internalisation des bactéries par les macrophages humains (Le Pabic H., *et al.*, 2015), nous avons pris en compte ce paramètre pour choisir les cibles à étudier. En effet, parmi les cibles sélectionnées et dont les interactions ont été validées *in vitro* avec SprC, on retrouve *czrB*, *deoD* et *agrB*. CzrB est un transporteur membranaire impliqué dans l'efflux du zinc (Kuroda M., *et al.*, 1999) pouvant être important dans la résistance de *S. aureus* au burst de zinc déclenché par son internalisation dans les cellules immunitaires (Botella H., *et al.*, 2011). DeoD est une purine nucléoside phosphorylase, enzyme clé dans la voie de récupération des purines pouvant être importante pour la survie intracellulaire de *S. aureus* (Grenha R., *et al.*, 2005 ; Luo W. *et al.*, 2011 ; Dalberto P.F., *et al.*, 2018). Enfin, AgrB fait partie du système de Quorum Sensing Agr et permet la maturation et l'export de l'AIP dans le milieu extracellulaire (Haag A.F., *et al.* 2015 ; Jenul *et al.*, 2018 ; Tan L., *et al.*, 2018). Ce système est essentiel à la survie intracellulaire de *S. aureus* puisqu'un mutant *agr* ne survie pas dans les macrophages dérivés de monocytes humains (Kubica M., *et al.*, 2008). De plus, son expression est augmentée à la sortie du phagolysosome ou lors de la lyse de la cellule hôte, pour permettre notamment la production d'exo-protéines (Flannagan R.S., *et al.*, 2015 ; Horn J., *et al.*, 2018).

Afin d'étudier ces cibles dans un contexte intracellulaire, nous avons dû mettre au point un protocole d'extraction des ARNs bactériens après internalisation par les cellules hôtes. En effet, le protocole utilisé au laboratoire ne permettait ni un bon rendement ni une bonne qualité des ARNs extraits posant problème pour la reproductibilité des résultats obtenus. De plus, un des défis techniques majeurs de ce protocole est l'énorme excès d'ARNs eucaryotes par rapport aux ARNs bactériens (Humphrys M.S., *et al.*, 2013), devant être éliminés pour obtenir des données transcriptomiques spécifiques et fiables sur l'expression des gènes des agents pathogènes intracellulaires. Pour ce faire, des méthodes d'extraction ont été développées afin de purifier les ARNs d'organismes procaryotes ou eucaryotes avec une efficacité et une qualité supérieure (Heptinstall J., 1998 ; Ares M., 2012). Pour l'extraction d'ARNs bactériens à partir d'une population homogène de bactéries, la collecte d'ARNs intacts et non dégradés est relativement facile et comprend une lyse mécanique ou enzymatique dans des conditions dénaturantes, pour l'ouverture des cellules (Ablain W., *et al.*, 2009 ; Rio D.C.,

*et al.*, 2010), suivie d'une extraction phénolique des acides nucléiques (Sambrook J., *et al.*, 2006) et d'un traitement à la DNase.

Cependant, lorsqu'elles sont réalisées à partir de mélanges complexes d'organismes eucaryotes et procaryotes, les extractions d'ARNs sont plus compliquées. De façon surprenante, très peu de méthodes sont disponibles pour extraire les ARNs bactériens à l'intérieur des cellules eucaryotes pendant l'infection (Voyich J.M., *et al.*, 2005 ; Di Cello F., *et al.*, 2005 ; Garzoni C., *et al.*, 2007). Des billes de zirconium ont déjà été proposées pour purifier les ARNs totaux en vue de la découverte d'ARNrég dans les bactéries (Gelderman G., *et al.*, 2013) mais dans l'ensemble, ces stratégies fournissent de faibles quantités d'ARNs purifiés, insuffisantes pour les analyses systématiques par RT-qPCR ou par Northern blot de l'expression des gènes bactériens à l'intérieur des cellules hôtes. Ces méthodes impliquent la lyse des cellules hôtes (mélange phénol/éthanol ; tampon RLT du kit Qiagen, ou mélange acétone glacée/éthanol) pour laisser les cellules bactériennes intactes et la purification ultérieure des ARNs totaux. De plus, la plupart des méthodes comportent une étape d'enrichissement des ARNs bactériens avec un kit commercial dédié, augmentant ainsi le coût de la procédure (Di Cello F., *et al.*, 2005 ; Garzoni C., *et al.*, 2007). Pour l'extraction des ARNs de *S. aureus*, la plupart des protocoles utilisent des kits commerciaux (Voyich J.M., *et al.*, 2005 ; Garzoni C., *et al.*, 2007). Le protocole de Wolz C. et ses collaborateurs comporte une lyse des bactéries dans les culots bactéries/débris cellulaires avec du Trizol et des billes de silice-zirconium (100µM de diamètre) dans un homogénéisateur à grande vitesse, pour isoler les ARNs totaux (Wolz C., *et al.*, 2002). Pour *S. typhimurium*, les premières méthodes décrites utilisaient un mélange de 0,1% de SDS, 1% de phénol acide et 19% d'éthanol pour lyser les cellules épithéliales infectées (Eriksson S., *et al.*, 2003 ; Hautefort I., *et al.*, 2008). Ensuite, les ARNs de *S. typhimurium* étaient préparé à l'aide d'un kit de purification des ARNs totaux (Promega SV total RNA purification kit) selon les recommandations du fabricant, suivie d'une purification supplémentaire au phénol/chloroforme. Une deuxième méthode utilise du Trizol pour extraire les ARNs, après lyse des cellules hôtes avec du PBS-0,1% Triton X-100 (Gu H., *et al.*, 2017).

## **A/ Article 1: Selective recovery of RNAs from bacterial pathogens after their internalization by human host cells**

### **1- Choix des billes d'extraction**

Après l'internalisation des bactéries par les cellules humaines, l'extraction des ARNs bactériens permet d'étudier l'expression des gènes bactériens dans diverses cellules hôtes. Lors de la mise au point du protocole, nous avons tout d'abord testé différents types de bille (Tableau 1, Article 1). Nous avons réalisé des extractions d'ARNs totaux, après internalisation, en utilisant ces billes. De plus deux contrôles ont été réalisés : un premier consistant en une extraction d'ARNs de bactéries non internalisées avec chacune des différentes sortes de bille et un deuxième consistant en une extraction d'ARNs eucaryotes à l'aide du Mini Kit RNeasy® (Quiagen, Venlo, Pays-Bas). Cela nous permettra ensuite de comparer les ARNs totaux extraits après internalisation avec les deux bandes correspondant aux ARNr 23S et 16S extraits des témoins procaryotes non internalisés, ainsi qu'avec les deux bandes correspondant aux ARNr 28S et 18S extraits du témoin eucaryote. Cette comparaison nous indiquera la proportion d'ARNs procaryotes et eucaryotes récupérés lors de l'extraction. L'utilisation des billes 1 ou 4, permet une détection des ARNr bactériens intacts, avec des quantités faibles d'ARNr humains visibles (Figure 1, Article 1). En revanche, l'utilisation des billes 2, 3 et 5 sont inappropriées pour la récupération d'ARNs bactériens après internalisation par les cellules hôtes (Figure 1, Article 1). Les billes 1, constituées de zirconium et d'une taille de 100µm de diamètre, ont finalement été sélectionnées sur la base de la quantité d'ARNs collectés estimée par (i) le dosage des échantillons au spectrophotomètre Nanodrop (Thermo Scientific, Waltham, USA), (ii) l'intégrité visuelle sur gel d'agarose et également en fonction du (iii) diamètre des billes qui est identique à celui des billes de verre, adapté à la lyse bactérienne (Tableau 3 et Figure 1, Article 1).

### **2- Comparaison de l'efficacité des billes de zirconium par rapport aux billes de verre**

Pour étudier l'efficacité de ces billes de zirconium par rapport aux billes de verre utilisées couramment au laboratoire pour extraire les ARNs bactériens, nous avons ensuite effectué des extractions d'ARNs en parallèle, afin de les comparer. Les ARNs extraits ont tout d'abord été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose. Pour le contrôle des "macrophages

non infectés" (= contrôle eucaryote), une extraction a été réalisée avec le Mini Kit RNeasy® (Quiagen, Venlo, Pays-Bas).

#### **a) Extractions d'ARNs à partir des échantillons témoins**

Pour le contrôle procaryote à Gram positif, après extraction des ARNs de *S. aureus* Newman on observe, à la fois avec les billes de verre et de zirconium, deux bandes sans dégradation correspondant aux ARNr 23S et 16S, attestant de l'intégrité des ARNs totaux extraits (Figure 2A, Article 1). Ensuite, pour les ARNs extraits de *S. typhimurium*, témoin bactérie à Gram-négatif, nous avons détecté trois bandes correspondant à l'ARNr 23S, qui est clivé en deux fragments d'ARN plus petits de 1,1 et 1,7 kb (Smith N.H., *et al.*, 1988), ainsi que l'ARNr 16S avec les billes de verre et de zirconium, validant le témoin (Figure 2B, Article 1). Enfin, pour les conditions non infectées (monocytes THP1 différenciés en macrophages), deux bandes sont détectées correspondant aux ARNr 28S et 18S, attestant de l'efficacité de la récupération d'ARNs eucaryotes intacts avec le kit Qiagen (Figure 2A, Article 1) et qui servira de témoin positif.

#### **b) Extractions d'ARNs à partir des bactéries internalisées**

Pour les *S. aureus* internalisés, nous avons détecté des différences entre les macrophages THP1 et les ostéoblastes Saos-2. Pour *S. aureus* internalisés par les macrophages THP1 tout d'abord, nous avons purifié des ARNs bactériens intacts avec les billes de zirconium, mais pas avec les billes de verre (Figure 2A, Article 1). En revanche, pour les bactéries internalisées par les ostéoblastes Saos-2, nous avons recueilli les ARNr bactériens et eucaryotes avec les billes de zirconium (Figure 2A, Article 1). Notre hypothèse est que lors de la lyse des cellules THP1, la plupart des ARN eucaryotes sont libérés et rejetés puisqu'ils se trouvent dans le surnageant après centrifugation, alors que les ARNs procaryotes sont probablement abrités à l'intérieur des bactéries au sein des culots cellulaires eucaryotes. Pour les cellules Saos-2, la différence est sûrement due à une lyse moins efficace, entraînant une libération et une élimination plus faibles de leurs ARNs.

Pour les *S. typhimurium* internalisées, nous visualisons une quantité d'ARNs inférieure à celle obtenue pour *S. aureus*, ainsi que des ARNs eucaryotes contaminants en plus grand nombre (Tableaux 4 et 5, Article 1). Le rendement de récupération en ARNs totaux est plus élevé avec les billes de zirconium qu'avec les billes de verre et nous supposons que cela est dû à la densité plus élevée du zirconium ( $d=6,5$ ) par rapport au verre ( $d=2,5$ ). De plus,

l'extraction est moins efficace pour les bactéries à Gram-négatif que pour les bactéries à Gram-positif.

### **3- Contrôle de la qualité des ARNs extraits**

#### **a) Contrôle de la qualité de l'extraction des ARNs de *S. aureus***

Par la suite nous avons voulu contrôler la qualité des ARN extraits de *S. aureus* après l'internalisation par les macrophages THP1 ainsi que par les ostéoblastes Saos-2 à l'aide de puces à ARN (Tableau 5, Article 1). Ces puces permettent de quantifier les ARN extraits afin d'évaluer leur intégrité. Dans un premier temps, pour chaque condition de la souche *S. aureus* (contrôle procaryotes, bactéries internalisées par les macrophages THP1 et par les ostéoblastes Saos-2), une quantité plus importante d'ARNs a été collectée avec les billes de zirconium par rapport aux billes de verre (Tableau 5, Article 1). En outre, les ARNs extraits de *S. aureus* internalisés par les THP1 avec des billes de zirconium présentent un indice d'intégrité de l'ARN (RIN) de 8,7, par rapport à son témoin procaryote (RIN de 9,6). Ce RIN a validé l'intégrité des ARNs extraits, à l'exception d'une légère dégradation de l'ARNr 23S pour les *S. aureus* internalisés (Figure supplémentaire A.1, Article 1). Pour les ARNs extraits avec les billes de zirconium à partir des bactéries internalisées par les Saos-2, nous avons obtenu un mélange d'ARNs eucaryotes et procaryotes, comme observé sur le gel d'agarose (Figure 2B, Article 1). L'électrophorégramme de ces ARNs extraits des bactéries internalisées par les Saos-2 (Figure supplémentaire A.2, Article 1) montre quatre pics correspondant aux ARNr eucaryotes et procaryotes, et un pic pouvant correspondre à une dégradation de l'ARNr 23S, comme pour les bactéries internalisées THP1.

#### **b) Contrôle de la qualité de l'extraction des ARNs de *S. typhimurium***

Dans un second temps, pour la souche *S. typhimurium*, les ARNs extraits à l'aide des billes de verre et de zirconium possèdent respectivement un RIN de 6,4 et 6,2. Ces valeurs sont inférieures à celles de *S. aureus* et sont sûrement dues au clivage de l'ARNr 23S (Smith N.H., *et al.*, 1988) dont nous avons parlé précédemment. Un profil similaire à celui obtenu par Hautefort I. et ses collaborateurs (Hautefort I., *et al.*, 2008) a été observé sur la puce à ARN, avec trois bandes dont l'une d'entre elles correspond à l'ARNr 16S et les deux autres à des fragments d'ARNr 23S (Figure supplémentaire B.2, Article 1). Pour *S. typhimurium* internalisées par les THP1, un mélange d'ARNs eucaryotes et procaryotes est détecté (RIN de

5.2), pouvant être considéré comme acceptable par rapport au RIN des contrôles procaryotes. Sur l'électrophorégramme (Figure supplémentaire A.3, Article 1), nous avons pu détecter les ARNs procaryotes et valider leur présence dans nos extraits.

#### 4- Étude de l'expression des gènes eucaryotes et procaryotes dans les ARNs extraits

Des études d'expression génétique, objectif premier de la mise au point de ce protocole, ont ensuite été réalisées avec des ARNs totaux extraits avec les billes de zirconium de 100 $\mu$ M de diamètre. Les niveaux de transcrits des gènes sélectionnés ont été contrôlés par RT-qPCR dans les ARNs extraits de *S. aureus* et de *S. typhimurium* internalisés par les THP1. L'expression de plusieurs gènes de référence a été mesurée : l'ARNm *gapdH* et l'ARNr 18S spécifiques des ARNs eucaryotes, l'ARNtm spécifique de la souche *S. aureus*, *invA* spécifique de la souche *S. typhimurium* et l'ARNr 16S pour *S. aureus* et *S. typhimurium*. Nous avons d'abord étudié le niveau de l'ARNr 16S, un gène commun entre *S. aureus* et *S. typhimurium* à l'aide d'amorces communes aux deux bactéries, par amplification d'une région conservée de l'ARN. Les valeurs de Ct (Cycle threshold) d'un contrôle ARNs de *S. aureus* sont inférieures à celles d'un contrôle de *S. typhimurium*, lors du suivi du niveau de transcrits de l'ARN 16S (Figure 3A, Article 1). Nous avons également analysé le niveau de transcrits pour un gène spécifique à chaque bactérie. Pour *S. aureus*, nous avons étudié l'expression de l'ARNtm (Figure 3B, Article 1), qui a été démontré comme invariable avant et après l'internalisation de *S. aureus* (Le Pabic H., *et al.*, 2015), ce qui est également observé ici. Pour *S. typhimurium*, l'ARNm *invA* spécifique au genre a été sélectionné et a été détecté lorsque la bactérie est internalisée (Figure 3C, Article 1). Ces données transcriptomiques sont en accord avec les gels d'agarose et les puces à ARN effectués.

Enfin, l'étude du niveau de transcrits de certains gènes eucaryotes nous renseigne sur la quantité d'ARNs eucaryotes encore présente dans les extraits d'ARNs totaux de bactéries internalisées, par comparaison avec des échantillons d'ARNs de macrophages non infectés. Nous avons tout d'abord étudié le niveau de l'ARNr 18S, fortement transcrit avec une valeur de Ct de 7,6 dans le contrôle macrophage (Figure 4A, Article 1). En comparaison, les valeurs de Ct de *S. aureus* et *S. typhimurium* internalisés sont plus élevées (15,8 et 10,9 respectivement) indiquant que la quantité d'ARNr eucaryote a été réduite dans nos

échantillons internalisés (Figure 4A, Article 1). Pour les ARNm, nous avons étudié le niveau de transcrit de *gapdH* et obtenu le même profil que pour l'ARNr 18S (Figure 4B, Article 1).

Pour conclure, lors de cette étude nous avons mis au point une méthode simple et peu coûteuse d'extraction d'ARNs procaryotes pour l'étude des interactions "cellule hôte-bactérie". Cette méthode améliore l'extraction d'ARNs bactériens lors de l'internalisation par les cellules eucaryotes et permet l'étude du RNome bactérien, sans qu'il soit nécessaire d'utiliser des kits onéreux pour éliminer la majeure partie de ces ARNs eucaryotes contaminants. La "preuve de concept" a été obtenue sur deux bactéries pathogènes, à Gram-positif et négatif, utilisées comme organisme modèle, ainsi que dans deux cellules hôtes humaines différentes. L'utilisation de billes de zirconium de 100 $\mu$ M de diamètre est optimale pour obtenir des extractions d'ARNs bactériens reproductibles, propres et intactes à partir de mélanges cellulaires hétérogènes. Notre protocole utilise d'abord du SDS pour lyser la plupart des cellules eucaryotes, puis des billes de zirconium de "haute densité" pour détruire les cellules bactériennes incorporées dans les débris cellulaires humains. Finalement, nous avons éliminé la plupart des ARNs eucaryotes tout en extrayant efficacement les ARNs bactériens des cellules internalisées.

Ce protocole a déjà été utilisé au sein du laboratoire lors de l'étude de l'expression de plusieurs systèmes toxine-antitoxine après internalisation par les macrophages humains (Riffaud C., *et al.*, 2019). De plus, après quelques optimisations, ce protocole a également permis de réaliser une étude transcriptomique par RNAseq de *S. aureus* après internalisation par des ostéoblastes Saos-2 (Gonzales C., données en préparation). Les principales optimisations ont concerné la lyse cellulaire, effectuée par du Triton X-100 et l'utilisation d'une quantité plus importante de cellules avec des expériences réalisées en flasques.

La mise au point de ce protocole va nous permettre d'étudier le niveau de transcrits des cibles validées par leur interaction avec SprC dans un contexte d'interaction hôte-pathogène.

## **Article 1**

# **Selective recovery of RNAs from bacterial pathogens after their internalization by human host cells.**

**Raynaud S., Le Pabic H. and Felden B.**

Methods. 2018 **143**:4-11



Contents lists available at ScienceDirect

## Methods

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ymeth](http://www.elsevier.com/locate/ymeth)

## Selective recovery of RNAs from bacterial pathogens after their internalization by human host cells

Simon Raynaud, H el ene Le Pabic, Brice Felden\*

Univ Rennes, Inserm, BRM [Bacterial Regulatory RNAs and Medicine] UMR\_S 1230, F-35000 Rennes, France



## ARTICLE INFO

## Keywords:

Bacterial & prokaryotic RNAs  
Host-pathogen interactions  
zirconium beads  
Bacterial internalization  
RNA expression  
Selective RNA purification

## ABSTRACT

Selective RNA extractions are required when studying bacterial gene expression within complex mixtures of pathogens and human cells, during adhesion, internalization and survival within the host. New technologies should be developed and implemented to enrich the amount of bacterial RNAs since the majority of RNAs are from the eukaryotic host cells, requiring high read depth coverage to capture the bacterial transcriptomes in dual-RNAseq studies. This will improve our understanding about bacterial adaptation to the host cell defenses, and about how they will adapt to an intracellular life. Here we present an RNA extraction protocol to selectively enrich the lowest bacterial RNA fraction from a mixture of human and bacterial cells, using zirconium beads, with minimal RNA degradation. Zirconium beads have higher capacity to extract bacterial RNAs than glass beads after pathogen internalization. We optimized the beads size and composition for an optimal bacterial lysis and RNA extraction. The protocol was validated on two human cell lines, differentiated macrophages and osteoblasts, with either Gram-positive (*Staphylococcus aureus*) or -negative (*Salmonella typhimurium*) bacteria. Relative to other published protocols, yield of total RNA recovery was significantly improved, while host cell infection was performed with a lower bacterial inoculum. Within the host, bacterial RNA recovery yields were about six-fold lower than an RNA extraction from pure bacteria, but the quality of the RNA recovered was essentially similar. Bacterial RNA recovery was more efficient for *S. aureus* than for *S. typhimurium*, probably due to their higher protection by the Gram-positive cell walls during the early step of eukaryotic cell lysis. These purified bacterial RNAs allow subsequent genes expression studies in the course of host cell-bacteria interactions.

## 1. Introduction

Transcriptomic studies of internalized bacteria gene expression improve our understanding of bacterial adaptation to host cells defense, and intracellular life [1,2]. Recent RNA-based technologies allow to tackle gene reprogramming by intracellular bacterial pathogens when internalized by eukaryotic host cells [3]. Those dual RNA-seq technologies assess how bacterial pathogens fine-tune gene expression when intracellular. Also, information about how the infected host cells react during infection can be collected. A major technical challenge, however, is the huge excess of eukaryotic over bacterial RNA [4] that needs to be removed to obtain specific and reliable transcriptomic data on pathogen gene expression, when intracellular. To this endeavor, extraction methods have been developed to purify RNAs from prokaryotic or eukaryotic organisms with higher efficiency and quality [5,6]. For bacterial RNA extraction from a homogenous population of bacteria, collecting intact, non-degraded RNAs is relatively easy and include mechanical or enzymatic lysis in denaturing conditions, for cell opening

[7,8], followed by phenol extraction of nucleic acids [9] and DNase treatment.

When performed from complex mixtures of organisms, RNA extractions are complicated. However and surprisingly, very few methods are available to extract bacterial RNAs inside eukaryotic cells during infection [10–12]. Zirconia beads were previously proposed to purify total RNAs for sRNA discovery in bacteria [13]. These strategies provide low amounts of purified RNAs, insufficient for systematic analyses by qPCR or by Northern of bacterial gene expression inside host cells. These methods involve host cells lysis (phenol/ethanol mix; RLT buffer of Qiagen kit, or ice-cold acetone: ethanol mix) to leave bacterial cells intact and subsequent total RNA purification. Also, most methods have an enrichment step of the bacterial RNAs with dedicated commercial kit, which increase the cost of the procedure [11,12]. For *S. aureus* RNA extraction, most protocols use manufacturer kits [10,11]. The protocol from [14] lyses bacteria in the bacteria/cellular debris pellets with Trizol and zirconia-silica beads (100 µm diameter) into a high-speed homogenizer, to isolate total RNA. For *S. typhimurium*, the first

\* Corresponding author.

E-mail address: [bfelden@univ-rennes1.fr](mailto:bfelden@univ-rennes1.fr) (B. Felden).<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2018.04.035>Received 19 April 2018; Received in revised form 25 April 2018; Accepted 26 April 2018  
Available online 27 April 2018

1046-2023/  2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

described methods used a mix of 0.1% SDS, 1% acidic phenol and 19% ethanol (in water) to lyse infected epithelial cells [15,16]. Then, *S. typhimurium* RNA was prepared using a total RNA purification kit (Promega SV total RNA purification kit). A second method used Trizol to extract RNAs, after host cells lysis with PBS-0.1% Triton X-100 [17].

We developed and report here a novel extraction protocol to selectively enrich the minor RNA fraction from internalized bacteria while removing most of the eukaryotic RNA excess, using zirconium beads. We provide evidences that beads sizes and their compositions during extraction must be optimized to improve bacterial cell lysis for selective bacterial RNA extraction. Bacterial RNA extractions were performed on two human cell lines upon *S. aureus* internalization, THP1-differentiated macrophages and Saos-2 osteoblasts. We also tested the new method for THP1-differentiated macrophages infected with *S. typhimurium*. We anticipate our bacterial RNA purification protocol to be applicable for various bacterial-host cell gene expressions, for subsequent transcriptomic studies.

## 2. Methods

### 2.1. Bacteria, human cells and cultures

RNA extraction of *Staphylococcus aureus* (Newman) [18] and *Salmonella typhimurium* strains were selected as Gram-positive and -negative representatives. The two strains were grown at 37 °C in Brain Heart Infusion broth (BHI, Oxoid, Dardilly, France) for *S. aureus*, and in Lysogeny Broth (LB, Sigma, Saint-Louis, USA) containing 300 mM NaCl for *S. typhimurium*.

THP1 human monocytes were from ATCC (Rockville, USA) and maintained at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> in RPMI1640 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) containing 10% FCS (GE Healthcare Hyclone, Chicago, USA). The THP1 cells were treated with 20 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma, St Louis, USA) for 3 days for differentiation into macrophages. The THP1 monocytes were differentiated into adherent macrophages, as evidenced by light microscopy. Saos-2 human osteoblasts (ATCC, Rockville, USA), are maintained at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> in McCoy medium (Thermo Fisher Scientific's, Waltham, USA) containing 15% FCS (GE Healthcare Hyclone, Chicago, USA).

### 2.2. Bacterial internalization and human cell lysis

Human THP1-differentiated macrophages and Saos-2 osteoblasts were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 1:10 and 1:30, respectively, with either *S. aureus* or *S. typhimurium*. Experiments were conducted in 6-wells plates with 5.10<sup>5</sup> THP1-differentiated macrophages, or 4.10<sup>5</sup> Saos-2 osteoblasts by well. Internalized assays of *S. aureus* were carried out for 2 h at 37 °C, with 5% CO<sub>2</sub> in RPMI 1640 containing 10% of human SAB for THP1-differentiated macrophages and in McCoy medium with 15% of human SAB for Saos-2 osteoblasts. Internalization was stopped on ice and cells were washed three times with ice-cold PBS. All the non-internalized bacteria were removed by culturing the human cells overnight in a medium supplemented with 50 µg/ml gentamycin (Sigma, St Louis, USA).

Internalized assays of *S. typhimurium* were carried out for 2 h at 37 °C, with 5% CO<sub>2</sub> in RPMI 1640 containing 10% of human SAB for THP1-differentiated macrophages. After washing the cells three times with PBS, all the non-internalized bacteria were removed by culturing the human cells for 90 min in a medium supplemented with 100 µg/ml gentamycin (Sigma, St Louis, USA). Subsequently, for both internalized assays, the medium was removed, cells were washed three times with PBS and incubated with 500 µL of PBS/SDS 1% for 15 min at room temperature for cell lysis. Three or six wells were pooled to increase the amount of RNA extracted for each condition, and then centrifuged. After centrifugation, supernatant containing intracellular material of human cells was discarded.

**Table 1**  
Tested beads, physical and chemical properties.

Beads	Compositions	Diameters (µm)	Densities (g/cm <sup>3</sup> )
1	zirconium	100	6.5
2	zirconium	400	6.5
3	Steel	200	7.8
4	zirconium oxide	500	5.9
5	Glass	100	2.5

### 2.3. RNA extraction

A method is described for selective bacterial RNA extraction by phenol/chloroform after human cells lysis and mechanical disruption of the bacterial envelopes with beads. The mechanical lysis probably improves bacterial release from the eukaryotic cells.

#### 2.3.1. The beads

Four different types of beads were tested for their abilities to extract RNAs from internalized bacteria. Glass beads (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), used as references, were compared to four new types of beads (Dutscher, Brumath, France). Table 1 shows their compositions, diameters and densities. The variation of beads composition and density should influence RNA extraction. Also, the variation of beads size should impact bacterial crushing, especially those trapped into the eukaryotic cell debris. Each bead set was washed twice in purified water and then twice in an RNA extraction buffer (SDS 0.5%; 20 mM sodium acetate; 1 mM EDTA pH 5.5), before use.

#### 2.3.2. RNA extraction from host cell-internalized bacteria

- (1) Prepare the Fast Prep tubes (cryotubes): add 250 µL beating beads (one of the five from Table 1), 250 µL phenol (pH 4) and 250 µL of a CHCl<sub>3</sub>/Isoamyl alcohol mix (24:1).
- (2) Mix the bacteria/THP1-differentiated macrophages or the bacteria/Saos-2 osteoblasts lysates from the internalization assays in 500 µL of RNA extraction buffer. Transfer this solution into a cryotube containing the beating beads and lyse into a Fast Prep, 30 s, power 6.5. As a negative control, the same experiment was done with a bacteria pellet only, without human cells.
- (3) Centrifuge cells at 12000 rpm for 5 min at 4 °C and keep the supernatant.
- (4) Extraction 'volume-to-volume' with a Phenol/CHCl<sub>3</sub>/Isoamyl alcohol mix (25:24:1).
- (5) Centrifuge the mix at 12000 rpm for 5 min at 4 °C and keep the upper phase.
- (6) Extract 'volume-to-volume' with a CHCl<sub>3</sub>/Isoamyl alcohol mix (24:1).
- (7) Centrifuge the mix at 12000 rpm for 5 min at 4 °C and keep the upper phase.
- (8) Precipitate the RNAs with 0.7 vol of isopropanol and 0.1 vol of sodium acetate 3 M (pH 5.2), for 2 h at –80 °C.
- (9) Centrifuge the mix at 12000 rpm for 30 min at 4 °C, discard the supernatant.
- (10) Wash the pellet with 500 µL of 70% ethanol.
- (11) Centrifuge the RNAs at 12000 rpm for 5 min at 4 °C, discard the pellet.
- (12) Dry the pellet for 5 min into a Speed Vacuum and dissolve the pellet in RNase-DNase free water.

#### 2.3.3. Human cell RNA extraction

RNAs from the THP1-differentiated macrophages were extracted by using an RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherland) in accordance with the protocol from the supplier. No gentamycin treatment was applied to this sample, which only serves as an internal control (eukaryotic rRNAs).

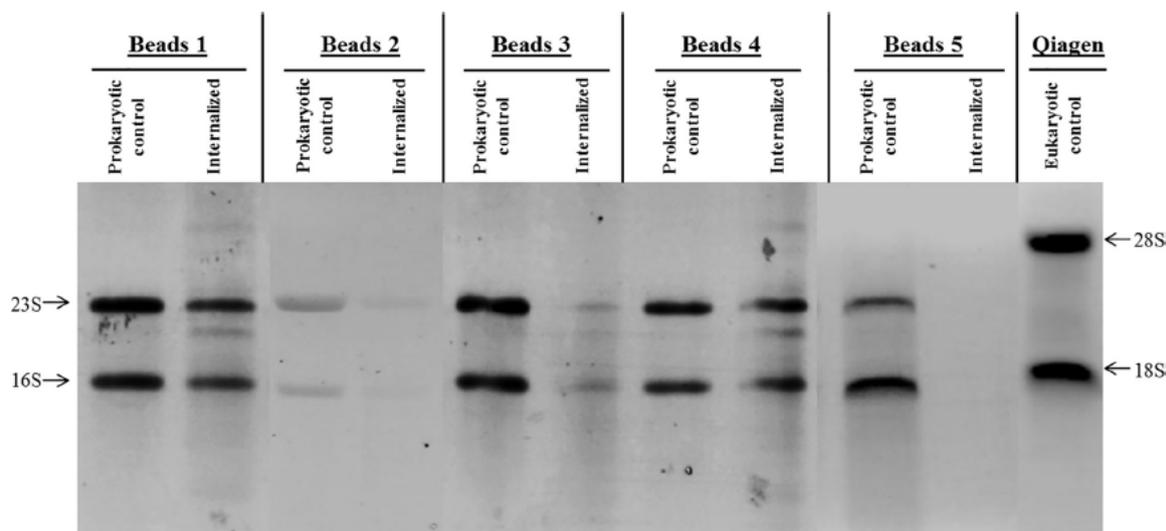


Fig. 1. Monitoring the extracted RNAs (500 ng total RNAs) after bacterial (*S. aureus* Newman) uptake by human macrophages. Agarose gel stained with ethidium bromide. 23S and 16S rRNAs are the prokaryotic rRNAs whereas the eukaryotic rRNAs are undetectable. Prokaryotic controls represent *S. aureus* Newman cells only. The eukaryotic control represents THP1-differentiated macrophages cells only.

## 2.4. Quality-control assessment of the extracted RNAs

### 2.4.1. Gel electrophoresis

- (1) Each sample of RNAs extracted from the internalized bacterial, prokaryotic and eukaryotic RNA control was diluted into 10  $\mu$ L final volume, and 2  $\mu$ L of 6X gel loading dye were added (New England Biolabs, Evry, France).
- (2) Load and migrate the samples for 1 h at 90 V on 1% agarose gel, supplemented with ethidium bromide.
- (3) Visualize the eukaryotic 28S and 18S rRNAs and the prokaryotic 23S and 16S rRNAs by UV transilluminator (Figs. 1 and 2).

### 2.4.2. RNA6000 Nano assays

RNA Nano Chips (Agilent, Santa Clara, USA) were used to quantify RNAs and access RNA Integrity Numbers (RIN, Table 3). The RNA Nano Chips were prepared according to the protocol supplied with the RNA 6000 Nano assay kit (Agilent).

- (1) Decontaminate the electrodes with an electrode cleaner chip filled with an RNaseZAP™ RNase decontamination solution (Ambion, Inc. cat. No. 9780) for 1 min and once with an electrode cleaner chip filled with RNase-free water for 10 sec.
- (2) The chip was filled with the gel-Dye Mix (Agilent).
- (3) 5  $\mu$ L of RNA markers mixture were then applied to each well, together with 1  $\mu$ L of a heat denatured (2 min at 70 °C) sample or a RNA ladder (Agilent).
- (4) The chip was vortexed and run on the Agilent 2100 Bioanalyzer.

## 2.5. Assessing the amount and ratio of prokaryotic versus eukaryotic RNAs

The amount and proportion of eukaryotic versus prokaryotic RNAs in either the THP1-differentiated macrophages or Saos-2 osteoblasts host cells with internalized bacteria was independently monitored by (i) RT-qPCR, (ii) gel electrophoresis and (iii) bioanalyzer.

- (1) Remove putative DNA remnants from the extracted RNAs using amplification-grade DNase I (Life Technologies, Carlsbad, USA).
- (2) Synthesize cDNAs with a High-Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit (Life Technologies, Carlsbad, USA).
- (3) Perform qPCR using a Real Master Mix SYBR Kit (5' PRIME, Life

Technologies, Carlsbad, USA) on a StepOnePlus Real-Time PCR system (GE Healthcare, Saint Aubin, France). The DNA Primers are listed on Table 2.

For the gene expression studies targeting *invA* mRNA, *tmrA*, 18S rRNA and *gapDH* mRNA, a Ct 'cut-off value' of 35 was chosen because obtaining a 3-cycle difference in target Ct, in comparison to a negative control Ct, except for the 16S rRNA expression where the Ct 'cut-off value' of 28 was selected. Before scoring any reaction, optimized qPCR conditions and melting curves were conducted by verifying that the Ct values and amplification curves were both acceptable. As the assay's thermal cycling protocol involved 40 cycles, Ct 35 was the latest Ct value where the above requirements were acceptable [19].

## 3. Results and discussion

After human cell internalization, bacterial RNA extraction allows studying bacterial gene expression within various host cells. Here we propose an easy and inexpensive procedure to increase bacterial RNA recovery while removing most of the eukaryotic RNA excess after host cell uptake. The technology was tested on two human cell types infected by either Gram-positive or -negative bacteria, used as model organisms. Various types of beating beads were tested to improve the purification of prokaryotic RNAs, especially those protected and trapped within the eukaryotic cells debris.

### 3.1. Beads testing and selection

In this proposed method, *S. aureus* strain Newman was internalized by two different human cell lines, THP1-differentiated macrophages and Saos-2 osteoblasts. These uptakes were followed by cells lysis and total RNA extraction by using five different types of beads (Table 1). As shown in Fig. 1, two samples were compared with each type of beads. Extraction controls were achieved with non-internalized bacteria ( $3.10^7$ ) compared to macrophages-internalized bacteria ( $3.10^6$  human cells with  $3.10^7$  bacteria; MOI 1:10). In Fig. 1, we see two bands correspond to the 23S and 16S rRNAs extracted from the prokaryotic controls, as well as two bands corresponding to the 28S and 18S rRNAs extracted from the eukaryotic control. For RNAs extracted from internalized bacteria with beads 1 or 4, we detect the intact bacterial rRNAs, with no or low amounts of human rRNAs. However, beads 2, 3 and 5

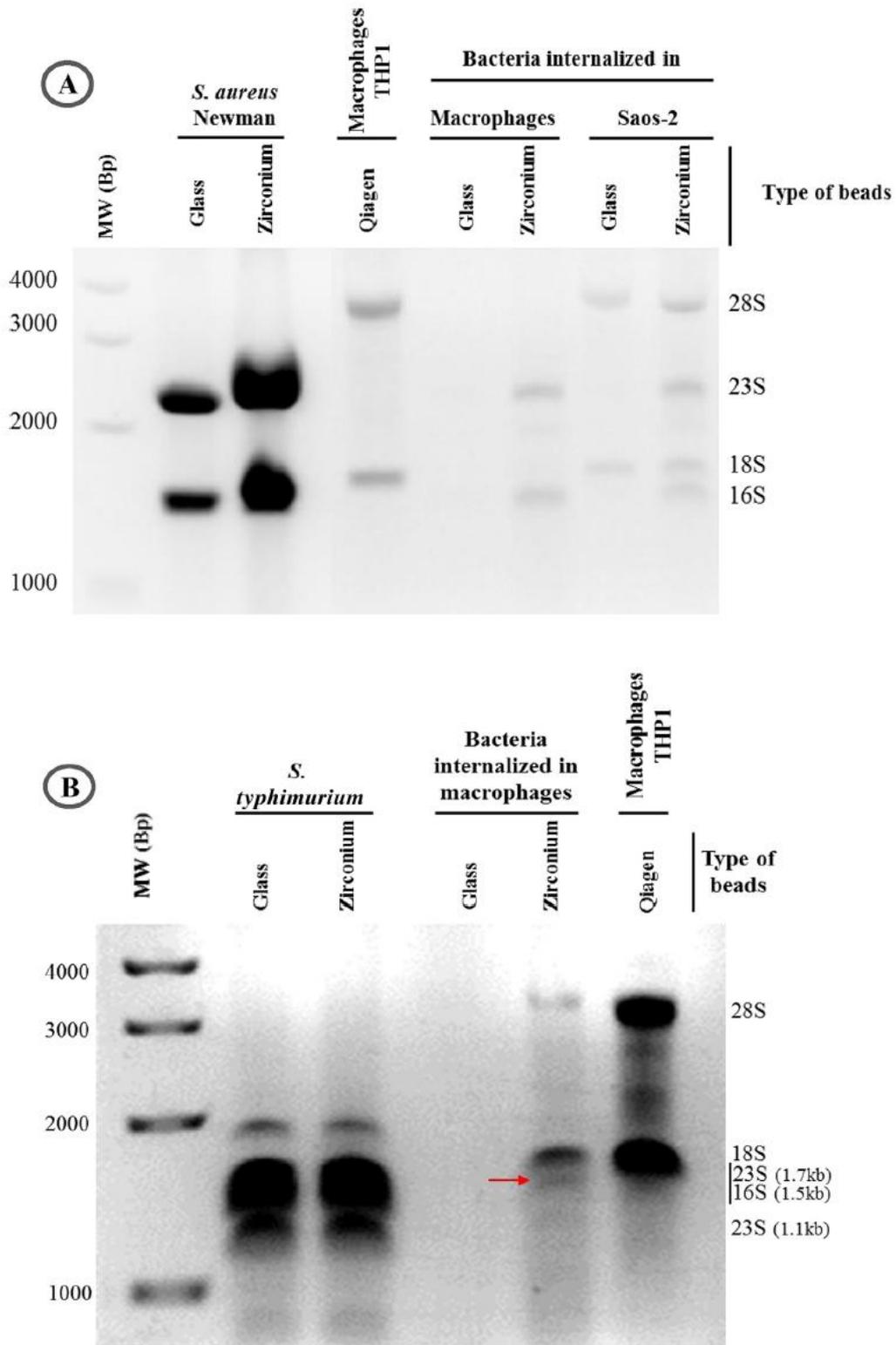


Fig. 2. Monitoring the extracted RNAs from internalized bacteria by agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide. 23S and 16S rRNAs reveal the presence of prokaryotic RNAs. 28S and 18S rRNAs are the contaminating eukaryotic RNAs. The eukaryotic control represents RNAs extracted from THP1-differentiated macrophages cells. A, prokaryotic controls represent RNAs extracted from *S. aureus* Newman cells. B, prokaryotic controls represent RNAs extracted from *S. typhimurium* cells. The arrow points to the bacterial rRNA. The amounts of RNA loaded are indicated onto Table 4.

**Table 2**  
Sequences of the DNA primers used to detect bacterial and host cells RNAs by qPCR.

Detected RNAs	Primers	(5'–3') sequences
<i>invA</i> mRNA ( <i>S. typhimurium</i> )	invA-F	CAACGTTTCCTGCGGTACTGT
	invA-R	CCCGAAGTGCGGATAATT
<i>tmRNA</i> ( <i>S. aureus</i> )	tmRNA-F	CACCTGTCATCGCCTAACAG
	tmRNA-R	GATTTGAAACCGGCGTCCAG
16S rRNA ( <i>S. aureus</i> & <i>S. typhimurium</i> )	16S-F	GTTGCGGACTTAACCCAAC
	16S-R	GCAACGGGAAGAACCCTTACC
18S rRNA (human)	18S-F	CGCGCTAGAGGTGAAATTC
	18S-R	TTGGCAAATGCTTTCGCT
<i>gapdh</i> mRNA (human)	Gapdh-F	TGCACCACCAACTGCTAAGC
	Gapdh-R	GGCATGGACTGTGGTCATGAG

**Table 3**  
Total RNA recovery from bacteria internalized into human cells and the respective controls testing various beads for cell crushing. The experiment is the result of pooling 6 wells which correspond to 3.10<sup>6</sup> human cells and 3.10<sup>7</sup> bacteria. The RNA dosage was done by Nanodrop.

Beads	Yields of prokaryotic control RNA recovery	Yields of total RNA recovery
Beads 1 100 µm zirconium beads	35–40 µg	20–30 µg
Beads 2 400 µm zirconium beads	10–12 µg	2–5 µg
Beads 3 200 µm Steel beads	24–40 µg	10–15 µg
Beads 4 500 µm zirconium oxide beads	25–30 µg	20–30 µg
Beads 5 100 µm Glass beads	20–40 µg	0.8–1.4 µg

**Table 4**  
Comparison of total RNA recovery (Nanodrop dosage) between glass and zirconium beads. The amounts of loaded RNA correspond to the data presented in Fig. 2.

		RNA concentration (ng/µL)	Total RNA recovered (µg)	Loaded RNA (ng)
Prokaryotic control ( <i>S. aureus</i> )	Glass	3250	97	1620
	zirconium	6900	207	3450
Prokaryotic control ( <i>S. typhimurium</i> )	Glass	1350	21.6	400
	zirconium	1650	26.4	400
Eukaryotic control (THP1 macrophages)	Qiagen	716	21.5	400
THP1-intemalized <i>S. aureus</i>	Glass	2.9	0.06	29
	zirconium	1070	17	300
Saos-2-intemalized <i>S. aureus</i>	Glass	26	0.5	300
	zirconium	62	1.25	300
THP1-intemalized <i>S. typhimurium</i>	Glass	12	0.2	120
	zirconium	128	1.540	300

are inappropriate for bacterial RNA recovery after host cell internalization (Fig. 1). Beads 1 were selected based on the amount of RNAs collected estimated by (i) Nanodrop dosage, (ii) visual integrity on agarose gel and also according to the beads diameter that is identical to that of glass beads, adapted for bacterial lysis (Table 3 and Fig. 1).

### 3.2. Comparison between Glass and zirconium beads

To investigate the efficiency of the zirconium beads compared to the glass beads, we performed the RNA extractions in parallel to compare these two types of beads. The extracted RNAs were analyzed by an electrophoresis on agarose gel (Fig. 2). For the ‘non-infected macrophage’ control, an extraction was performed with RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherland).

First, for the *S. aureus* prokaryotic control (Newman strain), two

**Table 5**  
Qualitative and quantitative analyses of the extracted RNAs from *S. aureus* Newman or *S. typhimurium* uptake by human cells. The experiment results in pooling 6 wells, which correspond to 3.10<sup>6</sup> human cells and 3.10<sup>7</sup> bacteria. RIN: N/A = Not Attributed, ‘1’ corresponds to degraded RNAs, and ‘10’ to intact RNAs. The bacterial inoculum was 50 µL (5.10<sup>6</sup> CFU) per well of 2 ml, corresponding to a total inoculum of 300 µL.

Extracted RNAs	Bead	Total amount (µg)	RNA Integrity Number
Prokaryotic control ( <i>S. aureus</i> )	Glass	97	9.6
	zirconium	207	9.6
Prokaryotic control ( <i>S. typhimurium</i> )	Glass	21.6	6.4
	zirconium	26.4	6.2
Eukaryotic control (THP1 macrophages)	Qiagen	21.5	9.5
THP1-intemalized ( <i>S. aureus</i> )	Glass	0.12	N/A
	zirconium	32.1	8.7
Saos-2-intemalized ( <i>S. aureus</i> )	Glass	0.5	N/A
	zirconium	1.25	N/A
THP1-intemalized ( <i>S. typhimurium</i> )	Glass	0.06	N/A
	zirconium	0.35	5.2

bands with no degradation correspond to the 23S and the 16S rRNAs, and attest RNA integrity (Fig. 2A) with both the glass and zirconium beads. Second, for the non-infected conditions (THP1-differentiated macrophages), two bands are detected corresponding to the 28S and the 18S rRNAs, attesting the efficiency of intact eukaryotic RNAs recovery with the Qiagen kit (Fig. 2A). This sample serves as positive control. For the internalized bacteria, we detected differences between the THP1 and Saos-2 host cells. For the macrophages-internalized bacteria, we purified intact bacterial RNAs with the zirconium beads, but not with the glass beads (Fig. 2A). For the Saos-2-intemalized bacteria, however, we collected both the bacterial and eukaryotic rRNAs with the zirconium beads (Fig. 2A). Our hypothesis is that during THP1 cells lysis, most of the eukaryotic RNAs are released and discarded since they locate in the supernatants after centrifugation, whereas the prokaryotic RNAs is probably sheltered inside bacteria (pellet). For the Saos-2 cells, their lysis may be less effective, with a lower release and elimination of their (eukaryotic) RNAs.

For the RNAs extracted from Gram-negative *S. typhimurium* (control), we detected three bands corresponding to the 23S rRNA, which is cleaved in two smaller RNA fragments of 1.1 and 1.7 kb [20], together with full-length 16S rRNAs for both the glass and zirconium beads, validating the control (Fig. 2B). We used the same sample from Fig. 2A for a eukaryotic control. For the internalized bacteria, we visualize a lower quantity of RNAs than for *S. aureus*, as well as more contaminating eukaryotic RNAs (Tables 4 and 5). There is a higher yield of RNA recovery with the zirconium beads than with the glass beads. The extraction is less effective for the Gram-negative bacteria than for the Gram-positive.

In conclusion, zirconium beads have higher capacity to extract bacterial RNAs than glass beads after pathogen internalization. This works better for Gram-positive (*S. aureus*) in comparison to Gram-negative bacteria (*S. typhimurium*). We assume that the improvement of extraction was due to the elevated density of zirconium (d = 6.5) in comparison to glass (d = 2.5). This characteristic may allow efficient bacteria crushing after their internalization by both THP1 and Saos-2 cells.

### 3.3. Quality control of the extracted RNAs

Next, we performed a RNA chip to monitor the quality of the extracted RNAs after THP1 uptake (Table 5). The chip allows quantifying the extracted RNAs to assess their integrity. For each condition (prokaryotic controls, Saos-2 internalized bacteria and THP1 internalized bacteria), higher amount of RNAs was collected with the zirconium

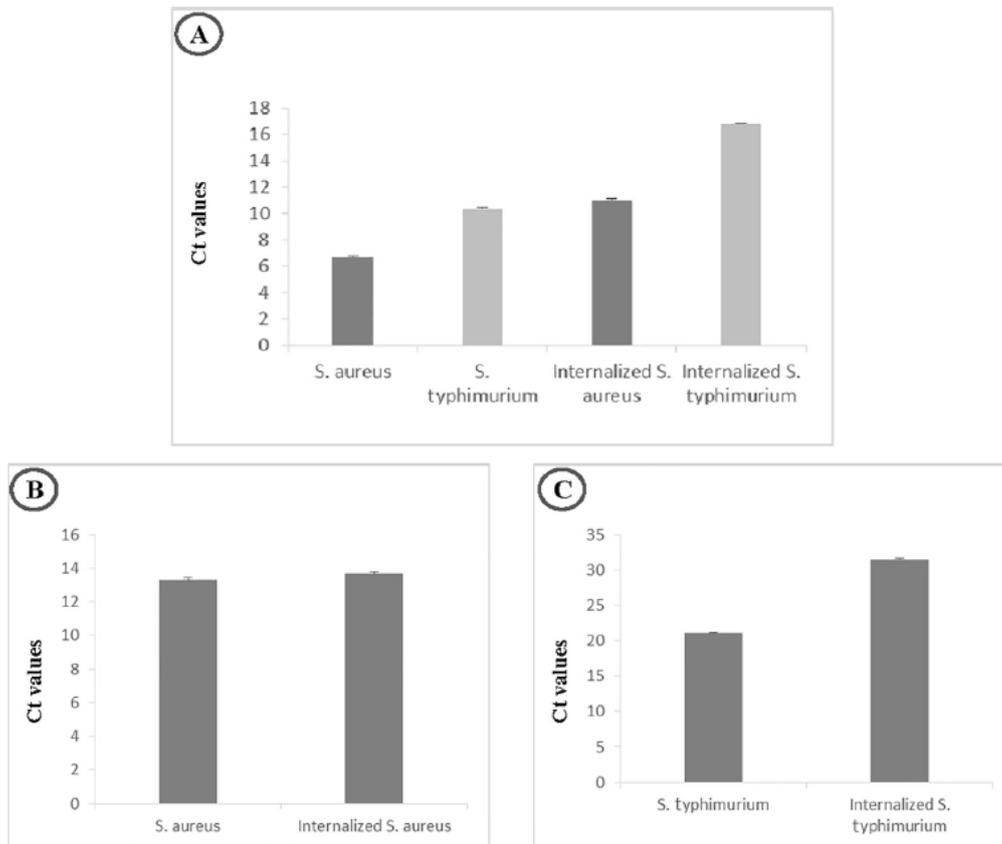


Fig. 3. RNA expression levels of selected prokaryotic genes in internalized bacteria versus non-internalized bacteria by RT-qPCR. The primer set to amplify the 16S rRNA is identical for both bacteria (A), *tmrA* mRNA is specific to *S. aureus* (B) and *InvA* mRNA is specific to *S. typhimurium* (C).

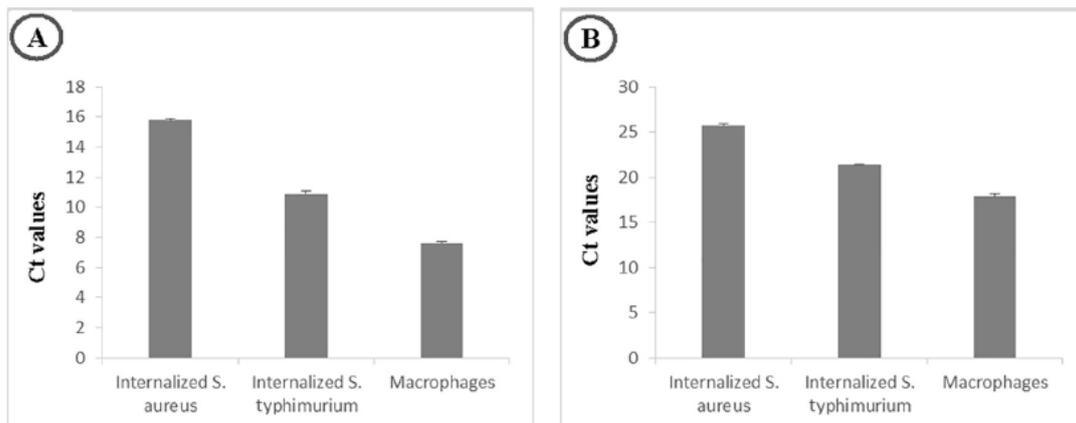


Fig. 4. RNA expression levels of selected eukaryotic genes in internalized bacteria samples versus non-infected macrophages, obtained by RT-qPCR. 18S rRNA (A) was picked for its high expression and *gapdH* mRNA (B) since it is a commonly used eukaryotic referent gene [22].

beads compared to the glass beads (Table 5). Also, the RNAs extracted from THP1 internalized *S. aureus* with zirconium beads show a RNA Integrity Number (RIN) of 8.7, compared with the prokaryotic controls (RIN of 9.6). That RIN validated the integrity of the extracted RNAs, except for a slight degradation of 23S rRNA for the internalized *S. aureus* (Supplemental data Fig. A.1). For the Saos-2 internalized bacteria, with the RNAs extracted by the zirconium beads, we obtained a mixture of eukaryotic and prokaryotic RNAs. On the electrophoregram of the extracted RNAs from the Saos-2 internalized bacteria (Supplemental data Fig. A.2), 4 peaks correspond to the eukaryotic and

prokaryotic rRNAs, and one peak may correspond to a 23S rRNA degradation, as for the THP1 internalized bacteria. This electrophoregram attests of the integrity of the extracted RNAs, with each peak associated to an rRNA (Supplemental data Fig. A.2). A summary of each extracts dropped on the chip is represented on Fig. B.1 (Supplemental data).

We realized a second RNA chip to get information about the quality of our *S. typhimurium* extracts. The RIN of both glass and zirconium beads are 6.4 and 6.2 respectively. These values are lower than for *S. aureus* and can be due to the 23S rRNA cleavage [20] that we discussed earlier. A profile similar to that obtained by [15] was observed, with

three bands. One of them corresponding to the 16S rRNA and the two others to 23S rRNA fragments (Supplemental data B.2). For the THP1-internalized *S. typhimurium*, a mix of eukaryotic and prokaryotic RNAs is detected (RIN of 5.2), which can be considered as acceptable in comparison to prokaryotic control RIN. On the electrophoregram (Supplemental data A.3), we could detect easily the prokaryotic rRNAs and validate their presence in our extracts.

### 3.4. Assessing eukaryotic and prokaryotic RNA expression from the extracts

Gene expression studies were performed with total RNAs extracted with the 100 µm diameter zirconium beads. The expression levels of selected RNA genes were monitored by RT-qPCR in the RNAs extracted from THP1 internalized *S. aureus* Newman and *S. typhimurium*. The expression of several representative genes was measured: *gapdH* mRNA and 18S rRNA were recorded from RNAs extracted from THP1-differentiated cells, *tmRNA* from RNAs extracted from *S. aureus* Newman, *invA* from RNAs extracted from *S. typhimurium*, and 16S rRNA (from both *S. aureus* and *S. typhimurium*) expression levels.

First, we studied the expression of 16S rRNA, a common gene between *S. aureus* and *S. typhimurium*. We designed a set of primers that could hybridize with 16S rRNAs from both bacteria, amplifying a conserved region of the RNA.

The Ct value of a *S. aureus* RNA control is lower than that of a *S. typhimurium* control, when monitoring 16S rRNA expression (Fig. 3A). This difference between the two strains is also detected when comparing the values obtained when bacteria are intracellular. The Ct value of 16S rRNA detection increases for both bacteria when intracellular, as expected. We also monitored RNA expression for a gene specific for each bacterium. For *S. aureus*, we monitored *tmRNA* expression (Fig. 3B), which was reported as unfluctuating before and after *S. aureus* uptake [21], that is also observed here. For *S. typhimurium*, genus-specific *invA* mRNA was selected and was detected when the bacteria are internalized (Fig. 3C). These expression data are in agreement with both the agarose gel and the chip experiments. Overall, our RNA extraction method is efficient for Gram-positive bacteria during host cell uptake but, to a lesser extent, for a Gram-negative bacterium. Probably the thicker, solid envelope of *S. aureus* better protects the RNA during the initial lysis steps of the eukaryotic cells than for *S. typhimurium*.

Monitoring the RNA expression levels of selected eukaryotic genes inform us about the amount of eukaryotic RNAs still present in the RNA extracts from internalized bacteria, compare with a non-infected ‘macrophages only’ sample. First, in Fig. 4A, we studied 18S rRNA expression which is highly expressed (a Ct value of 7.6 in macrophages). In comparison, the Ct values of internalized *S. aureus* and *S. typhimurium* are higher (15.8 and 10.9) respectively. It indicates that the amount of eukaryotic rRNA was reduced in our internalized sample, with a less efficiency for *S. typhimurium*. For mRNA, we studied expression of *gapdH* mRNA and obtained the same profile than for the 18S rRNA (Fig. 4B).

As described in the introduction, most of RNA extraction methods, after host cells uptake of bacteria, use commercial kits for bacterial RNA recovery needed for subsequent analyses. In this report, we describe a simple and inexpensive method to improve result. A PBS-1% SDS host cell lysis followed by zirconium beads beating and phenol extraction of RNAs. This method is simple and inexpensive. That method, however, will need optimization when modifying the host cells and bacteria. The method is more efficient on Gram-positive bacteria, probably due to different cell walls. Gram negative bacteria cell walls are more fragile than Gram-positive bacteria, with premature lysis of *S. typhimurium* during the extraction leading to premature prokaryotic RNA elimination. A lighter bacterial lysis (using Triton X100), may improve bacterial RNA recovery from *S. typhimurium*. *S. aureus* RNA extraction is more efficient after their uptake by THP1-differentiated macrophages than by Saos-2-osteoblasts. Indeed, RNAs extracted from Saos-2 internalization contain a significant fraction of eukaryotic RNAs and need further optimization.

## 4. Concluding remarks

The data presented in this report provide a simplified and inexpensive RNA extraction procedure for scientists working on ‘host cell-bacteria’ interactions that expect to enhance bacterial RNA recovery over the eukaryotic RNA excess from the host cells. This method allows genome-wide expression study of the bacterial RNome during host uptake, without the need to use expensive kits removing the bulk of eukaryotic RNAs. The ‘proof of concept’ was obtained on a Gram-positive and negative bacterial pathogen used as model organisms, in two different human host cells. 100 µm-diameter zirconium beads are optimal to get reproducible, clean and intact bacterial RNA extractions from that initial heterogeneous cell mixture. Our protocol is improved from the others because we first use SDS to lyse most of the eukaryotic cells, and then ‘high density’ Zirconia beads to destruct the bacteria cells embedded within the human cell debris. Therefore, we removed most of the eukaryotic RNAs whereas extracting efficiently the bacterial RNAs from the internalized cells. The amount of eukaryotic mRNAs recovered is low, probably because they are degraded and discarded during the initial lysis step. Eukaryotic rRNAs, however, are detected but their quantity is acceptable for subsequent bacterial gene expression studies.

## Funding

This work was supported by the “Fondation pour la Recherche Médicale” [to S.R., FDM40912]; and Inserm. This work was also funded by the Agence Nationale pour la Recherche (ANR) (grant # ANR-15-CE12-0003-01 “sRNA-Fit” to B.F.), by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) (grant # DBF20160635724 “Bactéries et champignons face aux antibiotiques et antifongiques”) to B.F.

## Appendix A. Supplementary data

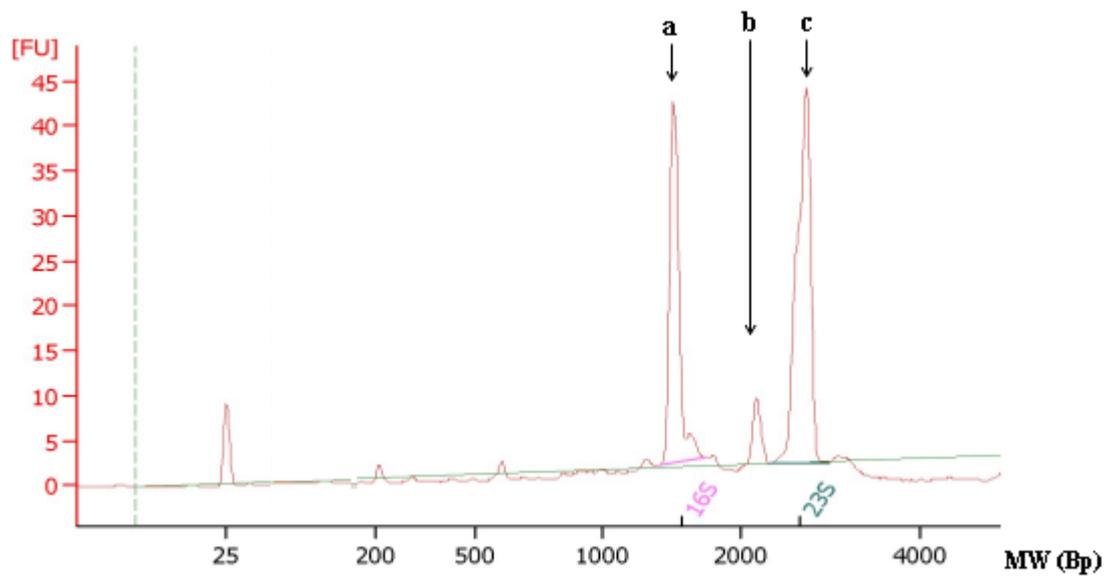
Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jymeth.2018.04.035>.

## References

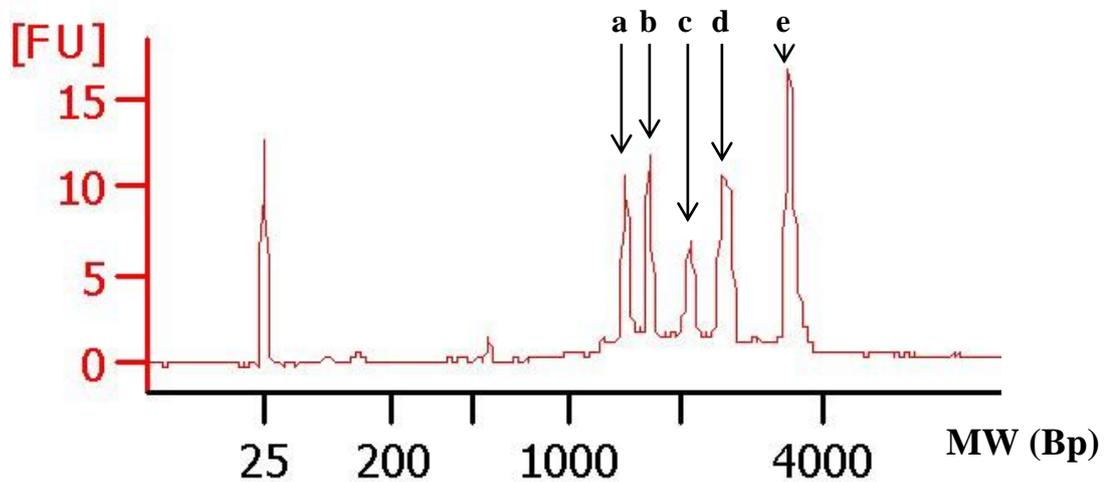
- [1] S.S. Chatterjee, H. Hossain, S. Otten, C. Kuenne, K. Kuchmina, S. Machata, E. Domann, T. Chakraborty, T. Hain, Intracellular gene expression profile of *Listeria monocytogenes*, *Infect. Immun.* 74 (2006) 1323–1338.
- [2] M.-V. La, D. Raoult, P. Renesto, Regulation of whole bacterial pathogen transcription within infected hosts, *FEMS Microbiol. Rev.* 32 (2007) 440–460.
- [3] A.J. Westerman, K.U. Förstner, F. Amman, L. Barquist, Y. Chao, L.N. Schulte, L. Müller, R. Reinhardt, P.F. Stadler, J. Vogel, Dual RNA-seq unveils noncoding RNA functions in host-pathogen interactions, *Nature* 529 (2016) 496–501.
- [4] M.S. Humphrys, T. Creasy, Y. Sun, A.C. Shetty, M.C. Chibucos, E.F. Drabek, C.M. Fraser, U. Farooq, N. Sengamalay, S. Ott, H. Shou, P.M. Bavoil, A. Mahurkar, G.S. Myers, Simultaneous transcriptional profiling of bacteria and their host cells, *PLoS One* 8 (2013) e80597.
- [5] J. Heptinstall, Isolation of total RNA from bacteria, *Methods Mol. Biol.* 86 (1998) 47–53.
- [6] M. Ares, Bacterial RNA Isolation, *Cold Spring Harbor Protoc.* 2012 (2012) ISSN: 1940-3402.
- [7] W. Ablain, S. Hallier Soulier, D. Causeur, M. Gautier, F. Baron, A simple and rapid method for the disruption of *Staphylococcus aureus*, optimized for quantitative reverse transcriptase applications: Application for the examination of Camembert cheese, *Dairy Sci. Technol.* 89 (2009) 69–81.
- [8] D.C. Rio, M. Ares Jr, J.G. Hannon, T.W. Nilsen, Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent), *Cold Spring Harb Protoc.* (2010), <http://dx.doi.org/10.1101/pdb.prot5439>.
- [9] J. Sambrook, D.W. Russell, Purification of Nucleic Acids by extraction with Phenol:Chloroform, *Cold Spring Harb Protoc.* (2006), <http://dx.doi.org/10.1101/pdb.prot4455>.
- [10] J.M. Voyich, K.R. Braughton, D.E. Sturdevant, A.R. Whitney, B. Saïd-Salim, S.F. Porcella, R. Daniel Long, D.W. Dorward, D.J. Gardner, B.N. Kreiswirth, J.M. Musser, F.R. DeLeo, Insights into mechanisms used by *Staphylococcus aureus* to avoid destruction by human neutrophils, *J. Immunol.* 175 (2005) 3907–3919.
- [11] C. Garzoni, P. Francois, A. Huyghe, S. Couzinet, C. Tapparel, Y. Charbonnier, R. Renzoni, S. Lucchini, P.D. Lew, P. Vaudaux, W.L. Kelley, J. Schrenzel, A global view of *Staphylococcus aureus* whole genome expression upon internalization in human epithelial cells, *BMC Genomics* 8 (2007) 171.
- [12] F. Di Cello, Y. Xie, M. Paul-Satyaseela, K.S. Kim, Approaches to bacterial RNA

- isolation and purification for microarray analysis of *Escherichia coli* K1 with human brain microvascular endothelial cells, *J. Clin. Microbiol.* 43 (2005) 4197–4199.
- [13] G. Gelderman, L.M. Contreras, Discovery of Posttranscriptional Regulatory RNAs Using Next Generation Sequencing Technologies, in: H.S. Alper (ed.), *Systems Metabolic Engineering. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, Totowa, 2013, 985, pp. 269–285.
- [14] C. Wolz, C. Goerke, R. Landmann, W. Zimmerli, U. Fluckiger, Transcription of clumping factor A in attached and unattached staphylococcus aureus in vitro and during device-related infection, *Infect. Immun.* 70 (2002) 2758–2762.
- [15] I. Hautefort, A. Thompson, S. Eriksson-Ygberg, M.L. Parker, S. Lucchini, V. Danino, R.J.M. Bongaerts, N. Ahmad, M. Rhen, J.C.D. Hinton, During infection of epithelial cells *Salmonella enterica* serovar Typhimurium undergoes a time-dependant transcriptional adaptation that results in simultaneous expression of three type 3 secretion systems, *Cell. Microbiol.* 10 (2008) 958–984.
- [16] S. Eriksson, S. Lucchini, A. Thompson, M. Rhen, J.C.D. Hinton, Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*, *Mol. Microbiol.* 47 (2003) 103–118.
- [17] H. Gu, C. Zhao, T. Zhang, H. Liang, X.-M. Wang, Y. Pan, X. Chen, Q. Zhao, D. Li, F. Liu, C.-Y. Zhang, K. Zen, *Salmonella* produce microRNA-like RNA fragment Sal-1 in the infected cells to facilitate intracellular survival, *Sci. Rep.* 7 (2017) 2392.
- [18] S.E. Duthier, L.L. Lorenze, Staphylococcal coagulase: mode of action and antigenicity, *J. Gen. Microbiol.* 6 (1952) 95–107.
- [19] M.T. Koskinen, J. Holopainen, S. Pyörälä, P. Bredbacka, A. Pitkälä, H.W. Barkema, R. Bexiga, J. Roberson, L. Sølverød, R. Piccinini, D. Kelton, H. Lehmusto, S. Niskala, L. Salmikivi, Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens, *J. Dairy Sci.* 92 (2009) 952–959.
- [20] N.H. Smith, P.B. Crichton, D.C. Old, C.F. Higgins, Ribosomal-RNA patterns of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and related Enterobacteriaceae, *J. Med. Microbiol.* 25 (1988) 223–228.
- [21] H. Le Pabic, N. Germain-Amiot, V. Bordeau, B. Felden, A bacterial regulatory RNA attenuates virulence, spread and human host cell phagocytosis, *NAR* 43 (2015) 9232–9248.
- [22] B. Kozera, M. Rapacz, Reference genes in real-time PCR, *J. Appl. Genetics* 54 (2013) 391–406.

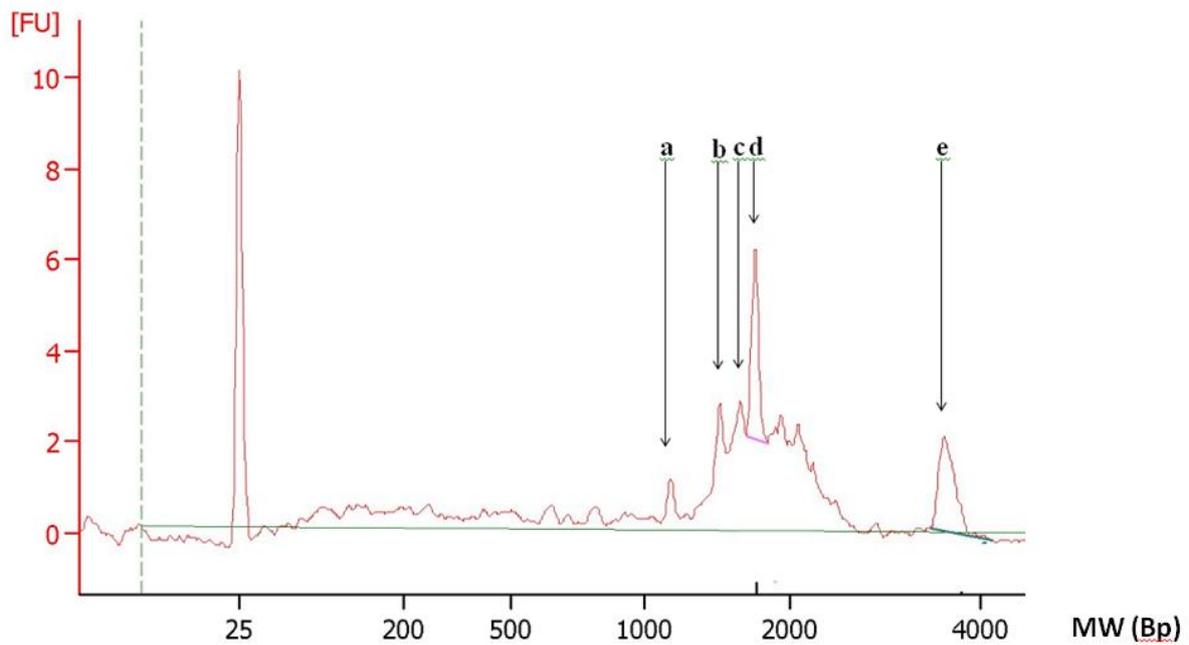
Supplemental Data.



**Supplemental Figure A.1:** Electrophoregram of the extracted RNAs after *S. aureus* internalized by THP1-macrophage cells. a = 16S rRNA, b = 23S rRNA degradation, c = 23S rRNA.

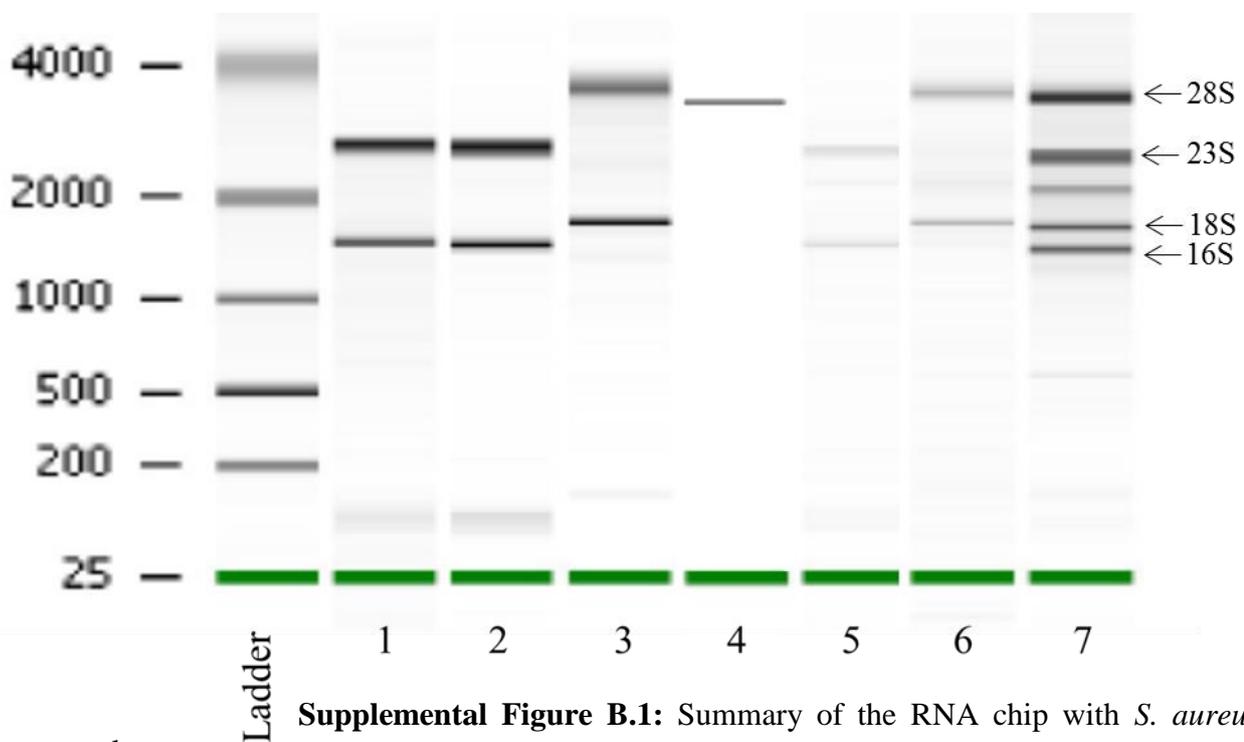


**Supplemental Figure A.2:** Electrophoregram of the extracted RNAs after *S. aureus* internalization by Saos-2-osteoblast cells. a = 16S rRNA, b = 18S rRNA, c = 23S rRNA degradation, d = 23S rRNA, e = 28S rRNA.



**Supplemental Figure A.3:** Electrophoregram of the extracted RNAs after *S. typhimurium* internalization by THP1-macrophage cells.

a = 23S rRNA fragment (1.1kb), b = 16S rRNA, c = 23S rRNA larger fragment (1.7kb), d = 18S rRNA, e = 28S rRNA.

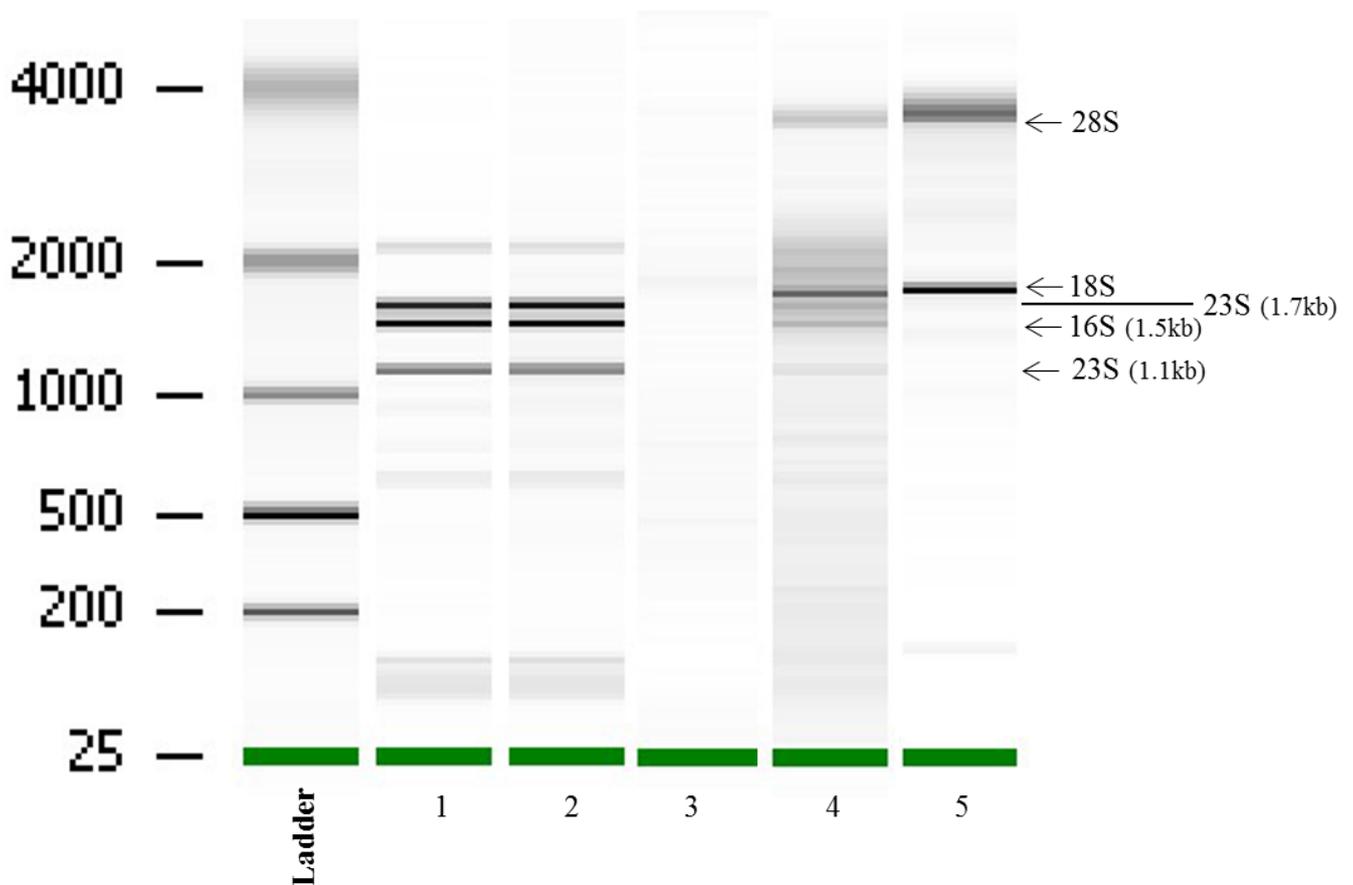


**Supplemental Figure B.1:** Summary of the RNA chip with *S. aureus*

samples

1 = *S. aureus* control extract with glass beads,

- 2 = *S. aureus* control extract with zirconium beads,
- 3 = non-infected macrophages extract with Qiagen kit,
- 4 = macrophages-internalized *S. aureus* extract with glass beads,
- 5 = macrophages-internalized *S. aureus* extract with zirconium beads,
- 6 = Saos-2-internalized *S. aureus* extract with glass beads,
- 7 = Saos-2-internalized *S. aureus* extract with zirconium beads.

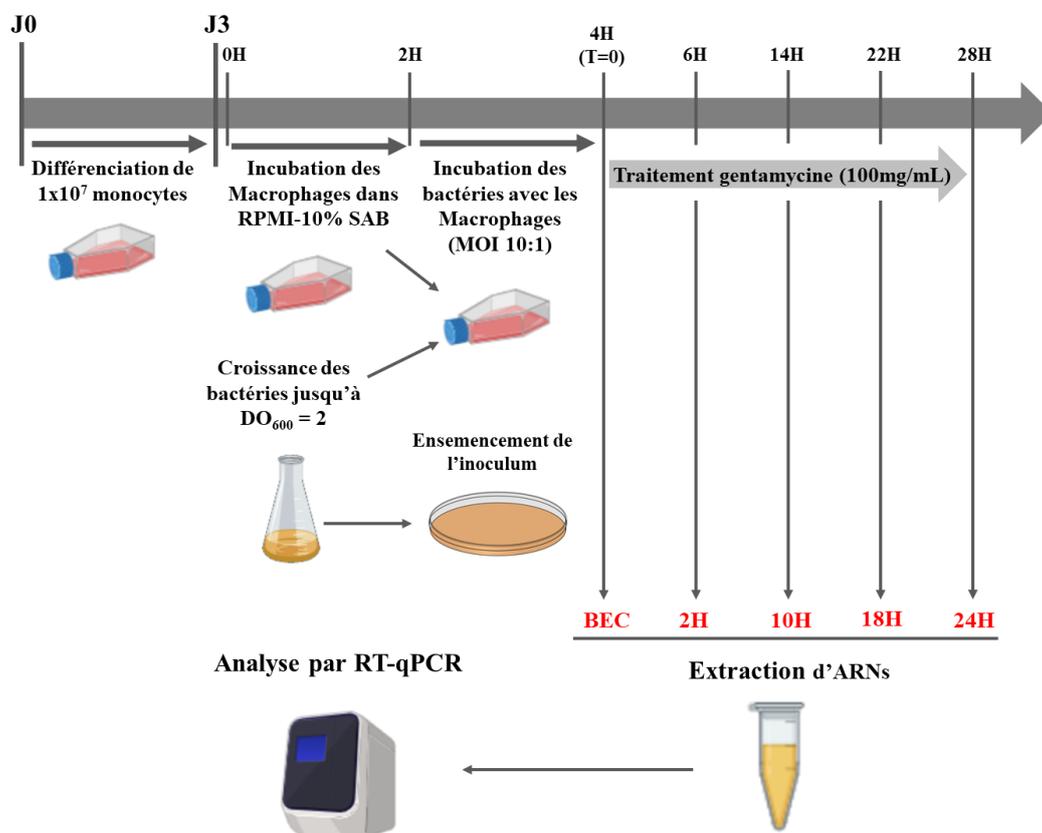


**Supplemental Figure B.2:** Summary of the RNA chip with *S. typhimurium* samples.

- 1 = *S. typhimurium* control extract with glass beads,
- 2 = *S. typhimurium* control extract with zirconium beads,
- 3 = macrophages-internalized *S. typhimurium* extract with glass beads,
- 4 = macrophages-internalized *S. typhimurium* extract with zirconium beads,
- 5 = non-infected macrophages extract with Qiagen kit.

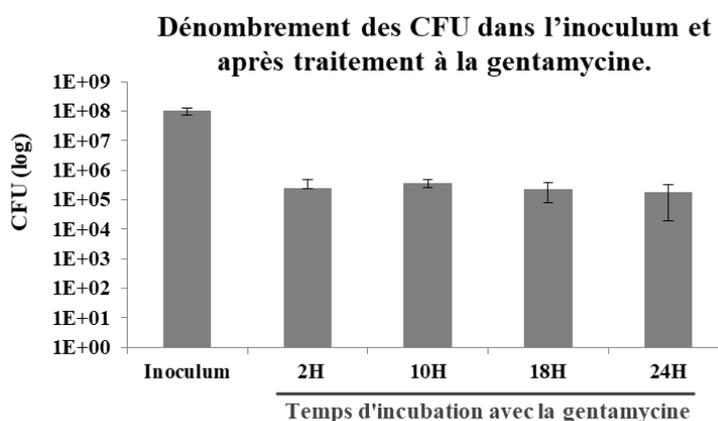
## B/ Étude des cibles ARNm de SprC validées au cours de l'internalisation

Pour l'étude des cibles ARNm de SprC, validées *in vitro*, au cours de l'internalisation des bactéries par les macrophages, nous avons tout d'abord différencié des monocytes THP1 en macrophages à l'aide de phorbol 12-myristate 13-acétate à 120ng/mL (PMA) pendant 3 jours (Figure 64). Puis, après avoir incubé nos macrophages pendant 2 heures avec du sérum humain de type AB (SAB), nous avons ensemencé nos bactéries ( $1 \times 10^8$  CFU) à une multiplicité d'infection (MOI) de 1:10, c'est-à-dire 1 macrophage pour 10 bactéries. En parallèle nous avons réalisé un contrôle en ensemencant le même inoculum bactérien ( $1 \times 10^8$  CFU) dans le milieu de culture des macrophages (RPMI + sérum humain). Après 2 heures de contact entre les bactéries et les macrophages, nous avons récupéré le surnageant de culture que nous avons centrifugé pour récupérer les bactéries extracellulaires (BEC) et avons incubé les macrophages avec 100µg/mL de gentamicine pendant différents temps afin d'éliminer les bactéries extracellulaires contaminantes (2H, 10H, 18H et 24H). Nous avons ensuite extraits les ARNs des bactéries internalisées et étudié le niveau de transcrits de chaque gènes par RT-qPCR.



**Figure 64 : Protocole utilisé lors de l'étude du niveau de transcrits des gènes cibles au cours de l'internalisation.** BEC = Bactéries ExtraCellulaires ; SAB = Sérum humain de type AB

Afin de s'assurer de la reproductibilité de nos expériences, nous avons tout d'abord commencé par vérifier notre inoculum, par dénombrement sur boîtes. De plus, nous avons également vérifié l'efficacité du traitement à la gentamicine de nos macrophages en réalisant un dénombrement du nombre de bactéries présentes dans le dernier lavage avant l'extraction des ARNs. Nous avons pu valider l'inoculum puisque nous obtenons un dénombrement moyen de  $1,02 \times 10^8$  UFC ( $\pm 0,2$ ) sur nos cinq expériences pour un inoculum théorique de  $1 \times 10^8$  UFC (Figure 65). De plus, lors du traitement à la gentamicine, nous obtenons une décroissance du nombre de bactéries présentes dans le dernier lavage d'un facteur 1000 (Figure 65). Ainsi, lorsque l'on fait le ratio entre le nombre de bactérie restant dans le dernier lavage et notre inoculum de départ, celui-ci est compris entre 0,17% et 0,35% en fonction des différentes conditions (Tableau 5).



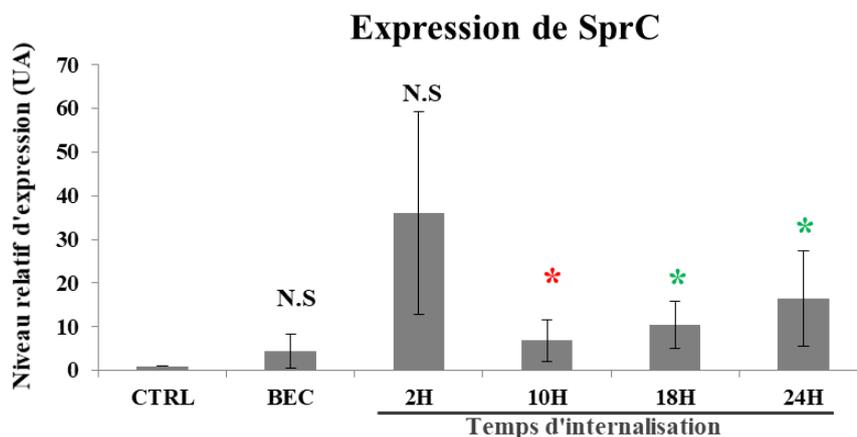
**Figure 65 : Vérification de l'inoculum et de l'efficacité du traitement à la gentamicine.** Dénombrements effectués sur boîtes BHI à partir de dilution de l'inoculum et des bactéries présentes dans le dernier lavage après les différents temps d'incubation avec la gentamicine (100mg/mL). Les données représentent la moyenne de cinq expériences indépendantes réalisées en duplicat technique.

**Tableau 5 : Pourcentage de l'inoculum restant après un traitement à la gentamicine à 100mg/mL.** Les données représentent la moyenne de cinq expériences indépendantes réalisées en duplicat technique.

	2H	10H	18H	24H
Pourcentage	0,24	0,35	0,22	0,17

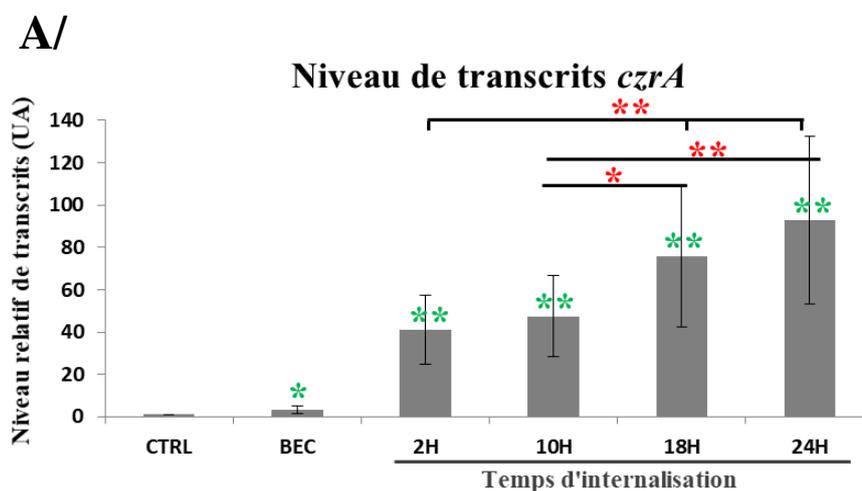
Après avoir validé les conditions expérimentales, nous avons étudié le niveau de transcrits de nos gènes pour chacune des conditions : bactéries extracellulaires (BEC) et pendant les différents temps d'internalisation à partir du traitement à la gentamicine (2H, 10H, 18H et 24H). Tout d'abord, nous nous sommes intéressés à l'expression de l'ARN SprC dans ces différentes conditions. On peut observer une légère augmentation de l'expression de SprC

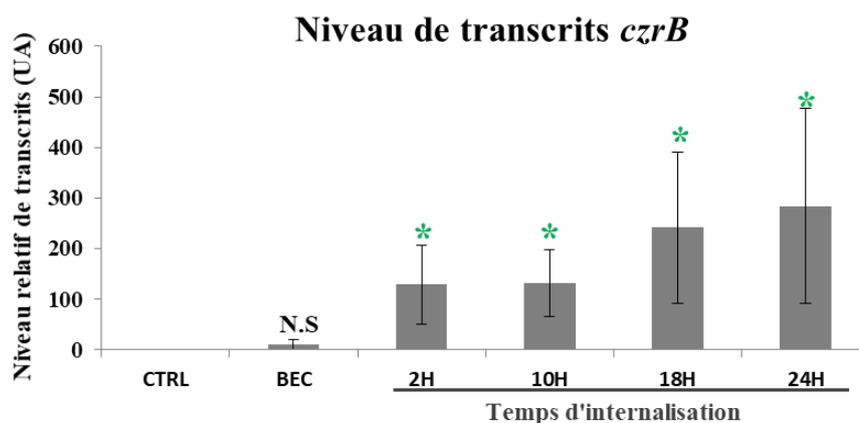
(non significative) dans les bactéries extracellulaires en contact avec les macrophages suivie, dès le début de l'internalisation (2H) d'une forte augmentation de l'expression de SprC bien que celle-ci ne soit pas significative (Figure 66). On observe ensuite une diminution de l'expression par rapport au temps 2H suivie d'une ré-augmentation progressive de l'expression de SprC.



**Figure 66 : Étude de l'expression de SprC lors de l'internalisation.** Le niveau relatif d'ADNc a été déterminé en utilisant l'ARNm *gyrB* comme gène référent. La valeur du témoin (CTRL), bactéries cultivées dans le milieu de culture des macrophages, a été fixée à 1. Les bactéries extracellulaires (BEC) ont été récupérées en centrifugeant le milieu avant un traitement gentamicine de durée variable (2H, 10H, 18H et 24H). Les données présentées sont la moyenne de cinq expériences indépendantes. Des tests de Welch (\* $p < 0,05$ ) ou de Mann-Whitney (\* $p < 0,05$ ) ont été réalisés pour déterminer les différences significatives avec le témoin (CTRL).

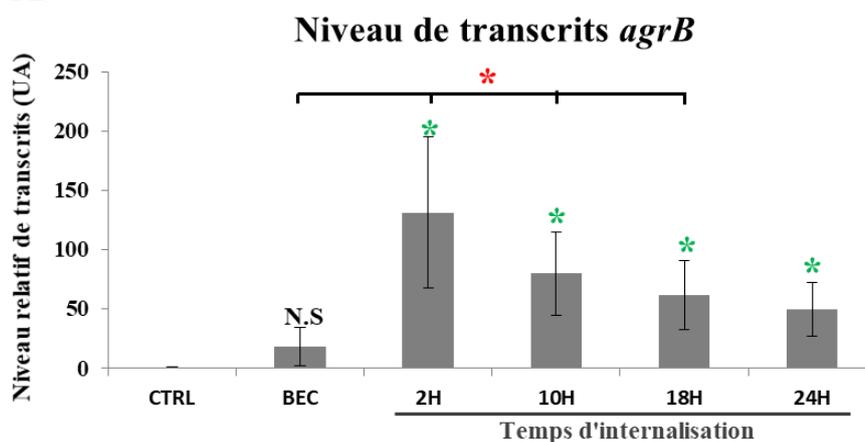
Nous nous sommes ensuite intéressés aux deux gènes de l'opéron *czrAB*. On constate que les deux membres de l'opéron ont un profil similaire dans la variation du niveau de transcrits au cours de l'internalisation (Figures 67-A, B). En effet, on observe une légère augmentation du niveau de transcrits dans les bactéries extracellulaires. De plus, au cours de l'internalisation, nous observons une forte augmentation temps-dépendant des transcrits *czrA* et *czrB* entre 2H et 24H d'internalisation par rapport au témoin non internalisé (CTRL).

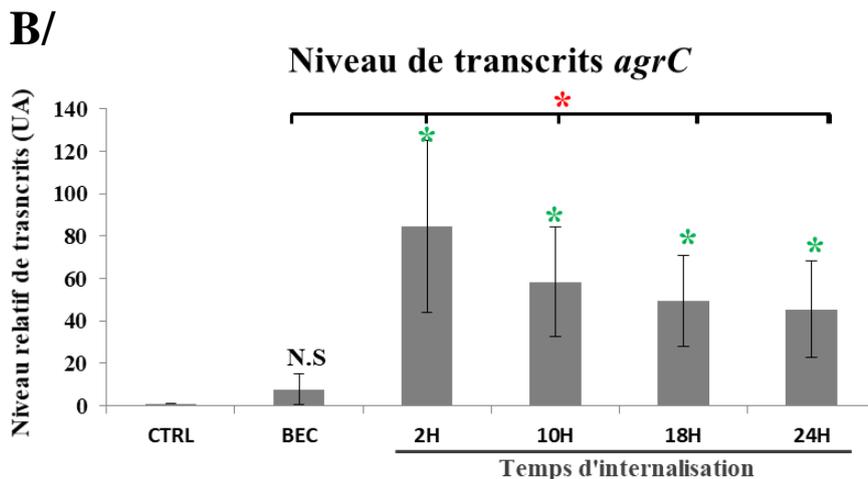


**B/**

**Figure 67 : Étude du niveau de transcrits de l'opéron *czrAB* lors de l'internalisation.** Les niveaux relatifs d'ADNc de *czrA* (A) et de *czrB* (B) ont été déterminés en utilisant l'ARNm *gyrB* comme gène référent. La valeur du témoin (CTRL), bactéries cultivées dans le milieu de culture des macrophages, a été fixée à 1. Les bactéries extracellulaires (BEC) ont été récupérées en centrifugeant le milieu avant un traitement gentamicine de durée variable (2H, 10H, 18H et 24H). Les données présentées sont la moyenne de cinq expériences indépendantes. Des tests de Welch ont été réalisés pour déterminer les différences significatives avec le témoin (\* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$ ) et des tests-t de Student ont été réalisés pour déterminer les différences significatives entre les différentes conditions d'internalisation (\* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$ ).

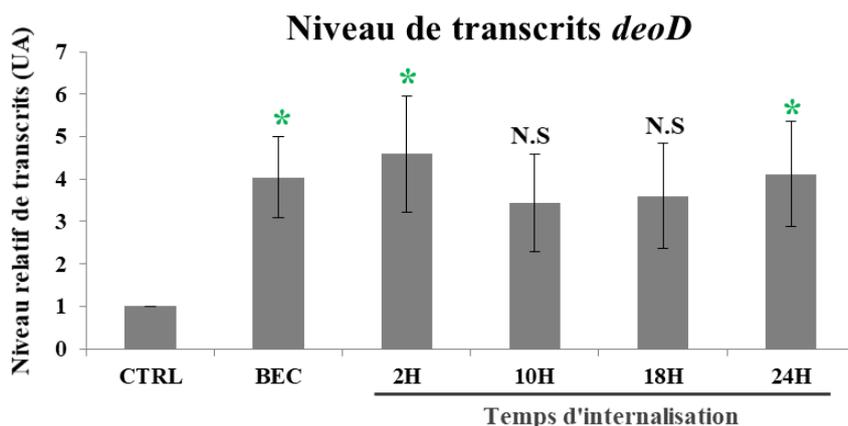
Par la suite, nous avons étudié les deux membres du système Agr, *agrB* et *agrC*. Ici, comme pour *czrAB*, les deux transcrits du système Agr ont un profil similaire (Figures 68-A, B). Tout d'abord, nous observons une augmentation (non significative) dans les bactéries extracellulaires suivie d'une très forte augmentation au début de l'internalisation (2H). Puis, à l'inverse de l'opéron *czrAB*, on observe une diminution temps-dépendant des niveaux de transcrits *agrB* et *agrC* jusqu'à des niveaux restants tout de même élevés avec des facteurs d'augmentation de 50 et 45 respectivement par rapport au contrôle (Figures 68-A, B).

**A/**



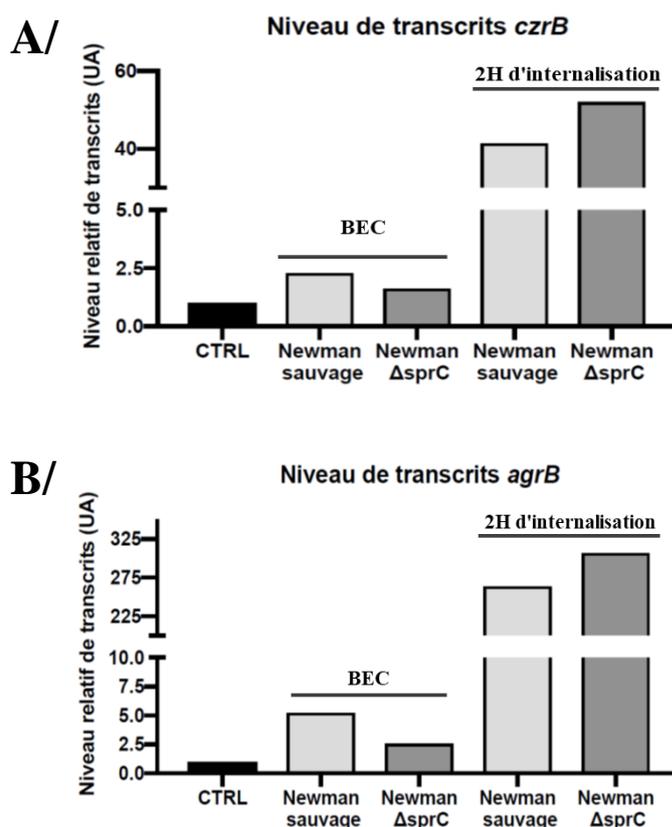
**Figure 68 : Étude du niveau de transcrits *agrB* et *agrC* lors de l'internalisation.** Les niveaux relatifs d'ADNc de *agrB* (A) et de *agrC* (B) ont été déterminés en utilisant l'ARNm *gyrB* comme gène référent. La valeur du témoin (CTRL), bactéries cultivées dans le milieu de culture des macrophages, a été fixée à 1. Les bactéries extracellulaires (BEC) ont été récupérées en centrifugeant le milieu avant un traitement gentamicine de durée variable (2H, 10H, 18H et 24H). Les données présentées sont la moyenne de quatre expériences indépendantes. Des tests de Welch ont été réalisés pour déterminer les différences significatives avec le contrôle (\* $p < 0,05$ ) et des tests-t de Student ont été réalisés pour déterminer les différences significatives entre les différentes conditions d'internalisation (\* $p < 0,05$ ).

Enfin, nous avons étudié la variation du niveau de transcrits *deoD* dans ces mêmes conditions. Sur la Figure 69, on peut voir que le niveau de *deoD* est augmenté d'un facteur 4 dans les bactéries extracellulaires par rapport au contrôle et reste ensuite stable au cours de l'internalisation.



**Figure 69 : Étude du niveau de transcrits *deoD* lors de l'internalisation.** Le niveau relatif d'ADNc a été déterminé en utilisant l'ARNm *gyrB* comme gène référent. La valeur du témoin (CTRL), bactéries cultivées dans le milieu de culture des macrophages, a été fixée à 1. Les bactéries extracellulaires (BEC) ont été récupérées en centrifugeant le milieu avant un traitement gentamicine de durée variable (2H, 10H, 18H et 24H). Les données présentées sont la moyenne de trois expériences indépendantes. Des tests de Welch ont été réalisés pour déterminer les différences significatives avec le témoin (\* $p < 0,05$ ).

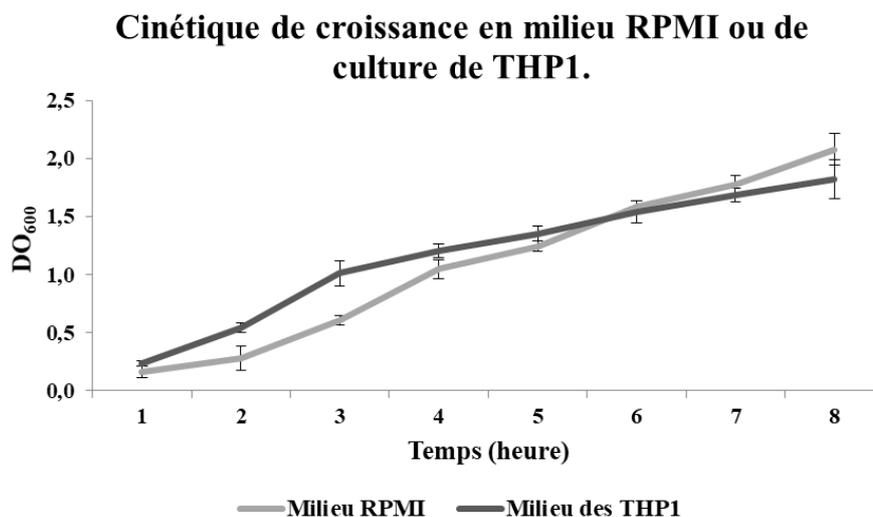
SprC intervenant dans le processus d'internalisation, nous nous sommes demandés si il modulait également le niveau de transcrits de ses cibles dans ces conditions. Nous avons donc réalisé des expériences d'internalisation en comparant le niveau de transcrits de *czrB* et *agrB* dans les bactéries extracellulaires ainsi qu'après 2 heures d'internalisation des souches Newman sauvage et Newman  $\Delta sprC$  (Figures 70-A, B). Les résultats préliminaires nous donnent des variations semblables pour les deux transcrits étudiés. Tout d'abord, dans le milieu extracellulaire, l'expression de SprC semble avantagée la souche Newman puisqu'on observe une augmentation du niveau de transcrits d'un facteur 2 pour *czrB* et *agrB* dans la souche sauvage par rapport à la souche  $\Delta sprC$ . A l'inverse, une fois les bactéries internalisées, l'expression de SprC semble diminuer le niveau de transcrits des cibles. En effet, pour *czrB*, on observe une diminution de 20% du niveau de transcrits en présence de SprC (Figure 70-A). De même, pour *agrB* une diminution de 15% est observée en présence de SprC (Figure 70-B). L'expérience n'ayant été réalisée qu'une fois, ces données nécessitent d'être reproduites pour être confirmées.



**Figure 70 : Étude du niveau de transcrits de *czrB* et *agrB* lors de l'internalisation en fonction de l'expression de SprC.** Les niveaux relatifs d'ADNc de *czrB* (A) et de *agrB* (B) ont été déterminés en utilisant l'ARNm *gyrB* comme gène référent. La valeur du témoin (CTRL), bactéries cultivées dans le milieu de culture des macrophages, a été fixée à 1. Les bactéries extracellulaires (BEC) ont été récupérées en centrifugeant le milieu avant un traitement gentamicine (100mg/mL) pendant 2 heures.

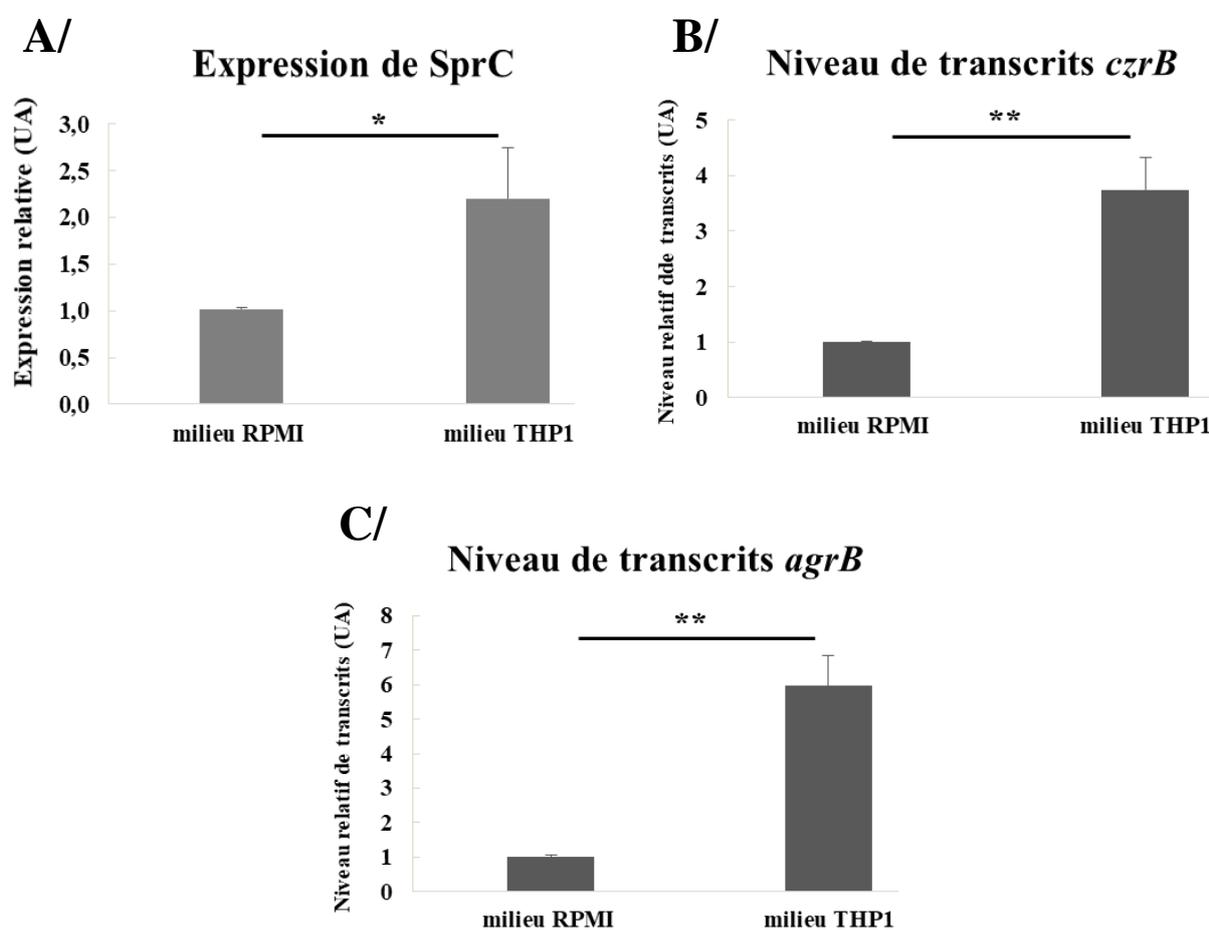
### C/ Étude de l'effet du milieu de culture des monocytes THP1 sur *S. aureus*

Lors de l'étude de nos gènes cibles dans des conditions d'internalisation des bactéries par les macrophages, nous nous sommes aperçus que l'expression de ces gènes était modifiée au contact des macrophages dans le milieu extracellulaire. Pour aller plus loin, nous avons étudié l'effet de ce milieu de culture des monocytes THP1 sur *S. aureus* sans aucun contact préalable entre les deux. Pour cela, nous avons tout d'abord réalisé une cinétique de croissance en erlenmeyer, en mettant en culture *S. aureus* Newman dans du milieu RPMI ou dans du milieu de culture de monocytes THP1. Tout d'abord, on constate que les bactéries ont une croissance ralentie dans ces deux milieux pauvres en nutriments (Figure 71). De plus, on remarque que dans un premier temps, les bactéries poussent mieux dans le milieu de culture des monocytes THP1 jusqu'à 5 heures de croissance. Puis, dans un second temps, on observe un switch dans la dynamique de croissance des bactéries. En effet, elles poussent mieux dans le milieu RPMI par rapport au milieu de culture des monocytes THP1 (Figure 71).



**Figure 71 : Cinétique de croissance des bactéries comparant le milieu RPMI et le milieu de culture des THP1.** *S. aureus* Newman a été ensemencé à une  $DO_{600} = 0,1$  dans du milieu RPMI et dans du milieu de culture des THP1. La croissance a été suivie par mesure de  $DO_{600}$  toutes les heures pendant 8 heures. Les données présentées sont la moyenne de quatre expériences indépendantes.

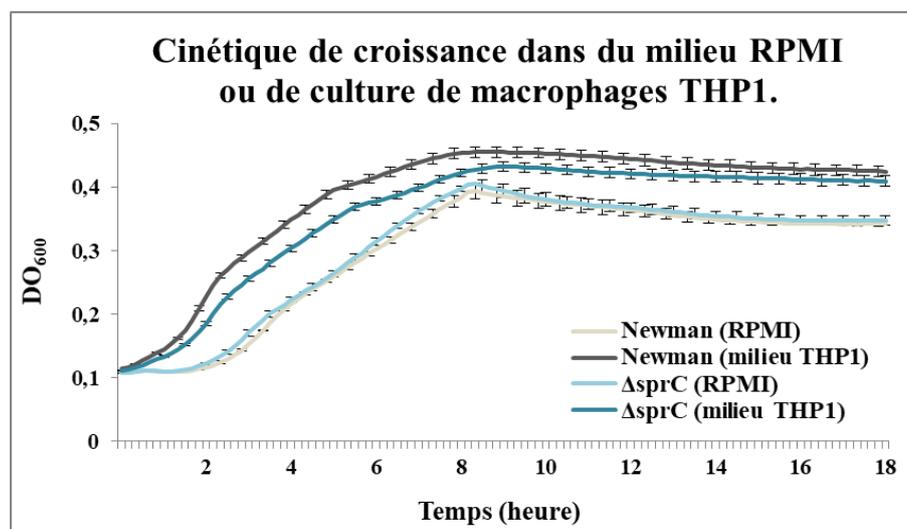
Ensuite, nous avons voulu voir si le milieu de culture des THP1, en plus d'avoir un effet sur la croissance bactérienne, modulait également l'expression des gènes cibles de SprC. Pour cela, nous avons mis en culture *S. aureus* Newman dans du milieu RPMI ou du milieu de culture de THP1 pendant 3 heures. Après 3 heures de culture, nous avons prélevé des bactéries et extraits les ARNs afin d'étudier le niveau de transcrits par RT-qPCR. Tout d'abord, la croissance des bactéries dans un milieu de culture de THP1 régule à la hausse l'expression de SprC d'un facteur 2,2 (Figure 72-A). En ce qui concerne les deux cibles de SprC que nous avons étudiées, les niveaux de transcrits de *czrB* et *agrB* sont augmentés respectivement d'un facteur 3,75 et 6 (Figures 72-B, C).



**Figure 72 : Étude de l'effet du milieu des THP1 sur le niveau de transcrits de SprC, *agrB* et *agrC*.** Les niveaux relatifs d'ADNc de SprC (A) de *czrB* (B) et de *agrB* ont été déterminés en utilisant l'*ARNtm* comme gène référent. La valeur du témoin, bactéries cultivées dans le milieu de culture RPMI, a été fixée à 1. Les données présentées sont la moyenne de quatre expériences indépendantes. Des tests de Welch ont été réalisés pour déterminer les différences significatives avec le témoin (\* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$ ).

## D/ Étude du milieu de culture des THP1-différenciés en macrophages sur *S. aureus*

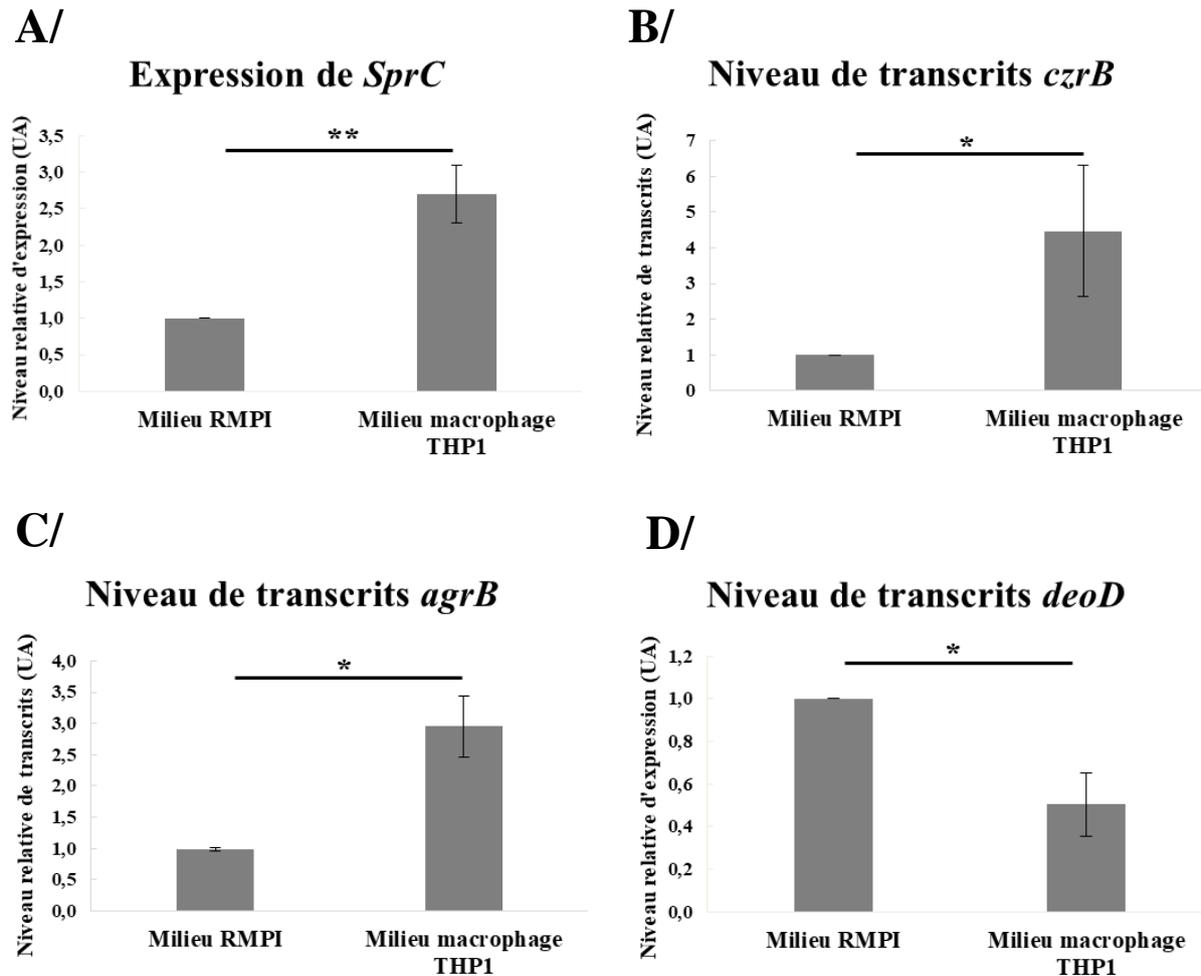
La majorité de notre étude s'étant focalisée sur les monocytes THP1 différenciés en macrophages, nous avons réalisé la même étude que précédemment avec le milieu des monocytes THP1, mais avec celui des macrophages. Ainsi, nous avons procédé de la même manière et commencé par étudier la cinétique de croissance de *S. aureus* Newman sauvage et  $\Delta sprC$  en microplaques en comparant le milieu de culture des macrophages avec le milieu RPMI contrôle. Ici aussi, on observe que les bactéries ont une croissance ralentie dans ces deux milieux de cultures (Figure 73). En revanche, les souches cultivées dans le milieu des macrophages THP1 poussent mieux que celles cultivées dans le milieu RPMI et, contrairement au milieu des monocytes THP1, on n'observe pas d'inversion de la dynamique de croissance. De plus, la souche sauvage, exprimant SprC semble avoir un léger avantage de croissance comparé à la souche  $\Delta sprC$  (Figure 73)



**Figure 73 :** Cinétique de croissance des bactéries comparant le milieu RPMI et le milieu de culture des THP1. *S. aureus* Newman sauvage et  $\Delta sprC$  ont été ensemencés à une  $DO_{600} = 0,1$  en microplaques dans du milieu RPMI et dans du milieu de culture des macrophages THP1. La croissance a été suivie par mesure de  $DO_{600}$  toutes les 10 minutes pendant 18 heures. Les données présentées sont la moyenne de trois expériences indépendantes réalisées en triplicat technique.

Pour l'étude du niveau des transcrits, nous avons effectué la même analyse que pour l'étude du milieu des monocytes THP1. C'est-à-dire que nous avons mis en culture *S. aureus* Newman dans du milieu RPMI ou du milieu de culture de macrophages THP1 pendant 3 heures. Puis, nous avons prélevé des bactéries et extraits les ARNs afin d'étudier le niveau de

transcrits par RT-qPCR (Figures 74-A, B, C et D). Tout d'abord, pour *SprC* et pour *cztB*, on observe des variations de même ordre qu'avec le milieu de culture des monocytes THP1 non différenciés, avec des facteurs d'augmentation de 2,7 et 4,5 respectivement (Figures 74-A, B). En ce qui concerne *agrB*, on observe une augmentation deux fois moins importante qu'avec le milieu de culture des monocytes, avec un facteur d'augmentation de 3 (Figure 74-C). Enfin, *deoD* est la seule cible étudiée pour laquelle on observe une diminution du niveau de transcrits, d'un facteur 2, avec le milieu des macrophages THP1 (Figure 74-D).



**Figure 74 :** Étude de l'effet du milieu des macrophages THP1 sur le niveau de transcrits de *SprC*, *cztB*, *agrB* et *deoD*. Les niveaux relatifs d'ADNc de *SprC* (A) de *cztB* (B), de *agrB* (C) et de *deoD* (D) ont été déterminés en utilisant l'*ARNtm* comme gène référent. La valeur du témoin, bactéries cultivées dans le milieu de culture RPMI, a été fixée à 1. Les données présentées sont la moyenne de trois expériences indépendantes. Des tests de Welch (\* $p < 0,05$ ) et un test-t de Student (\*\* $p < 0,01$ ) ont été réalisés pour déterminer les différences significatives avec le témoin.

# DISCUSSION ET PERSPECTIVES

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Mon travail de thèse s'inscrit dans la continuité d'une étude ayant permis la caractérisation du rôle d'un ARN régulateur, *Srn\_3610\_SprC*, dans la pathogénie de *S. aureus*. En effet, en 2015, il a été montré que cet ARN intervenait dans la virulence et la propagation des bactéries dans un modèle murin de septicémie (Le Pabic H. *et al.*, 2015). Ainsi, une souche délétée de *sprC* montre une augmentation de virulence dans ce modèle. De plus, cette même souche montre une augmentation de son internalisation par les monocytes et macrophages THP1 associée à une augmentation de la résistance bactérienne à un stress oxydant (Le Pabic H. *et al.*, 2015). Ces données nous montrent un effet anti-virulent rare chez les bactéries et qui, comme suggéré pour RsaA (Romilly C., *et al.*, 2014), pourrait favoriser un comportement de commensalisme de la bactérie afin d'éviter le système immunitaire de l'hôte. Dans le but d'identifier les mécanismes de ce rôle peu orthodoxe de *SprC*, Le Pabic H. et ses collaborateurs ont réalisé une étude protéomique comparative afin d'essayer d'identifier une protéine dont l'expression serait dépendante de l'expression de *SprC*. Ainsi, ils ont pu montrer que *SprC* interférait avec le processus d'internalisation en partie par le contrôle de l'expression d'une protéine, l'autolysine, impliquée dans l'internalisation des bactéries (Hirschhausen N., *et al.*, 2010 ; Le Pabic H. *et al.*, 2015). En effet, *SprC* régule négativement la production de l'autolysine en bloquant la traduction de son ARNm par inhibition directe. Cependant, cette interaction entre *SprC* et l'ARNm *atl* est faible ( $K_d = 35\mu M$ ) impliquant l'intervention potentielle de partenaires supplémentaires inconnus dans cette interaction. Afin d'essayer d'identifier ces partenaires putatifs, une recherche de cibles a été mise en place lors de la première partie de ma thèse.

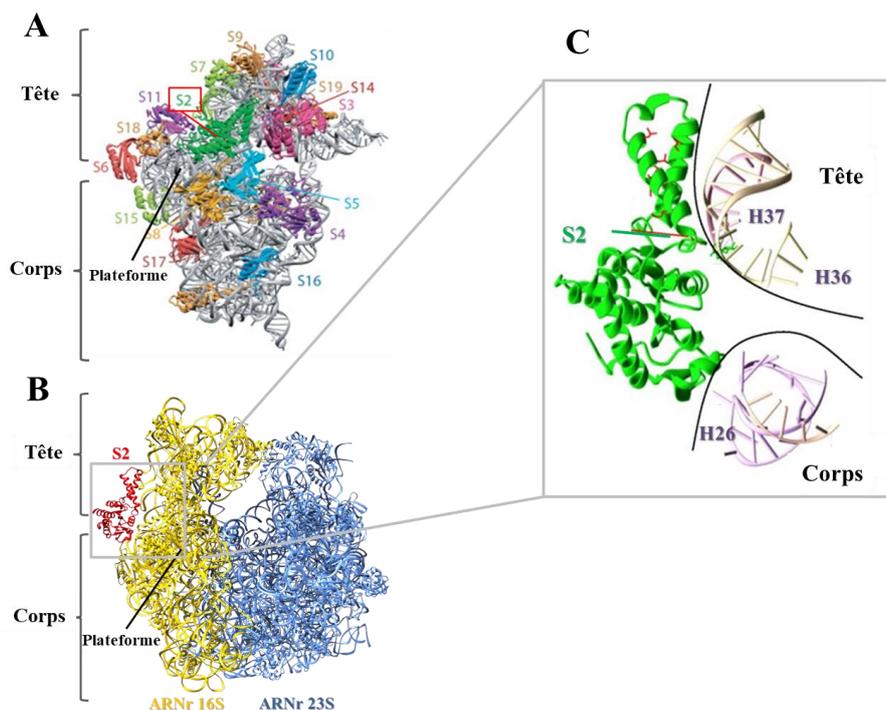
### ➤ Réalisation de la technique MAPS

Pour effectuer cette recherche, la technique MAPS (Purification par affinité avec MS2 couplée au séquençage ARN) (Saïd N., *et al.* 2009 ; Lalaouna D., *et al.*, 2015 ; Tomasini A., *et al.*, 2017) a été utilisée puisque cette stratégie, comme le montre de nombreuses études (Lalaouna D., *et al.*, 2015b ; Lalaouna D., *et al.*, 2015c ; Tomasini A., *et al.*, 2017 ; Lalaouna D., *et al.*, 2018 ; Lalaouna D., *et al.*, 2018b ; Bronesky D., *et al.*, 2019 ; Lalaouna D., *et al.*, 2019), est un outil de premier ordre pour l'étude fonctionnelle des ARN rég. La réalisation du MAPS nous a ainsi permis d'isoler une protéine (Figure 42), cible putative directe de *SprC* ainsi que 14 ARNm enrichis par fixation sur *SprC* (Tableau 4).

- **Cible protéique**

Le candidat le plus fiable en tant que partenaire protéique de SprC est la protéine ribosomale S2 (Tableau 3). En effet, son pourcentage élevé dans la bande séquencée (65%), le nombre de peptides identifiés ainsi que sa masse moléculaire théorique proche de celle visible sur le gel laisse peu de doute. Cette protéine ribosomale S2 est hautement conservée dans toutes les formes de vie (ses homologues sont appelés S0 chez la levure et SA chez les eucaryotes supérieurs) et est essentielle pour la machinerie de traduction (Aseev L.V., *et al.*, 2008 ; Aseev L.V., *et al.*, 2013). Il a été suggéré qu'elle pourrait être impliquée dans la protection et la stabilisation de l'hélice Shine-Dalgarno (SD), amarrée dans la "chambre" entre la tête et la plate-forme de la sous-unité 30S (Kaminishi T., *et al.*, 2007) ainsi que dans la liaison du duplex SD à l'étape post-initiation (Yusupova G., *et al.*, 2006). Cependant, ces données ne peuvent expliquer un rôle essentiel de S2 dans les systèmes de traduction des ARNm leaderless, n'utilisant pas l'interaction SD lors de l'initiation de la traduction (Aseev L.V., *et al.*, 2008 ; Aseev L.V., *et al.*, 2013). S2 est l'un des derniers composants identifiés dans l'assemblage de la sous-unité 30S mais elle nécessite que la surface de liaison au niveau de l'ARN soit préformée par la fixation préalable des autres protéines ribosomales. Chez *Escherichia coli* et très probablement chez d'autres organismes à Gram négatif, son association avec la particule 30S est critique pour la liaison de la protéine S1, permettant ainsi le recrutement des ARNm. Un rôle dans la formation du ribosome 100S a également pu être mis en évidence. Il s'agit d'un ribosome inactif qui se forme en condition de stress et dans lequel, deux monomères 70S interagissent par liaison flexible de leurs deux sous-unités 30S (Shcherbakova K., *et al.*, 2015). Enfin, des activités extra-ribosomales ont été démontrées puisque des complexes S1-S2 ont été co-purifiés avec l'ARN polymérase et Hfq dans des cultures d'*E. coli* en phase stationnaire (Sukhodolets M.V., *et al.*, 2003 ; Aseev L.V., *et al.*, 2008). De plus, la protéine S2 réprime sa propre traduction par fixation au niveau 5'UTR de son ARNm. Cette protéine est connue pour lier l'ARN puisqu'au sein de la sous-unité 30S du ribosome, elle forme plusieurs contacts directs avec un certain nombre d'hélices de l'ARNr 16S (Figure 75), notamment H35-H37 au niveau de la tête de la protéine et H26 dans le corps (Aseev L.V., *et al.*, 2008 ; Aseev L.V., *et al.*, 2013). Cette capacité à lier l'ARN 16S pourrait expliquer le fait que nous arrivons à l'enrichir en utilisant la technique MAPS. De plus, nous ne pouvons exclure que la protéine S2 soit enrichie de manière aspécifique sans lien réel avec SprC. Cependant, on observe un enrichissement plus important lorsque l'on utilise une souche délétée de *sprC* indiquant une éventuelle spécificité pour cet ARNrég. En outre, cette protéine a également été montrée comme enrichie par sa fixation à un autre régulateur de la famille des

Spr, l'ARN SprD (données non publiées). Or ces deux ARNrég jouant un rôle dans la virulence de *S. aureus* sur un modèle murin (Chabelskaya S., *et al.*, 2010 ; Le Pabic H. *et al.*, 2015), nous pouvons émettre l'hypothèse d'un rôle de cette protéine dans la régulation de la virulence de *S. aureus*. On pourrait également imaginer un rôle de chaperonne de cette protéine en dehors de son activité ribosomale. Ce rôle n'a pas encore été investigué mais pourrait faire l'objet d'une étude ultérieure au sein du laboratoire.



**Figure 75: Localisation de la protéine S2 au sein du ribosome.** (A) Sous-unité 30S avec l'ARN 16S en gris et les différentes protéines ribosomales en couleur. La protéine S2 est représentée en vert (adaptée de Broderson D.E., *et al.*, 2002). (B) Représentation du ribosome avec l'ARNr 16S en bleu, l'ARNr 23S en jaune et la protéine S2 en rouge (Giudice E., données non publiées). (C) Interaction entre la protéine S2 et l'ARNr 16S au niveau des hélices H36 et H37 de la tête et H26 du corps (adaptée de Broderson D.E., *et al.*, 2002).

- **Cibles ARNm**

Lors de la réalisation du MAPS pour identifier de nouvelles cibles ARNm de SprC, nous avons un contrôle positif puisque SprC régule négativement la traduction de l'ARNm *atl* par fixation directe (Le Pabic H., *et al.*, 2015). Cependant, les RT-qPCR contrôles réalisées avant le MAPS ne montraient pas d'enrichissement de cet ARNm *atl* cible (données non montrées). Néanmoins, nous avons émis l'hypothèse qu'une absence d'enrichissement pouvait être observée. En effet, à 2,5 heures de croissance bactérienne, temps choisi pour effectuer l'expérience de MAPS, l'ARNm de l'Atl est peu exprimé (Le Pabic H., *et al.*, 2015). Cela se traduit par un pool en ARNm libre faible et donc il est fort probable que l'on n'isole pas assez d'ARNm pour obtenir un niveau d'enrichissement significativement différent entre

le contrôle MS2 seul et notre appât MS2\_SprC. A cela on peut ajouter la faible interaction entre SprC et l'ARNm *atl* ( $K_d = 35\mu\text{M}$ ) qui peut s'avérer délétère pour la purification de ce dernier par affinité. De plus, lors des étapes de purification, de nombreux lavages sont réalisés afin d'éliminer les ARNs fixés de manière aspécifique et de réduire au maximum le bruit de fond. Or, l'équilibre est tenu entre le nombre minimum de lavages nécessaires pour diminuer le bruit de fond et ainsi faire ressortir un ARNm majoritaire, et un nombre de lavages trop important pouvant empêcher la détection d'un ARN faiblement enrichi. Enfin, on ne peut pas exclure que l'addition de l'étiquette MS2 sur notre appât modifie sa conformation empêchant ainsi la fixation de l'ARNm *atl*. Pour anticiper cette absence d'enrichissement de l'*atl*, nous avons réalisé en parallèle un contrôle interne avec un construit MS2\_ARNIII afin de s'assurer que les conditions utilisées lors du MAPS permettaient l'enrichissement de cibles potentielles. L'utilisation de l'appât MS2\_ARNIII nous a permis d'enrichir l'ARNm *rot*, cible connue de l'ARNIII, d'un facteur 8 (données non montrées).

Le RNAseq effectué afin d'identifier les ARNs ayant été isolés par fixation à SprC lors du MAPS nous a fourni une liste de 14 ARNm enrichis avec un facteur d'enrichissement  $>2$  et une p. valeur ajustée pour les tests multiples  $<0,05$  (Tableau 4). Il a ensuite fallu faire un choix afin de sélectionner certaines cibles et étudier plus en détail leur interaction avec SprC ainsi que leurs rôles dans la pathogénie de *S. aureus*. Notre choix s'est ainsi porté sur des ARNm ayant une implication potentielle dans la virulence et/ou l'internalisation de *S. aureus* par les cellules humaines. En effet, cela nous permettait de faire un lien avec SprC dont les effets anti-virulents et anti-phagocytaires ont pu être montrés (Le Pabic H., *et al.*, 2015). C'est pourquoi nous nous sommes focalisés plus particulièrement sur cinq cibles : *deoD*, *czrB*, *mgrA*, *agrB* et *agrC*. Cependant, nous aurions également pu opter pour d'autres critères dans la sélection des cibles à étudier. En effet, si l'on s'abstient dans un premier temps de penser au lien avec SprC, le critère le plus important pour choisir des cibles putatives est la prédiction d'interaction *in silico* avec SprC. Dans ce cas, si l'on sélectionne les cinq cibles ayant la meilleure énergie d'interaction avec SprC, on aurait choisi :

- la protéine hypothétique conservée NWMN\_0430 avec une énergie de -16,3kcal/mol et un enrichissement de 9,1 (= le 2<sup>ème</sup>).
- le **transporteur CzrB** que nous avons étudié avec une énergie de -13,5kcal/mol et un enrichissement de 6,4 (= le 3<sup>ème</sup>).
- la protéine hypothétique NWMN\_1548 avec une énergie de -12,5kcal/mol et un enrichissement de 3,4 (= le 10<sup>ème</sup>).

- le transporteur Bcr/CflA avec une énergie de -11,8kcal/mol et un enrichissement de 4,8 (= le 5<sup>ème</sup>).
- le transporteur BrnQ2 avec une énergie de -10,4kcal/mol et un enrichissement de 3,3 (= le 11<sup>ème</sup>).

On remarque alors qu'avec ces critères, il ne reste qu'une seule des cibles que nous avons sélectionnées, le transporteur CzrB. En prenant également en compte le niveau d'enrichissement de ces cibles putatives, deux d'entre elles ressortent : la protéine hypothétique NWMN\_0430 et le transporteur Bcr/CflA. Il serait donc intéressant d'envisager l'étude de ces deux cibles ultérieurement. Cependant, un alignement avec BlastP ne nous a donné aucune information sur les fonctions éventuelles de la protéine NWMN\_0430 par ressemblance avec un motif protéique connu. La seule information que nous avons pu obtenir est qu'il s'agirait d'une protéine membranaire.

Le transporteur Bcr/CflA quant à lui appartient à un groupe d'antiporteur conférant une résistance au chloramphénicol et au florfénicol chez *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104 et *Pseudomonas* ainsi qu'à la bicyclomycine chez *E. coli* en les transportant activement à l'extérieur des bactéries (Smith K.P., *et al.*, 2009). Les études précédentes réalisées au laboratoire et s'étant intéressées à un éventuel effet de SprC sur la résistance aux antibiotiques n'ont rien donné de concluant. Cependant, si un lien est démontré entre SprC et sur Bcr/CflA, il pourrait être intéressant d'étudier la résistance vis-à-vis de ces trois antibiotiques. D'autres cibles pourraient également être intéressantes comme FapR, NWMN\_0402, BrnQ2 et NWMN-1548.

FapR est le premier régulateur global de la synthèse des lipides découvert chez les bactéries. C'est un régulateur en grande partie conservé dans les organismes à Gram positif, y compris les agents pathogènes humains tels que *Staphylococcus aureus*, *Bacillus anthracis* et *Listeria monocytogenes* (Albanesi D., *et al.*, 2016). De plus, un fort potentiel de ce système comme cible pour de nouveaux médicaments contre les bactéries à Gram positif a également été décrit (Albanesi D., *et al.*, 2016).

Un alignement avec BlastP de NWMN\_0402 montre que cette protéine serait similaire à une protéine inhibitrice de la myéloperoxydase humaine et jouerait un rôle dans l'inhibition de l'opsonisation et de la phagocytose par les neutrophiles (de Jong N.W.M., *et al.*, 2017). On voit ici un lien évident avec SprC qui pourrait potentiellement amplifier l'action de cette protéine en augmentant son expression.

BrnQ2 est un des trois systèmes de transport des acides aminés à chaîne ramifiée de *S. aureus*, spécifiquement impliqué dans le transport de l'isoleucine (Kaiser J.C., *et al.*, 2015). Ces transporteurs sont importants pour l'apport en nutriments et pour la croissance de *S. aureus*. De plus, les acides aminés à chaîne ramifiée sont des activateurs de CodY, un répresseur transcriptionnel modulant des centaines de gènes, dont la plupart sont des facteurs de virulence et des gènes du métabolisme, en réponse à la disponibilité de nutriments clés comme le GTP et les acides aminés à chaîne ramifiée (Waters N.R., *et al.*, 2016). Ainsi, SprC pourrait permettre, via la régulation de *brnQ2*, la modulation de la disponibilité en isoleucine impactant indirectement la virulence de *S. aureus*.

Enfin, un alignement avec BlastP de NWMN\_1548 nous montre une similarité avec la cystéine protéase Prp. Or cette Prp permet le clivage de la protéine ribosomale L27, nécessaire à la libération de résidus critiques pour la stabilisation des ARNt au centre du site actif des ribosomes. Il a été suggéré que Prp pourrait être une nouvelle cible pour le développement potentiel d'un nouvel antibiotique du fait de la dépendance de *S. aureus* au clivage de L27 par cette enzyme ainsi que par le fait que ces deux protéines soient essentielles à sa survie (Wall E.A., *et al.*, 2017). Fait encore plus intéressant, la protéine L27 fait également partie des cibles de SprC identifiées par MAPS (Tableau 4). Ainsi, on peut imaginer une double régulation de SprC sur la Prp ainsi que sur la protéine L27 afin d'atténuer la virulence de la bactérie.

Pour finir, nous avons réalisé notre MAPS à 2,5 heures, correspondant à un temps de croissance où SprC est au début de son second pic d'expression (Figure 40). Nous pourrions refaire l'expérience à 4 heures de croissance, pour être au sommet de ce pic d'expression et ainsi confirmer certaines cibles ou en faire ressortir de nouvelles.

### ➤ Étude de l'interaction entre SprC et les cibles sélectionnées

Parallèlement au choix des cibles à étudier, nous avons réalisé des prédictions d'interactions *in silico* entre SprC et chacune d'entre elles. Puis nous avons essayé de confirmer ces interactions *in vitro* par gel retard ainsi que dans un contexte « *in vivo* » par l'utilisation d'un système rapporteur à double plasmides.

Si on se penche plus attentivement sur les prédictions d'interactions entre SprC et ses cinq cibles putatives (*deoD*, *czrB*, *mgrA*, *agrB* et *agrC*), on s'aperçoit qu'elles sont toutes situées au niveau de la tige-boucle H2 de SprC. Ces interactions sont plus précisément situées entre les nucléotides 64 et 90, région déjà connue pour interagir avec l'ARNm *atl* (Le Pabic

H., *et al.*, 2015). Cette zone de SprC pourrait donc représenter une séquence consensus d'interaction avec plusieurs cibles. La recherche de prédiction d'interaction *in silico* entre SprC et les neuf autres cibles putatives isolées par la technique du MAPS a permis d'argumenter cette hypothèse. En effet, six de ces cibles possèdent une prédiction d'interaction située dans cette région et une autre cible possède une prédiction d'interaction située à cheval sur cette zone de 26 nucléotides. Une hypothèse alternative serait que l'ajout de l'étiquette MS2 ait pu modifier la conformation de SprC rendant cette zone particulièrement accessible favorisant ainsi ces interactions.

- **Gel retard**

Les expériences de gel retard nous ont permis de valider trois cibles, *czrB* ; *deoD* et *agrB*, avec des *K<sub>d</sub>* calculés de 230nM, 1µM et 11µM respectivement. En ce qui concerne *agrB* et *deoD*, les gels retards ont été difficile à mettre en évidence et ont nécessité l'utilisation d'un transcrit comprenant l'ensemble de l'ARNm ainsi que la partie 5'UTR. Cela suggère une importance, pas toujours prise en compte, de la structure secondaire des ARNs dans les études d'interactions *in vitro*. De plus, malgré la mise en évidence d'interactions *in vitro*, celles-ci s'avèrent faibles suggérant encore une fois l'intervention d'une possible chaperonne *in vivo*, non identifiée à ce jour. En ce qui concerne *agrC* et *mgrA*, aucun retard n'a pu être mis en évidence quel que soit le transcrit utilisé (court ou long) pouvant suggérer qu'ils s'agissent de faux positifs enrichis de manière aspécifique.

- **Système rapporteur à double plasmides**

Nous avons également étudié ces cibles dans des conditions « *in vivo* » au sein de la bactérie afin de se rapprocher des conditions physiologiques dans lesquelles ces cibles peuvent interagir avec SprC. Pour cela nous avons utilisé un système rapporteur à double plasmides nous permettant de suivre les interactions putatives entre deux ARNs par mesure de niveau de fluorescence d'une fusion traductionnelle ARN-GFP.

Cette technique nous a tout d'abord permis de montrer une très faible variation du niveau de fluorescence de notre construit *czrAB-gfp* (Figure 53-A) indiquant une régulation négative de SprC sur la traduction de l'opéron *czrAB*. Bien que cette variation soit significative d'un point de vue statistique grâce à la forte reproductibilité de nos données, la question de la relevance biologique doit se poser. En effet, une variation si faible peut-elle honnêtement être relevante et avoir un impact physiologique au niveau de la bactérie ? Les études ultérieures que nous avons menées dans la caractérisation de la régulation de SprC sur

l'opéron *czrAB* nous laissent penser que cette interaction est réelle et que la faible variation est surtout due au système rapporteur. En effet, l'utilisation d'un promoteur fort, comme *PtufA*, pour l'expression de notre fusion pourrait permettre d'obtenir de meilleurs résultats. De plus, l'utilisation d'un mutant de délétion de *sprC* pourrait nous permettre de nous affranchir du niveau endogène de SprC pouvant interférer avec le système rapporteur.

Cela a notamment été le cas avec notre fusion *deoD-gfp* puisqu'on n'observe aucune différence du niveau de fluorescence dans la souche sauvage lorsque l'on surexprime SprC (Figure 53-C) alors que dans la souche isogénique délétée de *sprC* on observe une augmentation de cette fluorescence lorsque l'on exprime SprC (Figure 53-D). Cette augmentation de fluorescence indique un effet positif de SprC sur la traduction de *deoD*. Cependant, bien qu'il soit plus important que pour notre construit *czrAB-gfp*, cet effet reste modeste et pose encore une fois la question de la pertinence biologique de la faible variation du niveau de fluorescence de cette interaction. Ici aussi la question d'un changement de promoteur se pose afin de d'obtenir de meilleurs résultats.

Enfin, en ce qui concerne *agrB*, la dernière cible validée *in vitro*, on observe toujours un faible effet de SprC sur le niveau de fluorescence de la fusion *agrB-gfp* (Figure 53-B). Cette variation indique ici une régulation positive de SprC sur la traduction de *agrB*. Pour cette étude, l'utilisation d'une fusion *agrB $\Delta$ <sub>151-171</sub>-gfp*, délétée de la zone d'interaction avec SprC permet de supprimer l'effet positif de SprC sur le niveau de fluorescence suggérant une réelle interaction entre SprC et *agrB*. Encore une fois, l'utilisation d'un autre promoteur pourrait permettre d'obtenir de meilleurs résultats.

### ➤ **Étude de la régulation de l'opéron *czrAB* par l'ARN SprC**

#### • **Régulation du niveau de transcrits *czrAB* par SprC**

L'étude du niveau de transcrits *czrAB* dans une souche Newman sauvage et dans une souche isogénique délétée pour *sprC* ( $\Delta$ *sprC*) nous a permis de montrer une augmentation du niveau de transcrits entre 3 heures et 6 heures de croissance (Figure 56). Or nous avons montré que la régulation de SprC sur l'opéron *czrAB* intervenait en diminuant sa stabilité. Ainsi, l'augmentation progressive du niveau de transcrits *czrAB* observée entre 3 heures et 6 heures de croissance dans la souche  $\Delta$ *sprC* serait due à l'accumulation de transcrits *czrAB* qui serait moins dégradés. Cela concorde avec la cinétique d'expression de SprC qui montre un pic à 4 heures de croissance (Figure 40). Par la suite nous avons voulu voir si cette régulation

au niveau ARN avait un impact physiologique sur les bactéries en regardant notamment l'effet du zinc sur l'expression de SprC ainsi que sur la croissance des bactéries.

- **Effet du zinc sur l'expression de SprC**

En présence de zinc, l'expression de SprC est augmentée d'un facteur 5 par rapport à un milieu non supplémenté (Figure 59-C). Ce résultat est logique puisque SprC régule négativement le niveau de transcrits *czrAB* et que cet opéron est surexprimé en présence de zinc (Figures 59-A, B ; Kuroda M., *et al.*, 1999). Ainsi, l'augmentation de l'expression de SprC permet de compenser l'augmentation d'expression de CzrA et de CzrB, maintenant ainsi un contrôle négatif sur l'opéron. Par la suite nous avons étudié l'effet du zinc sur la croissance bactérienne afin de voir si l'effet anti-virulent de SprC était lié à une diminution de la résistance au zinc via la régulation négative de *czrAB*.

- **Effet du zinc sur la croissance bactérienne**

Nous avons tout d'abord confirmé la toxicité du zinc sur la bactérie avec l'observation d'un ralentissement de croissance et cela de manière concentration-dépendante (Figure 58). Nous nous sommes ensuite demandés si la régulation négative de SprC sur l'opéron *czrAB* conduisait à une variation dans l'adaptation au stress lié au zinc. On a ainsi pu montrer que l'expression de SprC dans la bactérie, en présence de zinc, était délétère pour la croissance (Figures 60 et 61). Cependant, si lors de la croissance en présence de zinc, l'adaptation au stress est plus rapide d'environ 2 heures dans la souche  $\Delta sprC$  (Figure 60), la biomasse finale n'est pas très impactée. Cela suggère un effet de stase bactérienne et non de mort cellulaire des bactéries. On peut également faire le même constat lors de l'application d'un stress après 2 heures de croissance. En effet, on observe que la souche sauvage continue de croître après l'application du stress même si elle semble avoir plus de difficulté par rapport à la souche  $\Delta sprC$  (Figure 61) comme le montre la croissance plus lente. De plus, un autre argument pour montrer qu'il s'agit bien d'une stase nous est donné par le fait que lorsque l'on cultive les bactéries pendant 6 heures après l'application du stress et que l'on ensemence des dilutions en cascade sur boîtes TSB, les souches continuent de croître même à une dilution d'un facteur  $10^7$  (Figure 62-A). De plus, il semblerait que lorsque l'on ensemence ces mêmes bactéries sur boîtes TSB + zinc (6mM), le même profil est observé qu'en microplaques avec une adaptation plus importante au zinc de la souche  $\Delta sprC$  qui pousse malgré deux dilutions de plus (Figure 62-B). Cependant, l'effet biologique observé entre les souches Newman sauvage et  $\Delta sprC$  face au stress lié au zinc reste modeste. Cela peut tout d'abord être expliqué par le fait que la

régulation de SprC sur *czrAB* ne montrant qu'une diminution de la quantité de transcrits d'un facteur compris entre 1,5 et 3, l'effet observé ne peut être très fort. De plus, chez les bactéries, il est rare qu'un seul système soit responsable de l'adaptation à un stress et donc la présence de système d'efflux de zinc compensatoire n'est pas à exclure comme le facilitateur de diffusion de cation CzcD par exemple (Ong C.L.Y., *et al.* 2018). Enfin, le niveau basal d'expression de SprC chez la souche Newman est beaucoup plus faible par rapport aux autres membres de la famille des Spr pouvant expliquer un effet modeste sur la résistance au zinc.

En revanche, la complémentation en SprC de la souche  $\Delta sprC$  ne montre qu'un retour partiel du phénotype de sensibilité au zinc de la souche sauvage. En effet, la courbe de croissance montre une dynamique partagée entre celles des souches Newman sauvage et Newman  $\Delta sprC$ , avec une adaptation au stress plus rapide que la souche sauvage mais une biomasse finale similaire (Figure 60-61). De même, une tolérance supérieure à celle de la souche sauvage, comparable à celle de la souche  $\Delta sprC$ , est observée lors de l'étude de toxicité sur boîte (Figure 62).

Cette sensibilité au stress lié au zinc conférée par l'expression de SprC, bien que modeste, nous a laissé penser à un lien avec SprC dans l'effet négatif observé lors de l'internalisation par les macrophages humains (Le Pabic H., *et al.*, 2015).

### ➤ Étude de l'expression des cibles validées lors de l'internalisation par les macrophages humains

Dans le but d'étudier l'expression des gènes, témoins des différentes stratégies mises en place par les bactéries pathogènes pour survivre en conditions intracellulaires, nous avons mis au point un protocole d'extraction d'ARNs totaux bactériens après internalisation par les cellules hôtes humaines (Raynaud S., *et al.*, 2018). Ce protocole simple et peu onéreux, utilise tout d'abord du SDS pour lyser la plupart des cellules eucaryotes, puis des billes de zirconium de "haute densité" pour détruire les cellules bactériennes incorporées dans les débris cellulaires humains. En définitive, cette méthode permet d'extraire efficacement les ARNs bactériens des cellules internalisées tout en éliminant la majorité des ARNs eucaryotes des cellules hôtes. La "preuve de concept" a été obtenue sur des bactéries pathogènes, à Gram positif et négatif (*S. aureus* et *S. typhimurium*), utilisées comme organisme modèle, ainsi que dans des cellules hôtes humaines (macrophages THP1 et ostéoblastes Saos-2). Toutefois, cette méthode devra être optimisée en fonction des différentes cellules hôtes et bactéries utilisées.

En effet, dans notre étude, la méthode a montré une efficacité supérieure dans notre modèle bactérien à Gram positif, probablement en raison des différences dans les parois cellulaires entre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. En effet, les parois cellulaires des bactéries à Gram négatif sont plus fragiles que celles des bactéries à Gram positif. Ainsi, une éventuelle lyse prématurée des bactéries à Gram négatif, au moment de la lyse des macrophages par le SDS, pourrait entraîner l'élimination prématurée de des ARNs procaryotes en même temps que l'élimination des ARNs eucaryotes. Une des solutions envisagée serait une lyse cellulaire plus légère, avec l'utilisation de Triton X100 ou la diminution de la concentration en SDS par exemple, afin d'améliorer le rendement en ARNs bactériens de *S. typhimurium*. De plus, l'extraction des ARNs de *S. aureus* est plus efficace après l'internalisation par des THP1 différenciés en macrophages que par des ostéoblastes Saos-2. En effet, les ARNs extraits après internalisation par les Saos-2 contiennent une fraction importante d'ARNs eucaryotes nécessitant, ici aussi une optimisation de la méthode. Ici, à l'inverse, une lyse cellulaire plus forte peut être envisagée afin de permettre une meilleure libération des ARNs des cellules eucaryotes et donc une meilleure élimination de ceux-ci avant l'extraction. L'augmentation de la concentration en SDS, l'ajout de protéinase K lors de la lyse ou le passage du lysat cellulaire dans un homogénéisateur de type Dounce ou de type Potter-Elvehjem sont plusieurs solutions qui pourraient permettre d'augmenter la lyse des cellules eucaryotes sans pour autant lyser prématurément les bactéries.

Une fois ce protocole mis au point pour l'extraction des ARNs totaux de *S. aureus* après internalisation par les macrophages, nous avons pu étudier la variation des niveaux de transcrits de nos cibles validées (*czrB*, *agrB* et *deoD*) au cours de l'internalisation. L'opéron *czrAB* est surexprimé de manière temps-dépendant en condition intracellulaire comme nous l'attendions (Figure 67). En effet, il a été démontré que le zinc représente une des stratégies de défense des cellules immunitaires pour lutter contre les bactéries intracellulaires (Botella H., *et al.*, 2011 ; Botella H., *et al.*, 2012 ; Niederweis M., *et al.*, 2015) et donc par conséquent il est normal que la bactérie s'adapte en sur-exprimant ce transporteur d'efflux de zinc afin de pouvoir résister à ce stress.

Les deux membres du système Agr, *agrB* et *agrC*, sont fortement surexprimés au début de l'internalisation (Figures 68-A, B) avant une légère baisse temps-dépendant. Un rôle de ce système était également attendu puisqu'il a été montré que le système Agr était augmenté à la sortie du phagolysosome ou lors de la lyse de la cellule hôte, pour permettre notamment la production d'exo-protéines (Flannagan R.S., *et al.*, 2015 ; Horn J., *et al.*, 2018).

La sortie de *S. aureus* du phagosome a été détectée après 2,5 heures d'infection dans les cellules HEK-293 (Grosz M., *et al.*, 2014 ; Horn J., *et al.*, 2018) et est corrélée avec une augmentation de l'expression de Agr dans les phagolysosomes juste avant l'échappement dans le cytoplasme (Shompole S., *et al.*, 2003 ; Grosz M., *et al.*, 2014 ; Horn J., *et al.*, 2018). Bien que ces résultats aient été obtenus dans un type cellulaire différent, cela concorderait avec nos observations d'une forte augmentation du niveau de transcrits de *agrB* et *agrC* après 2 heures d'internalisation. De plus, il semblerait que cette augmentation pourrait être déclenchée par l'acidification du phagosome (Shompole S., *et al.*, 2003 ; Kubica *et al.*, 2008). Cet échappement phagosomal est également attribué à un facteur dépendant d'Agr puisqu'un mutant de délétion *agr-* n'est pas retrouvé dans le cytoplasme (Shompole S., *et al.*, 2003 ; Blättner S., *et al.*, 2016). Ce facteur a été identifié comme étant la PSM $\alpha$ , aussi bien dans les phagocytes professionnels que dans les phagocytes non professionnels (Grosz M., *et al.*, 2014). Enfin, le système Agr est essentiel à la survie intracellulaire de *S. aureus* puisqu'un mutant *agr* ne survit pas dans les macrophages dérivés de monocytes humains (Kubica M., *et al.*, 2008). Cela coïncide également avec nos données qui montrent une expression plus faible, mais toujours forte, du système Agr après 24 heures d'internalisation. Cela peut s'expliquer par la production des exo-protéines et notamment l'hémolysine  $\alpha$ , nécessaire à la lyse de la cellule et à la dissémination dans l'organisme hôte (Flannagan R.S., *et al.*, 2015 ; Horn J., *et al.*, 2018).

Enfin, la dernière cible que nous avons étudiée dans ce contexte intracellulaire est la purine nucléoside phosphorylase (*deoD*). Nous avons pu montrer qu'elle était surexprimée d'un facteur 4 au cours de l'internalisation (Figure 69). Nous avons envisagé un rôle de cette enzyme clé de la voie de récupération des purines lors de l'internalisation en nous basant sur une étude de 2018 (Dalberto P.F., *et al.*, 2018). En effet, dans cette étude, les auteurs avaient suggéré que dans des conditions de faible disponibilité énergétique, en condition intracellulaire par exemple, la voie de récupération des purines pourrait être la principale source de maintien du pool de nucléotides, puisque la voie *de novo* est un processus à forte demande énergétique. Bien qu'ils n'aient pas pu mettre en évidence de rôle de DeoD dans l'invasion et la croissance de *M. tuberculosis* dans les macrophages, cette enzyme semble tout de même avoir un effet, encore inconnu, puisque son niveau de transcrits est augmenté durant l'internalisation. Cependant, comme ils l'ont très justement fait remarquer dans leur étude, la redondance des enzymes retrouvées dans la voie de biosynthèse des nucléotides, notamment chez *M. tuberculosis*, peut expliquer à la fois les résultats négatifs obtenus dans leur étude ainsi que la faible augmentation d'expression que nous observons.

Afin d'essayer de faire le lien avec SprC, nous avons réalisé la même expérience en utilisant la souche Newman sauvage et Newman  $\Delta sprC$ . Il semblerait tout d'abord que SprC ait un effet négatif sur le niveau de transcrits de *czrB* (Figure 70-A). Cela est en accord avec nos données précédentes montrant une régulation négative de SprC sur *czrAB* par modulation de la stabilité de son ARNm (Figures 56-57). En revanche, pour *agrB*, on observe une légère diminution du niveau de transcrits lorsque SprC est exprimé (Figure 70-B) ce qui va à l'encontre de nos résultats précédents. En effet, le système rapporteur nous avait indiqué une régulation positive de la traduction de *agrB* par SprC (Figure 53-B). Ces deux résultats n'ayant été réalisés qu'une fois, une répétition de l'expérience est nécessaire avant toute conclusion. Cependant, une des explications aux résultats contradictoires obtenus avec *agrB* serait que SprC, en condition intracellulaire, agisse différemment sur l'expression du système Agr. En effet, nous avons montré précédemment que Agr était essentiel à la survie intracellulaire (Kubica M., *et al.*, 2008) alors que SprC a un effet négatif sur l'internalisation (Le Pabic H., *et al.*, 2015) ce qui pourrait expliquer cette régulation. Une autre explication serait que SprC régule l'expression d'un facteur intermédiaire en condition intracellulaire et que ce facteur, *mgrA* par exemple, régule ensuite négativement le système Agr. Actuellement, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'interaction directe entre SprC et *mgrA* *in vitro* ce qui toutefois, n'exclut pas une potentielle interaction « *in vivo* ».

Lors de ces expériences d'internalisation, nous avons observé un fait intéressant puisque SprC et nos trois cibles validées ont montré une variation d'expression au contact des macrophages dans le milieu extracellulaire. Nous nous sommes alors demandés si les macrophages sécrétaient dans le milieu des facteurs que la bactérie pouvait détecter à distance pour se préparer à lutter contre le système immunitaire.

### ➤ **Étude de l'effet du milieu de culture des monocytes et des macrophages THP1 sur *S. aureus*.**

Pour étudier l'effet du milieu de culture des monocytes et des macrophages THP1 sur *S. aureus*, nous avons récupéré le milieu de culture des THP1 (monocytes ou macrophages) et nous avons mis en culture nos bactéries à l'aide de ce milieu.

#### • **Effet du milieu des THP1 sur la croissance bactérienne**

La première chose que nous avons regardée est l'effet du milieu des monocytes sur la croissance bactérienne. Tout d'abord on constate une dynamique de croissance en deux temps

permettant à la bactérie de croître plus facilement dans le milieu THP1 en début de croissance, avant un ralentissement de la croissance permettant aux bactéries du milieu RPMI contrôle de prendre le dessus (Figure 71). Cela laisse penser que le milieu de culture des THP1 possède un ou plusieurs éléments (nutriments ?) absent du milieu RPMI et permettant aux bactéries de mieux pousser. Ensuite, le ralentissement observé serait dû à la consommation totale de ces éléments privant ainsi les bactéries de cet avantage nutritionnel.

Dans un deuxième temps, l'utilisation du milieu de culture des macrophages nous montre le même avantage de croissance pour les bactéries comparé au milieu RPMI contrôle mais avec un effet plus important (Figure 73). En effet, cette fois ci nous n'observons pas le ralentissement de la courbe de croissance observé avec le milieu de culture des monocytes. De plus, nous avons également pu observer que la souche exprimant SprC présentait un léger avantage dans l'adaptation à ce milieu de culture des macrophages par rapport à la souche  $\Delta sprC$  bien que l'avantage sur la biomasse finale soit faible.

Afin d'aller plus loin dans cette étude nous avons regardé si SprC et nos cibles présentaient une variation d'expression dans ces deux milieux par rapport au contrôle RPMI.

- **Effet du milieu des THP1 sur l'expression de SprC et de nos cibles**

Ces deux milieux de culture, ceux des monocytes et des macrophages, provoquent une petite augmentation de l'expression de SprC et du niveau de transcrits de *agrB* et *czrB* par rapport au milieu RPMI contrôle (Figures 72 et 74). La reconnaissance par la bactérie de facteurs macrophagiques (cytokines ? interleukines ?) pourrait expliquer qu'elle sur-exprimerait SprC afin de diminuer son internalisation. De plus, la surexpression de SprC pourrait être responsable de l'augmentation du niveau de transcrits *agrB* mais n'explique pas l'augmentation de niveau de *czrB* pour qui on s'attendrait à l'effet inverse. En revanche, le niveau de transcrits *deoD* est régulé négativement contrairement aux autres cibles. Cela pourrait être dû au fait que pendant la culture des cellules eucaryotes, une petite partie des macrophages meurt, pouvant ainsi libérer le contenu intracellulaire et permettre à la bactérie de maintenir son pool de nucléotides sans passer par la voie de récupération des purines.

Pour aller plus loin, il faudrait dans un premier temps étudier le niveau d'expression des différentes cibles entre les souches Newman sauvage et Newman  $\Delta sprC$  afin de confirmer ou non un rôle de SprC dans la variation de ces différentes cibles. Dans un deuxième temps, une étude protéomique comparative du milieu des monocytes et des macrophages avec le milieu RPMI contrôle pourrait nous permettre d'identifier d'éventuelles facteurs responsables de ces variations d'expressions.

# CONCLUSION

## CONCLUSION

En conclusion, ce travail de thèse a permis d'identifier 15 cibles potentielles de SprC à l'aide de la technique MAPS dont une cible protéique et 14 cibles ARNm. Les études préliminaires d'interaction *in vitro* ont permis de montrer que SprC, via sa tige-boucle H2, interagissait avec trois de ces cibles (*czrB*, *agrB* et *deoD*). De plus, des études « *in vivo* » à l'aide d'un système rapporteur à double plasmides, ont permis de valider ces résultats *in vitro*.

La caractérisation de l'une de ces cibles, l'opéron *czrAB*, a permis de montrer une régulation négative de SprC sur le niveau de transcrits *czrAB* par diminution de la stabilité de ce dernier. Cette régulation négative entraîne une augmentation de la sensibilité de *S. aureus* Newman face à un stress lié au zinc. Cette augmentation de sensibilité pourrait expliquer l'effet anti-virulent de SprC ainsi que l'effet négatif sur la survie observé lors de l'internalisation des bactéries par les macrophages.

Dans le but d'étudier le lien entre SprC et *czrAB*, ainsi qu'avec les autres cibles de SprC validées (*agrB* et *deoD*), dans un contexte intracellulaire, nous avons mis au point une méthode d'extraction des ARNs bactériens après internalisation par les cellules hôtes. Cette méthode simple et peu coûteuse d'extraction d'ARNs procaryotes améliore l'extraction d'ARNs bactériens lors de leur internalisation par les cellules eucaryotes et permet l'étude du RNome bactérien sans qu'il soit nécessaire d'utiliser des kits onéreux afin d'éliminer la majeure partie de ces ARNs eucaryotes contaminants. La "preuve de concept" a été obtenue sur des bactéries pathogènes, à Gram positif et négatif, utilisées comme organisme modèle, ainsi que dans des cellules hôtes humaines différentes. Ainsi, l'utilisation de ce protocole a permis de montrer que les trois cibles de SprC étudiées (*czrAB*, *agrB* et *deoD*) jouent un rôle lors de l'internalisation puisque leur niveau de transcrits est augmenté au cours de l'internalisation. De plus, SprC semble réguler négativement le niveau de transcrits de *agrB* et de *czrB* bien que cela reste à confirmer.

La poursuite de ces études permettraient de mieux comprendre le rôle de l'internalisation dans la chronicité des infections à *S. aureus* et pourquoi pas aboutir au développement de stratégies anti-virulente permettant une meilleur élimination des pathogènes intracellulaire par les cellules immunitaires de l'hôte.

# MATÉRIELS ET MÉTHODES

# MATÉRIELS ET MÉTHODES

## I] Matériels

### A/ Souches bactériennes, plasmides, conditions de croissances

#### 1- Souches bactériennes utilisées

Les souches d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus* utilisées dans cette étude sont listées dans le Tableau 6. Les souches de *E. coli* ont été cultivées dans le milieu Luria-Bertani (LB, Sigma, Saint-Louis, USA) et les souches de *S. aureus* dans un bouillon cœur-cerveille (BHI, Oxoid, Basingstoke, UK) ou dans un bouillon Tryptone caséine soja (TSB, Oxoid, Basingstoke, UK) sous agitation à 37°C, 160 rpm. Toutes les croissances ont été contrôlées en mesurant la DO<sub>600nm</sub>. Des antibiotiques ont été ajoutés si nécessaire : ampicilline (50µg/mL), chloramphénicol et érythromycine (5 ou 10µg/mL).

#### 2- Purification d'ADN plasmidique et transformation

Les préparations de plasmides ont été réalisées grâce au kit « Nucleospin plasmid » (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) selon les recommandations du fabricant. Pour les souches de *S. aureus*, une étape préalable est nécessaire avec l'ajout de 50µg/mL de lysostaphine (Sigma, Saint-Louis, USA) dans le tampon de resuspension puis l'incubation des échantillons 15 minutes à 37°C. La lysostaphine est une endopeptidase capable de cliver le peptidoglycane présent dans la membrane des staphylocoques (Bastos M.D., *et al.*, 2010).

- Préparation de cellules compétentes de *E. coli*: Une culture de *E. coli* est réalisée dans 500mL de milieu SOB (NaCl 86mM ; KCl 2,5mM ; tryptone 2% ; extraits de levure 0,5%) et incubée 2 à 3 jours à 18°C sous forte agitation (220 rpm) jusqu'à ce que la culture atteigne une DO<sub>600</sub> = 0,6. Une fois la DO<sub>600</sub> atteinte, la culture est incubée 10 minutes sur glace puis centrifugée 10 minutes à 2500g, 4°C et les culots sont resuspendus dans 80mL de tampon TB froid (PIPES 10mM ; CaCl<sub>2</sub> 15mM ; KCl 250mM ; MnCl<sub>2</sub> 55mM ; pH 6,7). Après une nouvelle incubation sur glace de 10 minutes et une nouvelle centrifugation de 10 minutes à 2500g, 4°C, les culots sont resuspendus doucement dans 20mL de TB froid avant ajout de glycérol (7% finale). Après une dernière incubation de 10 minutes sur glace, les cellules sont aliquotées et stockées à -80°C.

- Préparation de cellules compétentes de *S. aureus*: Une préculture de *S. aureus* est réalisée en milieu TSB et incubée à 37°C, 160 rpm sur la nuit. Le matin, la culture est diluée au vingtième dans du milieu TSB frais puis cultivée jusqu'à DO<sub>600</sub> = 5 avant d'être placée 10 minutes sur glace. Les bactéries sont ensuite centrifugées à 3500 rpm, 4°C pendant 10 minutes. Puis, les culots sont lavés deux fois à l'eau stérile (50mL puis 5mL) puis une fois avec 2mL de sucrose 0,5M. Après centrifugation, les culots lavés sont repris dans 250µL de sucrose 0,5M/ Glycérol 10%.
  
- Transformations chez *E. coli*: 200µL de bactéries compétentes sont mises en présence d'environ 100ng de plasmides pendant 15 minutes sur glace avant de subir un choc thermique de 30 secondes à 42°C. Après avoir été remises sur glace pendant 2-3 minutes, les bactéries sont incubées 1 heure dans du milieu LB à 37°C puis étalées sur boîtes LB supplémentées en ampicilline (50µg/mL).
  
- Transformations chez *S. aureus*: 65µL de bactéries compétentes sont mises en présence d'environ 100ng de plasmides pendant 5 minutes à température ambiante avant l'électroporation à 2500V. Les bactéries sont ensuite incubées 1 heure dans du milieu BHI à 37°C puis étalées sur boîte BHI supplémentées de l'antibiotique approprié. Avant d'être transformés dans la souche Newman, les plasmides de *E. coli* sont d'abord transformés dans la souche RN4220, possédant une mutation dans les gènes *sauI* et *hsdR*, la rendant déficiente aux restrictions et faisant d'elle un hôte intermédiaire de clonage idéal (Kreiswirth B.N., *et al.*, 1983).

## **B/ Constructions réalisées au cours de cette étude**

L'ensemble des constructions réalisées pour cette étude est listé dans le Tableau 7 et les amorces utilisées dans le Tableau 8.

### **1- Constructions pour le MAPS**

Pour effectuer le MAPS, nous avons cloné SprC dans le pRMC2, un plasmide inductible à l'anhydrotétracycline portant une cassette de résistance au chloramphénicol (Corrigan R.M., *et al.*, 2009). Ce plasmide pRMC2\_MS2\_SprC (Tableau 7) permet l'expression de SprC fusionné en 5' avec une étiquette MS2. Le plasmide pRMC2 exprimant

l'étiquette MS2 seule ainsi que pRMC2\_MS2\_ARNIII exprimant la fusion MS2\_ARNIII ont été utilisés comme témoins et fournis par un membre du laboratoire (Hallier M.). La construction pRMC2\_MS2\_SprC a été réalisée chez *E. coli* DH5 $\alpha$  à l'aide des amorces retrouvées dans le Tableau 8. Les plasmides pRMC2 et pRMC2\_MS2\_ARNIII ont été transformés dans la souche Newman alors que le plasmide pRMC2\_MS2\_SprC a été transformé dans la souche Newman et dans la souche isogénique délétée de *sprC* (Tableau 6).

## 2- Constructions pour le système rapporteur à double plasmides

Pour ce système nous avons utilisé deux plasmides (Ivain L., *et al.*, 2017), le pICS3 (appelé dans cette étude pRMC3) modifié à partir du pRMC2 et le pCN33 (Charpentier E., *et al.*, 2004).

Nous avons cloné la séquence de *SprC* ainsi que son promoteur endogène dans le plasmide pICS3 afin de former le plasmide pRMC3-*SprC* et nous avons utilisé le pRMC3 natif comme témoin. La construction pRMC3-*SprC* a été réalisée chez *E. coli* DH5 $\alpha$  à l'aide des amorces retrouvées dans le Tableau 8. Ce plasmide à fort nombre de copies sert à la surexpression de notre ARNrég et possède une cassette de résistance au chlorampénicol. En parallèle nous avons construit les vecteurs des fusions *cible-gfp*. Pour cela, nous avons cloné la séquence d'intérêt de notre cible, sous le contrôle du promoteur constitutif *PamiA* et fusionnée en phase avec la séquence de la GFP pour obtenir les plasmides pCN33-*PamiA-cible-gfp*. Ces vecteurs permettant l'expression de nos cibles possèdent une cassette de résistance à l'érythromycine et sont listées dans le Tableau 7.

Toutes les constructions ont été réalisées chez *E. coli* grâce aux amorces listées dans le Tableau 8, séquencées et co-transformées chez *S. aureus*. Chaque souche utilisée dans l'étude a ainsi été co-transformée avec un des pCN33-*PamiA-cible-gfp* associé au pRMC3-*SprC* ou au pRMC3 contrôle (Tableau 6).

## C/ Culture cellulaire

Les monocytes humains de la lignée THP1 (ATCC Rockville, MD, USA) sont cultivés à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> dans du milieu RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute; Invitrogen, Carlsbad, USA) contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF; Biowest). L'entretien des THP1 est effectué par ensemencement de 100 000 cellules/mL dans du milieu RPMI-10% SVF dans une flasque T-75 cm<sup>2</sup> incubée à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Ces monocytes THP1 ont été traités

au Phorbol 12-Myristate 13-Acétate (PMA; Sigma, Saint-Louis, USA) à 120ng/mL pendant trois jours afin de stimuler leur différenciation en macrophages. La différenciation est réalisée en flasque T-175cm<sup>2</sup> à partir de 1x10<sup>7</sup> monocytes dans 40mL de RPMI 1640 10%SVF. L'efficacité de la différenciation est vérifiée par microscopie optique.

## II] Méthodes

### A/ Extraction des ARNs totaux

Les cellules bactériennes ont été récupérées par centrifugation à 4500 rpm, 4°C pendant 10 minutes. Les culots sont repris dans 500µL de tampon de lyse (SDS 0,5% ; Acétate de Sodium 20mM ; EDTA 1mM, pH 5,5) puis transférés dans un tube à vis contenant 250µL de billes de verre (106µm, Sigma, Saint-Louis, USA) en présence de 250µL de phénol (pH4) et de 250µL de mélange Chloroforme/Alcool isoamylique (ratio 24:1). Une lyse mécanique des cellules est effectuée à l'aide d'un Fastprep FP120 (MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, France) pendant 30 secondes à la puissance 6,5. L'extraction des ARNs totaux par le mélange Phénol/Chloroforme/Acide isoamylique (ratio 25:24:1) est ensuite réalisée sur le lysat obtenu par lyse mécanique. Ce lysat est centrifugé 5 minutes à 15 000g, 4°C et la phase aqueuse supérieure est récupérée et extraite avec 500µL de mélange Chloroforme/Acide isoamylique (ratio 24:1). Les ARNs contenus dans la phase aqueuse supérieure sont ensuite précipités à -80°C pendant au minimum 2 heures en présence de 0,1 volume d'acétate de sodium 3M pH 5,2 et de 0,7 volume d'isopropanol. Puis, les échantillons sont centrifugés 30 minutes à 15 000g, 4°C, les culots sont lavés avec 500µL d'éthanol 70% et séchés au Speed Vacuum. Pour finir, les culots sont resuspendus dans de l'eau dépourvue de RNase et de DNase et conservés à -80°C.

### B/ Northern blot

#### 1- Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et transfert sur membrane de nylon

Les ARNS sont séparés en fonctions de leurs tailles sur gel dénaturant d'acrylamide-urée 8% (TBE 1X Urée 8M ; TBE 1X Urée 8M Acrylamide/Bisacrylamide 19:1 à 20% ; TEMED, APS 10%). Une pré-migration est effectuée pendant 1 heure à 150V dans du tampon TBE 1X (Tris 89mM ; Acide Borique 89mM ; EDTA 2mM) pour éliminer les traces de

RNase. 15µg d'ARN, préalablement dénaturés 5 minutes à 65°C dans du tampon de charge (ARN 2X Ambion) sont déposés dans chaque puit et mis à migrer à 150V. Les échantillons sont ensuite électro-transférés sur une membrane Hybond-N+ (Amersham, Little Chalfont, UK) dans du tampon TBE 0,5X pendant 2 heures à 25V. Finalement les ARNs sont fixés à la membrane dans une chambre UV sous 120 000µJ/cm<sup>2</sup> (Crosslinker, Fisher Bioblock Scientific).

Les ARNs ont été sondés avec des oligonucléotides marqués. Pour cela, 1µL de sonde oligonucléotidique (IDT : Integrated DNA Technologies à 100µM) (Tableau 8) est placé en présence de tampon 10X, de l'enzyme T4PNK (New England Biolabs, Ipswich, USA), d'eau dépourvue de RNase et de Dnase et de 1µL de nucléotide radioactif  $\gamma$ -<sup>32</sup>PATP (3000Ci/mmol). Les sondes sont marquées pendant 30 minutes à 37°C avant d'être purifiées sur colonne G25 (Illustra MicroSpin, GE Healthcare, Chicago, USA).

La membrane est préhybridée dans 8mL de solution Expresshyb™ (Clontech, Moutain View, USA) dans une ampoule d'hybridation et incubée dans un four à hybridation pendant 30 minutes à 37°C sous agitation. Cette étape permet de saturer les sites non spécifiques. La sonde marquée est ensuite diluée dans 4mL de solution Expresshyb™ et ajoutée au mélange pour une hybridation sur la nuit à 37°C sous agitation. La membrane est ensuite lavée deux fois pendant 10 minutes dans du tampon de lavage 1 (SSC 2X) à 37°C sous agitation puis une fois pendant 15 minutes dans du tampon de lavage 2 (SSC 0,1X ; SDS 0,1%). La radioactivité est détectée par phosphorescence à l'aide d'un Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare, Chicago, USA) et l'image est acquise par le logiciel ImageQuantTL (GE Healthcare, Chicago, USA).

## **2- Électrophorèse sur gel d'agarose en conditions dénaturantes et transfert sur membrane de nylon**

Les ARNs sont séparés en fonctions de leurs tailles sur gel dénaturant d'agarose 1% (MOPS 1X ; Formaldéhyde 2,2M ; Formamide 50%). Une pré-migration est effectuée pendant 45 minutes à 60V dans du tampon MOPS 1X (MOPS 20mM ; Acétate de sodium 5mM ; EDTA 1mM ; pH 7,4) pour éliminer les traces de RNase. 15µg d'ARN, préalablement dénaturés 5 minutes à 65°C dans du tampon de dénaturation (Tampon MOPS 1X ; Formaldéhyde 2,2M ; Formamide 50%) sont déposés à l'aide de tampon de charge 5X (Ficoll 5% ; Bleu de Bromophénol 0,05% ; Xylène cyanol 0,05% ; Formamide 50%) dans chaque puit et mis à migrer à 60V. Les échantillons sont ensuite transférés sur une membrane Nytran

Hybond-XL (Amersham, Little Chalfont, UK) dans du tampon SCC 10X pendant 2,5 heures à l'aide d'un appareil de transfert sous vide. Finalement les ARNs sont fixés à la membrane dans une chambre UV sous 120 000 $\mu$ J/cm<sup>2</sup> (Crosslinker, Fisher Bioblock Scientific).

Les ARNs ont été sondés avec des produits PCR d'environ 200 pnb marqués. Pour cela, environ 400ng de produits PCR amplifiés à l'aide d'amorces spécifiques de l'ARN sondé (Tableau 8) sont placés en présence d'hexamères d'amorces aléatoires (kit « High-Capacity cDNA Archive », Applied Biosystems, Foster City, USA) et incubées 3 minutes à 100°C. Puis, après ajout de tampon klenow, de l'enzyme klenow, d'eau dépourvue de RNase et de Dnase et de 1 $\mu$ L de nucléotides radioactifs  $\alpha$ -<sup>32</sup>PATP (3000Ci/mmol), les sondes sont marquées pendant 45 minutes à 37°C avant d'être purifiées sur colonne G50 (Illustra MicroSpin, GE Healthcare, Chicago, USA).

La membrane est préhybridée dans 8mL de solution Expresshyb™ (Clontech, Mountain View, USA) dans une ampoule d'hybridation et incubée dans un four à hybridation pendant 30 minutes à 37°C sous agitation. La sonde marquée est ensuite dénaturée 5 minutes à 95°C puis incubée 5 minutes sur glace avant d'être diluée dans 4mL de solution Expresshyb™ et ajoutée au mélange pour une hybridation sur la nuit à 37°C sous agitation. La membrane est ensuite lavée deux fois pendant 10 minutes dans du tampon de lavage 1 (SSC 2X) à 37°C sous agitation puis une fois pendant 15 minutes dans du tampon de lavage 2 (SSC 0,1X ; SDS 0,1%). La radioactivité est détectée par phosphorescence à l'aide d'un Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare, Chicago, USA) et l'image est acquise par le logiciel ImageQuantTL (GE Healthcare, Chicago, USA).

## **C/ Identification des cibles d'un ARN régulateur par MAPS**

### **1- Préparation de la résine d'amylose**

La préparation de la résine d'amylose (New England Biolabs, Ipswich, USA) consiste en plusieurs lavages successifs effectués afin de l'équilibrer avant d'y déposer les protéines MS2-MBP. On réalise ainsi un premier lavage avec de l'eau dépourvue de RNase et de DNase puis trois lavages avec du tampon A (HEPES 20mM pH 7,5 ; NaCl 200mM ; MgCl<sub>2</sub> 1mM ;  $\beta$ -mercaptoethanol 1mM ; glycérol 5%).

Les protéines MS2-MBP sont ensuite ajoutées à la résine selon un ratio 20pmol/ $\mu$ L. Puis le mélange résine/protéines MS2-MBP est incubé pendant 15 minutes à 4°C sur un rotateur de laboratoire Revolver™ (Labnet, Edinson, USA). Enfin, la résine est lavée deux

fois supplémentaires avec le tampon A et répartie selon le nombre d'échantillons réalisés (150µL de résine/ échantillon).

## **2- Induction de l'expression de l'appât MS2-SprC et lyse des bactéries**

Des précultures de nos différentes souches sont diluées dans 100mL de milieu BHI supplémenté en chloramphénicol (10µg/mL) à une  $DO_{600} = 0,1$  et incubées à 37°C sous agitation. Après 2,5 heures ou 4 heures de croissance, l'induction de l'expression de nos construits, à partir du plasmide pRMC2, est effectuée par ajout de 1µM d'anhydrotétracycline. Les cultures sont ré-incubées 10 minutes à 37°C sous agitation, afin de permettre l'expression des construits, avant d'être centrifugées 10 minutes à 4500 rpm, 4°C. Chaque culot est ensuite lavé une fois avec du tampon de lyse (tampon A additionné d'une pastille de cocktail antiprotéase (Protease Inhibitor Cocktail, Merck, Darmstadt, Allemagne), centrifugé 1 minute à 13 000 rpm, 4°C puis repris dans 1mL de tampon de lyse. Une lyse mécanique est ensuite réalisée en présence de 500µL de billes de verre (106µm, Sigma, Saint-Louis, USA) à l'aide d'un Fastprep FP120 (MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, France) trois fois 40 secondes à puissance 6,5 et entrecoupée d'incubations de 5 minutes sur glace entre chaque passage dans le Fastprep. Les échantillons sont ensuite centrifugés une nouvelle fois 1 minute à 13 000 rpm, 4°C pour éliminer les billes. Finalement, les surnageants sont centrifugés une dernière fois à 40 000g afin de culoter les débris cellulaires. A cette étape un échantillon du surnageant est prélevé afin de vérifier l'induction de l'appât.

## **3- Purification des lysats bactériens pour isoler les protéines et les ARNs par affinité avec l'appât**

Avant la purification à proprement parler, une étape de pré-purification est réalisée avec de la résine non chargée en MS2-MBP afin d'éliminer les ARNs et protéines interagissant de manière aspécifique avec l'amylose et pouvant ainsi perturber le signal final lors de l'élution. Au cours de cette étape, les lysats bactériens sont passés successivement deux fois sur 500µL de résine pendant 10 minutes à 4°C sur le rotateur de laboratoire Revolver™ (Labnet, Edinson, USA) avec des centrifugations de 8 minutes à 4500 rpm entre chaque passage. Puis les lysats pré-purifiés sont fixés sur la résine chargée en protéines MS2-MBP, via l'affinité entre les domaines MS2 de la protéine et les étiquettes MS2 des appâts, par incubation, 15 minutes à 4°C, sur rotateur de laboratoire Revolver™ (Labnet, Edinson, USA). La résine est ensuite centrifugée 2 minutes à 13 000 rpm, 4°C et le surnageant est

prélevé pour vérifier la quantité d'appât fixée sur la résine. Ensuite, 7 lavages sont réalisés avec 1mL de tampon A, séparés par des centrifugations de 2 minutes, à 13000rpm, 4°C..

Les ARNs sont ensuite élués par ajout de 250µL d'eau et 450µL de phénol (pH4) directement sur la résine. Les ARNs présents dans le surnageant sont ensuite précipités avec 0,1 volume d'acétate de sodium 3M pH 5,2 ; 0,7 volume d'isopropanol et 1µL de glycogène.

En parallèle, les protéines sont éluées par incubation de la résine 30 minutes à 37°C avec 250µL de tampon de lyse additionné de 1µL de RNase I. Après une centrifugation de 2 minutes à 13 000, le surnageant est récupéré et la résine est lavée avec 900µL supplémentaire de tampon de lyse. Après une nouvelle centrifugation, les deux surnageants sont réunis et précipités avec du TCA (10% finale) pendant 30 minutes à 4°C. Après une centrifugation d'une heure à 40 000g, les culots sont lavés avec 800µL d'acétone et séchés dans une étuve à 37°C. Enfin, les culots sont repris dans du laemmli pH 8,5 (Tris 100mM pH6,8 ; SDS 0,1% ; glycérol 20% ; bleu de bromophénol ; β-mercaptoéthanol 100mM).

#### **4- Identification des ARNm isolés par séquençage haut débit des ARNs**

Les ARNs totaux obtenus après l'éluion ont été traités avec 1 unité de DNase I (DNase I Amplification Grade, ThermoFisher, Carlsbad, USA) pour éliminer les contaminations génomiques. L'absence d'ADN a été vérifiée par RT-qPCR et l'intégrité des ARNs a été évaluée sur un Bioanalyzer® (Agilent, Santa Clara, USA). Des bibliothèques d'ADNc ont été préparées à l'aide du kit « NEBNext Ultra Directional RNA Library Prep » pour Illumina (New England Biolabs, Ipswich, États-Unis). Pour cela, les ARNs ont été préalablement fragmentés en segments de 200 à 300 nucléotides avant la synthèse directionnelle d'ADN complémentaire bicaténaire. Ensuite, des adaptateurs sont ajoutés à chaque extrémité de ces doubles brins d'ADNc et ces ADNc possédant l'adaptateur ont été enrichis par PCR. La concentration, la qualité et la pureté des bibliothèques ont été déterminées en utilisant un BioAnalyzer®, un fluorimètre Qubit (Invitrogen, Carlsbad, USA) et un spectrophotomètre Nanodrop (Thermo Scientific, Waltham, USA). Finalement, les bibliothèques ont été séquencées à la Plateforme Génomique Santé (Biosit Rennes) sur un séquenceur MiSeq (Illumina, San Diego, Californie, USA) en mode paired-end (2\*75 nucléotides, 150 cycles) selon les instructions du fabricant.

La séquence du génome de *Staphylococcus aureus* Newman et le fichier d'annotation (au format GFF) ont été obtenus auprès du NCBI ([ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/Bacteria/Staphylococcus\\_aureus\\_Newman\\_uid58839/](ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/Bacteria/Staphylococcus_aureus_Newman_uid58839/)). Tous les ARNrég décrits dans la base de données SRD (Sassi M., *et al.*, 2015) pour la souche

Newman ont été ajoutés à ce GFF. Le contrôle de la qualité des données du séquençage et leur alignement sur le génome ont été effectués comme décrit précédemment (Sassi M., *et al.*, 2015). Les fichiers SAM ont été filtrés sur des valeurs d'indicateurs binaires (Li H., *et al.*, 2009) pour sélectionner correctement les données appariées. Les fragments paired-end ont ensuite été comptés en utilisant le HTSeq en mode union (Ander S., *et al.*, 2015) et le niveau d'enrichissement des ARNs isolés a été calculé en utilisant le package DESeq (Ander S., *et al.*, 2010) en utilisant le mode par condition, un seuil d'enrichissement  $>2$  et une p. valeur ajustée pour les tests multiples  $<0,05$ .

## D/ RT-qPCR

Les échantillons d'ARNs totaux (2  $\mu$ g) ont été traités avec 2 unités de DNase I (DNase I Amplification Grade, Thermofisher, Carlsbad, USA) pour éliminer les ADN contaminants. L'ADNc a été synthétisé à partir des ARNs traités à la DNase I en utilisant le kit « High-Capacity cDNA Archive » (Applied Biosystems, Foster City, USA) conformément aux instructions du fabricant. La PCR quantitative en temps réel a ensuite été réalisée à l'aide d'un kit « Real Master Mix SYBR » (5' PRIME, Life Technologies, Carlsbad, USA) sur un système PCR en temps réel StepOnePlus (GE Healthcare, Chicago, USA) en utilisant des amorces spécifiques à chaque transcrite étudié (Tableau 8). L'analyse des données a été réalisée selon la méthode de quantification comparative «  $\Delta\Delta C_t$  », qui permet ici de calculer le niveau relatif d'un ARNm, normalisé par rapport au niveau de l'ARNm *gyrB* ou de l'ARNtm, utilisés comme gène de référence.

## E/ Retard sur gel : étude des interactions ARN-ARN *in vitro*

### 1- Transcription *in vitro*

Toutes les constructions d'ARN ont été transcrites *in vitro* à partir de 1 $\mu$ g de matrices d'ADN amplifiées par PCR avec des amorces contenant la séquence du promoteur T7 en amont du site de départ de la transcription (Tableau 8). Les transcriptions ont été effectuées avec le kit « MEGAscript T7 » (Ambion, Austin, USA) selon les instructions du fabricant. Les ARNs obtenus ont été traités avec la Turbo DNase I avant d'être purifiés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes à 5 ou 8 % selon la taille des fragments d'ARN à purifier. Ils ont ensuite été élués dans un tampon d'éluion (Tris-HCl

20mM pH7,5 ; NaCl 250 mM ; EDTA 1 mM ; SDS 1%), et précipités avec 0,1 volume d'acétate de sodium 3M pH5,2 et 2,5 volume d'éthanol.

## 2- Marquage des sondes

Avant d'être marquées, les ARNs sont déphosphorylés en 5' par traitement à la CIP (Alkaline Phosphatase, Calf Intestina, New England Biolabs, Ipswich, USA) avant d'être extraits et précipités (suivant le protocole II] B/ Extraction des ARNs totaux). Les ARNs déphosphorylés sont ensuite marqués avec le nucléotide radioactif  $\gamma$ -<sup>32</sup>PATP (3000Ci/mmol) en utilisant l'enzyme T4PNK (New England Biolabs, Ipswich, USA) et un tampon de réaction (Tris-HCl 100mM ; MgCl<sub>2</sub> 10mM ; Spermidine 0,1mM) pendant 30 minutes à 37°C avant d'être purifiés sur colonne G50 (Illustra MicroSpin, GE Healthcare, Chicago, USA). Les ARNs purifiés sont ensuite dosés à l'aide d'un fluorimètre Qubit (Invitrogen, Carlsbad, USA).

## 3- Réaction de fixation

Pour la réalisation des retards sur gel, les ARNs ont été dénaturés dans un tampon de dénaturation (HEPES 80mM pH 7,5 ; KCl 330mM ; MgCl<sub>2</sub> 4mM) pendant 2 minutes à 80°C, refroidis sur glace, puis repliés pendant 20 minutes à température ambiante. Ils ont ensuite été mis en contact pendant 30 minutes à 30°C. Pour cela, 0,05 pmol ou 0,1pmol d'ARN marqué a été incubé avec des quantités croissantes d'ARN non marqué. La spécificité des complexes a été évaluée en utilisant un excès d'ARN non marqué (pour les concentrations utilisées, se référer aux Figures 45-46-47-48-49-50). Après ajout de glycérol à une concentration finale de 10%, les échantillons sont déposés sur des gels de polyacrylamide natifs à 5% ou 8% contenant 5% de glycérol. L'électrophorèse a été réalisée dans un tampon TBE 0,5X à 100V et à 4°C. Finalement, la radioactivité est détectée par phosphorescence à l'aide d'un Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare, Chicago, USA) et l'image est acquise par le logiciel ImageQuantTL (GE Healthcare, Chicago, USA).

## **F/ Système rapporteur à double plasmides : étude des interactions ARN-ARN « *in vivo* »**

Pour les mesures de fluorescence en microplaques, des précultures des souches Newman, chacune portant le plasmide pCN33-*PamiA-cible-gfp* et le plasmide pRMC3 ou pRMC3-sprC ont été diluées à une  $DO_{600} = 0,1$  dans milieu BHI. Des triplicats de cultures de 100  $\mu$ l ont été placés dans des plaques de microtitration de 96 puits. Ces cultures ont ensuite été cultivées dans un lecteur multimode Synergy 2 (Biotek, Winooski USA) à 37°C sous agitation continue. Des mesures de l'absorbance à 600 nm et du niveau de fluorescence à l'aide d'un filtre d'excitation de 485/20 nm et d'un filtre d'émission de 528/20 nm (lampe au tungstène) ont été réalisées toutes les 10 minutes pendant 22 heures. Les expériences ont été réalisées avec trois cultures indépendantes

## **G/ Étude de la stabilité du transcrit *czrAB***

Pour les études de stabilité, des précultures des souches Newman sauvage et Newman  $\Delta$ sprC ont été diluées à une  $DO_{600} = 0,1$  dans milieu BHI complétement avec 3mM de  $ZnSO_4$  et cultivées pendant 3 heures. Pour bloquer la transcription, de la rifampicine a été ajoutée à une concentration de 200 $\mu$ g/mL et la culture a été prolongée de 20 minutes. En parallèle un contrôle sans ajout de rifampicine a été réalisé. Des échantillons bactériens ont ensuite été prélevés juste avant l'ajout de rifampicine et après 1, 3, 5, 8, 12, 16 et 20 minutes supplémentaires de culture. Ces échantillons ont été centrifugés 1 minute à 13 000 rpm et les culots ont été stockés à -80°C. Les ARNs ont ensuite été extraits et analysés par Northern blot. Finalement, la stabilité a été quantifiée en calculant le temps nécessaire à l'obtention d'une diminution de 50% du niveau de transcrits pour nos deux souches étudiées.

## **H/ Étude de la toxicité du zinc**

### **1- Cinétique de croissance en microplaques**

Pour les cinétiques de croissance en microplaques, des précultures de *S. aureus* Newman sauvage ont été diluées à une  $DO_{600} = 0,1$  dans du milieu BHI complétement avec différentes concentrations de  $ZnSO_4$  (0, 2, 3, 4 et 6mM). Des triplicats de cultures de 100  $\mu$ l ont été placés dans des plaques de microtitration de 96 puits. Ces cultures ont ensuite été cultivées dans un lecteur multimode Synergy 2 (Biotek, Winooski USA) à 37°C sous agitation

continue et des mesures de l'absorbance à 600 nm ont été réalisées toutes les 10 minutes pendant 22 heures.

## **2- Effet du zinc sur les niveaux de transcrits *czrA*, *czrB* et *SprC***

Pour l'étude de l'effet du zinc sur les niveaux de transcrits *czrA*, *czrB* et *SprC*, des précultures de *S. aureus* Newman sauvage ont été diluées dilué à une  $DO_{600} = 0,1$  dans du milieu BHI complémenté ou non avec 3mM de  $ZnSO_4$  puis incubées à 37°C sous agitation. Après 3 heures de croissance, les cultures ont été centrifugées 10 minutes à 4500 rpm et les culots ont été stockés à -80°C. Les ARNs ont ensuite été extraits et analysés par RT-qPCR.

## **3- Étude de l'effet de l'expression de *SprC* sur la résistance des bactéries à un stress lié au zinc**

Pour étudier l'effet de *SprC* sur la résistance des bactéries à un stress lié au zinc, des précultures de *S. aureus* Newman sauvage, Newman  $\Delta sprC$  complémenté avec le vecteur à faible nombre de copies pCN38-*sprC* et Newman  $\Delta sprC$  possédant le vecteur pCN38 comme contrôle ont été diluées à une  $DO_{600} = 0,1$  dans du milieu BHI complémenté avec 6mM de  $ZnSO_4$ . Des triplicats de cultures de 100  $\mu$ l ont été placés dans des plaques de microtitration de 96 puits. Ces cultures ont ensuite été cultivées dans un lecteur multimode Synergy 2 (Biotek, Winooski USA) à 37°C sous agitation continue et des mesures de l'absorbance à 600 nm ont été réalisées toutes les 10 minutes pendant 22 heures. Les expériences ont été réalisées avec trois cultures indépendantes.

Dans un deuxième temps, ces mêmes souches ont été diluées à une  $DO_{600} = 0,1$  dans du milieu BHI et des triplicats de culture de 100  $\mu$ l ont été placés dans des plaques de microtitration de 96 puits. Ces cultures ont ensuite été incubées dans un lecteur multimode Synergy 2 (Biotek, Winooski USA) à 37°C sous agitation continue et des mesures de l'absorbance à 600 nm ont été réalisées toutes les 10 minutes. Après 2 heures de culture, un stress lié au zinc est induit par ajout de 6mM de  $ZnSO_4$  et les cultures sont ensuite ré-incubées dans le lecteur multimode Synergy 2 (Biotek, Winooski USA) à 37°C sous agitation continue. Des mesures de l'absorbance à 600 nm ont ensuite été réalisées toutes les 10 minutes pendant 22 heures.

#### 4- Étude de toxicité sur boîtes de petri

Pour les études de toxicité sur boîtes, des précultures de *S. aureus* Newman sauvage, Newman  $\Delta sprC$ , Newman  $\Delta sprC$  complétement avec le vecteur à faible nombre de copies pCN38-*sprC* et Newman  $\Delta sprC$  possédant le vecteur pCN38 comme contrôle ont été diluées à une  $DO_{600} = 0,1$  dans du milieu BHI et incubées à 37°C sous agitation. Après 2 heures de croissance, nous avons induit un stress par ajout de 6mM de  $ZnSO_4$  dans le milieu et ré-incubé nos cultures 6 heures supplémentaires à 37°C sous agitation. Nous avons ensuite réalisé des dilutions en cascade de nos souches jusqu'à  $10^{-7}$  et ensemencé une goutte de chaque dilution sur boîtes TSB (Bouillon tryptone caséine soja) et TSB + 6mM de  $ZnSO_4$ .

#### I/ Expériences d'internalisation

Pour l'étude de l'expression des cibles durant l'internalisation, des monocytes THP1 différenciés en macrophages sont incubés 2 heures dans du milieu RPMI contenant 10% de sérum humain de type AB (Établissement Français du sang, Rennes, France). En parallèle, des précultures de *S. aureus* Newman et Newman  $\Delta sprC$  sont diluées à une  $DO_{600} = 0,1$  dans du milieu BHI et cultivées jusqu'à une  $DO_{600} = 2$ . Les cultures bactériennes sont ensuite diluées et ensemencées à une MOI (Multiplicité d'Infection) de 1:10 avec les macrophages. De plus, nous réalisons également un étalement sur boîtes afin de vérifier par dénombrement nos inoculums ainsi qu'un contrôle sans macrophage dans lequel nos bactéries sont cultivées dans le milieu de culture des macrophages. Les macrophages en contact avec les bactéries sont ensuite incubés à 37°C, 5%  $CO_2$  pendant 2 heures puis les bactéries extracellulaires (BEC) sont récupérées. Les macrophages sont ensuite lavés trois fois au PBS 1X froid (NaCl 137mM ; KCl 2,7mM ;  $NaH_2PO_4$  10mM ;  $KH_2PO_4$  1,8mM) et incubés avec 100 $\mu$ g/mL de gentamicine pendant différents temps (2H, 10H, 18H, 24H).

Après traitement à la gentamicine, les macrophages sont lavés trois fois au PBS 1X et les derniers lavages sont centrifugés 10 minutes à 13 000 rpm et étalés sur boîtes BHI afin de vérifier l'efficacité du traitement antibiotique. Les macrophages sont ensuite lysés au PBS-SDS 1% pendant 10 minutes à température ambiante et les ARNs de nos bactéries sont extraits à l'aide de billes de zirconium comme décrit précédemment (Raynaud S., *et al.*, 2018). Finalement, les niveaux de transcrits des différents gènes, dans les différentes conditions étudiées, sont analysés par RT-qPCR.

## **J/ Effet du milieu des monocytes et des macrophages THP1 sur *S. aureus***

Pour l'étude de l'effet du milieu des monocytes et des macrophages THP1 sur *S. aureus*, des monocytes et des macrophages THP1 ont été cultivés pendant trois jours dans du milieu RPMI sans SVF. Après trois jours, les milieux des monocytes et des macrophages THP1 sont récupérés et centrifugés 10 minutes à 10 000 rpm afin d'éliminer les débris cellulaires et les cellules en suspensions.

Pour les cinétiques avec le milieu de culture des monocytes THP1, une préculture de *S. aureus* Newman est diluée à une  $DO_{600} = 0,1$  dans le milieu des THP1 et dans du milieu RPMI contrôle. Les deux cultures sont ensuite incubées pendant 8 heures et la croissance bactérienne est évaluée par mesure de la  $DO_{600}$  toutes les heures.

Pour les cinétiques avec le milieu de culture des macrophages THP1, des précultures de *S. aureus* Newman et Newman  $\Delta sprC$  sont diluées à une  $DO_{600} = 0,1$  dans le milieu des THP1 et dans du milieu RPMI contrôle. Des triplicats de cultures de 100  $\mu$ l ont été placés dans des plaques de microtitration de 96 puits. Ces cultures ont ensuite été cultivées dans un lecteur multimode Synergy 2 (Biotek, Winooski USA) à 37°C sous agitation continue et des mesures de l'absorbance à 600 nm ont été réalisées toutes les 10 minutes pendant 22 heures.

Pour l'étude des niveaux de transcrits des gènes cibles, une préculture de *S. aureus* Newman est diluée à une  $DO_{600} = 0,1$  dans les milieux de culture issus des monocytes et des macrophages ainsi que dans du milieu RPMI contrôle. Les cultures ont ensuite été cultivées pendant 3 heures à 37°C, sous agitation puis les ARNs ont été extraits et le niveau de transcrits des différents gènes a été analysé par RT-qPCR.

## **K/ Analyse statistique des données**

Pour l'analyse statistique des données, une vérification de la normalité des données ainsi que de l'égalité des variances a été effectuée. Puis, en fonction des résultats de ces deux tests, les tests paramétriques de Student (pour données appariées ou non) et de Welch ou le test non paramétrique de Mann-Whitney ont été effectués, sur au moins trois expériences indépendantes, pour évaluer la significativité. Les données ont été exprimées en moyenne  $\pm$  écarts types.

Tableau 6 : Liste des souches utilisées au cours de cette étude.

Souches de <i>E. coli</i>	Caractéristiques	Références
DH5 $\alpha$	$\alpha$ F- $\phi$ 80 $\Delta$ lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (rK- mK-) phoA supE44 $\lambda$ - thi-1 gyrA96 relA1	Dower W.J., <i>et al.</i> , 1988
Souche de <i>S. aureus</i>	Caractéristiques	Références
RN4220	Souche dérivée de 8325-4 avec système de restriction modification altéré	Kreiswirth B.N., <i>et al.</i> , 1983
Newman	Souche sensible à la méticilline	Duthie E.S., <i>et al.</i> , 1952
Newman $\Delta$ sprC	Souche Newman délétée pour sprC	Le Pabic H., <i>et al.</i> , 2015
Newman $\Delta$ sprC pCN38	Souche Newman délétée pour sprC avec le vecteur à faible nombre de copies pCN38	Le Pabic H., <i>et al.</i> , 2015
Newman $\Delta$ sprC pCN38-sprC	Souche Newman délétée pour sprC et complémenté en SprC	Le Pabic H., <i>et al.</i> , 2015
Newman pRMC2-MS2	Souche Newman exprimant l'étiquette MS2	Cette étude
Newman pRMC2-SprC	Souche Newman exprimant la fusion MS2_SprC	Cette étude
Newman $\Delta$ sprC pRMC2-SprC	Souche Newman délétée pour sprC exprimant la fusion MS2_SprC	Cette étude
Newman pRMC2-ARNIII	Souche Newman exprimant la fusion MS2_ARNIII	Cette étude
Newman pRMC3 pCN33-agrC	Souche Newman contrôle exprimant la fusion agrC-gfp	Cette étude
Newman pRMC3-sprC pCN33-agrC	Souche Newman de surexpression de SprC exprimant la fusion agrC-gfp	Cette étude
Newman pRMC3 pCN33-czrA	Souche Newman contrôle exprimant la fusion czrA-gfp	Cette étude
Newman pRMC3-sprC pCN33-czrA	Souche Newman de surexpression de SprC exprimant la fusion czrA-gfp	Cette étude
Newman pRMC3 pCN33-czrAB	Souche Newman contrôle exprimant la fusion czrAB-gfp	Cette étude
Newman pRMC3-sprC pCN33-czrAB	Souche Newman de surexpression de SprC exprimant la fusion czrAB-gfp	Cette étude
Newman pRMC3 pCN33-agrB	Souche Newman contrôle exprimant la fusion agrB-gfp	Cette étude
Newman pRMC3-sprC pCN33-agrB	Souche Newman de surexpression de SprC exprimant la fusion agrB-gfp	Cette étude
Newman pRMC3-sprC pCN33-agrB $\Delta$ 151-171	Souche Newman de surexpression de SprC exprimant la fusion agrB $\Delta$ 151-171-gfp	Cette étude
Newman pRMC3 pCN33-deoD	Souche Newman contrôle exprimant la fusion deoD-gfp	Cette étude

<b>Newman pRMC3-<i>sprC</i> pCN33-<i>deoD</i></b>	Souche Newman de surexpression de SprC exprimant la fusion <i>deoD-gfp</i>	Cette étude
<b>Newman <math>\Delta</math><i>sprC</i> pRMC3 pCN33-<i>deoD</i></b>	Souche Newman contrôle délétée pour <i>sprC</i> exprimant la fusion <i>deoD-gfp</i>	Cette étude
<b>Newman <math>\Delta</math><i>sprC</i> pRMC3-<i>sprC</i> pCN33-<i>deoD</i></b>	Souche Newman délétée pour <i>sprC</i> sur-exprimant SprC et exprimant la fusion <i>deoD-gfp</i>	Cette étude

Tableau 7 : Liste des constructions utilisées au cours de cette étude.

Plasmides	Caractéristiques	Références
<b>pCN38</b>	Vecteur à faible nombre de copies avec une résistance à l'ampicilline Amp <sup>R</sup> chez <i>E. coli</i> et au chloramphénicol Cm <sup>R</sup> ( <i>cat194</i> ) chez <i>S. aureus</i>	Charpentier E., <i>et al.</i> , 2004
<b>pCN38-sprC</b>	pCN38 exprimant SprC sous le contrôle de son promoteur endogène chez <i>S. aureus</i> Newman	Le Pabic H., <i>et al.</i> , 2015
<b>pRMC2-MS2</b>	pRMC2 permettant l'induction à l'anhydrotétracycline de l'étiquette MS2	Hallier M. non publié
<b>pRMC2-MS2_SprC</b>	pRMC2 permettant l'induction à l'anhydrotétracycline de la fusion SprC_MS2	Cette étude
<b>pRMC2-MS2_ARNIII</b>	pRMC2 permettant l'induction à l'anhydrotétracycline de la fusion ARNIII_MS2	Hallier M. non publié
<b>pRMC3</b>	Vecteur pICS3 à fort nombre de copies avec une résistance à l'ampicilline Amp <sup>R</sup> chez <i>E. coli</i> et au chloramphénicol Cm <sup>R</sup> ( <i>cat194</i> ) chez <i>S. aureus</i>	Ivain L., <i>et al.</i> , 2017
<b>pRMC3-sprC</b>	pRMC3 exprimant SprC sous le contrôle de son promoteur endogène chez <i>S. aureus</i> Newman	Cette étude
<b>pCN33-PamiA-gfp</b>	Vecteur pCN33 à faible nombre de copies avec une résistance à l'ampicilline Amp <sup>R</sup> chez <i>E. coli</i> et à l'érythromycine Erm <sup>R</sup> ( <i>ermC</i> ) exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur <i>Pamia</i>	Ivain L., <i>et al.</i> , 2017
<b>pCN33-PamiA-agrC-gfp</b>	pCN33 exprimant la fusion <i>agrC-gfp</i> sous le contrôle du promoteur <i>Pamia</i>	Cette étude
<b>pCN33-PamiA-czrA-gfp</b>	pCN33 exprimant la fusion <i>czrA-gfp</i> sous le contrôle du promoteur <i>Pamia</i>	Cette étude
<b>pCN33-PamiA-czrAB-gfp</b>	pCN33 exprimant la fusion <i>czrAB-gfp</i> sous le contrôle du promoteur <i>Pamia</i>	Cette étude
<b>pCN33-PamiA-deoD-gfp</b>	pCN33 exprimant la fusion <i>deoD-gfp</i> sous le contrôle du promoteur <i>Pamia</i>	Cette étude
<b>pCN33-PamiA-agrB-gfp</b>	pCN33 exprimant la fusion <i>agrB-gfp</i> sous le contrôle du promoteur <i>Pamia</i>	Cette étude
<b>pCN33-PamiA-agrB<sub>A151-171</sub>-gfp</b>	pCN33 exprimant la fusion <i>agrB<sub>A151-171</sub>-gfp</i> sous le contrôle du promoteur <i>Pamia</i>	Cette étude

Tableau 8 : Liste des constructions utilisées au cours de cette étude.

Nom	Séquence	Cibles / Constructions	Expériences
Sonde SprC	CGGCTACTACATTTCGCATGT	SprC	Northern blot (acryl)
Sonde ARNtm	ACACGCTTAATGAGCTCGGG	ARNtm	
Sonde MS2	AACGTACCCTGATGGTGTACG	étiquette MS2	
Sonde <i>cztAB</i> _F	CAAGCCATACATCACGCGAA	<i>cztAB</i>	Northern blot (agarose)
Sonde <i>cztAB</i> _R	AAGGAGACCGCCGATGATTT		
Sonde ARNtm_F	TTCATGGATTTCGACAGGGGT	ARNtm	
Sonde ARNtm_R	CAGACTTCAAACGGCAGTGT		
<u>T7</u> -sprC_F	TAATACGACTCACTATAGGGAA GTCAACGACCATGCGTGGACA G	Transcrit SprC (147 nucléotides)	Retard sur gel (partie 1)
T7-sprC_R	CCATGATTTTGAAGTCTTCATA AACTG		
<u>T7</u> -sprC_F	TAATACGACTCACTATAGGGAA GTCAACGACCATGCGTGGACA G	Transcrit SprC <sub>Δ27</sub>	
T7-sprC <sub>Δ27</sub> _Mut1	CATGGCAATTTATACTCATAGT AAACGGCTACTACATTCG		
T7-sprC_R	CCATGATTTTGAAGTCTTCATA AACTG		
T7-sprC <sub>Δ27</sub> _Mut2	AGCCGTTTACTATGAGTATAAA TTGCCATGAGAGTAGAAG		
<u>T7</u> -deoD_F1	TAATACGACTCACTATAGGGAC AAAAATTTCGAAAAAAGG	Transcrit <i>deoD</i> court (173 nucléotides)	
T7-deoD_R1	TTATCAGCAATATATTTTGCAC GTAGCG		
<u>T7</u> -deoD_F1	TAATACGACTCACTATAGGGAC AAAAATTTCGAAAAAAGG	Transcrit <i>deoD</i> long (774 nucléotides)	
T7-deoD_R2	AATTTAAATAATTACTCTGCGA TTTCTAAAGCGATTCCA		
<u>T7</u> -mgrA_F1	TAATACGACTCACTATAGGGCC AATCCGAAAAGAGAAAAA	Transcrit <i>mgrA</i> court (177 nucléotides)	
T7-mgrA_R1	CAAGAAATTGTGGGTATGTTAG ATTGTACTTCTT		
<u>T7</u> -mgrA_F1	TAATACGACTCACTATAGGGCC AATCCGAAAAGAGAAAAA	Transcrit <i>mgrA</i> long (513 nucléotides)	
T7-mgrA_R2	TTGTCATGACAAAAGTTAATTA TTTTTCCTTTGTTTCA		

<b><u>T7-<i>agrB</i>_F1</u></b>	<u>TAATACGACTCACTATAGGGTA</u> <u>AAAGATTGTAATAAAT</u>	Transcrit <i>agrB</i> court (213 nucléotides)	<b>Retard sur gel (partie 2)</b>
<b><u>T7-<i>agrB</i>_R1</u></b>	<u>GGTAAATTAATTGTTATGTATA</u> <u>CTATTGCCTATATTTTAAACA</u>		
<b><u>T7-<i>agrB</i>_F2</u></b>	<u>TAATACGACTCACTATAGGGTA</u> <u>AAAGATTGTAATAAAT</u>	Transcrit <i>agrB</i> long (632 nucléotides)	
<b><u>T7-<i>agrB</i>_R2</u></b>	<u>TAAATAATGTATTCATTTTAAG</u> <u>TCCTCCTT</u>		
<b><u>T7-<i>agrC</i>_F1</u></b>	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAT</u> <u>ATAAACGTAATCAAGAAG</u>	Transcrit <i>agrC</i> court (250 nucléotides)	
<b><u>T7-<i>agrC</i>_R1</u></b>	<u>CGATACCATTTAATTTTATAGC</u> <u>ATTCATTTGTAAATTGTC</u>		
<b><u>T7-<i>agrC</i>_F2</u></b>	<u>TAATACGACTCACTATAGGGTT</u> <u>TAAATAGAGAGTGTGATA</u>	Transcrit <i>agrC</i> long (850 nucléotides)	
<b><u>T7-<i>agrC</i>_R2</u></b>	<u>GTAAATTGTCTTTCATAGGTAC</u> <u>AATATTTT</u>		
<b><u>T7-<i>czrB</i>_F1</u></b>	<u>TAATACGACTCACTATAGGGGA</u> <u>TATAGATGAAGTTATAAC</u>	Transcrit <i>czrB</i> (312 nucléotides)	
<b><u>T7-<i>czrB</i>_R1</u></b>	<u>TTAATGTACATGCGCGTGATGA</u> <u>TGAGCATG</u>		
<b><u>T7-<i>czrB</i>_F2</u></b>	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAA</u> <u>AGCAAGCCATACATCACG</u>	Transcrit 5'- <i>czrB</i> (175 nucléotides)	
<b><u>T7-<i>czrB</i>_R2</u></b>	<u>GAGACCGCCGATGATTTGATA</u> <u>AACATATATA</u>		
<b><u>T7-<i>czrB</i>_F1</u></b>	<u>TAATACGACTCACTATAGGGGA</u> <u>TATAGATGAAGTTATAAC</u>	Transcrit <i>czrB</i> <sub>A34</sub>	
<b><u>T7-<i>czrB</i><sub>A34</sub>_Mut1</u></b>	<u>TATAATCGATTCATCATGTTTG</u> <u>AATATTTAAATGTAATAAATCA</u> <u>TGCTCA</u>		
<b><u>T7-<i>czrB</i>_F2</u></b>	<u>TTAATGTACATGCGCGTGATGA</u> <u>TGAGCATG</u>		
<b><u>T7-<i>czrB</i><sub>A34</sub>_Mut2</u></b>	<u>TTATTACATTTAAATATTCAAA</u> <u>ACATGATGAATCGATTATATGT</u> <u>TCAGGA</u>		
<b><u>T7-<i>czrA</i>_F</u></b>	<u>TAATACGACTCACTATAGGGGT</u> <u>ATTAAATTAATATATGAACAA</u>	Transcrit <i>czrA</i> (102 nucléotides)	
<b><u>T7-<i>czrA</i>_R</u></b>	<u>CAGTTACGCGTTCTAATGTATC</u> <u>TG</u>		
<b><u>pRMC2-MS2- SacI-sprC_F</u></b>	<u>GACACCATCAGGGGTCTGGAG</u> <u>CTCUAAGTCAACGACCATG</u>	pRMC2-MS2_SprC	<b>Clonage MAPS</b>
<b><u>pRMC2-MS2_ EcoRI-sprC_R</u></b>	<u>TAAAACGACGGCCAGTGAATTC</u> <u>ATGATTACTTCGTATACTGTT</u>		

<b>pRMC3-PstI-SprC_F</b>	<u>TTAAAAGCTTGCATGCCTGCAG</u> <u>ATAGGTGAGATGCATACAC</u>	pRMC3-sprC	<b>Clonages système rapporteur à double plasmides</b>
<b>pRMC3-NarI-SprC_R</b>	<u>GAGAAAATACCGCATCAGGCG</u> <u>CCGTATACTGTTATAACTG</u>		
<b>pCN33-BglII-<i>agrC</i>_F</b>	<u>GGATAATGTGATATAATGGAGA</u> <u>TCTACACGAATAATTTAAATAG</u> A	pCN33- <i>PamiA-agrC-gfp</i>	
<b>pCN33-EcoRV-<i>agrC</i>_R</b>	<u>TTCTCCTTTGCTTCTAGAGATAT</u> <u>CTTTCATAGGTACAATATTTT</u>		
<b>pCN33-BglII-<i>czrA</i>_F</b>	<u>GGATAATGTGATATAATGGAGA</u> <u>TCTGTATTAATTAATATATGA</u> ACAA	pCN33- <i>PamiA-czrA-gfp</i>	
<b>pCN33-EcoRV-<i>czrA</i>_R</b>	<u>TTCTCCTTTGCTTCTAGAGATAT</u> <u>CTTACGCGTTCTAATGTATCT</u>		
<b>pCN33-BglII-<i>czrAB</i>_F</b>	<u>GGATAATGTGATATAATGGAGA</u> <u>TCTTATGAACAAATATTCATAT</u> GA	pCN33- <i>PamiA-czrAB-gfp</i>	
<b>pCN33-EcoRV-<i>czrAB</i>_R</b>	<u>TTCTCCTTTGCTTCTAGAGATAT</u> <u>CATGTACATGCGCGTGATGAT</u>		
<b>pCN33-BglII-<i>deoD</i>_F</b>	<u>GGATAATGTGATATAATGGAGA</u> <u>TCTACAAAAATTCGCAAAAAA</u> GGGAAA	pCN33- <i>PamiA-deoD-gfp</i>	
<b>pCN33-EcoRV-<i>deoD</i>_R</b>	<u>TTCTCCTTTGCTTCTAGAGATAT</u> <u>C<sub>T</sub>AATACTGTTTTAGCAATTTT</u>		
<b>pCN33-BglII-<i>agrB</i>_F</b>	<u>GGATAATGTGATATAATGGAGA</u> <u>TCTTCGTATAATGACAGTGAGG</u> AGAGT	pCN33- <i>PamiA-agrB-gfp</i>	
<b>pCN33-EcoRV-<i>agrB</i>_R</b>	<u>TTCTCCTTTGCTTCTAGAGATAT</u> <u>CTACTTGCAAAAATGAATATG</u>		
<b>pCN33-BglII-<i>agrB</i>_F</b>	<u>GGATAATGTGATATAATGGAGA</u> <u>TCTTCGTATAATGACAGTGAGG</u> AGAGT	pCN33- <i>PamiA- agrB<sub>Δ151-171</sub>-gfp</i>	
<b>pCN33-EcoRV-<i>agrB</i>-mut_R</b>	<u>TTCTCCTTTGCTTCTAGAGATAT</u> <u>CATCTAAGTTATTTCTCTTTT</u>		
<b>SprC_F</b>	<u>AAGCTTCTACTCTCATGGCAAT</u> TT	SprC	<b>RT-qPCR (partie 1)</b>
<b>SprC_R</b>	<u>TCAAACGGCAGTGTTTAGCA</u>		
<b>CzrA_F</b>	<u>ACGACAAGGCCAATCAATGA</u>	<i>czrA</i>	
<b>CzrA_R</b>	<u>GCGTGATGTATGGCTTGCTT</u>		
<b>CzrB_F</b>	<u>TTTAAAGGCGGCGACACTTC</u>	<i>czrB</i>	
<b>CzrB_R</b>	<u>AATAGCTGCAGTAATGGCGC</u>		

<b>ARNtm_F</b>	CACTCTGCATCGCCTAACAG	<i>ARNtm</i>	<b>RT-qPCR (partie 2)</b>
<b>ARNtm_R</b>	TCAAACGGCAGTGTTTAGCA		
<b>AgrB_F</b>	TGACCAGTTTGCCACGTATC	<i>agrB</i>	
<b>AgrB_R</b>	AGCTAAGACCTGCATCCCTA		
<b>AgrC_F</b>	CCCTATCATTCGCGTTGCAT	<i>agrC</i>	
<b>AgrC_R</b>	GCGTGGTATATCAGCGC		
<b>DeoD_F</b>	TGGGGTTCTGGTATGGGTATTC	<i>deoD</i>	
<b>DeoD_R</b>	GCCACAAGAACCGATACGAA		

# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**Ablain W.**, Hallier Soulier S., Causeur D., Gautier M. and Baron F. (2010) A simple and rapid method for the disruption of *Staphylococcus aureus*, optimized for quantitative reverse transcriptase applications: Application for the examination of Camembert cheese. *Dairy Sci. Technol.* **89**: 69-81.

**Aiello S.E.** (2002) Le manuel Vétérinaire Merck, Deuxième édition française, Merck and co, Whitehouse station USA, 1391-1393 et 1949-1950.

**Albanesi D.** and de Mendoza D. (2016) FapR: From Control of Membrane Lipid Homeostasis to a Biotechnological Tool. *Front. Mol. Biosci.* **3**: 64.

**Alibayov B.**, Baba-Moussa L., Sina H., Zdeňková K. and Demnerová K. (2014) *Staphylococcus aureus* mobile genetic elements. *Mol. Biol. Rep.* **41**: 5005-5018.

**Alix E.** and Blanc-Potard A.-B. (2007) MgtC: a key player in intramacrophage survival. *Trends Microbiol.* **15**: 252-256.

**Alix E.** and Blanc-Potard A.-B. (2008) Peptide-assisted degradation of the Salmonella MgtC virulence factor. *EMBO J.* **27**: 546-557.

**Allen H.K.**, Trachsel J., Looft T. and Casey T.A. (2014) Finding alternatives to antibiotics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1323**: 91-100.

**Alloatti A.**, Kotsias F., Magalhaes J.G. and Amigorena S. (2015) Dendritic cell maturation and cross-presentation: timing matters! *Immunol. Rev.* **272**: 97-108.

**Alva-Murillo N.**, López-Meza J.E. and Ochoa-Zarzosa A. (2014) Nonprofessional Phagocytic Cell Receptors Involved in *Staphylococcus aureus* Internalization. *Bio. Med. Res. Int.* 2014: 538546. doi:10.1155/2014/538546.

**Amulic B.**, Cazalet C., Hayes G.L., Metzler K.D. and Zychlinsky A. (2012) Neutrophils Function: From Mechanisms to Disease. *Annu. Rev. Immunol.* **30**: 459-489.

**Anders S.** and Huber W. (2010) Differential expression analysis for sequence count data, *Genome Biol.* **11**: R106.

**Anders S.**, Pyl P.T. and Huber W. (2015) HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics.* **31**: 166-169.

**ANSM** “Consommation d’Antibiotiques et Résistances aux Antibiotiques en France: Une Infection Évitée, C’est un Antibiotique Préservé” *Agence Nationale de Sécurité du Médicament*, Novembre 2018.

**Ares M.** (2012) Bacterial RNA Isolation. *Cold Spring Harbor. Protoc.* **12**: 1024-1027.

**Arkhipova I.R.** and Rice P.A. (2016) Mobile Genetic Elements: *In silico, In Vitro, In Vivo.* *Mol. Ecol.* **25**: 1027-1031.

**Arvidson S.**, Holme T. and Lindholm B. (1972) The formation of extracellular proteolytic enzymes by *Staphylococcus aureus*. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand. B. Microbiol. Immunol.* **80**: 835–844.

**Arvidson S.** (1973). Studies on extracellular proteolytic enzymes from *Staphylococcus aureus*. II. Isolation and characterization of an EDTAsensitive protease. *Biochim. Biophys. Acta.* **302**: 149–157

**Arvidson S.**, Holme T. and Lindholm B. (1973) Studies on extracellular proteolytic enzymes from *Staphylococcus aureus*. I. Purification and characterization of one neutral and one alkaline protease. *Biochim. Biophys. Acta.* **302**: 135–148.

**Assev L.V.**, Levandovskaya A.A., Tchfistova L.S., Scaptsova N.V. and Boni I.V. (2008) A new regulatory circuit in ribosomal protein operons: S2-mediated control of the *rpsB-tsif* expression in vivo. *RNA.* **14**: 1882-1894.

**Assev L.V.**, Chugunov A.O., Efremv R.G. and Boni I.V. (2013) A Single Missense Mutation in a Coiled-Coil Domain of *Escherichia coli* Ribosomal Protein S2 Confers a Thermosensitive Phenotype That Can Be Suppressed by Ribosomal Protein S1. *J. Bacteriol.* **195**: 95-104.

**Atlas E.**, Clark H., Silverblatt F. and Turck M. (1969) Nalidixic acid and oxolinic acid in the treatment of chronic bacteriuria. *Ann. Intern. Med.* **70**: 713-721.

**B****aba T.**, Bae T., Schneewind O., Takeuchi F. and Hiramatsu K. (2008) Genome Sequence of *Staphylococcus aureus* Strain Newman and Comparative Analysis of Staphylococcal Genome: Polymorphism and Evolution of Two Major Pathogenicity Islands. *J. Bacteriol.* **190**: 300-310.

**Babitzke P.** and Romeo T. (2007) CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**: 156-163.

**Badia J.M.**, Casey A.L., Petrosillo N., Hudson P.M., Mitchell S.A. and Crosby C. (2017) Impact of surgical site infection on healthcare costs and patient outcomes: a systematic review in six European countries. *J. Hosp. Infect.* **93**: 1-15.

- Bae T.**, Banger A.K., Wallace A., Glass E.M., Åslung F., Schneewind O. and Missiakas D.M. (2004) *Staphylococcus aureus* virulence genes identified by *bursa aurealis* mutagenesis and nematode killing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**: 12312-12317.
- Bækkedal C.** and Haugen P. (2015) The Spot 42 RNA: A regulatory small RNA with roles in the central metabolism. *RNA Biol.* **12**: 1071-1077.
- Balaban N.** and Novick R.P. (1995) Translation of RNAlII, the *Staphylococcus aureus* agr regulatory RNA molecule, can be activated by a 3'-end deletion. *FEMS. Microbiol. Lett.* **133**: 155-161
- Barber M.** (1961) Methicillin-resistant staphylococci. *J. Clin. Pathol.* **14**: 385-393.
- Barrick J.E.**, Sudarsan N., Weinberg Z., Ruzzo W.L. and Breaker R.R. (2005) 6S RNA is a widespread regulator of eubacterial RNA polymerase that resembles an open promoter. *RNA.* **11**: 774-784.
- Barrick J.E.** and Breaker R.R. (2007) The distributions, mechanisms, and structures of metabolite-binding riboswitches. *Genome. Biol.* **8**: 239.
- Bastos M.D.**, Countinho B.G. and Coelho M.L. (2010) Lysostaphin: A Staphylococcal Bacteriolysin with Potential Clinical Applications. *Pharmaceuticals.* **3**: 1139-1161.
- Bayston R.**, Ashraf W. and Smith T. (2007) Triclosan resistance on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* expressed as small colony variant: a novel mode of evasion of susceptibility to antiseptics. *J. Antimicrobiol. Chemother.* **59**: 848-853.
- Belon C.**, Gannoun-Zaki L., Lutfalla G., Kremer L. and Blanc-Potard A.-B. (2014) *Mycobacterium marinum* MgtC Plays a Role in Phagocytosis but is Dispensable for Intracellular Multiplication. *PLoS ONE.* **9**: e116052.
- Belon C.**, Soscia C., Bernut A., Laubier A., Bleves S. and Blanc-Potard, A.-B. (2015) A Macrophage subversion factor is shared by intracellular and extracellular pathogens. *PLoS Pathog.* **11**: e1004969.
- Belon C.** and Blanc-Potard A.-B. (2016) Intramacrophage survival for extracellular bacterial pathogens: MgtC as a key adaptive factor. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **6**: 52.
- Belon C.**, Rosas Olvera M., Vives E., Kremer L., Gannoun-Zaki L. and Blanc-Potard A.-B. (2016b) Use of the Salmonella MgtR peptide as an antagonist of the Mycobacterium MgtC virulence factor. *Future Microbiol.* **11**: 215-225.

- Benito Y.**, Kolb F.A., Romby P., Lina G., Etienne J. and Vandenesch F. (2000) Probing the structure of RNAIII, the *Staphylococcus aureus* agr regulatory RNA, and identification of the RNA domain involved in repression of protein A expression. *RNA*. **6**: 668-679.
- Bierne H.**, Milohanic E. and Kortebi M. (2018) To Be Cytosolic or Vacuolar: The Double life of *Listeria monocytogenes*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8**: 136.
- Bischoff M.**, Dunman P., Kormanec J., Macapagal D., Murphy E., Mounts W., Berger-Bächi B. and Projan S. Microarray-Based Analysis of the *Staphylococcus aureus*  $\sigma^B$  Regulon. *J. Bacteriol.* **186**: 4085-4099.
- Biswas R.**, Voggu L., Simon U.K., Hentschel P., Thumm G. and Götz F. (2006) Activity of the major staphylococcal autolysin Atl. *FEMS. Microbiol Lett.* **259**: 260-2688.
- Bjerketorp J.**, Jacobsson K. and Frykberg L. (2004) The von Willebrand factor-binding protein (vWbp) of *Staphylococcus aureus* is a coagulase. *FEMS Microbiol. Lett.* **234**: 309-314.
- Blättner S.**, Das S., Paprotka K., Eilers U., Krischke M., Kretschmer D., Remmele C.W., Dittrich M., Müller T., Schülein-Völk C., Hertlein T., Müller M.J., Huettel B., Reinhardt R., Ohlsen K., Rudel T. and Fraunholz M.J. (2016) *Staphylococcus aureus* exploits a non-ribosomal cyclic dipeptide to modulate survival within epithelial cells and phagocytes. *PLoS Pathog.* **12**: e1005857.
- Blokesch M.** (2016) Natural competence for transformation. *Curr. Biol.* **26**: R1126-R1130.
- Blumberg H.M.**, Rimland D., Carroll D.J., Terry P. and Wachsmuth I.K. (1991) Rapid Development of Ciprofloxacin Resistance in Methicillin-Susceptible and -Resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* **163**: 1279-1285.
- Bohdanowicz M.**, Cosío G., Backer J.M. and Grinstein S. (2010) Class I and class III phosphoinositide 3-kinases are required for actin polymerization that propels phagosomes. *J. Cell Biol.* **191**: 999–1012.
- Bohn C.**, Rigoulay C., Chabelskaya S., Sharma C.M., Marchais A., Skorski P., Borezée-Durant E., Barbet R. Jacquet E., Jacq A., Gautheret D., Felden B., Vogel J. and Bouloc P. (2010) Experimental discovery of small RNAs in *Staphylococcus aureus* reveals a riboregulator of central metabolism. *Nucleic. Acids. Res.* **38**: 6620-6638.
- Boisset S.**, Geissmann T., Huntzinger E., Fechter P., Bendridi N., Possedko M., Chevalier., Helfer A.C., Benito Y., Jacquier A., Gaspin C., Vandenesch F. and Romby P. (2007) *Staphylococcus aureus* RNAIII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism. *Genes Dev.* **21**: 1353-1366.

- Bokarewa M.I.**, Jin T. and Tarkowski A. (2006) *Staphylococcus aureus*: Staphylokinase. *Int. J. Biochem.* **38**: 504-509.
- Bose J.L.**, Lehman M.K., Fey P.D. and Bayles K.W. (2012) Contribution of the *Staphylococcus aureus* Atl AM and GL Murein Hydrolase Activities in Cell Division, Autolysis, and Biofilm Formation. *PLoS One.* **7**: e42244.
- Bosi E.**, Monk J.M., Aziz R.K., Fondi M., Nizet V. and Palsson B.Ø. (2016) Comparative genome-scale modelling of *Staphylococcus aureus* strains identifies strain-specific metabolic capabilities linked to pathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**: E3801-E3809.
- Botella H.**, Peyron P., Levillain F., Poincloux R., Poquet Y., Brandli I., Wang C., Tailleux L., Tilleul S., Charrière G.M., Waddell S.J., Foti M., Lugo-Villarino G., Gao Q., Maridonneau-Parini I., Butcher P.D., Castagnoli P.R., Gicquel B., de Chastellier C. and Neyrolles O. (2011) Mycobacterial P1-Type ATPases Mediate Resistance to Zinc Poisoning in Human Macrophages. *Cell. Host. Microbe.* **10**: 248-259.
- Botella H.**, Stadthagen G., Lugo-Villarino G., de Chastellier C. and Neyrolles O. (2012) Metallobiology of host–pathogen interactions: an intoxicating new insight. *Trends Microbiol.* **20**: 106-112.
- Bouloc P.** and Felden B. (2011) Ribonucleic acids regulators of *Staphylococcus aureus* and their roles in virulence. *Med. Sci.* **27**: 238-241.
- Brannon J.R.** and Hadjifrangiskou M. (2016) The arsenal of pathogens and antivirulence therapeutic strategies for disarming them. *Drug Des. Devel. Ther.* **10**: 1795-1806.
- Brantl S.** and Jahn N. (2015) sRNAs in bacterial type I and type III toxinantitoxin systems. *FEMS. Microbiol. Rev.* **39**: 413-427.
- Breaker RR.** (2012) Riboswitches and the RNA World. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.* **4**: a003566.
- Brinkmann V.**, Reichard U., Goosmann C., Fauler b;? Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y. and Zychlinsky A. (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* **303**: 1532-1535.
- Bronesky D.**, Wu Z., Marzi S., Walter P., Geissmann T., Moreau K., Vandenesch F., Caldelari I. and Romby P. (2016) *Staphylococcus aureus* RNAlII and Its Regulon Link Quorum Sensing, Stress Responses, Metabolic Adaptation, and Regulation of Virulence Gene Expression. *Annu. Rev. Microbiol.* **70**: 299-316.

**Bronesky D.**, Desgranges E., Corvaglia A., François P., Caballero C.J., Prado L., Toledo-Arana A., Lasa I., Moreau K., Vandenesch F., Marzi S., Romby P. and Caldelari I. (2019) A multifaceted small RNA modulates gene expression upon glucose limitation in *Staphylococcus aureus*. *EMBO J.* **38**.

**Brunskill E.W.** and Bayles K.W. (1996) Identification and molecular characterization of a putative regulatory locus that affects autolysis in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **178**: 611-618.

**Bukowski M.**, Wladyka B. and Dubin G. (2010) Exfoliative Toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins*. **2**: 1148-1165.

**Bur S.**, Preissner K.T., herrmann M. and Bischoff M. (2013) The *Staphylococcus aureus* Extracellular Adherence Potein Promotes Bacterial Internalization by Keratinocytes Independent of Fibronectin-Binding Proteins. *J. Invest. Dermatol.* **133**: 2004-2012.

**Chabelskaya S.**, Gaillot O. and Felden B. (2010) A *Staphylococcus aureus* Small RNA Is Required for Bacterial Virulence and Regulates the Expression of an Immune-Evasion Molecule. *PLoS Pathog.* **6**: e1000927.

**Chabelskaya S.**, Bordeau V. and Felden B. (2014) Dual RNA regulatory control of a *Staphylococcus aureus* virulence factor. *Nucleic. Acids. Res.* **42**: 4847-58.

**Chan P.F.** and Foster S.J. (1998) Role of SarA in virulence determinant production and environmental signal transduction in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **180**: 6232–6241.

**Charpentier E.**, Anton A.I., Barry P., Alfonso B., Fang Y. and Novick R.P. (2004) Novel cassette-based shuttle vector system for gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 6076-6085.

**Chavakis T.**, Wiechmann K., Preissner K.T. and Herrmann M. (2005) *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium. *Thromb. Haemost.* **94**: 278-285.

**Cheng A.G.**, McAdow M., Kim H.K., Bae T., Missiakas D.M. and Schneewind O. (2010) Contribution of Coagulase towards *Staphylococcus aureus* Disease and Protective Immunity. *PLoS Pathog.* **6**: e1001036.

**Cheung A.L.**, Koomey J.M., Butler C.A., Projan S.J. and Fischetti V.A. (1992) Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (sar) distinct from agr. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 6462-6466.

**Cheung A.L.**, Schmidt K., Bateman B. and Manna A.C. (2001) SarS, a SarA homolog repressible by agr, is an activator of protein A synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **69**: 2448-2455.

**Cheung A.L.**, Bayer A.S., Zhang G., Gresham H. and Xiong Y.Q. (2004). Regulation of virulence determinants *in vitro* and *in vivo* in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **40**: 1-9.

**Cheung A.L.**, Nishina K.A., Trottonda M.P. and Tamber S. (2008) The SarA protein family of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **40**: 355-361.

**Cho H.**, Jeong D.W., Liu Q., Yeo W.S., Vogl T., Skaar E.P., Chazin W.J. and Bae T. (2015) Calprotectin Increases the Activity of the SaeRS Two Component System and Murine Mortality during *Staphylococcus aureus* Infections. *PLOS Pathog.* **11**: e1005026.

**Chunhua M.**, Yu L., Yaping G., Jie D., Qiang L., Xiaorong T. and Guang Y. (2012) The expression of LytM is down-regulated by RNAIII in *Staphylococcus aureus*. *J. Basic. Microbiol.* **52**: 636-641.

**Collin M.** and Bigley V. (2016) Monocyte, macrophage, and dendritic cell development: the human perspective. *Microbiol. Spectrum.* 4: doi: 10.1128/microbiolspec.MCHD-0015-2015.

**Corrigan R.M.** and Foster T.J. (2009) An improved tetracyclin-inducible expression vector for *Staphylococcus aureus*. *Plasmid.* **61**: 126-129.

**Cuatrecasas P.**, Fuchs S. and Anfinsen C.B. (1967) Catalytic properties and specificity of the extracellular nuclease of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **242**: 1541–1547.

**Cue D.**, Lei M.G. and Lee C.Y. (2013) Activation of sarX by Rbf is required for biofilm formation and icaADBC expression in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **195**: 1515-1524.

**Cunningham L.**, Catlin B.W. and de Garilhe M.P. (1956) A deoxyribonuclease of micrococcus pyogenes1. *J. Am. Chem. Soc.* **78**: 4642–4645.

**D**'Herelle F. (1917) Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *C. R. Acad. Sci.* **165**: 373–375.

**Dalberto P.F.**, Rodrigues-Junior V., Almeida Falcão V.C., Pinto A.F.M., Abadi B.L., Bizarro C.V., Basso L.A., Villela A.D. and Santo D.S. (2018) Assessing the role of *deoD* gene in *Mycobacterium tuberculosis* in vitro growth and macrophage infection. *Microb. Pathog.* **119**: 60-64.

**Darfeuille F.**, Unoson C., Vogel J. and Wagner E.G. (2007) An antisense RNA inhibits translation by competing with standby ribosomes. *Mol. Cell.* **26**: 381-392.

**Davies L.C.**, Jenkins S.J., Allen J.E. and Taylor P.R. (2013) Tissue-resident macrophages. *Nat. Immunol.* **14**: 986-995.

- de Buhr N.** and von Köckritz-Blickwede M. (2016) How Neutrophils Extracellular Traps become Visible. *J. Immunol. Res.* **2016**: 4604713. doi: 10.1155/2016/4604713
- de Jong N.W.M.**, Ramyar K.X., Guerra F.E., Nijland R., Fevre C., Voyich J.M., McCarthy A.J., Garcia B.L., van Kessel K., van Strijp J., Geisbrecht B.V. and Haas P.A. (2017). Immune evasion by a staphylococcal inhibitor of myeloperoxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **114**: 9439-9444.
- de Jong N.W.M.**, van Kessel K.P.M. and van Strijp J.A.G. (2019) Immune Evasion by *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Spectr.* **7**: doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0061-2019.
- De la Fuente R.**, Suarez G. and Schleifer K.H. (1985) *Staphylococcus aureus* subsp. *Anaerobius* subsp. Nov., the causal agent of abscess disease of sheep. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **35**: 99-102.
- Defez C.**, Fabbro-Peray P., Cazaban M., Boudemaghe T., Sotto A. and Daurès J.P. (2008) Additional direct medical costs of nosocomial infections: an estimation from a cohort of patients in a French university hospital. *J. Hosp. Infect.* **68**: 130-136.
- Delaune A.**, Dubrac S., Blanchet C., Poupel O., Mader U., Hiron A., Leduc A., Fitting C., Nicolas P., Cavailon J.M., Adib-Conquy M. and Msadek T. (2012). The WalkR System Controls Major Staphylococcal Virulence Genes and Is Involved in Triggering the Host Inflammatory Response. *Infect. Immun.* **80**: 3438-3453.
- Di Cello F.**, Xie Y., Paul-Satyaseela M. and Kim K.S. (2005) Approaches to Bacterial RNA Isolation and Purification for Microarray Analysis of *Escherichia coli* K1 with Human Brain Microvascular Endothelial Cells. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 4197-4199.
- Dinges M.M.**, Orwin P.M. and Schlievert PM. (2000) Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**: 16-34.
- Donnio P.-Y.**, (2010) Sensibilité de la bactérie aux agents bactériostatiques ou bactericides, *Staphylococcus aureus*. *Monographie de Microbiologie*, Edition Tec&Doc.
- Dower W.J.**, Miller J.F. and Ragsdale C.W. (1988) High efficiency transformation of *E.coli* by high voltage electroporation. *Nucleic. Acids. Res.* **16**: 6127-6145.
- Drapeau G.R.**, Boily Y. and Houmard J. (1972) Purification and properties of an extracellular protease of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **247**: 6720-6726.
- Dubrac S.** and Msadek T. (2004) Identification of genes controlled by the essential YycG/YycF two-component system of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **186**: 1175-1181.

**Dubrac S.**, Boneca I.G., Poupel O. and Msadek T. (2007) New insights into the WalK/WalR (YycG/YycF) essential signal transduction pathway reveal a major role in controlling cell wall metabolism and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **189**: 8257-8269.

**Dunman P.M.**, Murphy E., Haney S., Palacios D., Tucker-Kellogg G., Wu S. Brown E.L., Zagursky R.J., Shlaes D. and Projan S.J. (2001) Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the agr and/or sarA loci. *J. Bacteriol.* **183**: 7341-7353.

**Durand G.A.**, Raoult D. and Dubourg G. (2019) Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *Int. J. Antimicrob.* **53**: 371-382.

**Durand S.**, Braun F., Lioliou E., Romilly C., Helfer A.-C., Kuhn L., Quittot N., Nicolas P., Romby P. and Condon C. (2015) A Nitric Oxide Regulated Small RNA Controls Expression of Genes Involved in Redox Homeostasis in *Bacillus subtilis*. *Plos Genet.* **11**: e1004957.

**Duthie E.S.** and Lorenz L.L. (1952) Staphylococcal Coagulase: Mode of Action and Antigenicity. *J. Gen. Microbiol.* **6**: 95-107.

**Dziewanowska K.**, Carson A.R., Patti J.M., Deobald C.F., Bayles K.W. and Bohach G.A. (2000) Staphylococcal Fibronectin Binding Protein Interacts with Heat Shock Protein 60 and Integrins: Role in Internalization by Epithelial Cells. *Infect. Immun.* **68**: 6321-6328.

**E**ggenhofer F., Tafer H., Stadler P.F. and Hofacker I.L. (2011) RNApredator: fast accessibility-based prediction of sRNA targets. *Nucleic. Acids. Res.* **39**: W149-W154.

**Eijkmann C.**, (1901). Über Enzyme bei Bakterien und Schimmelpilzen. *Zentralbl. Bakt. Parasitenkd. Infektionskr.* **29**: 841-848.

**Eisenbeis J.**, Peisker H., Backes C.S., Bur S., Hölter S., Thewes N., Greiner M., Junker C., Schwarz E.C., Hoth M., Junker K., Preissner K.T., Jacobs K., Herrmann M. and Bischoff M. (2017) The extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* acts as a proliferation and migration repressing factor that alters the cell morphology of keratinocytes. *Int. J. Med. Microbiol.* **307**: 116-125.

**Eisenbeis J.**, Saffarzadeh M., Peisker H., Jung P., Thewes N., Preissner K.T., Herrmann M., Molle V., Geisbrecht B.V., Jacobs K. and Bischoff M. (2018) The *Staphylococcus aureus* Extracellular Adherence Protein Eap Is a DNA Protein Capable of Blocking Neutrophil Extracellular Trap Formation. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8**: 235.

**Eriksson S.**, Lucchini S., Thompson A., Rhen M. and Hinton J.C.D. (2003) Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* **47**: 103-118.

**Eyraud A.**, Tattevin P., Chabelskaya S. and Felden B. (2014) A small RNA controls a protein regulator involved in antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic. Acids. Res.* **42**: 4892-4905.

**Fagerlund A.**, Granum P.E. and Havarstein L.S. (2014) *Staphylococcus aureus* competence genes: mapping of the SigH, ComK1 and ComK2 regulons by transcriptome sequencing. *Mol. Microbiol.* **94**: 557-579.

**Favazzo L.J.**, Gill A.L., Farnsworth C.W., Mooney R.A. and Gill S.R. (2019) The Response of *nor* and *nos* Contributes to *Staphylococcus aureus* Virulence and Metabolism. *J. Bacteriol.* **201**: pii: e00107-19.

**Fenerbro J.** (2011) Fighting bacterial infections-Future treatment options. *Drug Resist. Updat.* **14**: 125-139.

**Flannagan R.S.**, Jaumouillé V. and Grinstein S. (2012) The Cell Biology of Phagocytosis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **7**: 61-98.

**Flannagan R.S.**, Heit B. and Heinrichs D.E. (2015) Antimicrobial Mechanisms of Macrophages and the Immune Evasion Strategies of *Staphylococcus aureus*. *Pathogens.* **4**: 826-868.

**Flannagan R.S.**, Heit B. and Heinrichs D.E. (2015b) Intracellular replication of *Staphylococcus aureus* in mature phagolysosomes in macrophages precedes host cell death, and bacterial escape and dissemination. *Cell. Microbiol.* **18**: 514-535.

**Fleischer B.** (1988) T cell stimulation by staphylococcal enterotoxins. Clonally variable response and requirement for major histocompatibility complex class II molecules on accessory or target cells. *J. Exp. Med.* **167**: 1697-1707.

**Fleming A.** (1945) Penicillin. *Nobel lecture*.

**Foster T.J.** (2005) Immune evasion by staphylococci. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 948-958.

**Foster T.J.**, Geoghegan J.A., Ganesh V.K. and Höök M. (2014) Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**: 49-62.

**Foster T.J.** (2016) The remarkably multifunctional fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **35**: 1923-1931.

**Foster T.J.** (2017) Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiol. Rev.* **41**: 430-449.

**Foster T.J.** (2019) The MSCRAMM Family of Cell-Wall-Anchored Surface Proteins of Gram-Positive Cocci. *Trends Microbiol.* **27**: 927-941.

**Fournier B.** and Hooper D.C. (2000) A new two-component regulatory system involved in adhesion, autolysis, and extracellular proteolytic activity of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **182**: 3955-3964.

**Fournier B.**, Klier A. and Rapoport G. (2001) The two-component system ArlS-ArlR is a regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **41**: 247-261.

**Fozo E.M.**, Makarova K.S., Shabalina S.A., Yutin N., Koonin E.V. and Storz G. (2010) Abundance of type I toxin-antitoxin systems in bacteria: searches for new candidates and discovery of novel families. *Nucleic. Acids. Res.* **38**: 3743-3759.

**Franze de Fernandez M.T.**, Eoyang L. and August J.T. (1968) Factor fraction required for the synthesis of bacteriophage Qbeta-RNA. *Nature.* **219**: 588-90

**Fraunholz M.** and Sinha B. (2012) Intracellular staphylococcus aureus: Live-in and let die. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2**: 43.

**Gannoun-Zaki L.**, Alibaud L., Carrère-Kremer S., Kremer L. and Blanc-Potard A.-B. (2013) Overexpression of the KdpF membrane meptide in *Mycobacterium bovis* BCG results in reduced intramacrophage growth and altered cording morphology. *PLoS ONE.* **8**: e60379.

**Gao H.**, Dai W., Zhao L., Min J. and Wang F. (2018) The Role of Zinc and Zinc Homeostasis in Macrophage Function. *J. Immunol. Res.* **2018**: 6872621.

**Garzoni C.**, Francois P., Huyghe A., Couzinet S., Tapparel C., Charbonnier Y., Renzoni R., Lucchini S., Lew P.D., Vaudaux P., Kelley W.L. and Schrenzel J. (2007) A global view of *Staphylococcus aureus* whole genome expression upon internalization in human epithelial cells. *BMC. Genomics* **8**: 171.

**Geissmann F.**, Manz M.G., Jung S., Sieweke M.H., Merad M. and Ley K. (2010) Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science.* **327**: 656.

- Geissmann T.**, Chevalier C., Cross M.-J., Boisset S., Fechter P., Noirot C., Schrenzel J., François P., Vandenesch F., Gaspin C. and Romby P. (2009) A search for small noncoding RNAs in *Staphylococcus aureus* reveals a conserved sequence motif for regulation. *Nucleic. Acids. Res.* **37**: 7239-7259.
- Gelderman G.** and Contreras L.M. (2013) Discovery of Posttranscriptional Regulatory RNAs Using Next Generation Sequencing Technologies. *Methods. Mol. Biol.* **985**: 269-285.
- Georg J.** and Hess W.R. (2011) *Cis*-antisens RNA, Another level of gene regulation in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **75**: 286-300.
- Geraci J.**, Neubauer S., Pöllath C., Hansen U., Rizzo F., Krafft C., Westermann M., Hussain M., Peters G., Pletz M.W., Löffler B., Makarewicz O. and Tuchscher L. (2017) The *Staphylococcus aureus* extracellular matrix protein (Emp) has a fibrous structure and binds to different extracellular matrices. *Sci. Rep.* **8**: 8396.
- Geraci J.E.**, Heilman F.R., Nichols D.R., Ross G.T. and Wellman W.E. (1956) Some laboratory and clinical experiences with a new antibiotic, vancomycin. *Mayo. Clin. Proc.* **31**: 564-582.
- Germain-Amiot N.**, Augagneur Y., Camberlein E., Nicolas I., Lecureur V., Rouillon A. and Felden B. (2018) A novel *Staphylococcus aureus cis-trans* type I toxin-antitoxin module with dual effects on bacteria and host cells. *Nucleic. Acids. Res.* **47**: 17591773.
- Ginhoux F.** and Jung S. (2014) Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* **14**: 392–404.
- Giraud A.T.**, Raspanti C.G., Calzolari A. and Nagel R. (1994) Characterization of a Tn551-mutant of *Staphylococcus aureus* defective in the production of several exoproteins. *Can. J. Microbiol.* **40**: 677-681.
- Glenny A.T.** and Stevens M.F. (1935) *Staphylococcus* toxins and antitoxins. *J. Pathol.* **40**: 201–210.
- Goerke C.**, Wirtz C., Flückiger U. and Wolz C. (2006) Extensive phage dynamics in *Staphylococcus aureus* contributes to adaptation to the human host during infection. *Mol. Microbiol.* **61**: 1673-1685.
- Gordon S.** (2016) Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity.* **44**: 463-475.
- Gordon S.** and Martinez-Pomares L. (2017) Physiological roles of macrophages. *Eur. J. Physiol.* **469**: 365-374.

- Gray M.** and Botelho R.J. (2016) Phagocytosis: Hungry, Hungry Cells. *Methods. Mol. Biol.* **1519**: 1-16.
- Grenha R.**, Levdikov V.M., Fogg M.J., Blagova E.V., Brannigan J.A., Wilkinson A.J. and Wilson K.S. (2005) Structure of purine nucleoside phosphorylase (DeoD) from *Bacillus anthracis*. *Acta. Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* **61**: 459-462.
- Griggs J.C.**, Ukpabi G., Gaudin C.F.M. and Murphy M.E.P. (2010) Structural biology of heme binding in the *Staphylococcus aureus* Isd system. *J. Inorg. Biochem.* **104** : 341-348.
- Grilo I.R.**, Ludovice A.M., Tomasz A., de Lencastre H. and Sobral R.G. (2013) The glucosaminidase domain of Atl – the major *Staphylococcus aureus* autolysin – has DNA-binding activity. *Microbiologyopen.* **3**: 247-256.
- Grohmann E.**, Muth G. and Espinosa M. (2003) Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**: 277-301.
- Grosz M.**, Kolter J., Paprotka K., Winkler A.C., Schafer D., Chatterjee S.S., Geiger T., Wolz C., Ohlsen K., Otto M., Rudel T., Sinha B. and Fraunholz M. (2014) Cytoplasmic replication of *Staphylococcus aureus* upon phagosomal escape triggered by phenol soluble modulins. *Cell. Microbiol.* **16**: 451-465.
- Grumann D.**, Nübel U. and Bröker B.M. (2014) *Staphylococcus aureus* toxins-Their functions and genetics. *Infect. Genet. Evol.* **21**: 583-592.
- Grundmeier M.**, Hussain M., Becker P., Heilmann C., Peters G. and Sinha B. (2004) Truncation of Fibronectin-Binding Proteins in *Staphylococcus aureus* Strain Newman Leads to Deficient Adherence and Host Cell Invasion Due to Loss of the Cell Wall Anchor Function. *Infect. Immun.* **72**: 7155-7163.
- Gu H.**, Zhao C., Zhang T., Liang H., Wang X.-M., Pan Y., Chen X., Zhao Q., Li D., Liu F., Zhang C.-Y. and Zen K. (2017) Salmonella produce microRNA-like RNA fragment Sal-1 in the infected cells to facilitate intracellular survival. *Sci. Rep.* **7**: 2392.
- Guerra F.E.**, Borgogna T.R., Patel D.M., Sward E.W. and Voyich J.M. (2017) Epic Immune Battles of History: Neutrophils vs. *Staphylococcus aureus*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**: 286.
- Gupta R.K.**, Luong T.T. and Lee C.Y. (2015). RNAlII of the *Staphylococcus aureus* agr system activates global regulator MgrA by stabilizing mRNA. *PNAS.* **112**:14036-14041.

- Haag A.F.** and Bagnoli F. (2015) The Role of Two-Component Signal Transduction Systems in *Staphylococcus aureus* Virulence Regulation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **409**: 145-198.
- Hacker J.**, Bender L., Ott M., Wingender J., Lund B., Marre R., and Goebel W. (1990) Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occurs *in vitro* and *in vivo* in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. *Microb. Pathog.* **8**: 213-225.
- Haggar A.**, Hussain M. Lönnes H., Herrmann M. Norrby-Teglund A. and Flock J.I. (2003) Extracellular Adherence Protein from *Staphylococcus aureus* Enhances Internalization into Eukaryotic Cells. *Infect. Immun.* **71**: 2310-2317.
- Hamza T.** and Li B. (2014) Differential responses of osteoblasts and macrophages upon *Staphylococcus aureus* infection. *BMC Microbiol.* **14** : 207.
- Hart M.E.**, Tsang L.H., Deck J., Daily S.T., Jones R.C., Liu H., Hart M.J. and Smeltzer M.S. (2013) Hyaluronidase expression and biofilm involvement in *Staphylococcus aureus* UAMS-1 and its *sarA*, *agr* and *sarA agr* regulatory mutants. *Microbiology.* **159**: 782-791.
- Hasan R.**, Rink L. and Haase H. (2013) Zinc signals in neutrophil granulocytes are required for the formation of neutrophil extracellular traps. *Innate Immun.* **19**: 253-264.
- Hautefort I.**, Thompson A., Eriksson-Ygberg S., Parker M.L., Lucchini S., Danino V., Bongaerts R.J.M., Ahmad N., Rhen M. and Hinton J.C.D. (2008) During infection of epithelial cells *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* undergoes a time-dependant transcriptional adaptation that results in simultaneous expression of three type 3 secretion systems. *Cell. Microbiol.* **10**: 958-984.
- Heptinstall J.** (1998) Isolation of total RNA from bacteria. *Methods. Mol. Biol.* **86**: 47-53.
- Herman-Bausier P.**, Valotteau C., Pietrocola G., Rindi S., Alsteens D., Foster T.J., Speziale P. and Dufrêne Y.F. (2016) Mechanical Strength and Inhibition of the *Staphylococcus aureus* Collagen-Binding Protein Can. *mBio.* **7**: e01529-16.
- Hindley J.** (1967) Fractionation of <sup>32</sup>P-labeled ribonucleic acids on polyacrylamide gels and their characterization by fingerprinting. *J. Mol. Biol.* **30**: 125-136.
- Hiramatsu K.**, Hanaki H., Ino T., Yabuta K., Oguri T. and Tenover F. (1997) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.* **40**: 135-136.
- Hirschhausen N.**, Schlesier T., Schmidt M.A., Gotz F., Peters G. and Heilmann C. (2010) A novel staphylococcal internalization mechanism involves the major autolysin Atl and heat shock cognate protein Hsc70 as host cell receptor. *Cell. Microbiol.* **12**: 1746-1764.

**Hoffmann C.**, Ohlsen K. and Hauck C.R. (2011). Integrin-mediated uptake of fibronectin-binding bacteria. *Eur. J. Cell. Biol.* **90**: 891-896.

**Horn J.**, Stelzner K., Rudel T. and Fraunholz M. (2018) Inside job: *Staphylococcus aureus* host-pathogen interactions. *Int. J. Med. Microbiol.* **308**: 607-624.

**Houston P.**, Rowe S.E., Pozzi C., Waters E.M. and O’Gara J.P. (2011) Essential Role for the Major Autolysin in the Fibronectin-Binding Protein-Mediated *Staphylococcus aureus* Biofilm Phenotype. *Infect. Immun.* **79**: 1153-1165.

**Howden B.P.**, McEvoy C.R., Allen D.L., Chua K., Gao W., Harrison P.F., Bell J., Coombs G., Bennett-Wood V., Porter J.L., Robins-Browne R., Davies J.K., Seemann T. and Stinear T.P. (2011) Evolution of multidrug resistance during *Staphylococcus aureus* infection involves mutation of the essential two component regulator WalKR. *PLoS Pathog.* **7**: e1002359.

**Humphrys M.S.**, Creasy T., Sun Y., Shetty A.C., Chibucos M.C., Drabek E.F., Fraser C.M., Farooq U., Sengamalay N., Ott S., Shou H., Bavoil P.M., Mahurkar A. and Myers G.S. (2013) Simultaneous transcriptional profiling of bacteria and their host cells. *PLoS One.* **8**: e80597.

**Ikemura T.** and Dahlberg J.E. (1973) Small ribonucleic acids of *Escherichia coli*. I. Characterization by polyacrylamide gel electrophoresis and fingerprint analysis. *J. Biol. Chem.* **248**: 5024-5032.

**Imanishi I.**, Nicolas A., Caetano A.C.B., Castro T.L.P., Tartaglia N.R., Mariutti R., Guédon E., Even S., Berkova N., Arni R.K., Seyffert N., Azevedo V., Nishifuji K. and Le Loir Y. (2019) Exfoliative toxin E, a new *Staphylococcus aureus* virulence factor with host-specific activity. *Sci. Rep.* **9** : 16336. doi: 10.1038/s41598-019-52777-3.

**Ito A.**, Hirai K., Inoue M., Koga H., Suzue S., Irikura T. and Mitsushashi S. (1980) In Vitro Antibacterial Activity of AM-175, a New Nalidixic Acid Analog. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **17**: 103-108.

**Ivain L.**, Bordeau V., Eyraud A., Hallier M., Dreano S., Tattevin P., Felden B. and Chabelskaya S. (2017) An in vivo reporter assay for sRNA-directed gene control in Gram-positive bacteria: identifying a novel sRNA target in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic. Acids. Res.* **45**: 4994-5007.

**J**enul C. and Horswill A.R. (2018) Regulation of *Staphylococcus aureus* virulence. *Microbiol. Spectr.* **6**: doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0031-2018.

**Jevon M.P.** (1961) “Celbenin”-resistant staphylococci. *Br. Med. J.* **1**: 124-125.

**Johnson B.K.** and Abramovitch R.B. (2017) Small molecules that sabotage bacterial virulence. *Trends Pharmacol. Sci.* **38**: 339-362.

**Joly-Guillou M.L.** and Régnier B. (2005) L'infection liée aux soins, stratégie de maîtrise des infections nosocomiales, épidémiologie bactérienne et clinique. *Edition bioMérieux.*

**Jones H.W.** (1911) Report of a series of cases of syphilis treated by Ehrlich's arsenobenzol at the Walter Reed General Hospital, District of Columbia. *Boston Med. Surg. J.* **164**: 381-383.

**Joshi L.R.**, Tiwari A., Devkota S.P., Khatiwada S., Paudyal S. and Pande K.R. (2014) Prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Dairy Farms of Pokhara, Nepal. *Inter. J. Vet. Sci.* **3**: 87-90.

**Josse J.**, Laurent F. and Diot A. (2017) Staphylococcal Adhesion and Host Cell Invasion: Fibronectin-Binding and Other Mechanisms. *Front. Microbiol.* **8**: 2433.

**Juhas M.**, van der Meer J.R., Gaillard M., Harding R.M., Hood D.W. and Crook D.W. (2009) Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**: 376-393.

**K**adariya J., Smith T.C. and Thapaliya D. (2014) *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health. *Biomed. Res. Int.* **827965**.

**Kaiser J.C.**, Omer S., Sheldon J.R., Welch I. and Heinrich D.E. (2015) Role of BrnQ1 and BrnQ2 in Branched-Chain Amino Acid Transport and Virulence in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immunol.* **83**: 1019-1029.

**Kaito C.**, Morishita D., Matsumoto Y., Kurokawa K. and Sekimizu K. (2006). Novel DNA binding protein SarZ contributes to virulence in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **62**: 1601-1617.

**Kaminishi T.**, Wilson D.N., Takemoto C., Harms J.M., Kawazoe M., Schluenzen F., Hanawa-Suetsugu K., Shirouzu M., Fucini P. and Yokoyama S. (2007). A snapshot of the 30S ribosomal subunit capturing mRNA via the Shine-Dalgarno interaction. *Structure* **15**: 289-297.

- Kant R.**, Taponen S., Koort J., Paulin L., Åvall-Jääskeläinen S. and Pavla A. (2015) Genome Sequences of Four *Staphylococcus aureus* Strain Isolated from Bovine Mastitis. *Genome Announc.* **3**: e00334-15.
- Kathirvel M.**, Buchad H. and Nair M. (2016) Enhancement of the pathogenicity of *Staphylococcus aureus* strain Newman by a small noncoding RNA SprX1. *Med. Microbiol. Immunol.* **205**: 563-574.
- Kiedrowski M.R.**, Crosby H.A., Hernandez F.J., Malone C.L., McNarama II and Horswill A.R. (2014) *Staphylococcus aureus* Nuc2 Is a Functional, Surface-Attached Extracellular Nuclease. *PLoS One.* **9**: e95574.
- Kintel T.L.**, Roux C.M., Dunman P.M. and Fang F.C. (2013) The *Staphylococcus aureus* SrrAB Two-Component System Promotes Resistance to Nitrosative Stress and Hypoxia. *MBio.* **4**.
- Koenig R.L.**, Ray J.L., Maleki S.J., Smeltzer M.S. and Hurlburt B.K. (2004). *Staphylococcus aureus* AgrA binding to the RNAlII-*agr* regulatory region. *J. Bacteriol.* **186**: 7549-7555.
- Kong C.**, Neoh H. and Nathan S. (2016) Targeting *Staphylococcus aureus* Toxins: A Potential form of Anti-Virulence Therapy. *Toxins.* **8**: pii : E72.
- Kortebi M.**, Milohanic E., Mitchell G., Péchoux C., Prevost M.C., Cossart P. and Bierne H. (2017). *Listeria monocytogenes* switches from dissemination to persistence by adopting a vacuolar lifestyle in epithelial cells. *PLoS Pathog.* **13**: e1006734.
- Krakaeur T.**, Pradhan K. and Stiles B.G. (2016) Staphylococcal Superantigens Spark Host-Mediated Danger Signals. *Front Immunol* **7**: 23.
- Kreiswirth B.N.**, Löfdahl S., Betley M.J., O'Reilly M., Schlievert P.M., Bergdoll M.S. and Novick R.P. (1983) The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. *Nature.* **305**: 709-712.
- Krol J.**, Loedige I. and Filipowicz W. (2010) The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat. Rev. Genet.* **11**: 597-610.
- Kubica M.**, Guzik K., Koziel J., Zarebski M., Richter W., Gajkowska B., Golda A., Maciag-Gudowska A., Brix K., Shaw L., Foster T. and Potempa J. (2008) A potential new pathway for staphylococcus aureus dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. *PLoS One.* **3**: e1409.
- Kuroda M.**, Hayashi H. et Ohta T. (1999) Chromosome-Determined Zinc-Responsible Operon *czt* in *Staphylococcus aureus* Strain 912. *Microbiol. Immunol.* **43**: 115-125.

**Kuroda M.**, Ohta T., Uchiyama I., Baba T., Yuzawa H., Kobayashi I., Cui L., Oguchi A., Aoki K., Nagai Y., Lian J., Ito T., Kanamori M., Matsumaru H., Maruyama A., Murakami H., Hosoyama A., Mizutani-Ui Y., Takahashi N.K., Sawano T., Inoue R., Kaito C., Sekimizu K., Hirakawa H., Kuhara S., Goto S., Yabusaki J., Kanehisa M., Yamashita A., Oshima K., Furuya K., Yoshina C., Shiba T., Hattori M., Ogasawara N., Hayashi H. and Hiramatsu K. (2001) Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. **357**: 1225-1240.

**Kutateladze M.** and Adamia R. (2008) Phage therapy experience at the Eliava Institute. *Med. Mal. Infect.* **38**: 426-430.

**Lacey K.A.**, Geoghegan J.A. and McLoughlin R.M. (2016) The Role of *Staphylococcus aureus* Virulence Factors in Skin Infection and Their Potential as Vaccine Antigens. *Pathogens*. **5**: pii: E22. doi: 10.3390/pathogens5010022.

**Lalaouna D.** and Massé E. (2015) Identification of sRNA interacting with a transcript of interest using MS2-affinity purification coupled with RNA sequencing (MAPS) technology. *Genomics. Data*. **5**: 136-138.

**Lalaouna D.**, Carrier M.-C., Semsey S., Brouard J.-S., Wang J., Wade J.T., Massé E. (2015b) A 30 external transcribed spacer in a tRNA transcript acts as a sponge for small RNAs to prevent transcriptional noise. *Mol. Cell*. **58**: 393-405.

**Lalaouna D.**, Morissette A., Carrier M.-C., Massé E. (2015c) DsrA regulatory RNA represses both *hns* and *rbsD* mRNAs through distinct mechanisms in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **98** :357-369.

**Lalaouna D.**, Eyraud A., Devinck A., Prévost K. and Massé E. (2018) GcvB small RNA uses two distinct seed regions to regulate an extensive targetome. *Mol. Microbiol.* **111**: 473-486.

**Lalaouna D.**, Desfranges E., Caldelari I. and Marzi S. (2018b) MS2-Affinity Purification Coupled With RNA Sequencing Approach in the Human Pathogen *Staphylococcus aureus*. *Methods. Enzymol.* **612**: 393-411.

**Lalaouna D.**, Baude J., Wu Z., Tomasini A., Chicher J., Marzi S., Vandenesch F., Romby P., Caldelari I. and Moreau K. (2019) RsaC sRNA modulates the oxidative stress response of *Staphylococcus aureus* during manganese starvation. *Nucleic. Acids. Res.* **47**: 9871-9887.

**Lam G.Y.**, Huang, J. and Brumell J.H. (2010) The many roles of NOX2 NADPH oxidase-derived ROS in immunity. *Semin. Immunopathol.* **32**: 415-430.

- Lasa I.**, Toledo-Arana A., Dobin A., Villanueva M., de los Mozos I.R., Vergara-Irigaray M., Segura V., Fagegaltier D., Penades J.R., Valle J., Solano C. and Gingeras T.R. (2011) Genome-wide antisense transcription drives mRNA processing in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.* **108**: 20172-20177.
- Le K.Y.** and Otto M. (2015). Quorum-sensing regulation in staphylococci-an overview. *Front. Microbiol.* **6**:1174.
- Le Loir Y.** and Gautier M. (2010) *Staphylococcus aureus*. *Monographie de Microbiologie*, Edition Tec&Doc.
- Le Pabic H.**, Germain-Amiot N., Bordeau V. and Felden B. (2015) A bacterial regulatory RNA attenuates virulence, spread and human host cell phagocytosis. *Nucleic. Acids. Res.* **43**: 9232-9248.
- Leick M.**, Azcutia V., Newton G. and Luscinskas F.W. (2014) Leukocyte recruitment in inflammation: basic concepts and new mechanistic insights based on new models and microscopic imaging technologies. *Cell. Tissue. Res.* **355**: 647–656.
- Lelifeld P.H.C.**, Wessels C.M., Leenen L.P.H., Koenderman L. and Pillay J. (2016) The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation. *Crit. Care.* **20**: 73
- Levine D.P.** (2006) Vancomycin: a history. *Clin. Infect. Dis.* **1**: S5-S12.
- Levy S.B.** and Marshall B. (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.* **10**: S122-129.
- Lewkowicz E.**, Herit F., Clainche C. L., Bourdoncle P., Perez F. and Niedergang F. (2008) The microtubule-binding protein CLIP-170 coordinates mDia1 and actin reorganization during CR3-mediated phagocytosis. *J. Cell. Biol.* **183**: 1287-1298.
- Li H.**, Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G., Durbin R. and 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* **25**: 2078-2079.
- Li T.**, Lu H., Wang X., Gao Q., Dai Y., Shang J. and Li M. (2017) Molecular Characteristic of *Staphylococcus aureus* Causing Bovine Mastitis between 2014 and 2015. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **17**: 127.
- Li Z.**, Peres A.G., Damian A.C. and Madrenas J. (2015) Immunomodulation and Disease Tolerance to *Staphylococcus aureus*. *Pathogens*, **4**: 793-815.

- Liang X.**, Zheng L., Landwehr C., Lunsford D., Holmes D. and Ji Y. (2005). Global regulation of gene expression by ArlRS, a two-component signal transduction regulatory system of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **187**: 5486-5492.
- Liesenborghs L.**, Verhamme P. and Vanassche T. (2018) *Staphylococcus aureus*, master manipulator of the human hemostatic system. *J. thromb. Heamost.* **16**: 441-454.
- Liew P.X.** and Kubes P. (2019) The Neutrophil's Role During Health and Disease. *Physiol. Rev.* **99**: 1223-1248.
- Ligon B.L.** (2004) Penicillin : Its Discovery and Early Development. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* **15**: 52-57.
- Lim J.J.**, Grinstein S. and Roth Z. (2017) Diversity and Versatility of Phagocytosis: Roles in Innate Immunity, Tissue Remodeling, and Homeostasis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**: 191.
- Lina G.**, Bohach G.A., Nair S.P., Hiramatsu K., Jouvin-Marche E. and Mariuzza R. (2004) International Nomenclature Committee for Staphylococcal Superantigens. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. *J. Infect. Dis.* **189**: 2334–2336.
- Lindsay J.A.** and Holden M.T.G. (2004) *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome. *Trends Microbiol.* **12**: 378-385
- Lindsay J.A.** (2014) *Staphylococcus aureus* genomics and the impact of horizontal gene transfer. *Int. J. Med. Microbiol.* **304**: 103-109.
- Liu G.Y.** and Nizet V. (2009) Color me bad: microbial pigments as virulence factors. *Trends Microbiol.* **17**: 406-413.
- Liu Q.**, Yeo W.-S. and Bae T. (2016) The SaeRS Two-Component System of *Staphylococcus aureus*. *Genes.* **7**: 81.
- Liu Y.**, Mu C., Ying X., Li W., Wu N., Dong J., Gao Y., Shao N., Fan M. and Yang G. (2011) RNAIII activates map expression by forming an RNA-RNA complex in *Staphylococcus aureus*. *FEBS. Lett.* **585**: 899-905.
- Loeb L.** (1903) The influence of certain Bacteria on the Coagulation of the blood. *J. Med. Res.* **10**: 407-419.
- Lu T.**, Park J.Y., Parnell K., Fox L.K. and McGuire M.A. (2012) Characterization of fatty acid modifying enzyme activity in staphylococcal mastitis isolates and other bacteria. *BMC. Res. Notes.* **5** :323.

**Luo W.**, Liu Y., Zhu X., Zhao W., Huang L., Cai J., Xu Z. and Cen P. (2011) Cloning and characterization of purine nucleoside phosphorylase in *Escherichia coli* and subsequent ribavirin biosynthesis using immobilized recombinant cells. *Microb. Technol.* **48**: 438-444.

**Luong T.T.**, Newell S.W. and Lee C.Y. (2003) Mgr, a novel global regulator in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **185**:3703-3710.

**Luong T.T.**, Dunman P.M., Murphy E., Projan S.J. and Lee C.Y. (2006) Transcription Profiling of the mgrA Regulon in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **188**:1899-1910.

**Lyell A.** (1967) A review of toxic epidermal necrolysis in Britain. *Br. J. Dermatol.* **79**: 662-671.

**Madani A.**, Garakani K. and Mofrad M.R.K. (2017) Molecular mechanics of *Staphylococcus aureus* adhesion, CAN, and the inhibition of bacterial adhesion by stretching collagen. *PLoS One.* **12**: e0179601.

**Malachowa N.** and DeLeo F.R. (2010) Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**: 3057-3071.

**Mann M.**, Wright P.R. and Baclofen R. (2017) IntaRNA 2.0: enhanced and customizable prediction of RNA-RNA interactions. *Nucleic. Acids. Res.* **45**: W435-W439.

**Manna A.C.** and Cheung A.L. (2003). sarU, a sarA homolog, is repressed by SarT and regulates virulence genes in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immu.* **7**: 343-353.

**Manna A.C.**, Ingavale S.S., Maloney M., van Wamel W. and Cheung A.L. (2004) Identification of sarV (SA2062), a new transcriptional regulator, is repressed by SarA and MgrA (SA0641) and involved in the regulation of autolysis in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **186**: 5267-5280.

**Manna A.C.** and Cheung A.L. (2006a). Transcriptional regulation of the agr locus and the identification of DNA binding residues of the global regulatory protein SarR in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **60**: 1289-1301.

**Manna A.C.** and Cheung A.L. (2006b) Expression of SarX, a negative regulator of agr and exoprotein synthesis, is activated by MgrA in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **188**: 4288-4299.

**Maple P.**, Hamilton-Miller J. and Brumfitt W. (1989) Ciprofloxacin resistance in methicillin- and gentamycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **8**: 622-624.

**Marchais A.**, Naville M., Bohn C., Bouloc P. and Gautheret D. (2009) Single-pass classification of all noncoding sequences in a bacterial genome using phylogenetic profiles. *Genome. Res.* **19**: 1084-1092.

- Marie-Anaïs F.**, Mazzolini J., Bourdoncle P. and Niedergang F. (2016) "Phagosome closure assay" to visualize phagosome formation in three dimensions using total internal reflection fluorescent microscopy (TIRFM). *J. Vis. Exp.* **114**: e54470.
- Martínez O.F.**, Cardoso M.H., Ribeiro S.M. and Franco O.L. (2019) Recent Advances in Anti-virulence Therapeutic Strategies with a Focus on Dismantling Bacterial Membrane Microdomains, Toxin Neutralization, Quorum-Sensing Interference and Biofilm Inhibition. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **9**: 74.
- Mauro T.**, Rouillon A. and Felden B. (2016) Insights into the regulation of small RNA expression: SarA represses the expression of two sRNAs in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic. Acids. Res.* **44**: 10186-10200.
- McAdow M.**, DeDent A.C., Emolo C., Cheng A.G., Kreiswirth B.N., Missiakas D.M. and Schneewind O. (2012) Coagulase as Determinants of Protective Immune responses against *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **80**: 3389-3398.
- McCarthy A.J.**, Witney A.A. and Lindsay J.A. (2012) *Staphylococcus aureus* temperate bacteriophage: carriage and horizontal transfer is lineage associated. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2**: 6.
- McClintock B.** (1950) The origin and behavior of mutable loci in maize. *Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **36**: 344-355.
- McGuinness W.A.**, Kobayashi S.D. and DeLeo F.R. (2016) Evasion of Neutrophil Killing by *Staphylococcus aureus*. *Pathogens.* **5**: 32.
- Mehlin C.**, Headley C.M., Klebanoff S.J. (1999) An inflammatory polypeptide complex from *Staphylococcus epidermidis*: Isolation and characterization. *J. Exp. Med.* **189**: 907-918.
- Mizuno T.**, Chou M.Y. and Inouye M. (1984) A unique mechanisms regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81** : 1966-1970.
- Mockenhaupt M.**, Idzko M., Grosber M., Schopf E. and Norgauer J. (2005) Epidemiology of staphylococcal scalded skin syndrome in Germany. *J. Invest. Dermatol.* **124**: 700-703.
- Moller T.**, Franch T., Hojrup P., Keene D.R., Bachinger H.P., Brennan R.G. and Valentin-Hansen P. (2002) Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction. *Mol. Cell.* **9**: 23-30.

**Morikawa K.**, Inose Y., Okamura H., Maruyama A., Hayashi H., Takeyasu K. and Ohta T. (2003) A new staphylococcal sigma factor in the conserved gene cassette: functional significance and implication for the evolutionary processes. *Genes Cells*. **8**: 699-712.

**Morikawa K.**, Takemura A.J., Inose Y., Tsai M., Nguyen Thi le T., Ohta T. and Msadek T. (2012) Expression of a cryptic secondary sigma factor gene unveils natural competence for DNA transformation in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog*. **8**: e1003003.

**Mortensen J.E.**, Shryock T.R. and Kapral F.A. (1992) Modification of bactericidal fatty acids by an enzyme of *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol*. **36**: 293–298.

**Moussouni M.**, Nogaret P., Garai P., Ize B., Vivès E. and Blanc-Potard A.-B. (2019) Activity of a Synthetic Peptide Targeting MgtC on *Pseudomonas aeruginosa* Intramacrophage Survival and Biofilm Formation. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. **9**: 84.

**Mulani M.S.**, Kamble E.E., Kumbar S.N., Tawre M.S. and Pardesi K.R. (2019) Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Front. Microbiol*. **10**: 539.

**Mulligan M.E.**, Ruane P.J., Johnston L., Wong P., Wheelock J.P., MacDonald K., Reinhardt J.F., Johnson C.C., Statner B. and Blomquist I. (1987) Ciprofloxacin for eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization. *Am. J. Med*. **82**: 215–219.

**Muylaert A.** and Mainil J.G. (2012) Résistances bactériennes aux antibiotiques: les mécanismes et leur “contagiosité”. *Ann. Méd. Vét*. **156**: 109-123.

**Nassera A.**, Moradi M., Jazireian P., Safari H., Alizadeh-Sanif M., Pourmand M.R. and Azimi T. (2019) *Staphylococcus aureus* versus neutrophil: Scrutiny of ancient combat. *Microb. Pathog*. **131**: 259-269.

**Newson S.W.B.** (2009) Ogston’s coccus. *J. Hosp. Infect*. **70**: 369-372

**Nguyen M.T.**, Luqman A., Bitschar K., Hertlein T., Dick J., Ohlsen K., Bröker B., Schitteck B. and Götz F. (2018) Staphylococcal (phospho)lipases promote biofilm formation and host cell invasion. *Int. J., Med. Microbiol*. **308**: 653-663.

**Nicolas I.**, Bordeau V., Bondon A., Baudy-Floch M. and Felden B. (2019) Novel antibiotics effective against gram-positive and –negative multi-resistant bacteria with limited resistance. *PLoS Biol*. **17**: e3000337.

**Niderweis M.**, Wolschendorf F., Mitra A. and Neyrolles O. (2015) Mycobacteria, Metals, and the Macrophage. *Immunol. Rev.* **264**: 249-263.

**Nikaido H.** (2009) Multidrug Resistances in Bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **78**: 119-146.

**Novick R.P.**, Iordanescu S., Projan S.J., Kornblum J. and Edelman I. (1989) pT181 plasmid replication is regulated by a countertranscript-driven transcriptional attenuator. *Cell.* **59**: 395-404.

**Novick R.P.**, Ross H.F., Projan S.J., Kornblum J., Kreiswirth B. and Morghazeh S. (1993) Synthesis of staphylococcal virulence factor is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO. J.* **12**: 3967-3975.

**Nudler E.** and Mironov A.S. (2004) The riboswitch control of bacterial metabolism. *Trends. Biochem. Sci.* **29**: 11-17.

**O'Brien L.**, Kerrigan S.W., Kaw G., Hogan M., Penadés J., Litt D., Fitzgerald D.J., Foster T.J. and Cox D. (2002) Multiple mechanisms for the activation of human platelet aggregation by *Staphylococcus aureus*: roles for the clumping factors ClfA and ClfB, the serine-aspartate repeat protein SdrE and protein A. *Mol. Microbiol.* **44**: 1033-1044.

**O'Neil J.** (2016) Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report And Recommendations. *The review on antimicrobial resistance.*

**O'Riordan K.** and Lee J.C. (2004) *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**:218-234.

**Ogle M.E.**, Degar C.E., Sridhar S. and Botchwey E. (2016) Monocytes and macrophages in tissue repair: Implications for immunoregenerative biomaterial design. *Exp. Biol. Med.* **241**: 1084-1097.

**Ogston A.** (1882) Micrococcus poisoning. *J. Anat. Physiol.* **16**: 526–567.

**Oliveira D.**, Borges A. and Simões M. (2018) *Staphylococcus aureus* Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases. *Toxins.* **10**: pii : E252.

**OMS** “Standardisation de la Méthodologie des Tests de Sensibilité Bactérienne” *Organisation Mondiale de la Santé*, Genève, 1961.

**Ong C.-I.Y.**, Berking O., Walker M.J. and McEwan A.G. (2018) New Insights Inoto the role of zinc acquisition and zinc tolerance in group A streptococcal Infection. *Infect. Immun.* **86**: e00048-18.

**Oscarsson J.**, Kanth A., Tegmark-Wisell K. and Arvidson S. (2006) SarA is a repressor of hla (alpha-hemolysin) transcription in *Staphylococcus aureus*: its apparent role as an activator of hla in the prototype strain NCTC 8325 depends on reduced expression of sarS. *J. Bacteriol.* **188**: 8526-8533.

**Otto M.** (2014a) *Staphylococcus aureus* toxins. *Curr. Opin. Microbiol.* **17**: 32-37.

**Otto M.** (2014b) Phenol-soluble modulins. *Int. J. Med. Microbiol.* **304**: 164-169.

**Paharik A.E.** and Horswill A.R. (2016) The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, regulation, and host response. *Microbiol. Spectr.* **4**: doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0022-2015.

**Palankar R.**, Binsker U., Haracska B., Wesche J., Greinacher A. and Hammerschmidt S. (2018) Interaction between the *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein Eap and its subdomains with platelets. *Int. J. Med. Microbiol.* **308**: 683-691.

**Partridge R.S.**, Kwong S.M. Firth N. and Jensen S.O. (2018) Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **31**: pii: e00088-17.

**Pasteur L.** et Joubert J. (1877) Charbon et septicémie. *Bull. Ac. Sc.* **3**: 101-115, 781- 797 et 921-926.

**Patti J.M.**, Allen B.L., McGavin M.J. and Hook M. (1994) MSCRMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**: 585-617.

**Penadés J.R.**, Chen J., Quiles-Puchalt N., Carpena N., and Novick R.P. (2015) Bacteriophage-mediated spread of bacterial virulence genes. *Curr. Opin. Microbiol.* **23**: 171-178.

**Peschel A.** and Otto M. (2013) Phenol-soluble modulines and staphylococcal infection. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**: 667-673.

**Pichon C.** and Felden B. (2005) Small RNA genes expressed from *Staphylococcus aureus* genomic and pathogenicity islands with specific expression among pathogenic strains. *PNAS.* **102**: 14249-14254.

**Pichon C.** and Felden B. (2007) Proteins that interact with bacterial small RNA regulators. *FEMS. Microbiol. Rev.* **31**: 614-625.

**Piercy E.A.**, Barbaro D., Luby J.P. and Mackowiak P.A. (1989) Ciprofloxacin for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**: 128-130.

**Pietrocola G.**, Nobile G., Rindi S. and Speziale P. (2017) *Staphylococcus aureus* Manipulates Innate Immunity through Own and Host-Expressed Proteases. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**: 166.

**Pinel-Marie M.L.**, Brielle R. and Felden B. (2014) Dual toxic-peptide-coding *Staphylococcus aureus* RNA under antisense regulation targets host cells and bacterial rivals unequally. *Cell. Rep.* **7**: 424-435.

**Porayath C.**, Suresh M.K., Biswas R., Nair B.G., Mishra N. and Pal S. (2018) Autolysin mediated adherence of *Staphylococcus aureus* with Fibronectin, Gelatin and Heparin. *Int. J. Biol. Macromol.* **110**: 179-184.

**Posner M.G.**, Upadhyay A., Abubaker A.A., Fortunato T.M., Vara D., Canobbio I., Bagby S. and Pula G. (2016) Extracellular Fibrinogen-binding Protein (Efb) from *Staphylococcus aureus* Inhibits the Formation of Platelet-Leukocyte Complexes. *J. Biol. Chem.* **291**: 2764-2776.

**Radzun H.-J.** (2015). Historie und Perspektive des Monozyten-/Makrophagensystems. *Pathologe.* **36**: 432-442.

**Raina M.**, King A., Bianco C. and Vanderpool C.K. (2018) Dual-function RNAs. *Microbiol. Spectr.* **6**: doi:10.1128/microbiolspec.RWR-0032-2018.

**Rammelkamp C.H.** and Maxon T. (1942) Resistance of *Staphylococcus aureus* to the Action of Penicillin. *Proc. Royal Soc. Exper. Biol. Med.* **51**: 386-389.

**Raynaud S.**, Le Pabic H. and Felden B. (2018) Selective recovery of RNAs from bacterial pathogens after their internalization by human host cells. *Methods.* **143**: 4-11.

**Recsei P.**, Kreiswirth B., O'Reilly M., Schlievert P., Gruss A. and Novick R.P. (1986) Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by agar. *Mol. Gen. Genet.* **202**: 58-61.

**Riffaud C.**, Pinel-Marie M.L., Pascreau G. and Felden B. (2018) Functionality and cross-regulation of the four SprG/SprF type I toxin-antitoxin systems in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic. Acids. Res.* **47**: 1740-1758.

**Rio D.C.**, Ares M. Jr, Hannon J.G. and Nilsen T.W. (2010) Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harb. Protoc.* **10**: doi: 10.1101/pdb.prot5439.

**Ritter von Rittershain B.G.** (1878) Die Exfoliative Dermatitis Jungener Senglinge. *Z. Kinderheilkd.* **2**: 3-23.

**Rocha-de-Souza C.M.**, Berent-Maoz B., Mankuta D., Moses A.E. and Levi-Schaffer F. (2008) Human Mast Cell Activation by *Staphylococcus aureus*: Interleukin-8 and Tumor Necrosis Factor Alpha Release and the Role of Toll-Like Receptor 2 and CD48 Molecules. *Infect. Immun.* **76**: 4489-4497.

**Rochat T.**, Bohn C., Morvan C., Le Lam T.N., Razvi F., Pain A., Toffano-Nioche C., Ponien P., Jacq A., Jacquet E., Fey P.D., Gauthered D. and Bouloc P. (2018) The conserved regulatory RsaE down-regulates the arginine degradation pathway in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic. Acids. Res.* **46** : 8803-8816.

**Romilly C.**, Caldelari I., Parmentier D., Lioliou E., Romby P. and Fechter P. (2012) Current knowledge on regulatory RNAs and their machineries in *Staphylococcus aureus*. *RNA. Biol.* **9**: 402-413.

**Romilly C.**, Lays C., Tomasini A., Caldelari I., Benito Y., Hammann P., Geissmann T., Boisset S., Romby P. and Vandenesch F. (2014) A non-coding RNA promotes bacterial persistence and decreases virulence by regulating a regulator in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog.* **10**: e1003979.

**Rosales C.** and Uribe-Querol E. (2017) Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. *Biomed. Res. Int.* **2017**:9042851. doi: 10.1155/2017/9042851

**Rosas Olvera M.**, Vivès E., Molle V., Blanc-Potard A.-B. and Gannoun-Zaki L. (2017) Endogenous and Exogenous KdpF Peptide Increases Susceptibility of *Mycobacterium bovis* BCG to Nitrosative Stress and Reduces Intramacrophage Replication. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**: 115.

**Rosas Olvera M.**, Garai P., Mongin G., Vivès E., Gannoun-Zaki L. and Blanc-Potard A.-B. (2019) Synthetic hydrophobic peptides derived from MgtR weaken Salmonella pathogenicity and work with a different mode of action than endogenously produced peptides. *Sci. Rep.* **9**: 15253.

**Ruegg P.L.** (2017) A 100-Year Review : Mastitis detection, management, and prevention. *J. Dairy Sci.* **100**: 10381-10397.

**Said N.**, Rieder R., Hurwitz R., Deckert J., Urlaub H. and Vogel J. (2009). *In vivo* expression and purification of aptamer-tagged small RNA regulators. *Nucleic. Acids. Res.* **37**: e133

**Said-Salim B.**, Dunman P.M., McAleese F.M., Macapagal D., Murphy E., McNamara P.J., Arvidson S., Foster T.J., Projan S.J. and Kreiswirth B.N. (2003) Global regulation of *Staphylococcus aureus* genes by Rot. *J. Bacteriol.* **185**: 610-619.

**Sambrook J.** and Russell D.W. (2006) Purification of Nucleic Acids by extraction with Phenol:Chloroform. *Cold Spring Harb. Protoc.* doi: 10.1101/pdb.prot4455.

**Sassi M.**, Augagneur Y., Mauro T., Ivain L., Chabelskaya S., Hallier M., Sallou O. and Felden B. (2015) SRD : a *Staphylococcus* regulatory RNA database *RNA.* **21**: 1005-1017.

- Savina A.** and Amigorena S. (2007) Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol. Rev.* **219**: 143-156.
- Sayed N.**, Nonin-Lecomte S., Réty S. and Felden B. (2012a) Functional and Structural Insights of a *Staphylococcus aureus* Apoptotic-like Membrane Peptide from a Toxine-Antitoxin Module. *J. Biol. Chem.* **287**: 43454-43463.
- Sayed N.**, Jousselin A. and Felden B. (2012b) A cis-antisens RNA acts in *trans* in *Staphylococcus aureus* to control translation of a humain cytotoxic peptide. *Nat. Strut. Mol. Biol.* **19**: 105-112.
- Schito G.C.** (2006) The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**: 3-8.
- Schmidt H.** and Hensel M. (2004) Pathogenicity Islands in Bacterial Pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**: 14-56.
- Schmidt K.A.**, Manna A.C., Gill S. and Cheung A.L. (2001). SarT, a repressor of alphahemolysin in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **69**: 4749-4758.
- Schoenfelder S.M.K.**, Lange C., Prakash S.A., Marincola G., Lerch M.F., Wencker F.D.R., Förstner K.U., Sharma C.M. and Ziebuhr W. (2019) The small non-coding RNA RsaE influences extracellular matrix composition in *Staphylococcus epidermidis* biofilm communities. *PLoS Pathog.* **15**: e1007618.
- Schulthess B.**, Meier S., Homerova D., Goerke C., Wolz C., Kormanec J., Berger-Bachi B. and Bischoff M. (2009) Functionnal Characterization of the B-Dependant *yabJ-spoVG* Operon in *Staphylococcus aureus*: Role in Methicillin and Glycopeptides Resistance. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **53**: 1832-1839.
- Seegers H.**, Fourichon C. and Beaudeau F. (2003) Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet. Res.* **34**: 475-491.
- Seilie E.S.** and Wardenburg J.B. (2017) *Staphylococcus aureus* pore-forming toxins: the interface of pathogen and host complexity. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **72**: 101-116.
- Sesto N.**, Wurtzel O., Archambaud C., Sorek R. and Cossart P. (2013) The excludon: a new concept in bacterial antisense RNA-mediated gene regulation. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**: 75-82.
- Shabalina S.A.**, Koonin E.V. (2008) Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends. Ecol. Evol.* **23**: 578-587.

- Sharma-Kuinkel B.K.**, Mann E.E., Ahn J.S., Kuechenmeister L.J., Dunman P.M. and Bayles K.W. (2009) The *Staphylococcus aureus* LytSR two-component regulatory system affects biofilm formation. *J. Bacteriol.* **191**: 4767-4775.
- Shaw L.N.**, Lindholm C., Prajsnar T.K., Miller H.K., Brown, M.C., Golonka E., Stewart G.C., Tarkowski A. and Potempa J. (2008) Identification and characterization of sigma, a novel component of the *Staphylococcus aureus* stress and virulence responses. *PLoS One.* **3**: e3844.
- Shcherbakova K.**, Nakayama H. and Shimamoto N. (2015) Role of 100S ribosomes in bacterial decay period. *Genes Cells.* **20**: 789-801.
- Shompole S.**, Henon K.T., Liou L.E., Dziewanowska K., Bohach G.A. and Bayles K.W. (2003) Biphasic intracellular expression of *Staphylococcus aureus* virulence factors and evidence for Agr-mediated diffusion sensing. *Mol. Microbiol.* **49**: 919-927.
- Shore A.C.** and Coleman D.C. (2013) Staphylococcal cassette chromosome *mec*: Recent advances and new insights. *Int. J. Med. Microbiol.* **303**: 350-359.
- Singh V.** and Phukan U.J. (2019) Interaction of host and *Staphylococcus aureus* protease-system regulates virulence and pathogenicity. *Med. Microbiol. Immunol.* **208**: 585-607.
- Smalla K.**, Jechalke S. and Top E.M. (2015) Plasmid detection, characterization and ecology. *Microbiol. Spectr.* **3**: doi:10.1128/microbiolspec.PLAS-0038-2014.
- Smith K.P.**, Kumar S. and Varela M.F. (2009) Identification, Cloning, and Functional Characterization of EmrD-3, a Putative Multidrug Efflux Pump of the Major Facilitator Superfamily from *Vibrio cholerae* O395. *Arch. Microbiol.* **191**: 903-911.
- Smith N.H.**, Crichton P.B., Old D.C. and Higgins C.F. (1988) Ribosomal-RNA patterns of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and related Enterobacteriaceae. *J. Med. Microbiol.* **25**: 223-228.
- Soares S.C.**, Geyik H., Ramos R.T.J., de Sá P.H.C.G., Barbosa E.G.V., Baumbach J., Figueiredo H.C.P., Miyoshi A., Tauch A., Silva A. and Azevedo V. (2016) GIPSy: Genomic island prediction software. *J. Biotechnol.* **232**: 2-11.
- Sollid J.U.E.**, Furberg A.S., Hanssen A.M. and Johannessen M. (2014) *Staphylococcus aureus*: Determinants of human carriage. *Infect. Genet. Evol.* **21**: 531-541.
- Spaan A.N.**, Surewaard B.G.J., Nijland R. and van Strijp J.A.G. (2013) Neutrophils Versus *Staphylococcus aureus*: A Biological Tug of War. *Annu. Rev. Microbiol.* **67**: 629-650.

**Stafford S.L.**, Bokil N.J., Achard M.E.S., Kapetanovic R., Schembri M.A., McEwanAN A.G. and Sweet M.J. (2013) Metal ions in macrophage antimicrobial pathways: emerging roles for zinc and copper. *Biosci. Rep.* **33**: e00049.

**Steinman R.M.** and Cohn Z.A. (1973) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* **137**: 1142-1162.

**Steinman R.M.** and Cohn Z.A. (1974) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J. Exp. Med.* **139**:380-397.

**Stone P.W.** (2009) Economic burden of healthcare-associated infections: an American perspective. *Expert Rev. Pharmacoecon Outcomes Res.* **9**: 417-422.

**Stougaard P.**, Molin S. and Nordström K. (1981) RNAs involved in copy-number control and incompatibility of plasmid R1. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.* **78** : 6008-6012.

**Sukhodolets M.V.** and Garges S. (2003) Interaction of *Escherichia coli* RNA polymerase with the ribosomal protein S1 and the Sm-like ATPase Hfq. *Biochemistry.* **42**: 8022-8034.

**Svensson S.L.** and Sharma C.M. (2016) Small RNAs in Bacterial Virulence and Communication. *Microbiol. Spectrum.* **4**: VMBF-0028-2015

**Tam K.** And Torres V.J. (2019) *Staphylococcus aureus* Secreted Toxins and Extracellular Enzymes. *Microbiol. Spectrum.* **7** : GPP3 – 0039-2018.

**Tamber S.** and Cheung A.L. (2009). SarZ promotes the expression of virulence factors and represses biofilm formation by modulating SarA and agr in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **77**: 419-428.

**Tan L.**, Li S.R., Jiang B., Hu X.M. and Li S. (2018) Therapeutic Targeting of the *Staphylococcus aureus* Accessory Gene Regulator (*agr*) System. *Front. Microbiol.* **9**: 55.

**Tang J.**, Zhou R., Shi X., Kang M., Wang H. and Chen H. (2008) Two thermostable nucleases coexisted in *Staphylococcus aureus*: evidence from mutagenesis and in vitro expression. *FEMS. Microbiol. Lett.* **284**: 176–183

**Tao L.**, Wu X. and Sun B. (2010). Alternative sigma factor sigmaH modulates prophage integration and excision in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog.* **6**: e1000888.

**Teng T.-S.**, Ji A.-I., Ji X.-Y. and Li Y.-Z. (2017) Neutrophils and Immunity: From bactericidal Action to Being Conquered. *J. Immunol. Res.* **2017**: 9671604. doi: 10.1155/2017/9671604.

**Thammavongsa V.**, Kim H.K., Missiakas D. and Schneewind O. (2015) Staphylococcal manipulation of host immune responses. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**: 529-543.

**Thomason M.K.** and Storz G. (2010) Bacterial antisense RNAs : How many are there and what are they doing?. *Annu. Rev. Genet.* **44**: 167-188.

**Tomasini A.**, Moreau K., Chicher J., Geissmann T., Vandenesch F., Romby P., Marzi S. and Caldelari I. (2017) The RNA targetome of *Staphylococcus aureus* non-coding RNA RsaA: impact on cell surface properties and defense mechanisms. *Nucleic. Acids. Res.* **45**: 6746-6760.

**Tomizawa J.** and Itoh T. (1981) Plasmid ColE1 incompatibility determined by interaction of RNAI with primer transcript. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.* **78** : 6096-6100.

**Tong S.E.**, Davis J.S., Eichenberger E., Holland T.L. and Fowler V.G. Jr (2015) *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clin. Microbiol. Rev.* **28**: 603-661.

**Totsika M.** (2016) Benefits and Challenges of Antivirulence Antimicrobials at the Dawn of the Post-Antibiotic Era. *Curr. Med. Chem.* **6**: 30-37.

**Touat M.**, Opatowski M., Brun-Buisson C., Cosker K., Guillemot D., Salomon J., Tuppin P., de Lagasnerie G. and Watier L. (2019) A Payer Perspective of the Hospital Inpatient Additional Care Costs of Antimicrobial Resistance in France: A Matched Case–Control Study. *Appl. Health Econ. Health Policy*, **17**: 381–389.

**Truong-Bolduc Q.C.**, Dunman P.M., Strahilevitz J., Projan .J. and Hooper D.C. (2005) MgrA is a multiple regulator of two new efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **187**:2395-2405.

**Truong-Bolduc Q.C.**, Bolduc G.R., Medeiros H., Vyas J.M., Wang Y. and Hooper D.C. (2015) Role of the Tet38 Efflux Pump in *Staphylococcus aureus* Internalization and Survival in Epithelial Cells. *Infect. Immunol.* **83**: 4362-4372.

**Tucker B.J.** and Breaker R.R. (2005) Riboswitchs as a versatile gene control elements. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**: 342-348.

**Ulrich M.**, Bastian M., Cramton S.E., Ziegler K., Pragman A.A., Bragonzi A., Memmi G., Wolz C., Schlievert P.M., Cheung A. and Döring G. (2007) The staphylococcal respiratory response regulator SrrAB induces *ica* gene transcription and polysaccharide intercellular adhesin expression, protecting *Staphylococcus aureus* from neutrophil killing under anaerobic growth conditions. *Mol. Microbiol.* **65**: 1276-1287.

**Uribe-Querol E.** and Rosales C. (2017) Control of Phagocytosis by Microbial Pathogens. *Front. Immunol.* **8**:1368.

**V**alero A., Pérez-Rodríguez F., Carrasco E., Fuentes-Alventosa J.M., García-Gimeno R.M. and Zurera G. (2009) Modelling the growth boundaries of *Staphylococcus aureus*: Effect of temperature, pH and water activity. *Int. J. Food. Microbiol.* **133**: 186-194.

**Van Furth R.**, Cohn Z.A., Hirsch J.G., Humphrey J.H., Spector W.G. and Langevoort H.L. (1972). The mononuclear phagocyte system. A new classification of macrophages, monocytes and their precursor cells. *Bull. WHO.* **46**: 845.

**Vandenesch F.**, Lina G. and Henry T. (2012) *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2**: 12.

**Vestergaard M.**, Frees D. and Ingmer H. (2019) Antibiotic Resistance and the MRSA Problem. *Microbiol. Spectr.* **7**: GPP3-0057-2018.

**Voyich J.M.**, Broughton K.R., Sturdevant D.E. , Whitney A.R., Saïd-Salim B. , Porcella S.F., Daniel Long R., Dorward D.W., Gardner D.J., Kreiswirth B.N., Musser J.M. and DeLeo F.R. (2005) Insights into Mechanisms Used by *Staphylococcus aureus* to Avoid Destruction by Human Neutrophils. *J. Immunol.* **175**: 3907-3919.

**Vuillemin P.** (1889) Antibiose et symbiose. Compte rendu de l'association française pour l'avancement des sciences. **18**: 525-542.

**W**agner E.G., Unoson C. (2012) The toxin-antitoxin system *tisB-istR1*: expression, regulation, and biological role in persister phenotypes. *RNA. Biol.* **9**: 1513-1519.

**Waksman S.A.** and Tishler M. (1942) The Chemical Nature of Actinomycin, an Anti-microbial Substance Produced by *Actinomyces Antibioticus*. *J. Biol. Chem.* **142**: 519-528.

**Waksman S.A.** (1953) "The background of the Discovery of Streptomycin" typed manuscript. *Waksman Papers*. Rutgers University, p.1.

**Walla E.A.**, Johnsona A.L., Peterson D.L. and Christie G.E. (2017) Structural Modeling and Functional Analysis of the Essential Ribosomal Processing Protease Prp from *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **104**: 520-532.

**Wassarman K.M.** and Storz G. (2000) 6S RNA regulates *E. coli* RNA polymerase activity. *Cell*. **101**: 613-623.

**Wassarman K.M.** and Saecker R.M. (2006) Synthesis-Mediated Release of a Small RNA Inhibitor of RNA Polymerase. *Science*. **314**: 1601-1603.

**Waters L.S.** and Storz G. (2009) Regulatory RNAs in Bacteria. *Cell*. **136**: 615-628.

**Waters N.R.**, Samuels D.J., Behera R.K., Livny J., Rhee K.Y., Sadykov M.R. and Brinsmade S.R. (2016) A spectrum of CodY activities drives metabolic reorganization and virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **101**: 495-514.

**Weiss G.** and Schaible U.E. (2015) Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol. Rev.* **264**: 182-203.

**Westermann A.J.** (2018) Regulatory RNAs in Virulence and Host-Microbe Interactions. *Microbiol. Spectr.* **6**: doi:10.1128/microbiolspec.rwr-0002-2017

**Wolz C.**, Goerke C., Landmann R., Zimmerli W. and Fluckiger U. (2002) Transcription of Clumping Factor A in Attached and Unattached *Staphylococcus aureus* *In Vitro* and during Device-Related Infection. *Infect Immun.* **70**: 2758-2762.

**Wright P.R.**, Georg J., Mann M., Sorescu D.A., Richter A.S., Lott S., Kleinkauf R., Hess W.R. and Backofen R. (2014) CopraRNA and IntaRNA: predicting small RNA targets, networks and interaction domains. *Nucleic Acids. Res.* **42**: W119-W123.

**Wu S.**, de Lencastre H. and Tomasz A. (1996) Sigma-B, a putative operon encoding alternate sigma factor of *Staphylococcus aureus* RNA polymerase: molecular cloning and DNA sequencing. *J. Bacteriol.* **178**: 6036-6042.

**Yarwood J.M.**, McCormick J.K. and Schlievert P.M. (2001) Identification of a novel two-component regulatory system that acts in global regulation of virulence factors of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **183**:1113-1123.

**Yarwood J.M.** and Schlievert P.M. (2003). Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *J. Clin. Invest.* **112**: 1620-1625.

**Yazdankhah S.**, Lassen J., Midtvedt T. and Solberg C.O. (20013) Historien om antibiotika. *Tidsskr Nor Laegeforen.* **133**: 2502-2507.

**Yipp B.G.**, Petri B., Salina D., Jenne C.N., Scott B.N., Zbytniuk L.D., Pittman K., Asaduzzaman M., W, K., Meijndert H.C., Malawista S.E., de Boisfleury Chevance A., Zhang K., Conly J. and Kubes P. (2012). Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat. Med.* **18**: 1386–1393.

**Yusupova G.**, Jenner L., Ree, B., Moras D. and Yusupov M. (2006) Structural basis for messenger RNA movement on the ribosome. *Nature* **444**: 391-394.

**Zapatoczna M.**, Heilbronner S., Speziale P. and Foster T.J. (2012) Iron-Regulated Surface Determinant (Isd) Proteins of *Staphylococcus lugdunensis*. *J. Bacteriol.* **194**: 6453-6467.

**Zapatoczna M.**, Jevnikar Z., Miajlovic H., Kos J. and Foster T.J. (2013) Iron-regulated surface determinant B(IsdB) promotes *Staphylococcus aureus* adherence to and internalization by non-phagocytic human cells. *Cell Microbiol.* **15**: 1026-1041.

**Zhao H.**, Hu F., Yang H., Ding B., Xu X., He C., Cui Z., Shu W. and Liu Q. (2017) Isobaric tags for relative and absolute quantitation proteomics analysis of gene regulation by SprC in *Staphylococcus aureus*. *Future. Microbiol.* **12**: 1181-1199.

**Zimlichman E.**, Henderson D., Tamir O., Franz C., Song P., Yamin C.K., Keohane C., Denham C.R. and Bates D.W. (2013) Health care-associated infections: a meta-analysis of costs and financial impact on the US health care system. *JAMA Intern. Med.* **173**: 2039-2046.

## Autres sources:

**Abrial C.** (2014) Caractérisation de la polarisation des macrophages pulmonaires humains et voies de régulation. Thèse en Biologie cellulaire de l'Université de Versailles-Saint Quentin en Yvelines.

**BMJ**: "SIR ALEXANDER OGSTON, K.C.V.O., M.D., C.M., LL.D." (1929) *Br. Med. J.* **1**: 325–327.

**Bongrand P.** (2014). **PHYSIOLOGIE DES CELLULES MONOCYTAIRES, MACROPHAGIQUES ET DENDRITIQUES.** ff10.1016/S1155-1984(13)60100-4. inserm-01071737.

**Bronsard J.** (2019) Identification et caractérisation de nouveaux ARN régulateurs chez *Staphylococcus aureus* : Mise en évidence d'un regroupement de 5 transcrits. Thèse en Biologie Moléculaire et Structurale, Biochimie de l'Université de Rennes 1.

**Comité Technique des Infections Nosocomiales.** (1999) 1<sup>ère</sup> à recommandations pour la surveillance et la prévention des infections nosocomiales, Ministère de l'emploi et de la Solidarité.

**ECDC:** ECDC and EMEA, rapport “The bacterial challenge: time to react.” 2009, p54.

**ENP 2018 :** Enquête Nationale de Prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé (France, Mai-Juin 2017)

**INSERM :** <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/infections-nosocomiales> [en ligne] (consulté le 17 décembre 2019)

**Institut Pasteur :** <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/staphylocoque> [en ligne] (consulté le 12 Décembre 2019)

**InVS:** Étude Burden BMR: morbidité et mortalité des infections à bactéries multi-résistantes aux antibiotiques en France en 2012, Juin 2015.

**Mauro T.** (2017) Étude de la régulation transcriptionnelle de deux ARN régulateurs de *Staphylococcus aureus* : Implication d'un facteur de transcription de la famille SarA. Thèse de Biologie-Santé de l'Université de Rennes 1.

**NCBI 1:** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/154> [en ligne] (consulté le 25 Novembre 2019)

**NCBI 2:** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=staphylococcus+aureus> [en ligne] (consulté le 25 Novembre 2019)

**Nobel, 1945:** <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1945/summary/> [en ligne] (consulté le 20 Janvier 2020)

**Rapport France :** Rapport du groupe de travail spécial pour la préservation des antibiotiques, « Tous ensemble, sauvons les antibiotiques », Juin 2015

**Rapport SÉNAT :** <https://www.senat.fr/rap/r05-421/r05-42113.html> [en ligne] (consulté le 18 Décembre 2019)

**Raynaud S.** (2016) Étude fonctionnelle d'un ARN régulateur exprimé par le staphylocoque doré, impliqué dans la virulence et la phagocytose des bactéries par les macrophages humains. Thèse d'exercice de la faculté de pharmacie de Rennes 1.

**SFM:** “Recommandation 2019 du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie” *Société Française de Microbiologie*, 2019.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**UE:** “Ban on antibiotics as growth promoters in animals feed enters into effect. *Union Européenne*, 2005.

**Waksman S.A.**, (1952): Nobel Lecture. NobelPrize.org. Nobel Media AB 2020: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1952/waksman/lecture/> [en ligne] (consulté le 16 Mars 2020).

---

**Titre : Étude fonctionnelle et cibles d'un ARN régulateur exprimé par le pathogène humain *Staphylococcus aureus* et impliqué dans l'internalisation des bactéries par les cellules humaines.**

**Mots clés :** *Staphylococcus aureus*, Purification par affinité, Internalisation des bactéries, Macrophages, ARN régulateur, Extraction d'ARNs

**Résumé :** *Staphylococcus aureus* est un pathogène humain important responsable d'un large spectre d'infections communautaires et nosocomiales faisant de lui un problème majeur de santé publique dans le monde. Le passage de commensalisme à la pathogénie est régi par la régulation fine de l'expression des gènes. En plus des facteurs de transcription, les ARNs régulateurs jouent également un rôle clé dans cette régulation. Cette thèse s'intéresse plus particulièrement à l'étude de l'un d'entre eux, le *srn\_3610\_sprC*, dont l'implication dans la virulence et dans l'internalisation des bactéries par les macrophages humains a été démontrée. Dans le but de mieux comprendre ces effets, nous avons mis en place la technique MAPS et identifié trois ARNm : *czrB*, *deoD* et *agrB*.

La caractérisation de l'interaction entre SprC et *czrB* a révélé une régulation négative de SprC sur l'opéron *czrAB* par modification de la stabilité de l'ARN. Ce mécanisme de régulation conduit à une diminution de la résistance de *S. aureus* au zinc. Le zinc fait partie des stratégies antibactériennes mises en œuvre par les cellules humaines. En plus de la description de la régulation par *Srn\_3610\_SprC*, nous avons développé un protocole pour l'extraction des ARNs bactériens après internalisation par les macrophages. Cette nouvelle méthode a permis d'étudier l'implication de l'opéron *czrAB* dans l'internalisation et la survie intracellulaire de *S. aureus*. Nous avons ainsi pu montrer qu'il était fortement surexprimé dans un contexte intracellulaire. Ainsi, la régulation négative de SprC sur l'expression de *czrB* pourrait expliquer la diminution de la survie de *S. aureus* au sein des macrophages.

---

**Title : Functional study and targets of a regulatory RNA expressed by the human pathogen *Staphylococcus aureus* and involved in bacterial internalisation by human cells.**

**Keywords :** *Staphylococcus aureus*, Affinity purification, Bacterial internalization, Macrophage, Regulatory RNA, RNAs extraction

**Abstract :** *Staphylococcus aureus* is an important human pathogen responsible for a wide spectrum of both hospital- and community-acquired infections, making it a major public health issue worldwide. The transition from commensalism to pathogenicity is governed by a fine regulation of genes expression. Beside transcription factors, regulatory RNAs play a key role in this regulation. This thesis focuses on the study of one of them, *Srn\_3610\_SprC*, which is known to be involved in virulence and bacterial internalization by human macrophages. For a better understanding of its role and function, we implemented the MAPS technology and identified three mRNA: *czrB*, *deoD* and *agrB*.

The characterization of the interaction between SprC and *czrB* revealed a negative regulation of SprC on the *czrAB* operon through modification of the RNA stability. This mechanism of regulation leads to a decrease in the resistance of *S. aureus* to zinc. Zinc belongs to the antibacterial strategies implemented by human cells. In addition to the depiction of regulation by *Srn\_3610\_SprC*, we developed a protocol for the extraction of bacterial RNAs after internalization by macrophages. This novel method allowed the study of the role of *czrAB* operon in the internalization and intracellular survival of *S. aureus*. We showed that it was highly over-expressed in an intracellular context. Therefore, the negative regulation of SprC onto *czrB* expression could explain the decrease in the survival of *S. aureus* within macrophages.