



HAL
open science

**Le régulon SarA chez Staphylococcus aureus : analyse combinée RNA-Seq, ChIP-Seq et bio-informatique.
Focus sur des cibles sARN**

Charlotte Oriol

► **To cite this version:**

Charlotte Oriol. Le régulon SarA chez Staphylococcus aureus : analyse combinée RNA-Seq, ChIP-Seq et bio-informatique. Focus sur des cibles sARN. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2022. Français. NNT : 2022REN1B012 . tel-03783255

HAL Id: tel-03783255

<https://theses.hal.science/tel-03783255>

Submitted on 22 Sep 2022

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 : Microbiologie, Virologie, Parasitologie

Par **Charlotte ORIOL**

Le régulon SarA chez *Staphylococcus aureus* : Analyse combinée RNA-Seq, ChIP-Seq et bio-informatique Focus sur des cibles sARN

Thèse présentée et soutenue à l'Université de Rennes 1, le jeudi 31 mars 2022

Unité de recherche : INSERM U1230 – ARN Régulateurs Bactériens et Médecine (BRM)

Rapporteurs avant soutenance :

ELSEN Sylvie
GUEDON Eric

Chargée de Recherche
Directeur de Recherche

Institut de Biologie Structurale, Grenoble
UMR 1253 – INRAE Institut Agro

Composition du Jury :

PAILLARD Luc (Président)
ELSEN Sylvie
GUEDON Eric
IOST Isabelle
BOULOC Philippe

Professeur d'Université
Chargée de Recherche
Directeur de Recherche
Chargée de Recherche
Directeur de Recherche

Université de Rennes 1, IGDR UMR 6290
Institut de Biologie Structurale, Grenoble
UMR 1253 – INRAE Institut Agro
Université de Bordeaux, INSERM U1212 - CNRS
Université de Paris-Saclay – I2BC

Directrice de thèse :
JOUVANTE-ROUILLON Astrid

Maitre de Conférences

Université de Rennes 1, INSERM U1230

Remerciements

Tous mes plus sincères remerciements vont à toi, **Astrid**. On aura surpassé pas mal d'obstacles pendant ces 3 ans et demi de thèse : un entretien inopé au cours de l'été 2018, une collaboration avec l'équipe américaine pas toujours facile, une pandémie, un confinement inédit, qui aurait pu prédire tout ça... Le quotidien au labo n'a pas toujours été tout rose ; je te remercierai jamais assez pour ton soutien, ta bonne humeur, et pour m'avoir supporté au quotidien (ce qui n'est pas chose facile). Ton dynamisme et ton engagement ont grandement contribué à ce que j'écrive ces mots aujourd'hui pour terminer ce sprint final. Merci pour ta disponibilité mais surtout la confiance que tu m'as accordée au cours de ces travaux, tu m'as permis de grandir et surtout tu m'as appris à avoir confiance en moi.

Mes pensées vont également pour **Brice Felden**, qui avait accepté de m'accorder une place au sein du laboratoire. Brice a été présent en ce début de cette thèse, et a pu me partager sa passion sur les ARN régulateurs et le staphylocoque doré. Merci de m'avoir accordé votre confiance pour accomplir cette thèse.

Noëlla, ma petite Nono. Ma bonne étoile du laboratoire, un énorme merci d'avoir été toujours là, pour ton sourire et ta joie de vivre (et les petits gâteaux) qui étaient omniprésents pour m'aider à surmonter les obstacles du quotidien. Une collègue avec qui j'ai pu partager beaucoup de temps forts, de la paillasse (ah cher PepA2 je ne suis pas prête de t'oublier) aux pauses café au soleil. Au cours de ces 3 ans, tu es surtout devenue une amie, une de mes plus belles rencontres bretonnes. J'espère que nos aventures ne sont pas prêtes de s'arrêter, de long périple nous attendent j'en suis sûre... (avec des pâtes cuites cette fois promis !)

Yoann, un collègue drômois de choc, toujours présent quand on a besoin d'un conseil. Je te remercie d'avoir toujours été là, toujours à l'écoute, et surtout d'avoir pris du temps jusqu'aux derniers instants pour corriger une partie de ce manuscrit. Tu es une des forces scientifiques de cette équipe, merci pour ces moments de partage. Dans tous les cas, on se donne rendez-vous au Hellfest !

Je tiens également à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à cette thèse, que ce soit d'un point de vue scientifique ou humain, merci notamment à : **Vincent, Marc**, et **Marie-Laure** d'avoir été présents. Je remercie ceux et celles qui nous ont quitté et qui sont parties vers d'autres horizons : **Gaëtan**, merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur, **Aude**, merci pour ton sourire, et **Anita** pour ta joie de vivre et ton optimisme.

Je remercie également les anciens thésards de m'avoir accueilli au sein du laboratoire : Julie, Camille, Kim et Simon qui m'ont permis de m'initier à la vie nocturne rennaise.

Merci pour votre accueil et à tous ceux que j'ai pu croiser pendant ma thèse : Pierre-Yves, Mathieu, Mohamed, Nathalie, Guillaume, Sophie, Loren, Killian, Audrey, Cintia, Hélène, Svetlana, Valérie.

Je tiens à remercier sincèrement **Julia**, pour avoir été une stagiaire au top, motivée comme jamais, à qui je souhaite tout le meilleur pour la suite.

Aux nouveaux, **Emeline, Laurence, Chloé, Maëlliss, Jean-Baptiste, Kévin**, et **Marie**, vos arrivées successives ont apporté un vrai rayon de soleil à la vie quotidienne du laboratoire. Je ne vous remercierai

jamais assez d'avoir été présents sur cette dernière année de thèse : vous avez su me booster pour continuer à avancer. Merci pour vos rires, vos bêtises, les bouffes, les bières, et les vacances partagées à vos côtés.

Au-delà du pays rennais, je tiens à remercier **Céline** et **Laura**, mes petites lyonnaises préférées avec qui j'ai pu partager de merveilleuses aventures. Vous qui savez mieux que quiconque les galères du quotidien de la thèse, merci d'avoir été là pour me soutenir dans les hauts et les bas.

Je ne remercierai jamais assez l'association badminton rennes et surtout **Thomas**, qui par hasard a accepté de m'accueillir dans cette association. Sans ça, ma thèse aurait pris une toute autre tournure... Je n'aurais pas pu rencontrer mes meilleurs amis bretons, que dis-je ma famille bretonne du quotidien. Plus de 3 ans à vos côtés, des aventures palpitantes à travers la Bretagne, cette belle Terre inconnue à mes yeux. Je pense particulièrement à vous : **Robin, Shirley, Doriane, Théo, Charles, et Olivier**. Merci d'avoir été présents pour rythmer mon quotidien, et me faire oublier les galères de la thèse avec : nos fous rires, nos escapades, nos sorties au bar, et surtout une petite pensée aux Quizz du Penny Lane du lundi soir, ah ces fameux traquenards...

Enfin, je tenais à remercier particulièrement **Robin**, présent depuis les débuts de ma thèse, ah on en aura connu des hauts et de bas mais aujourd'hui on en est là, plus forts que jamais. Je ne te remercierai jamais assez d'être là pour moi au quotidien, de me tirer vers le haut et de me faire rire (bon ok essayer de me faire rire) quand mon moral est au ras des pâquerettes. Partager cette thèse avec les chatons du badminton et toi, aura été une de mes plus belles surprises de mon arrivée en Bretagne. Pour finir, merci à **Mimi**, mon second acolyte du quotidien, merci de m'avoir assistée durant ses longues journées de rédaction.

Table des matières

INTRODUCTION.....	1
I. <i>Staphylococcus aureus</i>.....	3
A. Caractéristiques du genre <i>Staphylococcus</i>	3
B. <i>S. aureus</i> , un agent pathogène de l'Homme	3
1. Comment définir la notion de pathogène ?.....	4
2. Comment se déroule les infections à <i>S. aureus</i> ?.....	5
3. <i>S. aureus</i> et son interaction avec le microbiote	6
4. <i>S. aureus</i> : un problème de santé publique	7
4.1. Les Small Colony Variants (SCV).....	7
4.2. Les cellules persistantes et la réponse stringente	7
5. Adapter un mode de vie en biofilms.....	9
6. Un arsenal de facteurs de virulence	11
6.1. Les cytotoxines	11
a) L' α -toxine ou α -hémolysine.....	12
b) Les cinq familles de leucocidines.....	12
c) Les PSMs	13
6.2. Les enzymes sécrétées.....	14
a) Nucléase.....	14
b) Protéases	15
II. Régulation.....	17
A. Généralités sur les facteurs de transcription	17
B. Comment les facteurs de transcription intègrent-ils les signaux ?.....	18
C. Intégration des signaux chez <i>S. aureus</i>	20
1. Les systèmes à deux composants : les senseurs de l'environnement.....	20
1.1. WalKR : l'unique TCS essentiel chez <i>S. aureus</i>	21
1.2. Le système TCS SaeRS, un TCS à 4 partenaires	22
1.3. Le système TCS SrrAB (Staphylococcal Respiration Response)	23
1.4. Le système TCS ArlSR (Autolysis-Related Locus).....	24
1.5. Le système TCS LytSR : acteur de la lyse bactérienne.....	25
2. Le Quorum Sensing médié par le système Agr chez <i>S. aureus</i>	26
D. Les acteurs de la transcription chez <i>S. aureus</i>	28
1. Les facteurs σ au cœur de la transcription	28
Le facteur alternatif SigB - σ^B	28
2. Les facteurs de transcription chez <i>S. aureus</i>	29
2.1. CcpA (Catabolite control protein A).....	30
2.2. CodY.....	31
2.3. Famille Sar, des régulateurs exclusifs au genre Staphylocoque	33
a) Rot (Repressor of Toxins).....	35
b) MgrA.....	35
c) Le régulateur majeur SarA (Staphylococcal accessory regulator A).....	36
❖ SarA et la formation de biofilm	38
❖ SarA et la résistance aux antibiotiques.....	38
3. Les régulations croisées des facteurs de transcription : une question d'espace et de temporalité	38
3.1. Temporalité entre SarA et SarR sur le locus <i>agr</i>	38
3.2. Compétition entre CodY et SaeR	39
3.3. L'exemple de la multi-régulation.....	40
a) Le cas du gène <i>cap</i>	40
b) Le cas du gène <i>tst(H)</i>	41

4.	Souches de <i>S. aureus</i> disponibles pour étudier les réseaux de régulation	43
E.	Les ARN régulateurs	44
1.	Caractéristiques des ARN régulateurs	44
1.1.	ARN régulateurs en « <i>cis</i> »	45
1.2.	ARN régulateurs en « <i>trans</i> »	47
2.	ARN régulateurs et virulence	47
2.1.	L'ARNIII : l'ARN régulateur central du Quorum Sensing	47
2.2.	Les ARN « Spr » (Small Pathogenicity islands RNA)	48
a)	SprC et la phagocytose	49
b)	SprD et l'évasion du système immunitaire	49
c)	SprX et la résistance aux antibiotiques	49
d)	SprY : un ARNreg qui régule l'ARNIII	50
3.	ARN régulateurs et métabolisme	51
□	Les ARN de la famille Rsa	51
a)	RsaC (Srn_1590)	51
b)	RsaD (Srn_1640)	52
c)	RsaE (Srn_2130)	53
4.	Les systèmes toxine-antitoxine de type I	54
4.1.	Le système TA de type I SprA1/SprA1 _{AS}	55
4.2.	Le système TA de type I SprA2/SprA2 _{AS}	56
4.3.	Le système TA de type I SprG1/SprF1	57
4.4.	Les systèmes SprG2/SprF2 et SprG3/SprF3	58
5.	Quand les régulations des ARNreg s'entremêlent	58
5.1.	Le cas de SprD et ARNIII	58
5.2.	RsaI et RsaG, conditionnés par la présence de glucose	59
F.	Quand les régulations FT et ARNreg s'entremêlent	60
1.	Les ARNreg qui régulent les FT	60
1.1.	Le cas de ArtR et SarT	60
1.2.	Le cas de RsaA et MgrA	60
2.	Les FT qui régulent les ARNreg	61

CONTEXTE DE LA THESE 63

RESULTATS 65

Partie I : Le régulon SarA, mise en évidence de nouveaux gènes sARNs.....	67	
A.	Analyse transcriptomique des souches HG003 et HG003 délétée du gène <i>sarA</i>	67
B.	Expérience de CHIP-Seq	70
C.	Analyse combinée des deux expériences à haut-débit	74
1.	Choix des cibles potentiellement régulées par SarA	75
1.1.	Les gènes codant des protéines	75
a)	SAOUHSC_00088 (<i>galE</i>)	76
b)	SAOUHSC_00555 (<i>HAD</i>)	78
c)	SAOUHSC_00913 (facteur transcriptionnel type- <i>lysR</i>)	78
d)	SAOUHSC_00961 (<i>comK1</i>)	80
e)	SAOUHSC_00975	81
f)	SAOUHSC_01452 (<i>ald1</i>)	82
g)	SAOUHSC_02127 (<i>scpA</i>)	84
h)	SAOUHSC_02696 (<i>fmhA</i>)	85
i)	SAOUHSC_02820 (transporteur ABC hypothétique)	86
1.2.	Les gènes exprimant des sARNs	88
a)	Le gène <i>srn_0860_rsaOB</i>	88
b)	Le gène <i>srn_3950_teg16</i>	89

c) Le gène <i>srn_2230_sprG2</i>	90
d) Le gène <i>srn_9335_tsr29</i>	91
2. Validation des cibles sélectionnées présentes en RNA-Seq et CHIP-Seq	92
2.1. Northern Blot	92
2.2. Validation de la fixation de SarA par expérience de gel retard	94
2.3. Gène rapporteur	97
2.4. Recherche d'un site de fixation de SarA par empreinte à la DNase I	98
3. Ceux qui ne fallait pas rater... des sARNs aux critères de sélection imparfaits	99
3.1. Etude du gène <i>srn_0455_tsr9</i>	100
3.2. Etude du gène <i>srn_1640_rsaD</i>	101
3.3. Etude du gène <i>srn_4540_sprA2_{AS}</i>	102
D. Analyse bio-informatique du site de fixation de SarA	103
1. Recherche des cibles de SarA <i>in silico</i>	104
1.1. Paramètres utilisés	104
1.2. Résultats obtenus par les outils Glam2/Glam2Scan	105
1.3. Comparaison des données <i>in silico</i> avec les données expérimentales	109
1.4. Validation d'une cible issue de l'analyse consensus : <i>srn_5010_teg33</i>	109
E. Conclusion de l'étude du régulon SarA	110
Partie 2 : Méthode d'études des phénotypes liés à SarA	113
Infection sur le modèle larvaire <i>Galleria mellonella</i>	113
1. Stratégie expérimentale	113
2. Suivi de la mortalité journalière des souches HG003 et HG003 Δ <i>sarA</i>	115
3. Dénombrement intra-larvaire journalier	117
Partie 3 : Etudes des cibles sARN de SarA	119
Chapitre 1 : SprC et Srn_9340	119
1. Recherche de cibles et phénotype pour l'ARN Srn_9340	119
1.1. Protéomique	119
1.2. Etude du sARN Srn_9340 <i>in silico</i>	121
a) Recherche de cibles <i>in silico</i>	121
□ Outils bio-informatiques disponibles	121
□ Cibles potentielles	122
1.3. Stress d'autolyse au triton	126
1.4. Biofilms	128
2. Construction du double mutant HG003 Δ <i>sprC</i> / Δ <i>srn_9340</i>	131
Chapitre 2 : Systèmes toxine-antitoxine de type I	132
1. L'ensemble du système TA SprG2/SprF2 est-il régulé par SarA ?	133
1.1. Régulation de l'antitoxine SprF2 par SarA ?	133
1.2. Production de la toxine codée par <i>sprG2</i> en absence de <i>sarA</i>	135
2. L'ensemble du système TA SprA2/SprA2 _{AS} est-il régulé par SarA ?	136
2.1. Quantité d'ARN du système TA en fonction de SarA	136
2.2. Fixation de SarA sur l'ensemble du système TA ?	137
2.3. Régulation <i>in vivo</i> du système TA par SarA	138
2.4. Production de la toxine codée par <i>sprA2</i> dans la souche HG003 □ <i>sarA</i>	140
3. Expression du système TA SprA2/SprA2 _{AS} en milieu carencé NZM	142
3.1. Le milieu NZM	143
3.2. Transposition des résultats de la souche Newman à la souche HG003	144
3.3. Rôle de SarA dans la diminution de l'ARN SprA2 _{AS} en milieu carencé NZM ?	146
3.4. Vérification des souches par Northern blot	147
3.5. Production de PepA2 en milieu NZM	148
4. Des tailles différentes de PepA2 en fonction du milieu	149
4.1. Localisation de PepA2 dans les différents compartiments cellulaires	149
4.2. Production de PepA2 au cours de la croissance	150

4.3. Immunoprécipitation de PepA2-FLAG.....	152
Partie 4 : Double régulation de l'expression d'ARN régulateurs	155
A. RsaD, une cible régulée par CodY et SarA	155
B. D'autres cibles sARN communes aux régulateurs SarA et CodY ?	156
1. Organisation génétique et recherche <i>in silico</i> des consensus de fixation de CodY et SarA	157
1.1. Organisation génétique des gènes sARN	157
1.2. Positionnement des consensus CodY et SarA	158
2. Que sait-on sur le sARN Teg16 ?.....	160
2.1. Le gène <i>teg16</i> et l'opéron <i>ilv-leu</i> , liés plus que jamais	160
2.2. Quelle(s) fonction(s) pour Teg16 ?.....	161
3. RsaD et Teg16, une fonction commune chez <i>S. aureus</i> ?.....	162
3.1. Vérification de la répression de <i>teg16</i> par CodY et SarA dans la souche Newman.....	162
3.2. Construction du mutant <i>S. aureus</i> HG003 Δ <i>codY</i>	164
3.3. Niveaux des ARN Teg16 et RsaD dans les souches HG003.....	164
3.4. Teg16 et RsaD : Mêmes régulateurs et profils similaires, une fonction commune ?	166
4. Teg1 et RsaOB : cibles communes de SarA et CodY ?.....	168
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	171
Conclusion	172
Perspectives	174
A. SarA et la régulation des systèmes toxine-antitoxine de type I	174
B. A la croisée des régulons SarA et CodY chez <i>S. aureus</i>	175
1. Contrôle de la biosynthèse de la méthionine par Teg1 et RsaOB ?.....	176
1.1. Le cas de Teg1	177
1.2. Le cas de RsaOB	177
2. Teg16 et RsaD : vers une fonction commune ?.....	178
2.1. Contrôle de la production d'acétolactate synthases et production des BCAA	178
2.2. Teg16 et RsaD, des phénotypes communs ?	180
2.3. Intégration de nouvelles données sur la régulation de l'opéron <i>ilv-leu</i> chez <i>S. aureus</i>	180
2.4. L'opéron <i>ilv</i> , au-delà de la biosynthèse des acides aminés branchés	182
MATERIELS ET METHODES	185
I. Microbiologie.....	186
1. Souches et conditions de culture.....	186
2. Transformations.....	187
2.1. <i>E. coli</i>	187
2.2. <i>S. aureus</i>	187
3. Biofilm.....	187
4. Système rapporteur GFP.....	188
5. Dosage d'activité β -lactamase	189
6. Infection des larves <i>Galleria mellonella</i>	189
II. Biologie moléculaire.....	190
1. Purification d'ADN plasmidique et fragment PCR	190
2. Extraction d'ARN.....	190
3. RNA-Seq	190
4. ChIP-Seq	190
5. Northern Blot.....	191
5.1. Pour les sARN.....	191

a)	Gel acrylamide	191
b)	Révélation par sonde radioactive	191
5.2.	Pour les ARN messagers et l'ARN SprG2	191
a)	Gel agarose	191
b)	Construction de la sonde radioactive par PCR	191
5.3.	Hybridation des sondes radioactives sur les membranes	192
6.	Gel retard ADN - protéine	193
6.1.	Préparation des sondes	193
6.2.	Réaction	193
7.	Protéines	194
7.1.	Protéines de taille > 10 kDa	194
a)	Extraction de protéines : méthode billes de verre	194
b)	Western Blot – Gel Tris-Glycine	194
7.2.	Protéines de taille < 10 kDa - Peptides	194
a)	Extraction de protéines	194
b)	Extraction des protéines et fractionnement	194
c)	Immunoprécipitation de PepA2-FLAG	195
8.	RT-qPCR	195
8.1.	Traitement à la DNase	195
8.2.	Reverse transcription (RT)	195
8.3.	PCR quantitative (qPCR)	195
PUBLICATION.....		197
ANNEXES.....		225
Tableau des données RNA-Seq		227
Tableau des gènes communs retrouvés en RNA-Seq et en ChIP-Seq.....		241
POSTERS.....		247
BIBLIOGRAPHIE		251

Liste des figures :

Figure 1 : <i>Staphylococcus aureus</i> en microscopie électronique à balayage.....	3
Figure 2 : Infections humaines causées par <i>S. aureus</i>	4
Figure 3 : Molécules d'adhésion à la surface de <i>S. aureus</i> (MSCRAMMs).....	5
Figure 4 : Etapes du déroulement de l'infection à <i>S. aureus</i>	6
Figure 5 : Réponse stringente et rôle du (p)ppGpp chez les bactéries pathogènes.....	8
Figure 6 : Cycle de vie du biofilm chez <i>S. aureus</i>	9
Figure 7 : Formation des PIA chez <i>S. aureus</i>	10
Figure 8 : Vue de l'ensemble des facteurs de virulence produits par le pathogène <i>S. aureus</i>	11
Figure 9 : Formation de pores par l' α -hémolysine sur les cellules de l'hôte.....	12
Figure 10 : Formation de pores par les différentes leucocidines à deux composants.....	12
Figure 11 : Gènes codant les PSMs chez <i>S. aureus</i>	13
Figure 12 : Cascade de protéases staphylococciques.....	15
Figure 13 : Actions des protéases ScpA, SspA et SspB de <i>S. aureus</i> sur l'hôte.....	15
Figure 14 : Principales caractéristiques des facteurs de transcription bactériens.....	17
Figure 15 : Mécanismes de répression et d'activation par les facteurs de transcription sur les promoteurs bactériens.....	18
Figure 16 : Différents types de facteurs de transcription chez les bactéries.....	19
Figure 17 : Système à deux composants.....	20
Figure 18 : Le système WalKR et ses régulations associées.....	22
Figure 19 : Le système SaeRS et ses régulations associées.....	23
Figure 20 : Le système SrrAB et ses fonctions associées.....	24
Figure 21 : Le système ArlSR et ses fonctions associées.....	25
Figure 22 : Le système LytSR et ses fonctions associées.....	25
Figure 23 : Quorum sensing médié par le système Agr chez <i>S. aureus</i>	26
Figure 24 : Contribution du système Agr lors d'une ostéomyélite causée par <i>S. aureus</i>	27
Figure 25 : Partenaires de la régulation du facteur SigB.....	28
Figure 26 : Régulation de l'activité de CcpA chez <i>S. aureus</i>	30
Figure 27 : Formes et structure de CodY chez <i>S. aureus</i>	32
Figure 28 : Réponse stringente et CodY chez <i>S. aureus</i>	32
Figure 29 : Les niveaux de nutriments (ILV et GTP) influencent les niveaux ou activités des régulateurs majeurs de la virulence chez <i>S. aureus</i>	33
Figure 30 : Modifications post-traductionnelles des protéines SarA/MgrA/SarZ.....	34
Figure 31 : Inter-régulations des membres de la famille Sar chez <i>S. aureus</i>	34
Figure 32 : La région promotrice <i>sarA</i> et le réseau de régulation de SarA.....	36
Figure 33 : Alignements de séquences consensus de SarA.....	37
Figure 34 : Modèle de régulation du promoteur P2 du locus <i>agr</i> chez <i>S. aureus</i>	39
Figure 35 : Régulation croisée en CodY et SaeR chez <i>S. aureus</i>	40
Figure 36 : Régulation transcriptionnelle du gène <i>capA</i>	41
Figure 37 : Multi-régulation du gène <i>tst(H)</i> chez <i>S. aureus</i>	41
Figure 38 : Modèle de l'activation transcriptionnelle chez <i>Bacillus subtilis</i>	42
Figure 39 : Souches disponibles à partir de <i>S. aureus</i> NCTC8325.....	43
Figure 40 : Mécanismes d'action des ARN régulateurs sur les ARN messagers.....	45
Figure 41 : Localisation des ARN régulateurs en « <i>cis</i> ».....	45
Figure 42 : Mécanisme T-box riboswitch.....	46
Figure 43 : Localisation des ARN régulateurs en « <i>trans</i> ».....	47
Figure 44 : Quantité de l'ARNIII au cours de la croissance, et régulation de ses cibles chez <i>S. aureus</i>	48
Figure 45 : Fonctions des ARNreg SprC, SprD, SprX et SprY chez <i>S. aureus</i>	50
Figure 46 : Réseau de régulation RsaC chez <i>S. aureus</i>	51
Figure 47 : RsaD et la réponse au stress acide chez <i>S. aureus</i>	52
Figure 48 : <i>rsaD</i> , un gène aux multiples régulateurs chez <i>S. aureus</i>	53

Figure 49 : Résumé des différents types de systèmes toxine-antitoxine (I à VIII).....	54
Figure 50 : Système toxine-antitoxine SprA1/SprA1 _{AS} chez <i>S. aureus</i>	55
Figure 51 : Organisation génétique du système toxine-antitoxine SprA2/SprA2 _{AS} chez <i>S. aureus</i>	56
Figure 52 : Système toxine-antitoxine SprG1/SprF1 chez <i>S. aureus</i>	57
Figure 53 : Organisation génétique des trois systèmes toxine-antitoxine SprG2/SprF2, SprG3/SprF3 et SprG4/SprF4 dans le core génome de <i>S. aureus</i> NCTC8325.....	58
Figure 54 : Modèle du réseau de régulation par RsaI chez <i>S. aureus</i>	59
Figure 55 : Schéma de la régulation de ArtR sur <i>sarT</i>	60
Figure 56 : Réseaux de régulation RsaA prédit chez <i>S. aureus</i>	61
Figure 57 : Principaux objectifs de la thèse.....	64
Figure 58 : Vérifications de la production de la protéine SarA au cours du temps et de la croissance des souches utilisées pour le RNA-Seq.	68
Figure 59 : Résultats globaux du RNA-Seq.....	69
Figure 60 : Principe expérimental du ChIP-Seq.....	71
Figure 61 : Contrôles pour valider l'expérience de ChIP-Seq.....	72
Figure 62 : Fragments d'ADN après IP, séquencés et alignés sur le génome de référence.....	73
Figure 63 : Le gène SAOUHSC_00088 chez <i>S. aureus</i> NCTC8325.....	76
Figure 64 : Régulations connues du gène SAOUHSC_00088 (<i>galE</i>).....	77
Figure 65 : Le gène SAOUHSC_00555 chez <i>S. aureus</i> NCTC8325.....	78
Figure 66 : Le gène SAOUHSC_00913 chez <i>S. aureus</i> NCTC8325.....	79
Figure 67 : Régulations connues sur le gène SAOUHSC_00913.....	80
Figure 68 : Le gène SAOUHSC_00961 chez <i>S. aureus</i> NCTC8325.....	80
Figure 69 : Régulations connues sur le gène SAOUHSC_00961.....	81
Figure 70 : Le gène SAOUHSC_00975 chez <i>S. aureus</i> NCTC8325.....	82
Figure 71 : Le gène SAOUHSC_01452 chez <i>S. aureus</i> NCTC8325.....	83
Figure 72 : Régulations connues sur le gène SAOUHSC_01452.....	83
Figure 73 : Le gène SAOUHSC_02127 chez <i>S. aureus</i> NCTC8325.....	84
Figure 74 : Régulations connues sur le gène SAOUHSC_02127.....	85
Figure 75 : Le gène SAOUHSC_02696 chez <i>S. aureus</i> NCTC8325.....	86
Figure 76 : Le gène SAOUHSC_02820 chez <i>S. aureus</i> NCTC8325.....	87
Figure 77 : Régulations connues sur le gène SAOUHSC_02820.....	87
Figure 78 : Le gène <i>srn_0860_rsaOB</i> chez <i>S. aureus</i> NCTC8325.....	89
Figure 79 : Le gène <i>srn_3950_teg16</i> chez <i>S. aureus</i> NCTC8325.....	90
Figure 80 : Le gène <i>srn_2230_sprG2</i> chez <i>S. aureus</i> NCTC8325.....	91
Figure 81 : Le gène <i>srn_9335</i> chez <i>S. aureus</i> NCTC8325.....	92
Figure 82 : Western Blot révélant le niveau de protéines SarA dans les souches HG003.....	93
Figure 83 : Northern Blot révélant la quantité d'ARNm des 9 cibles sélectionnées.....	93
Figure 84 : Northern Blot des 4 sARNs sélectionnés.....	94
Figure 85 : Expérience de gel retard entre les séquences ADN des 13 gènes sélectionnés et la protéine SarA.....	96
Figure 86 : Niveaux des fusions transcriptionnelles des gènes étudiés au laboratoire dans les souches HG003, HG003 $\Delta sarA$ et HG003 $\Delta sarA/sarA$	98
Figure 87 : Le cas du gène <i>srn_0455_tsr9</i>	100
Figure 88 : Le cas du gène <i>srn_1640_rsaD</i>	101
Figure 89 : Le cas du gène <i>srn_4540_sprA2_{AS}</i>	102
Figure 90 : Alignement des séquences retrouvées dans l'analyse consensus avec les séquences révélées par expérience d'empreinte à la DNase I sur les gènes <i>srn_3610_sprC</i> et <i>srn_9340</i>	109
Figure 91 : Expérience de gel retard avec le promoteur marqué du gène <i>srn_5010</i> en présence de SarA.....	110
Figure 92 : <i>Galleria mellonella</i>	114
Figure 93 : Méthode d'injection des larves <i>G. mellonella</i>	114
Figure 94 : Courbe de croissance en milieu LB des souches HG003 et HG003 $\Delta sarA$	115
Figure 95 : Planification expérimentale des infections sur les larves <i>G. mellonella</i>	116

Figure 96 : Mesure du taux de survie des larves <i>G. mellonella</i> infectées avec les souches HG003 et HG003 $\Delta sarA$	116
Figure 97 : Schéma des étapes expérimentales pour réaliser le dénombrement bactérien intra-larvaire de la larve à l'étalement sur gélose.	117
Figure 98 : Dénombrement bactérien intra-larvaire journaliers des souches HG003 et HG003 $\Delta sarA$	118
Figure 99 : Antibiogrammes.....	120
Figure 100 : Interaction ARN-ARN <i>Srn_9340</i> – ARNm <i>epiA</i>	123
Figure 101 : Interaction ARN-ARN <i>Srn_9340</i> – ARNm <i>murG</i>	124
Figure 102 : Interaction ARN-ARN <i>Srn_9340</i> – ARNm SAOUHSC_00237.	124
Figure 103 : Interaction ARN-ARN <i>Srn_9340</i> – ARNm <i>mpsA</i>	125
Figure 104 : Taux de survie des souches HG003 et HG003 Δsmn_9340 en présence de triton X-100 0,1%.	127
Figure 105 : Taux de survie des souches HG003, HG003 $\Delta sarA$ et HG003 Δsmn_9340 en présence de triton X-100 0,1%.	127
Figure 106 : Réseaux de régulation de l'opéron <i>icaADBC</i> par différents signaux extracellulaires.....	129
Figure 107 : Etude de la formation de biofilm par coloration au cristal violet chez différentes souches de HG003.	130
Figure 108 : Etude de la formation de biofilm par coloration à la safranine chez différentes souches de HG003.	130
Figure 109 : Systèmes toxine-antitoxine de type I <i>SprA2/SprA2_{AS}</i> (à gauche) et <i>SprG2/SprF2</i> (à droite) et régulations par <i>SarA</i>	133
Figure 110 : Northern blot des ARN du système TA de type I <i>SprG2/SprF2</i>	134
Figure 111 : Potentielles régulations de la production de la toxine codée par <i>sprG2</i> en fonction de la présence de <i>SarA</i>	134
Figure 112 : Northern Blot des ARN des souches HG003, HG003 $\Delta sarA$, et HG003 $\Delta sarA/sarA+$	137
Figure 113 : Gel retard du promoteur du gène <i>smn_4550_sprA2</i> avec la protéine <i>SarA</i>	137
Figure 114 : Gel retard du promoteur du gène <i>smn_4540_sprA2_{AS}</i> avec la protéine <i>SarA</i> en compétition avec le promoteur du gène <i>smn_4550_sprA2</i>	138
Figure 115 : Dosage de l'activité β -lactamase de la fusion transcriptionnelle <i>P_{sprA2AS}-blaZ</i> dans les souches HG003, HG003 $\Delta sarA$ et HG003 $\Delta sarA/sarA$	139
Figure 116 : Potentielles régulations de la production de la toxine codée par <i>sprA2</i> en fonction de la présence de <i>SarA</i>	140
Figure 117 : Northern blot des ARNs <i>SprA2</i> et <i>SprA2_{AS}</i> dans les souches HG003, HG003 $\Delta sarA$ et HG003 $\Delta sarA/sarA$ avec les plasmides <i>pCN35-sprA2-FLAG</i> et <i>pCN35-sprA2-FLAG+sprA2_{AS}</i>	141
Figure 118 : Western Blot du peptide <i>PepA2-FLAG</i>	142
Figure 119 : Quantités relatives des ARNs du système TA <i>SprA2/SprA2_{AS}</i> suite à différents stress de 30min et 1 heure chez la souche Newman.	143
Figure 120 : Niveau d'expression relatif du transcrit <i>ilvD</i>	144
Figure 121 : Expression du système TA <i>SprA2/SprA2_{AS}</i> dans les souches HG003 et HG003 $\Delta sarA$	145
Figure 122 : Dosage de l'activité β -lactamase du promoteur du gène <i>sprA2_{AS}</i> en milieu TSB ou NZM....	146
Figure 123 : Northern Blot des ARN des souches contenant la version <i>PepA2-FLAG</i> plasmidique	148
Figure 124 : Western Blot du peptide <i>PepA2-FLAG</i> lors d'une culture en milieu NZM	148
Figure 125 : Western Blot des fractions protéiques de la souche HG003 $\Delta sprA2/\Delta sprA2AS$ + <i>pCN35-sprA2-FLAG +/- sprA2_{AS}</i>	149
Figure 126 : Production de <i>PepA2</i> au cours du temps lors d'une croissance en TSB ou NZM.....	150
Figure 127 : Taille de <i>PepA2-FLAG</i> dans le milieu extracellulaire en début de croissance.....	151
Figure 128 : Immunoprécipitation du <i>PepA2-FLAG</i>	152
Figure 129 : Régulations du gène <i>smn_1640_rsaD</i> exprimant un ARNreg chez <i>S. aureus</i>	155
Figure 130 : Organisations génétiques chez la souche <i>S. aureus</i> NCTC8325 des 4 gènes sARNs.....	158
Figure 131 : Positionnement du consensus CodY et de la zone de fixation de <i>SarA</i> en amont des gènes sARNs <i>smn_1640_rsaD</i> , <i>smn_350_teg16</i> , <i>smn_860_rsaOB</i> et <i>smn_0050_teg1</i> chez la souche NCTC8325.....	159

Figure 132 : Proposition de l'organisation de l'opéron <i>ilv-leu</i> en intégrant le gène <i>teg16</i>	161
Figure 133 : Northern blot des ARN extraits dans les souches Newman, Newman $\Delta sarA$ et Newman $\Delta codY$	162
Figure 134 : Niveau de l'ARNreg ARNIII dans différents mutants UAMS-1 chez <i>S. aureus</i>	163
Figure 135 : Northern Blot des ARN extraits de la souche HG003 toutes les heures d'une culture en TSB.	165
Figure 136 : Northern Blot des ARN extraits toutes les heures d'une culture en TSB de la souche HG003 $\Delta sarA$	165
Figure 137 : Quantifications relatives des niveaux d'ARN Teg16 et RsaD dans les souches HG003 et HG003 $\Delta sarA$ au cours du temps.....	166
Figure 138 : Schéma de régulation proposée pour l'interconnexion entre RsaD et Teg16, et les régulateurs SarA et CodY.....	167
Figure 139 : Voie de biosynthèse de la méthionine et régulateurs mis en évidence par cette étude chez <i>S.</i> <i>aureus</i>	169
Figure 140 : Le régulon SarA chez <i>S. aureus</i> connu à nos jours.....	172
Figure 141 : Recoupement des gènes sARN régulés par SarA et CodY chez <i>S. aureus</i>	175
Figure 142 : Régulations proposées pour la biosynthèse de la méthionine chez <i>S. aureus</i>	176
Figure 143 : Régulation de l'opéron <i>metICFE</i> chez <i>S. aureus</i>	177
Figure 144 : Modèle proposé pour la détoxification et la synthèse de BCAA chez <i>S. aureus</i>	179
Figure 145 : Régulation de l'expression de l'opéron <i>ilv-leu</i> par un mécanisme d'atténuation transcriptionnelle par un peptide leader contenu dans le gène sARN <i>teg16</i> chez <i>S. aureus</i>	181
Figure 146 : Connexions des régulations sur des gènes sARN par SarA - CodY intégrant la réponse stringente et la persistance chez <i>S. aureus</i>	183

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Ensemble des cofacteurs et enzymes sécrétés par <i>S. aureus</i>	14
Tableau 2 : Systèmes à deux composants fonctionnels chez <i>S. aureus</i>	21
Tableau 3 : Facteurs de transcription répondant à des signaux métaboliques ou environnementaux chez <i>S. aureus</i>	29
Tableau 4 : Cibles directes de SarA démontrées par des expériences d’empreinte à la DNase I, par retard sur gel ou par transcriptomique.....	37
Tableau 5 : Souches de <i>S. aureus</i> disponibles pour étudier les réseaux de régulation	43
Tableau 6 : Gènes réprimés sélectionnés l’étude du régulon SarA	75
Tableau 7 : Annotations des gènes étudiés dans les souches répertoriées dans la base de données Auréowiki.	76
Tableau 8 : Sélection de gènes sARNs communs au RNA-Seq et au ChIP-Seq.....	88
Tableau 9 : Séquences promotrices des gènes sARNs utilisées pour générer le consensus SarA dans Glam2.	105
Tableau 10 : Extraction des premiers résultats obtenus dans l’analyse Glam2Scan	106
Tableau 11 : Comparaison des résultats obtenus dans l’analyse Glam2Scan avec les données RNA-Seq et ChIP-Seq.	108
Tableau 12 : Regroupement de cibles potentielles de Srn_9340 en comparant les trois analyses <i>in silico</i> . 122	
Tableau 13 : Efficacité de transformation des souches HG003, HG003 $\Delta sarA$ et HG003 $\Delta sarA/sarA$	135
Tableau 14 : Compilations de données transcriptomiques des gènes sARNs réprimés par CodY et SarA. 157	
Tableau 15 : Souches et plasmides utilisés au cours de ces travaux.	187
Tableau 16 : Amorces utilisés pour les clonages SLIC pour le système rapporteur GFP	188
Tableau 17 : Sondes utilisées pour les Northern Blot (NB).	192
Tableau 18 : Sondes utilisées pour les gel retards ADN – protéine SarA (EMSA).	194
Tableau 19 : Amorces utilisées pour la RT-qPCR.	196
Tableau 20 : Extraction de données FPKM du RNA-Seq.	226
Tableau 21 : Données totales du RNA-Seq comparant les transcriptomes des souches HG003 et HG003 $\Delta sarA$	240
Tableau 22 : Gènes communs aux analyses RNA-Seq et ChIP-Seq	245
Tableau 23 : Séquences des sARNs utilisées pour les analyses bio-informatiques pour la prédiction de cibles <i>in silico</i>	246

Liste des abréviations :

A : Adénine
AA : Acides aminés
Ac : Anticorps
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNe : ADN extracellulaire
Agr : Accessory gene regulator
Arl : Autolysis-related locus
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ARNP : ARN polymérase
ARNreg : ARN régulateur
(s)ARN : Petit ARN dont le rôle régulateur n'a pas encore été démontré
ARNt : ARN de transfert
ARNtm : ARN transfert-message
Atl : Autolysine
ATP : Adénosine triphosphate
Aur : Auréolysine
BCAA : Acide aminé à chaîne ramifiée
B. cereus : *Bacillus cereus*
B. subtilis : *Bacillus subtilis*
CDM : Milieu chimiquement défini
ChIP-Seq : Immunoprécipitation de la chromatine et séquençage
Cna : protéine d'adhésion au collagène
CoNS : Bactéries à coagulase négative
DBD : Domaine de liaison à l'ADN
DO : Densité Optique
E. coli : *Escherichia coli*
EPS : Exopolysaccharides
ESKAPE : *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter spp*
FnBP : Protéine de liaison à la fibronectine
FPKM : Fragments per kilobase per million reads mapped
FT : Facteurs de transcription
Geh : Glycérol ester hydrolase
GFP : Green fluorescent protein
G. mellonella : *Galleria mellonella*
GTP : Guanosine-5'-triphosphate
Hla : α -hémolysine
Hlb : β -hémolysine
Hld : δ -hémolysine
HK : Histidine kinase
HP : Protéine hypothétique
kDa : Kilodalton
LB : Luria Broth
L. monocytogenes : *Listeria monocytogenes*
Ile : Isoleucine
ILV : Isoleucine, Leucine et Valine
MAPS : Purification par affinité par le tag MS2 couplé au séquençage d'ARN
MSCRAMM : Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules
MRSA/MSSA : *S. aureus* résistant/sensible à la méthicilline

MT : Marqueur de taille
NO : Oxyde nitrique
Nt : Nucléotides
Nuc : Nucléase
ORF : Open reading frame, cadre ouvert de lecture
PAM : Peptide antimicrobien
PBS : Tampon phosphate salin
PCR : Polymérisation en chaîne
PIA : Polysaccharide intercellular adhesins
PNAG : Poly-N-acétyl β 1-6-glucosamine
(p)ppGpp : Penta ou Tétraphosphate
PSM : Phénol Solubles Modulins
qPCR : PCR quantitative en temps réel
QS : Quorum Sensing
RBS : Site de fixation du ribosome
RD : Domaine régulateur
RNase : Ribonucléase
RNA-Seq : Séquençage des ARN totaux
ROS : Espèces réactives de l'oxygène
Rot : Répresseur des toxines
Rpm : rotation par minute
RR : Régulateur de réponse
RS : Réponse stringente
RT-qPCR : Rétro-transcription suivie d'une PCR quantitative
SAM : S-adenosylméthionine
SaPI : Ilôts de pathogénicité de *S. aureus*
Sar : Régulateur accessoire staphylococcique
S. aureus : *Staphylococcus aureus*
Sbi : Protéine de liaison aux immunoglobulines
SCC : Cassette chromosomale staphylococcique
SCV : Small Colony Variant
SD : Séquence Shine-Dalgarno : site de fixation du ribosome
SDS : Dodécylsulfate de sodium
S. epidermidis : *Staphylococcus epidermidis*
SigB : Facteur SigmaB (σ^B)
Sod : Superoxyde dismutase
Spa : Protéine A
SrrAB : Staphylococcal Respiration Response AB
T : Thymine
TA : Système toxine-antitoxine
TCS : Système à deux composants
TIR : équivalent de RBS, site de fixation du ribosome
TSB : Tryptic Soy Broth
TSST : Toxine du syndrome du choc toxique
UA : Unité arbitraire
UFC : Unité formant des unités
UTR : Région transcrite non traduite
+1 : Site d'initiation de la transcription

Introduction

I. *Staphylococcus aureus*

A. Caractéristiques du genre *Staphylococcus*

Le genre *Staphylococcus* est composé de bactéries à Gram positif d'un diamètre d'environ 1 µm. Elles sont représentées sous forme de cocci individuels et peuvent former des grappes ressemblant à des grappes de raisin (Kloos et Bannerman, 1994) (**figure 1**). Ces bactéries sont des anaérobies facultatifs, non mobiles et n'ont pas la capacité à sporuler. Les staphylocoques présentent une tolérance aux fortes concentrations de sel et une résistance à la chaleur (Plata et *al.*, 2009).

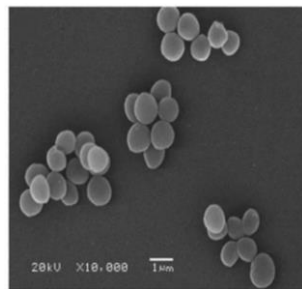


Figure 1 : *Staphylococcus aureus* en microscopie électronique à balayage (Zhang et *al.*, 2013).

Le genre *Staphylococcus* est divisé en deux groupes en fonction de la capacité des bactéries à produire de la coagulase, une enzyme qui provoque la coagulation du sang. Le premier groupe se compose des staphylocoques à coagulase positive, comme *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) et le second groupe, ceux à coagulase négative (CoNS), qui sont des bactéries commensales courantes de la peau comme *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) (Costa et *al.*, 2013)). Lors d'une croissance en milieu riche, les colonies de *S. aureus* sont de couleur dorée, du fait de la production d'un pigment type caroténoïdes, la Staphyloxanthine. Ce pigment est considéré comme un facteur de virulence car il assure la protection contre les agents oxydants produits par le système immunitaire de l'hôte (Plata et *al.*, 2009).

B. *S. aureus*, un agent pathogène de l'Homme

S. aureus est le pathogène le plus problématique du genre *Staphylococcus*, il est responsable d'un large spectre d'infections aiguës et chroniques (Tong et *al.*, 2015). Ces infections peuvent être suppuratives, notamment sur la peau, ou invasives et peuvent toucher divers tissus comme le tissu osseux, le tissu cardiaque ou encore les poumons (**figure 2**). Le pouvoir pathogène de *S. aureus* résulte de la sécrétion d'enzymes au large panel d'actions, avec notamment des enzymes capables de détruire les tissus (exemples : hyaluronidases, lipases, protéases) mais aussi de multiples toxines (leucocidines, hémolysines, exfoliatines). La sécrétion et la diffusion de ces toxines sont responsables d'infections invasives comme le syndrome du choc toxique staphylococcique (toxine TSST-1), ou encore du syndrome d'exfoliation généralisée (Le Loir et *al.*, 2010). Les toxines seront décrites en détails dans la section 6.1 (page 11). *S. aureus* est également

responsable d'infection alimentaire avec la production d'entérotoxines mais ce type d'infection ne sera pas développé dans ce manuscrit.

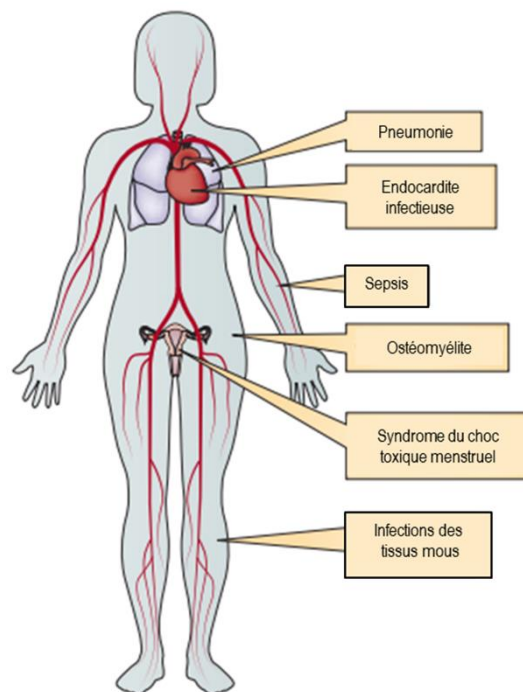


Figure 2 : Infections humaines causées par *S. aureus* (Salgado-Pabón et Schlievert, 2014).

S. aureus est le pathogène le plus couramment impliqué dans les infections de la peau dans le monde. Les infections cutanées sont dues à l'entrée de ce pathogène (souvent via un tissu traumatisé ou une blessure) et sa multiplication provoque diverses manifestations cutanées comme des furoncles, des impétigos ou encore des abcès (Giudice, 2020).

1. Comment définir la notion de pathogène ?

La pathogénicité ou virulence devrait être vue comme la caractéristique dynamique d'une interaction entre un hôte et un micro-organisme. La virulence peut aussi se définir par la diminution de la forme physique de l'hôte en raison de l'infection. Auparavant un pathogène était considéré comme une entité invariable, mais de nos jours la pathogénèse résulte généralement des interactions complexes entre l'hôte et les pathogènes et implique donc un équilibre entre le système immunitaire de l'hôte et les communautés microbiennes qui forment le microbiote (Méthot et Alizon, 2014).

S. aureus est considéré comme un pathogène opportuniste. En effet, dans la population générale son portage asymptomatique chez environ 30% de la population est retrouvé au niveau de la peau et des muqueuses, comme le nez (27%), les mains (27%) ou encore le périnée (22%) (Wertheim et al., 2005). Si l'équilibre entre le système immunitaire et le microbiote est rompu alors la colonisation de *S. aureus* peut devenir incontrôlable et l'infection va se propager dans l'hôte.

2. Comment se déroule les infections à *S. aureus* ?

Toute infection se déroule en plusieurs grandes étapes caractéristiques : l'adhésion, la colonisation, la dissémination et l'invasion.

S. aureus est capable d'adhérer sur les cellules de l'hôte grâce aux molécules dites « MSCRAMMs » (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules). Ces MSCRAMMs sont ancrées dans la paroi de la bactérie et lui permettent d'adhérer à différents types de matrices de l'hôte : comme le fibrinogène avec les protéines ClfA - ClfB ou la fibronectine avec les protéines FnBP (**figure 3**).

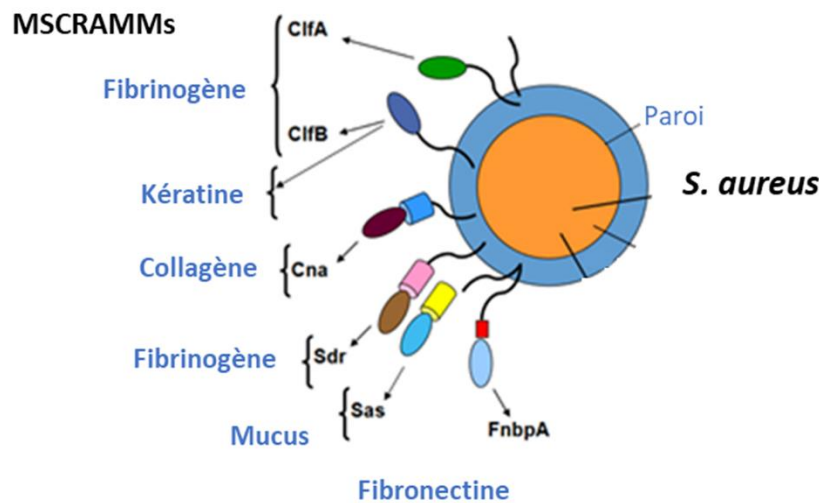


Figure 3 : Molécules d'adhésion à la surface de *S. aureus* (MSCRAMMs) (adapté de Foster, 2005). En bleu les différents types de matrices de l'hôte auxquelles *S. aureus* peut adhérer. La paroi de la bactérie est représentée avec le fond bleu, et son cytoplasme en orange.

Une fois l'étape d'adhésion effectuée, *S. aureus* peut coloniser la matrice et dans cette étape la formation de biofilm peut jouer un rôle important. La formation de biofilm sera décrite dans la section I.5 (page 9). Si *S. aureus* veut persister dans l'hôte, il doit assurer sa survie avec la nécessité d'un côté de contrer les défenses immunitaires de l'hôte et de l'autre de trouver des nutriments pour sa croissance. Durant la colonisation, *S. aureus* peut également causer une suractivation des lymphocytes avec des molécules dites « Superantigènes » ou à l'inverse échapper au système immunitaire, avec par exemples la production d'une capsule, ou de la protéine A (**figure 4**). Enfin l'infection à *S. aureus* peut se généraliser, on parle alors d'infection systémique, qui peut évoluer jusqu'à la septicémie. Dans un second cas, l'infection peut devenir profonde avec la formation de biofilms ou avec la formation de cellules particulières ; les SCV ou les cellules persistantes. Ces types de cellules peuvent permettre à *S. aureus* d'adopter une mode de vie intracellulaire qui lui permet notamment d'échapper aux défenses de l'hôte et aux traitements thérapeutiques, ce qui rend ces infections plus difficiles à éliminer (**figure 4**).

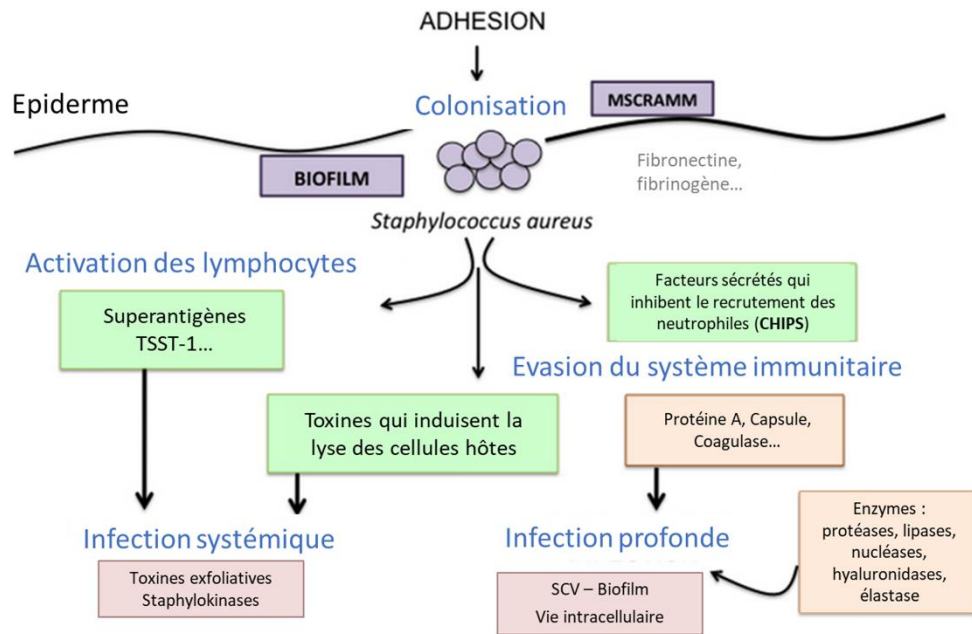


Figure 4 : Etapes du déroulement de l'infection à *S. aureus* (adapté de Dunyach-Remy et al., 2016). TSST-1 : toxine du choc toxique staphylococcique ; MSCRAMMs : molécule d'adhésion à la matrice de l'hôte ; CHIPS : protéine inhibitrice du chimiotaxie de *S. aureus* ; SCV : Small Colony Variant.

Comme décrit ci-dessus, la pathogénèse implique un équilibre entre le système immunitaire de l'hôte et les communautés microbiennes que le pathogène côtoie dans l'ensemble du microbiote.

3. *S. aureus* et son interaction avec le microbiote

La peau est dominée par des bactéries appartenant aux genres *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, et *Propionibacterium*. Dans le genre *Staphylococcus*, la plupart des bactéries commensales de la peau sont des staphylocoques à coagulase négative (CoNS), comme par exemple *S. epidermidis*, *Staphylococcus hominis* (*S. hominis*) ou encore *Staphylococcus lugdunensis* (*S. lugdunensis*). Néanmoins, *S. aureus* colonise entre 20 et 30% de la population adulte saine au niveau des narines, mais possède un taux de colonisation de la peau relativement lent. Pour autant, dans une étude réalisée dans 11 régions des Etats-Unis, *S. aureus* serait responsable de 76% des infections de la peau et des tissus mous (Moran et al., 2006). Pour contrôler la colonisation de *S. aureus*, le microbiote de la peau, et notamment les bactéries CoN, joue un rôle protecteur important. En effet, ce microbiote permet de limiter la colonisation des pathogènes via l'initiation du système immunitaire mais également au travers de la compétition entre les bactéries non-pathogènes déjà installées et les bactéries pathogènes (Parlet et al., 2019). Ainsi, il a été montré que la présence du genre *Corynebacterium* diminue la pathogénicité de *S. aureus*. En effet, pour passer d'un état commensal à un état pathogène, l'activation du système de Quorum Sensing Agr est cruciale (description à la page 26) or l'expression de ce système Agr est fortement inhibée en présence de *Corynebacterium* (Ramsey et al., 2016). Donc la présence du genre *Corynebacterium* empêche *S. aureus* de basculer vers un état pathogène.

Ces études montrent qu'un déséquilibre au niveau du microbiote de la peau ou bien un déséquilibre immunitaire peuvent conduire à une colonisation invasive de *S. aureus*.

4. *S. aureus* : un problème de santé publique

Ce pathogène opportuniste représente un enjeu majeur en santé publique notamment à cause de son large panel d'infections chez l'Homme mais aussi à cause de l'émergence de souches multi-résistantes aux traitements antibiotiques.

Ainsi, au début des années 1960 a émergé le *S. aureus* résistant à la méthicilline (MRSA). Cette souche a acquis la cassette de résistance SCC*mec* avec le gène *mecA* générant la résistance à la méthicilline et aux autres antibiotiques de la famille des β -lactamines. Depuis, de nombreuses souches résistantes à différentes classes d'antibiotiques ont vu le jour (Deurenberg et Stobberingh, 2008). Du fait de sa forte capacité à résister aux traitements antibiotiques, *S. aureus* représente aujourd'hui un vrai problème de santé publique. D'ailleurs, il fait partie du groupe de pathogènes « ESKAPE » pour : *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter spp.* Ce groupe ESKAPE réunit les pathogènes responsables de la majorité des maladies nosocomiales et résistants aux antibiotiques (Pendleton et al., 2013).

Les infections chroniques à *S. aureus* peuvent être difficiles à traiter, car elles impliquent souvent des cellules au métabolisme ralenti qui peuvent être retrouvées seules ou au sein des biofilms (Stoneham et al., 2020) (Rowe et al., 2021). Ces cellules sont moins vulnérables aux traitements antibiotiques puisque ces derniers ciblent en général des fonctions cellulaires actives (Waters et al., 2016). Deux grands types de cellules au métabolisme ralenti sont à distinguer : les SCV, pour Small Colony Variant et les cellules persistantes.

4.1. Les Small Colony Variants (SCV)

Chez *S. aureus*, les SCV sont définies comme des colonies de petite taille, à croissance lente, peu pigmentées. Ces SCV ont une paroi peu épaisse et sont non hémolytiques et non cytolytiques (Kahl et al., 2016). Ces bactéries ont acquis plusieurs mutations dans leur génome. Ces mutations impactent le fonctionnement du cycle de Krebs et la production d'énergie en altérant la chaîne de transport des électrons (Johns et al., 2015). Ces modifications entraînent une diminution de la production d'ATP et un ralentissement de croissance. Cette croissance ralentie explique leur petite taille mais également leur tolérance aux antibiotiques (Kahl et al., 2016). Ces SCV sont retrouvées lors d'infections chroniques comme par exemple dans le cas d'ostéomyélite à *S. aureus*, la fréquence de formation de SCV est estimée à environ 30%, ce qui explique la récurrence des infections (Bui et al., 2017). Une fois la pression antibiotique levée, les SCV peuvent rapidement retourner à un phénotype sauvage et retrouver une croissance classique (Kittinger et al., 2019).

4.2. Les cellules persistantes et la réponse stringente

Les cellules dites en persistance, rentrent dans un métabolisme particulier sans acquérir de mutations dans leur génome. Plusieurs types de cellules persistantes sont à distinguer : celles en lien avec un stress nutritif

qui sont enrichies dans la phase stationnaire de croissance (type I) et celles qui sont déclenchées de manière spontanée au sein de la population (type II) (Fung *et al.*, 2020). Cette persistance est caractérisée par des cellules ayant une croissance plus lente, et peuvent apparaître lors d'un stress antibiotique (Brauner *et al.*, 2016). En effet, les cellules persistantes peuvent également être définies comme une sous-partie de la population tolérante aux antibiotiques (Waters *et al.*, 2016) et retrouvent une croissance normale une fois la pression antibiotique levée.

L'entrée en persistance peut passer par la molécule signal de la réponse stringente, le (p)ppGpp, ou par une diminution de la synthèse d'ATP ou encore par l'activation de systèmes toxine-antitoxine (Fung *et al.*, 2020).

Dans cette partie, nous détaillerons seulement la réponse stringente (RS), déclenchée par une privation en acides aminés pour la bactérie. De manière générale, le (p)ppGpp s'accumule au cours de la croissance, et à un certain seuil va activer la réponse stringente au cours de la phase stationnaire de croissance (**figure 5A**). Chez *S. aureus*, le (p)ppGpp est synthétisé lors d'une carence en acides aminés, perçue par l'enzyme RSH (RelA/SpoT) qui va détecter l'accumulation d'ARNt non chargés dans la cellule (Geiger *et al.*, 2012). Cette molécule signal (p)ppGpp a montré avoir de multiples rôles au sein de la bactérie comme le fitness et l'adaptation dans l'environnement de l'hôte, la production de facteurs de virulence et la tolérance aux antibiotiques (**figure 5B**) (Kundra *et al.*, 2020).

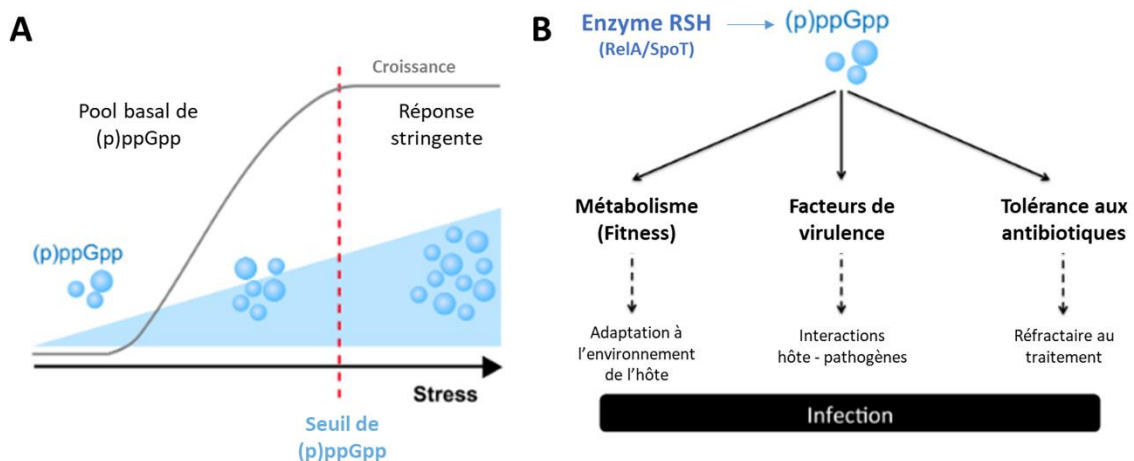


Figure 5 : Réponse stringente et rôle du (p)ppGpp chez les bactéries pathogènes (d'après Kundra *et al.*, 2020). (A) Accumulation du (p)ppGpp au cours de la croissance. (B) Le (p)ppGpp participe à la régulation de plusieurs processus critiques pour la pathogénèse de la bactérie.

Les rôles du (p)ppGpp sont universels dans le monde bactérien mis à part l'association avec l'expression des facteurs de virulence qui semblent être spécifique de l'espèce bactérienne (Kundra *et al.*, 2020). Ainsi, chez *S. aureus*, l'activité synthase de l'enzyme RSH, qui permet la production de ppGpp, est nécessaire pour l'expression des toxines *psm*, qui contribuent à la survie intracellulaire de *S. aureus* après phagocytose (Geiger *et al.*, 2012).

5. Adapter un mode de vie en biofilms

Les micro-organismes sont souvent soumis à des conditions hostiles, ils subissent des variations de pH ou encore d'osmolarité et sont en compétition permanente pour la disponibilité des nutriments. Ainsi, durant l'infection, les pathogènes sont soumis à des variations chimiques et environnementales et en parallèle ils doivent contrer les défenses de l'hôte. Adopter un mode de vie biofilm leur permet de s'affranchir des stress, d'empêcher la phagocytose et la pénétration de composés toxiques au cœur du biofilm et dans les bactéries (Mlynek *et al.*, 2020). Le biofilm se définit comme une communauté bactérienne hétérogène protégée par une matrice extracellulaire (Rowe *et al.*, 2021). La diffusion des nutriments au sein du biofilm est retardée, ce qui ralentit la croissance et favorise la formation de cellules persistantes et la tolérance aux antibiotiques (Moormeier et Bayles, 2017) (Mlynek *et al.*, 2020). Ainsi, jusqu'à 80% des infections bactériennes sont estimées être associées à la formation de biofilms, incluant les infections chroniques causées par *S. aureus* (endocardite, ostéomyélite, infection sur implants chirurgicaux et cathéters). En 2021, Rowe *et al.* ont répertorié la capacité de pénétration des antibiotiques dans des biofilms ou dans des bactéries présentes dans les cellules de l'hôte. Ils ont pu montrer que l'efficacité de certains antibiotiques comme ceux ciblant la synthèse de la paroi (β -lactamines), est fortement impactée par ces deux modes de vie de *S. aureus* (Rowe *et al.*, 2021).

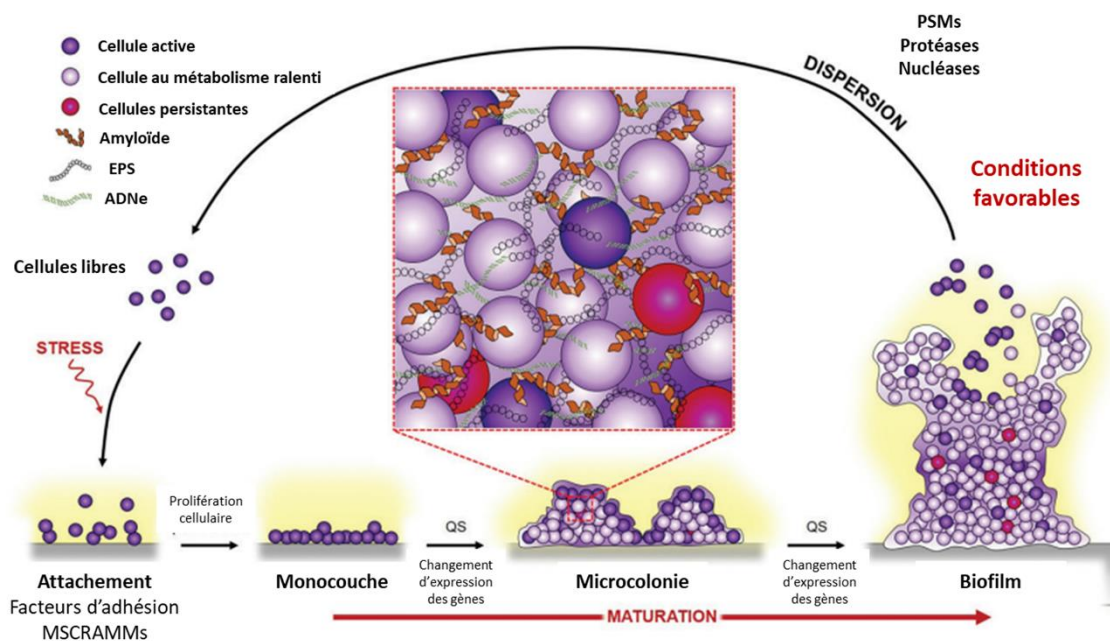


Figure 6 : Cycle de vie du biofilm chez *S. aureus* (adapté de Reffuveille *et al.*, 2017). EPS : exopolysaccharides, ADN_e : ADN extracellulaire, QS : Quorum sensing, PSM : Phénol Solubles Modulins.

Suite à la perception d'un signal de stress comme une agression physico-chimique, les bactéries vont déclencher l'initiation de la mise en place du biofilm (**figure 6**). Pour cela, les bactéries vont devoir adhérer à la matrice de l'hôte via les MSCRAMMs ou sur un polymère de surface (implants/cathéters) (Otto, 2009) et débiter la formation du biofilm. Les cellules adhérentes vont se multiplier et former une monocouche bactérienne. Une fois la densité cellulaire suffisante, le Quorum sensing (QS) est activé et va entraîner des changements d'expression au niveau de la communauté bactérienne qui deviendra une microcolonie. Cette

microcolonie est maintenue dans une matrice extracellulaire complexe produite par les bactéries. Cette matrice se compose d'exopolysaccharides (EPS), de structures amyloïdes et d'ADN extracellulaire (ADNe). La disponibilité en nutriments ou encore le gradient en oxygène sera différent en fonction de la localisation de la bactérie au sein du biofilm (Duraisamy *et al.*, 2020). Ainsi, dans le biofilm mature, différents types de cellules vont cohabiter : les cellules actives métaboliquement, les cellules au métabolisme ralenti et des cellules persistantes (**figure 6**). Enfin, quand les conditions seront plus favorables à la croissance, la structure du biofilm va être dispersée suite à la production de PSMs, de protéases et/ou nucléases par les bactéries qui vont casser la matrice extracellulaire. Les cellules libérées pourront donc retrouver un métabolisme actif et prospérer dans des conditions favorables à leur croissance (**figure 6**).

Deux types de biofilms sont très souvent décrits : ceux où la matrice est plutôt enrichie en sucres (EPS) et ceux de nature majoritairement protéique avec de l'ADNe (Zapotoczna *et al.*, 2016). La lyse contrôlée des bactéries par l'autolysine chez *S. aureus* est responsable de la libération d'ADNe et de protéines cytoplasmiques qui vont former la matrice de ce type de biofilm (Zapotoczna *et al.*, 2016).

Dans le second type de biofilm, la matrice extracellulaire se compose d'exopolysaccharides, qui sont des adhésines intercellulaires polysaccharidiques (PIA). Ces PIA sont des sucres de type a poly- β (1-6)-N-acétylglucosamine (PNAG), partiellement déacétylés, chargés positivement dont la synthèse est médiée par le locus *icaADBC* (**figure 7**) (Arciola *et al.*, 2015). Les protéines membranaires IcaA et IcaD vont synthétiser les homopolymères de N-acétylglucosamine (Glc-NAc), qui vont être exportés par la protéine membranaire IcaC. Une fois localisés au niveau de la paroi bactérienne, certains résidus vont être déacétylés par la protéine IcaD située sur la surface de la bactérie. Cette étape est nécessaire pour obtenir le caractère cationique des PIA qui est essentiel pour l'attachement à la surface (Otto, 2009).

Pour produire ces PIA, l'opéron *icaADBC* est sous le contrôle du régulateur IcaR dont le gène *icaR* est situé à proximité de l'opéron (**figure 7**). Ce dernier va limiter l'expression de l'opéron *icaADBC*. De plus, la régulation de cet opéron est soumise à d'autres régulateurs comme SarA ou le facteur SigB.

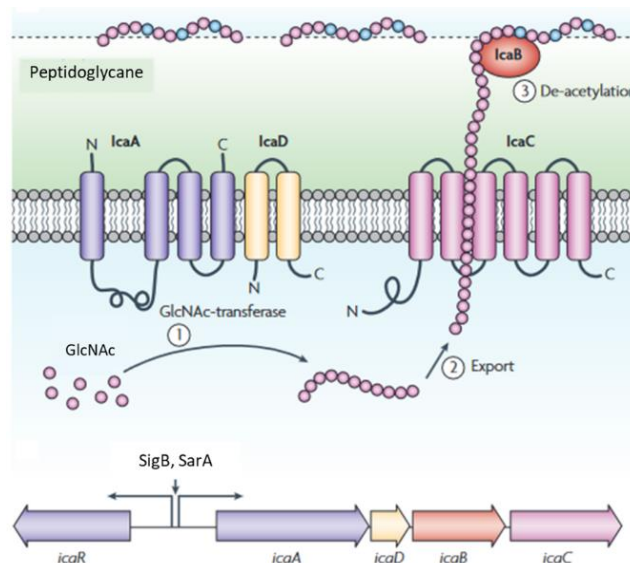


Figure 7 : Formation des PIA chez *S. aureus* (adapté de Otto, 2009). GlcNAc : N-acétylglucosamine.

Plus récemment, il a été montré que la matrice du biofilm pouvait avoir une composition intermédiaire avec des PIA liées à de l'ADNe, via une synthèse régulée par le régulateur CodY chez *S. aureus* (Mlynek et al., 2020). Ce nouvel élément ajoute un niveau de complexité dans la composition des biofilms en fonction des régulateurs impliqués dans sa formation.

Les biofilms composés de PIA sont nécessaires pour permettre à *S. aureus* d'adhérer aux cellules épithéliales nasales et prospérer dans l'hôte (Lin et al., 2015). De plus, le développement de *S. aureus* au sein de biofilm rend ce pathogène difficile à éradiquer lors d'infections chroniques. Pour autant, ce pathogène peut aussi attaquer de manière active l'hôte, en produisant différents types de facteurs de virulence et des toxines qui peuvent détruire les tissus de l'hôte mais aussi contrer les défenses immunitaires pour perpétuer dans l'hôte.

6. Un arsenal de facteurs de virulence

Par définition un facteur de virulence permet à la bactérie de se répliquer et se disséminer au sein d'un hôte en échappant aux défenses de l'hôte (Cross, 2008). *S. aureus* possède un large panel de facteurs de virulence avec des enzymes, des cytotoxines, des cofacteurs et des superantigènes (**figure 8**). Les superantigènes sont responsables d'une suractivation du système immunitaire, avec l'induction de la multiplication des lymphocytes (**figure 8**). Dans la suite de cette synthèse bibliographique, nous allons décrire quelques enzymes et cytotoxines produites par *S. aureus*.

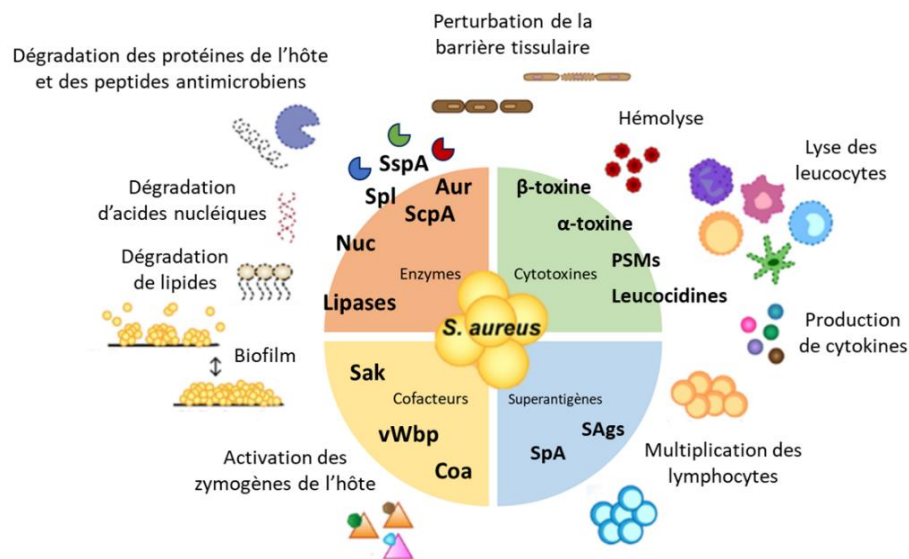


Figure 8 : Vue de l'ensemble des facteurs de virulence produits par le pathogène *S. aureus* (adapté de Tam et Torres, 2019).

6.1. Les cytotoxines

Ces toxines ont la capacité à former des pores membranaires sur les cellules de l'hôte ce qui déclenche une lyse cellulaire par la fuite des composés cytoplasmiques. Ces toxines ciblent les cellules du système immunitaire (macrophages, neutrophiles, lymphocytes T) et les cellules sanguines (Thammavongsa et al., 2015).

Il existe deux types de toxines : (i) celles au tropisme membranaire spécifique qui reconnaissent un récepteur de la cellule hôte (hémolysines et les toxines à deux composants) et (ii) celles qui agissent de manière non spécifique comme les PSMs (Phenol Soluble Modulins) (Tam et Torres, 2019).

a) L' α -toxine ou α -hémolysine

Cette toxine est codée par le gène *hla* présent dans le core génome de *S. aureus*. Cette toxine est capable de lyser différents types cellulaires, comme les érythrocytes, les cellules endothéliales et épithéliales et certains leucocytes (Tam et Torres, 2019). Plus précisément, l'hémolysine α reconnaît le récepteur ADAM-10 sur la cellule hôte, ce qui permet son oligomérisation et la formation de pores dans la membrane qui entraîne la lyse de la cellule (**figure 9**).

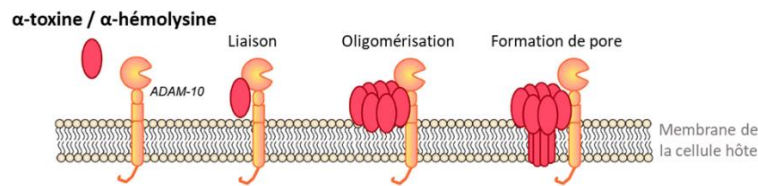


Figure 9 : Formation de pores par l' α -hémolysine sur les cellules de l'hôte (adapté de Tam et Torres, 2019). ADAM-10 : récepteur membranaire de liaison de la cellule hôte.

b) Les cinq familles de leucocidines

Les leucocidines sont des toxines à deux composants, c'est-à-dire composées de deux sous-unités, S et F. Cinq couples de leucocidines associées à des infections humaines ont été décrits chez *S. aureus* : LukSF-PV (anciennement appelée la Leucocidine de Panton-Valentine), les γ -hémolysines : HlgAB, HlgCB, LukED et LukAB (aussi connu sous le nom LukHG) (Alonzo et Torres, 2014) (Seilie et Wardenburg, 2017) (Spaan et al., 2017).

De manière générale, la sous-unité S reconnaît et se lie au récepteur spécifique de la cellule hôte, ce qui recrute la sous-unité F et entraîne la dimérisation de la toxine (**figure 10**). Ces recrutements sont suivis d'une oligomérisation avec trois autres dimères, laquelle aboutit à la formation d'un pore dans la membrane de la cellule hôte provoquant sa lyse (neutrophiles, lymphocytes T, macrophages et cellules sanguines) (Yamashita et al., 2011). LukAB fonctionne différemment puisqu'il forme directement un hétérodimère avant de trouver son récepteur cible (**figure 10**) (DuMont et al., 2014).

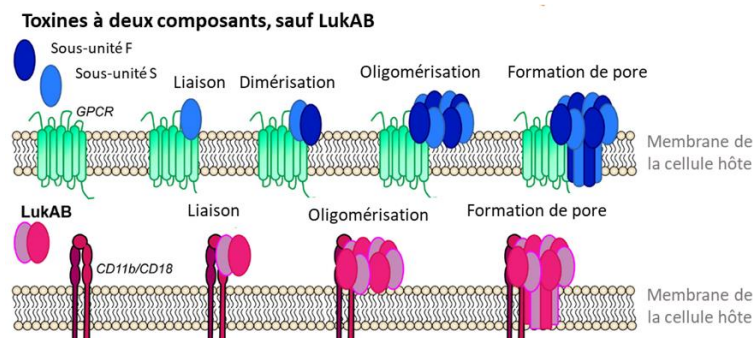


Figure 10 : Formation de pores par les différentes leucocidines à deux composants (adapté de Tam et Torres, 2019). GPCR et CD11b/CD18 : récepteurs membranaires de liaison de la cellule hôte.

Les gènes codant les γ -hémolysines LukAB, HlgAB et HlgCB sont présents dans le core génome de 99% des souches de *S. aureus* séquencées (von Eiff et al., 2004) (Ventura et al., 2010) (DuMont et al., 2011) (McCarthy et Lindsay, 2013). Le locus *hlg* est composé de trois gènes, le gène *hlgA* sous le contrôle de son propre promoteur, suivi de l'opéron *hlgC* et *hlgB* transcrit sous le contrôle d'un promoteur différent. Les sous-unités S HlgA et HlgC partagent la même sous-unité F, HlgB pour former deux leucocidines ciblant des types cellulaires spécifiques (Tam et Torres, 2019).

Les gènes codant les autres leucocidines sont localisés hors du core génome, dans des îlots de pathogénie ou des prophages. Le locus *lukSF-PV* se situe dans au moins six prophages présents dans le génome de *S. aureus* (Boakes et al., 2011). Aux Etats-Unis, plus de 90% des souches de *S. aureus* associées à des pneumonies nécrosantes sévères et des infections communautaires portent ce locus (Brown et al., 2012).

Quant aux gènes *lukED*, ils sont présents dans l'îlot de pathogénie vSa β , présent dans environ 70% des souches de *S. aureus* (von Eiff et al., 2004) (McCarthy et Lindsay, 2013). Les récepteurs cibles de la leucocidine LukED sont présents sur de multiples cellulaires immunitaires comme les neutrophiles ou les macrophages (Tam et Torres, 2019).

c) Les PSMs

Ces toxines font partie de la famille des peptides amphipathiques présents uniquement dans les staphylocoques. Ces PSMs ont de multiples rôles dans la pathogénèse de *S. aureus*, notamment la lyse de cellules hôte, la formation de canaux au sein du biofilm pour faciliter la diffusion des nutriments et la modulation de la réponse immunitaire (Periasamy et al., 2012) (Le et al., 2014).

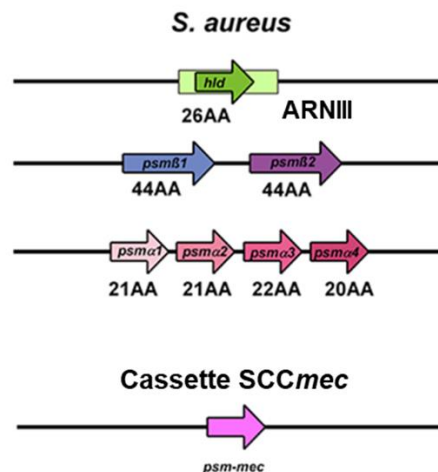


Figure 11 : Gènes codant les PSMs chez *S. aureus* (d'après Le et al., 2014). AA : acides aminés. Cassette SCCmec : cassette de résistance à la méthicilline.

Chez *S. aureus*, il existe trois loci dans le core génome qui codent pour des PSM : l'opéron *psmA* (PSM α 1-4), l'opéron *psm β* (PSM β 1-2) et le gène *hld*, codant la δ -hémolysine, et un dernier gène *psm-mec* qui est présent dans la cassette de résistance SCCmec (**figure 11**). La séquence codante de cette dernière est codée

dans un ARN régulateur (Kaito et al., 2011), de la même manière que la séquence codante de Hld fait partie d'un ARN régulateur majeur de *S. aureus*, l'ARNIII (Le et al., 2014).

6.2. Les enzymes sécrétées

Parmi son arsenal de facteurs de virulence, *S. aureus* est capable de sécréter de nombreux cofacteurs et enzymes dans le milieu extracellulaire (**tableau 1**). Les cofacteurs vont aller activer les zymogènes de l'hôte dans le système de coagulation pour favoriser la formation et la dissolution de caillots sanguins (Tam et Torres, 2019).

Cofacteurs/enzymes	Gène	Fonction
Coagulase	<i>coa</i>	Cofacteur
vWbp	<i>vwb</i>	Cofacteur
Staphylokinase	<i>sak</i>	Cofacteur
Nuc (thermonucléase)	<i>nuc</i>	Nucléase
Auréolysine	<i>aur</i>	Métalloprotéase
SspA - V8 protéase	<i>sspA</i>	Sérine protéase
SplABCDEF	<i>splABCDEF</i>	Sérine protéases
Toxine exfoliative A	<i>eta</i>	Sérine protéase
Toxine exfoliative B	<i>etb</i>	Sérine protéase
Staphopaine A	<i>scpA</i>	Cystéine protéase
Staphopaine B	<i>scpB</i>	Cystéine protéase
Hyaluronidase	<i>hysA</i>	Lyase
β -toxine	<i>hlb</i>	Sphingomyélinase, biofilm ligase
PI-PLC	<i>plc</i>	Phospholipase
SAL1	<i>lip1</i>	Lipase
SAL2	<i>geh</i>	Lipase
FAME	/	Détoxifie des acides gras libres

Tableau 1 : Ensemble des cofacteurs et enzymes sécrétés par *S. aureus* (adapté de Tam et Torres, 2019).

Les enzymes sécrétées peuvent avoir un rôle sur l'ADN, les lipides et les protéines, avec une certaine redondance de fonctions. Grâce à la sécrétion de ces différents effecteurs, *S. aureus* peut s'adapter aux différents stress et environnements rencontrés. Nous allons uniquement développer la nucléase Nuc et les diverses protéases.

a) Nucléase

La nucléase majeure chez *S. aureus*, aussi appelée thermonucléase est une enzyme codée par le gène *nuc*. Ce gène est réprimé lors de la formation du biofilm, mais est activé lors de la dispersion du biofilm ce qui permet la digestion de l'ADN extracellulaire liant les bactéries entre elles (Mann et al., 2009) (Kiedrowski et al., 2011).

De plus, ce gène a montré avoir un rôle dans l'échappement au système immunitaire en dégradant l'ADN relargué par des cellules immunitaires dont le rôle est d'immobiliser *S. aureus* (Brinkmann et al., 2004). Ce

gène est régulé par le facteur de transcription (FT) SarA et par le système à deux composants SaeRS (Cassat *et al.*, 2006) (Olson *et al.*, 2013).

b) Protéases

Les protéases citées dans le **tableau 1** sont impliquées dans divers rôles au cours de l'infection : l'acquisition de nutriments, la dissémination bactérienne, et l'évasion au système immunitaire (Tam et Torres, 2019).

Les gènes codant ces protéases extracellulaires sont exprimés en fin de phase exponentielle de croissance et sont contrôlés par le système Quorum sensing Agr et par SigB (Novick, 2003) (Shaw *et al.*, 2004). Les différentes familles de protéases sont fortement liées entre elles notamment en ce qui concerne leur activation (**figure 12**). Ainsi, les protéases Aur et ScpA produites sous la forme d'un précurseur, et vont devenir mature par un mécanisme d'auto-protéolyse. Concernant SspA, sa forme mature nécessite l'intervention de la protéase Aur, alors que la maturation de SspB dépend de SspA (**figure 12**). En parallèle, SspC et ScpB sont les inhibiteurs protéiques de SspB et ScpA respectivement. Leur action inhibitrice permet d'éviter que les protéases SspB et ScpA engendrent des dégâts intracellulaires avant leur sécrétion dans le milieu extérieur.

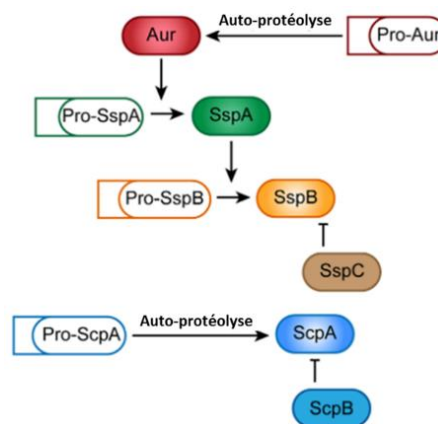


Figure 12 : Cascade de protéases staphylococciques (d'après Tam et Torres, 2019).

Ces différents types de protéases agissent de manière coordonnée et permettent de dégrader différents tissus de l'hôte. Elles dégradent les matrices extracellulaires formées de fibrinogène, d'élastine, et de collagène (**figure 13**).

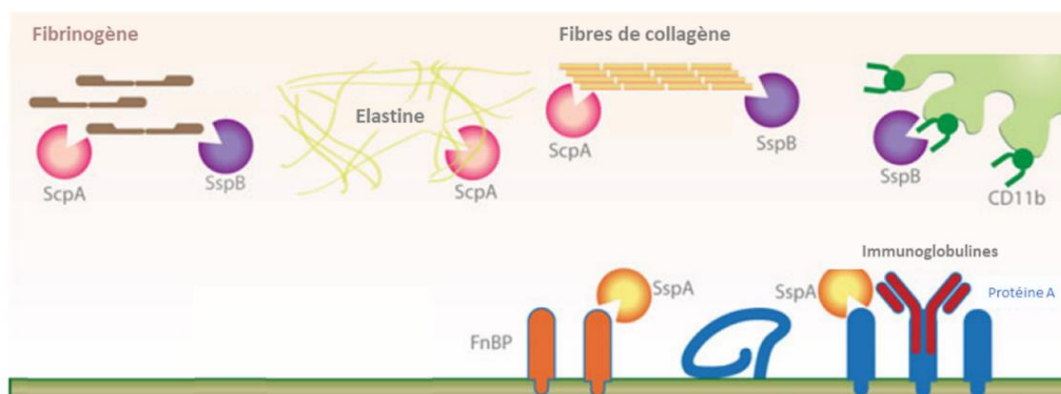


Figure 13 : Actions des protéases ScpA, SspA et SspB de *S. aureus* sur l'hôte (adapté de Frees *et al.*, 2013). CD11b : récepteur des cellules immunitaires ; FnBP : protéine de liaison à la fibronectine, molécule de la matrice de l'hôte.

La protéase SspA peut également dégrader des molécules produites par le pathogène lui-même comme la protéine de liaison à la fibronectine (FnBP) (McGavin et *al.*, 1997) et la protéine A (Karlsson et *al.*, 2001) (**figure 13**). De la même manière, l'auréolysine Aur peut dégrader les PSMs et le facteur ClfB (adhésion au fibrinogène) produits par *S. aureus* (McAleese et *al.*, 2001) (Gonzalez et *al.*, 2012). Le clivage des MSCRAMMs FnBP par SspA et ClfB par Aur, indique que les protéases extracellulaires sont importantes pour détacher *S. aureus* des surfaces de l'hôte et permettent sa dissémination pour l'infection (Frees et *al.*, 2013).

De plus, Aur contribue à la survie de *S. aureus* en dégradant des peptides antimicrobiens produits par le système immunitaire (Sieprawska-Lupa et *al.*, 2004), et en parallèle SspB agit directement sur les cellules phagocytaires. SspB clive le récepteur membranaire CD11b et déclenche la mort cellulaire programmée chez ces cellules immunitaires (**figure 13**) (Smagur et *al.*, 2009).

Pour conclure, l'action synergique de ces protéases donne des pouvoirs de dissémination, et d'évasion immunitaire à *S. aureus* qui sont en faveur de la propagation de l'infection dans l'hôte.

S. aureus est donc un pathogène opportuniste pour l'Homme, qui peut causer de multiples infections. En général, l'individu est infecté par le staphylocoque doré qu'il porte et ce portage se situe principalement au niveau de sa cavité nasale (Wertheim et *al.*, 2004). Cependant, la transition d'un état commensal vers un phénotype dit « pathogène », résulte d'un déséquilibre immunitaire et/ou du microbiote et entraîne généralement la multiplication de *S. aureus*. Cette multiplication engendre de nombreuses reprogrammations au niveau de l'expression de ses facteurs de virulence. La bactérie possède donc un réseau de régulation hyperconnecté qui lui permet d'adapter la production de facteurs de virulence en fonction de l'environnement rencontré et des réponses de l'hôte. *S. aureus* possède également un large panel de facteurs de transcription capable de réguler et de coordonner de manière efficace l'expression de ses facteurs de virulence en fonction des signaux extracellulaires perçus.

II. Régulation

A. Généralités sur les facteurs de transcription

Dans leur revue, Browning *et al* font le bilan sur les facteurs de transcription (FT) bactériens et les différents scénarios de régulation possibles. Souvent les FT bactériens se composent de deux domaines : un domaine capable de se lier à l'ADN (DBD) et un domaine dit « régulateur » qui permet au FT d'intégrer des informations qui vont moduler son activité (**figure 14**). Ces informations peuvent être de différents types comme, la localisation du FT dans la cellule, sa concentration, des modifications post-traductionnelles ou de liaison avec un ligand (**figure 14**). La plupart du temps, les FT agissent sous forme de dimère (homodimère ou hétérodimère). Une fois actif, le FT peut se fixer à l'ADN et engendrer soit une répression transcriptionnelle du gène cible soit une activation transcriptionnelle par le recrutement de l'ARN polymérase (Browning *et al.*, 2019).

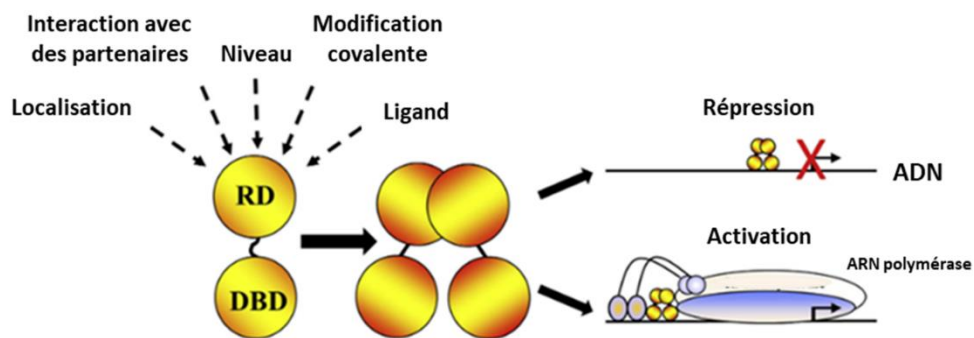


Figure 14 : Principales caractéristiques des facteurs de transcription bactériens (d'après Browning *et al.*, 2019). RD : domaine « régulateur » qui influence l'activité du FT ; DBD : domaine de liaison à l'ADN. La fixation du dimère à l'ADN peut entraîner une répression ou activation transcriptionnelle d'un gène cible.

La transcription peut être régulée par (i) la combinaison d'activateurs et répresseurs, (ii) la combinaison de répresseurs seulement ou (iii) la combinaison d'activateurs seulement.

Browning *et al*, décrivent trois types de mécanismes de répression transcriptionnelle : (1) l'encombrement stérique, où le FT bloque la reconnaissance du site de l'ARN polymérase en dissimulant les régions promotrices -10/-35 (**figure 15a**), (2) la formation d'une boucle rendant inaccessible la région promotrice par interaction entre deux répresseurs (**figure 15b**) ou (3) le blocage de l'ARN polymérase au niveau du promoteur, verrouillage par interaction ARN polymérase/FT (**figure 15c**).

Deux mécanismes d'activation transcriptionnelle sont à distinguer : (1) l'activation simple : la présence du FT en amont du gène est nécessaire pour recruter l'ARN polymérase (**figure 15d**) ou (2) l'activation par changement conformationnel où la fixation du FT sur l'ADN libère l'accès aux régions promotrices -10 et -35 (**figure 15e**).

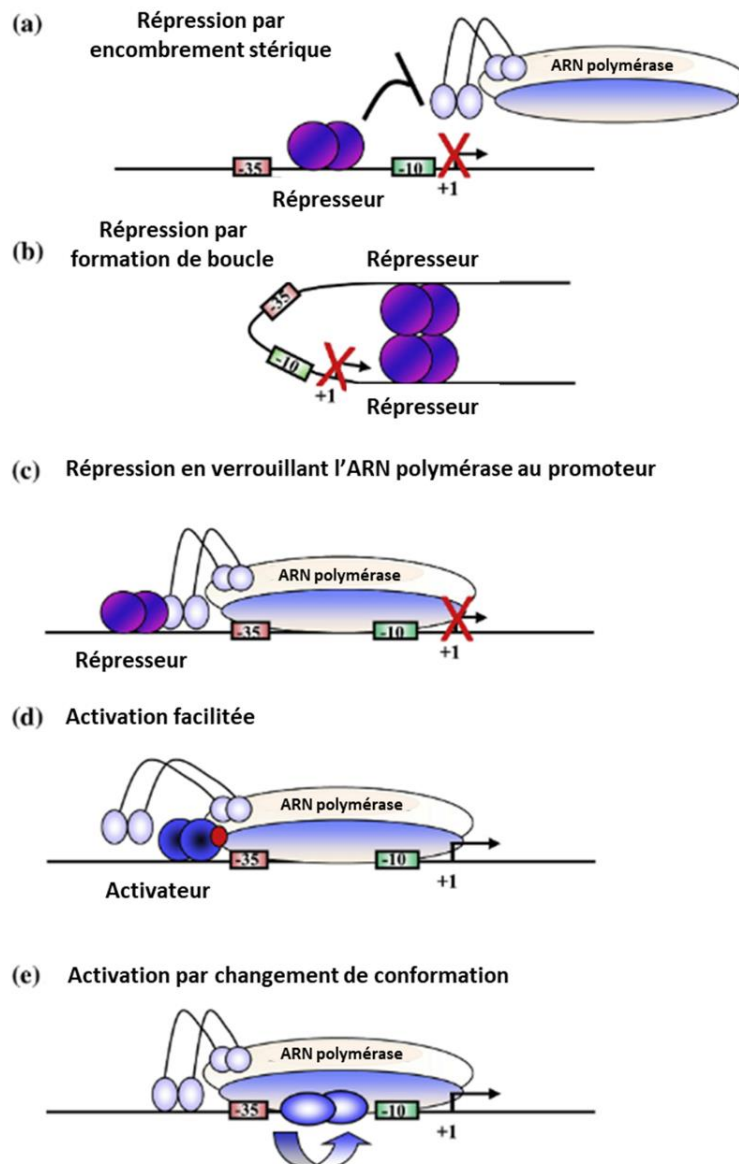


Figure 15 : Mécanismes de répression et d'activation par les facteurs de transcription sur les promoteurs bactériens (d'après de Browning et *al.*, 2019). Site +1 : site initiateur de la transcription ; -10 et -35, régions promotrices.

Pour qu'un FT puisse réguler l'expression d'un gène il va devoir se fixer sur l'ADN ou s'en décrocher. Ce sont le plus souvent des signaux intra ou extracellulaires qui vont apporter des modifications sur son domaine de liaison, modifiant son affinité pour l'ADN.

B. Comment les facteurs de transcription intègrent-ils les signaux ?

La transduction du signal intègre un réseau densément connecté allant des signaux perçus par la bactérie aux régulateurs de réponse. La coordination des régulateurs apporte donc des réponses appropriées à des conditions cellulaires distinctes.

Chez *E. coli*, il est estimé que 75% des régulateurs répondent directement aux signaux extracellulaires par phosphorylation ou par liaison avec des petites molécules (Seshasayee et *al.*, 2006). Seshasayee et *al.* décrivent trois types de FT : les FT exogènes, endogènes ou hybrides. Comme leur nom l'indique, les FT exogènes répondent à des signaux extracellulaires. Ces FT exogènes sont activés soit par phosphorylation grâce à un système à deux composants soit après liaison de métabolites qui ont été transportés à l'intérieur de la cellule (**figure 16a**). Nous reviendrons sur la description des systèmes à deux composants dans la partie suivante (page 20).

Pour le second type, les FT endogènes sont activés après liaison avec un métabolite qui a été synthétisé dans la bactérie (**figure 16b**). Enfin, les FT au fonctionnement hybride sont activés après liaison avec des métabolites qui peuvent avoir été importés dans la bactérie ou produits par cette dernière (**figure 16c**) (Seshasayee et *al.*, 2006).

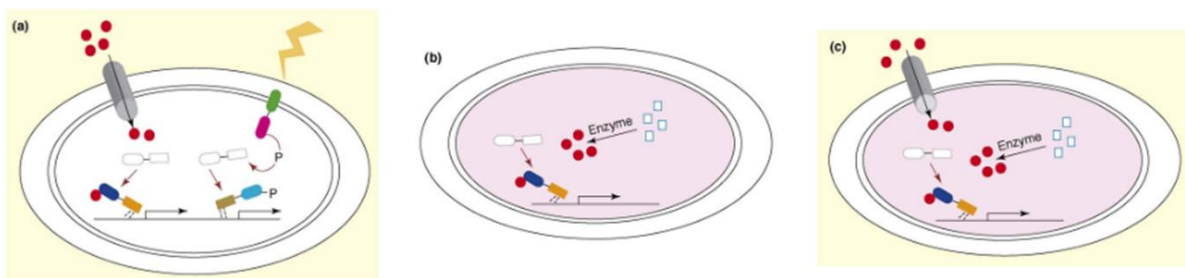


Figure 16 : Différents types de facteurs de transcription chez les bactéries (d'après Seshasayee et *al.*, 2006). Les FT sont représentés par la connexion d'une ellipse et d'un rectangle, en blanc FT inactif et en bleu/orange FT actif. En bleu le domaine dit « régulateur » et en orange le domaine de liaison à l'ADN (figure 15). (a) les FT exogènes, qui répondent soit à l'entrée d'un métabolite (rouge) à gauche ou sont activés par phosphorylation via un système à deux composants (vert/rose) à droite, qui répond à un stress (symbole jaune). (b) les FT endogènes qui répondent à un métabolite (rouge) synthétisé à l'intérieur de la cellule. (c) les FT hybride qui sont activés via liaison avec des métabolites (rouge) importés ou synthétisés au sein de la cellule.

Environ la moitié des gènes est contrôlée par plusieurs FT chez *E. coli* : les FT exogènes et hybrides se partagent rarement leurs cibles, mais ces deux classes de FT ont des cibles communes avec les FT endogènes (Seshasayee et *al.*, 2006). Cette information suggère que les signaux environnementaux doivent être combinés avec des signaux internes dans le réseau, et que les FT hybrides ne peuvent pas réaliser cette intégration indépendamment. Parmi les FT, environ la moitié des FT endogènes contrôle l'expression des régulateurs exogènes et hybrides, mais il y a peu de régulation réciproque des FT externes vers les internes.

Il a été montré que la plupart des régulateurs globaux (cinq sur sept) appartiennent à la classe endogène ; par conséquent, les régulateurs internes semblent former le centre du réseau, coordonnant et distribuant les réponses à divers signaux cellulaires (Martínez-Antonio, 2006). C'est pourquoi le concept de « orion » a été proposé par des auteurs, comme un module traitant des signaux environnementaux. Chaque orion comprend un FT senseur, qui n'est pas régulé par d'autres FT, suivi d'une hiérarchie de FT intermédiaires et d'interactions régulatrices qui se terminent au final par les gènes cibles finaux (Balázsi et *al.*, 2005).

Cette introduction sur les facteurs de transcription nous permet de refaire le point sur les différents modes de régulation possibles et sur les potentielles interactions entre les régulateurs. Dans la prochaine partie, nous développerons une partie des réseaux de régulation du pathogène *S. aureus*, en liant les acteurs de type protéique et aux riborégulateurs (ARN).

C. Intégration des signaux chez *S. aureus*

La polyvalence de *S. aureus* en tant qu'agent pathogène opportuniste repose sur sa capacité à adapter l'expression de ses facteurs de virulence en réponse à des signaux environnementaux rencontrés dans les différents tissus de l'hôte (Villanueva *et al.*, 2018).

1. Les systèmes à deux composants : les senseurs de l'environnement

Les systèmes à deux composants se composent d'un senseur type kinase à la membrane qui va percevoir un signal extracellulaire et va transmettre son signal à un régulateur de réponse (**figure 17**). Une fois le signal perçu, le senseur est activé par autophosphorylation, et va à son tour phosphoryler le régulateur de réponse. Ce régulateur désormais actif va pouvoir se fixer sur les régions promotrices des gènes cibles et activer leur transcription.

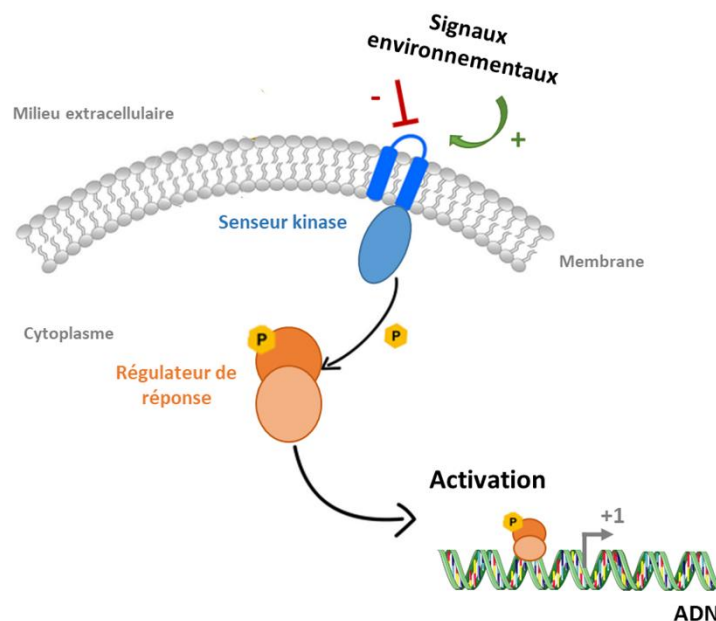


Figure 17 : Système à deux composants. En bleu, le senseur avec un domaine membranaire qui va percevoir le signal extracellulaire et relayer l'information au domaine kinase cytoplasmique qui va engendrer son autophosphorylation. Il va à son tour phosphoryler le régulateur de réponse (orange) sur son domaine dit « régulateur ». Ce régulateur activé va pouvoir se fixer sur les régions promotrices des gènes cibles grâce à son domaine de fixation à l'ADN.

Il a été décrit 16 systèmes à deux composants communs aux différentes souches de *S. aureus*. Parmi ces 16 TCS, un seul est essentiel à la croissance de ce pathogène, il s'agit du système WalKR (Haag et Bagnoli, 2015) (Villanueva *et al.*, 2018). Dans leur étude, Villanueva *et al.* ont montré que la délétion conjointe des 15 TCS ($\Delta 15$) n'entraîne pas de différence de croissance à 37°C en milieu riche. Néanmoins ce mutant $\Delta 15$ est sensible à certains stress, sa croissance est alors très ralentie par rapport à celle de la souche

parentale. Dans ce cas, la capacité à résister à ces différents stress est restaurée en ajoutant le TCS capable d'intégrer le signal spécifique dans le mutant $\Delta 15$. Les auteurs ont montré que par exemple, l'ajout des gènes codant le TCS SsrAB dans le mutant $\Delta 15$, lui permet de retrouver une croissance similaire à la souche sauvage à 28°C. Il semble donc que chaque TCS réponde à un ou des signaux spécifiques d'activation. Chaque TCS agit sur une ou plusieurs fonction(s) cellulaire(s) détaillées dans le **tableau 2**.

Nom	Fonctions	Localisation HK/RR
WalKR	Composition de l'enveloppe ; Autolysines	M/C
LytSR	Activité des muréine hydrolases	M/C
GraSR	Senseur de CAMP (peptides antimicrobiens cationiques)	M/C
SaeRS	Implication dans l'évasion du système immunitaire	M/C
ArI SR	Adhésion, autolyse, multi-résistance et virulence	M/C
SrrAB	Respiration aérobie / anaérobie	M/C
PhoPR	Assimilation du phosphate	M/C
AirSR	Senseur oxygène	C/C
VraSR	Biosynthèse de la paroi	M/C
AgrAC	Quorum sensing	M/C
KdpED	Transport de potassium	M/C
HssSR	Senseur de l'hème	M/C
NreCBA	Assimilation de l'azote	C/C
BraSR	Senseur/efflux/influx de bacitracine	M/C

Tableau 2 : Systèmes à deux composants fonctionnels chez *S. aureus* (adapté de Haag et Bagnoli, 2015). HK : Histidine kinase, RR : Régulateur de réponse. Localisation, C : cytoplasmique ; M : membranaire.

Dans ce manuscrit, nous allons décrire des TCS associés à la régulation de la pathogénie de *S. aureus* : WalKR, SaeRS, SrrAB, ArI SR et LytSR et le TCS AgrAC sera décrit plus loin dans la partie « Quorum sensing ».

1.1. WalKR : l'unique TCS essentiel chez *S. aureus*

Ce système à deux composants est composé d'un senseur kinase WalK à la membrane et du régulateur de réponse WalR (**figure 18**). Ce TCS est essentiel à la survie de *S. aureus*. Il régule des gènes impliqués dans le métabolisme de la paroi, comme les deux autolysines majeures AtlA et LytM (Dubrac et Msadek, 2004) (Dubrac et al., 2007), et intervient dans la formation de biofilm (Dubrac et al., 2007).

WalKR régule également des gènes de virulence impliqués dans l'adhésion (*fnbA*, *fnbB*), des cytotoxines (*hlgAB*, *hlgBC*) et intervient dans l'évasion du système immunitaire par l'activation du système TCS SaeRS (Delauné et al., 2012). De plus, en régulant le renouvellement de la paroi, WalKR joue un rôle dans la

résistance aux antibiotiques et plus particulièrement à ceux ciblant la paroi comme la vancomycine (Jansen *et al.*, 2007). Au travers de ces fonctions, WalKR est un atout dans la régulation de la virulence de ce pathogène. Le signal reconnu par WalK pour activer le système est encore mal connu mais WalKR pourrait répondre au niveau d'oxygène et/ou au potentiel redox (Dubrac *et al.*, 2008).

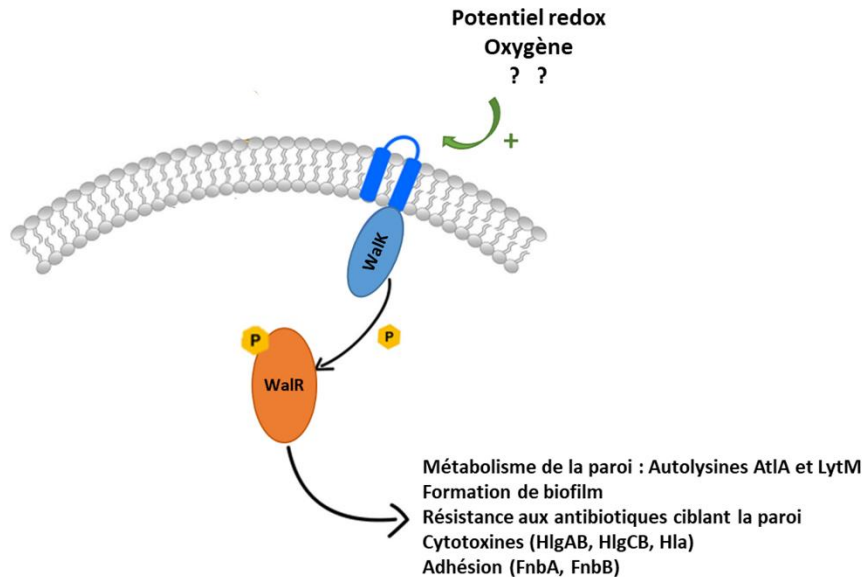


Figure 18 : Le système WalKR et ses régulations associées (adapté de Jenul et Horswill, 2019). P : phosphorylation sur le régulateur WalR.

1.2. Le système TCS SaeRS, un TCS à 4 partenaires

Le système SaeRS est composé d'un senseur membranaire SaeS, et d'un régulateur de réponse SaeR cytoplasmique. Il est exprimé au sein d'un locus codant, une lipoprotéine hypothétique (SaeP) et une protéine membranaire (SaeQ) (**figure 19**). Le régulateur SaeR est un régulateur positif de son propre opéron et de gènes de virulence. En effet, sa fixation à l'ADN est médiée par une séquence consensus qui peut être présente une fois, c'est le cas des gènes cibles avec une forte affinité, ou en deux exemplaires, pour le cas des gènes à faible affinité (Mlynek *et al.*, 2018).

Ce système SaeRS est responsable de la production de nombreux facteurs de virulence comme les coagulases, les adhésines (FnbA) et les cytotoxines (Giraud *et al.*, 1997) (Liang *et al.*, 2006) (Rogasch, 2006) (Ameya A. Mashruwala *et al.*, 2017). Il est contrôlé négativement par les protéines SaeP et SaeQ localisées à la membrane. La transcription du locus *sae* est diminuée en présence d'une forte concentration en NaCl et quand le milieu s'acidifie (Novick et Jiang, 2003) mais elle est stimulée en présence de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ et de α -défensines produits par le système immunitaire de l'hôte (**figure 19**) (Geiger *et al.*, 2008). Ces stimuli produits par les cellules immunitaires activent le senseur SaeS, ce qui favorise la production de cytotoxines lesquelles permettent à la bactérie de se défendre contre ses agressions. De plus, SaeRS agit de manière synergique avec le système Quorum sensing Agr (Novick et Jiang, 2003). Les facteurs de virulence régulés à la fois par SaeRS et Agr permettent à *S. aureus* d'échapper aux macrophages humains

(Münzenmayer *et al.*, 2016). Les rôles de SaeRS et d'AgR ont été démontrés *in vivo* lors de modèle d'infection chez la souris, et contribuent de manière significative à la virulence de la souche *S. aureus* USA300 (Montgomery *et al.*, 2010).

SaeRS a également été montré comme inhibiteur de la formation de biofilm chez la souche *S. aureus* Newman (Cue *et al.*, 2015). Ce système SaeRS permet donc à la bactérie de répondre à de nombreux signaux au cours de l'infection chez l'hôte, et de riposter suite aux agressions de l'hôte.

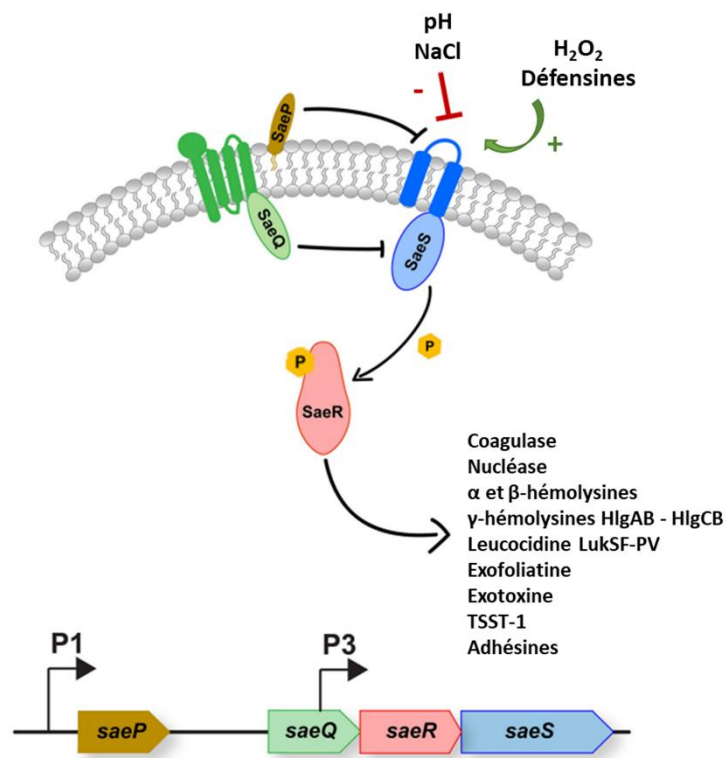


Figure 19 : Le système SaeRS et ses régulations associées (adapté de Jenul et Horswill, 2019). TSST-1 : toxine du choc toxique staphylococcique. Adhésines = protéines de liaison au fibrinogène et fibronectine, impliquées dans l'adhésion et l'invasion. Transcription sous le contrôle des promoteurs P1 et P3. P : phosphorylation sur le régulateur SaeR.

1.3. Le système TCS SrrAB (Staphylococcal Respiration Response)

SrrAB est composé d'un senseur à la membrane, SrrB et de son partenaire de réponse SrrA. SrrB est activé en présence de faible concentration en oxygène, d'oxyde nitrique NO[•] et d'ions superoxyde O₂⁻ et déclenche une réponse aux stress oxydatifs (**figure 20**) (Kinkel *et al.*, 2013) (King *et al.*, 2020). L'activation du régulon SrrAB permet à *S. aureus* de maintenir sa production d'énergie ainsi que ses processus essentiels de biosynthèse et de détoxification dans de multiples environnements de l'hôte (Kinkel *et al.*, 2013).

Ainsi en condition anaérobie, SrrAB active la biosynthèse de PIA en régulant l'opéron *icaADBC* (Ulrich *et al.*, 2007), et favorise la lyse cellulaire entraînant la libération d'ADNe. Ces deux phénomènes participent à la formation de biofilms (Ameya A Mashruwala *et al.*, 2017). Le système SaeRS est également responsable de la formation de biofilm en condition fermentative (Ameya A Mashruwala *et al.*, 2017). Ainsi,

la coordination des réponses via SrrAB et SaeRS en condition d'hypoxie illustre les superpositions de régulation qui intègrent les signaux environnementaux pour affiner l'expression des gènes de virulence chez *S. aureus* (King et al., 2020).

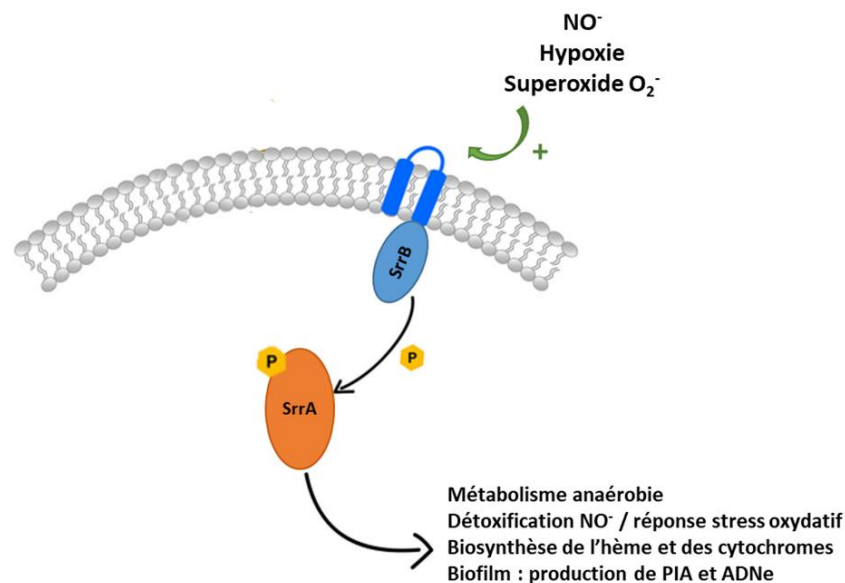


Figure 20 : Le système SrrAB et ses fonctions associées (adapté de Jenul et Horswill, 2019). P : phosphorylation sur le régulateur SsrA.

1.4. Le système TCS ArlSR (Autolysis-Related Locus)

Ce système est composé de ArlS, le senseur à la membrane et du régulateur cytoplasmique ArlR. ArlRS est impliqué dans l'autolyse, la formation de biofilm, la synthèse de la capsule et la virulence (Liang et al., 2005).

Les signaux d'activation de ce TCS ne sont pas connus actuellement (**figure 21**) (Jenul et Horswill, 2019), néanmoins la transcription du locus *alrRS* est médiée par le facteur de réponse au stress σ^B (Meier et al., 2007). Le régulateur ArlR se fixe sur la séquence consensus TTTTCTCAT-N4-TTTTAATAA dans la région promotrice de ses cibles (Crosby et al., 2020) et permet l'expression de gènes comme *aur* (Jin et al., 2019) ou encore l'opéron *ica* chez *Staphylococcus epidermidis* (Wu et al., 2012).

Chez *S. aureus*, ArlRS est un répresseur du mécanisme d'autolyse seulement dans les souches MSSA (Memmi et al., 2012). L'autolyse est un mécanisme qui permet de lyser les bactéries pour libérer de l'ADNe et initier la formation de biofilm. La régulation des cibles de ArlSR peut passer par la régulation directe du FT MgrA (**figure 21**) (Crosby et al., 2020). Les réseaux de régulation couplant ArlRS et MgrA en font des régulateurs pro-capsule et anti-formation de biofilm chez *S. aureus*.

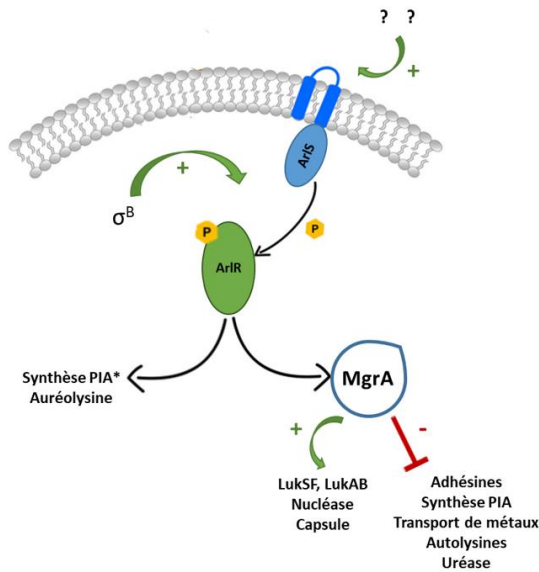


Figure 21 : Le système ArlSR et ses fonctions associées (adapté de Jenul et Horswill, 2019 ; Crosby et al., 2020). P : phosphorylation sur le régulateur ArlR ; * : chez *Staphylococcus epidermidis*.

1.5. Le système TCS LytSR : acteur de la lyse bactérienne

Le TCS LytSR se compose d'un senseur membranaire LytS qui intègre le potentiel membranaire de la bactérie, et transmet le signal par phosphorylation à son partenaire de régulation LytR. De plus, en présence d'un excès de glucose, l'enzyme Acétyl-P peut phosphoryler le régulateur LytR indépendamment de l'activation du senseur LytS (**figure 22**) (Sadykov et Bayles, 2012).

LytSR est connu pour réguler l'opéron *lrgAB* qui code des muréines hydrolases (Brunskill et Bayles, 1996). L'opéron *lrgAB* est impliqué dans le contrôle de la lyse de *S. aureus* (Sadykov et Bayles, 2012) et peut intervenir au moment de la formation de biofilm pour libérer de l'ADNe et constituer la matrice du biofilm. Il est transcrit en présence d'acide acétique lié à un excès de glucose et d'oxygène dans le milieu (Rice et Bayles, 2008).

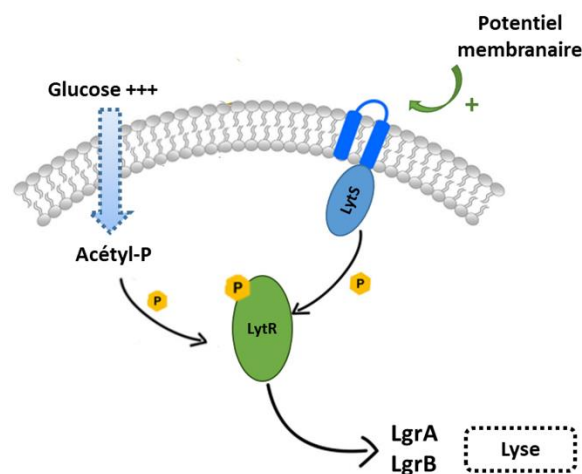


Figure 22 : Le système LytSR et ses fonctions associées (adapté de Jenul et Horswill, 2019). P : phosphorylation sur le régulateur LytR.

L'ensemble de ces TCS décrits permet à *S. aureus* de répondre à de multiples signaux extracellulaires, allant de la formation de biofilm à la production de facteurs de virulence répondant à des agressions chimiques produites par le système immunitaire de l'hôte au cours de l'infection. La densité bactérienne peut également permettre aux cellules de synchroniser leurs expressions en répondant au phénomène de Quorum sensing.

2. Le Quorum Sensing médié par le système Agr chez *S. aureus*

Le Quorum Sensing (QS) permet aux bactéries de communiquer entre elles via la production de signaux spécifiques en fonction de la densité de population et de coordonner leur réponse. Le QS chez *S. aureus* a été un des premiers systèmes décrits et il est médié via la production de peptides auto-inducteurs (AIP) (Jenul et Horswill, 2019).

Chez *S. aureus*, le Quorum sensing est assuré par le locus *agr* qui se divise en deux parties : une première sous le contrôle du promoteur P2 qui permet la transcription de l'ARNII contenant les séquences codantes de *agrB*, *agrD*, *agrC* et *agrA* et la seconde partie sur le brin opposé où le promoteur P3 contrôle la synthèse de l'ARNIII qui contient la séquence codante de la δ -hémolysine (gène *hld*) (**figure 23**). Le signal AIP est codé par une partie de *AgrD*. *AgrD* est transporté à l'extérieur de la cellule grâce au transporteur membranaire *AgrB* avec l'aide de *SpsB* (signal peptidase), ce qui conduit à l'accumulation d'AIP dans le milieu. Quand la concentration en AIP atteint un certain seuil, ce signal est perçu par le senseur *AgrC* (histidine kinase) qui va s'autophosphoryler. Ce senseur *AgrC* fait partie du système à deux composants *AgrAC*. Le phosphate est alors relayé au régulateur de réponse cytoplasmique *AgrA* qui est alors activé. *AgrA* va aller se fixer sur les promoteurs P2 et P3 du locus *agr* et induire la production de l'ARNII et l'ARNIII, mais aussi induire en parallèle la production de PSMs (**figure 23**).

L'ARNIII est l'effecteur majeur du système Agr et régule des gènes cibles clés de la virulence de *S. aureus*. L'ARNIII sera traité en détails dans la partie « ARN régulateurs » (page 47).

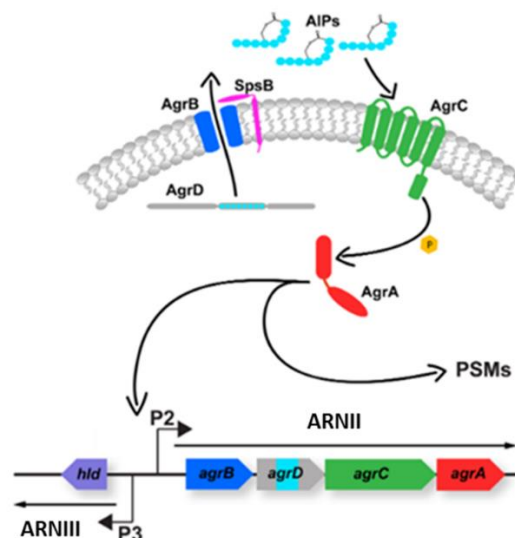


Figure 23 : Quorum sensing médié par le système Agr chez *S. aureus* (adapté de Jenul et Horswill, 2019). P : phosphorylation sur le régulateur *AgrA* ; AIP : peptides auto-inducteurs. Gène *hld* codant l' δ -hémolysine.

Au cours de la croissance bactérienne, l'accumulation des molécules effectrices AIP conduit à l'activation du système de QS Agr qui permet une réponse coordonnée des bactéries. Il a été montré que le QS est nécessaire pour passer de l'étape de colonisation à l'étape d'infection dans l'hôte (Queck et *al.*, 2008). Quand le système Agr est inactif, *S. aureus* adhère aux cellules de l'hôte alors que quand il est activé avec l'augmentation de densité de population, le phénomène de dissémination est alors favorisé. La dissémination s'accompagne de la production de cytotoxines, lysant les cellules de l'hôte rendant alors *S. aureus* très agressif (Queck et *al.*, 2008).

Le système Agr joue également un rôle dans la dispersion du biofilm, avec notamment la régulation de protéases et les PSMs qui permettent de disséminer les cellules du biofilm en cassant la matrice protéique (Boles et Horswill, 2008).

Au cours de l'infection, l'activation du système Agr peut jouer un rôle clé dans l'évolution de l'infection. Par exemple, lors d'ostéomyélite, *S. aureus* est capable de se comporter de manière « pro-virulence » si Agr est activé. Ce phénotype favorise la dissémination et la sécrétion de cytotoxines par la bactérie (**figure 24**). Si *S. aureus* adopte un comportement « pro-persistance » (Agr inactif) alors il favorisera la formation de biofilm et l'adhésion via la production de MSCRAMMS (**figure 24**) (Butrico et Cassat, 2020). Dans ces deux contextes, *S. aureus* continuera à limiter les réponses immunitaires de l'hôte via la production de cytotoxines ou avec la protéine A (SpA).

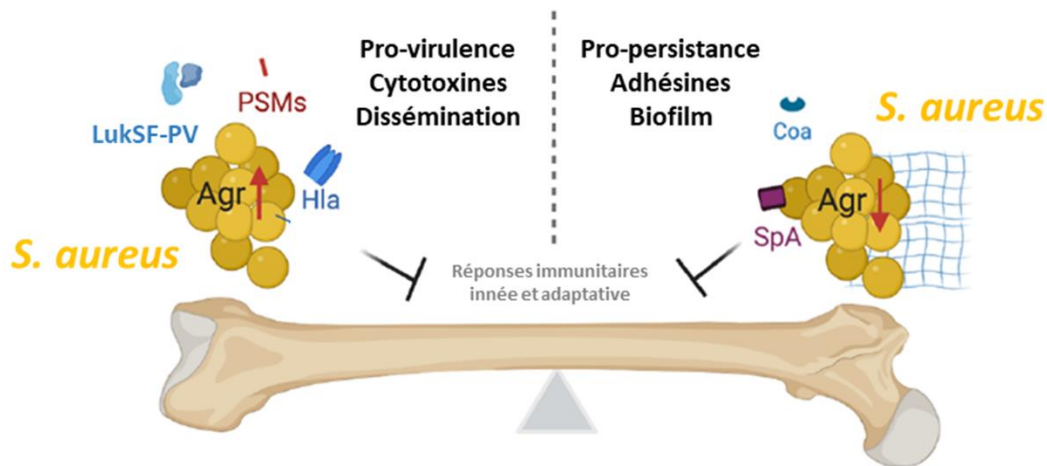


Figure 24 : Contribution du système Agr lors d'une ostéomyélite causée par *S. aureus* (adapté de Butrico et Cassat, 2020). Hla : α -hémolysine ; Coa : cofacteur ; SpA : protéine A.

Les réseaux de régulation s'entremêlent et il a été montré que le locus *agr* est sous le contrôle de FT intrinsèques à la bactérie comme le FT SarA qui favorise son expression (Cheung et *al.*, 2004).

Les TCS percevant les variations physico-chimiques de l'environnement ou la densité de population jouent des rôles clés dans l'activation de facteurs de virulence, et sont cruciaux au cours de l'infection pour permettre à *S. aureus* d'adapter sa réponse aux différentes conditions rencontrées. Les régulations peuvent également passer par des régulateurs plus conventionnels comme les facteurs σ et les facteurs de transcription.

D. Les acteurs de la transcription chez *S. aureus*

1. Les facteurs σ au cœur de la transcription

Les facteurs Sigma (Sig) sont très conservés dans le monde bactérien, ils donnent une spécificité de promoteur à l'ARN polymérase et sont régulés par facteur anti-Sigma via une interaction directe (Campbell et al., 2008). Il a été décrit quatre facteurs σ chez *S. aureus* : le facteur σ^A qui est responsable de la transcription des gènes de ménage, σ^B responsable de la transcription des gènes de la réponse au stress, σ^S qui contrôle l'expression de gènes liés au fitness et à la survie, et le facteur σ^H qui joue un rôle dans la compétence et l'intégration/excision des prophages (Wu et al., 1996) (Morikawa et al., 2003) (Shaw et al., 2008) (Tao et al., 2010). Dans cette partie, nous allons détailler uniquement le facteur de réponse σ^B car il intervient dans la régulation du système Agr, et de divers FT.

- Le facteur alternatif SigB - σ^B

Le gène *sigB* fait partie d'un opéron avec les gènes *rsbU*, *rsbV*, *rsbW* (*rsb* pour régulateurs de SigB). En général, SigB complexé avec son antagoniste, le facteur anti-Sigma RsbW, est sous forme inactive (**figure 25**). Lié à SigB, RsbW favorise la phosphorylation de RsbV, ce qui inactive RsbV. Quand RsbV est déphosphorylé, il se lie à RsbW, ce qui dissocie le complexe RsbW-SigB et rend SigB libre et actif. Lors d'un stress, l'activité phosphatase de RsbU est activée, ce qui permet la déphosphorylation de RsbV et donc la séquestration du facteur anti-sigma RsbW, libérant SigB. Le facteur SigB va alors se fixer sur les régions ADN de ses gènes cibles (séquences GTTTAA – N₁₂₋₁₅ – GGGTAT), se lier à l'ARN polymérase et activer leur expression (**figure 25**) (Homerová et al., 2004) (Junecko, 2012).

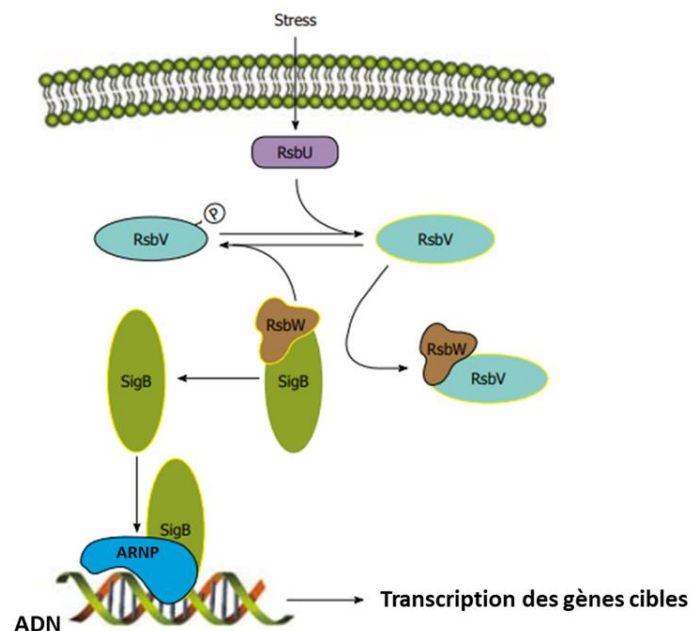


Figure 25 : Partenaires de la régulation du facteur SigB (adapté de Junecko, 2012). ARNP : ARN polymérase.

Le facteur σ^B est un acteur central de la réponse au stress, il est activé en réponse à l'exposition à différents stress comme un stress oxydatif (espèces réactives de l'oxygène, ROS), un stress acide ou encore un stress thermique. De manière générale, il est également activé au début de la phase stationnaire de

croissance (Pané-Farré et al., 2006). Il contribue également à la virulence, la persistance intracellulaire et aux infections chroniques. En effet, une souche délétée du gène *sigB* n'est plus capable ni de former des SCV ni de persister dans l'hôte (Tuchscher et al., 2015). Le facteur σ^B participe également à la survie de *S. aureus* exposée aux antibiotiques et à la survie dans le sang grâce à la résistance au stress oxydatif (Ranganathan et al., 2020). SigB régule l'expression de facteurs de virulence (adhésines, *fnb* ; *clfA*) mais aussi de régulateurs comme *sarA* ou *alrSR* (Bonilla, 2020). De plus, il a été montré récemment que SigB réprime indirectement la formation de biofilm et plus particulièrement la synthèse des PIA de la matrice du biofilm (Valle et al., 2019).

Les facteurs Sig sont des acteurs constants de la transcription des gènes car ils interagissent directement avec l'ARN polymérase. Préalablement à ce processus, les facteurs de transcription jouent un rôle clé soit pour masquer la zone de fixation de l'ARN polymérase soit pour la libérer et donc influencer la transcription des gènes situés en aval.

2. Les facteurs de transcription chez *S. aureus*

Au total plus de 120 facteurs de transcription ont été prédits dans la souche *S. aureus* N315, ce qui représente environ 5% du génome de la bactérie (Ravcheev et al., 2011). Ces FT combinés aux systèmes à deux composants font de *S. aureus* une bactérie capable de s'adapter à de multiples environnements, tout autant qu'ils participent à son développement en tant que bactérie commensale ou pathogène (Price et Boyd, 2020). Comme décrits précédemment, trois catégories de FT coexistent dans la bactérie : les FT à fonctionnement endogène, exogène ou hybride selon les signaux auxquels ils répondent.

Les FT répondant à des signaux métaboliques ou environnementaux chez *S. aureus* sont regroupés dans le **tableau 3**. Parmi ces signaux, nous retrouvons plusieurs ions métalliques (Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} et Mn^{2+}). Ces ions sont des micronutriments essentiels pour les organismes, car ils agissent en tant que cofacteurs de nombreuses enzymes. Néanmoins il est crucial pour éviter toute cytotoxicité pour les cellules de maintenir un bon équilibre de ces ions métalliques. Ces FT fixant des ions métalliques permettent de contrôler l'homéostasie de ces derniers.

Facteurs de transcription	Fonction	Signaux
CcpA	Catabolisme du carbone	Glucose
CodY	Métabolisme des acides aminés	GTP ; BCAA
Rex	Métabolisme anaérobie	Absence d'oxygène
LexA	Domage à l'ADN	Réponse SOS
CstR	Réponse choc thermique	Soufre / métaux
PerR	Stress oxydatif	H_2O_2
CymR	Métabolisme cystéine/soufre	Cystéine/soufre
Fur	Homéostasie du fer	Fe^{2+}
Zur	Homéostasie du zinc	Zn^{2+}
CsoR	Métabolisme du cuivre	Cu^{2+}
MntR	Métabolisme du manganèse	Mn^{2+}

Tableau 3 : Facteurs de transcription répondant à des signaux métaboliques ou environnementaux chez *S. aureus* (adapté de Ravcheev et al., 2011 et, Price et Boyd, 2020). BCAA : acides aminés à chaîne ramifiée.

Parmi les signaux métaboliques, comme le glucose, le GTP et les BCAA, ces molécules peuvent être synthétisées par la bactérie ou provenir d'un apport exogène. Dans cette partie nous développerons les facteurs de transcription CcpA et CodY, retrouvés chez tous les bactéries à Gram positif, pathogènes ou non.

2.1. CcpA (Catabolite control protein A)

CcpA est un régulateur primaire de la répression catabolique chez les bactéries à Gram positif au faible pourcentage G-C dans leur génome (Rudra et Boyd, 2020). La répression catabolique permet aux micro-organismes une utilisation préférentielle des sources de carbone, notamment l'utilisation du glucose.

CcpA agit majoritairement comme répresseur en se fixant sur ces gènes cibles. CcpA se décompose en deux domaines, un premier domaine HTH (hélice-couche-hélice) qui permet sa fixation à l'ADN, et un second dit « régulateur ». La fixation de CcpA à l'ADN via son domaine HTH s'opère sur des séquences *cre* (catabolite-responsive element) avec pour séquence consensus TGTGAAAGCCATTCATA mais cette séquence ne semble pas cruciale pour la fixation de CcpA à l'ADN (Seidl et al., 2009).

La régulation CcpA-dépendante est déclenchée par une forte présence de glucose dans la cellule. Ce dernier va stimuler la phosphorylation de la protéine Hpr par la kinase/phosphatase HPrK. Cette protéine Hpr phosphorylée est un partenaire de CcpA. CcpA et Hpr-P vont interagir (oligomérisation) et se fixer sur l'ADN pour réguler les gènes cibles, c'est la forme active de CcpA (**figure 26**). Suite à un stimulus externe, CcpA peut aussi être directement phosphoryler par la Sérine-Thréonine kinase Stk1. Cette forme phosphorylée de CcpA sur son domaine HTH la rend inactive, incapable de se fixer à l'ADN (**figure 26**) (Leiba et al., 2012) (Wünsche et al., 2012).

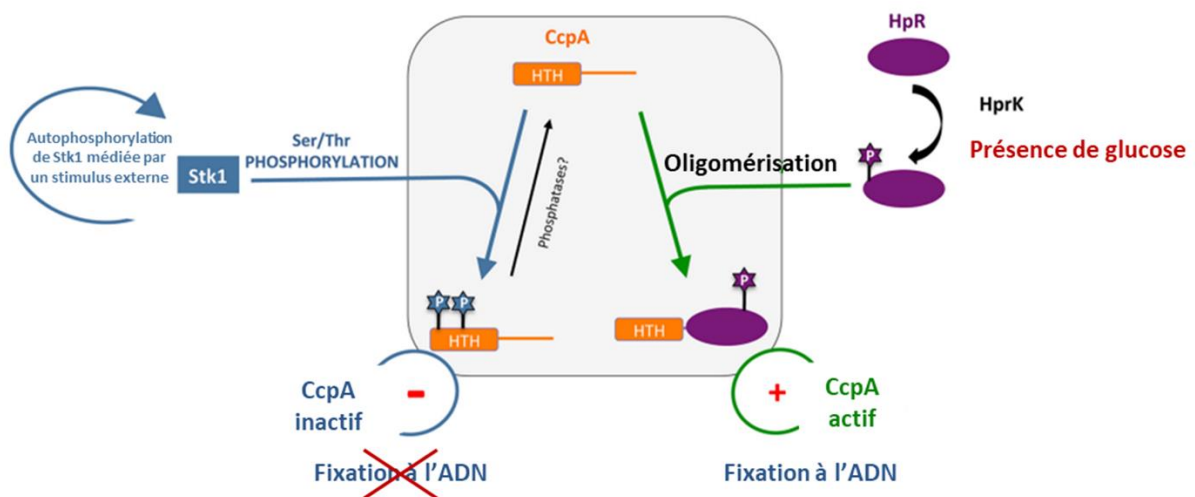


Figure 26 : Régulation de l'activité de CcpA chez *S. aureus* (adapté de Leiba et al., 2012). Domaine HTH en orange : domaine de liaison à l'ADN (hélice-couche-hélice) ; P : phosphorylation ; Ser/Thr : Sérine-Thréonine.

CcpA contrôle le catabolisme des sources de carbone, en réprimant notamment le cycle de Krebs en présence de forte concentration de glucose. CcpA a également été montré comme jouant un rôle central dans la virulence de *S. aureus*. Tout d'abord par son action sur la formation de biofilm via une régulation de la synthèse de PIA (opéron *ica*) et via le relargage d'ADNe (*cidA*) (Seidl et al., 2008). De plus, en présence de

glucose, CcpA réprime la transcription du gène *tst*, responsable de la production de la toxine TSST-1 du syndrome du choc toxique, et du gène *spa* codant la protéine A (Seidl *et al.*, 2006) (Seidl *et al.*, 2009). Cette protéine A est présente à la surface de la bactérie, elle interagit avec les anticorps de l'hôte et empêche la phagocytose du pathogène. Elle peut être également libre dans le milieu et se fixer sur les lymphocytes B, ce qui va déclencher leur processus de mort programmée, supprimant la réponse immunitaire adaptative (Kobayashi et DeLeo, 2013).

La disponibilité en glucose peut varier au cours du processus infectieux de *S. aureus*. En effet, dans les abcès, *S. aureus* est privé de glucose et d'oxygène, ce qui force la bactérie à adapter son métabolisme. A l'inverse, les personnes diabétiques ont des taux élevés de glucose dans le sérum, ce qui affecte le métabolisme des pathogènes au cours de l'invasion. Des expériences sur des souris diabétiques montrent que ces dernières sont plus susceptibles de développer une infection de la peau à *S. aureus* (Rudra et Boyd, 2020) (King *et al.*, 2020). De même, les patients diabétiques font plus d'infections à *S. aureus* et la sévérité de ces dernières est plus importante, pour autant la corrélation entre le taux élevé de glucose dans le sang et la fréquence des infections n'a pas été mise en évidence à l'heure actuelle (Muller *et al.*, 2005). Enfin, il a été montré qu'un environnement hyper-glycémique, comme dans le foie entraîne l'expression de la toxine α -hémolysine via une régulation par CcpA (Bischoff *et al.*, 2017). Lorsque *S. aureus* envahit les tissus, il rencontre également un environnement riche en glucose mais pauvre en oxygène, ce qui montre encore une fois que *S. aureus* doit s'adapter à son environnement par l'action des TCS et des FT (Vitko *et al.*, 2015). *S. aureus* rencontre des variations de concentration de glucose tout au long de l'infection, ce qui fait de CcpA un régulateur clé dans la virulence de ce pathogène.

2.2. CodY

CodY est un régulateur majeur des bactéries à Gram positif, il régule à la fois des gènes impliqués dans le métabolisme de biosynthèse des acides aminés mais aussi des gènes impliqués dans la virulence (Levdikov *et al.*, 2006). *S. aureus* est capable de synthétiser la majorité des acides aminés mais, lorsqu'ils sont disponibles, il préfère capter les acides aminés à chaîne ramifiée (BCAAs) dans l'environnement extracellulaire (Kaiser *et al.*, 2016). CodY est le régulateur principal de la voie de biosynthèse de ces acides aminés.

En condition de carence nutritive, CodY est inactif et il est retrouvé principalement sous forme de tétramère dans la cellule (**figure 27A**). La transcription des gènes impliqués dans la biosynthèse des BCAAs est donc activée et les acides aminés sont synthétisés. En présence de nutriments, CodY est majoritairement actif sous forme de dimère et se lie aux métabolites (GTP et Ile), puis se fixe en amont de ces gènes cibles pour réprimer leur transcription (**figure 27A**).

CodY est essentiellement un répresseur, agissant sous forme de dimère et en se liant au GTP et aux acides aminés à chaîne ramifiée présents dans la cellule (Levdikov *et al.*, 2006). CodY se divise en deux domaines, le domaine MBD qui fixe les métabolites (BCAAs et GTP) et le domaine DBD qui lui permet la liaison à l'ADN (**figure 27B**) (Han *et al.*, 2016). La séquence consensus de fixation pour CodY se compose de deux

régions inversées répétées : ATTTTCWGAAAATT (**figure 27A**) (Pohl *et al.*, 2009) (Majerczyk *et al.*, 2010). Si la fixation de CodY à l'ADN nécessite de l'isoleucine et du GTP, il a été montré que seule l'isoleucine est essentielle pour le fonctionnement de CodY (Pohl *et al.*, 2009).

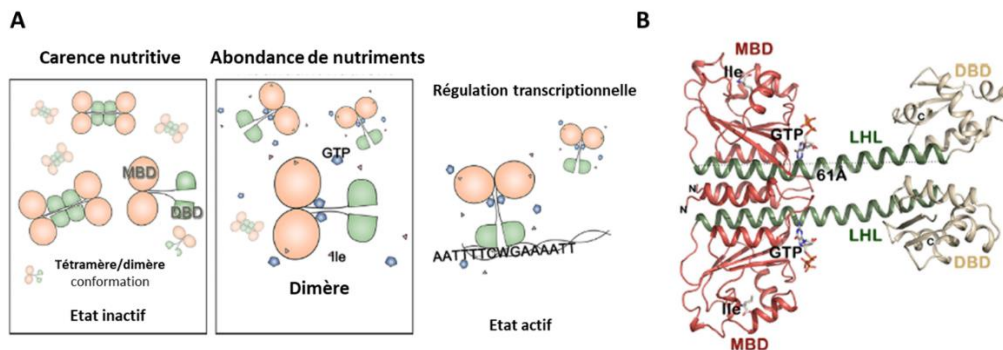


Figure 27 : Formes et structure de CodY chez *S. aureus* (d'après Han *et al.*, 2016). (A) Modèle proposé pour la régulation de CodY. (B) Cristallographie de la protéine CodY en dimère ; hélice en vert. MBD : domaine de liaison aux métabolites (GTP, Isoleucine (Ile)) ; DBD : domaine de liaison à l'ADN.

CodY est également étroitement lié à la réponse stringente (RS) par rapport au pool de GTP/ppGpp disponible dans la cellule et la disponibilité des acides aminés au cours de la croissance. En présence de nutriments, l'enzyme RSH va former du GTP à partir du ppGpp et en parallèle, CodY lié au GTP et aux BCAAs va jouer son rôle de répresseur sur la transcription de ses gènes cibles (**figure 28**). En carence nutritive, le pool de ppGpp augmente grâce à l'activité synthase de RSH, au détriment du pool GTP ce qui va activer la réponse stringente. Néanmoins l'absence de BCAAs et de GTP inactive CodY, activant par conséquent la transcription des gènes cibles (Geiger et Wolz, 2014). La carence nutritive est détectée par la présence d'ARNt non chargés dans le ribosome, ce qui activera l'activité synthase de RSH (**figure 28**). L'activation de la RS va conduire à la formation de cellules au métabolisme ralenti, qui vont économiser leurs ressources jusqu'à rencontrer des conditions plus favorables à la croissance. La RS a été montrée comme liée à la formation de cellules tolérantes aux antibiotiques (Kundra *et al.*, 2020). Par conséquent, les cibles déreprimées par l'inactivation de CodY pourraient avoir un rôle dans ce processus de tolérance.

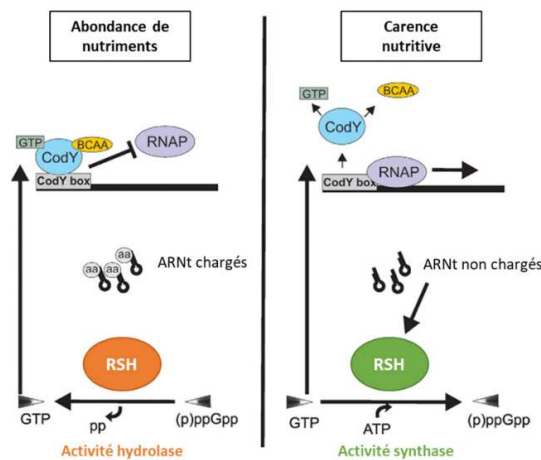


Figure 28 : Réponse stringente et CodY chez *S. aureus* (d'après de Geiger et Wolz, 2014). RNAP : ARN polymérase ; GTP / BCAA, ligands pour l'activation de CodY. CodY box : consensus de fixation de CodY en amont des gènes cibles. ARNt : ARN de transfert chargés (aa : acides aminés) ou non. RSH : enzyme centrale de la réponse stringente.

De manière globale, le régulon CodY a été beaucoup décrit ses 20 dernières années et plusieurs cibles directes ont pu être identifiées. Ces gènes jouent un rôle dans la synthèse de BCAAs (*ilvD*), le transport de protéines (*oppB*), la synthèse de la capsule (*capA*), la réponse au stress oxydatif (*katA*) ou encore le système *agr* (*rnaIII* et *agrBDCA*) (Majerczyk et al., 2010) (Roux et al., 2014).

CodY fait également partie des régulateurs de la pathogénie de *S. aureus*, en réprimant l'expression des cytotoxines (*hla*, *hlgCB*, *lukSF-PV*), et des protéases (*sspA*, *sspB*, *splB*, *aur*) (Rivera et al., 2012) (Montgomery et al., 2012). De plus, l'inactivation de CodY va indirectement permettre l'activation de différents gènes impliqués dans la formation de biofilm avec la synthèse de PIA/PNAG associés à de l'ADN extracellulaire permettant l'agrégation des cellules entre elles (Mlynek et al., 2020).

Lors d'une carence nutritive, la levée de répression par CodY en fin de croissance, semble en corrélation avec l'augmentation de la densité bactérienne et donc l'activation du Quorum sensing Agr/ARNIII. En parallèle l'activité de Rot, le répresseur des toxines chez *S. aureus* diminue au cours de la croissance (**figure 29**). Par conséquent, les deux répresseurs de la production de toxines et d'enzymes extracellulaires CodY et Rot, laissent leur place à l'activateur Agr en fin de croissance (Brinsmade, 2017). Ces actions s'inscrivent dans la propagation de l'infection par *S. aureus*, donc les régulateurs Agr, Rot et CodY semblent agir de manière synergique pour optimiser la réponse du pathogène dans l'hôte.

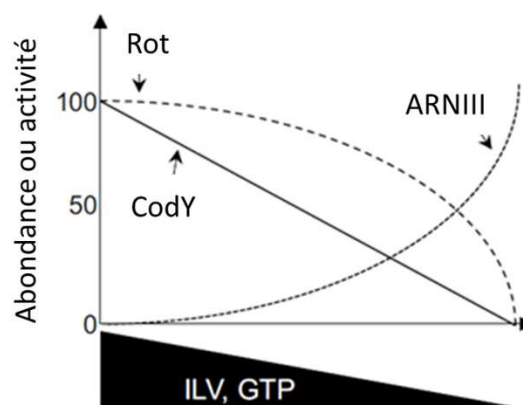


Figure 29 : Les niveaux de nutriments (ILV et GTP) influencent les niveaux ou activités des régulateurs majeurs de la virulence chez *S. aureus* (d'après Brinsmade, 2017). ILV : Isoleucine, Leucine, Valine.

2.3. Famille Sar, des régulateurs exclusifs au genre Staphylocoque

La famille Sar se compose de 10 protéines : SarA, SarR, SarS, SarT, SarU, SarV, SarX, SarZ, MgrA et Rot. Contrairement à CodY et CcpA, la famille Sar est exclusivement retrouvée dans le genre *Staphylococcus*. Cette famille a particulièrement été étudiée chez *S. epidermidis* avec SarA (Tormo et al., 2005) et SarZ (Wang et al., 2008) et chez *S. aureus* que nous allons développer dans cette partie.

Ces FT partagent tous une structure tridimensionnelle en « winged-helix », avec un domaine HTH (hélice-coude-hélice) qui leur permet de se fixer à l'ADN. Les protéines de la famille Sar ont une séquence en acides aminés différente mais possède une cystéine en commun (Cys9) qui peut être soumise à des

modifications post-traductionnelles. Cette cystéine peut être phosphorylée par la kinase Stk1 mais aussi oxydée par des ROS. Ces modifications, observées pour SarA, MgrA et SarZ, modifient leur affinité à l'ADN (**figure 30**). Cette oxydation ou phosphorylation sur le résidu cystéine empêche ces FT de se fixer à l'ADN pour réguler leurs gènes cibles (Sun et al., 2012). Les régulateurs de la famille Sar sont décrits pour agir en tant d'activateur ou répresseur, par conséquent ces modifications post-traductionnelles peuvent activer ou réprimer l'expression de gènes impliqués dans la virulence, la résistance aux antibiotiques ou encore la synthèse de la paroi (**figure 30**).

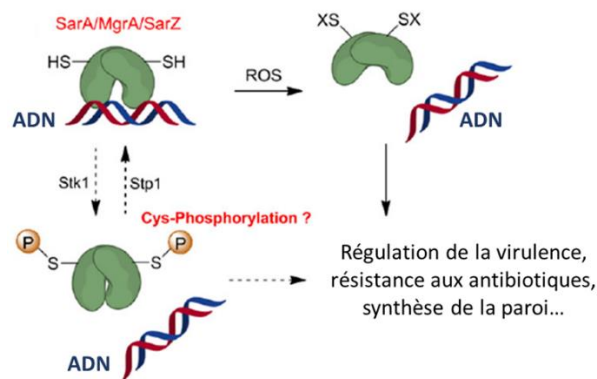


Figure 30 : Modifications post-traductionnelles des protéines SarA/MgrA/SarZ (d'après Sun et al., 2012). Les protéines sont sous forme de dimère (vert). Le résidu cystéine en extrémité Nter est fortement conservée chez les protéines SarA/MgrA/SarZ. Ce résidu est soumis à une oxydation par les ROS ce qui dissocie les protéines de l'ADN. La phosphorylation de ce même résidu par Stk1-Stp1 pourrait également moduler la régulation des gènes cibles.

Les gènes *sar* sont exprimés différemment au cours de la croissance, mais la plupart d'entre eux sont retrouvés au cours de la phase exponentielle de croissance (Ballal et Manna, 2009). Ils agissent sous forme de dimère sauf SarS et SarU dont la taille est plus grande et conforment des monomères. Néanmoins cette structure en monomère tend à mimer un dimère de petites protéines (Cheung et al., 2008). Les dimères sont souvent de type homodimère, mais il a été montré que SarA, MgrA et SarZ pouvaient former des hétérodimères (Sun et al., 2012). De plus, ces FT régulent leur expression entre eux, ce qui complexifie le réseau de régulation Sar (**figure 31**). La plupart de ces FT exerce un statut répresseur sauf SarZ et MgrA qui s'activent mutuellement, et SarT et Rot qui régulent positivement SarS.

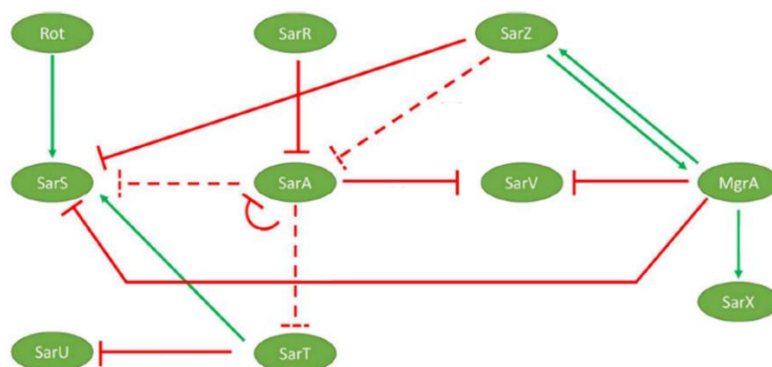


Figure 31 : Inter-régulations des membres de la famille Sar chez *S. aureus* (d'après la thèse de Tony Mauro, 2017). Les traits rouges indiquent des répressions et ceux en vert indiquent des activations.

Ces régulateurs transcriptionnels sont impliqués dans de nombreuses fonctions chez *S. aureus*, comme notamment la formation de biofilm, le processus d'autolyse ou encore la production d'exoprotéines (Cheung et al., 2008) (Ballal et al., 2009). Les régulateurs Sar jouent donc un rôle majeur dans l'expression des facteurs de virulence, c'est pourquoi cibler ces protéines d'un point de vue thérapeutique a déjà été initié pour limiter la sévérité des infections staphylococciques. Des petites molécules inhibitrices ont été testées sur MgrA et SarA, et ont montré leur efficacité sur modèles animaux (Sun et al., 2011) (Arya et al., 2015).

Dans cette partie, nous allons nous intéresser aux fonctions des régulateurs Rot, MgrA et SarA chez *S. aureus*.

a) Rot (Repressor of Toxins)

Rot, répresseur des toxines, peut agir en tant que répresseur ou activateur de ses gènes cibles. Chez *S. aureus*, une analyse transcriptomique a montré que Rot activerait plus de 80 gènes et en réprimerait plus de 60 (Said-Salim et al., 2003). Rot contrôle la production de nombreux facteurs de virulence : il réprime l'expression des protéases codées par les opérons *spl* et *ssp*, de la lipase (*geh*) et de l'hémolysine α via la régulation du TCS SaeRS (Jenul et Horswill, 2019). Cependant, Rot agit comme activateur, sur l'expression de la protéine A (*spa*) ou de protéines ayant des propriétés super-antigéniques (Said-Salim et al., 2003) (Benson et al., 2011).

Par ailleurs, l'ARN régulateur ARNIII du système QS Agr réprime la production du régulateur *rot* via interaction ARN-ARNm, qui bloque la traduction de l'ARNm *rot* (Boisset et al., 2007). Pour autant, les régulateurs Rot et Agr sont intimement liés puisque leur régulations se superposent dans le sens où ils partagent un certain nombre de cibles communes mais montrent également des régulations opposées (Said-Salim et al., 2003).

b) MgrA

Le facteur de transcription MgrA, anciennement Rat ou NorR, a été initialement identifié comme le régulateur de *NorA*, une pompe à efflux multi-drogues qui confère la résistance aux antibiotiques de la famille des quinolones (Ng et al., 1994) (Truong-Bolduc et al., 2003). Il a été montré que MgrA régule également les pompes à efflux *NorB* et *NorC* (Truong-Bolduc et al., 2006), ce qui indique que MgrA est impliqué dans les mécanismes de résistance aux antibiotiques. Quand MgrA est phosphorylée, il est capable de se fixer au promoteur de *norB*, jouant un rôle de répresseur alors que quand MgrA est déphosphorylée, il peut activer l'expression de *norA* en se fixant sur sa région promotrice (Jenul et Horswill, 2019). La fixation de MgrA à l'ADN est médiée par la phosphorylation par la kinase *Stk1* et la déphosphorylation par *RsbU*, ce qui peut causer des différences de fonctions de MgrA en fonction des souches de *S. aureus* (Junecko, 2012). La transcription de *mgrA* est médiée par deux promoteurs P1 et P2, et l'ARNm produit par le promoteur P2 est stabilisé par l'ARN régulateur ARNIII (Gupta et al., 2015). L'expression de *mgrA* est également activée par le système TCS *ArlRS* (**figure 21**).

De manière directe ou indirecte, MgrA affecte l'expression d'au moins 175 gènes de manière positive et 180 gènes de manière négative chez *S. aureus* (Luong et al., 2006). Globalement, MgrA est un régulateur qui favorise la formation de la capsule et l'agrégation des cellules entre elles au détriment de la formation de

biofilm (Trotonda *et al.*, 2008) (Crosby *et al.*, 2016) (Li *et al.*, 2019) (Lei et Lee, 2020). Il joue un rôle majeur dans l'autolyse car MgrA régule les TCS *lytSR* et *alrRS* ainsi que les autolysines *lytM* et *lytN* (Ingavale *et al.*, 2005).

MgrA et SarA sont capables de réprimer l'expression de *sarV*, *sarS* et *sarT* (Ballal *et al.*, 2009), et donc pourraient agir de manière synergique pour réguler d'autres gènes cibles chez *S. aureus*.

c) Le régulateur majeur SarA (Staphylococcal accessory regulator A)

Le régulateur SarA est l'un des plus décrits dans la famille Sar. La transcription de *sarA* est sous le contrôle de trois promoteurs, P2, P3 et P1, ne donnant naissance à une seule protéine : SarA. Les promoteurs P2 et P1 sont régulés positivement par le facteur σ^A alors que le promoteur P3 est sous le contrôle du facteur de réponse au stress σ^B (Manna *et al.*, 2017). SarR réprime l'expression de *sarA* sur les trois promoteurs et enfin SarA s'autorégule négativement sur les promoteurs P1 et P3 (**figure 32**). SarA est capable d'activer le système Agr alors qu'il réprime l'expression des régulateurs *rot*, *sarT* et *sarS*, ce qui se traduit par une production de toxines et une répression de la protéine A (Spa) (**figure 32**). De plus, le gène sARN *teg49* est localisé dans la région promotrice de *sarA*, et il a été montré que Teg49 régule des gènes de virulence indépendamment de SarA (Manna *et al.*, 2017).

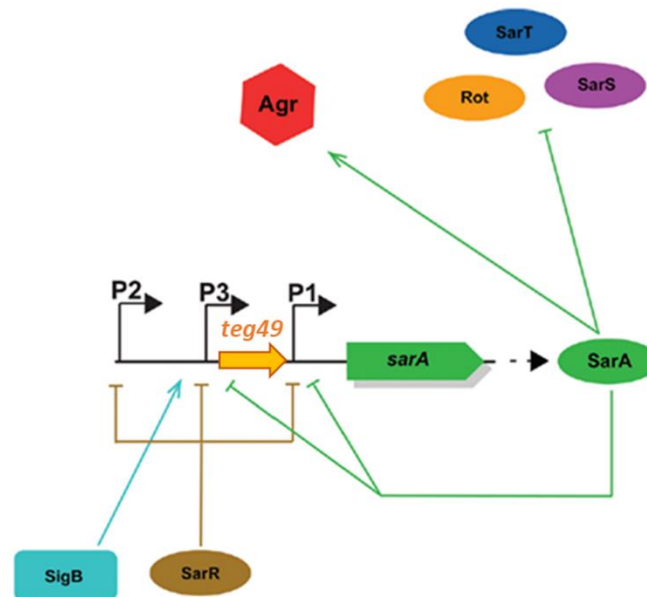


Figure 32 : La région promotrice *sarA* et le réseau de régulation de SarA (adapté de Jenul et Horswill, 2019).

Concernant la séquence consensus de fixation de SarA, elle fait l'objet de débat depuis une vingtaine d'années. En effet, plusieurs séquences ont été proposées (**figure 33**) :

- AAATNTAATTTGTATTNAATATTTTANTN : 30 nucléotides (Chan et Foster, 1998)
- TTTGTATTTAATATTTATATAATTG : 26 nucléotides (Chien *et al.*, 1999)
- ATTTTAT : 7 nucléotides (Sterba *et al.*, 2003)

L'alignement de ces séquences consensus tend à faire ressortir une séquence commune de 20 nucléotides conservés, contenant le consensus de 7 nucléotides proposé par Sterba et al (**figure 33**). Cette séquence ATTTGTATTTAATATTTNATA montre que la protéine SarA se fixe majoritairement sur des séquences riches en adénine (A) et thymine (T), ce qui reste en cohérence avec les séquences -10 et -35 des zones promotrices et un effet sur la régulation transcriptionnelle. De la même manière que pour la protéine MgrA, l'état de phosphorylation de SarA impacte sa capacité à fixer l'ADN (Didier et al., 2010). Enfin, SarA a été décrite comme une protéine architecturale, c'est-à-dire que sa fixation modulerait la conformation du chromosome bactérien et donc rendrait des zones plus ou moins accessibles aux autres régulateurs (Schumacher et al., 2001).

```

Chan : AAATATAATTTGTATTTAATATTTAATA----
Chien : -----ATTTGTATTTAATATTTATATAATTG
          ***** **
Consensus : ATTTGTATTTAATATTTwwATA
Sterba : ATTT AT
          **** **

```

Figure 33 : Alignements de séquences consensus de SarA. W signifie A ou T.

Par ailleurs, SarA est une protéine très affine pour les acides nucléiques, et est aussi capable de se fixer à l'ARN. Cette fixation peut jouer un rôle dans la stabilité et la demi-vie de certains ARNm, comme l'ARNm *spa* (Morrison, 2012).

Le **tableau 4** permet de répertorier l'ensemble des cibles directes de SarA qui ont été démontrées par expérience d'empreinte à la DNase ou par retard sur gel. Depuis plus de 20 ans, cette protéine SarA est étudiée pour son impact dans l'ensemble des réseaux de régulation chez *S. aureus*.

	Gènes réprimés par SarA	Gènes activés par SarA
Expériences d'empreinte à la DNase I montrant le site de fixation de SarA	<i>spa</i> (Chien et al., 1999) <i>sarA</i> (Cheung et al., 2008) <i>sarV</i> (Manna et al., 2004) <i>srn_3610_sprC</i> (Mauro et al., 2016) <i>srn_9340</i> (Mauro et al., 2016)	<i>agr</i> (Chien et Cheung, 1998) <i>hla</i> (Chien et al., 1999) <i>fnbA</i> (Wolz et al., 2000) <i>tst</i> (TSST-1) (Andrey et al., 2010) <i>fntA</i> (Zhao et al., 2012)
Expériences de gel retard entre la séquence du gène cible et SarA	<i>trxB</i> (Ballal et Manna, 2010) <i>sodM sodA</i> (A. Ballal et Manna, 2009) <i>ena</i> (Blevins, 2002) Protéases <i>sspA</i> – <i>sspB</i> – – <i>aur</i> (Jan Oscarsson et al., 2006) <i>nuc</i> (Cassat et al., 2006)	Hémolysine β (Ziebandt et al., 2001) Système TA <i>mazEF</i> (Donegan et Cheung, 2009) <i>icaADBC</i> (Valle et al., 2003) (Cerca et al., 2008)

Tableau 4 : Cibles directes de SarA démontrées par des expériences d'empreinte à la DNase I, par retard sur gel ou par transcriptomique. Système TA : système toxine-antitoxine. En rouge, les régulateurs ; en bleu, les gènes sARNs ; en orange, les gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant ; en vert, les gènes impliqués dans l'adhésion (MSCRAMMs) ; en noir, les gènes impliqués dans la formation/dispersion de biofilm, la production de toxines, ou l'échappement au système immunitaire.

De l'analyse des gènes cibles de SarA, reportés dans le tableau 4, SarA semble impliquer dans de grandes fonctions comme : la formation de biofilm, la réponse au stress oxydant, la résistance aux antibiotiques ou encore l'expression de facteurs de virulence, ce qui fait de SarA un régulateur majeur chez *S. aureus*.

❖ *SarA et la formation de biofilm :*

SarA est un activateur de l'opéron *icaADBC*, qui permet la production de PIA et initie la formation de biofilm. Au niveau phénotypique, une souche mutée pour le gène *sarA* est incapable de former du biofilm cela serait dû à son incapacité à réguler le locus *ica* et donc à son incapacité à produire la matrice du biofilm (Valle et al., 2003). De plus, SarA est connue pour réprimer la production de protéases (*aur* et *sspA*) qui peuvent jouer un rôle dans la dispersion du biofilm (Jan Oscarsson et al., 2006). Par conséquent, SarA favorise la formation du biofilm chez *S. aureus* et limite sa dispersion.

❖ *SarA et la résistance aux antibiotiques :*

S. aureus est une bactérie qui peut être multirésistante aux antibiotiques, causant un vrai problème de santé publique. Il a été démontré que SarA pourrait favoriser l'antibiorésistance chez ce pathogène. En effet, une souche délétée du gène *sarA* est plus sensible aux antibiotiques de la famille des β -lactamines (Li et al., 2016) et réduit le développement de la résistance à la ciprofloxacine et à la vancomycine (Lamichhane-Khadka et al., 2009). SarA régule également positivement l'expression de *fntA*, protéine impliquée dans la résistance à la méthicilline (Zhao et al., 2012). Ces études montrent l'importance de SarA pour développer des mécanismes de résistance aux antibiotiques chez *S. aureus*.

L'intérêt pour le régulateur transcriptionnel SarA n'est pas nouveau, dans les années 2000 il a été l'objet d'études à plus grande échelle grâce aux techniques de puces à ADN. Ainsi ces analyses transcriptomiques ont révélé une partie du régulon SarA chez les souches *S. aureus* RN27 (Dunman et al., 2001) et UAMS-1 (Cassat et al., 2006). Dunman et al ont décrit 46 gènes réprimés par SarA et 78 gènes activés par SarA contre 18 gènes régulés dans l'étude de Cassat et al. En 2016, il a été démontré que SarA réprimait l'expression de deux gènes sARNs, *sprC* et *srn_9340* (Mauro et al., 2016), des gènes sARNs qui pourraient ne pas être des cas isolés chez *S. aureus*.

3. Les régulations croisées des facteurs de transcription : une question d'espace et de temporalité

Chez *S. aureus*, les réseaux de régulation s'entremêlent, les FT peuvent avoir des cibles en commun ce qui permet à la bactérie de coordonner ses réponses. Dans cette partie, nous allons développer des exemples de régulation temporelle, spatiale ou encore multiples sur différents gènes.

3.1. Temporalité entre SarA et SarR sur le locus *agr*

Le système Agr est crucial pour passer d'un mode colonisation à un mode dissémination, par conséquent sa régulation rigoureuse est essentielle pour optimiser une réponse coordonnée entre les bactéries au cours de l'infection (Queck et al., 2008).

Les auteurs Reyes et *al.*, ont démontré que le promoteur P2 qui contrôle l'expression d'*agrBDCA* possède des sites de fixation pour plusieurs régulateurs. Il contient 4 sites de fixation pour le régulateur majeur du locus, AgrA. En phase exponentielle de croissance, AgrA se fixe en amont du promoteur P2, ce qui induit une courbure d'ADN renforcée par la fixation du dimère SarA (**figure 34**). Cette courbure pourrait permettre l'interaction de deux dimères AgrA. Cette configuration améliore le recrutement de l'ARN polymérase et initie la transcription des gènes *agrBDCA*. En fin de phase exponentielle de croissance, le régulateur SarA laisse sa place au régulateur SarR, qui a une meilleure affinité pour cette région promotrice. En effet, SarA et SarR partagent un site de fixation chevauchant en amont du promoteur P2 (**figure 34**). La fixation de SarR va permettre de linéariser l'ADN, ce qui va entraîner une diminution de l'efficacité de recrutement de l'ARN polymérase et donc une diminution de l'expression des gènes *agrBDCA* (Reyes et *al.*, 2011).

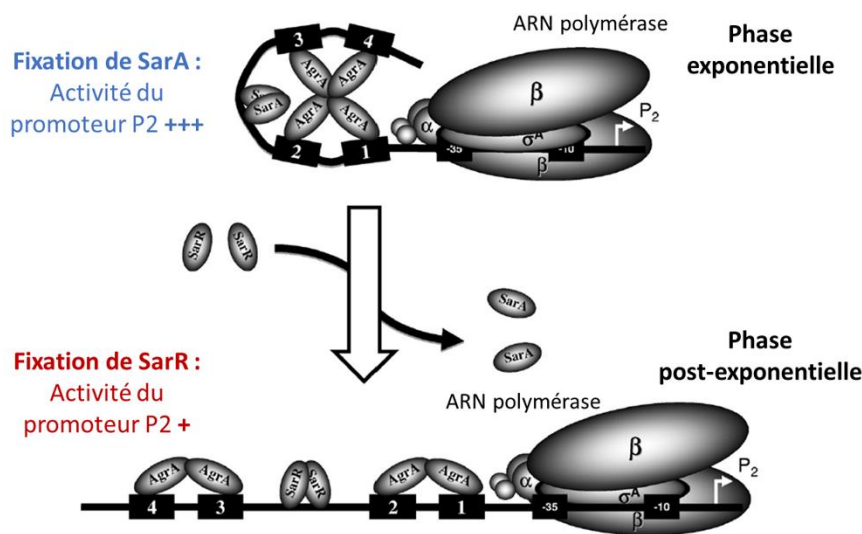


Figure 34 : Modèle de régulation du promoteur P2 du locus *agr* chez *S. aureus* (d'après Reyes et *al.*, 2011).

Avec cette étude sur la régulation du promoteur P2 du locus *agr* au cours de la croissance, nous avons ici un exemple de cascade d'intervention temporelle des FT de la famille Sar, SarA et SarR.

3.2. Compétition entre CodY et SaeR

Dans ce second exemple, nous allons aborder la régulation croisée entre CodY et le régulateur de réponse SaeR qui appartient au système à deux composants SaeRS. Ces deux régulateurs interviennent dans la régulation de multiples facteurs de virulence. Il a été montré que CodY régule l'expression du locus *saePQRS* en réprimant son expression lorsque la bactérie se trouve dans un milieu riche en nutriments (**figure 35**). La séquence de fixation de CodY partage une partie de la séquence consensus de SaeR. Par conséquent, lors d'une forte présence en nutriments dans le milieu, CodY se fixe sur sa séquence de reconnaissance et masque la séquence de fixation de SaeR, les gènes cibles sont donc réprimés par CodY. Au fur et à mesure de la croissance, la disponibilité en nutriments commence à diminuer et CodY devient de moins en moins actif et laisse sa place sur l'ADN au régulateur SaeR phosphorylé par l'activation du système TCS. SaeR va

pouvoir activer l'expression de ses gènes cibles, comme la production de cytotoxines (**figure 35**) (Mlynek et al., 2018).

CodY et SaeR sont donc deux régulateurs antagonistes, CodY réprime les gènes cibles lors d'une forte présence de nutriments, et SaeR peut activer ces gènes quand les nutriments commencent à manquer. L'action de ces deux FT influence donc de manière séquentielle la régulation de facteurs de virulence du pathogène *S. aureus*. De plus, SaeRS agit en synergie avec le système Agr lors de la mise en place du Quorum sensing (Novick et Jiang, 2003).

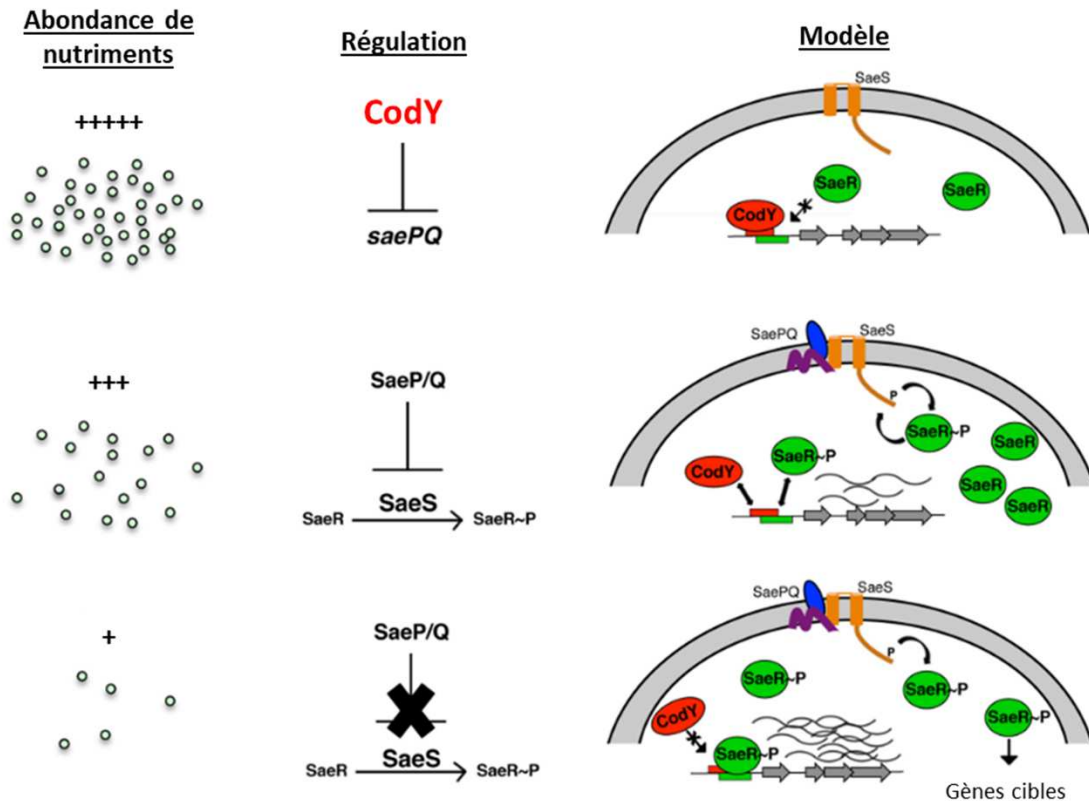


Figure 35 : Régulation croisée en CodY et SaeR chez *S. aureus* (d'après Mlynek et al., 2018).

CodY agit donc comme un régulateur principal de la pathogénèse en liant la disponibilité des nutriments à l'expression des gènes de virulence en régulant le TCS SaeRS.

3.3. L'exemple de la multi-régulation

a) Le cas du gène *cap*

La biosynthèse de la capsule chez *S. aureus* est contrôlée de manière rigoureuse au niveau transcriptionnel. Cette régulation donne un phénotype hétérogène dans la population, et elle est observée chez des cellules qui ne se divisent plus. Au cours de l'infection, la capsule joue un rôle dans l'évasion immunitaire du pathogène. Cette biosynthèse de la capsule est médiée par les gènes *cap* qui sont sous le contrôle limité du facteur SigA, qui a très peu d'affinité pour cette région ADN. L'expression de *cap* n'est

donc pas constitutive via l'action du facteur SigA, elle va donc être soumise à la transduction de divers signaux qui vont recruter différents régulateurs. En effet, le facteur alternatif de réponse au stress SigB et des répresseurs comme CodY et Rot peuvent se fixer dans la région promotrice du gène *cap* (**figure 36**). Ces répresseurs se fixent en amont de la séquence promotrice et répriment la transcription de l'opéron *cap*. L'interférence coordonnée de ces répresseurs avec l'activité du facteur SigB assurent une régulation rigoureuse de la synthèse de la capsule chez ce pathogène, qui répondrait à un stress spécifique perçu par SigB (Keinhörster et al., 2019).

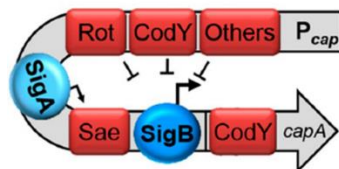


Figure 36 : Régulation transcriptionnelle du gène *capA* (d'après Keinhörster et al., 2019). P_{cap} : promoteur du gène *cap* ; en rouge les facteurs de transcription et en bleu les facteurs σ .

b) Le cas du gène *tst(H)*

La toxine responsable du syndrome du choc toxique TSST-1 est codée par le gène *tst(H)*, porté par un élément génétique mobile qui n'est pas présent dans toutes les souches de *S. aureus* (îlot de pathogénie SaP11). L'expression de ce gène est soumise à nombreux réseaux de régulation répondant à divers signaux environnementaux : Quorum sensing, le pH ou encore la présence d'antibiotiques (**figure 37**). L'ensemble de ces signaux intègre différents facteurs de réponse comme de nombreux répresseurs. Par exemples, SarA et Rot agissent en amont ou dans la région promotrice du gène *tst(H)* alors que CcpA masque le site RBS empêchant l'initiation de la traduction. Le facteur SigB joue un rôle crucial dans l'expression de cette toxine, en activant en amont des facteurs de transcription (Andrey et al., 2015).

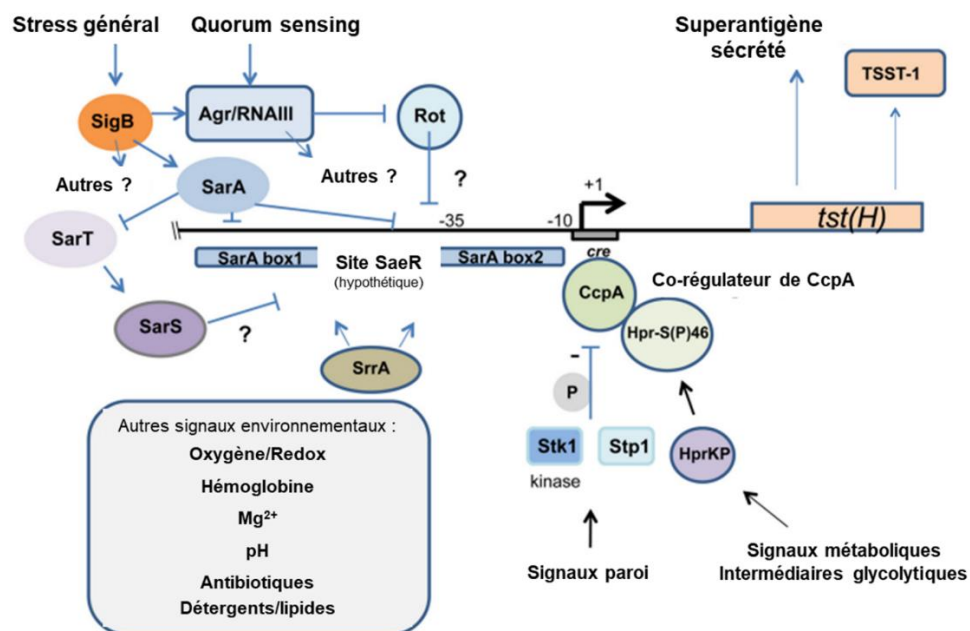


Figure 37 : Multi-régulation du gène *tst(H)* chez *S. aureus* (d'après Andrey et al., 2015).

La régulation de l'expression du gène *tst(H)* illustre un exemple des nombreuses boucles de régulations dans lesquelles sont imbriquées des FT de différentes familles et le facteur SigB chez *S. aureus*.

3.4. Quand les FT interagissent entre eux...

Chez *Bacillus subtilis*, les FT CodY et CcpA jouent un rôle clé dans la régulation des gènes et coordonnent leur action. Par exemple, l'expression de l'opéron responsable de la biosynthèse des BCAAs (*ilvBHC-leuABCD*) est réprimée par CodY. Quand les cellules rencontrent un excès de carbone, CcpA stimule la transcription de l'opéron *ilvBHC*, et conduit à la synthèse des BCAAs. Ces BCAAs augmentent la capacité de CodY à se fixer à l'ADN. CodY va donc pouvoir réprimer de nombreuses voies qui vont réorienter les voies métaboliques et répondre à l'excès de carbone. D'autre part, étant donné que CcpA et CodY activent les voies de débordement du carbone lorsque le glucose est en excès, l'activité accrue de CodY générée par CcpA accentue cette coopération (Richardson et al., 2015).

D'autre part, Wunsche et al ont démontré que CodY et CcpA pouvaient interagir et ensemble recruter l'ARN polymérase chez *B. subtilis*. En effet, CcpA peut interagir avec RpoA, la sous-unité α de l'ARN polymérase. Lors d'un excès de glucose, CcpA-HPr-P (forme active de CcpA) peut se lier à RpoA et à CodY fixé à l'ADN (**figure 38**). L'ensemble de ces interactions formerait un complexe d'initiation de la transcription et permettrait l'expression du gène cible (Wünsche et al., 2012).

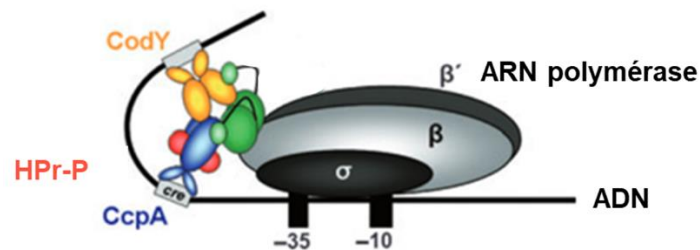


Figure 38 : Modèle de l'activation transcriptionnelle chez *Bacillus subtilis* (d'après Wünsche et al., 2012). La représentation schématique montre l'arrangement de CcpA, CodY et de l'ARN polymérase. En bleu, l'homodimère CcpA, en rouge le co-régulateur de CcpA, HPr-P (HPr-phosphorylé), en orange l'homodimère CodY, en vert, l'homodimère de la sous-unité α de l'ARNP, RpoA.

Récemment, les double régulations CodY et CcpA ont été étudiées chez *S. aureus*. Une analyse transcriptomique a été réalisée dans la souche *S. aureus* UAMS-1 en comparant les transcriptomes des mutants UAMS-1 $\Delta ccpA$, UAMS-1 $\Delta codY$ et le double mutant UAMS-1 $\Delta ccpA/\Delta codY$. Ce double mutant partage des caractéristiques similaires à la fois au mutant UAMS1 $\Delta ccpA$ et au mutant UAMS1 $\Delta codY$. Néanmoins, les mutations *codY* et *ccpA* peuvent avoir des effets opposés, notamment au niveau de la production de toxines avec une surexpression de toxines dans le mutant UAMS-1 $\Delta codY$. Dans le double mutant comme aucune augmentation de la production de toxines n'est observée cela indique que le phénotype *ccpA* est dominant par rapport au phénotype *codY* (Bullock, 2021).

L'interaction physique entre CodY et CcpA observée chez *B. subtilis*, serait à confirmer chez *S. aureus*, ce qui permettrait de mieux comprendre les liens entre ces deux régulateurs centraux du métabolisme.

4. Souches de *S. aureus* disponibles pour étudier les réseaux de régulation

Différentes souches de *S. aureus* sont disponibles en laboratoire pour étudier les réseaux de régulation chez ce pathogène (Herbert et al., 2010). Néanmoins chaque souche possède ses particularités et notamment des mutations spécifiques qui sont responsables de régulations divergentes pour l'expression des facteurs de virulence (**tableau 5**).

Souches	Caractéristiques principales
NCTC8325 (RN1)	Mutation dans les gènes <i>rsbU</i> et <i>tcaR</i>
Newman	Mutation dans le TCS SaeRS
UAMS-1	Délétion des FT <i>sarT</i> et <i>sarU</i>
N315	Délétion du gène <i>arlR</i> (TCS ArlSR)
COL	Défaut dans le système <i>agr</i> (moins virulent)
USA300	Phénotype unique : surproduction de Hla et Spa

Tableau 5 : Souches de *S. aureus* disponibles pour étudier les réseaux de régulation (d'après Herbert et al., 2010).

La souche NCTC8325 est étudiée depuis plus de 50 ans, de ce fait de nombreuses données ont été accumulées sur ses réseaux de régulation. C'est pourquoi différentes souches ont été construites à partir de cette dernière. Nous nous attarderons en particulier sur les souches : HG001, HG003 et RN4220 (**figure 39**). Pour la souche HG001, le gène *rsbU*, impliqué dans la régulation du facteur σ^B a été restauré et dans la souche HG003 les deux gènes défectueux *rsbU* et *tcaR* ont été restaurés afin de rétablir l'ensemble des réseaux de régulation (**figure 39**). Enfin la souche RN4220 est mutée dans le système de modification/restriction de l'ADN et sert d'intermédiaire pour les clonages entre *Escherichia coli* et la souche finale de *S. aureus*. En effet, RN4220 permet d'adapter les modifications épigénétiques de l'ADN plasmidique pour qu'il soit plus facilement transformable dans les autres souches de *S. aureus*.

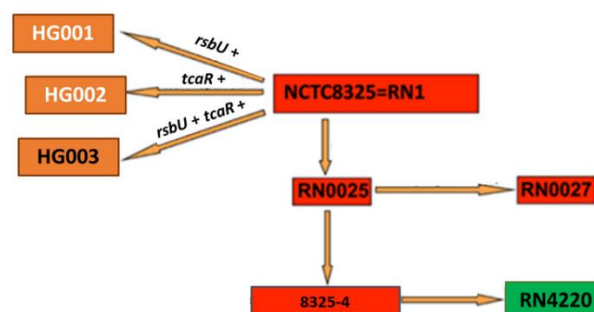


Figure 39 : Souches disponibles à partir de *S. aureus* NCTC8325 (adapté de Herbert et al., 2010).

Nous venons d'avoir un aperçu des nombreux acteurs protéiques de la régulation que sont les facteurs Sigma, les TCS ou encore les FT, il existe cependant une autre classe de régulateurs : les ARN régulateurs.

E. Les ARN régulateurs

1. Caractéristiques des ARN régulateurs

Les régulateurs protéiques ont été largement décrits dans le monde bactérien, néanmoins il existe d'autres types de régulateurs de type ARN : les ARN régulateurs (ARNreg). Ces ARNreg permettent à la bactérie de s'adapter rapidement sans avoir recours à la synthèse protéique ni aux modifications post-traductionnelles. Ainsi, la réponse à un stress environnemental peut être plus rapide et moins énergivore pour la bactérie. Ces ARNreg sont capables de réguler la quantité d'une cible après interaction avec celle-ci.

Les potentiels ARNreg pour lesquels aucune fonction ou cible ne leur ont été attribués à l'heure actuelle, seront appelés sARNs dans le manuscrit, pour « Small ARN ».

Et s'il est difficile de définir parfaitement les ARNreg, ils ont pour caractéristiques d'être en général de petite taille (une centaine de nucléotides), non codants, et leur demi-vie est plus longue que celle des ARNm (Pichon et Felden, 2005). En 2018, les sARN dit « *Bona Fide* » sont décrits comme possédant leur propre promoteur et terminateur de transcription et leur transcription n'est pas chevauchante à celle du brin opposé (Liu et al., 2018). Chez les bactéries à Gram négatif, des protéines chaperones comme Hfq et ProQ peuvent être nécessaires à la fonction des ARNreg (Melamed et al., 2020), mais, à ce jour, aucune chaperone ne semble nécessaire à leur fonctionnement chez *S. aureus* (Bohn et al., 2007). La mise au point des techniques de séquençage à haut débit et les analyses bio-informatiques ont permis de mettre à jour de nouveaux ARNreg chez les bactéries (Barquist et Vogel, 2015).

Pour pouvoir centraliser les connaissances sur les ARNreg chez *S. aureus* et simplifier leur nomenclature, la base de données SRD (Staphylococcal RNA Database) a été créée, au sein du laboratoire. Elle donne un nom Srn_ à chaque sARN identifié chez ce pathogène par de multiples données transcriptomiques et regroupe les différents noms assignés pour le même ARN dans différentes souches (Sassi et al., 2015). La découverte de nouveaux ARNreg a remis en question les caractéristiques descriptives des ARNreg comme par exemple des ARNreg qui font plus de 1000nt (Srn_1590_RsaC) (Lalaouna et al., 2019), ou encore ceux qui codent des peptides (Sorensen et al., 2020).

Au niveau mécanistique, les ARNreg peuvent interagir avec des cibles protéiques ou ARN. Dans cette partie, nous traiterons seulement les cibles types ARN, qui sont la plupart du temps des cibles type ARNm et qui sont régulées au niveau traductionnel par interaction ARN-ARN.

Ainsi, la répression traductionnelle s'effectue soit (i) par un appariement entre l'ARNreg et l'ARNm au niveau du site de fixation du ribosome (TIR, ou RBS), bloquant ainsi l'initiation de la traduction ou (ii) par le recrutement de RNases qui vont dégrader l'ARNm cible (**figure 40**). A l'inverse, l'activation traductionnelle se manifeste soit (i) par la libération du site TIR de l'ARNm ou (ii) par la stabilisation de l'ARNm en empêchant sa dégradation par le recrutement de RNases (**figure 40**).

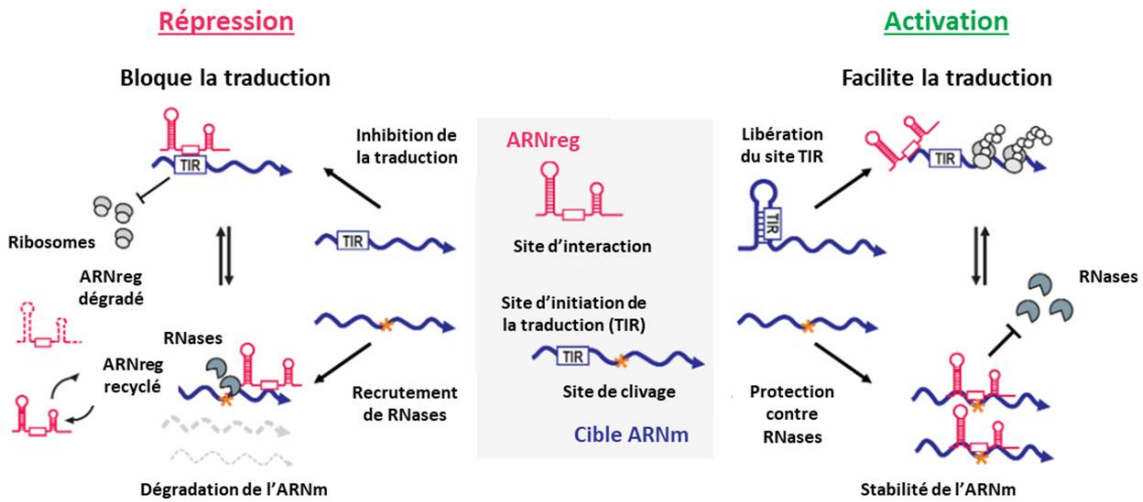


Figure 40 : Mécanismes d'action des ARN régulateurs sur les ARN messagers (adapté de Svensson et Sharma, 2016). TIR : site de fixation du ribosome.

Dans tous les cas, l'ARNreg interagit de manière spécifique avec sa cible ARNm. Cette interaction peut être parfaite, c'est-à-dire que l'appariement nucléotidique est identique, c'est souvent le cas pour les ARNreg sur le brin opposé à la cible, on dit que ces ARNreg agissent en « *cis* ». Pour les ARNreg ayant un appariement imparfait avec leur cible, on dit qu'ils agissent en « *trans* » et sont souvent localisés ailleurs sur le chromosome bactérien.

1.1. ARN régulateurs en « *cis* »

Parmi les ARNreg en « *cis* », deux catégories sont à distinguer ceux codés en « *cis* » c'est-à-dire ceux pour lesquels le gène exprimant l'ARNreg se situe sur le brin opposé à la cible leur permettant un appariement ARN-ARN parfait avec la région 5'UTR, 3'UTR ou l'ORF de la cible (**figure 41A**).

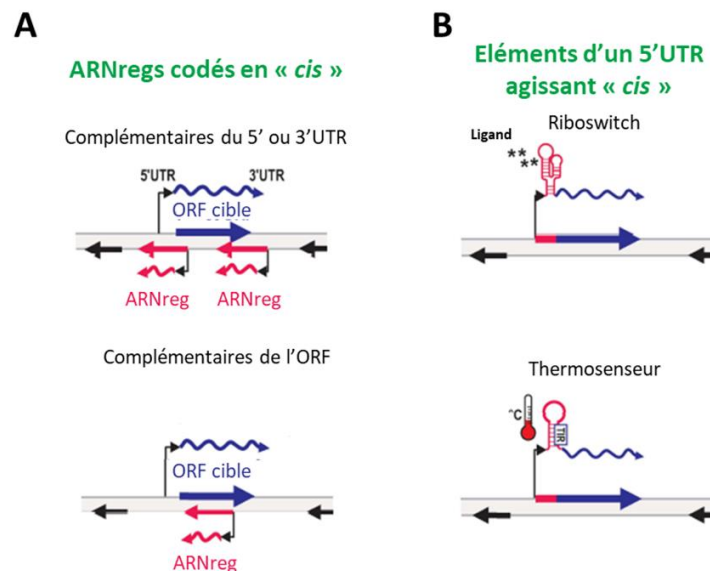


Figure 41 : Localisation des ARN régulateurs en « *cis* » (adapté de Svensson et Sharma, 2016). (A) ARN codés en « *cis* », sur le brin opposé à la cible. (B) Riboswitch ou thermosenseur localisé en amont de la cible. ORF : cadre ouvert de lecture ; 5'/3'UTR : Régions transcrites non traduites. (*) : ligand du riboswitch ; TIR : site de fixation du ribosome.

La deuxième catégorie d'ARNs en « *cis* » sont localisés dans la région 5'UTR de la cible, et agissent comme un senseur de l'environnement en tant que thermosenseur (sensible à la température) ou riboswitchs (interaction avec un ligand) (**figure 41B**).

Les riboswitchs sont généralement des aptamères qui se localisent dans la région 5'UTR de la cible qu'ils régulent au niveau transcriptionnel ou traductionnel. Les riboswitchs possèdent deux domaines fonctionnels : un domaine de reconnaissance pour un ligand/métabolite et une plateforme d'expression. La fixation du ligand entraîne un changement de conformation de l'ARN riboswitch qui conduit à la terminaison de la transcription ou à l'arrêt de l'initiation de la traduction (Felden et Augagneur, 2021).

Si le ligand est un ARN de transfert, on parle alors de riboswitch type T-box. Ces riboswitchs T-box sont situés en amont de gènes responsables de la biosynthèse d'acides aminés (Kreuzer et Henkin, 2018). Ainsi la présence d'ARNt chargés en acide aminé va conditionner la production endogène de ces derniers par la bactérie. Quand l'ARNt chargé se fixe sur le riboswitch, cette interaction forme une structure terminatrice et la transcription est alors arrêtée (**figure 42A**). Quand l'ARNt est non chargé, l'interaction avec le riboswitch forme une structure anti-terminatrice qui va permettre l'expression des gènes en aval (**figure 42B**).

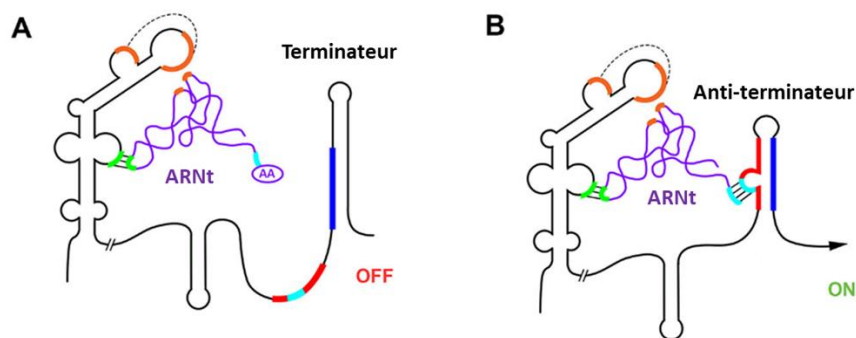


Figure 42 : Mécanisme T-box riboswitch (d'après Kreuzer et Henkin, 2018). (A) Situation où l'ARN de transfert (ARNt) est chargé et sa fixation induit une structure terminatrice de la transcription sur l'ARN. (B) Situation où l'ARNt est non chargée, sa fixation induit une structure anti-terminatrice par appariement des séquences rouge et bleue sur l'ARN. En violet : l'ARN de transfert chargé ou non d'un acide aminé (AA).

Les gènes régulés par les riboswitchs sont impliqués dans la biosynthèse, le catabolisme, la signalisation ou le transport de son métabolite de liaison, ce qui crée un mécanisme de régulation par rétroaction négative pour maintenir les niveaux adéquats de cette molécule dans les processus métaboliques (Mandal et Breaker, 2004). Lorsque les niveaux du métabolite augmentent, la liaison au riboswitch se produit, entraînant une régulation à la baisse des niveaux d'expression des gènes liés au métabolite et, par conséquent, du métabolite lui-même. Ce mécanisme de rétroaction négative peut être considéré comme une réaction rapide aux changements de concentration de métabolites environnementaux qui ne nécessite pas l'assistance d'autres molécules, ce qui minimise par conséquent le gaspillage d'énergie (Antunes et al., 2018).

Les riboswitchs type thermosenseurs sont des séquences ARN qui changent de conformation en fonction de la température rencontrée par la bactérie. Par exemple, chez *S. aureus* il a été montré que la région 5'UTR du gène *cidA* comportait une région régulatrice qui contrôle la survie et la formation de biofilm chez ce pathogène. Ce thermosenseur prend une conformation différente à 33°C et à 37°C. Cette transition de

température est souvent observée lors du passage de l'état commensal de portage à l'état d'infection (Hussein et al., 2019). Par conséquent, ces thermosenseurs peuvent intervenir dans la régulation de la virulence de *S. aureus* en fonction de l'environnement rencontré par le pathogène.

Parmi les ARN codés en « *cis* », il existe également une catégorie particulière : les systèmes toxine-antitoxine de type I qui sera développée à la page 54.

1.2. ARN régulateurs en « *trans* »

Les ARN codés en *trans* sont soit (1) situés dans une région intergénique où ils possèdent alors leur propre promoteur et terminateur, soit (2) dérivent d'une région 3'UTR d'un ARNm qui a été modifié suite l'action d'une RNase (**figure 43**).

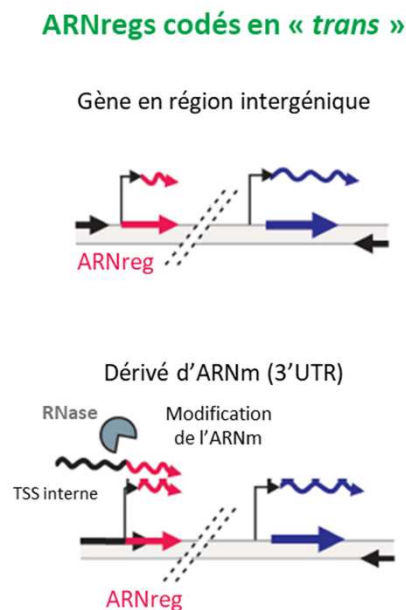


Figure 43 : Localisation des ARN régulateurs en « *trans* » (adapté de Svensson et Sharma, 2016). TSS : site initiation de la transcription.

Chez *S. aureus*, plusieurs ARNreg majeurs ont été décrits, nous détaillerons (i) l'ARNIII qui est l'ARNreg lié au système Quorum Sensing Agr, (ii) des ARNreg impliqués dans la virulence, (iii) des ARNreg liés à différents métabolismes ainsi que (iiii) des ARNreg appartenant aux systèmes toxine-antitoxine de type I.

2. ARN régulateurs et virulence

Les ARNreg participent fortement à l'adaptation et au fitness du Staphylocoque doré mais font aussi partie intégrante de la régulation de la virulence de ce pathogène. De nombreuses études ont mis en évidence la régulation de facteurs de virulence par des ARNreg, cette partie en développera quelques exemples.

2.1. L'ARNIII : l'ARN régulateur central du Quorum Sensing

L'ARNIII (Srn_3910) a été un des premiers ARNreg décrits chez *S. aureus*, et son expression est liée au Quorum Sensing. L'activation du QS permet à la bactérie de passer d'un mode adhésion avec

l'expression des protéines de surface MSCRAMMs à un mode virulent avec la production d'exotoxines. Cette activation a lieu en fin de phase exponentielle de croissance, c'est pourquoi l'expression et la quantité de l'ARNIII augmentent au cours de la croissance (**figure 44**) (Felden et Augagneur, 2021). Cet ARN d'environ 500 nucléotides possède une structure complexe avec 14 tiges boucles, et une partie de cet ARN code pour l' δ -hémolysine (*hld*) (**figure 23**). L'ARNIII a été très étudié ces vingt dernières années et plusieurs tiges boucles de cet ARN ont été montrées comme responsables de la régulation négative de facteurs de virulence comme la protéine Sbi (évasion immunitaire), la protéine A (Spa) ou l'autolysine LytM (Huntzinger et al., 2005) (Chunhua et al., 2012) (Chabelskaya et al., 2014) (**figure 44**). L'ARNIII régule également deux FT de la famille Sar : il réprime la traduction de *rot* mais active celle de *mgrA* (Boisset et al., 2007) (Gupta et al., 2015) (**figure 44**). L'expression du QS est liée à la transition d'expression des protéines de surface à l'expression de exotoxines, ce qui fait de l'ARNIII un ARN régulateur central du pouvoir infectieux de *S. aureus*.

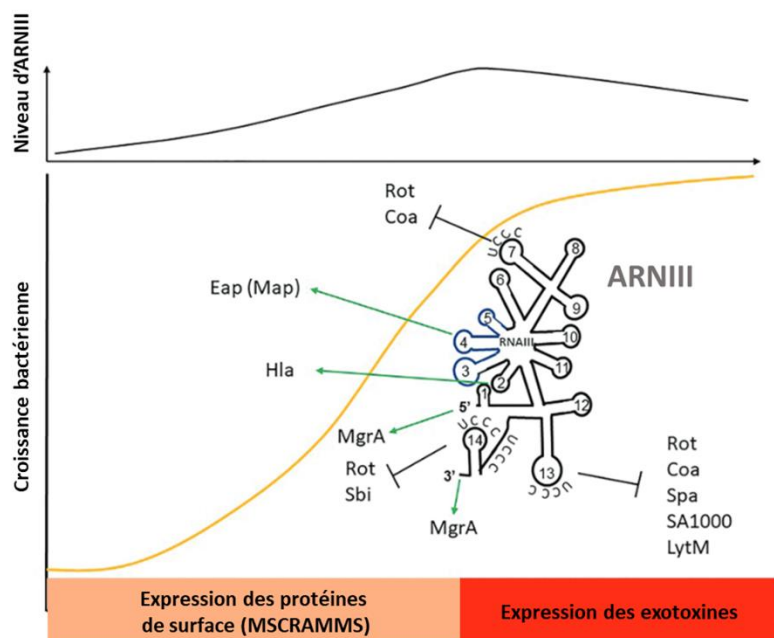


Figure 44 : Quantité de l'ARNIII au cours de la croissance, et régulation de ses cibles chez *S. aureus* (d'après Felden et Augagneur, 2021). Les flèches vertes représentent les cibles activées, et les symboles noirs les cibles réprimées par l'ARNIII. La courbe en orange indique la courbe de croissance bactérienne.

L'ARNIII est un ARN présent chez toutes les souches de *S. aureus* mais d'autres ARNreg peuvent être plus spécifiques en fonction des souches, notamment ceux qui font partie d'éléments génétiques mobiles.

2.2. Les ARN « Spr » (Small Pathogenicity islands RNA)

Les ARN Spr ont été découverts suite à la recherche de nouveaux ARN régulateurs chez *S. aureus*. Ils ont été prédits par des méthodes *in silico* et leur expression a été vérifiée par Northern Blot. Ces ARN ont été nommés de SprA à SprG et ont fait l'objet de plusieurs publications au sein du laboratoire. Les gènes exprimant ces ARN sont localisés dans des îlots de pathogénie situés tout au long du chromosome. Ces îlots

contiennent également de nombreux facteurs de virulence et/ou des gènes de résistance aux antibiotiques (Pichon et Felden, 2005).

Dans cette partie, nous allons détailler les ARNreg, SprC, SprD, SprX et SprY. Les ARN SprA et SprG/F font partie de systèmes toxine-antitoxine de type I qui seront détaillés à la fin de cette partie (page 54).

a) SprC et la phagocytose

Le gène exprimant l'ARNreg SprC (Srn_3610) se situe au sein de l'îlot de pathogénie vSaß et a une taille de 147 nucléotides. Le Pabic et al, ont montré que SprC régule la production de l'autolysine Atl chez la souche *S. aureus* Newman. En effet, SprC inhibe directement la traduction de l'autolysine via une interaction ARN-ARN au niveau du RBS de l'ARNm *atl* (Le Pabic et al., 2015). Les autolysines sont importantes pour le renouvellement de la paroi cellulaire mais aussi lors de la formation de biofilm (Dubrac et al., 2007). Au niveau phénotypique, la phagocytose par les cellules immunitaires est augmentée en présence d'une souche Newman $\Delta sprC$, car cette souche produit de l'autolysine, qui facilite la phagocytose. Dans un modèle d'infection murin, SprC agit comme un ARN anti-virulent, c'est-à-dire qu'une souche *S. aureus* Newman délétée du gène *sprC* est plus virulente qu'une souche parentale (Le Pabic et al., 2015). En 2017, une étude protéomique a révélé de nouvelles cibles potentielles de SprC, impliquées dans le métabolisme et la virulence, comme la leucocidine LukED. Les gènes codant cette toxine sont situés à proximité du gène *srn_3610_sprC* dans l'îlot de pathogénie vSaß (Zhao et al., 2017). La régulation du gène *sprC* sera détaillée à la page 61.

b) SprD et l'évasion du système immunitaire

SprD (Srn_3800) est un ARNreg de 142 nucléotides. Une étude protéomique du mutant délété du gène *sprD* a révélé la forte présence de la protéine Sbi, impliquée dans l'évasion immunitaire de *S. aureus*. Par la suite il a été montré que SprD inhibe la traduction de la protéine Sbi en se fixant au niveau du RBS sur l'ARNm *sbi* (Chabelskaya et al., 2010). De plus, dans un modèle d'infection murin, un mutant HG001 $\Delta sprD$ est moins virulent qu'une souche parentale, ce qui témoigne de l'implication de SprD dans la virulence de *S. aureus*, avec un effet opposé à SprC (Chabelskaya et al., 2010). Nous reviendrons sur cet ARNreg à la page 58.

c) SprX et la résistance aux antibiotiques

SprX (Srn_3820) est un ARNreg de 150 nucléotides, identifié initialement sous le nom de RsaOR (Bohn et al., 2010). Cet ARNreg a été montré comme jouant un rôle dans la résistance aux antibiotiques et plus particulièrement dans la résistance aux glycopeptides (vancomycine et teicoplanine). Une analyse protéomique a mis en évidence que SprX régule la production de la protéine SpoVG, impliquée dans la formation de la capsule et dans la résistance aux glycopeptides. Quand le gène *srn_3820_sprX* est surexprimé, il se fixe au niveau du site RBS sur l'ARNm codant SpoVG, ce qui inhibe la traduction de cette cible, rendant la souche plus sensible aux glycopeptides (Eyraud et al., 2014).

De plus, quand SprX est surexprimé, il peut favoriser la production de la protéine ClfB (MSCRAMMs) et de la δ -hémolysine (*hld*, codée par l'ARNIII) dans la souche *S. aureus* Newman (Kathirvel et al., 2016), ce qui fait de SprX un ARNreg impliqué dans l'adhésion et la production de toxine chez *S. aureus* respectivement. En 2021 une étude a montré que SprX régule positivement le système à deux composants WalKR en se fixant sur l'ARNm *walR*. En effet, la surexpression de SprX conduit à la production des autolysines (IsaA et LytM), régulés par WalR. SprX pourrait donc avoir un rôle dans l'autolyse et la formation de biofilm (Buchad et Nair, 2021). L'ARNreg SprX semble avoir un rôle important chez *S. aureus* avec un double rôle dans la régulation de l'adhésion et l'invasion de *S. aureus*.

d) SprY : un ARNreg qui régule l'ARNIII

Absent de la base de données SRD, SprY est un ARNreg de 125 nucléotides dont la quantité s'accumule au cours de la croissance de *S. aureus*, de la même manière que l'ARNIII. Il a été démontré que SprY se fixe sur la boucle spécifique H13 de l'ARNIII. Cette boucle intervient dans la régulation de nombreux facteurs de virulence, comme Rot (**figure 44**). Lorsque l'ARNIII est présent en faible quantité, SprY agirait comme un ARN « éponge » et titrerait cet ARNreg l'empêchant de réguler ses cibles sur sa boucle H13. A forte quantité d'ARNIII, SprY est dépassé et l'ARNIII pourra donc effectuer ses fonctions régulatrices. Au niveau phénotypique, la surexpression de SprY réduit l'activité hémolytique de *S. aureus* et un mutant HG003 $\Delta sprY$ est moins virulent dans un modèle d'infection murin (Le Huyen et al., 2021).

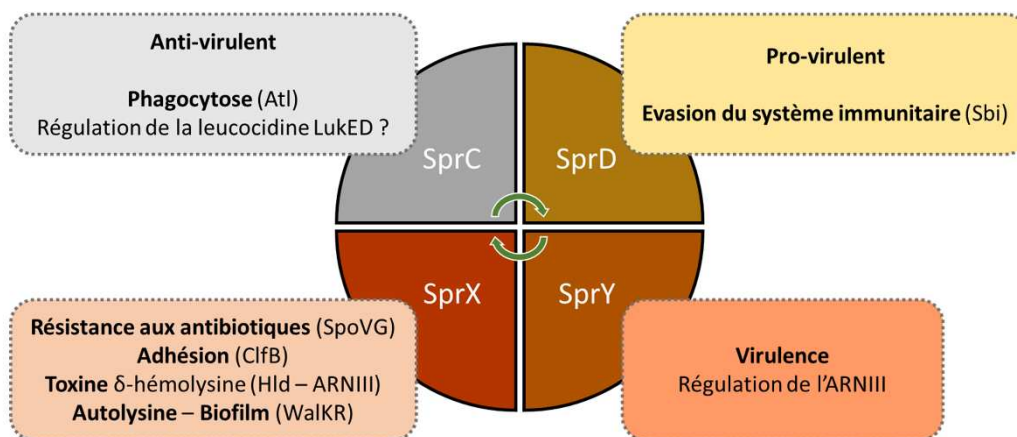


Figure 45 : Fonctions des ARNreg SprC, SprD, SprX et SprY chez *S. aureus*.

Cette brève description de quelques ARNregs acquis par *S. aureus* lors de l'intégration d'îlots de pathogénie montre leur utilité dans l'adaptation de la bactérie en lui permettant de surmonter de nombreux obstacles au cours de l'infection, allant de la phagocytose à l'évasion du système immunitaire (**figure 45**).

3. ARN régulateurs et métabolisme

- Les ARN de la famille Rsa

a) RsaC (Srn_1590)

RsaC est un ARN atypique de plus de 1000nt et il dérive d'une région 3' UTR de l'opéron *mntABC* qui est exprimé en condition carencé en manganèse (Mn^{2+}). L'ARNm de l'opéron *mntABC* est alors clivé par la RNase III et crée une forme stable et mature de RsaC (Lalaouna et al., 2019).

Lors d'une infection, le stress oxydatif produit par les cellules phagocytaires joue un rôle dans la défense contre les pathogènes (Price et Boyd, 2020). En réponse à ce stress, les bactéries doivent pour se détoxifier pour survivre dans l'hôte. Cette détoxification passe par des enzymes comme les superoxydes dismutases (Sod) qui ont besoin de cofacteurs pour être fonctionnelles. Le manganèse est un micronutriment essentiel à *S. aureus*, car il sert de cofacteur à la superoxyde dismutase SodA, qui permet à la bactérie d'éliminer les ions superoxydes O_2^- . L'ARNreg RsaC joue un rôle central dans la régulation de cette détoxification par les enzymes Sod (Lalaouna et al., 2019).

En effet, en présence de Mn^{2+} l'expression de *srn_1590_rsaC* est inhibée, et la détoxification des ions O_2^- s'opère via la superoxyde dismutase SodA (co-facteur Mn^{2+}) (**figure 46A**). A l'inverse, en condition carencé en Mn^{2+} , RsaC est produit et inhibe la synthèse de l'enzyme SodA. Cette répression favorise la réponse alternative au stress oxydatif médié par la superoxyde dismutase SodM (cofacteur Fe^{2+}) (**figure 46B**) (Lalaouna et al., 2019). La régulation de l'utilisation des enzymes Sod par RsaC permet à la bactérie d'adapter son activité enzymatique en fonction des cofacteurs présents et donc lui permet de se défendre contre les attaques de l'hôte dans toutes circonstances. De plus, RsaC est également un acteur majeur dans la virulence de *S. aureus* sur modèle murin, en effet une souche Newman $\Delta rsaC$ est moins virulente et montre des différences d'expression en fonction de la présence d'oxygène et des stress émis par l'hôte (Panthee et al., 2021). Ces observations restent en accord avec l'adaptation du stress oxydatif par l'ARNreg RsaC.

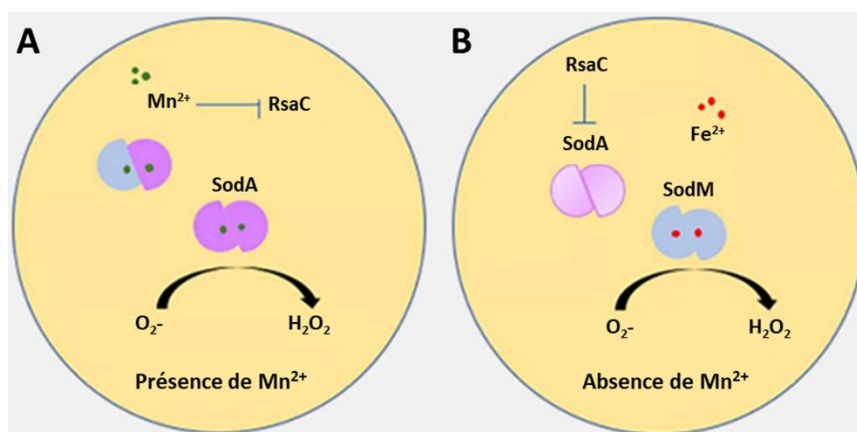


Figure 46 : Réseau de régulation RsaC chez *S. aureus* (d'après Lalaouna et al., 2019). (A) En présence de manganèse (Mn^{2+}), le manganèse réprime l'expression de l'ARNreg RsaC. La détoxification des ions superoxydes O_2^- se fait par le biais de SodA (co-facteur Mn^{2+}). (B) En absence de manganèse (Mn^{2+}), RsaC est exprimé et réprime la production de SodA. SodM (co-facteur Fe^{2+}) détoxifie la cellule des ions O_2^- .

Récemment, il a été montré que *S. aureus* est capable de produire des vésicules extracellulaires (EVs). Elles sont impliquées dans la communication intercellulaire, et transportent des macromolécules comme des toxines, des protéines d'adhésion mais aussi des ARNreg, comme RsaC. RsaC pourrait donc jouer un rôle dans la communication intercellulaire au cours de l'infection, notamment au moment de la phagocytose où le stress oxydatif est utilisé par la cellule hôte pour se défendre contre le pathogène (Silva Rosa da Luz et al., 2021).

b) RsaD (Srn_1640)

RsaD est un ARN régulateur de 176 nucléotides dont l'expression est contrôlée par le facteur SigB (Geissmann et al., 2009). Récemment cet ARN a été découvert suite à l'étude du régulon sARNs de CodY chez *S. aureus*. En effet l'ARN RsaD est l'un des ARN les plus présents dans une souche délétée du gène *codY*. Après analyse bio-informatique des cibles potentielles de RsaD et validation expérimentale, Augagneur et al ont pu montrer que RsaD contrôle la production de l'enzyme acétolactate synthase AlsS qui transforme le pyruvate en α -acétolactate. RsaD se fixe sur le site RBS de l'ARNm *alsS*, ce qui empêche le recrutement du ribosome et donc inhibe la traduction de l'enzyme (Augagneur et al., 2020).

Lors d'un excès de glucose dans le milieu, la réponse au stress acide est alors déclenchée. La bactérie doit donc détourner les flux métaboliques vers la production d'acétoïne au détriment du lactate et de l'acétate, qui en trop grande quantité induisent la mort cellulaire. Ce détournement métabolique est assuré en partie par l'enzyme AlsS. Par conséquent en réprimant AlsS, RsaD redirige ce métabolisme en contribuant à la mort cellulaire lors d'une exposition à un faible stress acide, notamment en phase stationnaire de croissance (**figure 47A**). Néanmoins lors d'un excès de glucose, RsaD est présent en très faible quantité ce qui permet la synthèse de l'enzyme AlsS et donc la détoxification de la cellule pour résister au stress acide (**figure 47B**) (Augagneur et al., 2020).

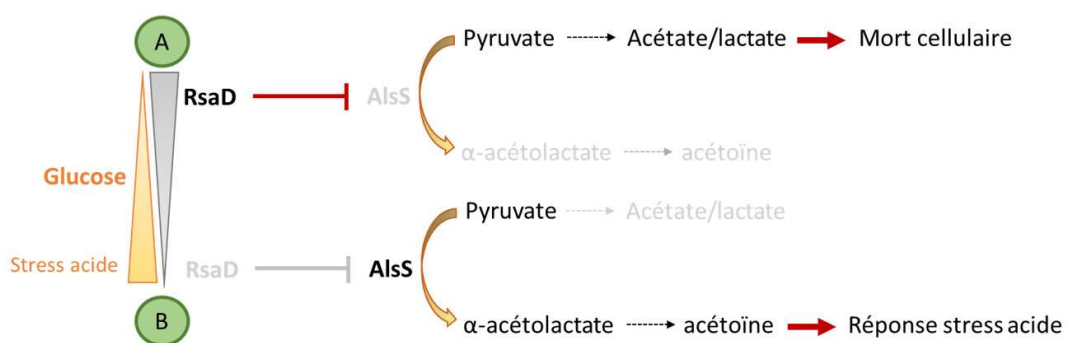


Figure 47 : RsaD et la réponse au stress acide chez *S. aureus*. (A) Stress acide faible en présence de faible concentration en glucose dans le milieu. RsaD est exprimé et réprime la traduction de l'enzyme AlsS. (B) Stress acide en présence de forte concentration en glucose dans le milieu. RsaD est peu exprimé, l'enzyme AlsS peut être produite et permet la détoxification de la cellule en produisant de l'acétoïne.

L'expression du gène *sm_1640_rsaD* est donc contrôlée de par différents signaux métaboliques : son expression est réprimée par CodY et potentiellement par le système Agr mais activée par SigB et le système

TCS SrrAB, qui répond à un stress NO⁺ (**figure 48**) (Augagneur et al., 2020). RsaD peut donc répondre à différents stimuli, il serait donc intéressant d'étudier son impact lors d'une infection sur un modèle *in vivo*.

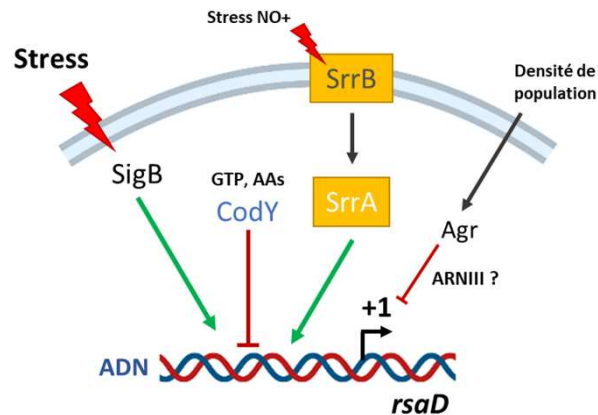


Figure 48 : *rsaD*, un gène aux multiples régulateurs chez *S. aureus* (d'après Augagneur et al., 2020).

c) RsaE (Srn_2130)

RsaE est un ARN régulateur de 100 nucléotides, atypique car très conservé parmi les Firmicutes (Bohn et al., 2010) : il est retrouvé chez toutes les espèces du genre *Staphylococcus*, mais aussi chez *Bacillus subtilis* (RoxS) (Durand et al., 2015). RsaE est un ARNreg central dans le métabolisme de la bactérie. Il contrôle les enzymes impliquées dans le transport de peptides/acides aminés (*opp3A-3B*), le métabolisme des lipides et carbohydrates, du cycle de Krebs et dans la voie de dégradation de l'arginine (*rocF*) (Geissmann et al., 2009) (Bohn et al., 2010) (Rochat et al., 2018). De manière générale, les régulations médiées par RsaE participeraient à rééquilibrer la balance NAD⁺/NADH quand la cellule rencontre divers stimuli (Durand et al., 2017).

La quantité de RsaE augmente de manière transitoire dans la phase stationnaire de croissance (Bohn et al., 2010), et cet ARN est surexprimé dans les SCV, impliquées dans les infections chroniques chez *S. aureus* (Tuchscher et al., 2020).

Chez *S. epidermidis*, RsaE joue un rôle dans la formation du biofilm et est exprimé de manière hétérogène au sein de ce dernier. Il permet la libération d'ADN extracellulaire localement dans le biofilm en régulant la lyse bactérienne (*lgrA*), et facilite la production de PIA (*icaADBC*). Il faut noter que l'interaction avec l'ARNm *lgrA* est spécifique à *S. epidermidis*, elle n'est pas retrouvée chez *S. aureus*, ce qui suggère des différences spécifiques au sein du genre *Staphylococcus* (Schoenfelder et al., 2019).

Ces exemples d'ARNreg impliqués dans le contrôle du métabolisme, donnent un aperçu des rôles multiples des ARNreg et qu'ils peuvent être impliqués dans la virulence et le métabolisme de *S. aureus*. Mais, ces riborégulateurs ont surtout un rôle central dans l'adaptation de ce pathogène aux différents stress rencontrés lors de sa croissance. Le dernier type d'ARN régulateurs que nous allons détailler sont ceux appartenant aux systèmes toxine-antitoxine de type I.

4. Les systèmes toxine-antitoxine de type I

Les systèmes toxine-antitoxine (TA) se composent de deux partenaires : une toxine, et une antitoxine pouvant contrecarrer la toxicité de cette dernière. Les TA type I ont été initialement identifiés sur des plasmides, et permettaient la maintenance du plasmide chez la bactérie. En effet, la demi-vie de l'antitoxine étant plus courte que celle de la toxine, la perte du plasmide entraîne une diminution de la concentration en antitoxine dans la cellule et donc la mort de la bactérie par la production de la toxine (Nonin-Lecomte et al., 2021). De plus en plus de copies de ces systèmes TA sont identifiés au sein du chromosome bactérien (Fozo et al., 2010). De manière générale, ils ont été montrés comme jouant des rôles clés, dans la réponse au stress, la formation de biofilm, ou encore la persistance (Jurénas et al., 2022). La formation de cellules persistantes peut être due à l'activation de la réponse SOS impliquée dans la réparation de l'ADN ou de la réponse stringente (RS), suite à l'exposition à un stress, comme un traitement antibiotique (Harms et al., 2016).

Les systèmes toxine-antitoxine (TA) se classent en 8 types en fonction de la nature de l'antitoxine et des mécanismes d'action de cette dernière (**figure 49**). En effet, alors que les toxines sont généralement des protéines, l'antitoxine peut être de type protéique (types II, IV, V, VI et VII) ou de type ARN non codant (types I et III) (Wang et al., 2021). En 2018, le système TA type VIII est découvert, où la toxine et l'antitoxine sont de nature ARN (Choi et al., 2018).

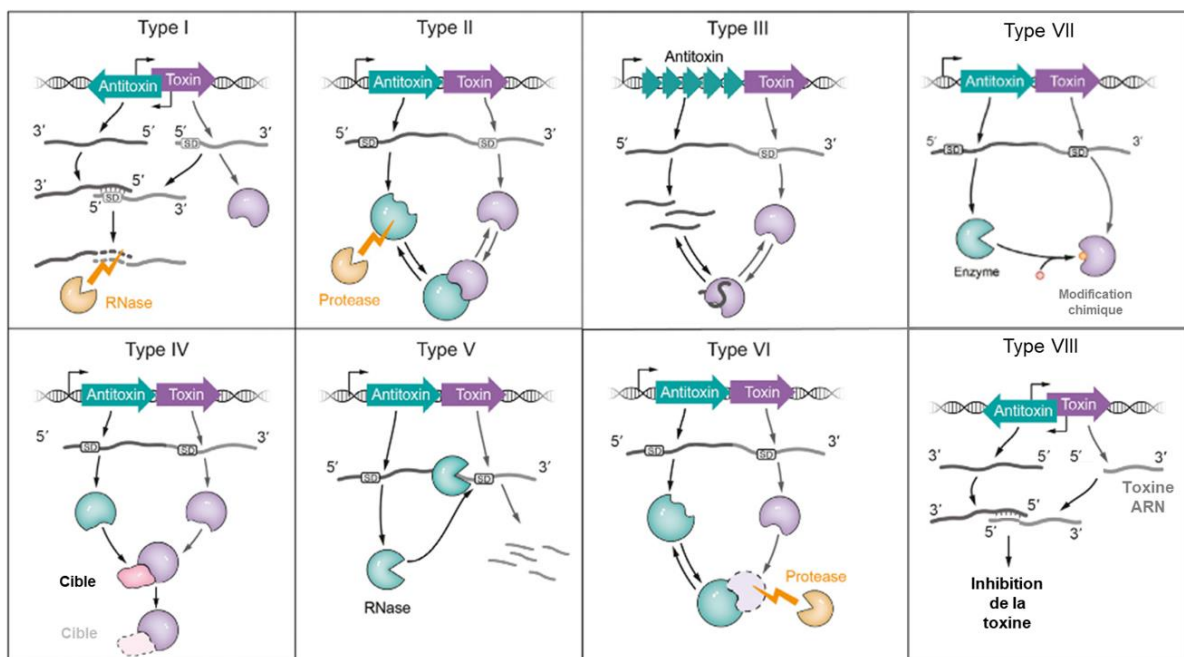


Figure 49 : Résumé des différents types de systèmes toxine-antitoxine (I à VIII) (adapté de Wang et al., 2021). SD : Site de fixation du ribosome, séquence Shine-Dalgarno.

Les antitoxines agissent selon différents mécanismes : (i) inhibent la synthèse de la toxine (types I et V), (ii) séquestrent la toxine (types II, III et VIII), (iii) contrecarrent l'activité toxique (type IV), facilitent la dégradation (type VI), ou modifient la toxine à un niveau post-traductionnel (type VII) (**figure 49**). Dans cette partie, nous ne détaillerons que les systèmes TA de type I décrits chez *S. aureus*.

Les systèmes TA de type I, mettent en jeu deux partenaires ARN. Chez *S. aureus*, le fonctionnement des systèmes TA de type I SprA/SprA_{AS} et SprG/SprF a été mis en évidence ces dernières années.

Dans un système à l'équilibre, l'ARN antitoxine empêche la production de la toxine en se fixant par appariement de base sur l'ARN codant la toxine. Cette interaction ARN-ARN va masquer le site de fixation du ribosome (RBS) ou induire leur dégradation par recrutement d'une RNase. Si un déséquilibre entre les deux ARNs se crée lié par exemple à (i) une moindre production de l'ARN antitoxine, (ii) la dégradation précoce de l'antitoxine ou à (iii) la surproduction de l'ARN toxine, la toxine pourra être produite par la bactérie. La plupart des toxines des systèmes TA de type I sont des peptides hydrophobes localisés à la membrane et qui induisent la dépolarisation et/ou la perméabilisation membranaire suivie d'une diminution de l'ATP intracellulaire (Nonin-Lecomte et al., 2021).

4.1. Le système TA de type I SprA1/SprA1_{AS}

Le système TA de type I SprA1/SprA1_{AS} a été découvert en 2012 et se situe dans l'îlot de pathogénicité vSaβ, par conséquent toutes les souches de *S. aureus* ne possèdent pas ce système. Le gène *sm_3580_sprA1* (207 nt) code la toxine PepA1 de 30 acides aminés et le gène *sm_3590_sprA1_{AS}* exprime l'ARN antitoxine de 60 nt. Quand le peptide PepA1 est surproduit, il a la capacité de s'insérer dans les membranes et induit la mort cellulaire des bactéries l'exprimant. De plus, le peptide synthétique PepA1 a montré une activité hémolytique sur les érythrocytes humains (**figure 50A**) (Sayed et al., 2012a).

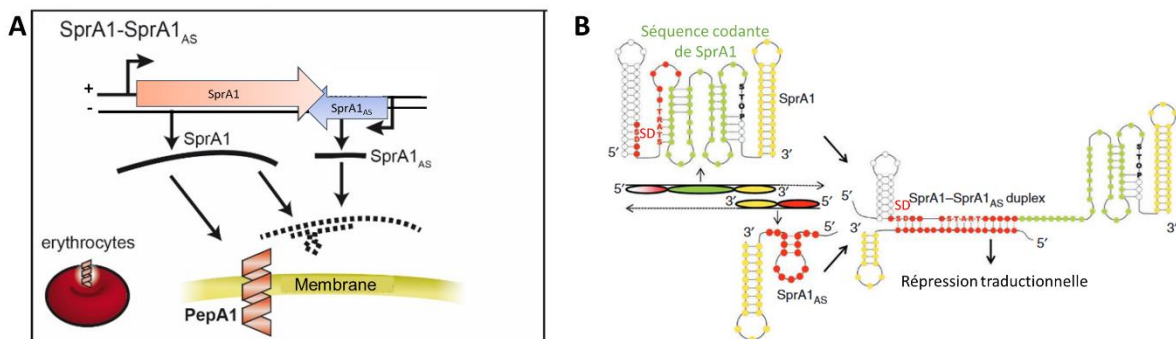


Figure 50 : Système toxine-antitoxine SprA1/SprA1_{AS} chez *S. aureus*. (A) Fonctionnement global du système TA (d'après Schuster et Bertram, 2016). (B) Interaction entre l'ARN antitoxine SprA1_{AS} et l'ARN codant la toxine SprA1, d'après Sayed et al, 2012. En vert : la séquence codante du peptide, en jaune : la zone d'appariement parfait entre les deux ARNs et en rouge la zone d'interaction réelle entre les deux ARNs qui masque la séquence de reconnaissance du ribosome (SD) et inhibe la traduction de la toxine.

Pour empêcher la production de la toxine PepA1, l'ARN antitoxine doit interagir avec l'ARN codant la toxine. Les deux gènes sont chevauchants sur leur partie 3', ce qui engendre un appariement parfait entre les deux ARNs (partie jaune - **figure 50B**). Néanmoins il a été démontré que l'interaction entre les deux ARNs a lieu au niveau de leur région 5'. Cette interaction imparfaite masque le site de reconnaissance du ribosome (séquence SD) et inhibe la traduction de la toxine (**figure 50B**). On dit donc que l'ARN antitoxine SprA1_{AS} est un ARN codé en « cis » mais qui agit en « trans » sur son ARN cible (Sayed et al., 2012a).

Dans des conditions classiques de culture, le système SprA1/SprA1_{AS} est à l'équilibre, la quantité d'ARN antitoxine produite est suffisante pour inhiber la synthèse de la toxine et permet à *S. aureus* de croître dans ces conditions. Pourtant, la production de PepA1 est induite lors d'un stress acide et oxydatif par une diminution du niveau de l'ARN antitoxine SprA1_{AS}. Une telle situation pourrait être considérée comme un comportement altruiste au cours de l'infection où quelques bactéries pourraient produire la toxine pour mettre à l'écart les cellules immunitaires de l'hôte et favoriser la propagation de l'infection (Sayed et al., 2012b).

La découverte de ce système TA de type I a permis une analyse génomique comparative pour déterminer si d'autres systèmes similaires étaient présents au sein du génome de *S. aureus*. Cette analyse a permis la découverte d'un système homologue nommé : SprA2/SprA2_{AS}.

4.2. Le système TA de type I SprA2/SprA2_{AS}

Contrairement au système TA SprA1/SprA1_{AS}, le système SprA2/SprA2_{AS} (Srn_4550/Srn_4540) se situe dans le core génome de *S. aureus*, et possède une organisation génomique différente (Germain-Amiot et al., 2019). En effet, les deux gènes sont situés sur des brins opposés mais partagent toujours leur partie 3' en commun (**figure 51**). De la même manière, que pour le système TA SprA1/SprA1_{AS}, cette zone d'appariement parfait n'est pas responsable de la régulation de la production de la toxine. La partie 5' de l'ARN antitoxine SprA2_{AS} interagit avec la partie 5' de l'ARN SprA2, contenant le site de reconnaissance du ribosome (séquence Shine-Dalgarno SD) (**figure 51**).

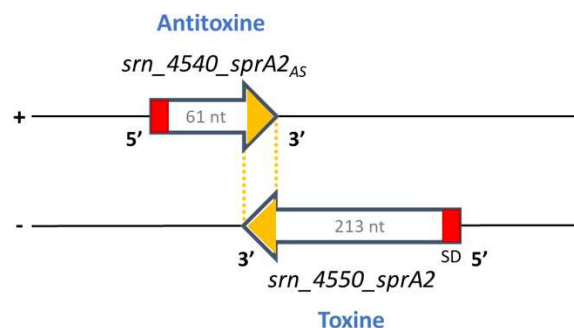


Figure 51 : Organisation génétique du système toxine-antitoxine SprA2/SprA2_{AS} chez *S. aureus* (adapté de Germain-Amiot et al., 2019). La partie en jaune indique l'appariement parfait entre les deux ARN, et la partie en rouge indique la réelle interaction entre les deux ARNs. Cette interaction masque le site de reconnaissance du ribosome (SD) et inhibe la production de la toxine codée par *srn_4550_sprA2*.

L'interaction imparfaite en 5' de deux ARNs est responsable de l'inhibition de la production de la toxine, ce qui fait de l'ARN antitoxine SprA2_{AS} un ARN codé en « *cis* » qui agit en « *trans* ». De plus, l'appariement de ces deux ARN leur permet de se protéger mutuellement, et d'augmenter leur demi-vie dans la bactérie. Malgré les similarités de séquences, aucune régulation croisée des systèmes SprA1/SprA1_{AS} et SprA2/SprA2_{AS} n'a été observé en conditions *in vitro* et *in vivo* (Germain-Amiot et al., 2019).

La production de la toxine codée par *sprA2*, PepA2 entraîne la mort de la bactérie. Néanmoins, si on déclenche la production de la toxine dans une souche de *S. aureus* en co-culture avec d'autres bactéries

(*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* ou *Enterococcus faecalis*), cette toxine cause la mort de *S. aureus* qui l'exprime mais pas des autres bactéries. Cette toxine PepA2 agit au niveau intracellulaire seulement dans les cellules qui l'ont produite. Le peptide synthétique PepA2 en contact avec des érythrocytes et neutrophiles a également une activité hémolytique mais avec des concentrations plus faibles que PepA1. Par ailleurs, PepA2 (35 acides aminés) partage 50% d'identité de séquence avec PepA1 (Germain-Amiot et al., 2019).

Enfin, lors d'un stress hyper-osmotique (NaCl) et d'une croissance en milieu stringant (NZM), le niveau de l'ARN antitoxine SprA_{AS} diminue chez *S. aureus*. Ces deux conditions pourraient réunir les signaux nécessaires pour déséquilibrer le système TA et induire la production de la toxine (Germain-Amiot et al., 2019).

4.3. Le système TA de type I SprG1/SprF1

Le système TA de type I SprG1/SprF1 a été découvert en 2014 chez la souche *S. aureus* N315 et se situe dans l'îlot de pathogénie ΦSa3PI, par conséquent toutes les souches de *S. aureus* ne possèdent pas ce système. Le gène codant la toxine (*sm_3840_sprG1*) partage son extrémité 3' avec le gène codant l'ARN antitoxine (*sm_3830_sprF1*). Cet appariement parfait permet l'interaction entre les ARNs SprG1 (308 nt) et SprF1 (143 nt) provoquant la dégradation du complexe et évite la production de la toxine. L'ARN SprG1 a la particularité de coder deux peptides : « SprG1 court » (31 acides aminés) et « SprG1 long » (44 acide aminés) (**figure 52A**). Ces peptides sont responsables de la formation de pores dans la membrane entraînant la lyse bactérienne (Pinel-Marie et al., 2014). Les peptides synthétiques agissent contre les cellules de l'hôte (érythrocytes) ou sur d'autres bactéries en compétition avec *S. aureus* (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) et entraînent leur mort cellulaire.

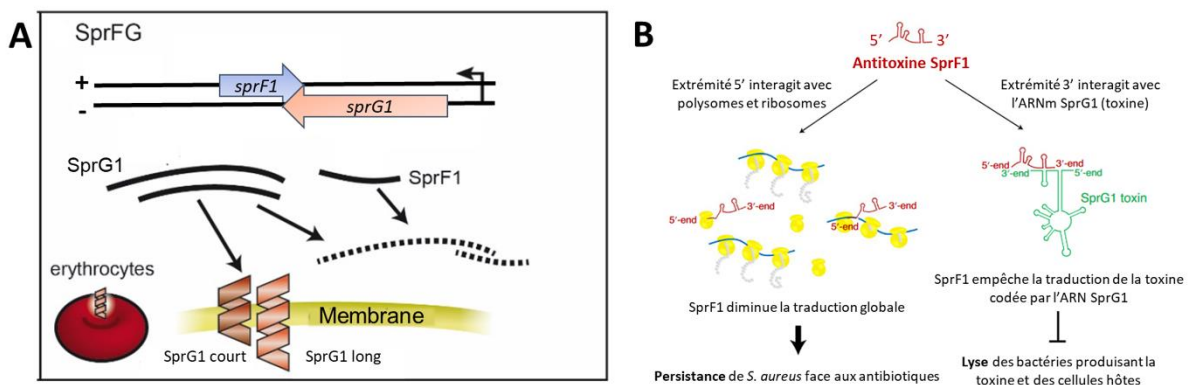


Figure 52 : Système toxine-antitoxine SprG1/SprF1 chez *S. aureus*. (A) Fonctionnement global du système TA (adapté de Schuster et Bertram, 2016). (B) Rôles de l'ARN antitoxine SprF1 (d'après Pinel-Marie et al., 2021).

De manière surprenante, l'ARN antitoxine SprF1 possède une fonction se détachant de ce système TA. Son extrémité 5' interagit avec la machinerie traductionnelle (polysomes et ribosomes) et diminue la traduction globale de la bactérie (**figure 52B**). Cette diminution peut être associée à la formation de cellules persistantes au métabolisme ralenti. Par conséquent, SprF1 favorise la persistance de *S. aureus* face aux antibiotiques en se fixant aux ribosomes. En conclusion, SprF1 possède une double fonction avec une

interaction avec les ribosomes (extrémité 5') et une interaction avec l'ARN SprG1 (extrémité 3') qui empêche la production de la toxine, et donc la lyse de la bactérie (**figure 52B**) (Pinel-Marie et al., 2021).

4.4. Les systèmes SprG2/SprF2 et SprG3/SprF3

De la même manière aux systèmes SprA/SprA_{AS}, trois systèmes TA similaires à SprG1/SprF1 ont été découverts dans le core génome de *S. aureus* : SprG2/SprF2, SprG3/SprF3 et SprG4/SprF4 (**figure 53**).

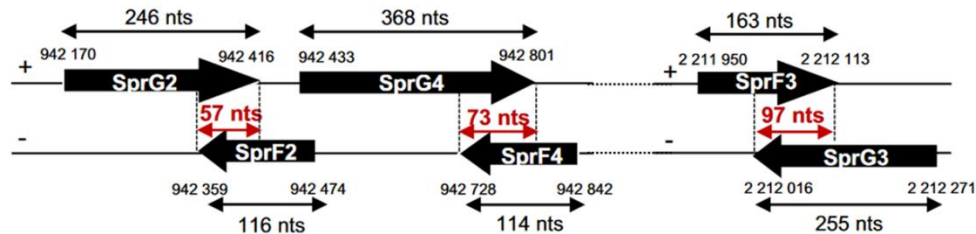


Figure 53 : Organisation génétique des trois systèmes toxine-antitoxine SprG2/SprF2, SprG3/SprF3 et SprG4/SprF4 dans le core génome de *S. aureus* NCTC8325 (d'après Riffaud et al., 2019).

Riffaud et al., ont montré la fonctionnalité des deux systèmes TA SprG2/SprF2 et SprG3/SprF3. L'induction de la toxine codée par *smn_2230_sprG2* et *smn_2250_sprG3* induit l'arrêt de croissance des bactéries. Cet effet est contrecarré par l'ajout des ARN antitoxines SprF2 et SprF3 respectivement. La production des toxines n'entraîne pas la mort des bactéries qui le produisent ou celles aux alentours, mais la bactérie productrice rentre en état de stase, et arrête de se diviser. Les signaux d'activation de ces systèmes ne sont pas encore bien compris mais les niveaux des ARNs semblent moduler en présence d'un stress hyperosmotique ou oxydatif (Riffaud et al., 2019).

Ces multiples systèmes TA ont une importance dans la physiologie de *S. aureus* car ils lui permettent à la fois de se défendre contre les cellules de l'hôte, contre des bactéries compétitrices ou encore lui permettent de rentrer en persistance en présence d'antibiotique.

5. Quand les régulations des ARNreg s'entremêlent...

5.1. Le cas de SprD et ARNIII

La protéine Sbi est impliquée dans l'évasion du système immunitaire et agit de manière similaire à la protéine A. La protéine Sbi se trouve au niveau de la paroi de la bactérie, et se lie avec les IgG produites par le système immunitaire, bloquant leur action (Smith et al., 2011). La production de Sbi est régulée par l'ARNreg SprD chez *S. aureus*. SprD se fixe sur l'ARNm *sbi* et empêche la traduction de la protéine (Chabelskaya et al., 2010). La production de cette protéine Sbi est également contrôlée par l'ARNIII, ce qui fait de Sbi, une cible commune de deux ARNreg majeurs chez *S. aureus* (Chabelskaya et al., 2014).

Les profils d'expression de ces deux ARNreg sont très différents, SprD est fortement présent au début de la croissance alors que l'ARNIII s'accumule jusqu'à la phase stationnaire de croissance. Ces deux ARNreg réguleraient de manière successive la protéine Sbi (Chabelskaya et al., 2014). La dégradation des ARNreg suffirait à produire rapidement la protéine Sbi au moment adéquat, notamment au cours de l'infection.

F. Quand les régulations FT et ARNreg s'entremêlent...

1. Les ARNreg qui régulent les FT

1.1. Le cas de ArtR et SarT

ArtR (Srn_4050) a été le premier ARNreg identifié comme régulant un FT de la famille Sar. Tout d'abord, son expression est sous le contrôle du régulateur de réponse du Quorum sensing AgrA. ArtR peut se fixer sur la région 5' de l'ARNm *sarT* et induire sa dégradation par recrutement de la RNase III. Cette dégradation va entraîner la levée d'inhibition de la synthèse de l'hémolysine α (*hla*) contrôlée par SarT (**figure 55**) (Xue et al., 2014).

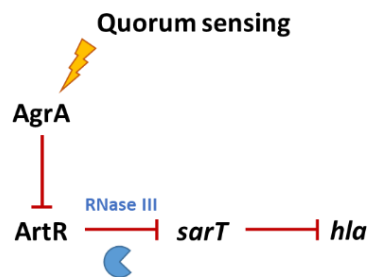


Figure 55 : Schéma de la régulation de ArtR sur *sarT*. Les traits rouges représentent les répressions.

L'ARNreg ArtR joue donc un rôle indirect dans la régulation d'un facteur de virulence chez *S. aureus*, permettant de relier l'activation du QS avec la production de toxines.

1.2. Le cas de RsaA et MgrA

RsaA (Srn_1510) est présent dans la bactérie sous deux formes, une forme courte de 138 nt et une forme longue de 286 nt. L'expression de *srn_1510_rsaA* est dépendante du facteur σ^B . Il a été démontré que RsaA favorise la persistance et atténue la virulence de *S. aureus*. RsaA contribue donc plutôt à des infections chroniques qu'à des infections aiguës (Romilly et al., 2014). Il réprime la traduction du FT de la famille Sar *mgrA*, en se fixant sur sa séquence Shine-Dalgarno. Par conséquent, RsaA favorise indirectement la formation de biofilm et diminue la synthèse de la capsule.

Des prédictions bio-informatiques indiquent que RsaA pourrait interagir avec de nombreux régulateurs dont 5 FT de la famille Sar : SarA, SarT, SarZ, Rot, SarV ou encore l'ARNIII (**figure 56**) (Georg et al., 2020).

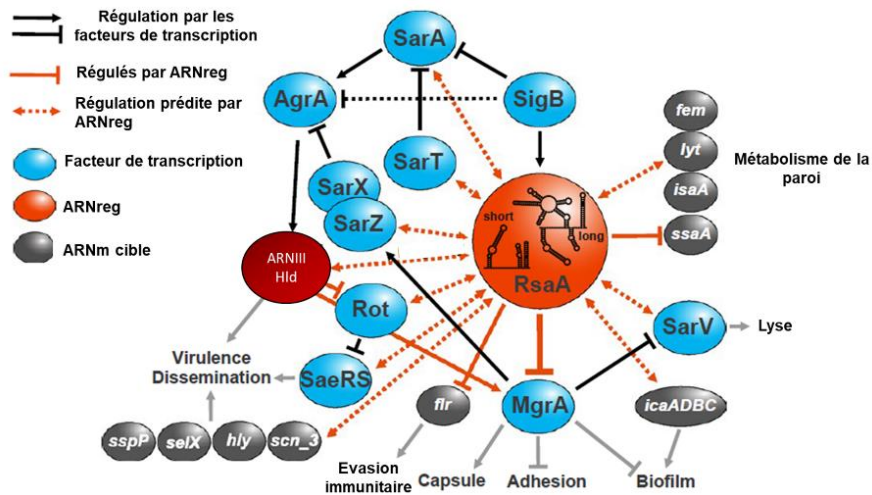


Figure 56 : Réseaux de régulation RsaA prédit chez *S. aureus* (d'après de Georg et al., 2020).

2. Les FT qui régulent les ARNreg

La flexibilité métabolique de *S. aureus* lui permet de s'adapter à une multitude de niches écologiques, témoignant de sa capacité à persister en tant que bactérie commensale ou basculer vers un statut virulent et causer un large spectre d'infections (Mlynek et al., 2020). Le glucose est un élément clé pour les bactéries, et sa présence et sa quantité peuvent varier au sein des tissus (Bischoff et al., 2017) (Rudra et Boyd, 2020) (King et al., 2020). En effet, la présence de glucose extracellulaire conditionne l'activation de CcpA qui va réprimer l'expression de *rsaI* ; et à l'inverse, la présence de glucose-6-phosphate permet l'expression de *rsaG* chez *S. aureus* (Bronesky et al., 2019). La présence des acides aminés branchés (BCAA) et le pool de GTP dans la cellule vont impacter l'activité du régulateur CodY. CodY a été montré comme répresseur du gène *rsaD*. RsaD contrôle la production de l'acétolactate synthase AlsS qui permet de répondre à un stress acide causé par un excès de glucose (Augagneur et al., 2020).

Néanmoins les signaux déclenchant la régulation d'ARNreg par des facteurs de transcription ne sont pas toujours connus. C'est le cas de SarA et des deux gènes sARN *sprC* et *srn_9340*. Ces deux gènes sont situés à proximité dans l'îlot de pathogénie vSaβ et sont fortement réprimés par SarA. La fixation de SarA au niveau des régions promotrices empêche le recrutement de l'ARN polymérase (Mauro et al., 2016). Il a été montré que l'expression de *sprC* est induite dès les premières minutes de la phagocytose (Le Pabic et al., 2015), mais le lien avec la régulation par SarA n'a pas été encore établi.

En conclusion, les réseaux de régulation entre partenaires protéiques et ARN régulateurs s'entremêlent et permettent de répondre à différentes conditions environnementales que *S. aureus* rencontre en tant que bactérie commensale ou au cours d'une infection.

Contexte de la thèse

L'implication des ARN régulateurs dans le métabolisme ou la virulence de *Staphylococcus aureus* n'est plus à démontrer, et les phénotypes liés à ces ARNreg peuvent être mis en évidence avec la délétion ou la surexpression de ces derniers dans la bactérie. Cependant, les signaux, pourtant cruciaux, permettant l'expression ou la répression de ces ARNreg sont souvent inconnus. Au sein du laboratoire, il a été montré que le facteur de transcription SarA réprime l'expression des gènes *sprC* et *srn_9340*. SarA étant un régulateur majeur de *S. aureus*, il a fait l'objet de nombreuses études qui ont montré qu'il régule l'expression de plus d'une centaine de gènes et est impliqué dans la formation de biofilm, la résistance aux antibiotiques et la virulence. Les études à grande échelle pour identifier les gènes influencés par la présence de SarA ont été réalisées avant l'annotation des sARNs. Nous émettons donc l'hypothèse que SarA, en plus de *sprC* et *srn_9340*, pourrait réguler d'autres sARNs, qui pourraient avoir des rôles clés dans l'adaptation et plus largement la virulence de *S. aureus*.

La première partie de ces travaux portera sur l'identification du régulon SarA en combinant des données ChIP-Seq, RNA-Seq et des analyses bio-informatiques. Nous nous focaliserons sur les gènes sARNs régulés par SarA (**figure 57**). La seconde partie traitera l'étude des phénotypes associés aux nouveaux sARNs identifiés et leur lien avec le FT SarA. Enfin, nous aborderons les potentielles doubles régulations de gènes sARNs par le FT SarA et le régulateur global CodY chez *S. aureus*. En effet, en comparant des données transcriptomiques, nous nous sommes aperçus que ces deux régulateurs partageaient des cibles sARN communes. Ces sARN semblent liés au métabolisme des acides aminés et à la réponse au stress acide, ce qui apporterait des nouveaux éléments sur les réseaux de régulation chez ce pathogène.

L'ensemble de ces travaux montrent l'importance des régulations, qu'elles aient lieu au niveau de ADN, grâce aux FT, ou qu'elles aient lieu au niveau ARN, puisqu'elles permettent la bactérie de contrôler son métabolisme.

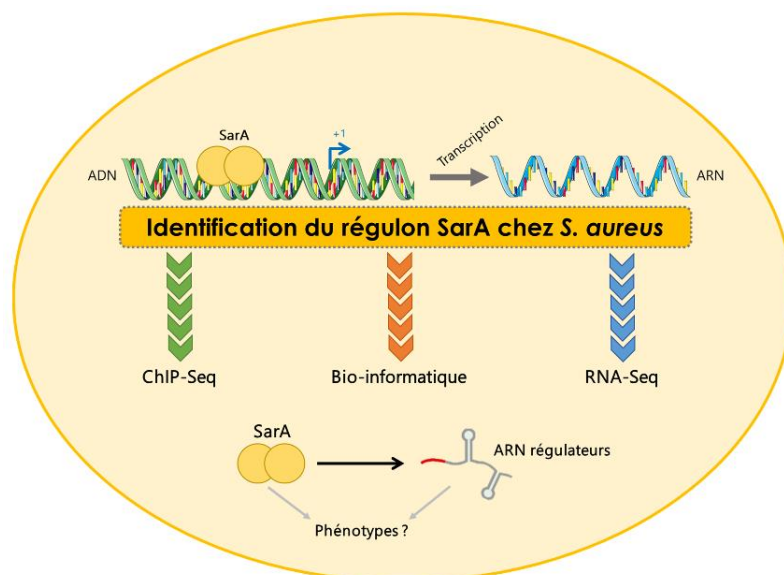


Figure 57 : Principaux objectifs de la thèse.

Résultats

Partie I : Le régulon SarA, mise en évidence de nouveaux gènes sARNs

L'objectif de cette première partie, réalisée en collaboration avec l'équipe du P. Ambrose Cheung aux Etats-Unis, a été de mettre en évidence des nouvelles cibles directes du facteur de transcription SarA en comparant des données de transcriptome avec les données des zones de fixation de SarA sur le chromosome. Dans notre analyse, nous nous focaliserons en particulier sur les nouvelles cibles sARNs. Les séquences promotrices de 15 de ces cibles sARNs seront utilisées pour construire une séquence consensus de fixation de SarA. Cette séquence scannée sur l'ensemble du génome permettra, en nous détachant des conditions expérimentales, de révéler *in silico* des gènes potentiellement régulés par SarA parmi lesquels nous devrions trouver de nouveaux gènes. L'ensemble des données décrites dans cette partie du manuscrit participe à la vision globale du régulon SarA chez le pathogène *S. aureus*. Ce travail a été publié dans la revue mSystems sous le titre « **Expanding the *Staphylococcus aureus* SarA Regulon to Small RNAs** » et est disponible à la page 198.

A. Analyse transcriptomique des souches HG003 et HG003 délétée du gène *sarA*

Depuis plusieurs dizaines d'années des études ciblées ou à grande échelle comme l'analyse par puce à ADN ont été menées pour déterminer les gènes régulés par le facteur de transcription SarA. Une liste d'une vingtaine de cibles directes a pu être établie avec des gènes impliqués dans la pathogénie ou encore le stress oxydatif (**tableau 4**). De plus, les études de type puce à ADN ont révélé plus de 120 gènes comme réprimés ou activés en présence de SarA (Dunman et al., 2001) et (Cassat et al., 2006). Plus récemment au sein du laboratoire, les deux gènes sARNs *sm_3610_sprC* et *sm_9340* ont été démontrés comme réprimés directement par SarA (Mauro et al., 2016). Cette dernière découverte laisse à supposer que d'autres sARNs ou ARN régulateurs peuvent faire partie du régulon SarA. Avec l'apport des nouvelles technologies et connaissances, il nous est apparu pertinent d'analyser de manière plus précise l'ensemble du régulon SarA en se focalisant sur les sARN et ARN régulateurs qui sont de plus en plus étudiés de nos jours.

Ainsi, nous avons souhaité comparer le transcriptome des souches de *S. aureus* HG003 sauvage et HG003 délétée du gène *sarA* pour mettre en évidence de nouveaux gènes régulés par SarA. Préalablement à ce travail, nous avons montré que SarA est exprimée de manière constante dans la cellule au cours de la croissance (**figure 58A**). Nous avons également vérifié et confirmé que la croissance des deux souches HG003 et HG003 $\Delta sarA$ est similaire en milieu TSB (**figure 58B**). De ce fait, nous avons choisi d'étudier le régulon SarA à 2h et 4h30 de culture, ces temps de croissance correspondent, à la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de croissance respectivement (**figure 58B**). Ainsi, les ARN totaux des souches HG003 et HG003 $\Delta sarA$ ont été extraits en triplicat après 2h et à 4h30 de culture en TSB.

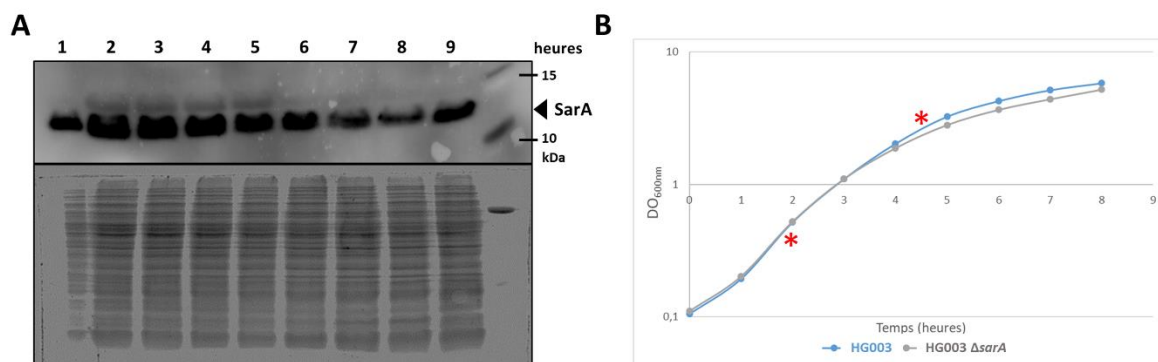


Figure 58 : Vérifications de la production de la protéine SarA au cours du temps et de la croissance des souches utilisées pour le RNA-Seq. (A) Western Blot révélant la présence de SarA toutes les heures lors d'une croissance en milieu TSB dans la souche HG003 (haut du gel) et contrôle de dépôts avec révélation au SyproRuby. (B) Courbes de croissance des souches HG003 et HG003 $\Delta sarA$ en milieu TSB (indiqué avec le symbole rouge, les temps d'extraction des ARN totaux pour le RNA-Seq).

En fin de thèse, le doctorant Tony Mauro a réalisé les cultures et extraits les ARNs des souches aux différents temps. Par la suite il a également réalisé les banques d'ARN et envoyé les échantillons à séquencer. Les séquences obtenues (nommés reads) ont été alignées au génome de *S. aureus* NCTC8325 (NC_007795) sous le serveur Galaxy.

A mon arrivée, nous avons repris les fichiers bruts du RNA-Seq pour calculer les FPKM pour chaque gène (FPKM, pour Fragments per kilobase per million reads mapped) et les différentiels d'expression entre les souches aux différents temps de l'expérience. Les FPKM nous permettent de normaliser le nombre de reads alignés sur un transcrit d'intérêt par rapport à la taille du gène d'intérêt et au nombre total de fragments séquencés. Pour révéler les cibles potentiellement régulées directement par SarA, nous avons fait le choix de fixer les critères suivants : une différence d'expression supérieure à 3 entre les deux souches et une valeur de FPKM supérieure à 10 dans au moins une des deux conditions du RNA-Seq. Ce dernier critère nous a semblé pertinent pour pouvoir suivre expérimentalement l'expression des transcrits des gènes révélés par cette étude de transcriptomique et observer une différence d'expression entre la souche sauvage et la souche délétée du gène *sarA*.

Avec ces critères, nous avons identifié au total 299 gènes dont l'expression est augmentée en absence de *sarA* et 142 gènes dont l'expression est diminuée en absence de *sarA*, ce qui indique respectivement, une action répressive ou activatrice directe ou indirecte de SarA sur ces gènes (**figure 59A**). L'ensemble des données RNA-Seq est disponible dans le **tableau 21 en annexe**. Une classification des données obtenues révèle que l'expression de 262 gènes codant des protéines et 37 gènes sARNs semble réprimée en présence de SarA et l'expression de 128 gènes codant des protéines et 14 gènes sARNs semble activée par SarA. Plus précisément, nous retrouvons presque deux fois plus de cibles dont l'expression est réprimée qu'activée. De la même manière, nous retrouvons plus de cibles au temps 4h30 qu'à 2h de croissance, plus particulièrement pour les gènes cibles codant des protéines. Enfin, de manière générale, le différentiel d'expression est plus important pour les gènes réprimés et en particulier pour les gènes codant des protéines par rapport aux gènes codant des sARNs. Autre constat, les cibles communes aux deux temps de croissance représentent seulement

6,5% des gènes activés par SarA contre 36% pour les gènes réprimés. Dans notre analyse, nous avons utilisé les 540 sARNs disponibles sur la base de données SRD en révélant un total de 51 cibles sARN dont l'expression et/ou la stabilité est modifiée en fonction de la présence de SarA, cela correspond à environ 10% du génome sARN de *S. aureus* alors que l'impact de SarA sur les cibles codant des protéines est d'environ 13%.

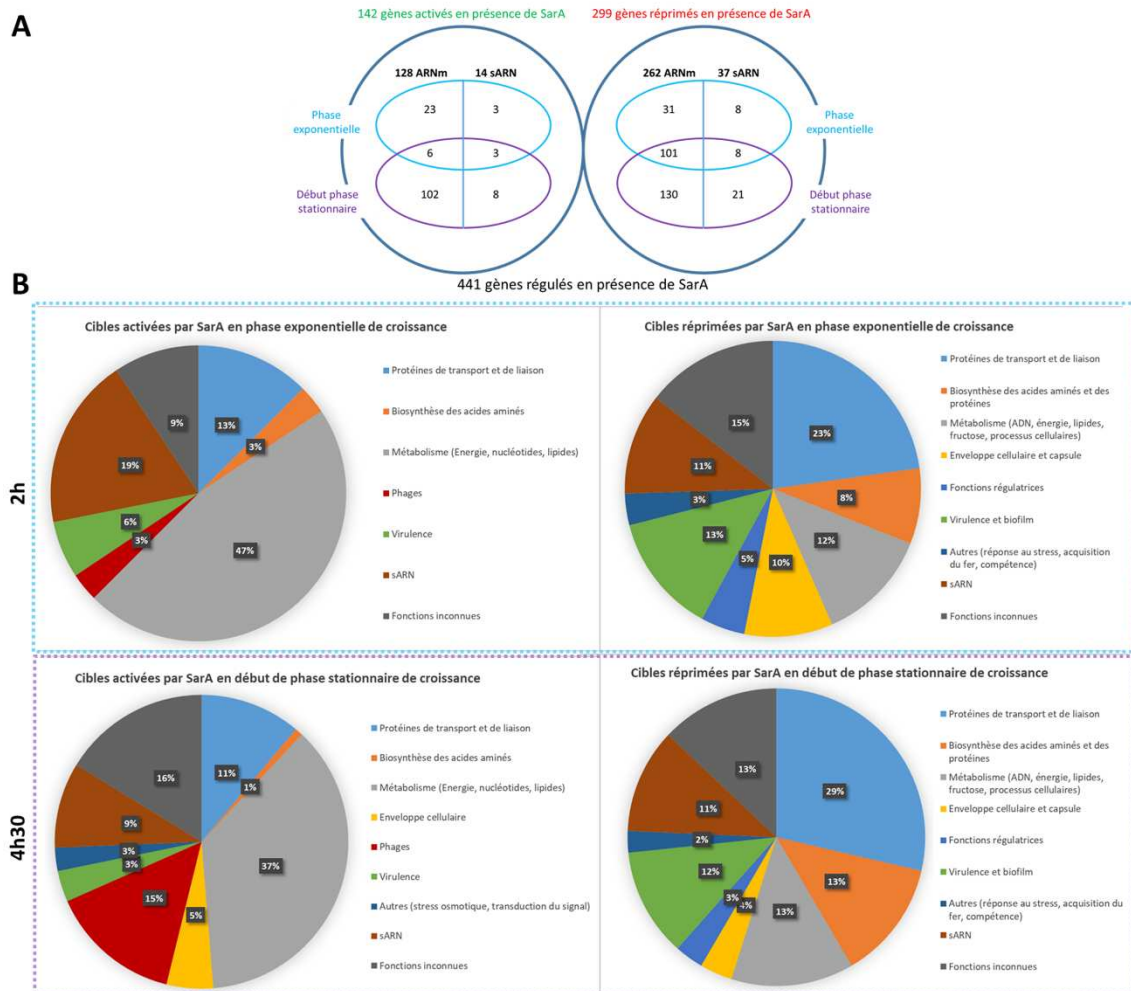


Figure 59 : Résultats globaux du RNA-Seq. (A) Proportions des gènes activés et réprimés en présence de SarA, avec en détails les proportions des gènes codant des protéines et gènes sARNs. (B) Regroupement par fonctions des cibles activées et réprimées en RNA-Seq à 2h et 4h30.

Dans la **figure 59B**, les gènes impliqués dans le métabolisme énergétique, des nucléotides et des lipides représentent 47% et 37% des gènes activés, à 2h et 4h30 de croissance respectivement. A l'inverse, les gènes impliqués dans la virulence et dans la formation de biofilm semblent être majoritairement réprimés dans nos conditions, ils représentent environ 12% de l'ensemble des gènes régulés négativement. D'autre part, environ un quart des gènes réprimés sont liés aux protéines de transport et de liaison. De plus, les gènes impliqués dans la synthèse de l'enveloppe et de la capsule sont majoritairement réprimés en phase exponentielle de croissance.

En analysant en détail les gènes cibles de SarA (**tableau 21 en annexe**), des cibles réprimées connues de SarA sont retrouvées, comme le gène *aur* (SAOUHSC_02971) codant la protéase Auréolysine (Jan Oscarsson et al., 2006), le gène codant la thermonucléase Nuc (SAOUHSC_00888) (Cassat et al., 2006), ou encore le gène *sodM* (SAOUHSC_00093) impliqué dans le stress oxydatif (A. Ballal et Manna, 2009).

Pour les gènes sARNs, ils représentent en moyenne entre 10% et 20% des cibles régulées (**figure 59B**). Plus de la moitié des gènes sARN régulés par SarA sont réprimés et si la plupart ont des fonctions encore inconnues, nous retrouvons parmi les cibles, les deux gènes sARNs *srn_3610_sprC* et *srn_9340* lesquels ont été décrits comme des cibles directement réprimées par SarA (Mauro et al., 2016). De nombreux sARNs semblent impactés par la présence ou l'absence de SarA, comme les ARNregs du métabolisme RsaD ou RsaG mais la plupart des gènes sARNs mis en évidence ont des fonctions encore inconnues à l'heure actuelle.

Cette étude de transcriptomique permet de révéler l'ensemble des cibles directes et indirectes du régulateur SarA chez la souche HG003, c'est pourquoi nous avons décidé d'aller plus loin dans l'investigation des cibles directement régulées par le facteur de transcription SarA chez *S. aureus*.

B. Expérience de ChIP-Seq

Pour poursuivre l'identification des cibles directes de SarA, nous avons réalisé une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) en ciblant la protéine SarA. Cette expérience permet de mettre en évidence les régions d'ADN liées à SarA à un instant donné. Nous partons du principe que SarA régule l'expression de ses cibles en se fixant en amont de leur +1 de transcription. Cette expérience à grande échelle nous permettra d'identifier toutes les zones de fixation de SarA sur l'ensemble du chromosome.

Comme décrit à la **figure 60**, cette expérience de ChIP-Seq a été réalisée à partir d'une culture bactérienne en milieu TSB, où les interactions ADN-protéines ont été figées après 4h de croissance. L'ADN est ensuite fragmenté et nous obtenons deux types d'extraits, le premier qui contient l'ensemble des fragments d'ADN et le second ceux retenus par immunoprécipitation avec le FT SarA. L'ensemble des fragments sont séquencés et alignés sur le génome de *S. aureus* (**figure 60**).

Cette partie expérimentale a été réalisée en collaboration avec l'équipe américaine du P. Ambrose Cheung. Bien que nous possédions des anticorps dirigés contre la protéine native SarA, après quelques essais nous avons conclu que cet anticorps ne permettait pas d'envisager un ChIP-Seq de qualité. C'est pourquoi, nous nous sommes retournés vers une protéine SarA tagguée avec le tag Myc en extrémité C-terminale. Nous avons choisi de réaliser le ChIP-Seq dans la souche délétée du gène *sarA* pour s'affranchir de la protéine SarA endogène et éviter toute compétition entre la protéine SarA endogène et la protéine SarA-Myc.

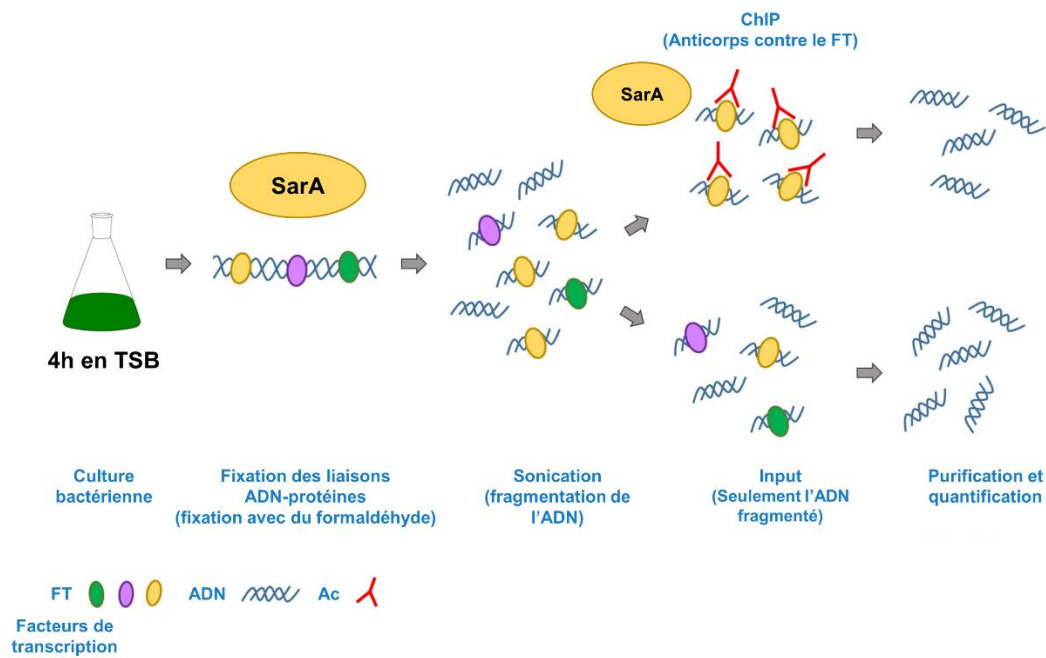


Figure 60 : Principe expérimental du ChIP-Seq (adapté de Giner-Lamia et *al.*, 2018). Ac : anticorps ; FT : facteur de transcription.

Pour mener l'expérience de ChIP-Seq, les régions immunoprécipitées par l'anti-Myc de la souche HG003 $\Delta sarA$ portant le plasmide pSK236 seront comparées à celles de la souche HG003 $\Delta sarA$ contenant le plasmide pSK236-*sarA*-myc. Le plasmide pSK236-*sarA*-myc comporte une version tagguée de la protéine SarA exprimée sous le contrôle de son promoteur endogène P1.

Au préalable, la croissance des souches HG003, HG003 $\Delta sarA$, HG003 $\Delta sarA$ avec pSK236 +/- *sarA*-myc a été étudiée et semble similaire en milieu TSB. Ainsi, la présence du plasmide n'influence pas la croissance de la bactérie (**figure 61A**). Par Western blot, nous avons ensuite vérifié le niveau de protéines SarA produit dans la souche HG003 $\Delta sarA$ contenant le plasmide pSK236-*sarA*-myc. Comme visible dans la **figure 61B**, cette construction permet de produire un niveau similaire de protéine SarA dans la souche HG003 $\Delta sarA$ comparé à celui d'une souche sauvage HG003 (**Figure 61B**). L'utilisation d'un anticorps dirigé contre la protéine SarA, permet d'observer une différence de taille entre la protéine SarA native présente dans la souche HG003 et la protéine SarA-Myc présente dans la souche HG003 $\Delta sarA$ contenant le plasmide pSK236-*sarA*-myc (**figure 61B**).

Pour le ChIP-Seq, les extraits ont été réalisés en duplicat après 4h de croissance en milieu TSB. Les liaisons protéines-ADN ont été fixées à l'instant t avec du formaldéhyde puis l'ADN a été fragmenté par sonication. La qualité de la sonication est vérifiée par la migration des fragments d'ADN sur gel d'agarose (**figure 61C**). La taille optimale des fragments varie entre 100 et 600 nucléotides (nt). Nous obtenons un profil similaire entre les réplicats, avec des fragments d'ADN compris entre 100 et 800 nt.

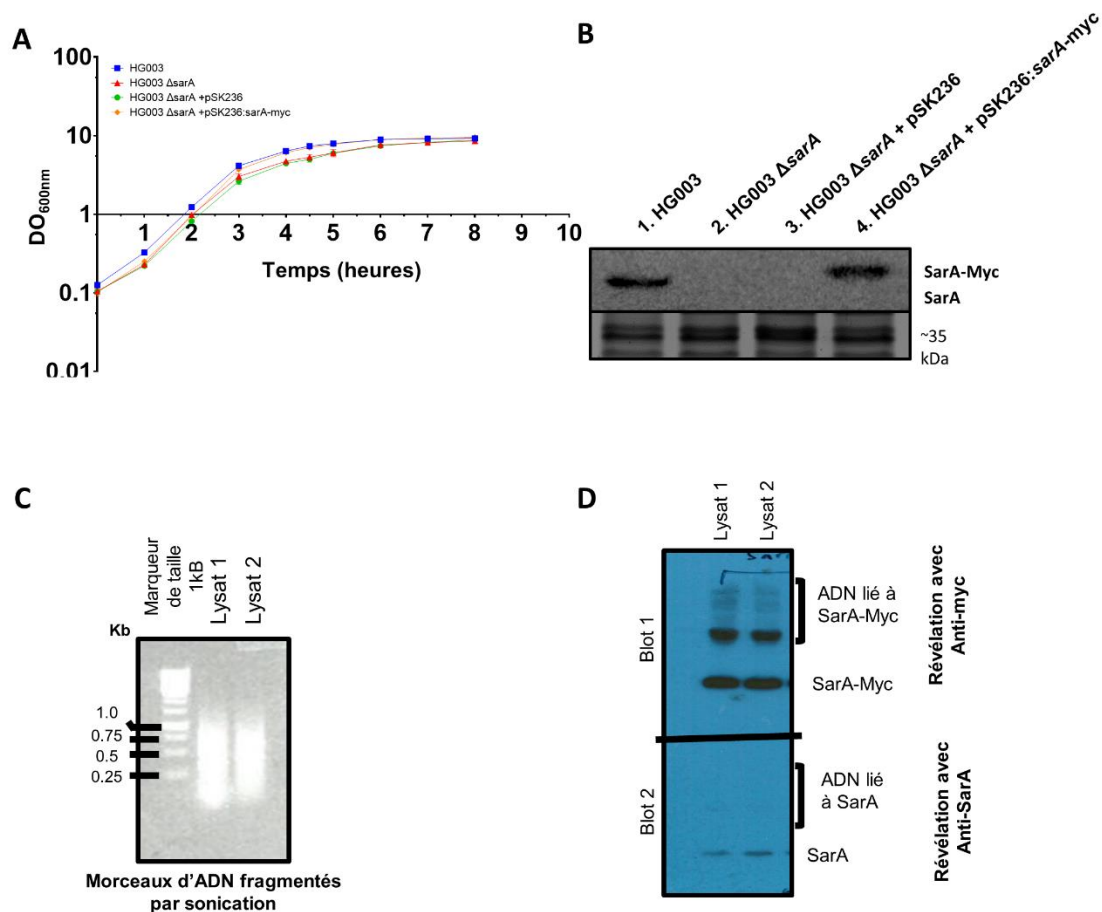


Figure 61 : Contrôles pour valider l'expérience de ChIP-Seq. (A) Courbes de croissance des souches utilisées en milieu TSB pour le ChIP-Seq : HG003 Δ sarA + pSK236 et HG003 Δ sarA + pSK236:sarA-myc comparées au souches HG003 et HG003 Δ sarA. (B) Vérification de la production de la protéine SarA tagguée (SarA-Myc) par rapport à la souche parentale HG003. Western Blot avec un anticorps dirigée contre la protéine SarA. (C) Contrôle de la taille des fragments d'ADN après sonication. Migration des lysats obtenus sur gel d'agarose. (D) Contrôle de l'IP SarA/ADN. Western Blot avec un anticorps anti-Myc (Blot 1) et avec un anticorps anti-SarA (Blot 2).

Par la suite nous allons séparer les parties dites (1) « input » pour l'ensemble des fragments d'ADN et (2) les fragments d'ADN récupérés grâce à l'anticorps dirigé contre le tag myc de la protéine SarA-Myc lors de l'immunoprécipitation (**figure 60**).

La version tagguée de SarA permet de récupérer les régions ADN sur lesquelles SarA est fixée à 4h de culture c'est-à-dire en début de phase stationnaire. L'IP de la protéine SarA liée aux fragments d'ADN est vérifiée par Western blot avec soit une révélation avec un anticorps dirigé contre le tag Myc ou contre la protéine SarA (**Figure 61D**). La révélation avec l'anticorps anti-Myc permet de mettre en évidence qu'une partie de la protéine SarA est libre, et qu'une autre partie est liée aux fragments d'ADN.

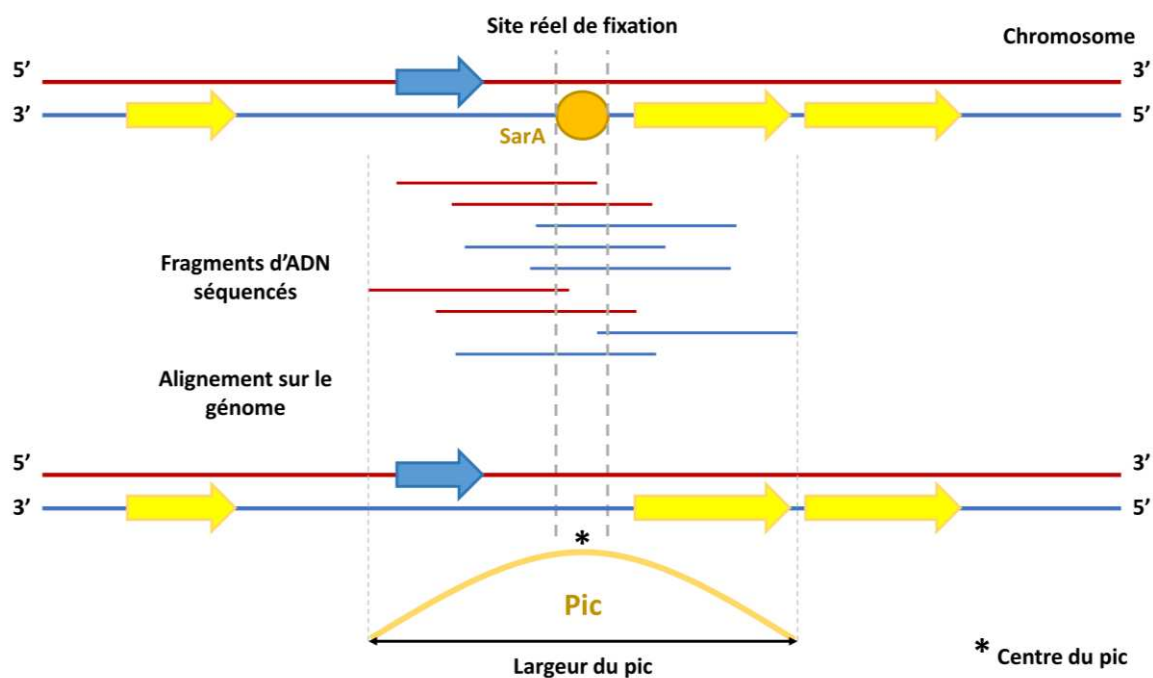


Figure 62 : Fragments d'ADN après IP, séquencés et alignés sur le génome de référence. En jaune, les gènes codant des protéines, et en bleu les gènes exprimant des sARNs.

L'ensemble des fragments d'ADN séquencés ont été alignés sur le génome de *S. aureus* NCTC8325 afin de repositionner les zones de fixation de SarA sur l'ensemble du chromosome. Ces fragments d'ADN liés à SarA sont alignés sur le génome de référence avec le logiciel CLC (Genomics Workbench 11) (**figure 62**). Cette partie a été réalisée avec l'aide du P. Vincent Cattoir avant mon arrivée au laboratoire. Les zones identifiées sont listées selon leur localisation génomique, la largeur du pic, le centre du pic de fixation et une valeur statistique p-value (**figure 62**). Elles ont été repositionnées par rapport à la localisation des gènes codant des protéines (jaune) et les gènes sARNs en bleu (**figure 62**). Les zones de fixation identifiées par l'alignement des fragments séquencés sont caractérisées comme « pic » de fixation de SarA, et la zone la plus couverte en séquençage est désignée comme le centre du pic de fixation.

Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux pics situés en amont des gènes qui pourraient témoigner d'une régulation du gène cible par SarA. A mon arrivée au laboratoire, j'ai repris l'analyse des fichiers et replacés les pics obtenus sur l'ensemble du chromosome. Au total plus de 1000 pics de fixation de SarA ont été obtenus, nous avons sélectionné les zones de fixation de SarA qui se situent en amont d'un gène codant une protéine (5'UTR) ou sARNs. Ce premier filtre nous a permis d'éliminer les pics situés à l'intérieur d'un gène ou encore en 3'UTR. Enfin nous avons fixé le seuil d'une p-value inférieure à $1E^{-250}$ pour pouvoir analyser au mieux les données. Ce critère de sélection nous révèle environ 340 pics de fixation de SarA en amont de gènes sur l'ensemble du chromosome de *S. aureus* (tableau S3 dans Oriol et al., 2021).

Dans la publication, nous avons classé les cibles de fixation de SarA en fonction de la fonction assurée par le gène d'intérêt retrouvé en ChIP-Seq. Ces données sont disponibles dans le tableau S4 des données supplémentaires (Oriol et *al.*, 2021).

C. Analyse combinée des deux expériences à haut-débit

Pour identifier les cibles directement régulées par SarA, il nous a semblé pertinent de combiner les résultats ChIP-Seq et RNA-Seq afin de faire ressortir les cibles communes aux deux expériences, caractérisées par une fixation de SarA en amont du gène et une variation d'expression en fonction de la présence de SarA. Cette analyse combinée a permis de révéler 140 gènes dont 125 gènes codant des protéines et 15 gènes sARNs (**tableau 22 en annexe**). Seulement 12 gènes sur 140 sont retrouvés activés en présence de SarA dans le RNA-Seq. Cette observation semble indiquer que la fixation de SarA en amont d'un gène entrainerait en majorité une répression transcriptionnelle du gène cible. Les cibles directes de SarA sont donc généralement des cibles réprimées, et les indirectes seraient majoritairement des cibles activées.

Parmi les 125 gènes codant des protéines, environ une vingtaine de gènes sont des gènes liés au transport (transporteurs ABC, symporteurs ou encore perméases). Concernant les facteurs de virulence, nous retrouvons la grande famille de protéases de *S. aureus* réprimées par SarA : *sspAB* (SAOUHSC_00988-00987) et *aur* (SAOUHSC_02971) (Oscarsson et *al.*, 2006). Le gène *sodM* connu pour être régulé par SarA fait également parmi des données comparatives RNA-Seq/ChIP-Seq (A. Ballal et Manna, 2009).

Parmi les nouvelles cibles de SarA, nous avons mis en évidence trois grandes cytotoxines de *S. aureus*, les leucocidines LukED, LukSF et HlgCB responsables de la formation de pores dans les membranes eucaryotes (Tam et Torres, 2019), qui n'avait pas été montrées être régulées par le FT SarA auparavant. De plus, les gènes *sarX* et *mgrA* sont retrouvés parmi les cibles réprimées par SarA (**tableau 22 en annexe**).

La plupart des sARNs communs aux deux expériences RNA-Seq/ChIP-Seq sont impactés négativement par la présence de SarA, sauf l'ARN *Srn_1550_Teg49*. Ce gène est localisé dans la longue région 5'UTR du gène *sarA*, par conséquent la mutation du gène *sarA* aura pu impacter l'expression de ce gène. Par ailleurs, les gènes sARNs sont soit décrits comme transcrits par la base de données SRD ou localisés dans la région 5'UTR d'un gène. De plus, ils sont tous impactés en début de phase stationnaire de croissance sauf *srn_1530* qui n'est retrouvé qu'au temps 2h avec les seuils fixés.

En conclusion, les données de transcriptomiques et de ChIP-Seq sur SarA révèlent des cibles déjà connues pour être régulés par ce FT chez *S. aureus*, mais ouvrent de nombreuses perspectives sur l'implication de SarA chez ce pathogène notamment au niveau du métabolisme et de la régulation des facteurs de virulence.

1. Choix des cibles potentiellement régulées par SarA

Pour étudier si la régulation par SarA est directe ou non, nous sommes partis du principe qu'une cible commune révélée en RNA-Seq et en ChIP-Seq est un bon candidat pour faire partie des cibles directes de SarA. Nous avons sélectionné 13 candidats possédant ces critères pour valider cette hypothèse. Ces 13 gènes se composent de 9 gènes codant des protéines et 4 gènes exprimant des sARNs. L'analyse de ces 13 cibles a été partagée avec nos collaborateurs américains. Ces 13 candidats sont exclusivement des gènes réprimés en RNA-Seq. Ils possèdent les différentiels d'expression les plus importants ou sont impliqués dans des fonctions cellulaires non connues pour être régulées par SarA. De plus, les gènes sélectionnés possèdent des zones de fixation de SarA en amont de leur gène, dans leur région promotrice avec des p-values très faibles (**tableau 6**). Le choix de sélectionner seulement des gènes réprimés s'explique par le fait que la majorité des cibles communes sont réprimées et que les phénomènes de répression s'identifient en général sur une zone proche des régions promotrices -10 et -35 alors que les activations transcriptionnelles se localisent sur des zones plus variables donc plus difficile à visualiser par la suite en retard sur gel.

Annotation	Nom du gène	Assignement	RNA-Seq		ChIP-seq		
			Différentiel d'expression HG003 Δ sarA vs HG003		Distance par rapport à l'ATG ou au +1 pour les sARNs (nt)	Score du pic	p-value
			Phase exponentiel (2h)	Début phase stationnaire (4h30)			
SAOUHSC_00088	<i>galE</i>	UDP-glucose 4-épimérase	75,5	43,0	85	33,2	7,09E-242
SAOUHSC_00555		Hydrolase type haloacide déhalogénase	15,2	7,0	33	45,3	0
SAOUHSC_00913	<i>lysR</i>	Protéine régulatrice de la famille LysR	65,1	42,8	58	50,4	0
SAOUHSC_00961	<i>comK1</i>	Facteur transcriptionnel lié à la compétence	15,2	9,4	111	46,7	0
SAOUHSC_00975	HP	Protéine hypothétique	4,7	26,6	440	47,8	0
SAOUHSC_01452	<i>ald1</i>	Alanine déshydrogénase	16,7	38,3	197	52,1	0
SAOUHSC_02127	<i>scpA</i>	Staphopaine thiol protéinase	126,7	57,2	221	51,0	0
SAOUHSC_02696	<i>fmhA</i>	Aminoacyltransférase (Protéine de résistance à la méthicilline - famille FemAB)	38,9	21,0	99	41,7	0
SAOUHSC_02820	HP	Protéine de liaison à l'ATP d'un transporteur ABC	23,4	44,4	82	43,3	0
<i>srm_0860_rsaOB</i>	<i>teg40_sRNA61</i>	Transcrit - régulateur agissant en cis	-	10,5	88	24,8	1,09E-135
<i>srm_2230_sprG2</i>	<i>teg19B</i>	Transcrit - système toxine-antitoxine de type I	15,5	9,0	54	33,7	9,01E-249
<i>srm_3950_teg16</i>	<i>sRNA321</i>	Transcrit	-	21,8	106	44,7	0
<i>srm_9335_tsr29</i>	-	Transcrit	3,1	5,5	113	40,5	0

Tableau 6 : Gènes réprimés sélectionnés l'étude du régulon SarA. En jaune, les gènes codant des protéines et en bleu les gènes exprimant des sARNs. Les différentiels d'expression en rouge indiquent des gènes réprimés dans le RNA-Seq. HP : protéine hypothétique.

1.1. Les gènes codant des protéines

Cette partie permet d'introduire les différents gènes choisis par rapport à leurs critères RNA-Seq/ChIP-Seq et de présenter leur fonction ainsi que les régulations potentiellement déjà connues. Comme décrit dans l'introduction, différentes souches de *S. aureus* sont étudiées pour leur réseau de régulation : NCTC8325, COL, N315, Newman et USA300. L'annotation de leurs gènes est répertoriée dans la base de données Auréowiki sous différents noms, lesquels sont regroupés dans le **tableau 7** (Fuchs et al., 2018).

Pour chaque gène sélectionné, nous allons détailler sa localisation génétique, les régulations connues et intégrer la vision globale de son environnement génomique avec la visualisation des données RNA-Seq avec

GalE qui permet la transformation du UDP-galactose en UDP-glucose et inversement. Le galactose est l'un des principaux sucres présents dans le mucus qui recouvrent l'épithélium nasopharyngé de la cavité nasale, où est retrouvé *S. aureus* (Carvalho et al., 2017). Donc l'activation de cet opéron pourrait être utile à la bactérie pour survivre dans la cavité nasale de l'Homme. Les deux autres gènes de l'opéron, SAOUHSC_00089 et SAOUHSC_00090, codent des protéines hypothétiques mais seraient probablement une phosphotransférase et une glycosyltransférase respectivement, qui pourraient être impliquées dans la biosynthèse de la capsule (The UniProt Consortium, 2021) (**figure 63B**). Cet opéron pourrait être impliqué dans la survie de *S. aureus* au niveau des cavités nasales.

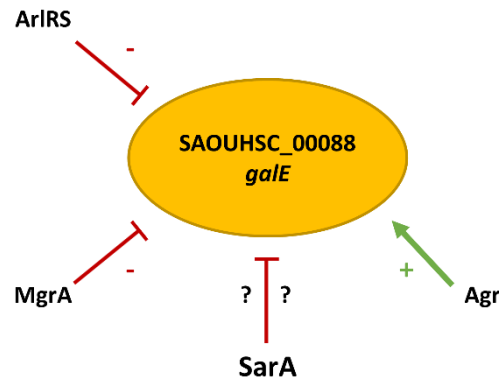


Figure 64 : Régulations connues du gène SAOUHSC_00088 (*gale*). En rouge, les acteurs réprimant son expression et en vert ceux qui active son expression.

Ce gène SAOUHSC_00088 a été mis en évidence dans une étude portant sur l'expression des gènes en condition anaérobie, où son expression est légèrement augmentée lors de ce stress (Fuchs et al., 2007). Concernant les régulateurs globaux, il a été montré que l'expression de ce gène est réprimée à la fois par le système à deux composants ArIRS (consensus ArIR) et par MgrA dans les souches N315 et USA300 (Liang et al., 2005) (Luong et al., 2006) (Crosby et al., 2020) mais serait activé par le système Agr (Said-Salim et al., 2003) (**figure 64**).

Les trois FT SarA, MgrA et Agr sont connus pour réguler positivement la synthèse de la capsule (Luong et al., 2006) (Gupta et al., 2013). D'ailleurs, en RNA-Seq/ChIP-Seq, nous retrouvons également deux autres opérons impliqués dans la synthèse de la capsule, notamment *capIABC* et *capABCDEF* où le gène *capE* code également une UDP-galactose 4-épimérase comme *gale* (**tableau 22 en annexe**). Cette nouvelle cible SAOUHSC_00088 ajouterait une régulation supplémentaire par SarA sur la synthèse coordonnée de la capsule. Dans l'introduction (page 40), nous avons pu détailler la régulation du gène *cap* impliqué dans la synthèse de la capsule. Aux multiples répresseurs déjà décrits dans la littérature, nous ajoutons ici le FT SarA en tant de nouveau répresseur de la synthèse de la capsule. Ce multiple réseau de régulation témoigne que la production de cette capsule est finement régulée pour être activée au moment adéquat.

HTH (hélice-couche-hélice). Les protéines LTTR sont les régulateurs les plus communs chez les procaryotes (Schell, 1993). Ils activent la transcription des opérons et des régulons impliqués dans diverses fonctions, comme la biosynthèse d'acides aminés ou encore la résistance aux antibiotiques. Souvent ils agissent comme répresseur sur leur propre expression, ce qui a pu être démontré chez *S. aureus* pour ce gène SAOUHSC_00913 (Groma *et al.*, 2020).

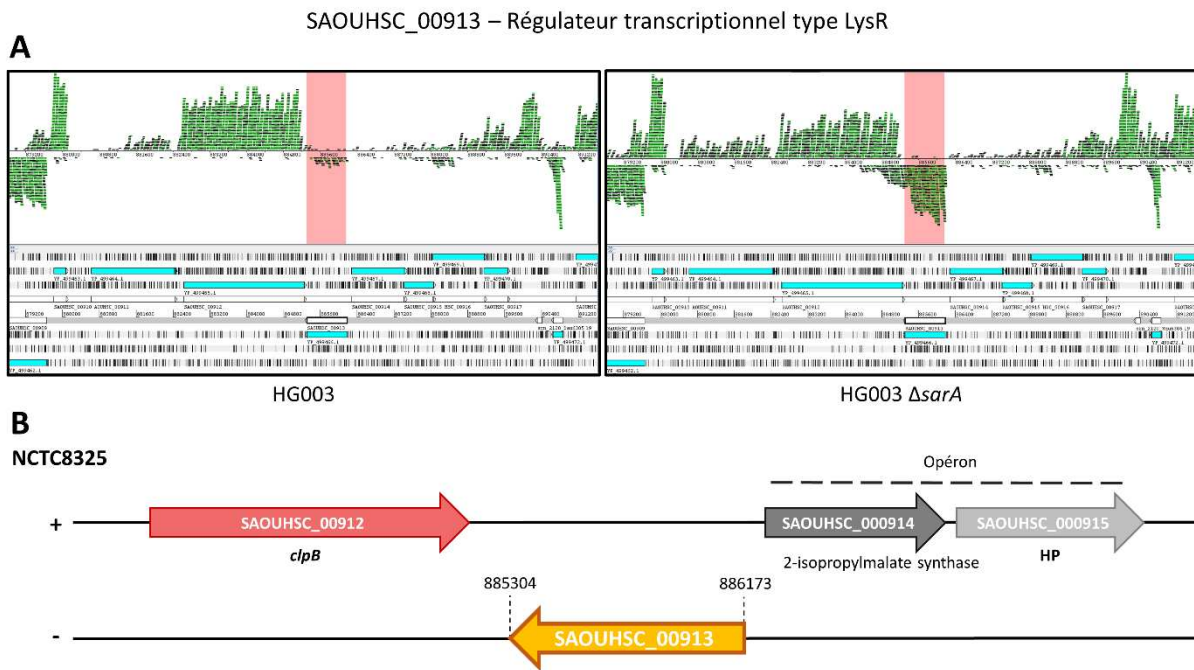


Figure 66 : Le gène SAOUHSC_00913 chez *S. aureus* NCTC8325. (A) Vision sur le logiciel Artémis des données RNA-Seq à 4h30 dans les souches HG003 et HG003 $\Delta sarA$. Surligné en rose sur les images Artémis, le gène d'intérêt. En vert, les reads du RNA-Seq. (B) Organisation génétique. Représenté avec une flèche rouge, les gènes régulés par le régulateur de réponse au stress thermique CstR. HP : protéine hypothétique.

SAOUHSC_00913 est un gène très conservé chez *S. aureus* et possède 96% d'identité au niveau de sa séquence protéique avec les autres LTTRs, et semble être critique pour le fitness de *S. aureus* durant la colonisation des tissus secondaires lors d'une infection sur modèle murin (Groma *et al.*, 2020). Une analyse transcriptomique a été réalisée avec un mutant de ce gène et cette analyse a révélé que des gènes comme *l'arnIII*, ou encore l'opéron *ilvDBCA* étaient activés par ce facteur LTTR. Pour aller plus loin dans l'identification de ce FT, les auteurs de ce travail ont montré que sa transcription était réprimée en présence de glucose, activée en condition de microaérobie et que son activité dépendait d'ions cuivre (**figure 67**) (Groma *et al.*, 2020).

A ce jour, 4 LTTRs ont été identifiées chez *S. aureus* : CidR, HutR, GltC et CcpE (Groma *et al.*, 2020). En 2006, une analyse transcriptomique par puce à ADN a révélé que ce gène LTTR SAOUHSC_00913, était surexprimé dans un mutant *sarA* à la fois en phase exponentielle et post-exponentielle de croissance (Cassat *et al.*, 2006). Comme cette étude n'est pas allée plus loin dans la caractérisation de cette régulation par SarA, nous avons choisi de le sélectionner SAOUHSC_00913 parmi

montré que *S. aureus* pouvait être naturellement compétente grâce à l'activation du facteur sigma cryptique SigH (**figure 69**). Ce facteur ComK1 est un orthologue de ComK chez *Bacillus subtilis*. Ce dernier agit sous forme de dimère et se lie à des séquences spécifiques sur l'ADN (K-box) puis la forme en tétramère permet l'activation transcriptionnelle des gènes cibles en courbant l'ADN et facilite la fixation de l'ARN polymérase (Bæk et al., 2013).

En 2014, le génome de *S. aureus* a révélé contenir deux nouveaux FT ayant des similarités avec ComK1 et ComK2 de *Bacillus cereus* (*B. cereus*). Notre gène d'intérêt ComK1 possède 25% d'identité et 47% de similarité à la fois à ComK de *B. subtilis* et ComK1 de *B. cereus*. De plus, quand le facteur SigH est surexprimé, le gène SAOUHSC_00961 *comk1* est également surexprimé (Fagerlund et al., 2014) ce qui renforce le fait que ComK1 serait impliqué de manière active dans la compétence de *S. aureus*. Son expression est également activée par le système Agr (Cheung et al., 2011) (**figure 69**) et induite lors d'un choc thermique (10°C puis 42°C) (Anderson et al., 2006).

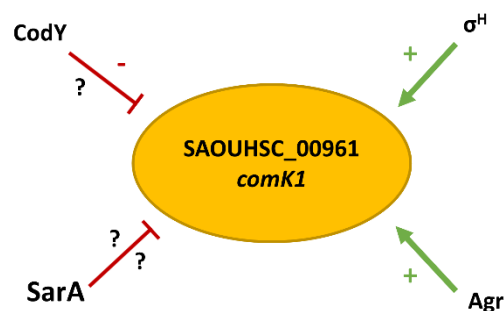


Figure 69 : Régulations connues sur le gène SAOUHSC_00961. En rouge, les acteurs réprimant son expression et en vert ceux qui active son expression. Régulé par CodY démontré chez *B. cereus*.

Chez *B. cereus*, ComK est régulé par CodY (**figure 69**) (Mirończuk et al., 2011), or *S. aureus* possède également un FT CodY et comme il n'existe pas d'homologue de SarA chez *B. cereus* il nous ait apparu intéressant de sélectionner SAOUHSC_00961 afin de valider le rôle direct de SarA sur la transcription de ce gène (**figure 68B**).

e) SAOUHSC_00975

L'expression du gène SAOUHSC_00975 est fortement réprimée en début de phase stationnaire avec un différentiel d'expression de 26 contre 4 à 2h de croissance (**figure 70A**). Le pic de fixation de SarA avec une p-value proche de 0 se situe 440 nt en amont de son codon d'initiation.

Ce gène est situé sur le brin (-) dans le core génome (**figure 70B**) et code une protéine hypothétique qui est prédite comme localisée à la membrane avec deux domaines transmembranaires potentiels (The UniProt Consortium, 2021).

Lors d'un stress acide, l'expression du gène SAOUHSC_00975 est réprimée lors d'une culture à un pH de 5,5 (Weinrick, 2004) mais son expression est déréprimée dans des conditions de biofilm après 8 heures de croissance (différentiel d'expression par rapport à une culture planctonique de 4h) (Resch et al., 2006).

SAOUHSC_00975 – Protéine hypothétique

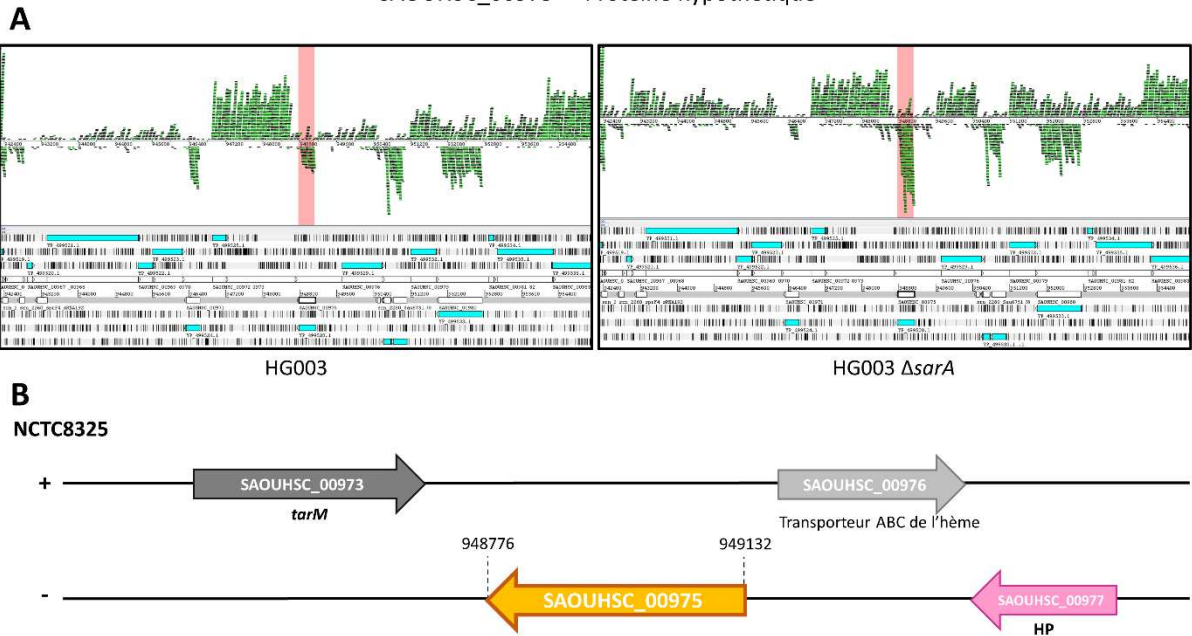


Figure 70 : Le gène SAOUHSC_00975 chez *S. aureus* NCTC8325. (A) Vision sur le logiciel Artémis des données RNA-Seq à 4h30 dans les souches HG003 et HG003 $\Delta sarA$. Surligné en rose sur les images Artémis, le gène d'intérêt. En vert, les reads du RNA-Seq. **(B)** Organisation génétique. Représenté avec une flèche rose, les gènes régulés par le facteur SigB. HP : protéine hypothétique.

Aucun régulateur direct n'a été identifié pour ce gène mais au vu de son différentiel d'expression et de la fixation de SarA en amont de celui-ci, nous avons décidé d'aller étudier sa régulation par le régulateur global SarA.

f) SAOUHSC_01452 (*ald1*)

Le gène SAOUHSC_01452 est fortement exprimé dans un mutant $\Delta sarA$ à 4h30 par rapport à 2h, avec des différentiels d'expression de 38 et 16 à 2h et 4h30 respectivement (**figure 71A**). En CHIP-Seq, la zone de fixation de SarA se localise à 197 nt en amont du codon d'initiation avec une p-value proche de 0.

Le gène SAOUHSC_01452 code une alanine déshydrogénase, qui permet la conversion du pyruvate en L-alanine et inversement. L'acide aminé L-alanine peut intervenir dans la synthèse du peptidoglycane, ou encore dans le maintien de l'équilibre redox (Dave et Kadepagari, 2019), c'est pourquoi la régulation d'un tel gène peut être cruciale pour la bactérie. Le maintien de l'équilibre redox est nécessaire pour la croissance et la survie de la bactérie.

Par ailleurs, ce gène semble faire partie d'un opéron avec les gènes SAOUHSC_01448-01450-01451 (**figure 71B**) dans lequel *norB* (SAOUHSC_01448) est connu pour être exprimé simultanément à *ald1* (Truong-Bolduc et Hooper, 2007) (**figure 71B**) alors que SAOUHSC_01450 et SAOUHSC_01451 sont connus pour être régulés par CodY.

Le gène *aldI* (SACOL1478) est également réprimé par la protéine Rex, régulateur central du métabolisme anaérobie chez *S. aureus* (Pagels et al., 2010). La protéine Ald peut également jouer un rôle dans l'équilibre redox NAD⁺/NADH de la bactérie (Dave et Kadeppagari, 2019). La fixation de Rex est renforcée par le NAD⁺ tandis que le NADH, concurrent du NAD⁺ pour la liaison Rex, diminue l'activité de Rex. Par conséquent la régulation par Rex permettrait de remettre l'équilibre redox à la normale.

Enfin, le gène *aldI* SAOUHSC_01452 fait également partie des gènes activés par SrrAB (Cao et al., 2017), TCS qui répond au stress oxydant ou à l'hypoxie (**figure 72**).

Pour finir, ce gène *aldI* a été trouvé dans une étude qui montre sa répression par *sarA* dans les souches *S. aureus* UAMS et COL. Cette étude n'est pas allée plus loin dans la caractérisation de cette cible en lien avec le régulateur SarA (Nagarajan et al., 2009).

Ce gène *aldI* a été retrouvé dans de nombreuses études et semblerait faire partie à part entière du métabolisme central de *S. aureus*, car il est connu pour être régulés par au moins 9 régulateurs répondant à des signaux très divers. C'est pourquoi, nous avons choisi d'étudier sa régulation directe par SarA.

g) SAOUHSC_02127 (*scpA*)

Ce gène *scpA* fait partie des gènes les plus réprimés en RNA-Seq, avec un différentiel d'expression de 126 à 2h et de 57 à 4h30 de croissance (**figure 73A**). La fixation de SarA en amont du codon d'initiation se situerait à environ 221 nt avec une p-value proche de 0. SAOUHSC_02127 fait partie d'un opéron de deux gènes (*scpA-scpB*) dont l'ensemble semble impacté par l'absence de *sarA* en RNA-Seq (**tableau 6**).

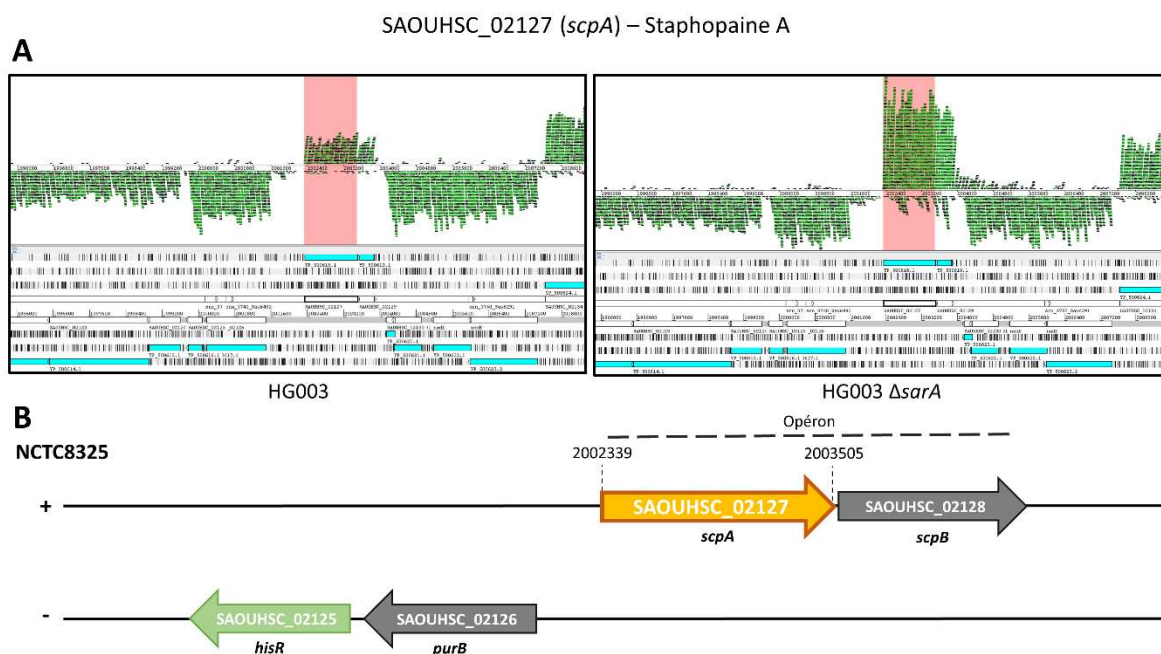


Figure 73 : Le gène SAOUHSC_02127 chez *S. aureus* NCTC8325. (A) Vision sur le logiciel Artemis des données RNA-Seq à 4h30 dans les souches HG003 et HG003 Δ *sarA*. Surligné en rose sur les images Artemis, le gène d'intérêt. En vert, les reads du RNA-Seq. (B) Organisation génétique. Représenté avec une flèche verte, les gènes régulés par HisR (régulateur de la biosynthèse de l'histidine).

Le gène SAOUHSC_02127 code la Staphopaine A, une cystéine protéase sécrétée par *S. aureus* (Dubin, 2002). Elle possède une spécificité très large et est capable de dégrader l'élastine, protéine de la matrice extracellulaire chez les eucaryotes qui donne l'élasticité et la résilience aux tissus. Le gène *scpA* fait partie de l'opéron *scp* qui contient aussi le gène *scpB* qui code l'inhibiteur de cette protéase, la staphostatine A (**Figure 73B**). Cet inhibiteur permet d'éviter que la cystéine protéase ScpA cause des dommages intracellulaires dans la bactérie avant sa sécrétion.

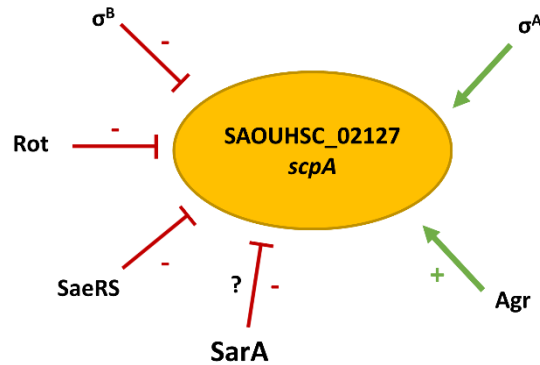


Figure 74 : Régulations connues sur le gène SAOUHSC_02127. En rouge, les acteurs réprimant son expression et en vert ceux qui active son expression.

Au niveau des signaux perçus par *S. aureus*, Il a été montré que le gène *scpA* est surexprimé en condition limitante en fer (Allard et al., 2006). Par ailleurs, l'expression de cet opéron est connue pour être régulée par le facteur σ^A (SigA) et activée par le système Agr (Shaw et al., 2004). Néanmoins, cet opéron est connu pour être réprimé par le système SaeRS (Cassat et al., 2013), par le facteur σ^B (SigB) (Bischoff, 2004), par Rot (Said-Salim et al., 2003) et par SarA (Shaw et al., 2004) (Nagarajan et al., 2009) (**figure 74**). SarA est connue pour être le régulateur central des protéases chez *S. aureus*, ces gènes sont retrouvés fortement réprimés en RNA-Seq. Cette protéase ScpA est co-exprimée avec les trois autres protéases majeures chez ce pathogène, Auréolysine (*aur* - SAOUHSC_02971), la Staphopaine B (*sspB* - SAOUHSC_00987) et la glutamyl-endopeptidase (*sspA* - SAOUHSC_00988). Au sein de notre RNA-Seq, nous retrouvons les gènes *aur* et *sspB* fortement réprimés dans nos conditions.

La régulation directe par SarA n'avait pas été mise en évidence pour le gène *scpA*, c'est pourquoi nous avons décidé d'étudier ce gène dans nos conditions RNA-Seq et ChIP-Seq dans la souche HG003.

h) SAOUHSC_02696 (*fmhA*)

Le gène SAOUHSC_02696 possède des différentiels d'expression de 38 et 21 à 2h et 4h30 de croissance respectivement (**figure 75A**). En ChIP-Seq, le pic de fixation de SarA est retrouvé à 99 nt en amont du codon d'initiation avec une p-value proche de 0 (**tableau 6**).

SAOUHSC_02696 (*fmhA*) - Aminoacyltransférase

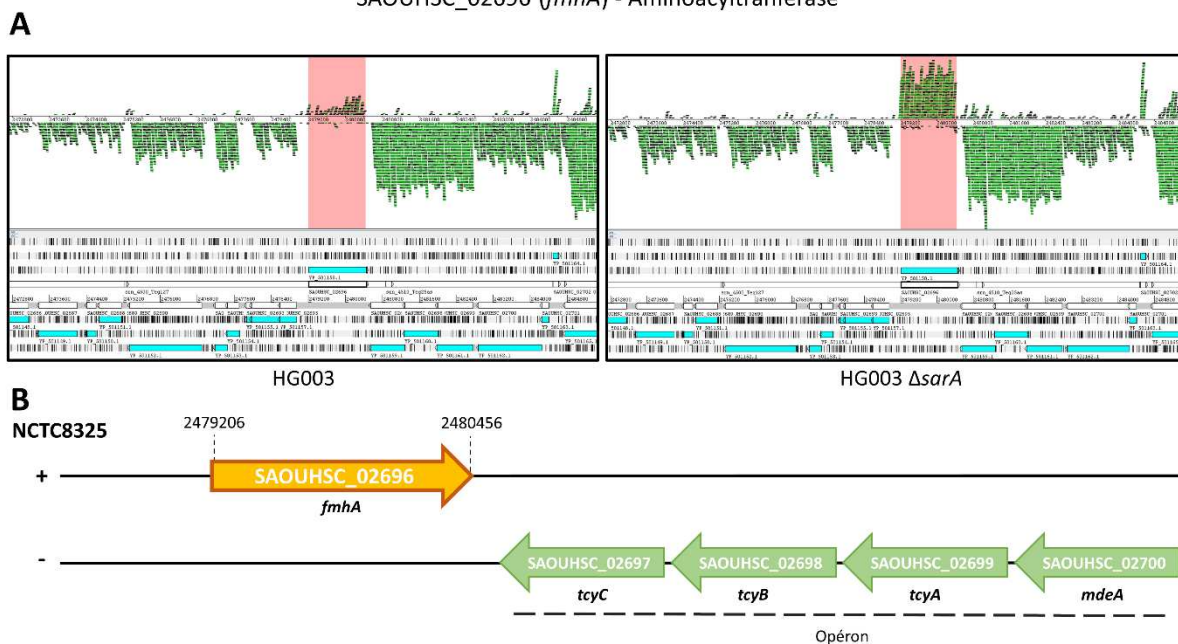


Figure 75 : Le gène SAOUHSC_02696 chez *S. aureus* NCTC8325. (A) Vision sur le logiciel Artémis des données RNA-Seq à 4h30 dans les souches HG003 et HG003 $\Delta sarA$. Surligné en rose sur les images Artémis, le gène d'intérêt. En vert, les reads du RNA-Seq. (B) Organisation génétique. Représenté avec une flèche verte, les gènes régulés par CymR (régulateur de la biosynthèse de la cystéine).

Le gène SAOUHSC_02696 (*fmhA*) code une aminoacyltransférase qui fait partie de la famille des protéines type FemAB (**figure 75B**). Les protéines FemAB sont essentielles pour la viabilité et la bonne ségrégation des cellules filles chez *S. aureus* (Monteiro et al., 2019). Elles permettent de catalyser la formation de pont interpeptidique composé de cinq glycines, caractéristique du peptidoglycane de *S. aureus* (Ehlert et al., 1997). Ces ponts sont synthétisés par trois protéines, FemX qui ajoute la première glycine, puis les homodimères FemA et FemB qui ajoutent deux dipeptides glycine-glycine. Récemment il a été montré que des dipeptides sérine-glycine se retrouvent dans les ponts interpeptiques ajoutés par les homologues FmhA et FmhC, ce qui confère la résistance à la lysostaphine et protège contre les muréines hydrolases endogènes (Willing et al., 2020). Il a également été démontré que les protéines de type FemAB interviennent dans la résistance à la méthicilline (SARM) (Strandén et al., 1997). La protéine FmhA agit en synergie avec la protéine FmhC (gène SAOUHSC_01220), mais ne constitue pas un opéron avec ce dernier (**figure 75B**).

Ce gène *fmhA* a été très peu décrit jusqu'à maintenant, alors que dans cette étude, il fait partie des gènes les plus réprimés par SarA (**tableau 21 en annexe**). De ce fait il nous est apparu intéressant de poursuivre son étude en étudiant sa régulation par SarA, car aucun régulateur de ce gène n'est connu à l'heure actuelle. De plus, SarA a déjà été montré comme jouant un rôle dans la résistance aux antibiotiques avec la régulation du gène *fmtA*, protéine impliquée dans la résistance à la méthicilline (Zhao et al., 2012).

i) SAOUHSC_02820 (transporteur ABC hypothétique)

Le gène SAOUHSC_02820 a obtenu des différentiels d'expression de 23 à 2h et 44 à 4h30 en RNA-Seq (**figure 76A**). Son pic de fixation de SarA a été déterminé à environ 82 nt en amont de son codon d'initiation (**tableau 6**).

SAOUHSC_02820 – Transporteur ABC hypothétique

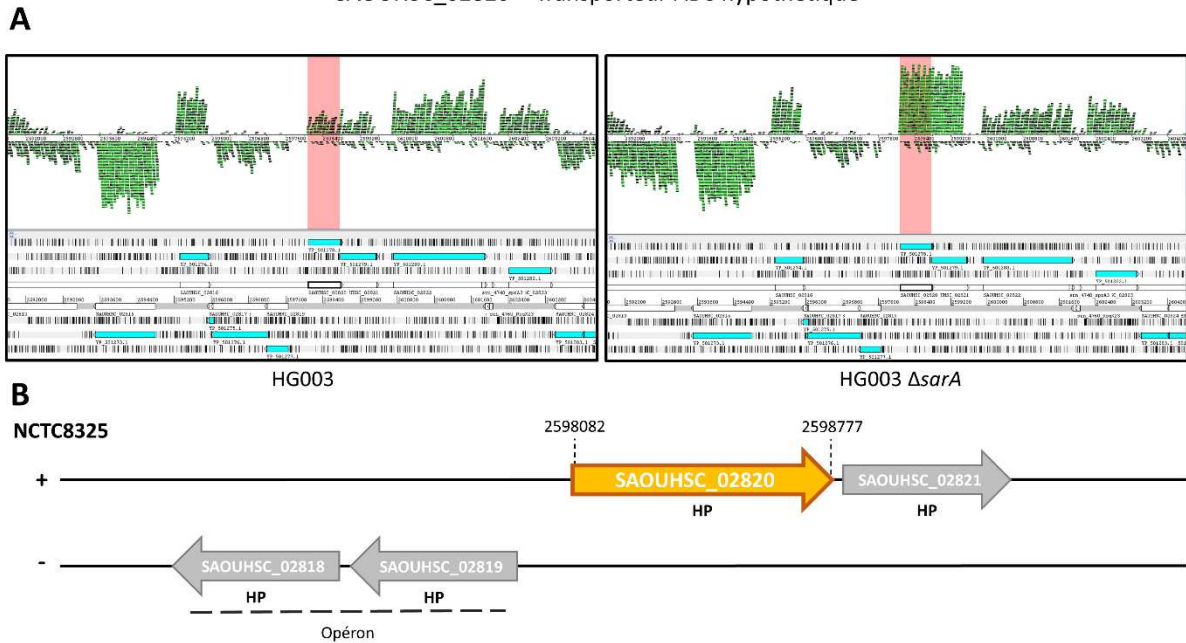


Figure 76 : Le gène SAOUHSC_02820 chez *S. aureus* NCTC8325. (A) Vision sur le logiciel Artémis des données RNA-Seq à 4h30 dans les souches HG003 et HG003 $\Delta sarA$. Surligné en rose sur les images Artémis, le gène d'intérêt. En vert, les reads du RNA-Seq. (B) Organisation génétique. HP : protéine hypothétique.

Le gène SAOUHSC_02820 code un transporteur ABC hypothétique, et forme un opéron avec le gène SAOUHSC_02821 qui coderait la perméase du transporteur (**figure 76B**) (Fuchs et al., 2018). Ce gène est présent dans 100% des souches de *S. aureus* et présent dans la moitié des souches de *Staphylococcus epidermidis* (Méric et al., 2015). Il possède également 87% d'homologie avec le transporteur de bacitracine BcrA de *Staphylococcus hominis* (Truong-Bolduc et al., 2011). La bacitracine est un antibiotique produit par *B. subtilis* qui cible la paroi bactérienne.

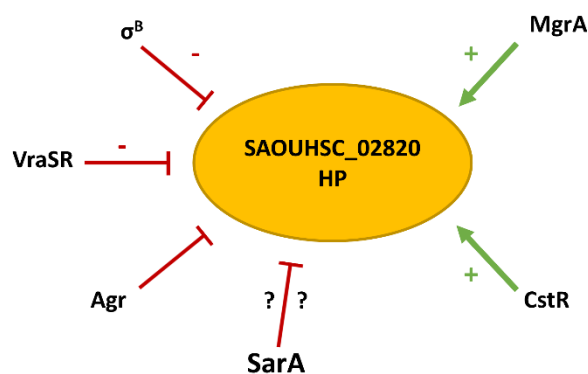


Figure 77 : Régulations connues sur le gène SAOUHSC_02820. En rouge, les acteurs réprimant son expression et en vert ceux qui active son expression.

Au niveau régulation, le gène SAOUHSC_02820 a montré être réprimé par le facteur σ^B (Bischoff, 2004) et par le système Agr (Cheung et al., 2011) mais activé par CstR (Peng et al., 2017) et par MgrA (Truong-Bolduc et al., 2011).

Chez la souche *S. aureus* N315, ce gène est moins exprimé lors d'un stress acide à pH 5,5 (Weinrick, 2004) et dans un biofilm (Beenken, 2004) mais surexprimé lors de différents stress ciblant la paroi (oxacilline, vancomycine et la nisine) (Muthaiyan, 2008). Il est notamment réprimé par le système VraSR en présence d'oxacilline (Boyle-Vavra, 2013), TCS responsable de la biosynthèse de la paroi. Ces observations semblent en accord avec la fonction prédite pour cet ABC transporteur hypothétique chez *S. aureus*.

Ce gène SAOUHC_02820 potentiellement impliqué dans la résistance à différents composés ciblant la paroi, pourrait faire partie du régulon SarA ce qui renforce le fait que le régulateur SarA a un rôle important dans l'adaptation de la bactérie face aux stress antibiotiques.

L'ensemble de ces gènes codant des protéines pourraient renforcer le rôle de SarA dans certains phénotypes comme la résistance aux antibiotiques, mais également d'ouvrir de nouvelles perspectives comme la régulation de la compétence chez *S. aureus*.

1.2. Les gènes exprimant des sARNs

L'ensemble des gènes sARNs retrouvés en commun en RNA-Seq et ChIP-Seq sont regroupés dans le **tableau 22 en annexe**. Pour enrichir le régulon SarA en gènes exprimant des sARNs, nous avons fait le choix de sélectionner quatre gènes pour les valider leur régulation directe par SarA : *sm_0860_rsaOB*, *sm_2230_sprG2*, *sm_3950_teg16*, et *sm_9335_tsr29*. Les données RNA-Seq et ChIP-Seq de ces gènes sont rappelées dans le **tableau 8**.

Annotation	Nom du gène	Assignement	RNA-Seq		ChIP-seq		
			Différentiel d'expression HG003 Δ sarA vs HG003		Distance par rapport au +1 de transcription	Score du pic	p-value
			Phase exponentiel (2h)	Début phase stationnaire (4h30)			
<i>sm_0860_rsaOB</i>	<i>teg40_sRNA61</i>	Transcrit - régulateur agissant en cis	-	10,5	88	24,8	1,09E-135
<i>sm_2230_sprG2</i>	<i>teg19B</i>	Transcrit - système toxine-antitoxine de type I	15,5	9,0	54	33,7	9,01E-249
<i>sm_3950_teg16</i>	<i>sRNA321</i>	Transcrit	-	21,8	106	44,7	0
<i>sm_9335_tsr29</i>	-	Transcrit	3,1	5,5	113	40,5	0

Tableau 8 : Sélection de gènes sARNs communs au RNA-Seq et au ChIP-Seq. Les différentiels d'expression en rouge indiquent des gènes réprimés dans le RNA-Seq.

a) Le gène *sm_0860_rsaOB*

L'expression du gène *sm_0860_rsaOB* est fortement réprimée en début de phase stationnaire de croissance (différentiel d'expression de 10,5) (**figure 78A**) et possède un pic de fixation de SarA avec une p-value de $1,09E^{-135}$ en dessous du seuil fixé de $1E^{-250}$ (**tableau 8**). Etant donné son différentiel d'expression, il fait partie des sARNs les plus réprimés en RNA-Seq, c'est pourquoi nous avons choisi d'étudier la régulation de *sm_0860_rsaOB* par SarA en étant moins strict sur la valeur de p-value obtenue en ChIP-Seq.

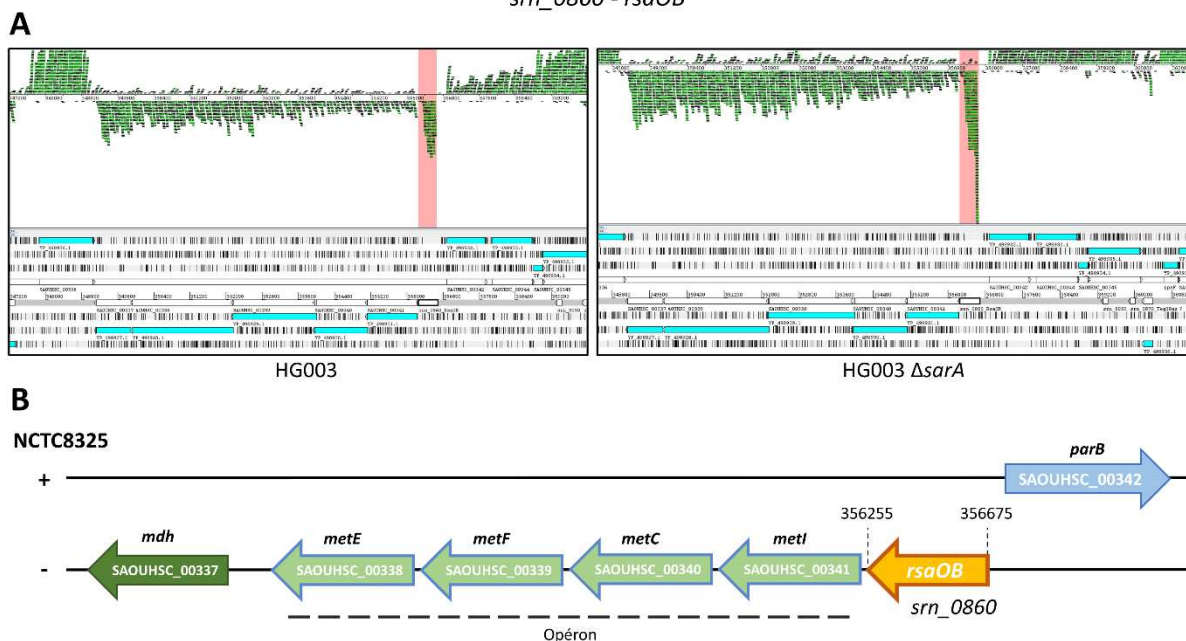


Figure 78 : Le gène *srn_0860_rsaOB* chez *S. aureus* NCTC8325. (A) Vision sur le logiciel Artémis des données RNA-Seq à 4h30 dans les souches HG003 et HG003 $\Delta sarA$. Surligné en rose sur les images Artémis, le gène d'intérêt. En vert, les reads du RNA-Seq. (B) Organisation génétique. Représenté avec une flèche bleue, les gènes régulés par CodY, et ceux en vert clair sont régulés par CodY et par un mécanisme de T-box riboswitch.

Le gène *srn_0860* est localisé dans le 5' UTR de l'opéron *metICFE* qui permet la synthèse de la méthionine (**figure 78B**). Cet opéron régulé par un mécanisme de T-box riboswitch (Schoenfelder et *al.*, 2013). En présence de méthionine, l'ARNt-Met chargé se fixe au début de l'opéron et arrête la transcription, alors qu'en absence de méthionine l'ARNt ne peut pas se fixer, ce qui permet l'expression de l'opéron pour synthétiser la méthionine. De plus, CodY contrôle l'expression de cet opéron dans la souche *S. aureus* N315 (Schoenfelder et *al.*, 2013), ce qui pourrait indiquer une régulation à deux niveaux de cet opéron. L'opéron *metICFE* semble également être légèrement impacté par l'absence de *sarA* (**figure 78A**), ce qui est confirmé dans le **tableau 21 en annexe** avec un différentiel d'expression d'environ 3.

Nous avons donc décidé d'étudier la régulation de ce gène *srn_0860* via le facteur de transcription SarA chez *S. aureus*.

b) Le gène *srn_3950_teg16*

L'expression du gène *srn_3950_teg16* est fortement réprimée à 4h30 de croissance avec un différentiel d'expression de 22 (**figure 79A**) et possède un pic de fixation à environ 106 nt en amont de son +1 de transcription avec une p-value proche de 0 (**tableau 8**).

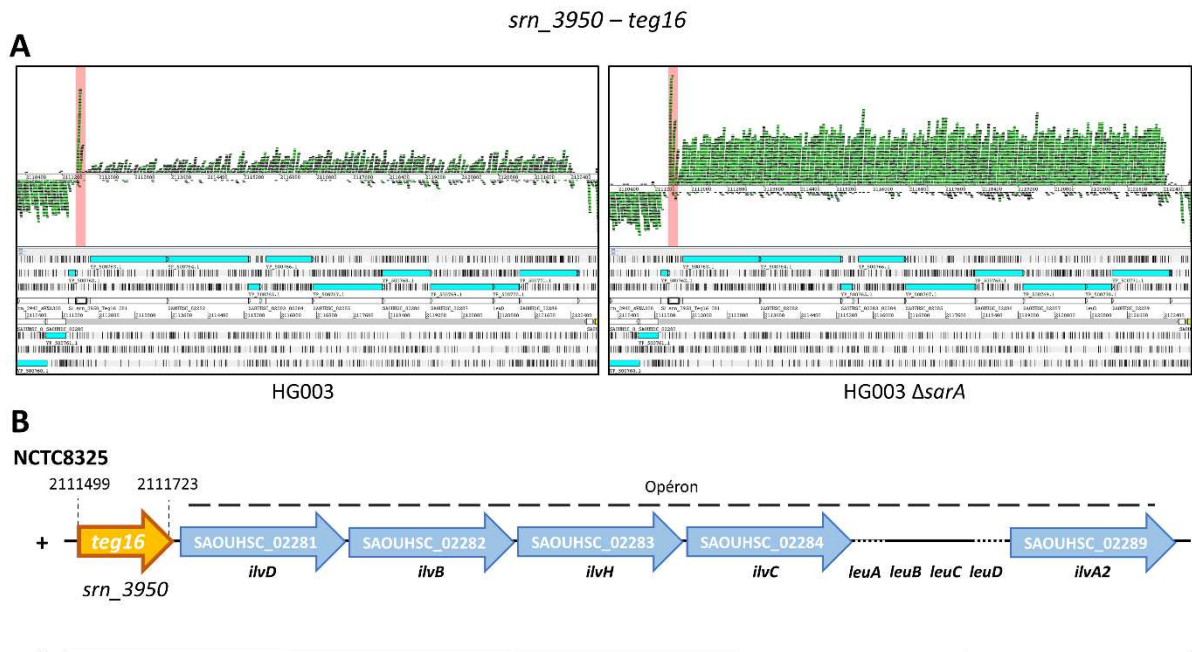


Figure 79 : Le gène *srn_3950_teg16* chez *S. aureus* NCTC8325. (A) Vision sur le logiciel Artémis des données RNA-Seq à 4h30 dans les souches HG003 et HG003 Δ *sarA*. Surligné en rose sur les images Artémis, le gène d'intérêt. En vert, les reads du RNA-Seq. (B) Organisation génétique. Représenté avec une flèche bleue, les gènes régulés par CodY.

Le gène *srn_3950* se situe en amont de l'opéron SAOUHSC_02281 – SAOUHSC_02289 (*ilv-leu*) qui synthétise les acides aminés isoleucine, leucine et valine. Cet opéron est connu pour être réprimé par le FT CodY en présence des acides aminés précédemment cités (Majerczyk et al., 2010), et semble être totalement impacté par l'absence de *sarA* dans nos conditions de RNA-Seq (**figure 79B**).

Il est à noter que plusieurs cibles sélectionnées semblent être également régulées par CodY. Comme le RNA-Seq n'a pas montré de différentiel d'expression du gène *codY* (SAOUHSC_01228) en absence de *sarA* aux deux temps de croissance et que l'analyse ChIP-Seq n'a pas révélé de fixation de SarA en amont du gène *codY*, il pourrait s'agir d'une double régulation directe de ces cibles à la fois par SarA et CodY plutôt qu'un rôle indirect de SarA via CodY dans la régulation de l'opéron SAOUHSC_02281 – SAOUHSC_02289 et de *srn_3950*.

c) Le gène *srn_2230_sprG2*

Le gène *srn_2230_sprG2* est le 3^{ème} gène exprimant un ARNreg dont l'expression est la plus réprimée dans les conditions RNA-Seq, avec des différentiels d'expression de 15 et 9 à 2h et 4h30 respectivement (**figure 80A**). SarA se fixe à environ 54 nt du +1 de transcription, pic de fixation avec une p-value de $9E^{-249}$ (**tableau 8**).

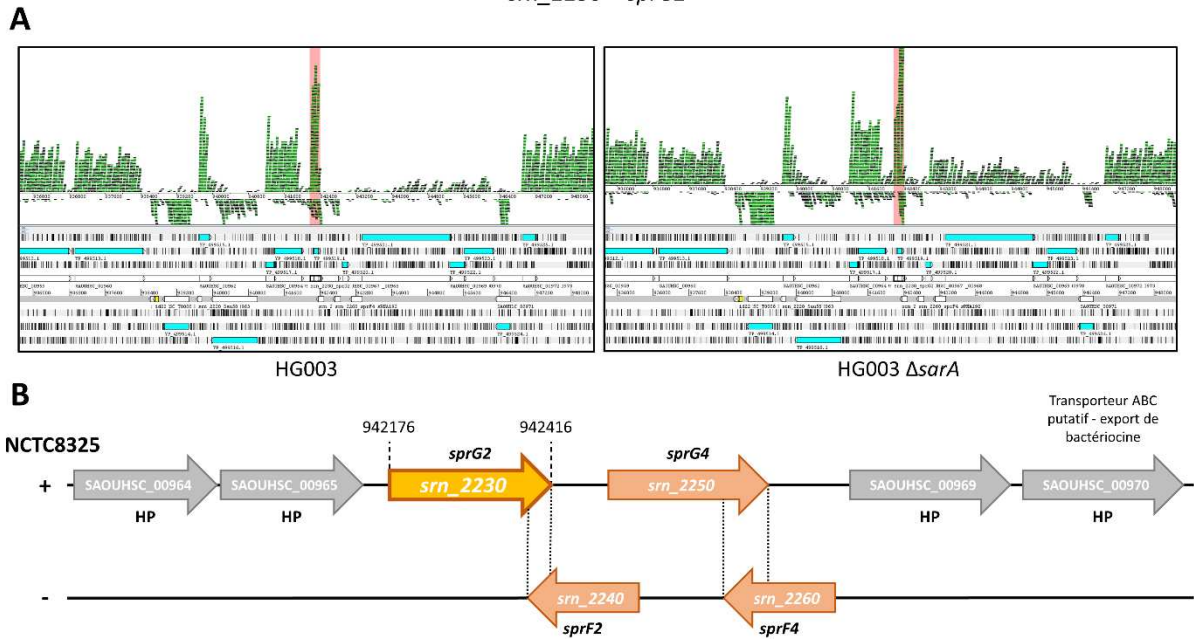


Figure 80 : Le gène *srn_2230_sprG2* chez *S. aureus* NCTC8325. (A) Vision sur le logiciel Artémis des données RNA-Seq à 4h30 dans les souches HG003 et HG003 $\Delta sarA$. Surligné en rose sur les images Artémis, le gène d'intérêt. En vert, les reads du RNA-Seq. (B) Organisation génétique. Représenté avec une flèche orange, les gènes sARN. En gris, les gènes codant des protéines hypothétiques HP.

Le gène *srn_2230_sprG2* code la toxine du système toxine-antitoxine (TA) de type I SprG2/SprF2 chez *S. aureus*. Sur le brin opposé, SprF2 est l'ARN antitoxine qui se lie à l'ARN SprG2 pour empêcher la production du peptide toxique (Riffaud et al., 2019) (**figure 80A**). Le second système TA à proximité SprG4/SprF4 n'est pas impacté par l'absence de *sarA* (**figure 80 A-B**).

En plus d'être l'un des gènes sARNs le plus réprimé par SarA, le gène *srn_2230* est l'un des gènes les plus exprimés dans la souche HG003 $\Delta sarA$, son nombre de FPKM passe de 4000 à 41 000 entre la souche sauvage et la souche $\Delta sarA$ à 4h30 en RNA-Seq (**tableau 20 en annexe**).

L'expression du gène *sprG2* codant la toxine du système TA de type I semble très fortement réprimé par SarA, c'est pourquoi nous avons choisi d'étudier sa régulation par SarA par la suite de ces travaux.

d) Le gène *srn_9335_tsr29*

Le gène *srn_9335_tsr29* est réprimé de 3 fois et 5 fois à 2h et 4h30 de culture respectivement (**figure 81A**), et le centre du pic de fixation de SarA se situe à environ 113 nt en amont de son +1 de transcription avec une p-value proche de 0 (**tableau 8**).

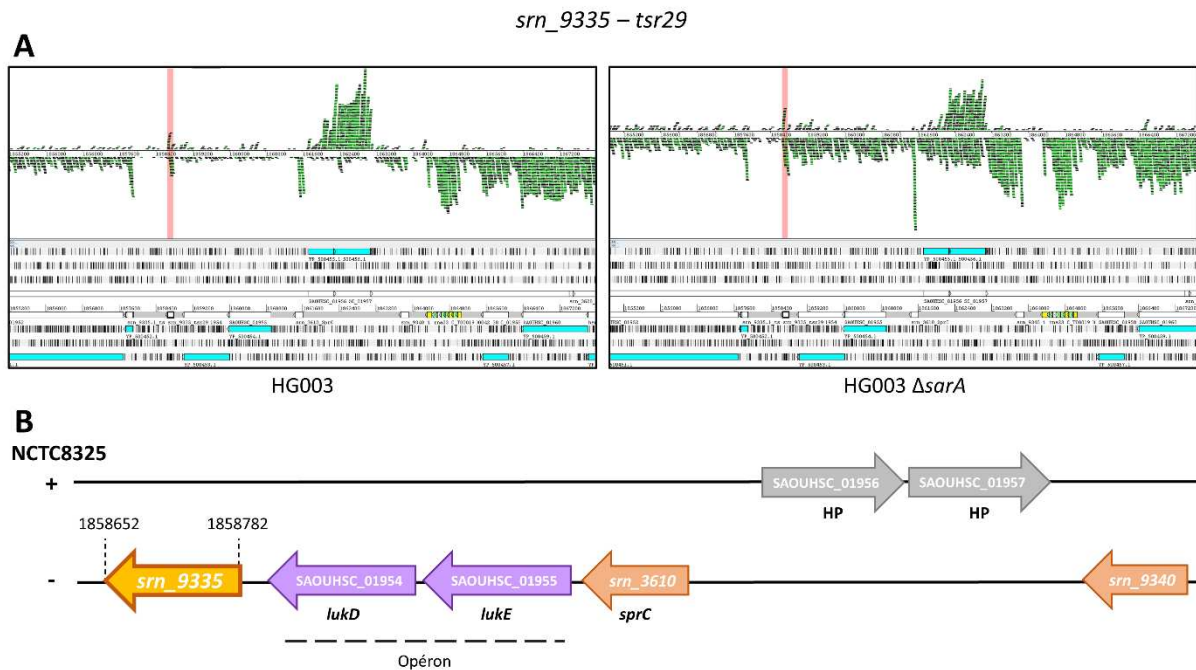


Figure 81 : Le gène *srn_9335* chez *S. aureus* NCTC8325. (A) Vision sur le logiciel Artémis des données RNA-Seq à 4h30 dans les souches HG003 et HG003 Δ *sarA*. Surligné en rose sur les images Artémis, le gène d'intérêt. En vert, les reads du RNA-Seq. (B) Organisation génétique. Représenté avec une flèche violette, les gènes régulés par SaeR, avec une flèche orange les gènes sARN. En gris, les gènes codant des protéines hypothétiques HP.

Le gène *srn_9335* se situe dans l'îlot de pathogénie vSa β dans lequel les gènes *srn_3610_sprC* et *srn_9340* sont présents. D'ailleurs, ces cibles sARNs connues de SarA (Mauro et al., 2016) sont également retrouvées réprimées dans le RNA-Seq et une zone de fixation de SarA est mise en évidence en amont de ces gènes dans le ChIP-Seq.

En conclusion, nous avons choisi au total 13 gènes aux profils différents mais pour lesquels l'absence de *sarA* conduit à une augmentation de leur quantité d'ARN présente et pour lesquels une fixation de SarA sur la région promotrice avait été visualisé par ChIP-Seq. Notre souhait a été de valider la régulation transcriptionnelle directe de SarA sur ces cibles.

2. Validation des cibles sélectionnées présentes en RNA-Seq et ChIP-Seq

Pour valider la régulation directe de SarA sur les cibles sélectionnées, nous avons souhaité vérifier (1) la quantité présente d'ARN des cibles par Northern Blot (ARNm ou sARN) et (2) la fixation spécifique de SarA sur les régions promotrices de ces cibles par expérience de gel retard.

2.1. Northern Blot

Afin de valider les cibles codant des protéines et des sARNs réprimées par SarA mises en évidence au cours de l'analyse combinée RNA-Seq / ChIP-Seq, différentes souches ont dû être construites. Le plasmide pCN36-*sarA* a été construit, il permet l'expression du gène *sarA* sous le contrôle de son promoteur endogène.

Le plasmide vide pCN36 et le plasmide pCN36-*sarA* ont été introduits par transformation dans les souches HG003 et HG003 Δ *sarA*. Ce plasmide permet de compléter l'absence du gène *sarA* dans la souche HG003 Δ *sarA*. Afin de vérifier que ces constructions sont fonctionnelles, les protéines ont été extraites à 2h et 4h30 de culture en TSB correspondant aux conditions de croissance du RNA-Seq. Les protéines extraites ont été déposées sur un gel d'acrylamide et la quantité de SarA présente dans chaque échantillon a été révélée après transfert grâce à un anticorps dirigé contre la protéine SarA. Sur la **figure 82**, nous observons une quantité similaire de SarA entre les différentes souches (1 – 3 – 4 et 6) que ce soit à 2h ou à 4h30 de culture. En conclusion, ces constructions permettent de restaurer un niveau de protéines SarA proche de celui observé dans la souche sauvage.

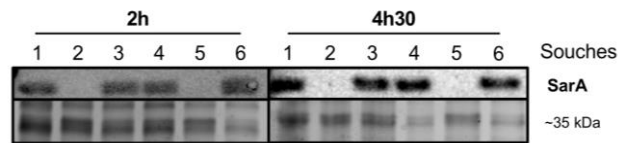


Figure 82 : Western Blot révélant le niveau de protéines SarA dans les souches HG003. (1) HG003, (2) HG003 Δ *sarA*, (3) HG003 + pCN36, (4) HG003 + pCN36-*sarA*, (5) HG003 Δ *sarA* + pCN36 et (6) HG003 Δ *sarA* + pCN36-*sarA*. Partie haute du gel, Western blot, et partie basse, contrôle de dépôts révélé au bleu de Coomassie.

Afin de visualiser les quantités de transcrits des 13 cibles en fonction de la présence ou non de *sarA*, des Northern Blot ont été réalisés avec des ARN extraits dans les mêmes conditions que le RNA-Seq, après 2h et 4h30 de culture en TSB à 37°C et pour les 6 souches construites précédemment.

Pour visualiser les ARNm, un gel agarose a été réalisé et 15µg d'ARN ont été déposés pour chaque échantillon, les ARN ribosomiaux 16S et 23S servent de témoins de charge dans les puits. Après migration et transfert, les membranes ont été hybridées avec des sondes spécifiques de chaque cible, construite par PCR avec de la radioactivité α . Dans la **figure 83**, les ARNm des 9 cibles sont fortement présents dans les souches HG003 Δ *sarA* et HG003 Δ *sarA* + pCN36 par rapport à la souche sauvage HG003 ou la souche HG003 + pCN36-*sarA* (surexpression de *sarA*) où ils sont quasiment invisibles. Ces résultats confirment que l'absence de *sarA* conduit à une plus grande quantité des ARNm des 9 cibles. SarA apparaît ici comme le régulateur négatif de l'expression de ces cibles.

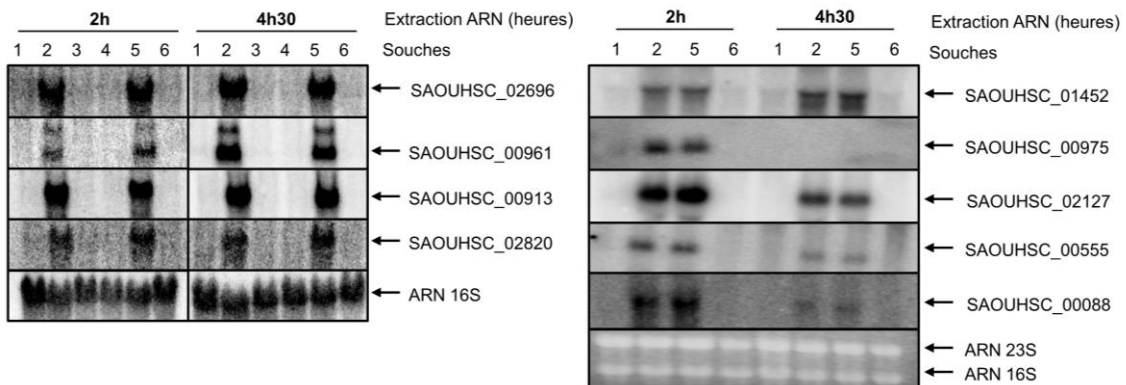


Figure 83 : Northern Blot révélant la quantité d'ARNm des 9 cibles sélectionnées. Souches : (1) HG003, (2) HG003 Δ *sarA*, (3) HG003 + pCN36, (4) HG003 + pCN36-*sarA*, (5) HG003 Δ *sarA* + pCN36 et (6) HG003 Δ *sarA* + pCN36-*sarA*. Les ARN16S et 23S servent de contrôle de dépôt.

Pour la visualisation des sARNs, un gel d'acrylamide a été réalisé en déposant 10µg d'ARN extraits par puits, l'ARNtm servira de contrôle de dépôt dans les puits. Après migration et transfert, les membranes ont été hybridées avec des sondes spécifiques de chaque sARN, marquées à leur extrémité 5' avec de la radioactivité γ . Dans la **figure 84**, la quantité des 4 sARNs est manifestement plus forte dans les souches HG003 $\Delta sarA$ ou HG003 $\Delta sarA$ + pCN36 par rapport au contexte sauvage (n°1), surexprimant (n°2) ou complétement (n°6) pour le gène *sarA*. Cette première observation confirme la répression transcriptionnelle par SarA sur ces cibles sARNs. De plus, comme révélé en RNA-Seq et visible sur le panel de gauche sur la **figure 84**, les 3 sARN sont majoritairement réprimés à 4h30 de croissance, en début de phase stationnaire de croissance. Pour *Srn_3950_Teg16*, deux bandes distinctes sont révélées, ce qui indique deux tailles de ARN. Cette différence de taille peut être liée à la présence deux sites d'initiation, d'un second terminateur de transcription ou alors du clivage de l'ARN par une RNase. Nous ne sommes pas allés plus loin sur cette voie car dans notre cas il s'agissait de montrer la régulation du gène *smn_3950* par SarA. Sur la **figure 84** (panel de droite), une très forte quantité d'ARN *SprG2* est observée en absence de *sarA* (puits n°2 et n°5). Cette observation est en accord avec les fortes valeurs FPKM obtenues en RNA-Seq (**tableau 20 en annexe**).

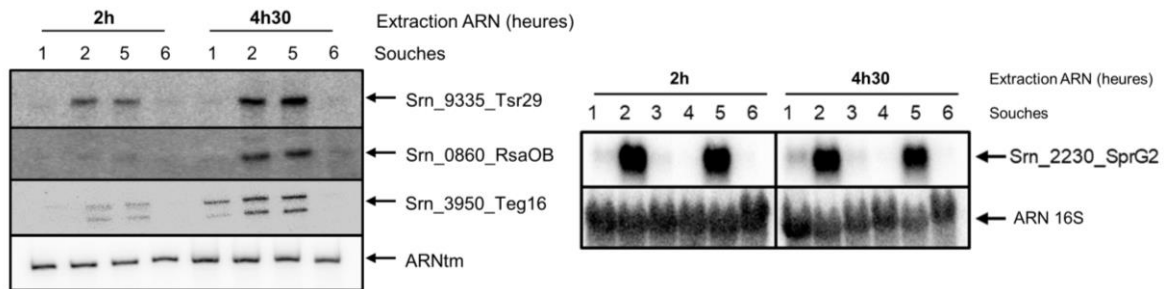


Figure 84 : Northern Blot des 4 sARNs sélectionnés. Souches : (1) HG003, (2) HG003 $\Delta sarA$, (3) HG003 + pCN36, (4) HG003 + pCN36-*sarA*, (5) HG003 $\Delta sarA$ + pCN36 et (6) HG003 $\Delta sarA$ + pCN36-*sarA*. L'ARNtm ou l'ARN 16S sert de contrôle de dépôt.

2.2. Validation de la fixation de SarA par expérience de gel retard

Concernant la régulation par SarA, plusieurs études d'empreintes à la DNase I ont montré que SarA peut se fixer sur les régions promotrices de ses cibles pour réprimer leur expression (**tableau 4**). C'est notamment le cas, pour le régulateur de la famille Sar, SarV où SarA se fixe au niveau des régions -10 et -35 (Manna et al., 2004). De la même manière, il a été montré le même mécanisme pour les gènes sARNs *smn_3610_sprC* et *smn_9340*, où SarA se fixe au niveau des régions promotrices -10/-35 et empêche la fixation de l'ARN polymérase (Mauro et al., 2016).

Pour valider si la répression transcriptionnelle observée en RNA-Seq et en Northern Blot est due à la fixation spécifique de SarA, nous avons mesuré la capacité de SarA à se lier spécifiquement aux différents promoteurs sélectionnés par des expériences de gel retard. Dans ces expériences, nous avons mis en contact le promoteur marqué du gène cible et la protéine SarA. Si les deux partenaires sont capables d'interagir alors la formation du complexe « ADN cible/SarA » entraîne un retard de migration sur le gel. Pour chaque cible, nous avons choisi une sonde ADN de 250nt comprenant 200 nt en amont de l'ATG à 50 nt en aval.

Tous les gels retard sont similaires, le gène SAOUHSC_02696 sera pris pour exemple pour décrire l'expérience et il suffira d'étendre cela à l'ensemble des résultats obtenus.

Sur la partie gauche du gel (**figure 85**), le promoteur radiomarqué de SAOUHSC_02696 a été mis en contact avec une quantité croissante de la protéine SarA allant de 0 à 2 pmol. Cette quantité croissante doit permettre la formation d'un retard de migration si SarA se fixe sur la région d'ADN marqué. Pour la cible SAOUHSC_02696, 1pmol de SarA est suffisant pour former un retard de migration.

Dans un second temps, pour déterminer si la fixation de SarA sur cette région d'ADN est spécifique, nous avons réalisé des compétitions entre le promoteur radiomarqué SAOUHSC_02696 et une sonde spécifique non marquée, ici le même promoteur de SAOUHSC_02696 mais non radiomarqué ou une sonde non spécifique non marquée. Le promoteur du gène de l'ARN16S a été choisi pour jouer le rôle de la sonde non spécifique dans l'ensemble de nos expériences. Sur la partie droite du gel (**figure 85**), la compétition commence avec l'ajout d'une quantité de sonde non radiomarquée identique à la sonde spécifique (1X) puis l'expérience se poursuit en augmentant la quantité de sonde non marquée. C'est la comparaison entre les résultats avec les sondes spécifique et non spécifique qui nous permet de conclure sur la spécificité de la fixation. En effet, la sonde spécifique marquée doit rapidement titrer la protéine SarA et libérer la sonde radiomarquée alors qu'avec la sonde non spécifique on ne s'attend à aucun changement. Les compétitions se réalisent avec des quantités en excès des sondes spécifiques ou non radiomarquées.

Sur la **figure 85** (partie droite du gel), pour la cible SAOUHSC_02696, la sonde marquée $P_{SAOUHSC_02696}^*$ a été mise au contact de 1 pmol de SarA, recréant le complexe observé sur la partie gauche du gel. Puis différentes quantités de sonde spécifique non marquée (de 1X à 100X) ont été ajoutées au complexe initial. On observe que l'excès 10X est suffisant pour décrocher la quasi-totalité du complexe $P_{SAOUHSC_02696}^*/SarA$. Pour la sonde non spécifique non marquée, même un excès de 100X n'est pas suffisant pour déplacer le complexe.

Ces deux observations mettent en évidence la fixation spécifique de SarA *in vitro* sur la région promotrice du gène SAOUHSC_02696.

De cette manière globale, nous avons pu montrer pour l'ensemble des 13 cibles sélectionnées une fixation spécifique de SarA dans les régions promotrices de celles-ci.

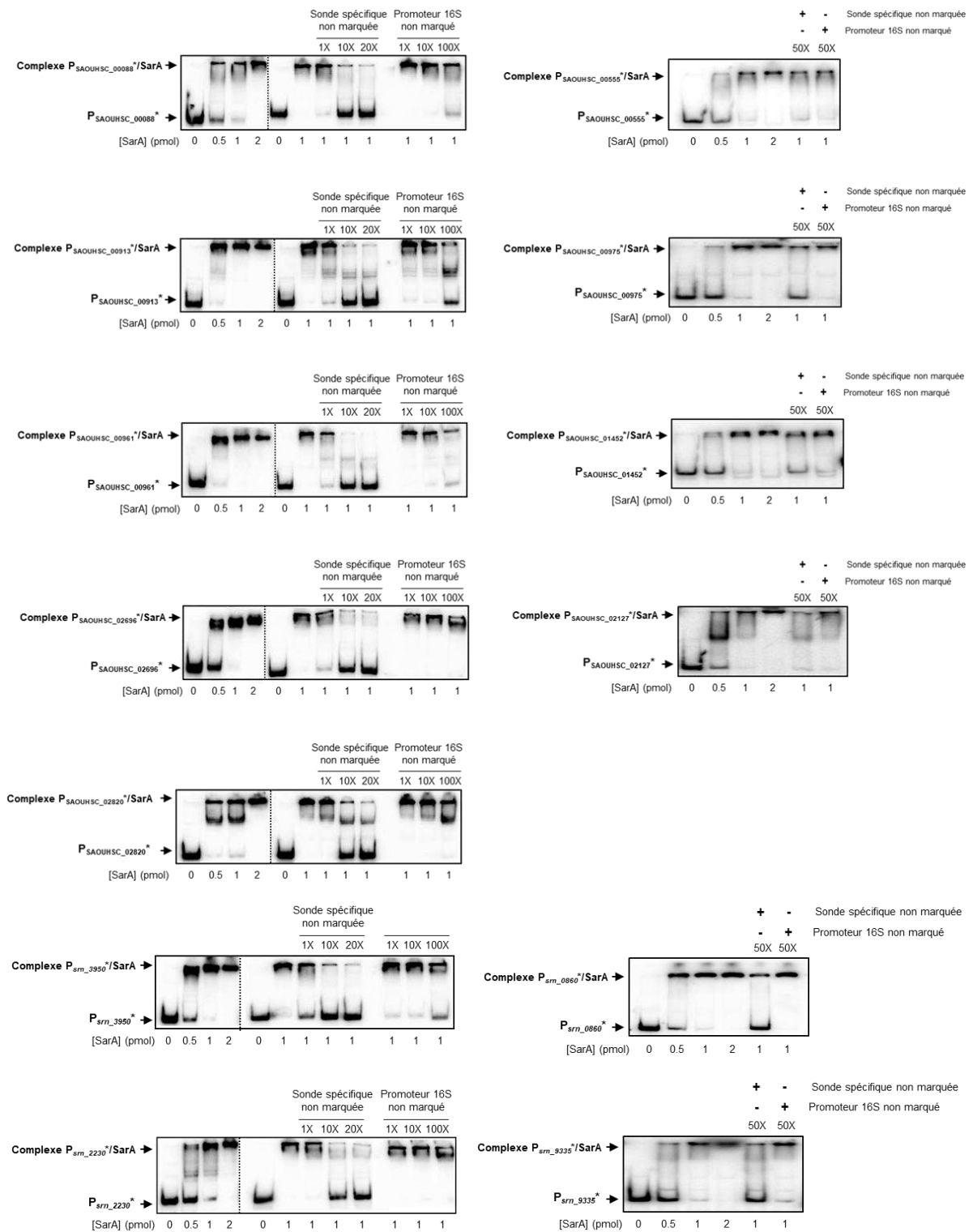


Figure 85 : Expérience de gel retard entre les séquences ADN des 13 gènes sélectionnés et la protéine SarA.

2.3. Gène rapporteur

Après avoir validé la fixation de SarA *in vitro*, il nous a semblé intéressant de tester l'action de SarA sur les différents promoteurs des gènes décrits ci-dessus avec l'utilisation d'un système rapporteur *in vivo*. Pour observer cette régulation directe de SarA, des fusions transcriptionnelles contenant les promoteurs d'intérêt fusionnés au gène exprimant la GFP ont été clonées dans le plasmide pCN52c. Nous avons fait le choix de cloner des fragments allant de -200/+1 par rapport au site d'initiation de la transcription. Les +1 de transcription ont été déterminés avec l'analyse Prados qui a déterminé les séquences promotrices chez différentes souches de *S. aureus* (Prados et al., 2016). En effet, les pics obtenus en ChIP-Seq sont situés en moyenne à 100 nt du codon d'initiation ou du +1 de transcription (**tableau 6**). Donc nous partons de l'hypothèse que ces fragments de 200 nt clonés contiennent la région promotrice des gènes cibles et que la régulation de SarA pourra être mesurée avec ce système rapporteur.

Ces plasmides ont été transformés dans les souches HG003, HG003 $\Delta sarA$ et HG003 $\Delta sarA/sarA+$ complémentée au génome avec en contrôle positif les promoteurs des gènes *srn_3610_sprC* et *srn_9340* régulés directement par la fixation de SarA sur leurs séquences promotrices (Mauro et al., 2016).

Seulement les résultats des fusions transcriptionnelles des gènes étudiés au laboratoire seront présentés, car les fusions transcriptionnelles ont présenté des résultats similaires avec les gènes étudiés par l'équipe américaine. En effet, après plusieurs modifications de milieu et de concentration en antibiotiques, ces plasmides n'ont pas permis de mettre en évidence une régulation de ces gènes par SarA. Pour les sARNs, les constructions avec les promoteurs P_{sprC} et P_{srn_9340} sont fonctionnelles, nous obtenons une plus forte fluorescence dans la souche $\Delta sarA$ par rapport à la souche HG003 ce qui témoigne de la dérégulation des deux cibles en l'absence de SarA (**figure 86A**). Néanmoins les 6 autres constructions testées ne se sont pas avérées fonctionnelles car nous n'obtenons pas de différence de fluorescence entre les 3 souches (**figure 86B**).

Nous pensons que le système rapporteur et/ou les constructions n'étaient pas adaptés à notre questionnement. Ce constat nous a amené à conclure que nous n'avons probablement pas cloné l'ensemble de la région régulatrice de la transcription des gènes *sprG2* et *teg16* et de ce fait nous n'étions pas en mesure d'observer la régulation par SarA (**figure 86B**). Concernant les gènes codant des protéines, globalement nous détectons un niveau de fluorescence inférieur aux constructions avec les promoteurs des gènes sARNs. Ces constructions ne permettent pas de mettre en évidence le rôle de SarA dans l'expression de ces différentes cibles car le niveau de fluorescence est similaire entre les différentes souches (**figure 86B**). Par conséquent, nos constructions ne nous ont pas permis de démontrer *in vivo* la régulation directe de SarA sur les cibles testées.

En conclusion pour les promoteurs des gènes ARNm, il aurait été préférable de cloner jusqu'au codon d'initiation de la traduction pour ne pas avoir le biais d'une mauvaise position du +1 de transcription par analyse *in silico* et avoir une meilleure concordance avec les zones de fixation obtenues en ChIP-Seq. De même pour les gènes sARNs, les sites d'initiation de la transcription (+1) sont peut-être mal annotés donc il manquerait quelques bases en aval du +1 cloné pour avoir un promoteur fonctionnel.

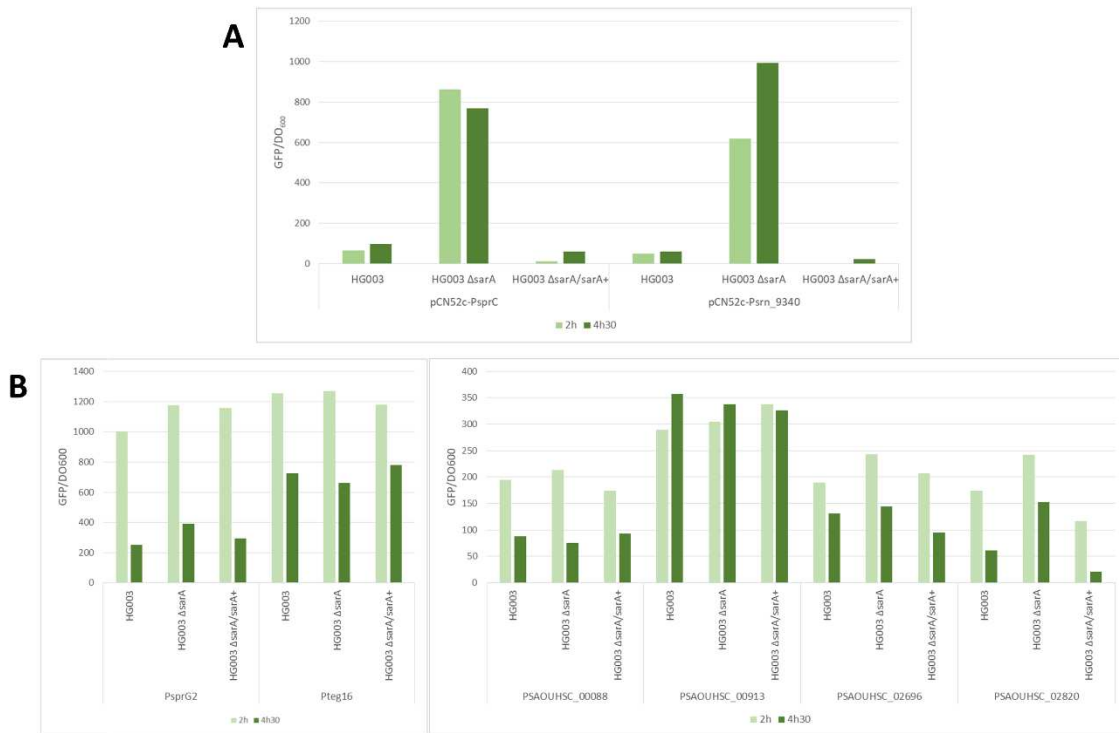


Figure 86 : Niveaux des fusions transcriptionnelles des gènes étudiés au laboratoire dans les souches HG003, HG003 Δ sarA et HG003 Δ sarA/sarA. (A) les promoteurs des gènes *sprC* et *srn_9340* (contrôles de l'expérience). (B) Promoteurs des gènes sARNs *sprG2* et *teg16* et des gènes (ARNm) SAOUHSC_00088, SAOUHSC_00913, SAOUHSC_02696 et SAOUHSC_02820.

2.4. Recherche d'un site de fixation de SarA par empreinte à la DNase I

Comme différentes études ont montré les zones de fixation du régulateur SarA sur différentes cibles (**tableau 4**), une cible ARNm et une cible sARN ont été sélectionnées pour aller plus loin dans la régulation des gènes cibles par SarA.

En parallèle des expériences précédentes, nous avons décidé de tenter de réaliser une empreinte à la DNase I avec le promoteur d'un gène sARN, *srn_2230_sprG2*, gène codant la toxine du système TA de type I et le promoteur du gène SAOUHSC_02820 codant un transporteur ABC hypothétique. L'objectif de ces expériences était d'apporter de nouvelles informations sur le site de fixation de SarA lesquelles pouvaient être utiles pour générer un consensus de fixation de SarA par la suite.

Pour cela, nous avons amplifié et marqué radioactivement un fragment PCR de -200 à 50 nt par rapport au +1 de transcription. Nous avons mis ce fragment au contact d'une quantité croissante de la protéine SarA allant de 0 à 1 pmol, quantité suffisante pour créer un complexe par retard sur gel (**figure 85**). Ces échantillons ont été traités à la DNase I et extraits par phénol-chloroforme puis déposés pour migration sur un gel d'acrylamide. Les zones de protection par la protéine SarA ne seraient pas impactées par l'action de la DNase, ce qui nous permettrait d'identifier ses zones de fixation sur l'ADN.

Malheureusement ces expériences n'ont pas permis de mettre en évidence une zone de protection par SarA sur la séquence promotrice de *srn_2230_sprG2* ou du gène SAOUHSC_02820. Nous avons rencontré des problèmes de dégradation de la sonde libre sans DNase par conséquent, ces expériences n'ont pas été concluantes.

En conclusion de l'ensemble de ces expériences, nous avons pu montrer que SarA se fixe spécifiquement *in vitro* en amont des 13 gènes cibles par gel retard, et que cette fixation entraîne une répression transcriptionnelle observée sur Northern blot avec une quantité d'ARN très importante dans la souche HG003 Δ *sarA*. Ces 13 nouvelles cibles s'ajoutent donc dans le régulon SarA de *S. aureus*, ajoutant de nouvelles caractéristiques dans la fonction de SarA, avec notamment la régulation de nouveaux sARNs. Ainsi, SarA réprime l'expression de *srn_2230_sprG2*, codant la toxine du système TA SprG2/SprF2 de type I mais aussi l'expression de *srn_3950_teg16*, *srn_0860_rsaOB*, et *srn_9335_tsr29* dont les fonctions restent encore à élucider.

3. Ceux qui ne fallait pas rater... des sARNs aux critères de sélection imparfaits

Pour aller plus loin dans le régulon SarA chez HG003, nous avons décidé d'exploiter au maximum les données RNA-Seq et CHIP-Seq disponibles dans le but de faire ressortir de potentielles nouvelles cibles de SarA. En effet, les critères retenus dans notre analyse (différentiel d'expression supérieur à 3 et valeur FPKM supérieure à 10 dans au moins une des deux conditions) nous ont semblé trop stricts par rapport à l'ensemble des données RNA-seq. En effet, si pour l'ensemble des gènes la valeur médiane des FPKM est comprise entre 90 et 100, elle est comprise entre 8 et 13 pour les gènes sARNs aux deux temps de croissance et dans les deux souches. De même, les valeurs maximums de différentiel d'expression mesurés pour les ARN messager sont de 460 et 270 à respectivement 2h et 4h30 de croissance alors qu'ils ne sont que de 15 et 33 pour les sARNs au même temps de croissance. De plus, beaucoup de sARNs (29 des 37 réprimés et 11 des 14 activés) n'apparaissent régulés qu'à un seul temps de croissance or nous n'avons réalisé l'analyse CHIP-Seq qu'à un seul temps de croissance, c'est pourquoi nous avons alors décidé de regarder l'ensemble des sARNs au cas par cas.

En effet, il est connu que l'expression des gènes sARNs est régulée finement de manière temporelle donc nos conditions expérimentales ont pu passer outre leur mise en évidence. Enfin, les sARNs sont souvent de petite taille, ce qui peut avoir compromis leur identification lors du RNA-Seq. Nous avons donc décidé d'élargir l'analyse en réévaluant nos critères. Pour le RNA-Seq, le différentiel d'expression peut être inférieur à 3 et en CHIP-Seq, la valeur de p-value du pic peut être plus élevée que E^{-250} comme pour *srn_0860_rsaOB* avec une p-value de E^{-135} pour lequel nous avons montré qu'il fait partie des cibles directes de SarA.

Avec cette nouvelle analyse, nous avons retenu trois nouveaux gènes sARNs : *srn_0455_tsr9*, *srn_1640_rsaD* et *srn_4540_sprA2_{AS}* pour tester notre hypothèse.

3.1. Etude du gène *srn_0455_tsr9*

Le gène *tsr9* n'a pas été révélé par la première analyse car d'une part il possède un différentiel d'expression inférieur à 3 à 2h entre la souche sauvage HG003 et la souche HG003 $\Delta sarA$ et d'autre part a une valeur FPKM inférieure à 10 dans la condition 4h30 (**figure 87A**). De plus, si un pic de fixation par SarA est présent à 82 nt en amont de ce gène, sa p-value de $2,8E^{-90}$ est inférieure au seuil précédemment fixé à $1E^{-250}$.

Aucune fonction n'a été découverte pour cet sARN, néanmoins les données de séquençage indiquent un potentiel cadre de lecture sans qu'aucun peptide n'ait été identifié à ce jour (Carroll et al., 2016) (Sorensen et al., 2020).

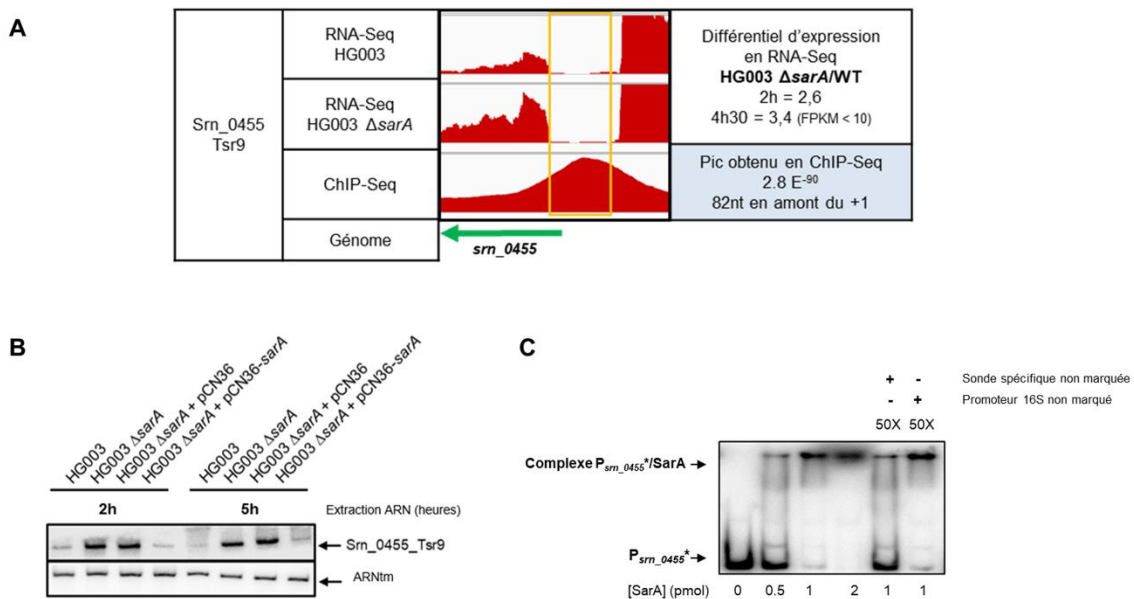


Figure 87 : Le cas du gène *srn_0455_tsr9*. (A) Visualisation des données RNA-Seq et ChIP-Seq ; l'orientation du gène *srn_0455* est indiquée par la flèche verte. En rouge, les reads obtenus en séquençages. L'encadré orange indique le pic retrouvé en amont du gène. (B) Northern Blot révélant l'ARN *Srn_0455* dans les souches HG003 ; l'ARNtm sert de contrôle de dépôt. (C) Gel retard entre la protéine SarA et le promoteur radiomarqué du gène *srn_0455*.

Pour aller plus loin, nous avons réalisé des cultures en TSB des souches HG003, HG003 $\Delta sarA$, HG003 $\Delta sarA$ + pCN36 et HG003 $\Delta sarA$ + pCN36-*sarA* pour complémentation et extraits les ARN à 2h et 5h de croissance. 10 μ g d'ARN ont été déposés sur un gel d'acrylamide. Après migration et transfert, la membrane a été hybridée avec une sonde spécifique de *Srn_0455_Tsr9* marquée radioactivement. A 2h et 5h, l'ARN *Srn_0455_Tsr9* est très peu présent dans la souche HG003 contrairement au mutant HG003 $\Delta sarA$. Dans la souche de complémentation, on observe un niveau d'ARN *Srn_0455_Tsr9* similaire à celui de la souche sauvage (**figure 87B**). L'absence de *sarA* semble nécessaire pour obtenir une grande quantité de *Srn_0455_Tsr9*.

Enfin, nous avons réalisé une expérience de gel retard pour mettre en évidence la fixation spécifique de SarA sur la région ADN en amont du gène *srn_0455*, qui serait responsable de la répression transcriptionnelle

observée en Northern blot. Sur la **figure 87C**, nous observons le comportement de SarA en présence de la sonde P_{srn_0455}* marquée. 1pmol de SarA est suffisant pour créer le complexe P_{srn_0455}*/SarA. Pour ce qui est de la spécificité de cette interaction, nous pouvons voir que l'ajout 50X en excès de la sonde spécifique non radiomarquée entraîne le décrochage complet de la protéine SarA du promoteur marqué, mais la même quantité de sonde non spécifique (promoteur ARN16S) n'entraîne aucun décrochage. Cette expérience montre donc l'implication de SarA dans la répression transcriptionnelle du gène *srn_0455_tsr9* via sa fixation sur la région promotrice.

3.2. Etude du gène *srn_1640_rsaD*

Le gène *srn_1640_rsaD* a récemment été mis en évidence lors de l'étude du régulon CodY chez *S. aureus*. En effet, l'expression de *rsaD* est réprimée par CodY, et sa levée de répression va permettre à RsaD d'inhiber la production de l'acétolactate synthase (AlsS) essentielle pour résister à un stress acide déclenché par un excès de glucose dans le milieu (Augagneur et al., 2020).

Dans le RNA-Seq que nous avons réalisé, le gène *srn_1640_rsaD* est plus fortement exprimé en début de phase stationnaire (4h30), en effet ses valeurs FPKM passent de 1700 dans la souche HG003, à 20000 dans la souche HG003 Δ *sarA* (différentiel d'expression de 10) (**tableau 20 en annexe**). De plus, un pic de fixation de SarA avec une p-value de 10^{-102} (**figure 88A**) est présent à environ 28 nt en amont du +1 de transcription. L'ensemble de ces données font de *rsaD* un bon candidat pour intégrer le régulon SarA.

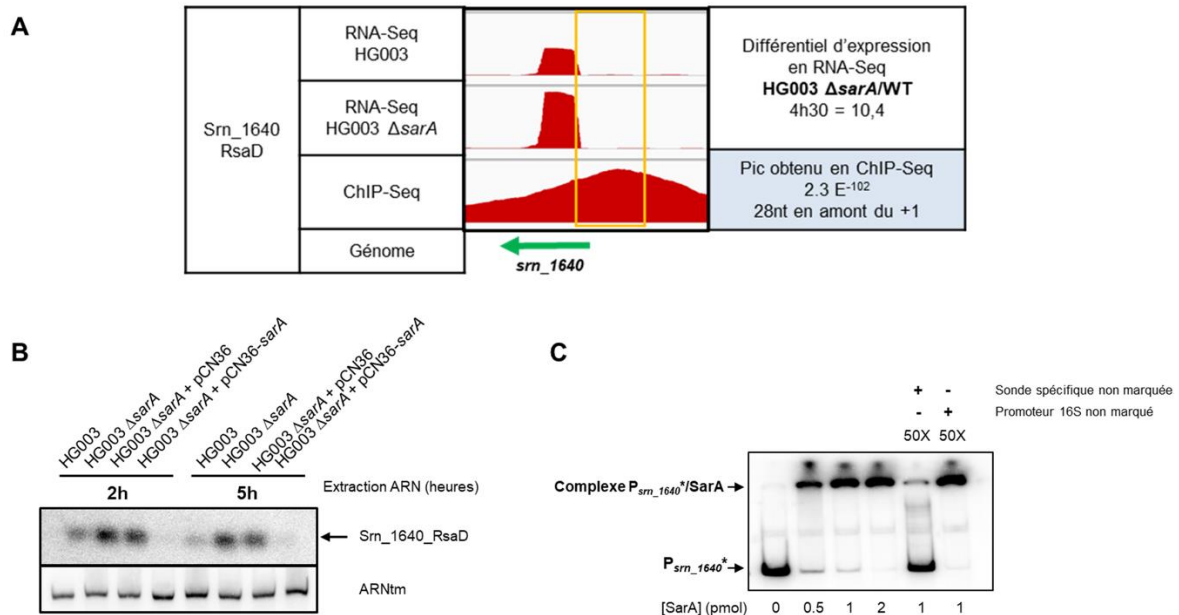


Figure 88 : Le cas du gène *srn_1640_rsaD*. (A) Visualisation des données RNA-Seq et ChIP-Seq ; l'orientation du gène *srn_0455* est indiquée par la flèche verte. En rouge, les reads obtenus en séquençages. L'encadré orange indique le pic retrouvé en amont du gène. (B) Northern Blot révélant l'ARN *Srn_1640* dans les souches HG003 ; l'ARNtm sert de contrôle de dépôt. (C) Gel retard entre la protéine SarA et le promoteur radiomarqué du gène *srn_1640*.

De la même manière que pour *Srn_0455_Tsr9*, un Northern blot et un gel retard entre le promoteur de *srn_1640_rsaD* et SarA ont été réalisés pour valider la répression transcriptionnelle de ce gène via la fixation de SarA sur son promoteur. Le Northern blot a mis en évidence que la quantité de *Srn_1640_RsaD* à 2h et à 5h de culture est plus importante en l'absence de *sarA* (**figure 88B**). De plus la fixation de SarA sur sa région promotrice semble spécifique car un retard sur gel est obtenu dès 0,5 pmol de SarA et seul l'ajout de la sonde spécifique P_{rsaD} non marquée en excès permet de libérer le complexe (**figure 88C**).

Par conséquent, la fixation spécifique de SarA sur le promoteur de *srn_1640* est responsable de sa répression transcriptionnelle en milieu TSB. L'ARN régulateur *Srn_1640_RsaD* s'ajoute donc au régulon SarA.

3.3. Etude du gène *srn_4540_sprA2_{AS}*

Le gène *srn_4540_sprA2_{AS}* est le gène exprimant l'ARN antitoxine *SprA2_{AS}* du système toxine-antitoxine de type I *SprA2/SprA2_{AS}*. En ChIP-Seq, on retrouve un pic à 57 nt en amont de son +1 de transcription avec une p-value très faible de E^{-294} (**figure 89A**). Il s'avère que le gène *srn_4540* exprime une antitoxine ARN de 61 nt. Cette petite taille pourrait faire que cet ARN, bien que présent lors de l'extraction d'ARN ne soit pas représenté dans la banque d'ARN ayant été séquencée en RNA-Seq. En effet, il a pu être éliminé au cours des traitements préalables au séquençage, rendant impossible son identification (**figure 89A**). De ce fait, nous avons voulu étudier l'expression de ce gène par Northern blot en absence de *sarA* ainsi que la capacité de SarA à se fixer spécifiquement sur son promoteur.

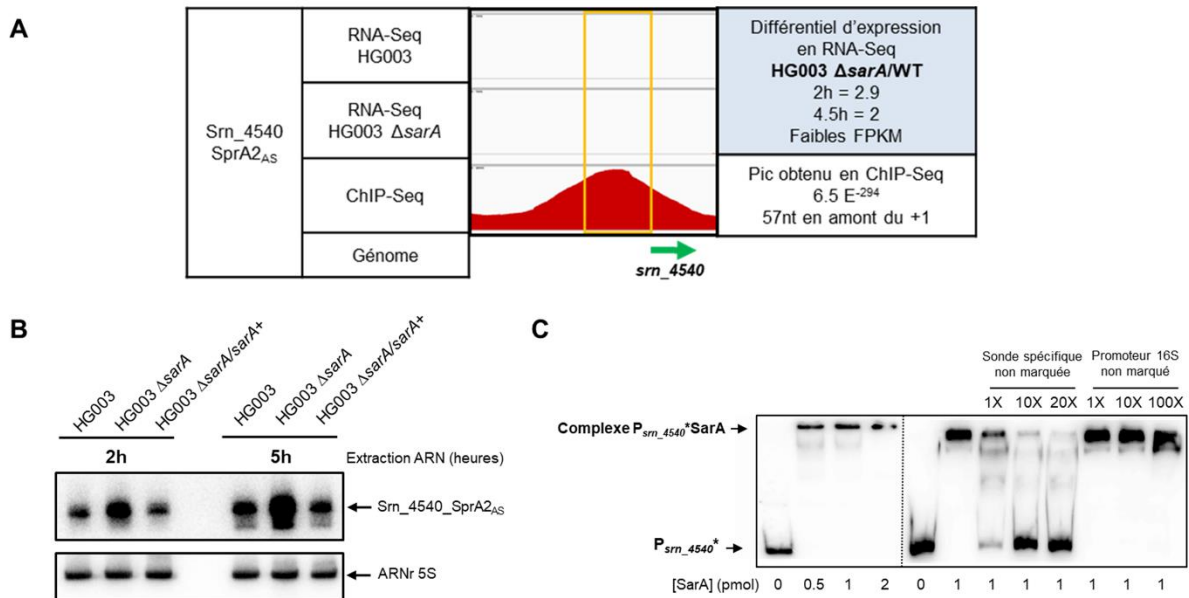


Figure 89 : Le cas du gène *srn_4540_sprA2_{AS}*. (A) Visualisation des données RNA-Seq et ChIP-Seq ; l'orientation du gène *srn_0455* est indiquée par la flèche verte. En rouge, les reads obtenus en séquençages. L'encadré orange indique le pic retrouvé en amont du gène. (B) Northern Blot révélant l'ARN *Srn_4540* dans les souches HG003 ; l'ARNtm sert de contrôle de dépôt. (C) Gel retard entre la protéine SarA et le promoteur radiomarqué du gène *srn_4540*.

De la même manière que les deux gènes sARNs précédents, nous avons recherché sa régulation par SarA avec des expériences de Northern blot et de gel retard. Les ARN des souches HG003, HG003 $\Delta sarA$, et HG003 $\Delta sarA$ complétementée au génome ont été extraits après 2h et 5h de croissance en TSB. Le Northern Blot en **figure 89B** révèle que la quantité de *srn_4540_sprA2_{AS}* est plus importante dans le mutant $\Delta sarA$ par rapport à la souche sauvage surtout à 5h de culture. Le mutant HG003 $\Delta sarA$ complétementée au génome permet de rétablir une quantité de *Srn_4540_SprA2_{AS}* similaire à la souche sauvage. Enfin, l'expérience de gel retard permet de mettre en évidence que la présence de SarA conduit à un retard sur gel témoignant de sa fixation au promoteur $P_{srn_4540}^*$ marqué. De plus, cette fixation est spécifique puisque ce retard est réversible suite à l'ajout du promoteur spécifique non marqué en excès (**figure 89C**). Ainsi, la fixation de SarA au niveau du promoteur est spécifique et cette dernière est probablement responsable d'une répression transcriptionnelle du gène exprimant l'ARN antitoxine *SprA2_{AS}* observée par Northern blot.

Suite à ces découvertes, d'autres expérimentations ont été menées sur ce système toxine-antitoxine, elles sont présentées dans la partie 3 de ce manuscrit.

Ces trois exemples de gènes sARNs qui ne réunissent pas les critères fixés au début, révèlent que les analyses nécessitent d'être regardées au cas par cas pour faire ressortir de potentiels nouveaux candidats.

Ainsi nous avons démontré que toutes les cibles étudiées communes aux analyses RNA-Seq et ChIP-Seq sont des cibles directes de SarA. Le régulon SarA s'enrichit donc de 7 nouvelles cibles sARNs et de 9 gènes codant des protéines (ARNm). Nous venons également de montrer que des études au cas par cas peuvent révéler d'autres cibles ce qui augmente encore la richesse du régulon direct de SarA.

D. Analyse bio-informatique du site de fixation de SarA

Cette première partie a permis de mettre en évidence de nouveaux gènes régulés directement par SarA, à la fois des gènes codant des protéines mais aussi des gènes codant des sARNs ou ARN régulateurs.

Les séquences promotrices de ces nouvelles cibles réprimées vont permettre d'aller plus loin dans la régulation SarA, notamment en menant une nouvelle étude concernant le consensus de fixation de SarA. Les études menées auparavant impliquaient peu de candidats, avec des études isolées (**tableau 4**) ne permettant pas d'avoir une vision globale du consensus de fixation de SarA. En utilisant un nombre plus conséquent de régions promotrices de gènes régulés directement par SarA, nous espérons obtenir une vision plus globale du consensus de fixation de SarA sur ces cibles.

La mise en évidence d'un nouveau consensus plus fiable permettrait de s'affranchir des conditions expérimentales comme la phase de croissance et le milieu de culture utilisé. Ceci nous permettrait d'avoir une vision globale du régulon SarA en l'enrichissant de nouvelles cibles de SarA dont l'expression n'est pas modifiée dans nos conditions expérimentales.

1. Recherche des cibles de SarA *in silico*

1.1. Paramètres utilisés

Lors de ces vingt dernières années, plusieurs consensus de fixation de SarA ont été trouvés en utilisant différents gènes codant des protéines mais aucun ne semble regrouper tous les critères pour mettre en avant l'ensemble du régulon SarA. Nous émettons l'hypothèse que le consensus de fixation de SarA est le même pour les gènes réprimés, et se situerait au niveau de la région promotrice de ces cibles. L'utilisation des régions promotrices des cibles directes pour obtenir ce consensus pourrait nous permettre d'obtenir un consensus plus fiable. Aussi, nous avons décidé d'utiliser les séquences promotrices des gènes retrouvés en RNA-Seq et en ChIP-Seq pour établir un consensus de fixation pour le facteur de transcription SarA. Une analyse similaire a été réalisée chez *Pseudomonas aeruginosa* avec le régulateur AmrZ avec des cibles identifiées en ChIP-Seq (Jones *et al.*, 2014).

Pour aller plus loin, nous avons récupéré les séquences promotrices des nouvelles cibles identifiées et testé différentes combinaisons :

- Promoteurs des gènes codant des protéines
- Promoteurs des gènes sARNs
- Promoteurs des gènes codant des protéines et promoteurs des gènes sARNs.

Les séquences promotrices des gènes ont été déterminés à l'aide des données de Prados (Prados *et al.*, 2016). Les différentes combinaisons ont été analysées avec l'outil MEME Glam2 (Frith *et al.*, 2008), qui permet de faire ressortir des motifs plus ou moins espacés sur l'ADN.

Nos tests préliminaires nous ont amené à fixer les critères suivants :

- Taille de la séquence promotrice à 100nt
- Séquences promotrices des gènes sARNs seulement

Avec ces critères nous passons outre les régions 5'UTR des gènes codant des protéines qui peuvent être assez longues et non informatives dans notre étude. Nous utiliserons le +1 des gènes sARNs qui est souvent connu ou plus facile à déterminer.

Nous avons sélectionné 15 gènes sARNs qui ressortent dans notre analyse combinée RNA-Seq/ChIP-Seq. Les séquences promotrices de ces 15 gènes sARN (-100/+1) sont répertoriées dans le **tableau 9**. Ces gènes sARN sélectionnés pour la construction du consensus ont été validés de manière expérimentale dans cette première partie et/ou font partie du tableau des cibles communes RNA-Seq/ChIP-Seq, et la seule exception est *smn_1680* (126 nt), il possède un pic en ChIP-Seq avec une valeur de p-value proche de 0 et avec, en RNA-Seq, un différentiel d'expression de 2,7 à 4h30 c'est-à-dire légèrement en dessous du seuil fixé au départ (données non montrées). Ce candidat pourrait donc rejoindre la liste des sARN aux critères imparfaits comme *smn_4540_sprA2_{AS}* qui n'avait pas été détecté en RNA-Seq.

> <i>srn_0455</i>	<i>tsr9</i>	TAATGAAAAATGTTTGTTTTTATCTTCAAACGTAAATTTATTCTAATTTTAT TGCTTATCTTTTAATATTTGTCTTTGAGGTAAGTCGTATACTAAAAT
> <i>srn_0860</i>	<i>rsaOB</i>	AGATACCAATTACAATTTACAAAACAAATTAACTTTTAAATCAAAATTTTCT GAATAATTGTTGACAAATCTTTTTTACTCTGTAAGCTAATTAATATC
> <i>srn_0930</i>	<i>teg76</i>	TGTACATTTATAAACTATTTAAAGATTACCTAAGCAGTTATTGAAAAAATG CCGAAAATTTGCTATTATCGTTAAATAATTTACATAAACTCATATAAT
> <i>srn_1640</i>	<i>rsaD</i>	ATTTAACTAATTTATATGAAGAATAGCTTTCCCTAATAAATATCACTCACAA TATAATAATTAATAATTTCTGAATTTTTAATTTACTTTTCATTTTCATT
> <i>srn_1680</i>	<i>sRNA142</i>	TAATATTATTAACATTTTAGGATATCGGTTTCATATTTTTATAAATGCTGATT GATAGTGATAAAAAGCGTTTTAGTGATTTAACTAATTATAAAAAAT
> <i>srn_2230</i>	<i>sprG2</i>	GGTAATATTTTTAACAGCAAGCGGTTATTATTGAGATTAGGTTTTAGTCA GTTTTATTACTAAATTTTTATAAAAAATGGTATAATTTTTTGAGCAA
> <i>srn_3500</i>	<i>sRNA277</i>	AATAAAAATTCATGCGTATCTTTTTGAAGAAATATATGTAGAATTGTTGC AATTTAATGGTAATATTGATATTTTTCTTTGTATATAAATTATAAAA
> <i>srn_3610</i>	<i>sprC</i>	ATATAATTTTATACAATGTATAATAAGATTTAAAGATGTAGCTCATCAACAT TTTCATAGGGGATTTTTAAAATTAAGTATTGAAAAATAAATATTTAT
> <i>srn_3910</i>	<i>RNAIII</i>	TTTGTATTTAATTTTTAACATAAAAAAATTTACAGTTAAGAATAAAAAACGA CTAGTTAAGAAAAATTGGAAAATAAATGCTTTTAGCATGTTTTAATA
> <i>srn_3950</i>	<i>teg16</i>	TTAAATTTCTTATCTTTGAAACAGATTATCTATTCAAAGTTAATTGTAAGAAA ATTTAAAATATTTGTTGACATACTAAAGCAGATATAGTAAATTAAT
> <i>srn_4540</i>	<i>sprA2_{AS}</i>	AAATCATTTTTCGAAATACTTAATTCTAATATAATTAATTCATTTATTGTAA TATTGCAAAAATACATTGCACACCTTGTCATCAATGCTATAATTA
> <i>srn_4680</i>	<i>sau19</i>	TTTGTGATGTATTTACAAAATTTATCACTATTTTGGAAAATTAAGAAATATTT AATTATATAAAAGTTTAATAAGTCAGAAAATATGATAAAATGTAGAT
> <i>srn_4980</i>	<i>teg32</i>	AAAATGTCTTGTGCGTTTTTAATATAACAAGTGATTTTTGGAAATGCCAAA AATATATAGATTGTTTATATAAAATGATTTAAAATGTTTTATAACAAC
> <i>srn_9335</i>	<i>tsr29</i>	TACAAATTAATAACAAATAATTATTATAAATTCATTGATTTATTGTGTGGTA ATGATTAATATGACAATTGAAGTGGGTCTTAACCTCAACTTTTAAAT
> <i>srn_9340</i>	<i>sRNA287</i>	GTTTTGAAATGTAATGTTTAGCTGTTACTTAAAGAAAATCAAATATTATATA TACGCTTGAAAAATAAAAATAAATATTATAATATAATCAATCGGCA

Tableau 9 : Séquences promotrices des gènes sARNs utilisées pour générer le consensus SarA dans Glam2.

1.2. Résultats obtenus par les outils Glam2/Glam2Scan

Les séquences promotrices (-100/+1) ont été analysées dans le logiciel Glam2 (MEME) (Frith et al., 2008). Cet algorithme permet de générer une matrice de pondération de position pour chaque nucléotide retrouvé dans le « consensus » SarA, c'est-à-dire la probabilité de retrouver tel nucléotide à telle position dans la séquence. Cette séquence d'environ 20 nt est ensuite transférée dans l'algorithme Glam2Scan qui va scanner cette séquence sur l'ensemble du génome de *S. aureus* NCTC8325. L'algorithme va rechercher toutes les séquences ressemblantes au « consensus » désigné.

Nous avons étudié les 200 premiers résultats et dans le **tableau 10**, seuls les 31 premiers résultats sont représentés (Oriol et al., 2021). Ces 200 résultats peuvent être considérés comme des « hits » car la séquence retrouvée ne correspond pas toujours à un gène et peut se situer dans un cadre de lecture par exemple.

Les candidats sont classés selon une valeur score, plus il est élevé plus la séquence désignée et proche de la séquence consensus. Nous retrouvons également les coordonnées et la séquence nucléotidique révélée par la recherche du consensus.

Analyse Glam2Scan								
Rang	Début	Localisation	Fin	Brin	Score	Connu ou nouveau	Nom	Distance ATG ou +1*
1	942169	aaaaatataaccattttataaaaatttagtaata	942132	-	38	Utilisé pour le consensus	<i>srn_2230 sprG2</i>	6nt 5'
2	639896	gaaagtaaatataaaatcagaataattttaatt	639932	+	35,8	Utilisé pour le consensus	<i>srn_1640 rsaD</i>	8nt 5'
3	2556250	acaaattatcactattttggaaaataagaaatatt	2556286	+	33,6	Utilisé pour le consensus	<i>srn_4680 sau19</i>	48nt 5'
4	2111466	acaaatattttaaattttcctaactttgaat	2111430	-	31,8	Utilisé pour le consensus	<i>srn_3950 teg16</i>	32nt 5'
5	174152	acaaatataaaagataagacaataaaat.tagaataaat	174190	+	31,5	Utilisé pour le consensus	<i>srn_0455 tsr9</i>	25nt 5'
6	2714676	aaaaatataagattgtttataaaa.atgatttaaa	2714641	-	31	Utilisé pour le consensus	<i>srn_4980 teg32</i>	15nt 5'
7	356702	aaagattgtcaacaattattcagaaaattttgattaaa	356741	+	30,4	Utilisé pour le consensus	<i>srn_0860 rsaOB</i>	26nt 5'
8	2614055	aaaaataaatagagataacaataaaatattgataaaaa	2614016	-	29,8		SAOUHSC_02838	Dans 5'/chevauchement
9	909388	acaaatatttaataaattgttaataagttttctataatt	909349	-	29,4		SAOUHSC_00936	Chevauchement
10	1795114	gaaaataatcaatattaccattaaat.tgcaacaatt	1795150	+	29,3	Utilisé pour le consensus	<i>srn_3500 sRNA277</i>	20nt 5'
11	746762	aaaaataagattaacataattataaaat.tttaaataaaa	746799	+	29,3		SAOUHSC_00764	Dans 3'
12	2502462	ataattaaattcatttattgtaatat.tgcaaaaaata	2502497	+	29	Utilisé pour le consensus	<i>srn_4540 sprA2_{AS}</i>	4nt 5'
13	1863936	aaaaataaaataaataattataataataatcaatcggc	1863899	-	29	Utilisé pour le consensus	<i>srn_9340 sRNA287</i>	1nt 5'
14	660508	aaaaatgaaccgatctcaaaaat.gttaataata	660473	-	29	Utilisé pour le consensus	<i>srn_1680 sRNA142</i>	63nt 5'
15	2721352	aaaaatgtcaaaaagtgtataataaaacataaat	2721315	-	28,2	Nouvel sARN	<i>srn_5010 teg33</i>	9nt 5'
16	2744123	aaaaataaattaatttaca.aaaaatataaaaaat	2744088	-	28,2	Même position que 168	SAOUHSC_02978	29nt 5'
17	1831080	aaaaatataataaaattataaaaa.aggtatttta	1831044	-	28,2	Même position que 20	SAOUHSC_01923	55nt 5'
18	1488099	aaaaataaatttttttttaaaattttaataact	1488136	+	27,5		SAOUHSC_01539	100nt 5'
19	1831039	caaaataaaatccctttttataaatt.tattataata	1831075	+	27,4	Même position que 18	SAOUHSC_01923	50nt 5'
20	1459693	aaaaatagataaattat.ataaattttcaagata	1459658	-	27,4		SAOUHSC_01508	Chevauchement
21	1533308	acaaataaactataattactaaaaatacagcaatt	1533344	+	27,4		SAOUHSC_01609	Chevauchement
22	1848285	gaaaataataataaatttttaaaag.aacaattaac	1848249	-	27,4	Même position que 65	SAOUHSC_01944	39nt 5'
23	1171183	aaaaataaatacaaaatcaaatcagttaaataatgcaattatc	1171223	+	27,2		SAOUHSC_01220	Chevauchement
24	2036267	gaaaaatattaaaaatcaataaaatataaaagaaa	2036303	+	27,1	<i>sak</i>	SAOUHSC_02171	100nt 5'
25	799922	atagttattttataaattataaaatttttataaatt	799959	+	27,1	<i>nuc</i> (Même position que 35, 89)	SAOUHSC_00818	74nt
26	1858881	acaaattaatacaaaataattatttaaattcattgatt	1858842	-	27	Utilisé pour le consensus	<i>srn_9335 tsr29</i>	59nt 5'
27	899869	aaaattattcaagtttattttagaataatcagttatt	899831	-	27		SAOUHSC_00928	53nt 5'
28	433225	aaaaatagaacatttatcaataat.tgctataata	433190	-	26,8		SAOUHSC_00434	38nt 5'
29	1257462	gaaaacaaaatacaaaataaaaataatgaataatc	1257426	-	26,7		SAOUHSC_01313	Chevauchement
30	664367	aacaataaagcattatctgaatattgataaaaa	664403	+	26,7		SAOUHSC_00674	Chevauchement
31	76259	aaatttaataaaaatcatatttttaattgta	76223	-	26,6	<i>sarS</i> (Même position que 116)	SAOUHSC_00070	70nt 5'

Tableau 10 : Extraction des premiers résultats obtenus dans l'analyse Glam2Scan. Distance par rapport à l'ATG pour les gènes codant des protéines, par rapport au +1 pour les gènes sARNs. En jaune, les séquences promotrices des gènes sARNs utilisés pour générer le consensus dans Glam2.

Pour chaque séquence contenant le consensus de Glam2, nous allons rechercher manuellement où cette dernière se situe au sein du génome et lui attribuer un gène ou deux gènes correspondants. Cette attribution est souvent faite en parallèle de la détermination de la distance entre le consensus et l'ATG pour les gènes codant des protéines, ou le +1 pour les gènes sARNs. Par exemple pour le premier candidat, *srn_2230_sprG2* (hit n°1), la séquence retrouvée se situe à 6nt en amont de son +1 de transcription, ce qui indique la présence du consensus de fixation de SarA en amont du gène et la répression transcriptionnelle par SarA observée précédemment.

Parmi les 200 hits, on retrouve les séquences promotrices des 15 gènes sARNs qui ont servi à générer le consensus dans Glam2 (en jaune). Les autres hits se retrouvent à proximité de gènes codant des protéines ou plus rarement à proximité de gènes sARN. Certains gènes peuvent être retrouvés plusieurs fois, c'est par exemple le cas avec *sarS* (SAOUHSC_00070) au rang 31 dans le **tableau 10**.

Par la suite dans le **tableau 11**, nous avons fait le parallèle avec les données RNA-Seq et ChIP-Seq disponibles pour mettre en évidence si des gènes présents dans ces deux expérimentations ressortaient également dans l'analyse consensus Glam2/Glam2Scan. Pour les caractéristiques RNA-Seq, les gènes en orange sont ceux retrouvés dans la catégorie « réprimés par SarA » (**tableau 21 en annexe**). Parmi les 31 premières cibles, on retrouve exclusivement des gènes réprimés dans nos conditions de RNA-Seq (18 sur 31). Pour ces gènes réprimés, on retrouve également un pic de fixation de SarA en amont de leur codon d'initiation. Tous les gènes où le consensus tombait dans une catégorie « dans 5' / chevauchement » ne sont ni retrouvés en RNA-Seq ni en ChIP-Seq.

Parmi ces 31 résultats présentés dans le **tableau 11**, une cible connue de SarA est retrouvée, le gène *nuc* (SAOUHSC_00818) qui se positionne à la 25^{ème} place (Cassat et al., 2006). Enfin dans l'ensemble des 200 hits, on retrouve également des gènes pour lesquels la régulation directe par SarA a été démontrée précédemment, comme par exemple : SAOUHSC_00975, SAOUHSC_01452 (*ald1*) ou encore SAOUHSC_02696 (*fmhA*) (suite dans les données supplémentaires de la publication (Oriol et al., 2021)).

Nous avons utilisé 15 sARNs réprimés pour mener l'analyse consensus, et lorsque l'information existe, nous nous apercevons que notre analyse Glam2Scan fait ressortir uniquement des gènes réprimés en RNA-Seq, ce qui pourrait indiquer que l'utilisation de séquences promotrices réprimées par SarA favorise l'identification de gènes réprimés par SarA. Il pourrait donc exister deux types de consensus de fixation de SarA l'un pour les gènes réprimés et l'autre pour les gènes activés.

Par conséquent, cette analyse Glam2Scan permet (i) de faire ressortir des cibles connues de SarA, (ii) de croiser les données expérimentales RNA-Seq et ChIP-Seq pour donner du poids aux résultats *in silico*, et (iii) ne permet de faire ressortir que des cibles réprimées par SarA avec les paramètres utilisés.

Informations				Position consensus	ChIP-Seq				RNA-Seq					
Rang	Gène	ATG ou +1*	Orientation		Centre du pic	Position par rapport à l'ATG ou +1*	Score	p-value	2h	Régulation	p-value	4h30	Régulation	p-value
1	<i>srn_2230_sprG2</i>	942176	+	6nt 5'	942122	54	33,67	9,01E-249	15,48	-	1,16E-143	8,99	-	1,94E-25
2	<i>srn_1640_rsaD</i>	639887	-	8nt 5'	639915	28	21,45	2,30E-102	1,02	-	9,85E-01	10,43	-	3,05E-27
3	<i>srn_4680_sau19</i>	2556335	+	48nt 5'	2556303	32	39,91	0	1,79	-	2,03E-02	4,58	-	3,85E-05
4	<i>srn_3950_teg16</i>	2111499	+	32nt 5'	2111393	106	44,69	0	2,25	-	2,45E-14	21,83	-	4,41E-44
5	<i>srn_0455_tsr9</i>	174126	-	25nt 5'	174208	82	20,11	2,78E-90	2,60	-	1,61E-05	3,37	-	1,44E-04
6	<i>srn_4980_teg32</i>	2714625	-	15nt 5'	2714742	117	46,37	0	7,94	-	1,62E-21	12,05	-	1,10E-34
7	<i>srn_0860_rsaOB</i>	356675	-	26nt 5'	356763	88	24,76	1,09E-135	1,40	-	2,11E-03	10,51	-	7,34E-29
8	SAOUHSC_02838	2614025	-	Dans 5'/chevauchement	ND				ND ¹			ND ¹		
9	SAOUHSC_00936	908438	+	Chevauchement	ND				0,89	+	7,72E-01	1,21	-	6,66E-01
10	<i>srn_3500_sRNA277</i>	1795093	-	20nt 5'	1795100	7	52,29	0	1,72	-	1,31E-06	3,22	-	1,30E-08
11	SAOUHSC_00764	746397	+	On 3'	ND				0,98	+	9,59E-01	1,16	-	6,06E-01
12	<i>srn_4540_sprA2_{AS}</i>	2502532	+	34nt 3'	2502457	57	36,60	6,9E-294	2,90	-	1,84E-02	1,98	-	2,05E-01
13	<i>srn_9340_sRNA287</i>	1863897	-	1nt 5'	1863948	51	54,78	0	13,91	-	1,20E-50	24,83	-	1,66E-52
14	<i>srn_1680_sRNA142</i>	660569	+	63nt 5'	660473	96	44,56	0	1,27	-	1,75E-01	2,72	-	5,58E-05
15	<i>srn_5010_teg33</i>	2721313	-	9nt 5'	2721325	12	12,64	6,04E-37	0,71	+	5,05E-04	0,92	+	6,68E-01
16	SAOUHSC_02978	2744058	-	29nt 5'	2744123	65	33,43	2,63E-245	1,11	-	4,45E-01	1,63	-	3,30E-02
17	SAOUHSC_01923	1830988	-	55nt 5'	1831064	76	44,55	0	6,19	-	4,86E-57	3,96	-	5,84E-12
18	SAOUHSC_01539	1487998	-	100nt 5'	1488110	112	12,59	1,20E-36	0,80	+	1,00E+00	2,84	-	5,46E-01
19	SAOUHSC_01923	1830988	-	50nt 5'	1831064	76	44,55	0	6,19	-	4,86E-57	3,96	-	5,84E-12
20	SAOUHSC_01508	1460141	-	Chevauchement	ND				0,91	+	6,95E-01	0,71	+	2,30E-01
21	SAOUHSC_01609	1533835	-	Chevauchement	ND				0,73	+	4,41E-03	0,52	+	8,64E-03
22	SAOUHSC_01944	1848325	+	39nt 5'	1848234	91	41,93	0	1,46	-	3,34E-01	9,43	-	1,32E-22
23	SAOUHSC_01220	1170355	+	Chevauchement	ND	ND	ND	ND	3,41	-	1,12E-27	6,36	-	3,63E-21
24	SAOUHSC_02171	2036166	-	100nt 5'	2036270	104	23,86	3,73E-126	26,73	-	5,60E-186	30,13	-	7,57E-59
25	SAOUHSC_00818	800034	+	74nt	799858	176	42,72	0	130,10	-	4,46E-277	269,37	-	4,52E-115
26	<i>srn_9335_tsr29</i>	1858782	-	59nt 5'	1858895	113	40,47	0	2,07	-	2,11E-03	5,45	-	5,57E-15
27	SAOUHSC_00928	899923	+	53nt 5'	899854	69	38,22	5,48E-320	0,79	+	5,15E-01	3,55	-	1,79E-07
28	SAOUHSC_00434	433151	-	38nt 5'	433254	103	27,85	5,38E-171	1,11	-	8,48E-01	2,60	-	4,65E-05
29	SAOUHSC_01313	1257226	+	Chevauchement	1257353	-127	44,64	0	0,89	+	4,67E-01	0,96	+	9,67E-01
30	SAOUHSC_00674	664261	+	Chevauchement	664176	85	35,87	4,89E-282	4,10	-	7,20E-44	3,67	-	3,29E-09
31	SAOUHSC_00070	76152	-	70nt 5'	76211	59	47,42	0	0,96	+	8,52E-01	0,89	+	7,01E-01

Tableau 11 : Comparaison des résultats obtenus dans l'analyse Glam2Scan avec les données RNA-Seq et ChIP-Seq. En orange, les gènes réprimés en RNA-Seq avec un différentiel d'expression supérieur à 3, critère seuil pour notre analyse. ND : non déterminé, ; ¹ : avec une taille inférieure à 100 nt, le gène SAOUHSC_02838 pourrait se trouver à la limite de détection en RNA-Seq.

1.3. Comparaison des données *in silico* avec les données expérimentales

Dans un second temps, nous avons souhaité comparer les séquences consensus de fixation SarA obtenues avec Glam2Scan pour les gènes *srn_3610_sprC* (position n°135) et *srn_9340* (position n°13) avec les séquences de fixation découvertes par empreinte à la DNase I publiées pour ces deux cibles sARN (Mauro *et al.*, 2016) (**figure 90**).

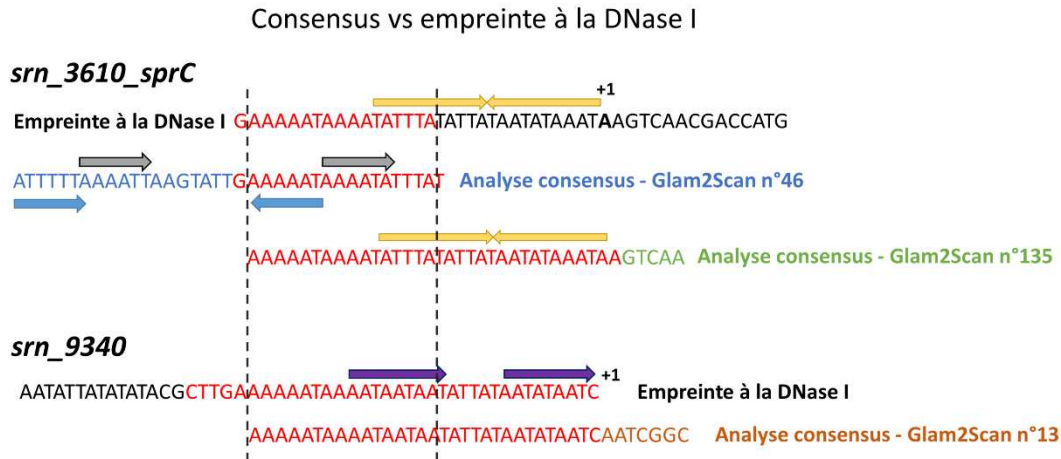


Figure 90 : Alignement des séquences retrouvées dans l'analyse consensus avec les séquences révélées par expérience d'empreinte à la DNase I sur les gènes *srn_3610_sprC* et *srn_9340*. Les flèches jaunes et bleues représentent les séquences inversées répétées et les flèches grises et violettes sont des séquences identiques.

On peut voir que pour les deux gènes sARNs, il y a une superposition correcte des séquences obtenues *in silico* avec celles obtenues expérimentalement. De plus les séquences *in silico* contiennent bien les répétitions et les séquences inversées dans la **figure 90**. Pour rappel, le gène *srn_9340* a été découvert grâce à la similarité de séquence avec le promoteur du gène *srn_3610_sprC*, et sont situés à proximité dans l'îlot de pathogénie vSaβ (Mauro *et al.*, 2016).

Cette analyse a conforté l'ensemble de nos résultats Glam2/Glam2Scan et nous a amené à aller plus loin et tenter de valider l'ensemble de cette analyse avec d'une nouvelle cible potentiellement régulée par SarA.

1.4. Validation d'une cible issue de l'analyse consensus : *srn_5010_teg33*

Pour valider notre workflow, nous avons choisi de valider une cible sARN proposée par l'analyse Glam2Scan afin de montrer que la prédiction de fixation de SarA *in silico* pouvait être réelle dans des conditions *in vitro*. Notre choix s'est porté sur la première cible sARN révélée uniquement par l'analyse consensus, *srn_5010_teg33* (**tableau 10**). En effet, nos analyses RNA-Seq indiquent que cette cible est présente de manière équivalente aux temps de croissance et dans les deux souches HG003 et HG003 $\Delta sarA$. Ses valeurs FPKM à 2h et 4h30 sont de 1000, ce qui indique une quantité d'ARN assez importante (**tableau 20 en annexe**). Nous avons fait le choix de valider la cible seulement avec une expérience de retard sur gel, car il aurait été difficile de trouver la condition de culture dans laquelle la régulation par SarA s'opère, pour étudier ses variations d'expression dans un contexte sauvage ou délété du gène *sarA*.

Nous avons mis en contact le promoteur marqué du gène *srn_5010_teg33* en contact avec une quantité croissante de la protéine SarA. Dans ces conditions, nous obtenons un retard sur gel, c'est-à-dire la formation du complexe $P_{srn_5010^*}/SarA$ avec 1 pmol de SarA (**figure 91**). Enfin, pour vérifier la spécificité de fixation, nous avons mis en compétition le promoteur $P_{srn_5010^*}$ avec soit le promoteur P_{srn_5010} non marqué (sonde spécifique) soit avec le promoteur du gène de l'ARN16S (sonde non spécifique). Seule la condition avec la sonde spécifique permet de rompre le complexe $P_{srn_5010^*}/SarA$, donc la fixation de SarA sur le promoteur du gène *srn_5010_teg33* est spécifique (**figure 91**).

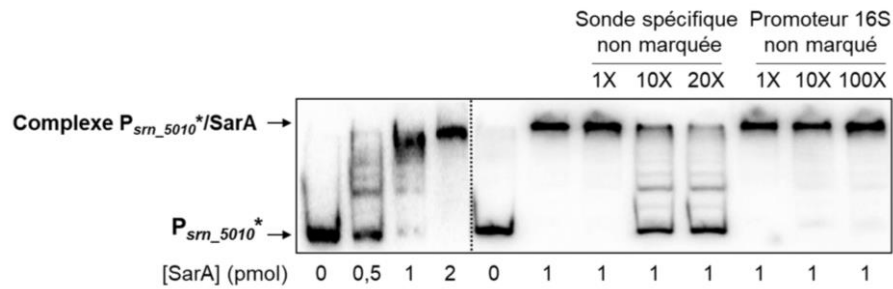


Figure 91 : Expérience de gel retard avec le promoteur marqué du gène *srn_5010* en présence de SarA.

Le consensus construit avec les promoteurs des 15 gènes sARN a permis de mettre en évidence une nouvelle cible sARN de SarA, *srn_5010_teg33*. SarA peut fixer *in vitro* de manière spécifique la région promotrice de ce gène. Néanmoins, dans nos conditions expérimentales nous n'avons pas pu montrer ni de variation d'expression en absence de *sarA* en RNA-Seq ni de pic de fixation en ChIP-Seq. Par la suite, il faudrait étudier quel signal entraîne une régulation ou non par SarA sur ce gène sARN.

Par conséquent, l'analyse consensus a été assez robuste pour révéler une nouvelle cible sARN. Ce type d'analyse se détachant des conditions expérimentales peut être puissante à l'avenir pour étudier de nouvelles cibles du régulon SarA ou être transposée à des nouveaux facteurs de transcription.

E. Conclusion de l'étude du régulon SarA

Les analyses à haut débit RNA-Seq et ChIP-Seq amènent une complémentarité et nous avons pu voir ici que la combinaison des résultats a permis de trouver des nouvelles cibles directes d'un facteur de transcription. En effet, si la fixation de SarA a lieu en amont du gène d'intérêt, et que la quantité de ce dernier varie en fonction de la présence ou absence de SarA, alors ce dernier peut être considéré comme une cible directe de SarA. Ainsi nous avons pu valider 13 cibles avec les critères de départ c'est-à-dire que toutes les cibles étudiées se sont révélées directement régulées par SarA. En extrapolant nos résultats, il semble qu'une cible retrouvée régulée négativement en RNA-Seq et pour laquelle une fixation de SarA est visualisée dans la région promotrice en ChIP-Seq est une cible directe de SarA. De ce fait, le régulon SarA s'étend à 128 cibles dans nos conditions expérimentales.

Cela étant, nous avons également démontré que les critères choisis pour construire cette étude étaient peut-être trop strictes ainsi, nous avons pu ajouter trois autres gènes sARNs avec des critères imparfaits, démontrant que le régulon SarA avait été sous-estimé précédemment. Enfin l'analyse *in silico* et les retards sur gels ont révélés le gène sARN *sm_5010_teg33* comme étant probablement une nouvelle cible directe de SarA et ont montré par-là que le régulon SarA devait encore être étendu. En effet, les analyses RNA-Seq et ChIP-Seq sont toujours réalisées dans des conditions expérimentales précises, conditions dans lesquelles certaines cibles peuvent être non exprimées.

Cette analyse comparative a également permis de faire ressortir des gènes d'intérêt pour mener une enquête de « consensus » pour le FT donné. Le consensus reconnu par SarA, semble beaucoup plus complexe que ceux décrits pour d'autres FT comme CodY ou AlrR pour lesquels le site de fixation est d'une taille et d'une séquence précise (Majerczyk et al., 2010) (Crosby et al., 2020).

Le fait que notre étude n'ait pas permis de déterminer précisément une séquence consensus de SarA semble indiquer que la séquence nucléotidique n'est peut-être pas le seul critère strict pour une fixation de SarA sur l'ADN. Des études montrent de plus en plus que le degré de courbure de l'ADN est essentiel pour la fixation et l'accessibilité de l'ADN par les protéines régulatrices (Martis B. et al., 2019). Des outils comme ThreaDNA (Cevost et al., 2018) aurait pu aider à l'analyse du consensus SarA, car il permet de combiner les données de courbure d'ADN avec la séquence reconnue pour la fixation d'un FT. Malheureusement la cristallographie de SarA en présence d'ADN disponible ne regroupe pas assez d'éléments pour utiliser ce logiciel (Schumacher et al., 2001). Des expériences complémentaires d'empreinte à la DNase I seraient nécessaire sur des gènes sARNs et gènes codant des protéines pour aller plus loin dans cette analyse de « consensus ».

Par ailleurs, la protéine SarA classée facteur de transcription a énormément d'affinité pour l'ADN, comme en témoigne notre analyse ChIP-Seq qui révèle 1000 pics de fixation SarA sur le chromosome bactérien. Ce nombre est bien au-delà de ce qui est habituellement retrouvé pour les facteurs de transcription. SarA a déjà été proposé comme étant une protéine de type chaperone capable d'agir sur la conformation et par conséquent agir sur l'accessibilité ou non de la chromatine pour la transcription des gènes à proximité (Schumacher et al., 2001). Si tel était le cas, il serait d'autant plus intéressant d'utiliser des outils bio-informatiques qui utilisent des données de courbures de l'ADN ainsi que de cristallographie de SarA pour tenter de découvrir les nucléotides importants pour la reconnaissance et la fixation de SarA à l'ADN.

Pour aller plus loin dans la compréhension du mécanisme de répression transcriptionnelle, nous pourrions vérifier si SarA empêche la fixation de l'ARN polymérase par encombrement stérique comme il a été proposé pour les gènes *sm_3610_sprC* et *sm_9340*. Dans tous les cas, SarA semble être responsable de la répression transcriptionnelle d'au moins 130 gènes cibles ARNm et sARNs découverts avec l'analyse commune RNA-Seq / ChIP-Seq.

Nous avons plus particulièrement étendu le régulon SarA à de nouveaux gènes sARNs, régulateurs clés dans les réponses au stress. Ces sARNs peuvent faire partie de systèmes toxine-antitoxine de type I. Ainsi, nous

avons pu montrer que SarA est capable à la fois réprimer l'expression du gène *sprG2* codant la toxine du système SprG2/SprF2, mais aussi réprimer l'expression du gène *sprA2_{AS}* codant l'ARN antitoxine du système SprA2/SprA2_{AS}. Ces observations ajoutent de la complexité au réseau de régulation chez *S. aureus* car un régulateur global est capable de contrôler l'expression d'un système toxine-antitoxine, à l'équilibre déjà par lui-même, ce qui pourrait être un gain d'énergie d'agir en direct sur l'ADN et non sur l'ARN.

Certains sARN régulés par SarA ont des fonctions connues comme Srn_1640_RsaD lié au métabolisme, ou alors des fonctions qui restent à découvrir comme Srn_3950_Teg16. Nous avons fait le choix d'étudier plus en détails certains d'entre eux dans la suite de ces travaux de thèse.

Partie 2 : Méthode d'études des phénotypes liés à SarA

Avant d'aller plus loin dans l'investigation des cibles sARNs de SarA, nous avons voulu mettre au point différents modèles pour étudier les phénotypes associés à l'absence de *sarA* chez *S. aureus*.

Cette partie portera donc essentiellement sur la mise au point de techniques permettant de poursuivre l'étude du régulon SarA et plus particulièrement d'étudier les phénotypes des sARNs régulés directement par SarA.

Le phénotype d'une souche délétée du gène *sarA* a été uniquement testé dans le contexte d'une infection musculo-squelettique chez un modèle murin. Blevins et al., ont montré qu'un mutant UAMS-1 $\Delta sarA$ a une capacité plus faible à causer des arthrites septiques et des ostéomyélites par rapport à la souche sauvage (Blevins et al., 2003). Une seconde étude a testé la multiplication bactérienne sur un modèle d'infection sur cathéters. Ce type d'infection nécessite la mise en place de la formation de biofilm par *S. aureus*. Les auteurs ont mis en évidence que la souche délétée du gène *sarA* disparaît plus rapidement que la souche parentale (Snowden et al., 2013). Très peu d'études ont été menées sur ce mutant mais ces dernières tendent à montrer qu'une souche *S. aureus* délétée du gène *sarA* a un fitness impacté négativement lors de l'infection.

Infection sur le modèle larvaire *Galleria mellonella*

1. Stratégie expérimentale

Dans cette partie, nous avons voulu comparer les souches HG003 et HG003 $\Delta sarA$ dans le modèle d'infection larvaire *Galleria mellonella*. Cette étude a été réalisée avec l'aide de Julia Papail, une stagiaire en master 1 de microbiologie.

Le modèle d'infection larvaire a été mis au point par le doctorant Guillaume Ménard au sein du laboratoire. Ses travaux ont fait l'objet d'une publication montrant le rôle de certains sARNs au cours de l'infection dans ce modèle (Ménard et al., 2021b). Ce modèle a été utilisé pour étudier de nombreux pathogènes comme *Pseudomonas aeruginosa* ou encore *Listeria monocytogenes* (Ménard et al., 2021a). Ce modèle possède de nombreux avantages : il est peu coûteux, facilement manipulable, ne demande de dérogation spécifique, permet une reproduction rapide des résultats, et enfin les larves infectées peuvent se maintenir à 37°C. Ce dernier facteur est essentiel pour réaliser des infections avec *S. aureus*, et mimer une infection chez l'Homme (Pereira et al., 2020).

La larve possède un système immunitaire innée avec une réponse cellulaire et humorale proche de celle de l'Homme. Ainsi on retrouve les principaux mécanismes de défense comme la phagocytose, la production de peptides antimicrobiens (PAMPs). A ces mécanismes s'ajoute le phénomène de mélanisation, spécifique de *G. mellonella* et témoigne du déclenchement de la réponse immunitaire de la larve (Pereira et al., 2020). Ainsi, une larve en pleine santé est de couleur crème et très mobile (larve 1), alors qu'une larve infectée va commencer à présenter des tâches noires (larves 2-3), qui sont des signes de mélanisation et de réponse immunitaire (**figure 92A**). Au cours de l'infection, la larve forme des nodules qui possèdent des structures

similaires à celles trouvées dans les abcès humains (Sheehan *et al.*, 2019). L'ensemble de ces caractéristiques fait de cette larve un bon modèle d'étude de ce pathogène notamment pour faire des parallèles avec les infections humaines. Par ailleurs, *S. aureus* est la bactérie à Gram positive la plus étudiée dans ce modèle d'infection larvaire (Pereira *et al.*, 2020).

Au niveau anatomique, les larves se composent de trois grandes parties distinctes : la tête, le thorax, et l'abdomen (**figure 92B**). Au niveau des tissus, on retrouve principalement deux composants, le corps gras et l'hémolymphe, laquelle correspond au système circulatoire dans la larve (Singkum *et al.*, 2019).

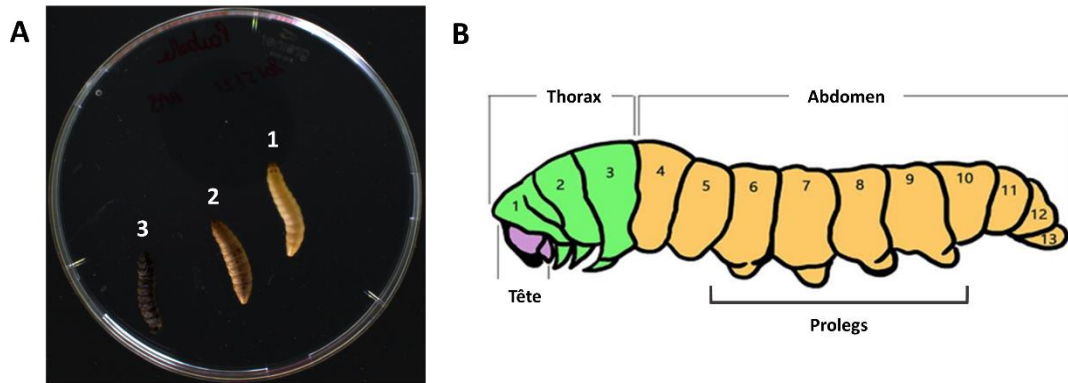


Figure 92 : *Galleria mellonella*. (A) Etats morphologiques : n°1 - Larve vivante (couleur crème en pleine santé), n°2 – Larve présentant des tâches noires de mélanisation, n°3 - Larves morte (entièrement mélanisées : noires). (B) Schéma anatomique de la larve, composée de trois parties distinctes : tête, thorax et abdomen.

Pour mettre au point ce modèle, nous nous sommes inspirés du protocole publié dans Ménard *et al.*, 2021b. L'inoculum utilisé pour réaliser l'infection est préparé de la manière suivante : après une culture de nuit des souches à tester en milieu LB à 37°C, ces dernières sont centrifugées et les culots bactériens sont lavés avec une solution de PBS puis calibrées à 10^8 UFC/mL. Pour réaliser ce calibrage des correspondances entre la densité optique (DO_{600nm}) et la quantité de bactéries ont été réalisées. Dans notre cas, il est nécessaire d'ajuster la DO_{600nm} à 0,3 pour avoir 10^8 UFC/mL. Cet inoculum est introduit dans une seringue de 1mL et positionné sur le micro-injecteur (**figure 93A**).

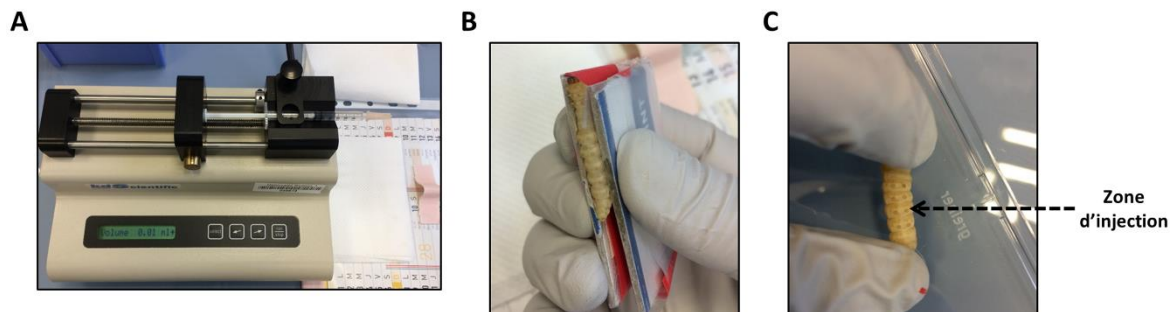


Figure 93 : Méthode d'injection des larves *G. mellonella*. (A) Micro-injecteur KD Scientific KDS 100 avec une seringue de 1mL, et d'une aiguille BD Precision Glide Needle ; injection de $10\mu L$ dans les larves (soit 10^6 UFC) (B) Larve tenue dans un morceau de carton solide pour l'immobiliser lors de l'infection. (C) Larve sur le dos, visualisation des prolegs, zone d'injection indiquée par la flèche noire. Photos Marie Suriray ©.

En parallèle, 20 larves pour chaque souche testée sont désinfectées avec de l'alcool 70% sur un écouvillon puis placées dans une boîte de pétri carrée. L'injection a été calibrée à 10 μ L soit une injection de 10⁶ UFC par larve. La larve est maintenue immobile grâce à un carton qui nous permet d'orienter la larve vers l'aiguille (**figure 93B**). L'injection a lieu au niveau d'un proleg, c'est-à-dire les ventouses sur sa partie dorsale (**figure 93C**). En parallèle, des larves injectées avec des solutions de différentes souches de *S. aureus*, une dizaine de larves sont injectées avec du PBS, ce groupe sera le témoin de la bonne santé des larves ainsi que du bon déroulement de l'expérience. Afin de vérifier l'inoculum, chaque dilution calibrée à 10⁸ UFC/mL est diluée en cascade et les dilutions 10⁻⁵ et 10⁻⁶ sont étalées sur un milieu non sélectif et incubés à 37°C puis les colonies sont dénombrées après 24h d'incubation. Si le comptage est en accord avec les dilutions alors l'expérience peut être poursuivie.

Les injections sont réalisées à partir de bactéries cultivées dans un milieu LB. Avant de réaliser les injections nous avons vérifié que les souches étudiées avaient la même croissance dans ce milieu. Pour cela, nous avons réalisé des courbes de croissance après culture, sous agitation à 37°C, en milieu LB et en erlen. La croissance a été évaluée par la mesure de la densité optique toutes les heures. Dans notre cas, nous nous sommes intéressés à comparer la souche HG003 et la souche HG003 $\Delta sarA$. Les courbes de croissance des deux souches sont quasiment superposables, ce qui indique une croissance similaire en milieu LB (**figure 94**). En parallèle, nous avons préparé les inoculums pour les deux souches HG003 et HG003 $\Delta sarA$, et réaliser les dilutions en cascade et les étalements sur milieu non sélectif pour vérifier que nous étions bien calibrés à 10⁸ UFC/mL pour une DO_{600nm} initiale de 0,3.

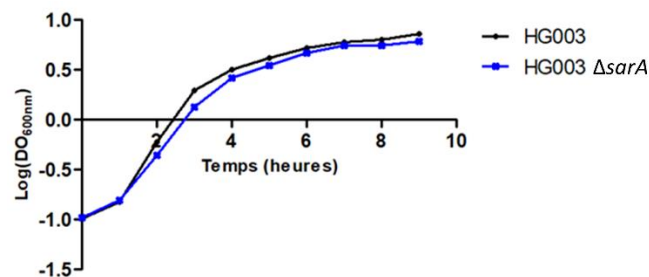


Figure 94 : Courbe de croissance en milieu LB des souches HG003 et HG003 $\Delta sarA$. Culture en erlen à 37°C sous agitation à 160 rpm et mesure de la densité optique DO_{600nm} toutes les heures au spectrophotomètre.

2. Suivi de la mortalité journalière des souches HG003 et HG003 $\Delta sarA$

Pour chaque expérience d'infection sur le modèle *G. mellonella*, nous allons quotidiennement et ce jusqu'à 6 jours post-infection, suivre la mortalité larvaire et en parallèle le dénombrement bactérien intralارvaire. Pour que les résultats soient reproductibles et comparatifs, les larves sont calibrées avant chaque expérience, avec un poids compris entre 250 et 300mg.

Dans nos expériences, un réplicat correspond à 20 larves injectées avec la même souche le même jour, les souches à comparer ayant été injectées systématiquement le même jour. Ainsi, nous avons décidé d'injecter 40 larves par souche réparties en deux lots de 20 : le premier lot permet de suivre la mortalité et le deuxième

le dénombrement bactérien intra-larvaire (**figure 95**). Ces expériences ont été réalisées en triplicat, c'est-à-dire sur trois lots de larves différents pour le suivi de mortalité et de dénombrement, soit 60 larves pour chaque souche.

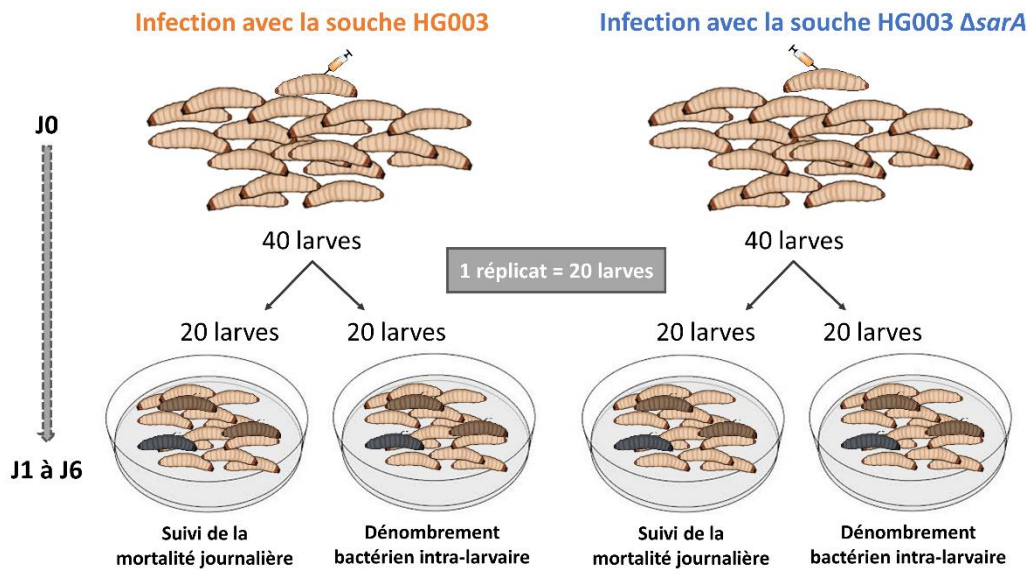


Figure 95 : Planification expérimentale des infections sur les larves *G. mellonella*. Infection avec la souche HG003 à gauche et avec la souche HG003 $\Delta sarA$ à droite. Les larves de couleur claire sont en bonne santé par rapport aux larves de couleur marron/noire qui témoignent de la mélanisation de la larve suite à l'infection.

Dans le suivi de mortalité, les larves mélanisées c'est-à-dire de couleur noire et immobiles sont considérées comme mortes. Ainsi, sur la **figure 96A**, nous avons pu observer que la quasi-totalité des larves survivent lors des premières 24h post-infection. Deux jours après l'infection, 80% des larves ont survécu à l'infection avec la souche HG003 comme avec la souche HG003 $\Delta sarA$.

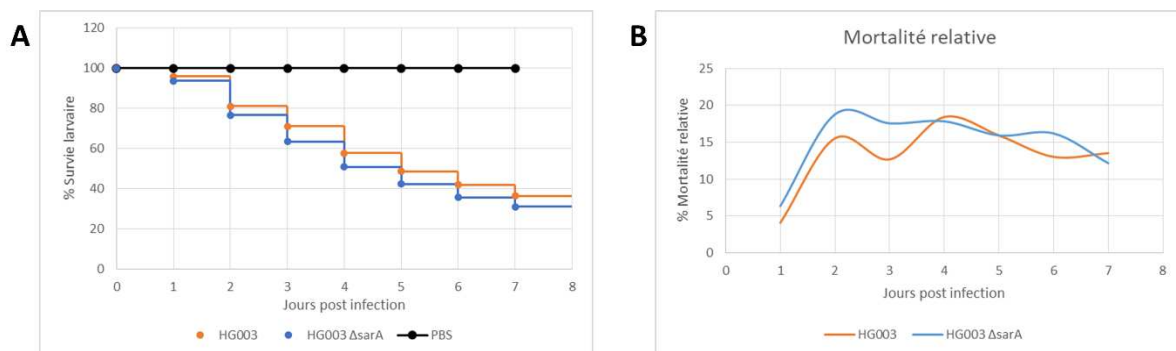


Figure 96 : Mesure du taux de survie des larves *G. mellonella* infectées avec les souches HG003 et HG003 $\Delta sarA$. (A) Courbes de survie Kaplan-Meier des larves infectées. (B) Taux de mortalité relative des larves infectées en (%). Expérience réalisée en triplicat.

A partir du 3^{ème} jour post-infection, l'écart se creuse entre les deux souches, l'infection avec la souche HG003 $\Delta sarA$ cause un peu plus de morts chaque jour. Cette observation se confirme quand on calcule la mortalité relative. Cette dernière se calcule en comparant le nombre de larves vivantes entre 2 jours consécutifs. Par exemple pour le jour 2, on fera le rapport entre les larves mortes à J2 sur celles vivantes à

J1, ainsi les larves mortes sont retirées du comptage au fur et à mesure de l'expérience. La **figure 96B** permet de mettre en évidence que nous obtenons bien un pic de mortalité à 2 jours pour les deux souches. Néanmoins, les deux souches ont des profils différents par la suite, c'est-à-dire que la souche HG003 $\Delta sarA$ semble causer le nombre constant de morts tous les jours (entre 15 et 18%) alors que la souche sauvage semble présenter un second pic de mortalité au 4^{ème} jour post-infection.

3. Dénombrement intra-larvaire journalier

Pour aller plus loin dans l'analyse de la virulence des souches dans le modèle *Galleria mellonella*, nous avons suivi l'évolution journalière de la quantité intra-larvaire de *S. aureus*. Le microbiote de la larve est composé majoritairement de bactéries du genre *Enterococcus*, et les entérobactéries et les staphylocoques ne sont pas détectables au sein de la larve (Ménard et al., 2021a). Par conséquent les bactéries *S. aureus* dénombrées au cours de l'expérience proviendront uniquement de l'inoculum de départ.

Ainsi pour réaliser le dénombrement intra-larvaire, chaque jour deux larves étaient prises aléatoirement, désinfectées à l'alcool 70%, puis broyées dans une solution de PBS. Le broyage effectué par le piston d'une seringue permettait de bien homogénéiser le mix (**figure 97**). Ce mélange est alors dilué en cascade dans du PBS et 100 μ L de chaque dilution sont étalés sur un milieu non sélectif. En parallèle, des larves injectées avec du PBS ont servi de contrôle pour visualiser le microbiote de la larve et distinguer les colonies *S. aureus* sur les larves traitées. Les boîtes de dénombrement étaient souvent placées à 4°C quelques jours pour faire ressortir le pigment jaune spécifique des colonies de *S. aureus*.

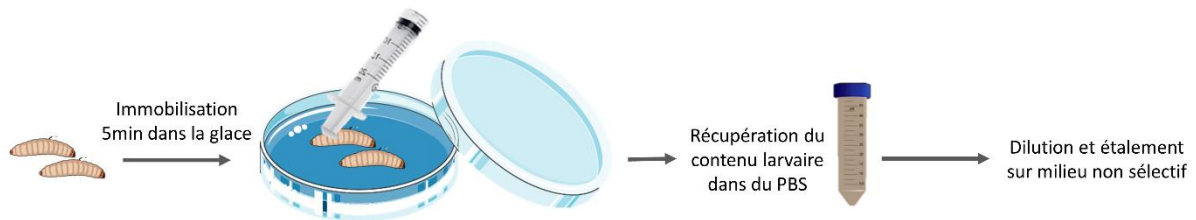


Figure 97 : Schéma des étapes expérimentales pour réaliser le dénombrement bactérien intra-larvaire de la larve à l'étalement sur gélose.

Sur la **figure 98**, nous pouvons suivre le dénombrement bactérien des souches HG003 et HG003 $\Delta sarA$ au cours du temps. Le dénombrement a été réalisé de J0, jour de l'infection jusqu'au 6^{ème} jour post-infection. Pendant les premières 24 heures, on observe que l'infection se met en place dans la larve car nous observons la plus grande augmentation d'UFC par larve (d'environ 2 log) pour les deux souches. Ensuite la quantité de bactéries présentes dans la larve se maintient entre 10^6 et 10^7 UFC/mL. Ce résultat indique que la capacité à survivre et à proliférer dans la larve est identique pour les deux souches au cours du temps.

A l'inverse de la mortalité relative, la souche HG003 semble se maintenir de manière constante dans la larve alors que pour la souche HG003 $\Delta sarA$, une quantité de bactéries plus importante est mesurée aux jours J2 et J4 post-infection.

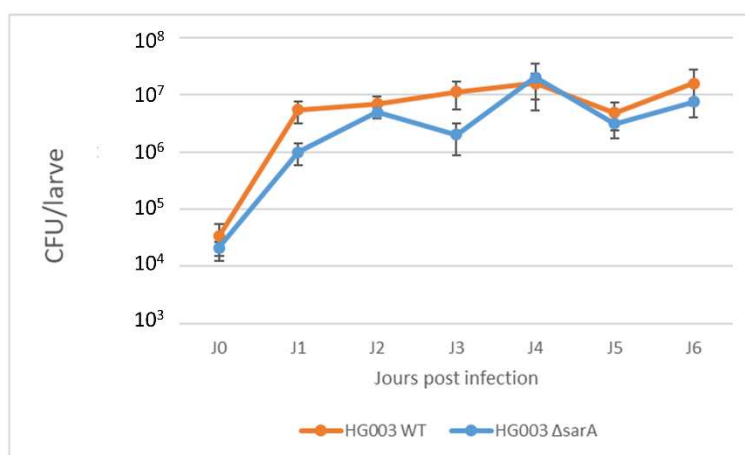


Figure 98 : Dénombrement bactérien intra-larvaire journaliers des souches HG003 et HG003 Δ sarA. Expérience réalisée en triplicat, les barres verticales représentent les écart-types.

Cependant, le suivi de mortalité et le dénombrement bactérien intra-larvaire ne révèlent pas de différence importante entre les deux souches, elles semblent se comporter de manière similaire dans la larve au cours de l'infection.

Nous avons été surpris par ce résultat, car SarA est impliquée dans la régulation d'une centaine de gènes liés à de multiples fonctions cellulaires chez *S. aureus*. Son absence engendre l'expression de nombreux facteurs de virulence comme par exemple des protéases (Shaw et al., 2004). Nos résultats semblent indiquer que lors d'une infection avec 10^6 bactéries dans la larve *Galleria mellonella*, l'absence de SarA n'entraîne pas de différence de mortalité au cours des 6 jours post-infection. Les fonctions exprimées dans la souche délétée du gène *sarA* ne semblent pas donner d'avantages à cette dernière au cours de l'infection. Cela étant, il pourrait être intéressant de travailler avec des inoculums différents et/ou avec des durées d'infections différentes.

Dans tous les cas, en ayant manipulé le modèle, nous sommes maintenant en mesure de tester d'autres souches et notamment des mutants des gènes sARNs régulés par SarA. Ainsi, nous pourrions voir si certains d'entre eux possèdent une fonction cruciale lors de l'infection, en effet avec ce modèle, le criblage de mutants paraît beaucoup plus facile à mener. Récemment, Ménard et al ont initié l'étude des sARNs chez *G. mellonella* infectée à *S. aureus*, et ils ont pu identifier que les quantités des ARNregs SprD et SprC augmentent au cours de l'infection (Ménard et al., 2021b). De plus, ils ont montré qu'il était possible de travailler avec des souches de *S. aureus* portant des plasmides et malgré l'absence de pression de sélection, ces derniers ont été maintenus tout au long de l'expérience. De ce fait, nous pourrions plus rapidement associer un phénotype lié à l'absence ou à la surexpression d'un sARN.

Partie 3 : Etudes des cibles sARN de SarA

Les deux premières cibles de SarA étudiées au sein du laboratoire sont les sARNs *Srn_3610_SprC* et *Srn_9340*, qui sont localisés dans le même îlot de pathogénie vSaβ. Ces deux gènes possèdent une forte similarité de séquences au niveau de leur promoteur (Mauro *et al.*, 2016), ce qui laisse penser à une régulation potentiellement similaire donc à une fonction proche. Ces deux gènes sont très peu exprimés dans la souche HG003 alors que dans la souche HG003 $\Delta sarA$, une grande quantité d'ARN est détectée. Le doctorant précédent Tony Mauro a tenté de mettre en évidence les signaux de dérèpression, c'est-à-dire les signaux permettant la levée de répression par SarA de ces deux gènes sARNs. Il a pu mettre en évidence avec un système de gène rapporteur GFP que les promoteurs de ces deux gènes étaient plus actifs lors d'un stress de type autolyse (triton), qu'en condition classique de culture (Thèse Tony Mauro, 2017) De plus, il a étudié la présence de ces deux gènes dans différentes souches de *S. aureus*, et mis en évidence que toutes les combinaisons sont possibles : les deux peuvent être présents, l'un ou l'autre ou les deux absents. Par conséquent la présence d'un des deux gènes ne conditionne pas la présence du second, leur présence semble indépendante l'une de l'autre.

Différents rôles ont été mis en évidence pour *SprC*, il permet à la fois capable de réprimer la traduction de l'autolysine *Atl*, impliquée dans la phagocytose mais également est caractérisé comme un atténuateur de la virulence dans un modèle murin (Le Pabic *et al.*, 2015). Néanmoins, la fonction de l'ARN *Srn_9340* reste encore à découvrir. Aucun phénotype n'a été pour l'instant associé à la délétion du gène *srn_9340*. C'est pourquoi, dans cette prochaine partie nous allons décrire des expériences qui ont pour objectif de permettre une meilleure caractérisation du rôle des sARNs *SprC* et *Srn_9340* régulés par SarA chez *S. aureus*.

Chapitre 1 : *SprC* et *Srn_9340*

1. Recherche de cibles et phénotype pour l'ARN *Srn_9340*

Pour avoir une première idée des potentielles cibles d'un sARN, une analyse protéomique classique permet de faire un premier criblage des protéines présentes ou non chez une souche mutante ou surexprimant le sARN cible. Cette approche avait été utilisée pour *SprC*, où la protéine Autolysine *Atl* était majoritairement présente dans le mutant Newman $\Delta sprC$ (Le Pabic *et al.*, 2015). Cette approche a donc été utilisée pour tenter d'élucider la fonction de *Srn_9340* chez *S. aureus*. De plus, nous savons que l'ARN *Srn_9340* est 8 fois plus présent dans un contexte génétique HG003 $\Delta sarA$, donc sa dérèpression après le décrochage de SarA du promoteur du gène *srn_9340* a un instant donné permettrait de libérer une grande quantité de cet ARN pour qu'il exerce sa fonction.

1.1. Protéomique

Dans le but de découvrir les cibles protéiques de *Srn_9340*, une analyse protéomique avait été initiée en deux temps avant mon arrivée au laboratoire. Tout d'abord, les protéines présentes dans les souches

HG003 + pCN36 et HG003 + pCN36- P_{veg} -*srn_9340* (surexpression de *srn_9340*) ont été comparées. Le promoteur P_{veg} est un promoteur de *Bacillus subtilis* (Lam et al., 1998), qui permet une surexpression constante du gène cible car il n'est pas soumis aux régulations internes chez *S. aureus* (comme SarA). Cette première analyse protéomique n'avait pas révélé de différences significatives, alors mes prédécesseurs avaient alors décidé de comparer la souche HG003 Δsrn_9340 construite au laboratoire et la souche de surexpression. Pour cela, les contenus protéiques des souches HG003 Δsrn_9340 + pCN36 et HG003 Δsrn_9340 + pCN36- P_{veg} -*srn_9340* ont été identifiés. Cette seconde analyse protéomique n'avait pas révélé de différence majeure entre ces deux souches. Pour autant, en croisant les deux analyses, des différences importantes étaient révélées mais ne semblaient pas en lien avec la présence ou l'absence de *srn_9340*.

Par la suite, à mon arrivée au laboratoire nous avons réalisé des antibiogrammes avec les souches : HG003, HG003 Δsrn_9340 construite au laboratoire, et les souches HG003 Δsrn_9340 + pCN38 et HG003 Δsrn_9340 + pCN38- P_{veg} -*srn_9340* (**figure 99**). Ces antibiogrammes ont révélé un profil atypique du mutant HG003 Δsrn_9340 . Cela nous a encouragé à réaliser un séquençage rapide de la souche mutante, qui nous a indiqué que le profil génétique de notre souche se rapprochait de la souche N315. Cette dernière est naturellement résistante à l'érythromycine et dépourvue du gène *srn_9340* et se caractérise par sa couleur de colonie blanche. Cette souche a donc probablement été sélectionnée malencontreusement lors de la création de la souche mutante.

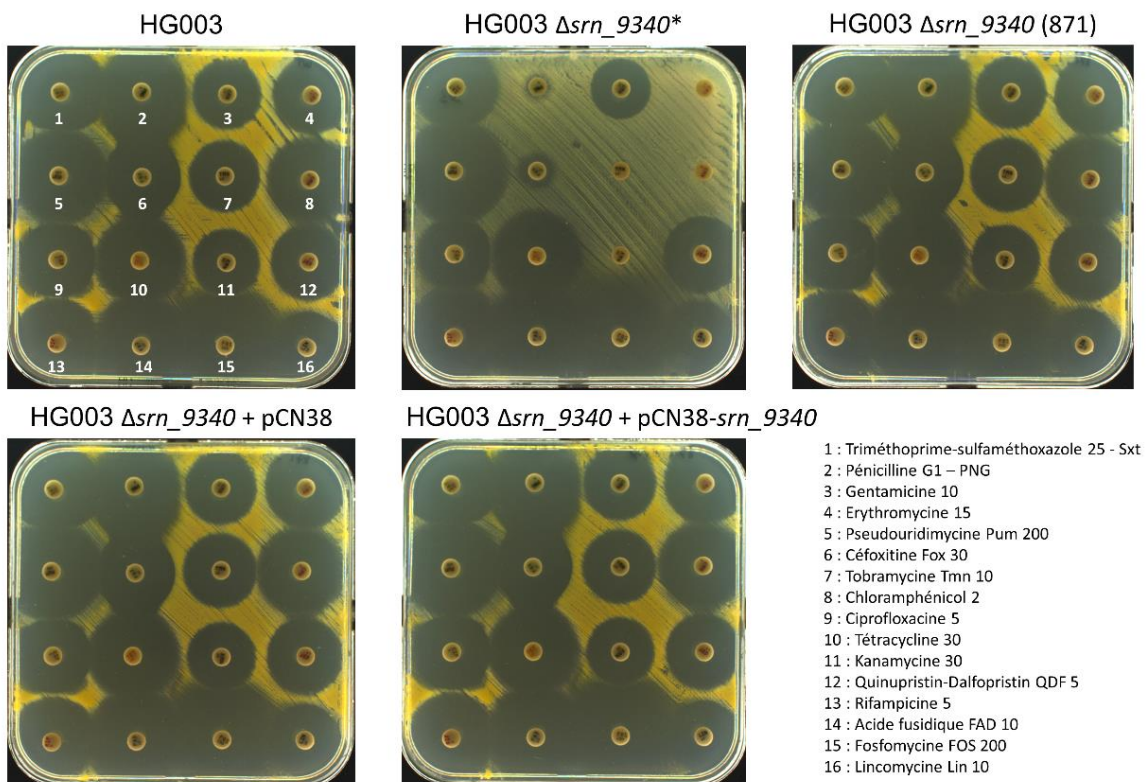


Figure 99 : Antibiogrammes. Souches : HG003, HG003 Δsrn_9340^* réalisé au laboratoire, HG003 Δsrn_9340 de la banque de P. Bouloc (871), HG003 Δsrn_9340 (871) + pCN38 et HG003 Δsrn_9340 (871) + pCN38-*srn_9340*. Les antibiotiques utilisés sont exprimés en mg/L.

Par conséquent, la deuxième analyse protéomique avait été réalisée avec la souche N315 et non HG003 Δsm_{9340} et c'est pourquoi la comparaison entre les deux analyses protéomiques montrait autant de différences sans lien avec la présence de sm_{9340} . De plus, la surexpression du sARN dans des conditions inhabituelles est inefficace pour découvrir les cibles régulées par ce dernier en raison de son absence naturelle dans la souche.

En parallèle, nous avons récupéré les mutants de la banque de Philippe Bouloc, 3 clones du mutant HG003 Δsm_{9340} contenant 3 barcodes différents (Le Lam et al., 2017). Ces mutants ont été transformés avec les plasmides pCN38 vide et le plasmide de complémentation pCN38- sm_{9340} . Les antibiogrammes réalisés avec les souches HG003 Δsm_{9340} + pCN38 et HG003 Δsm_{9340} + pCN38- sm_{9340} ne montrent pas de profil différent par rapport à la souche HG003 (**figure 99**). A partir d'ici, toutes les expériences avec le mutant HG003 Δsm_{9340} sont réalisées avec la souche HG003 Δsm_{9340} de Philippe Bouloc.

Pour mettre en évidence des cibles de sARNs, plusieurs techniques sont maintenant disponibles notamment des techniques d'appât-proie qui mettent en lumière en interaction ARN-ARN ou ARN-protéines (MAPS, GRIL-Seq etc) (Desgranges et al., 2020). Ces techniques peuvent être plus ou moins longues à mettre en place, c'est pourquoi avant de se lancer dans ces techniques, il est nécessaire de trouver le moment où l'expression du sARN est induite. Cette information clé est nécessaire pour pouvoir élucider la fonction d'un sARN. De plus, il est connu que l'expression des ARN régulateurs intervient à un moment spécifique, et peut être très furtive dans le temps. Parfois les analyses *in silico* peuvent révéler des cibles potentielles, et donc donner des pistes de fonction pour le sARN étudié.

1.2. Etude du sARN Srn_{9340} *in silico*

a) Recherche de cibles *in silico*

❖ Outils bio-informatiques disponibles

Pour mettre en évidence, les cibles ARN potentielles d'un ARN régulateur *in silico*, trois logiciels sont couramment utilisés : CopraRNA, RNAPredator et TargetRNA2 (Wright et al., 2014) (Eggenhofer et al., 2011) (Kery et al., 2014). Ces logiciels recherchent des interactions fortes entre la séquence d'un ARN régulateur et d'un ARN messager. Le logiciel nous donne une liste de cibles potentielles classées selon leur énergie d'hybridation de l'interaction ARN-ARN, la valeur statistique p-value et enfin la fonction connue de la cible désignée.

Pour le logiciel CopraRNA, nous avons besoin de travailler avec trois souches de *S. aureus*, nous avons fait le choix de prendre les souches : NCTC8325 (la souche la plus proche de HG003), Newman et USA300. Ces souches sont présentes dans la banque de données SRD ce qui permet de connaître les coordonnées génomiques des sARNs (Sassi et al., 2015). De plus, elles sont également répertoriées dans la base de données des gènes de *S. aureus* (Auréowiki) (Fuchs et al., 2018). Les deux autres souches présentes dans la banque

SRD possèdent des particularités : soit le gène *sprC* est absent comme c'est le cas pour la souche JKD6008 ou soit le gène *srn_9340* est absent comme précédemment indiqué pour la souche N315. Nous avons donc fait le choix de mettre de côté ces deux souches pour étudier les cibles de *Srn_9340*.

Avec CopraRNA, les critères de recherche sont modifiables, c'est pourquoi nous avons fait le choix de rechercher des zones d'interaction entre -50/+250 par rapport au codon d'initiation de la traduction. Les interactions ARNreg et ARNm ont souvent lieu dans la région RBS ce qui peut conduire à un arrêt ou une activation de la traduction de la cible (**figure 40**).

Pour le logiciel RNAPredator, les interactions sont recherchées jusqu'aux régions 5'UTR et 3'UTR lesquelles ont une taille définie de 200 nt. Enfin, le logiciel targetRNA2 recherche des interactions 80 nt en amont du codon d'initiation et 20 nt en aval. La taille des interactions peut varier en fonction des logiciels.

❖ Cibles potentielles

Nous avons donc interrogé les trois logiciels pour tenter de mettre en évidence des cibles potentielle du sARN *Srn_9340*. Les séquences utilisées sont listées dans le **tableau 23 en annexe**. L'ARN de la souche NCTC8325 possède quelques nucléotides supplémentaires en 5' car son +1 de transcription a été déterminé expérimentalement (Mauro *et al.*, 2016). Les séquences des deux souches Newman et USA300 sont issues de la base de données SRD, elles seraient à valider de manière expérimentale également.

Les cibles communes ressorties dans plusieurs analyses sont regroupées dans le **tableau 12**. Elles sont classées selon leur énergie d'hybridation entre l'ARN *Srn_9340* et l'ARNm de la cible, associée avec une p-value données par le logiciel CopraRNA. Plus l'énergie est faible, plus la force d'hybridation est grande. Le rang des cibles par logiciel est indiqué entre parenthèse.

Nom	Energie d'hybridation	p-value	CopraRNA	RNApredator	TargetRNA2
SAOUHSC_01953 (<i>epiA</i>)	-21 kcal/mol	1,38e-06	x (1 ^{er})	x (2 ^{ème})	-
SAOUHSC_01424 (<i>murG</i>)	-18 kcal/mol	1,88e-05	x (3 ^{ème})	x (3 ^{ème})	-
SAOUHSC_00237	-16 kcal/mol	2e-3	x (14 ^{ème})	x (11 ^{ème})	x (1 ^{er})
SAOUHSC_00412 (<i>mpsA</i>)	-16 kcal/mol	9,23e-06	x (2 ^{ème})	-	x (3 ^{ème})

Tableau 12 : Regroupement de cibles potentielles de *Srn_9340* en comparant les trois analyses *in silico*.

➤ SAOUHSC_01953 - *epiA*

L'ARNm *epiA* semble le meilleur candidat, ce gène se situe dans le même flot de pathogénie et à proximité du gène *srn_9340*. Le gène *epiA* fait partie d'un opéron regroupant les gènes *epiABCD-P-GEF*

(Fuchs et al., 2018). L'expression de ces gènes semble permettre la production d'un lantibiotique, l'Épidermine. Les lantibiotiques sont des peptides antimicrobiens synthétisés par les bactéries à Gram positif par la machinerie ribosomale contenant des acides aminés atypiques, comme par exemple la Nisine A (Draper et al., 2015). L'épidermine est connue pour être produit par *Staphylococcus epidermidis* Tü 3298 (Bonelli et al., 2006) et inhibe la synthèse du peptidoglycane par la formation de pores en se fixant au lipide II (précurseur de la synthèse de la paroi) (Brötz et al., 1998). Ainsi les gènes *epiABCD* sont responsables de la production de l'épidermine, et les gènes *epiGEF* codent le mécanisme de protection contre ce lantibiotique. L'interaction entre les ARN Srn_9340 et l'ARNm *epiA* a lieu à la fin de l'ARNm *epiA*. Le logiciel IntaRNA montre un appariement parfait entre les deux séquences ARN (**figure 100A**). Cet appariement pourrait libérer l'accès au ribosome pour le gène *epiB* ou recruterait des RNases pour dégrader le complexe ARN (**figure 100B**).

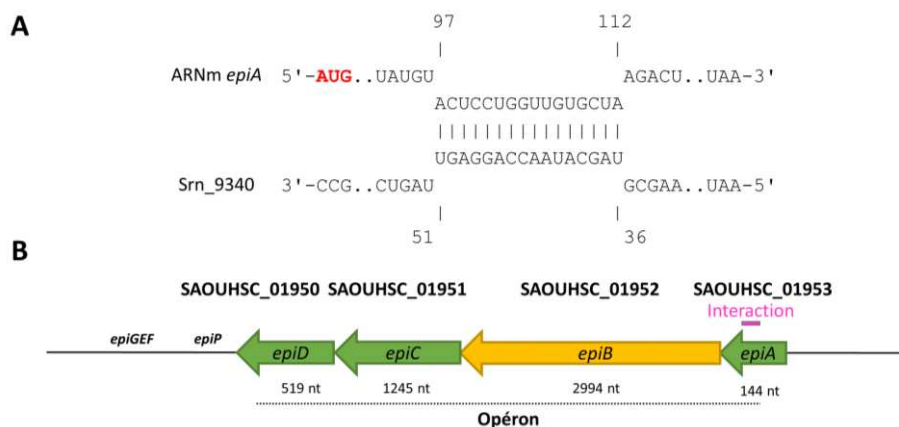


Figure 100 : Interaction ARN-ARN Srn_9340 – ARNm *epiA*. (A) Interaction par le logiciel IntaRNA (Wright et al., 2014). (B) Localisation de la zone d'interactions sur l'opéron *epi*.

Cela étant, dans toutes les données RNA-Seq disponibles au laboratoire (souches classiques et souches cliniques) comme dans la littérature, ces gènes ne semblent pas être exprimés chez *S. aureus* contrairement à leurs gènes voisins *epiGEF*, qui semblent être activés en présence de SarA (**tableau 21 en annexe**). De plus, le gène *epiE* (SAOUHSC_01947) a montré être fortement activé par le facteur σ^B (Bischoff, 2004). L'opéron *epiGEF* code le transporteur qui permet de la protection contre le lantibiotique produit par EpiABCD (**figure 100B**).

Nous aurions pu tenter la validation *in vitro* de l'interaction Srn_9340 avec l'ARNm *epiA*, cependant nous avons donc fait le choix de ne pas aller plus loin dans la caractérisation de cette cible car nous n'avions pas de certitudes sur la fonctionnalité de cet opéron à produire l'épidermine chez *S. aureus*.

➤ SAOUHSC_01424 - *murG*

L'ARNm *murG* est ressorti dans les analyses CopraRNA et RNApredator (**tableau 12**). MurG est une muréine hydrolase localisée à la membrane, impliquée dans la synthèse de la paroi, essentielle chez *S. aureus* (Jarick et al., 2018). Cette enzyme a été identifiée comme une N-acétylglucosamine transférase et catalyse l'étape irréversible essentielle de la synthèse du peptidoglycane qui permet de produire du lipide II.

Des inhibiteurs de MurG ont déjà été étudiés mais pourraient présenter une certaine toxicité (Liu et Breukink, 2016).

L'interaction entre les ARN Srn_9340 et l'ARNm *murG* a lieu au début de l'ARN *murG*. Le logiciel IntaRNA montre un appariement parfait entre les deux séquences ARN sauf sur les 3 nucléotides au centre de l'interaction (**figure 101A**). Cet appariement pourrait uniquement favoriser la production de MurG en libérant l'accès au ribosome comme cette protéine est essentielle pour la croissance de la bactérie (**figure 101B**).

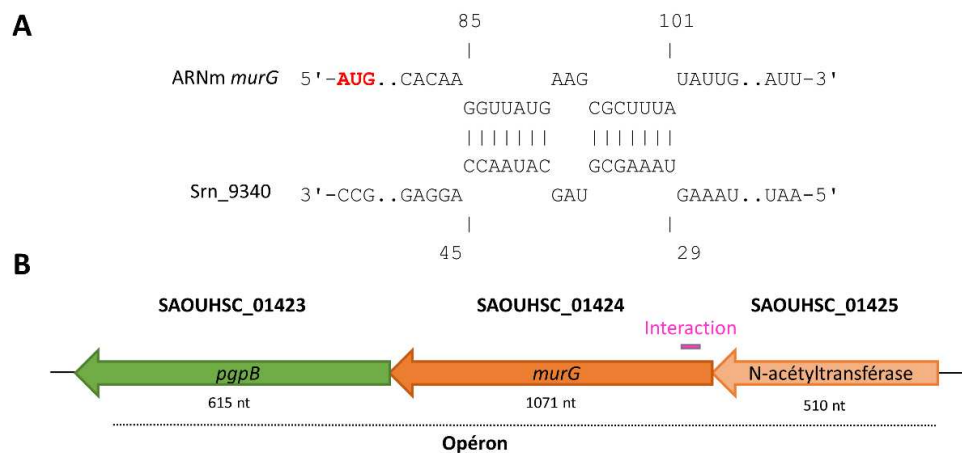


Figure 101 : Interaction ARN-ARN Srn_9340 – ARNm *murG*. (A) Interaction par le logiciel IntaRNA (Wright et al., 2014). (B) Localisation de la zone d'interactions sur l'opéron.

➤ SAOUHSC_00237

Cette cible SAOUHSC_00237 a été mise en évidence dans les 3 logiciels de prédiction : TargetRNA2 (1^{er}), RNAPredator (11^{ème}) et CopraRNA (14^{ème}) (**tableau 12**). Ce gène code une enzyme CHP, une méthyltransférase SAM-dépendante, dont l'expression est contrôlée par le régulateur de réponse ArlR et est moins exprimé au sein du biofilm (Beenken, 2004) (Ouyang et al., 2019). Les méthyltransférases peuvent être impliquées dans la biosynthèse de l'ubiquinone/ménaquinone. Ces deux éléments sont essentiels au transport des électrons chez *S. aureus*, processus principal impacté chez les SCV (Kahl et al., 2016).

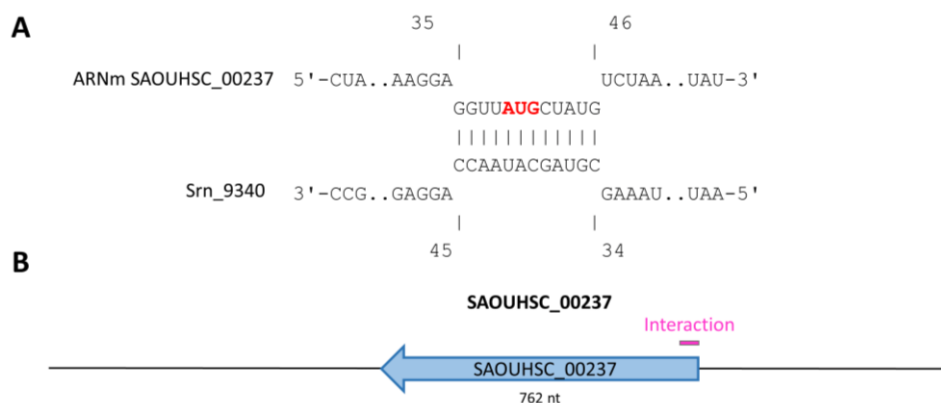


Figure 102 : Interaction ARN-ARN Srn_9340 – ARNm SAOUHSC_00237. (A) Interaction par le logiciel IntaRNA (Wright et al., 2014). (B) Localisation de la zone d'interactions sur l'opéron.

complexe ARN/ARN. Cette interaction sera confirmée en localisant la zone de fixation par des mutations ponctuelles sur l'ARN.

Par ailleurs, si *Srn_9340* a toutes les caractéristiques d'un sARN (Liu et al., 2018), sa demi-vie semble assez faible (5min dans la souche *S. aureus* Newman – Mauro et al., 2016), mais cette demi-vie pourrait être augmentée grâce à la fixation ARN-ARN avec sa cible ou compensée par une forte augmentation de son expression en cas de décrochage de *SarA* de sa région promotrice. Tant que nous ne connaissons pas le signal permettant la levée de répression de ce gène, nous ne pouvons pas poursuivre l'étude de ces cibles ARNm potentielles.

Cependant, les deux premières cibles (*epiA* et *murG*) semblent liées par la présence du lipide II, précurseur de la synthèse de la paroi. Si *Srn_9340* est exprimé lors d'un stress à la paroi, alors il pourrait favoriser la production de lipide II via *MurG* et donc le renouvellement de la paroi. Néanmoins, le lipide II permet au lantibiotique de se fixer pour former des pores, donc la production de l'épidermine favorisé ou non par la présence de *Srn_9340* pourrait induire la mort d'une partie de la population n'exprimant pas le système de défense *EpiGEF*.

Enfin, deux cibles (*SAOUHSC_00237* et *SAOUHSC_00412*) semblent impliquées dans la formation de SCV chez *S. aureus*, par conséquent les régulations de ces cibles par *Srn_9340* pourraient jouer un rôle dans ce phénotype particulier, et pourraient expliquer pourquoi nous n'arrivons pas à déterminer de condition de culture permettant une forte expression de *Srn_9340*.

1.3. Stress d'autolyse au triton

SprC et *Srn_9340* semblent reliés de plusieurs manières, ils sont situés à proximité dans le même îlot de pathogénie, leur région promotrice est très similaire et enfin leur expression est fortement réprimée par *SarA*. *SprC* régule la production de l'autolysine chez *S. aureus* mais aucune cible n'a été démontré pour *Srn_9340*, même si deux cibles prédites *in silico* semblent liées au renouvellement de la paroi (*MurG* et *EpiA*). Cependant, les promoteurs de ces deux gènes semblent plus actifs lors d'un stress de type autolyse (triton), qu'en condition classique de culture (Mauro, 2017). Le triton X-100 agit comme un détergent sur les membranes et va les déstructurer, causant la mort de la bactérie. En concentration sub-inhibitrice, le triton va mimer un stress d'autolyse pour la bactérie. Il nous a donc semblé intéressant d'aller étudier le comportement du mutant HG003 $\Delta sarA$, pour le contexte de surexpression de deux gènes sARNs et du mutant HG003 Δsrn_9340 lors d'un stress autolyse.

Pour mener cette expérience, nous sommes partis de deux protocoles publiés pour tester la capacité de résistance à un stress d'autolyse des différentes souches (Manna et al., 2004) (Dubrac et al., 2007). Brièvement, à partir de culture de nuit en milieu TSB, les cultures sont diluées à une DO_{600nm} de 0,05 et sont cultivées à 37°C jusqu'à une DO_{600nm} égale à 1. Les cellules sont centrifugées et les culots sont lavés et resuspendus dans du PBS supplémenté ou non en triton X-100 0,1%. Les cultures sont incubées à 30°C et la turbidité du milieu (DO_{600nm}) est mesurée toutes les 30 min pendant 3h.

En culture dans du PBS, 70% des bactéries survivent au bout de 3 heures, alors que celles traitées au triton affichent un taux de survie de 30% (**figure 104**). Les souches HG003 et HG003 Δsrn_{9340} survivent de manière similaire à un stress de type autolyse au cours du temps. L'absence de *srn_{9340}* ne semble pas impacter la survie des bactéries dans ces conditions.

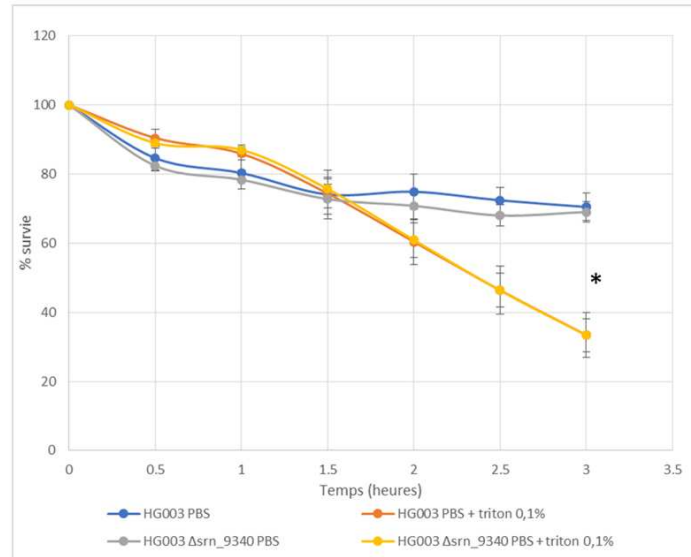


Figure 104 : Taux de survie des souches HG003 et HG003 Δsrn_{9340} en présence de triton X-100 0,1%. 5 réplicats ont été réalisés, les barres verticales représentent les écart-types, et analyse statistique avec le test Mann-Whitney * = p-value < 0,05.

Néanmoins quand nous testons ces souches en comparaison avec la souche HG003 $\Delta sarA$, nous observons que cette dernière est moins capable de résister à ce stress d'autolyse, nous obtenons 20% de survie contre 50% pour les souches HG003 et HG003 Δsrn_{9340} (**figure 105**). Cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois, elle mériterait à être répétée afin de confirmer que le stress d'autolyse entraîne une diminution de survie de la souche HG003 $\Delta sarA$.

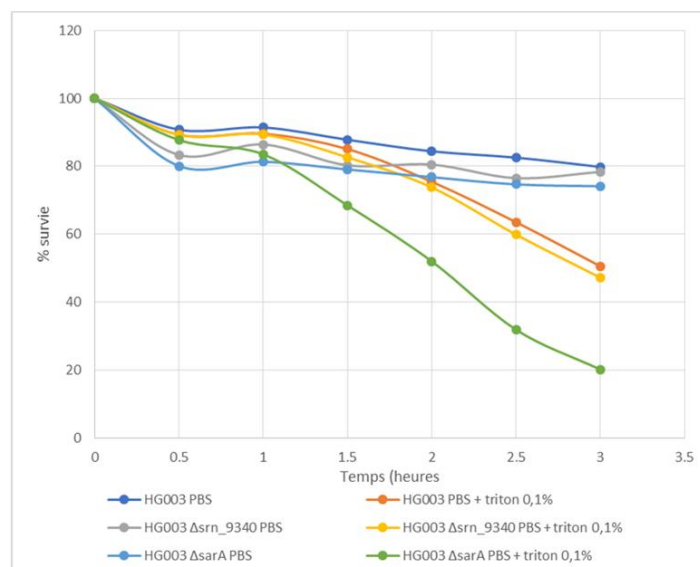


Figure 105 : Taux de survie des souches HG003, HG003 $\Delta sarA$ et HG003 Δsrn_{9340} en présence de triton X-100 0,1%. Un seul réplicat réalisé.

Cette observation reste en accord avec le fait que SarA doit jouer un rôle clé lors d'un stress d'autolyse, comme sa quantité augmente fortement dans la bactérie (Cordwell *et al.*, 2002). De plus, l'absence de *srn_9340* n'aurait pas d'impact sur la résistance au stress autolyse chez *S. aureus*. Il resterait également à contrôler qu'un mutant délété du gène *sprC*, soit moins capable de résister à un stress d'autolyse, dû à la production de l'autolysine Atl.

Pour investiguer si dans la souche HG003 $\Delta sarA$, la forte quantité de SprC et Srn_9340 influence la capacité de *S. aureus* à survivre à ce stress, il faudrait vérifier que la surexpression de ces deux gènes soit néfaste pour la bactérie, en introduisant des plasmides permettant la surexpression de ces deux derniers chez la souche HG003 pour confirmer cette hypothèse.

1.4. Biofilms

S. aureus est connu pour sa capacité à former des biofilms, notamment sur les implants et les cathéters posés chez l'Homme (Snowden *et al.*, 2013). Ces structures mono ou pluri-bactériennes posent un vrai problème en terme de traitement, car la plupart du temps les traitements antibiotiques ne pénètrent pas au cœur du biofilm, ce qui favorise les infections chroniques difficiles à traiter (Rowe *et al.*, 2021). SarA est un régulateur majeur dans la formation de biofilm, car ce FT régule l'opéron *icaADBC* qui permet la synthèse de PIA formant la matrice extracellulaire du biofilm. Il a été montré dans de nombreuses études qu'un mutant $\Delta sarA$ est moins apte à former des biofilms dans des milieux contenant du glucose et du NaCl (Beenken, 2004) alors qu'il forme plus de biofilm seulement en présence de glucose chez *S. epidermidis* (Christner *et al.*, 2012). Ces différences de phénotypes sont à relier avec les différents types de biofilms formés par *S. aureus* qui, en fonction du milieu, peuvent être de type sucres ou de type protéines.

Pour prendre en main la technique de formation de biofilm avec ce pathogène, nous avons voulu répéter ces résultats et ainsi mettre au point cette technique au sein du laboratoire. En effet, par rapport à des modèles à Gram négatif, le Staphylocoque est plus capricieux pour former des biofilms en laboratoire.

De manière générale, nous avons préparé nos inoculums bactériens à une DO_{600nm} égale à 0,1 à partir d'une culture de nuit en TSB supplémenté en glucose 0,5%. Dans une microplaque, nous avons inoculé nos différentes souches dans différents milieux et incubé la plaque à 37°C sans agitation pendant 22h. Le lendemain, après plusieurs lavages nous avons coloré les biofilms à l'aide de deux types de colorants : du Cristal violet 0,1% ou de la Safranine à 0,1% et mesuré la DO finale par puits. Nous partons du postulat que la densité optique est proportionnelle au biofilm formé par les bactéries. En parallèle, nous avons pris la DO_{600nm} correspondant à la croissance bactérienne du biofilm avant coloration à titre informative mais cela n'a pas changé la tendance des résultats.

Dans un premier temps, nous avons testé la capacité des souches : HG003, HG003 $\Delta sarA$, HG003 $\Delta sarA/sarA$ complémentée au génome, HG003 $\Delta sprC$, et HG003 Δsm_9340 . Les trois premières souches servent de contrôle pour la formation de biofilm, en effet le mutant HG003 $\Delta sarA$ devrait former moins de biofilm que les deux autres souches (Valle *et al.*, 2003). Ces contrôles permettront de comparer les mutants des gènes sARNs pour leur capacité à former du biofilm.

Nous nous sommes intéressés aux mutants HG003 $\Delta sprC$, et HG003 Δsmn_9340 , car SarA réprime l'expression de ces deux gènes sARNs, qui ont une forte similarité de séquences promotrices ce qui laisser à penser à une régulation spatio-temporelle similaire. Comme SarA est fortement liée au biofilm, nous nous sommes demandés si ces deux sARNs pouvaient intervenir dans la formation du biofilm. En effet, on sait que SprC régule la production de l'autolysine Atl (Le Pabic et al., 2015), et que cette dernière peut avoir un rôle dans les étapes précoces d'attachement du biofilm (Raafat et al., 2019). Il devenait très intéressant de regarder si l'absence de *sprC* modifiait la capacité de *S. aureus* à former du biofilm.

Nous avons testé trois types de milieux : TSB, TSB supplémenté en glucose 0,5%, avec ou non NaCl 2,5% ou Ethanol 8% (Kim et al., 2016). Chez le genre Staphylocoque, il a été montré qu'un milieu TSB supplémenté en NaCl (3%) induit un biofilm type « sucre » avec la synthèse de PIA par l'opéron *ica*, alors qu'un milieu supplémenté en glucose (0,5%) induit plutôt un biofilm type « protéines » avec les protéines FnBP (Formosa-Dague et al., 2016).

De plus, la présence de NaCl ou Ethanol induit la formation de biofilm en réprimant l'expression du gène *icaR* qui code le répresseur de l'opéron *icaADBC* (**figure 106**). Cette répression peut passer par le facteur SigB, lequel peut activer un répresseur de l'expression de *icaR*, ou par l'activation de SarA, qui va directement induire l'expression de l'opéron *icaADBC* qui produit les PIA, molécules de la matrice extracellulaire du biofilm.

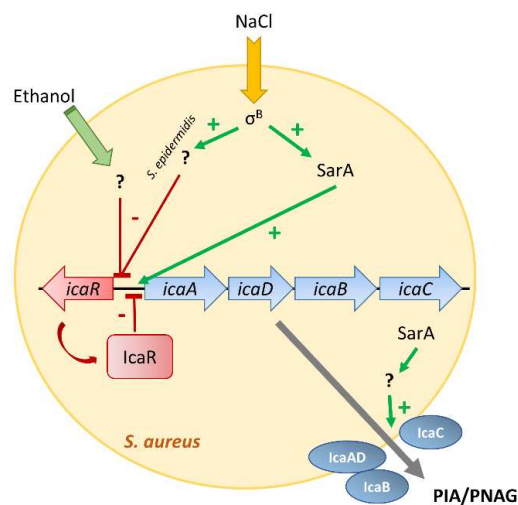


Figure 106 : Réseaux de régulation de l'opéron *icaADBC* par différents signaux extracellulaires (adapté de O'Gara, 2007). σ^B : facteur Sigma^B ; IcaR est le répresseur de l'opéron *icaADBC* qui permet la production de PIA/PNAG.

Les résultats les plus représentatifs seront présentés dans cette partie. A la **figure 107**, en condition TSB supplémenté en glucose 0,5%, les cinq souches semblent avoir la même capacité de formation de biofilm. Néanmoins, l'ajout d'éthanol à 8% affecte les souches de manière différente. En effet, les souches HG003 $\Delta sarA$ et HG003 $\Delta sarA/sarA$ forment moins de biofilm que la souche sauvage HG003. Néanmoins les deux mutants HG003 $\Delta sprC$ et HG003 Δsmn_9340 sont aussi compétents que la souche sauvage pour former du biofilm dans ces conditions, ce qui indiquerait que l'absence de ces deux gènes sARNs n'impactent pas la formation du biofilm chez *S. aureus*.

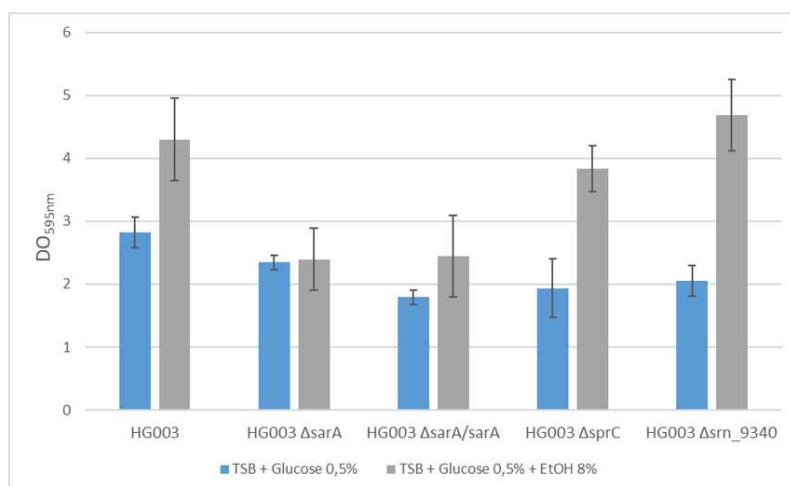


Figure 107 : Etude de la formation de biofilm par coloration au cristal violet chez différentes souches de HG003.

En parallèle, nous avons testé la coloration à la safranine pour déterminer de manière semi-quantitative la formation de biofilm chez les souches précédentes. A la **figure 108**, nous pouvons voir que la souche HG003 Δ sarA est la souche formant le moins de biofilm dans les trois conditions testées, ce qui reste en accord avec les données bibliographiques décrites ci-dessus. Cette fois-ci, la souche HG003 semble faire moins de biofilm dans la condition TSB glucose 0,5% supplémenté en éthanol 8% par rapport aux deux autres conditions. Enfin pour les trois autres souches : HG003 Δ sarA/sarA, HG003 Δ sprC, et HG003 Δ srn_9340, les différentes conditions de culture ne semblent pas avoir un impact sur leur formation de biofilm en microplaque. On peut noter que le mutant HG003 Δ srn_9340 semblerait faire plus de biofilm dans un milieu supplémenté en éthanol. Ces observations seraient à répéter plusieurs fois, car les variations entre les différents réplicats peuvent être très importantes.

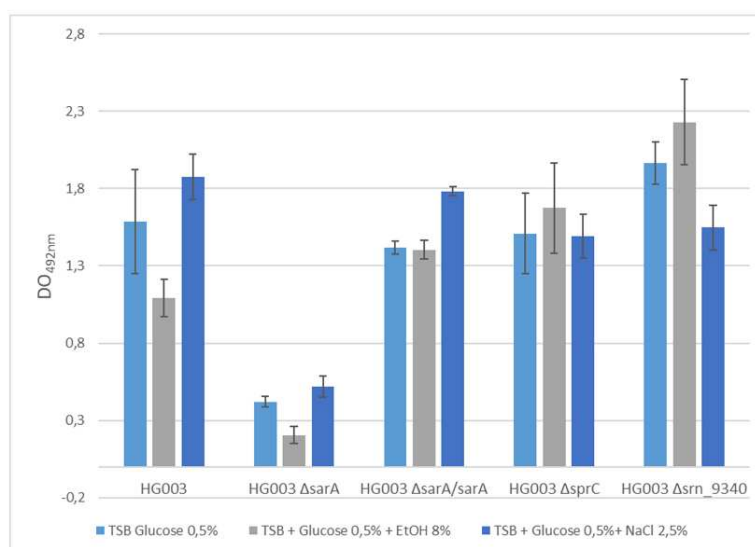


Figure 108 : Etude de la formation de biofilm par coloration à la safranine chez différentes souches de HG003.

Pour finir, nous avons également testé différentes conditions censées favoriser l'adhérence des bactéries au support, soit en laissant les cellules adhérentes 1h à 37°C et en changeant le milieu de culture dans les puits,

soit en réalisant une fixation au préalable avec du sérum (SBF) qui peut favoriser l'adhésion des cellules (Beenken et *al.*, 2003) Enfin nous avons testé différents types de plaques : des plaques à fond plat (Thermo Scientific) ou des plaques avec des puits en forme de U (Eppendorf) pour éviter que les colorants ne se fixent dans les coins des puits et ne soit pas représentative de la masse de biofilm formée.

Cette mise au point de formation de biofilm pourrait être utilisée par la suite, pour tester les phénotypes de différents mutants de sARNs, comme par exemples les systèmes TA de type I qui sont connus pour jouer un rôle dans l'entrée des cellules en persistance, lesquelles sont retrouvées au sein d'un biofilm de *S. aureus* (Nonin-Lecomte et *al.*, 2021).

Ces expériences nous ont permis d'introduire et de mettre au point la formation de biofilm chez *S. aureus*. Ces études préliminaires nous ont permis de reproduire qu'une souche délétée du gène *sarA* est moins capable de former de biofilm que sa souche parentale. Les mutants délétés des gènes sARNs, *sprC* et *srn_9340* ne semblent pas impactés dans leur capacité à former un biofilm dans les conditions testées. Ces résultats seraient à répéter pour ensuite aller plus loin dans la compréhension de la formation de biofilm chez ces mutants. En effet, nous pourrions vérifier la production de PIA/PNAG en déposant sur une membrane des extraits de biofilm. La présence de ces PNAG serait révélée avec un anticorps primaire anti-PNAG couplé à un anticorps secondaire permettant de doser la chimiluminescence émise (Lin et *al.*, 2015). De plus, nous pourrions tester la composition du biofilm des différentes souches en appliquant un traitement : (1) DNase pour voir si le biofilm est composé de beaucoup d'ADN extracellulaire pour maintenir sa structure ou (2) protéases pour mettre en évidence une matrice plutôt de type protéique (Moormeier et *al.*, 2014). Il a été montré que l'autolysine Atl joue un rôle essentiel dans la formation de biofilm adhérent à la fibronectine humaine (Houston et *al.*, 2011). Par conséquent le mutant HG003 Δ *sprC* produisant plus d'Atl, devrait faire plus de biofilm dans ces conditions.

Ces premières études phénotypiques nous ont permis d'étudier les sARNs *SprC* et *Srn_9340*, découverts au laboratoire il y a plusieurs années et dont l'expression est contrôlée par le FT *SarA*. Cependant, les signaux de régulation ou encore les cibles et phénotypes liés à l'ARN *Srn_9340* sont inconnus à l'heure actuelle.

2. Construction du double mutant HG003 Δ *sprC*/ Δ *srn_9340*

Pour tenter de mettre en évidence un phénotype plus robuste pour les sARNs *SprC* et *Srn_9340*, nous avons décidé de construire le double mutant dans la souche HG003. Les ARN régulateurs peuvent posséder une certaine redondance d'action, ce qui pourrait expliquer que parfois supprimer un seul ARN régulateur n'est pas suffisant pour faire ressortir un phénotype (Goldberger et *al.*, 2021). *sprC* et *srn_9340* possèdent des séquences promotrices similaires donc nous posons l'hypothèse que ces deux sARNs répondraient à des signaux identiques et agir sur une même voie métabolique et avoir donc un rôle fonctionnel commun.

Pour construire ce mutant nous sommes partis de la souche HG003 Δ *srn_9340* pour la transformer avec le plasmide thermosensible pBT2 (Brückner, 1997) contenant le gène de résistance à l'érythromycine entouré des régions flanquantes au gène *sprC* (Le Pabic et *al.*, 2015). L'obtention du mutant s'est faite en

deux temps avec une première étape d'intégration du plasmide devenu non répliatif à la température de 42°C puis la sélection de clones ayant éjectés ce dernier et recombines soit vers la copie sauvage de *sprC* (Clone Erythromycine^S) soit la version délétée de *sprC* (clone Erythromycine^R).

Plus précisément, les cultures et transformations s'effectuent à 28°C. Une fois le plasmide introduit dans la souche, nous passons la culture à 42°C ce qui permet de sélectionner l'intégration du plasmide thermosensible pBT2 au locus *sprC* lorsqu'elle a eu lieu. Les clones ayant intégré le plasmide sont sélectionnés sur milieu supplémenté en Erythromycine. Des répliques sur velours sont effectués pour rechercher les clones Erythromycine^R et Chloramphénicol^R. Les clones non intégrés meurent à 42°C en présence de Chloramphénicol et/ou d'Erythromycine. Plusieurs clones sont sélectionnés et passés à 28°C, ce qui va induire le deuxième événement de recombinaison homologue et donner soit le mutant HG003 $\Delta sprC$ ou le retour à la version sauvage. Les clones Erm^R Cm^S sont sélectionnés et testés par PCR sur colonie pour vérifier le génotype HG003 $\Delta sprC \Delta sm_{9340}$. Afin d'avoir un mutant propre, nous avons créé un stock de phages avec la souche HG003 $\Delta sprC \Delta sm_{9340}$ et transduit les phages dans une souche sauvage HG003 pour éviter d'éventuelles mutations après le passage à 42°C qui est un choc thermique pouvant causer des dommages à l'ADN.

Nous n'avons pas eu le temps de tester ce double mutant pour sa capacité à survivre à un stress d'autolyse ou encore sa capacité à former des biofilms. Cette partie devra être menée par la suite.

L'investigation de la fonction des sARNs *SrpC* et *Srn_9340* régulés par *SarA* chez *S. aureus* demande de mener de nouvelles analyses, en particulier pour tenter de trouver le signal permettant à *SarA* de se décrocher des régions promotrices pour permettre leur expression optimale.

Chapitre 2 : Systèmes toxine-antitoxine de type I

Dans la première partie du manuscrit, nous avons pu montrer que *SarA* est capable de réguler des systèmes toxine-antitoxine de type I avec d'un côté la répression de l'expression du gène *sm_{2230}_sprG2* codant la toxine et de l'autre l'expression du gène *sm_{4540}* codant l'antitoxine *SprA2_{AS}* (Oriol et al., 2021). De manière générale, les systèmes TA sont à l'équilibre avec l'ARN antitoxine qui se fixe sur l'ARN codant la toxine pour empêcher la production de la toxine. La production de la toxine peut causer l'entrée en bactériostase pour *SprG2* ou la mort intracellulaire pour *SprA2* chez *S. aureus* (Riffaud et al., 2019) (Germain-Amiot et al., 2019). Néanmoins, la régulation par un facteur de transcription semble nécessaire pour répondre à des requêtes qui restent à déterminer. Naturellement on peut donc se poser la question si *SarA* est capable de contrôler l'expression de ces systèmes en entier, c'est-à-dire en régulant à la fois la production de l'ARN antitoxine mais aussi de l'ARN codant la toxine. Enfin, on peut se demander si les régulations par *SarA* peuvent influencer la quantité de toxine produite, avec comme hypothèse qu'un mutant délétée du gène *sarA* produirait moins de toxine codée par *sprA2*, mais plus de toxines produites par *sprG2* (**figure 109**).

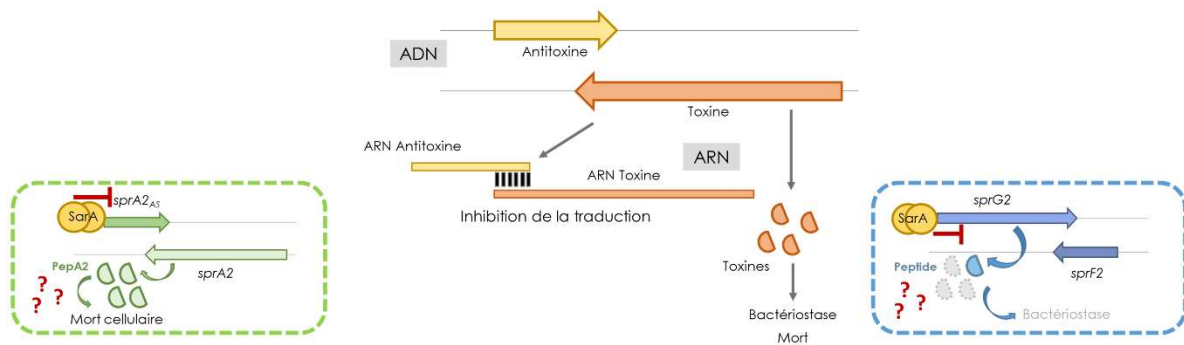


Figure 109 : Systèmes toxine-antitoxine de type I SprA2/SprA2_{AS} (à gauche) et SprG2/SprF2 (à droite) et régulations par SarA.

1. L'ensemble du système TA SprG2/SprF2 est-il régulé par SarA ?

1.1. Régulation de l'antitoxine SprF2 par SarA ?

Le gène *srn_2230_sprG2* exprimant un des sARNs les plus présents dans la souche HG003 $\Delta sarA$ (valeurs FPKM 40 000) (**tableau 20 en annexe**), et possède un pic de fixation de SarA en amont de son +1 de transcription avec une très faible p-value dans le ChIP-Seq. Nous avons par ailleurs montré précédemment que la fixation directe et spécifique de SarA sur la région promotrice de *srn_2230_sprG2* est responsable de sa répression transcriptionnelle.

Concernant l'antitoxine ARN codée par le gène *srn_2240_sprF2*, elle n'a été mise en évidence dans aucune des expériences. Dans le RNA-Seq, cet ARN est très peu présent par rapport à SprG2 (moyenne d'environ 100 FPKM) et aucune fixation de SarA n'a été retrouvée dans le ChIP-Seq. La présence de SarA semblerait donc être importante pour garder le système à l'équilibre, en contrôlant l'expression du gène *sprG2*.

Par Northern Blot, nous avons analysé les ARN contenus dans les souches HG003 et HG003 $\Delta sarA$ utilisée en RNA-Seq ainsi que ceux présents dans les souches HG003 et HG003 $\Delta sarA$ contenant les plasmides pCN36 et celui de complémentation pCN36-*sarA*. Nous pouvons voir sur la **figure 110** que l'ARN SprG2 est fortement présent dans les souches HG003 $\Delta sarA$ (puits n°2) et HG003 $\Delta sarA$ avec le pCN36 vide (puits n°5), et qu'il est très peu détecté dans les souches sauvages ou complémentées (puits n°1, 3, 4, 6). A l'inverse, l'ARN antitoxine SprF2 semble moins présent dans les souches HG003 $\Delta sarA$ (puits n°2 et 5). De même, plus la quantité de *sarA* est importante plus l'ARN SprF2 semble présent (puits n°4 et n°6).

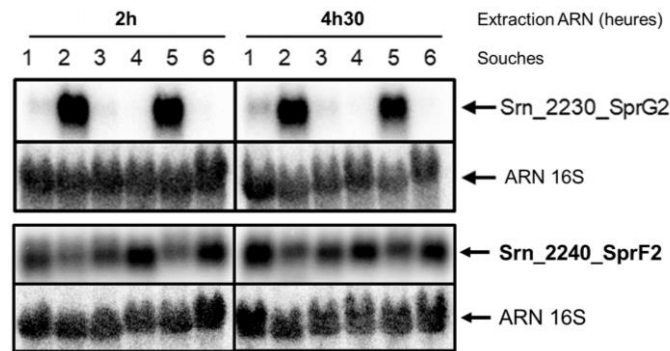


Figure 110 : Northern blot des ARN du système TA de type I SprG2/SprF2. Souches : (1) HG003, (2) HG003 $\Delta sarA$, (3) HG003 + pCN36, (4) HG003 + pCN36-*sarA*, (5) HG003 $\Delta sarA$ + pCN36 et (6) HG003 $\Delta sarA$ + pCN36-*sarA*. L'ARN16S sert de contrôle de dépôt. ARN extraits après 2h et 4h30 de culture en milieu TSB.

Ces deux gènes sembleraient avoir un comportement opposé en absence de *sarA* : avec un ARN SprG2 présent en forte quantité à l'inverse de la faible quantité de SprF2 présente (**figure 110**). Par conséquent, le système TA ne serait plus à l'équilibre en absence de *sarA*. En effet, l'antitoxine SprF2 est proportionnellement moins présente et ne pourrait pas empêcher la traduction de la toxine codée par l'ARN SprG2.

Pour autant dans les conditions expérimentales utilisées ici, dans une souche HG003 ou HG003 $\Delta sarA$, le système TA SprG2/SprF2 semble toujours à l'équilibre puisque la croissance des souches est possible (**figure 58**). Riffaud et al., ont montré que l'induction d'une forte quantité de *sprG2* induisait une entrée en bactériostase de *S. aureus* (Riffaud et al., 2019). Nos résultats semblent indiquer que la dérégulation transcriptionnelle de *sprG2* liée l'absence de *sarA* ne soit pas suffisante pour induire cette bactériostase, et laisse penser qu'un autre acteur rentrerait en jeu pour produire la toxine. Le fait que SarA se décroche de la région promotrice de *sprG2* semble un signal suffisant pour potentiellement produire la toxine et permettrait de répondre à des conditions environnementales spécifique pour induire la stase bactérienne (**figure 111**).

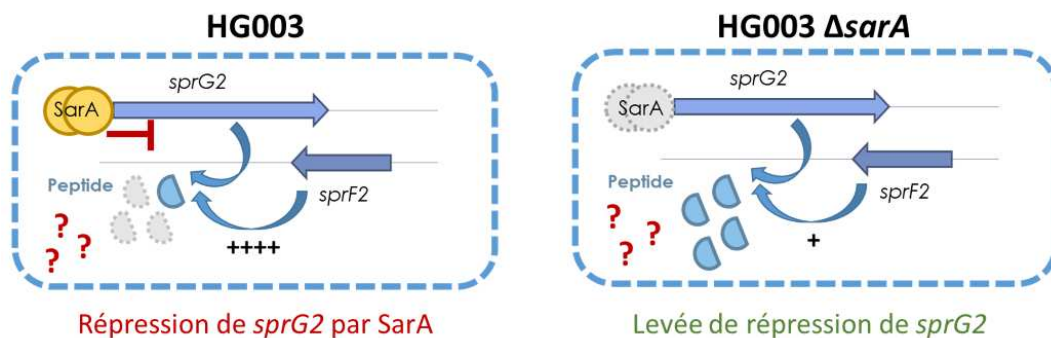


Figure 111 : Potentielles régulations de la production de la toxine codée par *sprG2* en fonction de la présence de SarA.

1.2. Production de la toxine codée par *sprG2* en absence de *sarA*

Suite à ces observations nous avons voulu suivre la production de la toxine codée par le gène *sprG2* dans les souches HG003, HG003 $\Delta sarA$ et HG003 $\Delta sarA/sarA$ complétée au génome. Comme l'ARN SprG2 est fortement présent dans la souche HG003 $\Delta sarA$, nous nous attendons à avoir une plus grande quantité de toxine produite par rapport à la souche HG003.

Pour visualiser la production de la toxine, nous avons à notre disposition des plasmides contenant une version tagguée du gène *sprG2*, *sprG2*-FLAG qui permet de révéler la présence de la toxine par Western Blot (Riffaud et al., 2019). La version tagguée d'une toxine permet de la rendre beaucoup moins toxique ce qui permet son étude sur un système plasmidique à fort nombre de copies. De plus, la fabrication d'anticorps dirigés contre les peptides est difficile à réaliser et coûteuse.

Nous avons transformé les trois souches avec les plasmides pCN35, pCN35-*sprG2*-FLAG et pCN35-*sprG2*-FLAG+*sprF2*, ce dernier permet de remettre le système à l'équilibre en réintroduisant l'ARN antitoxine sur le plasmide. Il a été impossible d'introduire le plasmide pCN35-*sprG2*-FLAG dans la souche HG003 $\Delta sarA$ alors que toutes les autres transformations se sont réalisées avec succès avec des efficacités de transformation entre 10^4 et 10^5 UFC/ μ g d'ADN (**tableau 13**).

Plasmide pour transformation	Souche receveuse	Efficacité de transformation UFC/ μ g ADN
pCN35	HG003	5.25×10^4
	HG003 $\Delta sarA$	3.15×10^5
	HG003 $\Delta sarA/sarA+$	4.25×10^5
pCN35- <i>sprG2</i> -FLAG	HG003	5.95×10^4
	HG003 $\Delta sarA$	0
	HG003 $\Delta sarA/sarA+$	2.95×10^5
pCN35- <i>sprG2</i> -FLAG+ <i>sprF2</i>	HG003	6.00×10^4
	HG003 $\Delta sarA$	3.75×10^5
	HG003 $\Delta sarA/sarA+$	2.75×10^5

Tableau 13 : Efficacité de transformation des souches HG003, HG003 $\Delta sarA$ et HG003 $\Delta sarA/sarA$. Transformation avec les plasmides : pCN35, pCN35-*sprG2*-FLAG et pCN35-*sprG2*-FLAG+*sprF2*.

Nous avons également à disposition un plasmide où le codon d'initiation a été remplacé par un codon stop permettant l'arrêt de la production de la toxine. Nous avons tenté de transformer la souche HG003 $\Delta sarA$ avec ce plasmide mais cette expérience serait à répéter pour conclure si c'est la quantité d'ARN SprG2/SprG2-FLAG en elle-même est trop importante dans la souche HG003 $\Delta sarA$ et est toxique pour la bactérie.

Enfin, la souche HG003 $\Delta sarA \Delta sprG2/sprF2$ a été construite par transduction phagique et cette souche n'a pas non plus été capable d'accepter le plasmide pCN35-*sprG2*-FLAG. Cette dernière expérience confirme qu'en absence de *sarA*, la construction SprG2-FLAG portée par le plasmide à fort nombre de copie n'est pas viable pour la bactérie. Pour pallier à ce problème, nous pourrions introduire le tag FLAG au locus *sprG2* dans une souche HG003 ainsi que dans une souche HG003 $\Delta sarA$. Avec une seule copie

chromosomique de *sprG2* nous devrions avoir moins de cytotoxicité. Cependant, nous ne savons pas si une seule copie du gène codant le peptide taggué sera suffisante pour produire une quantité nécessaire pour une révélation par Western Blot.

En conclusion, SarA réprime la transcription du gène *sm_2230_sprG2* dans des conditions riches de culture. Néanmoins le mutant HG003 $\Delta sarA$ a une croissance similaire à la souche parentale pour autant que le ratio toxine/antitoxine semble en défaveur de l'antitoxine SprF2 et donc potentiellement plus de toxine codée par *sprG2* devrait être produite. Nous proposons donc qu'il existe un deuxième niveau de régulation empêchant la traduction de la toxine dans les conditions expérimentales étudiées, et permet à la souche HG003 $\Delta sarA$ de ne pas rentrer en bactériostase.

Donc l'équilibre du système toxine-antitoxine SprG2/SprF2 semble contrôler : à la fois au niveau ADN avec la répression transcriptionnelle du gène codant sa toxine par le FT SarA, mais aussi au niveau ARN avec l'intervention de l'antitoxine SprF2 qui interfère à un autre niveau dans la production de la toxine codée par *sprG2*. Ces types de régulation permettent à *S. aureus* de contrôler rigoureusement l'expression de ces systèmes toxine-antitoxine de type I.

2. L'ensemble du système TA SprA2/SprA2_{AS} est-il régulé par SarA ?

Nous avons pu démontrer dans la première partie de ce manuscrit que SarA réprime l'expression du gène *sm_4540_sprA2_{AS}*, gène codant l'ARN antitoxine du système SprA2/SprA2_{AS}. Cette régulation été mise en évidence suite à la découverte d'une zone de fixation de SarA avec un p-value très faible en ChIP-Seq. Néanmoins, cette régulation n'avait pas été révélé en RNA-Seq car avec une taille de 61 nt, l'ARN SprA2_{AS} se situe en-dessous de la limite de détection du RNA-Seq (Oriol et al., 2021). Comme pour le système précédent SprG2/SprF2, nous nous sommes demandés si SarA pouvait réprimer l'expression de la toxine codée par le gène *sm_4550_sprA2* et donc contrôler l'ensemble du système toxine-antitoxine de type I.

Le gène *sm_4550_sprA2* n'a pas été révélé par notre analyse RNA-Seq, il n'y a pas de différence de la quantité d'ARN SprA2 entre la souche HG003 et la souche HG003 $\Delta sarA$: sa valeur FPKM est en moyenne de 2000 à 2h et 4h30 (**tableau 20 en annexe**). De plus, aucune fixation de SarA en amont de *sm_4550_sprA2* n'est ressortie dans l'expérience de ChIP-Seq.

2.1. Quantité d'ARN du système TA en fonction de SarA

La présence de SarA semble seulement faire varier la quantité de l'antitoxine SprA2_{AS}, néanmoins nous sommes allés suivre la quantité de l'ARN SprA2 dans les souches HG003, HG003 $\Delta sarA$, et HG003 $\Delta sarA/sarA$ à deux temps de croissance par Northern blot. Comme attendu et déjà démontré précédemment, à 2h comme à 5h la quantité de SprA2_{AS} est fortement augmentée en absence de *sarA* par rapport à la quantité observée dans la souche sauvage et dans la souche complémentée (**figure 112**). En parallèle, on note que la quantité de SprA2 semble presque similaire entre les trois souches à 2h, cependant dans la souche HG003 $\Delta sarA$, nous observons une augmentation de la quantité d'ARN SprA2 à 5h de culture, cette augmentation

semble suivre celle de l'ARN SprA2_{AS} (**figure 112**). Cette observation semblerait en accord avec le fait que l'appariement de ces deux sARNs les protège en limitant leur dégradation par les RNases intracellulaires (Germain-Amiot et al., 2019). De plus, l'augmentation de la quantité de SprA2 à 5h dans la souche délétée du gène *sarA* pourrait témoigner d'un mécanisme indépendant de SarA, d'autres réseaux de régulation pourraient entrer en jeu.

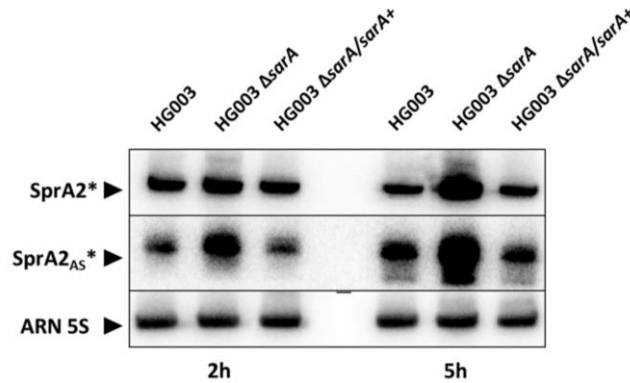


Figure 112 : Northern Blot des ARN des souches HG003, HG003 $\Delta sarA$, et HG003 $\Delta sarA/sarA^+$. Les ARN ont été extraits après 2h et 5h de culture en TSB. L'ARN 5S sert de contrôle de dépôt.

La quantité plus importante de SprA2 peut être due à une régulation directe par SarA ou serait en lien avec la protection contre les RNases apportée au dimère SprA2/SprA2_{AS}.

2.2. Fixation de SarA sur l'ensemble du système TA ?

Pour tenter de répondre à cette question, nous avons réalisé des expériences de gel retard entre le promoteur radiomarqué du gène *srn_4550_sprA2* et la protéine SarA. En ajoutant une quantité croissante de SarA, nous obtenons la formation du complexe $P_{srn_4550^*}/SarA$ et ce dès 0,5 pmol de SarA (**figure 113**). Pour vérifier la spécificité de fixation, nous mettons en compétition soit un excès de sonde spécifique non marquée (P_{srn_4550}) soit un excès de sonde non spécifique non marquée (le promoteur du gène codant l'ARN16S). Sur la **figure 113**, nous observons que seul un excès de la sonde spécifique est capable de casser le complexe $P_{srn_4550^*}/SarA$, et permet donc de libérer la sonde radioactive en bas du gel (puits 10x et 20x). *In vitro*, SarA peut donc se fixer spécifiquement en amont du gène *srn_4550_sprA2* codant la toxine du système SprA2/SprA2_{AS}.

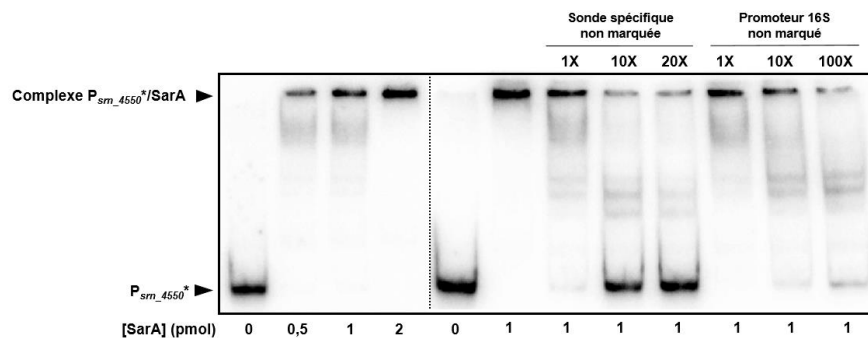


Figure 113 : Gel retard du promoteur du gène *srn_4550_sprA2* avec la protéine SarA.

Pour aller plus loin, nous avons souhaité comparer la capacité de SarA à se fixer sur le promoteur du gène *sprA2_{AS}* ou du gène *sprA2*. Nous avons visualisé par gel retard la formation du complexe entre le promoteur P_{*srn_4540_sprA2_{AS}*} marqué et la protéine SarA, lequel a été mis en compétition avec un excès du promoteur spécifique P_{*srn_4540_sprA2_{AS}*} ou avec un excès du promoteur non spécifique P_{*srn_4550_sprA2*} (**figure 114**). Sur les puits 3 à 5, nous pouvons voir qu'une quantité 10 fois plus importante du promoteur P_{*srn_4540_sprA2_{AS}*} non radiomarké décroche en totalité le complexe alors qu'il faut 20 fois plus de promoteur P_{*srn_4550_sprA2*} (puits 6 à 8) pour décrocher le complexe P_{*srn_4540_sprA2_{AS}*}/SarA. Cette expérience nous montre que SarA se fixe préférentiellement sur le promoteur du gène *sprA2_{AS}* codant l'ARN antitoxine que celui du promoteur du gène *sprA2* codant la toxine.

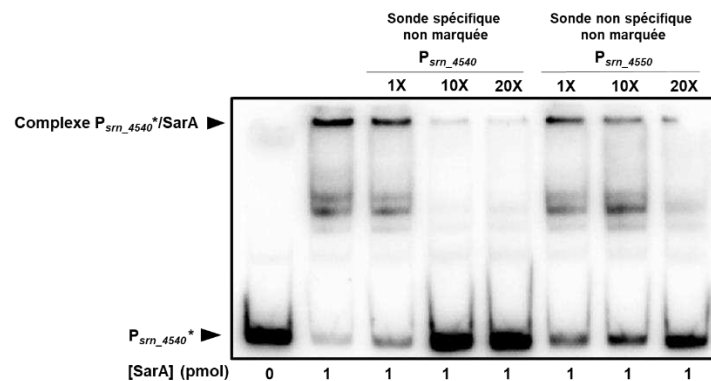


Figure 114 : Gel retard du promoteur du gène *srn_4540_sprA2_{AS}* avec la protéine SarA en compétition avec le promoteur du gène *srn_4550_sprA2*. En compétition avec une quantité en excès du promoteur non marqué du gène *srn_4540_sprA2_{AS}* (sonde spécifique) ou du promoteur non marqué du gène *srn_4550_sprA2* (sonde non spécifique).

En conclusion, *in vitro* SarA est capable de se fixer sur les deux régions promotrices de *sprA2* et *sprA2_{AS}*. Cependant la fixation sur le promoteur du gène *sprA2_{AS}* semble plus forte au vu des compétitions réalisées. De plus, cette fixation a été visualisée *in vivo* en amont du gène *sprA2_{AS}* via les expériences de ChIP-Seq et cette fixation est reliée à une répression de l'expression du gène *sprA2_{AS}* dans les conditions testées. Il est parfois difficile de savoir si des observations *in vitro* ont une réalité biologique, c'est pourquoi nous avons décidé de cloner ces deux régions promotrices sur un système rapporteur permettant de mesurer leur activité en présence ou absence de SarA dans la bactérie. Il faut noter qu'au niveau génomique, les deux gènes se chevauchent sur les brins opposés (**figure 109**) et qu'il se pourrait que la fixation préférentielle de SarA pour la région promotrice de *sprA2_{AS}* modifie la conformation de l'ADN à cet endroit et impacterait la fixation de SarA sur le promoteur du gène *sprA2*. SarA pourrait également se fixer sur le promoteur du gène *sprA2* dans des conditions de culture spécifiques.

2.3. Régulation *in vivo* du système TA par SarA

Pour aller plus loin sur cette piste, nous avons construit des fusions transcriptionnelles des promoteurs P_{*sprA2_{AS}*} et P_{*sprA2*} avec un gène rapporteur afin d'étudier si la fixation observée *in vitro* entraîne une régulation de l'expression du gène *in vivo*.

Ainsi, nous avons cloné dans le plasmide pCN41c les promoteurs de *sprA2* ou *sprA2_{AS}* en amont du gène rapporteur *blaZ*. Les plasmides pCN41c, pCN41c-P_{*sprA2AS*}-*blaZ* et pCN41c-P_{*sprA2*}-*blaZ* ont été introduits dans les souches HG003, HG003 Δ *sarA*, et HG003 Δ *sarA/sarA* complétement au génome. Ces souches permettent de doser l'activité β -lactamase résiduelle (pCN41c) ou dépendante du promoteur présent en amont du gène *blaZ* (pCN41c-P_{*sprA2AS*}-*blaZ* ou + pCN41c-P_{*sprA2*}-*blaZ*). Les souches sont cultivées dans un milieu TSB et les protéines sont extraites à 2h et 5h de culture pour réaliser le dosage de l'activité β -lactamase à ces deux temps de croissance, et reproduire les mêmes conditions que le Northern blot (**figure 112**). Les extraits protéiques ont été dilués au 1/2^e, au 1/5^e et au 1/10^e dans de l'eau. La nitrocéphaline a été ajoutée aux extraits puis l'activité β -lactamase a été mesurée en lecteur de microplaque à 37°C toutes les 10 minutes. En parallèle, un dosage Bradford est réalisé avec la dilution au 1/5^e pour doser la quantité des protéines de chaque échantillon et la rapporter à l'activité β -lactamase détectée.

Bien que le séquençage des plasmides ait montré que les constructions obtenues étaient celles désirées, nous n'avons pas réussi à obtenir une construction fonctionnelle avec le promoteur *sprA2*. Un léger décalage entre le +1 décrit et le +1 de transcription réel pourrait expliquer ce résultat. Aucune donnée RACE n'est disponible pour ce gène *sprA2*.

Néanmoins, nous avons pu réaliser le dosage de l'activité β -lactamase avec le promoteur *sprA2_{AS}* (**figure 115**). A 2h, l'activité du promoteur P_{*sprA2AS*} est 4 fois plus importante dans la souche HG003 Δ *sarA* par rapport à la souche HG003. A 5h, le même profil est retrouvé mais la différence d'activité du promoteur est de 2 entre les souches. La souche HG003 Δ *sarA/sarA* complétement permet de retrouver la répression transcriptionnelle observée dans la souche parentale HG003 à 2h et 5h de culture. Cette expérience indique que l'absence de *sarA* permet une activité transcriptionnelle plus forte du promoteur P_{*sprA2AS*}.

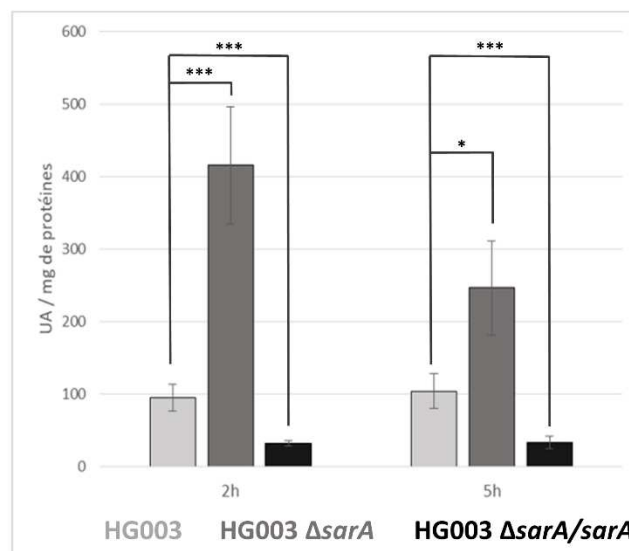


Figure 115 : Dosage de l'activité β -lactamase de la fusion transcriptionnelle P_{*sprA2AS*}-*blaZ* dans les souches HG003, HG003 Δ *sarA* et HG003 Δ *sarA/sarA*. Les protéines ont été extraites après 2h et 5h de croissance en milieu TSB. L'unité de dosage de l'activité β -lactamase est représentée en unités arbitraires (UA) par mg de protéines par extrait.

En combinant les données disponibles en RNA-Seq, ChIP-Seq, Northern blot (**figure 112**) et l'expérience de gène rapporteur (**figure 115**), nous pouvons conclure que SarA réprime la transcription du gène *srn_4540_sprA2_{AS}* en se fixant directement sur son promoteur.

Par des expériences *in vitro*, nous avons vu que SarA était capable de fixer la région en amont du gène *sprA2*, néanmoins, il semble que la fixation de SarA *in vitro* sur le promoteur de *sprA2* ne soit pas une réalité biologique dans les conditions de cultures utilisées. En effet, nous n'avons pas vu de réelle différence de quantité d'ARN SprA2 que ce soit en RNA-Seq ou en Northern Blot et aucune fixation de SarA n'a été mise en évidence en amont du gène *sprA2* dans notre expérience de ChIP-Seq. Il faudrait tester d'autres conditions de culture et différents types de stress pour observer des variations d'expression du système TA, et voir si SarA peut intervenir dans la régulation du gène *sprA2* codant la toxine. A l'heure actuelle, la potentielle régulation de SarA sur l'expression de *sprA2* reste encore en suspens.

2.4. Production de la toxine codée par *sprA2* dans la souche HG003 $\Delta sarA$

Il a été montré que le rôle physiologique du système TA SprA2/SprA2_{AS} serait d'induire la mort intracellulaire des bactéries qui expriment la toxine dans le but d'avoir un comportement altruiste et de nourrir les bactéries alentours. Des expériences de co-cultures ont montré que la toxine PepA2 ne semble pas avoir d'influence sur la viabilité des autres bactéries dans le milieu extracellulaire (Germain-Amiot et al., 2019).

L'ensemble des résultats précédents semble indiquer que SarA ne joue pas de rôle direct dans la légère augmentation de la quantité d'ARN SprA2 observée en son absence en Northern Blot (**figure 112**). Dans la souche HG003, le système est exprimé mais est à l'équilibre pour que la bactérie soit viable alors que dans une souche HG003 $\Delta sarA$, il semblerait que le ratio toxine/antitoxine soit en faveur de l'ARN antitoxine SprA2_{AS}. En effet, en absence de *sarA*, la plus grande quantité d'antitoxine pourrait conduire à une moindre production de la toxine codée par *sprA2* dans la souche HG003 $\Delta sarA$ (**figure 116**).

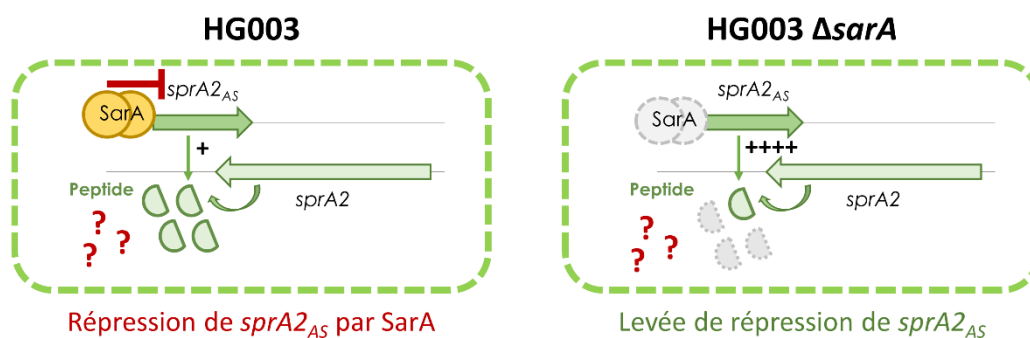


Figure 116 : Potentielles régulations de la production de la toxine codée par *sprA2* en fonction de la présence de SarA.

De la même manière que pour l'étude de la production de la toxine codée par *sprG2*, nous disposons des plasmides avec une version tagguée de la toxine PepA2. Le plasmide pCN35-*sprA2*-FLAG contient une version tagguée de la toxine à l'extrémité Nter, ce qui permet de la suivre par Western Blot et la rend moins toxique. Le gène *sprA2_{AS}* a été rajouté sur un plasmide ce qui permet d'avoir le système TA à l'équilibre (Germain-Amiot et al., 2019). De plus, la fabrication d'anticorps dirigés contre les peptides est difficile à réaliser et coûteuse. Les plasmides pCN35-*sprA2*-FLAG et pCN35-*sprA2*-FLAG+ *sprA2_{AS}* ont été introduits par transformation dans les souches HG003, HG003 Δ *sarA* et HG003 Δ *sarA/sarA*.

Nous avons vérifié par extraction d'ARN la quantité des ARNs *SprA2* et *SprA2_{AS}* dans les souches HG003, HG003 Δ *sarA* et HG003 Δ *sarA/sarA* avec les plasmides pCN35-*sprA2*-FLAG et pCN35-*sprA2*-FLAG + *sprA2_{AS}* lors d'une croissance en milieu TSB. Sur la **figure 117**, nous pouvons observer que l'ARN *SprA2* est présent sous deux tailles distinctes, la forme endogène (*SprA2*) et la forme *SprA2*-FLAG portée par le plasmide pCN35. La quantité de *SprA2* endogène est plus importante dans le puits n°3, comme il avait pu être observé sur le Northern Blot précédent (**figure 112**), et l'apport du gène *sprA2_{AS}* permet de retrouver une quantité de *SprA2* similaire aux autres conditions. Concernant la version *SprA2*-FLAG, elle semble plus importante dans les souches HG003 Δ *sarA* (puits n°3 et 4). Pour l'ARN *SprA2_{AS}* endogène, nous retrouvons la répression transcriptionnelle via *SarA* en comparant le puits n°3 aux puits n°1 et 5. Le même type de profil est observé avec l'apport du gène *sprA2_{AS}* porté le plasmide pCN35-*sprA2*-FLAG+*sprA2_{AS}*, avec plus d'ARN *SprA2_{AS}* dans la souche Δ *sarA* par rapport aux deux autres souches. Les souches construites sont donc validées et la production du peptide PepA2-FLAG va pouvoir être suivie dans ces dernières.

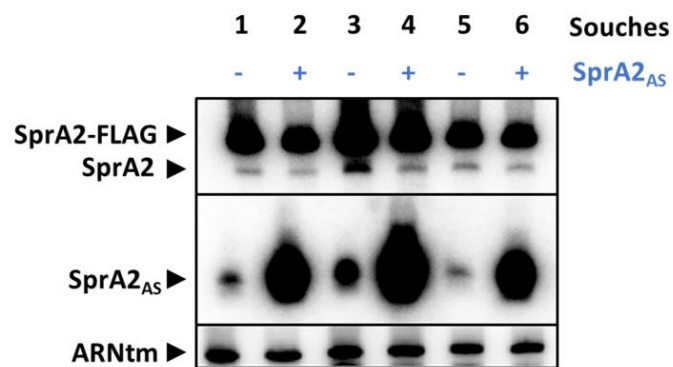


Figure 117 : Northern blot des ARNs *SprA2* et *SprA2_{AS}* dans les souches HG003, HG003 Δ *sarA* et HG003 Δ *sarA/sarA* avec les plasmides pCN35-*sprA2*-FLAG et pCN35-*sprA2*-FLAG+*sprA2_{AS}*. Pour les extractions d'ARN, les cultures ont été réalisées en milieu TSB jusqu'à une DO_{600nm} égale à 2, centrifugées puis remises en culture pendant une heure dans du milieu TSB frais (Germain-Amiot et al, 2018).

A la **figure 118**, nous pouvons suivre la quantité de PepA2-FLAG présente dans les extraits protéiques totaux et extracellulaires dans les souches HG003 et HG003 Δ *sarA* avec les plasmides pCN35-*sprA2*-FLAG et pCN35-*sprA2*-FLAG + *sprA2_{AS}*. En comparant les deux premiers puits, nous pouvons conclure que dans la souche HG003 semble produire une très faible quantité de PepA2-FLAG avec ou sans l'apport exogène de l'antitoxine *sprA2_{AS}*. Par ailleurs, dans la souche HG003 Δ *sarA* + pCN35-*sprA2*-FLAG (puits 3), nous

observons une augmentation de la quantité de PepA2-FLAG par rapport à la souche HG003 + pCN35-*sprA2*-FLAG (puits1) et cette quantité revient à la normale quand on ajoute la version plasmidique du gène *sprA2_{AS}*.

Concernant les protéines extracellulaires, des profils similaires sont observés avec une plus faible production de PepA2-FLAG dans la souche HG003 par rapport à la souche HG003 Δ *sarA*. L'ajout de *SprA2_{AS}* dans les deux souches permet de diminuer la production du peptide dans le milieu extracellulaire.

De manière globale, nous pouvons conclure que lors d'une croissance en milieu TSB, la souche HG003 Δ *sarA* produit plus de peptides PepA2-FLAG par rapport à la souche parentale HG003.

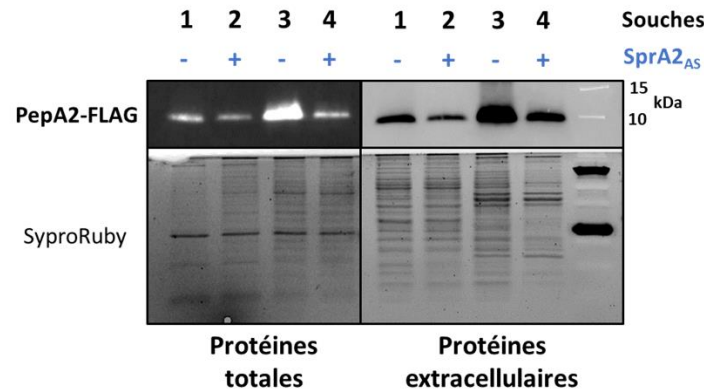


Figure 118 : Western Blot du peptide PepA2-FLAG. Extraction des protéines après 1h de stress en TSB. Souches utilisées : (1) HG003 + pCN35-*sprA2*-FLAG ; (2) HG003 + pCN35-*sprA2*-FLAG + *sprA2_{AS}* ; (3) HG003 Δ *sarA* + pCN35-*sprA2*-FLAG ; (4) HG003 Δ *sarA* + pCN35-*sprA2*-FLAG + *sprA2_{AS}*. Expériences réalisées en duplicat.

Nous pouvons conclure que l'augmentation du nombre de copies du gène *sprA2_{AS}* a permis de réguler la quantité de PepA2-FLAG. Pour autant, nous ne nous attendions pas à observer une quantité plus importante de peptide dans la souche délétée pour le gène *sarA* par rapport à la souche sauvage. Certes nous avons observé un peu plus d'ARN *SprA2* en Northern blot (**figures 112 et 117**) mais la forte présence de l'antitoxine de *SprA2_{AS}* en absence de *sarA* aurait pu freiner la production de la toxine. Mais il faut garder à l'esprit que les constructions ne sont pas intégrées au génome, par conséquent le nombre de copies de plasmides présent peut varier d'une souche à l'autre. De plus, le système endogène *sprA2/sprA2_{AS}* au chromosome peut interférer avec les versions plasmidiques.

3. Expression du système TA *SprA2/SprA2_{AS}* en milieu carencé NZM

En 2018, Germain-Amiot et *al* ont voulu aller plus loin dans la compréhension du système TA *SprA2/SprA2_{AS}* notamment en essayant d'identifier les conditions environnementales qui pourraient induire le système TA c'est-à-dire déséquilibrer le complexe *SprA2/SprA2_{AS}* et donc amener à la production de la toxine dans la bactérie. A priori cela serait possible soit en augmentant la quantité d'ARN *SprA2* soit en diminuant la quantité d'ARN *SprA2_{AS}*.

Dans ce but, différents stress avaient été appliqués sur la souche sauvage Newman et les ARN ont été extraits après 30min et 1h de stress. Cette étude a révélé que la quantité d'ARN *SprA2_{AS}* diminue fortement en

présence d'un stress osmotique (NaCl 1M) et un stress nutritif mimé par le milieu NZM. A l'inverse, seul le stress osmotique semble impacter le niveau de l'ARN SprA2 en le diminuant. Aucun changement n'avait été observé pour cet ARN lors d'un stress nutritif (**figure 119**).

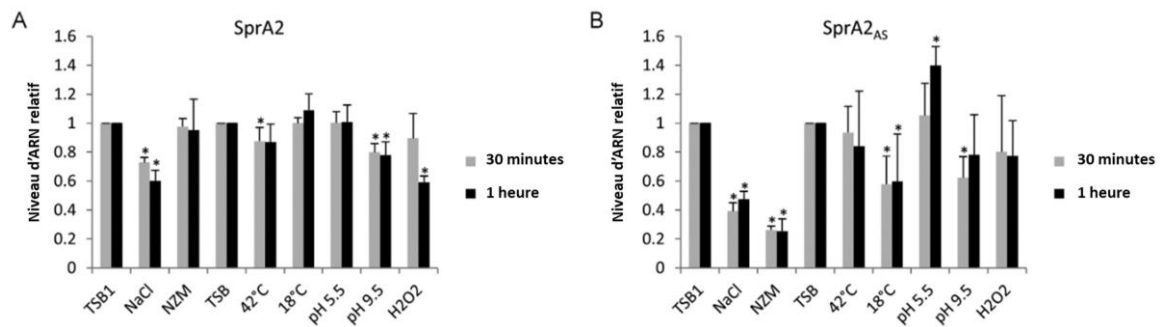


Figure 119 : Quantités relatives des ARNs du système TA SprA2/SprA2_{AS} suite à différents stress de 30min et 1 heure chez la souche Newman (d'après Germain-Amiot et al., 2019). (A) ARN SprA2 (toxine). (B) ARN SprA2_{AS} (antitoxine). TSB1 sert de contrôle pour les stress osmotique (NaCl) et nutritif (NZM), et TSB sert de contrôle pour les chocs thermiques, stress pH et stress oxydant (H₂O₂).

Comme nous savons maintenant que SarA régule directement l'expression de *sprA2_{AS}*, nous nous sommes demandés si les variations d'expression observées dans ces différents stress étaient dues à SarA. Nous nous sommes intéressés en particulier à la régulation du système TA lors d'un stress nutritif induit par le milieu NZM.

3.1. Le milieu NZM

Plusieurs études ont décrit le milieu NZM comme induisant une réponse stringente chez *S. aureus* (Bronsard et al., 2017) (Germain-Amiot et al., 2019). La réponse stringente est un état physiologique très particulier pour la bactérie. Il est déclenché par un stress comme par exemple une carence en acides aminés et est signalé par l'alarmone ppGpp. Il induit un arrêt de transcription de la plupart des gènes, et freine la croissance bactérienne des conditions plus favorables. Néanmoins, la composition du milieu NZM est assez riche (10g/l caséine tryptone digérée, 5g/l NaCl, 2g/l MgSO₄ ; pH 7) et ne semble pas propice à déclencher une réponse stringente chez le staphylocoque. Des auteurs précédents avaient décrit le milieu NZM comme « milieu stringent » (Beaume et al., 2010) (Geissmann et al., 2009), où l'expression de divers sARNs avaient été étudiés.

Pour vérifier si le milieu NZM induit une réponse stringente (RS) spécifique, nous avons comparé l'expression de gènes spécifiques de la RS comme *ilvD*. Nous avons mesuré son expression dans 3 milieux différents : TSB, NZM (Fluka) et NZM (2). Le NZM (Fluka) est le milieu utilisé par Germain-Amiot et al., et le milieu NZM (2) a la même composition mais a été reconstitué au laboratoire avec les différents ingrédients. Ce gène *ilvD* permet la biosynthèse des acides aminés à chaînes ramifiées et a été révélé dans une étude portant sur la RS chez *S. aureus* (Reiß et al., 2012) et a également servi de senseur de la RS (Pathania et al., 2021). En contrôle positif, nous avons traité les bactéries avec de la mupirocine pendant 10 et 30 minutes, un antibiotique déclenchant une RS (Reiß et al., 2012). Les ARN ont été extraits, traités à la

DNase et rétro-transcrits pour réaliser une PCR quantitative. L'expression du gène *ilvD* est très importante après traitement avec la mupirocine, à l'inverse il est très peu ou pas du tout exprimé dans les bactéries cultivées dans un milieu TSB ou NZM Fluka (**figure 120**). En parallèle, nous avons testé une nouvelle recette de NZM, nommée NZM (2) mais aucune de ces conditions ne semble induire de réponse stringente chez *S. aureus*.

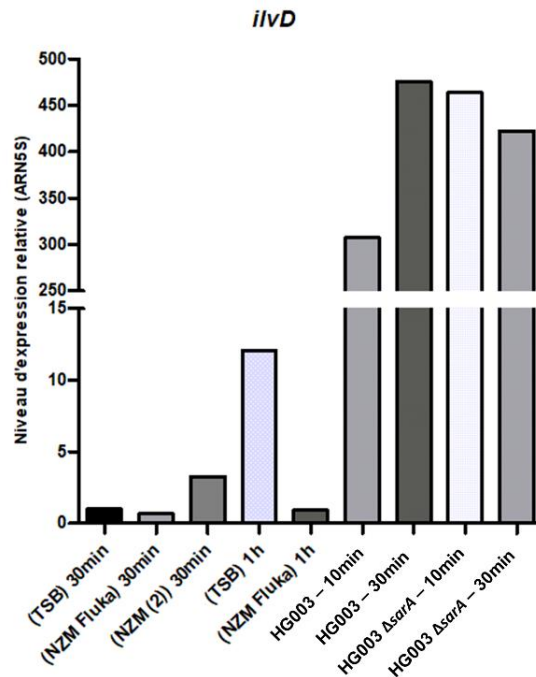


Figure 120 : Niveau d'expression relatif du transcrit *ilvD*. RT-qPCR sur des ARN extraits suite à un traitement TSB ou NZM pendant 30min ou 1h, avec en contrôle positif le traitement à la mupirocine, induisant une réponse stringente. Condition TSB 30min sert de référence pour calculer l'expression relative dans les autres conditions.

Par conséquent dans la suite de ce manuscrit, le milieu NZM sera considéré comme un milieu carencé notamment un stress nutritif sans glucose.

3.2. Transposition des résultats de la souche Newman à la souche HG003

Pour revenir à l'étude de l'impact de SarA sur l'expression de *sprA2_{AS}*, dans un premier temps nous avons vérifié si les variations observées en milieu NZM dans la souche Newman sont également retrouvées dans la souche d'étude HG003. Pour cela, nous avons reproduit le stress nutritif NZM avec en contrôle le milieu riche TSB et les ARN ont été extraits après 30min et 1h de stress dans les souches HG003 et HG003 Δ sarA (**figure 121**). En milieu NZM à 30min et 1h de stress, nous observons une diminution de la quantité de *SprA2_{AS}* dans la souche HG003 ce qui confirme le phénotype obtenu avec la souche Newman (Germain-Amiot et al., 2019). Concernant la souche HG003 Δ sarA, comme attendu en milieu TSB, nous observons une plus forte quantité de *SprA2_{AS}*, cette dérégulation est également retrouvée en NZM en absence de *sarA* (**figure 121**).

En ce qui concerne l'ARN *SprA2*, nous observons en TSB comme en NZM, une légère augmentation de sa quantité avec environ deux fois plus de *SprA2* présent en absence de *sarA* par rapport à la souche sauvage

HG003 (**figure 121**). Lorsque l'on compare les quantités de SprA2 mesurées en milieu NZM et TSB indépendamment pour chaque souche, nous concluons que contrairement à SprA2_{AS}, le milieu TSB ou NZM n'influence pas la quantité de SprA2 présente dans les souches étudiées.

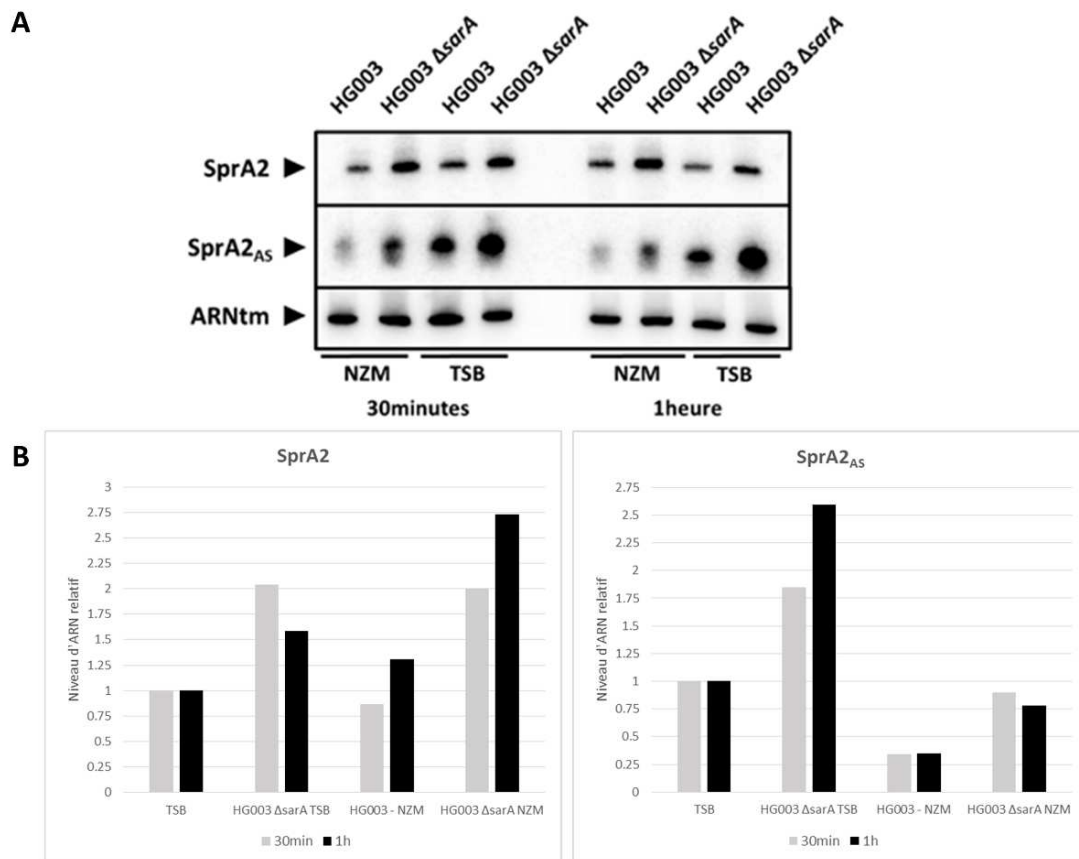


Figure 121 : Expression du système TA SprA2/SprA2_{AS} dans les souches HG003 et HG003 Δ sarA. (A) Northern Blot dans les souches HG003 et HG003 Δ sarA en milieu TSB et NZM après 30min et 1h de stress. Les ARN SprA2_{AS}, SprA2 et ARNtm ont été révélées avec des sondes marquées radioactivement et l'ARNtm sert de contrôle de dépôt. **(B)** Quantifications relatives des ARN SprA2 et SprA2_{AS} du Northern Blot en (A).

Pour SprA2, seule l'absence de *sarA* a un effet sur la quantité d'ARN retrouvée à un instant donné. Le milieu NZM ne semble pas impacter directement la quantité de SprA2. En milieu NZM, la quantité de l'ARN antitoxine SprA2_{AS} est donc diminuée dans les deux souches, le ratio SprA2/SprA2_{AS} est alors en défaveur de SprA2_{AS} ce qui devrait avoir pour conséquence une plus forte production de toxine (environ 3 fois plus de SprA2 par rapport à SprA2_{AS}). Ce phénomène a également été observé pour le système TA similaire SprA1/SprA1_{AS}, où en stress oxydatif (H₂O₂) la quantité de l'antitoxine SprA1_{AS} diminuait pour laisser place à plus de toxine PepA1-FLAG produite dans cette condition (Sayed *et al.*, 2012b). Dans le cas du système TA SprA2/SprA2_{AS}, l'augmentation de la production de toxine potentielle en NZM, devrait induire une mort intracellulaire permettant un comportement altruiste entre les bactéries, pour permettre à la communauté d'avoir assez de nutriments pour subsister à ce stress nutritif

Cette expérience confirme que dans la souche HG003, nous obtenons les mêmes phénotypes que dans la souche Newman avec la forte diminution de l'ARN SprA2_{AS} en milieu carencé NZM. Nos investigations peuvent donc se poursuivre dans le fond génétique HG003 utilisé depuis le début de nos expériences.

3.3. Rôle de SarA dans la diminution de l'ARN SprA2_{AS} en milieu carencé NZM ?

Les résultats obtenus en Northern Blot semblent indiquer qu'en absence de *sarA*, nous observons toujours un effet du milieu NZM sur la quantité d'ARN SprA2_{AS} présente.

Pour vérifier ce résultat, nous avons réalisé des expériences de gènes rapporteurs. Ainsi, nous avons réutilisé les souches HG003 et HG003 $\Delta sarA$ avec les plasmides pCN41c et pCN41c-P*sprA2_{AS}*. Ce dernier contient la fusion transcriptionnelle du promoteur de *sprA2_{AS}* avec le gène *blaZ* qui permet le dosage de l'activité β -lactamase. Pour mimer les expériences de Germain-Amiot et al, nous avons réalisé des cultures en TSB jusqu'à DO_{600nm} égale à 2, puis nous avons séparé la culture en deux pour centrifugation. La moitié de la culture a été reprise dans du milieu TSB et l'autre moitié dans du milieu NZM (Germain-Amiot et al., 2019). Les cultures ont été remises à 37°C puis les dosages ont été réalisés après 1h et 2h de culture. Nous avons adapté les temps de prélèvement pour que le dosage β -lactamase soit le reflet de la réponse de la bactérie au changement de milieux TSB ou NZM et éviter de mesurer l'activité β -lactamase produite précédemment en milieu TSB.

Des extractions d'ARN ont été réalisées après 1h de stress en NZM pour contrôler que la diminution de l'ARN SprA2_{AS} est également observée dans les souches contenant les plasmides pour le dosage de l'activité β -lactamase. Le Northern blot valide la diminution de la quantité de SprA2_{AS} en milieu NZM par rapport au milieu TSB dans les souches utilisées pour le dosage de l'activité β -lactamase (**figure 122A**).

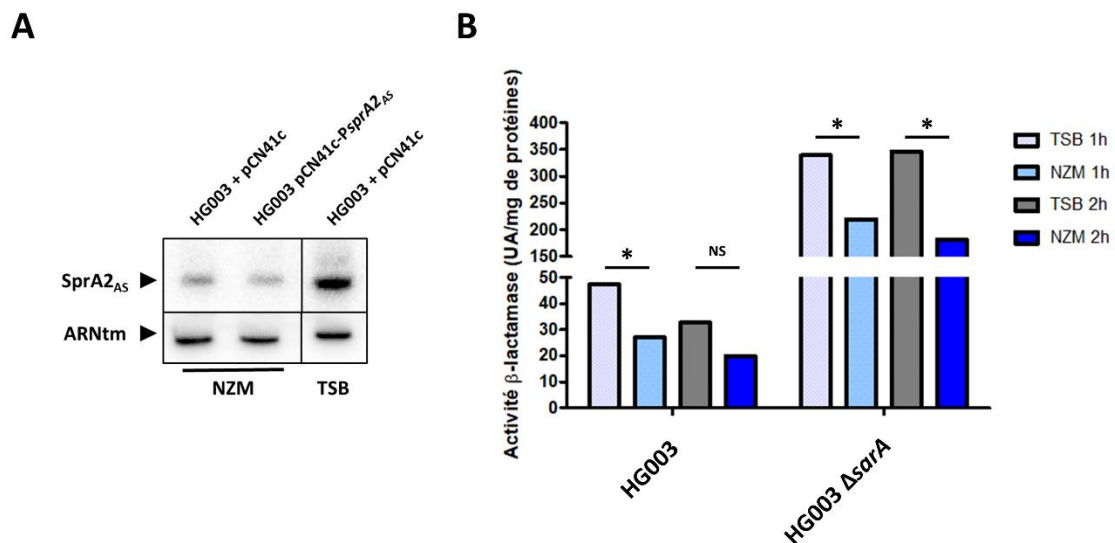


Figure 122 : Dosage de l'activité β -lactamase du promoteur du gène *sprA2_{AS}* en milieu TSB ou NZM. (A) Northern Blot des ARN extraits des souches HG003 + pCN41c et HG003 + pCN41c-P*sprA2_{AS}* en NZM et en TSB après 1h de culture. (B) Dosage de l'activité β -lactamase dans les souches HG003 et HG003 $\Delta sarA$ après 1h et 2h de culture en TSB ou NZM. L'analyse statistique a été réalisée avec le test de Mann-Whitney, les différences (*) sont considérées comme statistiquement significatives lorsque la p-value est inférieure à 0,05.

Dans la **figure 122B**, premièrement, nous observons une faible activité β -lactamase dans la souche HG003 (de 30 à 50 UA/mg de protéines) par rapport à celle observée dans la souche HG003 $\Delta sarA$ (200 à 350 UA/mg de protéines). Ces différences s'expliquent par la dérégulation de l'expression de *sprA2_{AS}* en absence de *sarA*, démontrée auparavant dans cette étude. Deuxièmement, l'activité β -lactamase de la souche HG003 est encore plus faible dans le milieu NZM à 1h et 2h de culture, ce qui témoigne d'une moindre

activité du promoteur *sprA2_{AS}* dans ce milieu, en accord avec la diminution observée de l'ARN *SprA2_{AS}* (Germain-Amiot et al., 2019). Alors que dans la souche HG003 $\Delta sarA$, l'activité β -lactamase est environ 6 fois plus importante par rapport à la souche sauvage, cette activité est beaucoup plus faible dans le milieu NZM. La moindre activité du promoteur *sprA2_{AS}* dans le milieu NZM ne peut pas être reliée au FT SarA puisque la souche ne contient pas ce dernier. Par ailleurs, les profils d'activité β -lactamase sont similaires entre les deux souches avec une activité β -lactamase plus faible en NZM qu'en TSB. SarA ne semble donc pas impliquée dans la diminution de quantité d'ARN *SprA2_{AS}* observée en milieu carencé NZM. Cette diminution serait probablement liée à une stabilité plus faible de l'ARN *SprA2_{AS}* au cours de ce stress. Pour répondre à cette question, des expériences de demi-vie pourrait être effectuées en comparant la demi-vie de *SprA2_{AS}* en milieu riche TSB par rapport au milieu carencé NZM.

Actuellement et pour conclure sur le rôle de SarA par rapport au système TA *SprA2/SprA2_{AS}*, nous pouvons indiquer que SarA réprime la transcription de l'antitoxine *sprA2_{AS}* uniquement. En milieu TSB, le système TA est à l'équilibre dans une souche sauvage alors que pour une souche délétée du gène *sarA*, on sait que la quantité de *SprA2_{AS}* est beaucoup plus forte et possiblement corrélée à une moindre production de PepA2 natif. Dans ce cas, quel serait le rôle d'une régulation par SarA ? SarA peut-il dans certaines conditions réprimer plus fortement l'expression du gène ou alors se décroche-t-il du promoteur du gène *sprA2_{AS}* permettant une plus forte production de l'ARN *SprA2_{AS}*.

Ce décrochage aurait-il lieu pour répondre à une augmentation de l'expression de *sprA2* ? Si tel est le cas cela permettrait à la bactérie de limiter la traduction de PepA2. A moins que ce décrochage n'ait aucun lien avec le système TA *SprA2/SprA2_{AS}* parce que *SprA2_{AS}* aurait un autre rôle dans la bactérie que de bloquer la traduction de PepA2 ?

Nos expériences ne nous ont pas permis de vérifier ces hypothèses, il faudrait idéalement posséder des anticorps dirigés contre PepA2 natif, mais cela est très complexe. Il faudrait également travailler avec différentes versions tagguées de PepA2 et dans tous les cas proscrire les constructions non intégrées au génome.

3.4. Vérification des souches par Northern blot

Pour aller plus loin dans notre raisonnement, nous nous sommes demandés si la diminution de l'ARN *SprA2_{AS}* en milieu carencé NZM conduirait à une plus grande quantité de toxine codée par *sprA2*. Pour cela, nous avons utilisé les souches HG003 et HG003 $\Delta sarA$ avec les plasmides pCN35-*sprA2*-FLAG et pCN35-*sprA2*-FLAG + *sprA2_{AS}*.

Ensuite nous avons traité les souches avec les mêmes conditions que Germain-Amiot et al., en réalisant un stress d'une heure en milieu carencé NZM ou TSB. Les ARN ont été extraits et analysés par Northern blot. Sur la **figure 123**, nous observons une grande quantité de *SprA2_{AS}* dans les souches contenant le système TA à l'équilibre (souches 2 et 4) et une diminution de *SprA2_{AS}* dans la souche 2 en milieu NZM, correspondant aux résultats précédemment obtenus (**figure 123**).

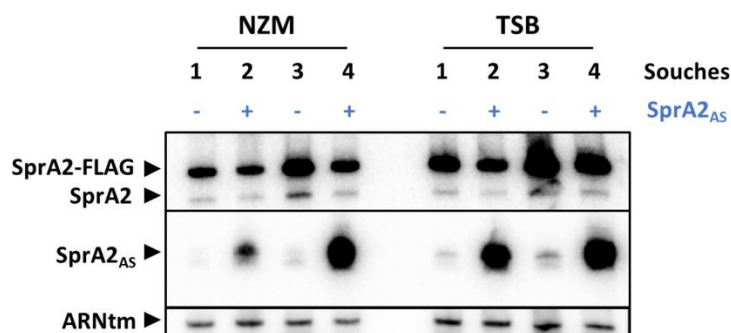


Figure 123 : Northern Blot des ARN des souches contenant la version PepA2-FLAG plasmidique. Extraction ARN après un stress d'1h en milieu NZM ou TSB. (1) HG003 + pCN35-*sprA2*-FLAG ; (2) HG003 + pCN35-*sprA2*-FLAG + *sprA2_{AS}* ; (3) HG003 Δ *sarA* + pCN35-*sprA2*-FLAG ; (4) HG003 Δ *sarA* + pCN35-*sprA2*-FLAG + *sprA2_{AS}*

Ces souches validées ont pu être utilisées pour mettre en évidence la quantité de peptide PepA2-FLAG lors d'une croissance en milieu carencé NZM.

3.5. Production de PepA2 en milieu NZM

Nous avons réalisé le même protocole que précédemment pour les cultures des souches HG003 et HG003 Δ *sarA* contenant les plasmides pCN35-*sprA2*-FLAG et pCN35-*sprA2*-FLAG + *sprA2_{AS}*. Les protéines totales et extracellulaires ont été extraites et déposées sur un gel Western blot.

Sur la **figure 124**, pour les protéines totales, les deux souches se comportent de la même manière avec une quantité de PepA2-FLAG qui diminuent quand on rajoute l'antitoxine *SprA2_{AS}* (souches 2 et 4). On peut également noter qu'il semblerait y avoir une plus grande quantité de peptide lors d'une culture en NZM que lors d'une culture en TSB (**figure 118**), ce qui serait cohérent avec la diminution de la quantité de l'antitoxine. Néanmoins les quantités de PepA2-FLAG retrouvées dans le milieu extracellulaire sont très différentes entre les deux souches. En effet, le PepA2-FLAG est quasiment inexistant dans le milieu extracellulaire de la souche HG003 alors qu'il est très présent dans celui de la souche HG003 Δ *sarA* (n°3) en absence du gène *sprA2_{AS}* sur le plasmide. Donc la présence de l'antitoxine dans la souche HG003 Δ *sarA* influencerait la présence du peptide dans le milieu extracellulaire lors d'une culture en milieu carencé NZM.

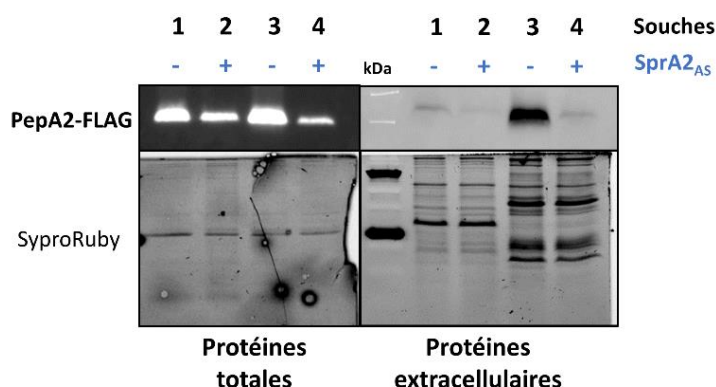


Figure 124 : Western Blot du peptide PepA2-FLAG lors d'une culture en milieu NZM. Extraction des protéines après 1h de stress en NZM. Souches utilisées : (1) HG003 + pCN35-*sprA2*-FLAG ; (2) HG003 + pCN35-*sprA2*-FLAG + *sprA2_{AS}* ; (3) HG003 Δ *sarA* + pCN35-*sprA2*-FLAG ; (4) HG003 Δ *sarA* + pCN35-*sprA2*-FLAG + *sprA2_{AS}*. Expériences réalisées en duplicat.

Nous ne sommes pas allés plus loin dans l'analyse de la production de PepA2 dans la souche $\Delta sarA$. Néanmoins on peut noter que la croissance des souches HG003 est similaire donc la surproduction de PepA2-FLAG n'influence pas la croissance de la souche HG003 $\Delta sarA$ (données non montrées).

Cela étant, nous avons en parallèle poursuivi nos recherches avec les souches existantes pour étudier plus précisément ce peptide en s'intéressant à sa localisation, et son expression au cours du temps, après une découverte fortuite de la présence d'une taille différente de PepA2-FLAG.

4. Des tailles différentes de PepA2 en fonction du milieu

4.1. Localisation de PepA2 dans les différents compartiments cellulaires

Pour aller plus loin dans la caractérisation de PepA2, nous avons décidé de réaliser des extractions de protéines en fractionnement, c'est-à-dire en séparant les compartiments : extracellulaire, la paroi, la membrane et le cytosol. Dans le cas d'un système TA, on s'attend à retrouver le peptide au niveau de la membrane (Sayed et al., 2012b).

De plus, la souche HG003 $\Delta sprA2/\Delta sprA2_{AS}$ a été construite avec le plasmide pIMAY au cours de ma thèse par ma collègue Noëlla Amiot, donc nous avons transformé cette souche avec les plasmides pCN35-*sprA2*-FLAG et pCN35-*sprA2*-FLAG+*sprA2*_{AS} pour que le système endogène n'interfère pas avec les constructions.

Comme nous avons observé une différence de quantité de PepA2 entre les milieux TSB et NZM, nous avons décidé de réaliser le fractionnement dans ces deux conditions en parallèle.

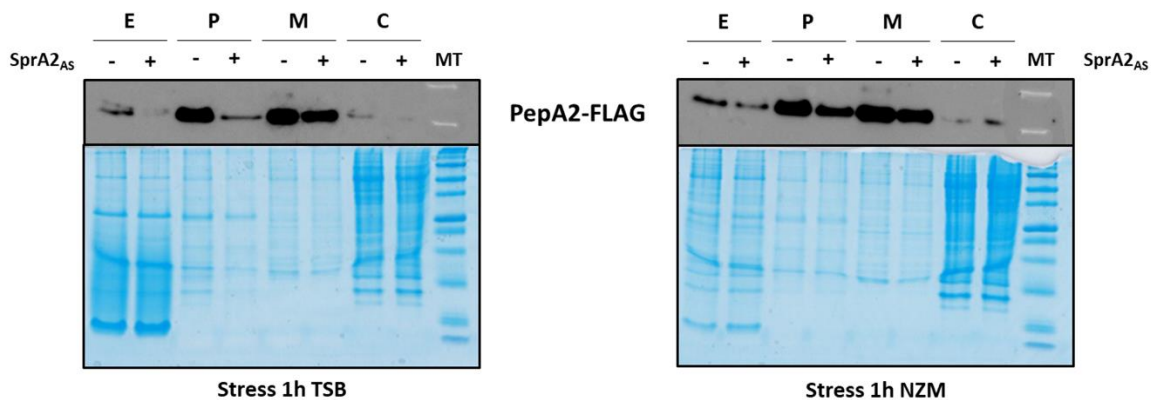


Figure 125 : Western Blot des fractions protéiques de la souche HG003 $\Delta sprA2/\Delta sprA2_{AS}$ + pCN35-*sprA2*-FLAG +/- *sprA2*_{AS}. Les compartiments sont annotés (E) pour milieu extracellulaire, (P) paroi, (M) membrane et (C) pour cytosol. MT : marqueur de taille. Normalisation des dépôts par rapport à la DO. En haut, le gel Western blot révélant la présence de PepA2-FLAG avec un anticorps anti-FLAG. En bas, le gel protéines révélaté avec la coloration ReadyBlue (Sigma).

Dans la partie gauche pour le milieu TSB (**figure 125**), nous observons de gauche à droite les compartiments suivants : milieu extracellulaire, paroi, membrane et cytosol. Le gel du haut correspond à la révélation du PepA2-FLAG avec un anticorps anti-FLAG en western blot, et le gel en-dessous correspond au gel protéines pour vérifier que les dépôts des échantillons sont similaires et donc comparables. Lors d'une culture en TSC, PepA2-FLAG est retrouvé de manière globale en forte quantité dans la paroi et la membrane. Les souches contenant les constructions avec l'antitoxine *SprA2*_{AS} montrent moins de PepA2 dans le milieu

extracellulaire, paroi et le cytosol mais la quantité semble inchangée dans la membrane. Pour le fractionnement en milieu NZM (**figure 125**), nous observons globalement une plus grande quantité de PepA2-FLAG, ce qui est en corrélation avec ce qui avait été observé précédemment (**figure 124**). La présence de SprA2_{AS} semble moins influencer la quantité de PepA2 par rapport au milieu TSB. Cette observation peut s'expliquer par le fait que la quantité de l'ARN SprA2_{AS} est fortement diminuée lors d'un stress NZM (**figures 121 et 123**).

Ces fractionnements permettent (1) de confirmer que la quantité de PepA2-FLAG est plus importante lors d'une croissance en milieu carencé NZM et que (2) le peptide se localise principalement au niveau de la membrane quel que soit le milieu de culture. En effet, les toxines des systèmes TA de type I sont connues pour avoir une action au niveau de la membrane. Ces toxines perméabilisent et/ou dépolarisent la membrane interne des bactéries et peuvent engendrer la mort intracellulaire (Nonin-Lecomte et *al.*, 2021).

4.2. Production de PepA2 au cours de la croissance

Pour suivre l'évolution de la quantité de PepA2 au cours du temps, nous avons réalisé des croissances en milieux TSB et NZM de la souche HG003 + pCN35-*sprA2*-FLAG et extraits les protéines extracellulaires et totales à 2h, 5h et 7h de culture.

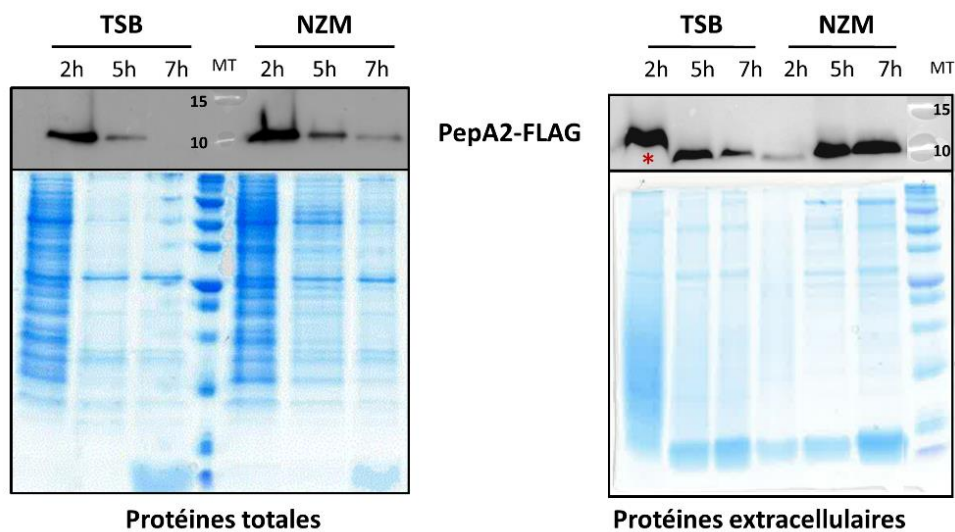


Figure 126 : Production de PepA2 au cours du temps lors d'une croissance en TSB ou NZM. Western blot des protéines extracellulaires et totales et révélation avec anticorps anti-FLAG. Extraits protéiques à 2 – 5 – 7h. En haut, le gel Western blot révélant la présence de PepA2-FLAG avec un anticorps anti-FLAG. En bas, le gel protéines révélé avec la coloration ReadyBlue (Sigma). * : Taille PepA2-FLAG plus grande.

Sur le Western blot en **figure 126**, nous observons de manière globale que la quantité de PepA2 varie en fonction du milieu et au cours du temps. Pour les protéines totales, les deux conditions de culture semblent indiquer un comportement similaire, où le peptide PepA2-FLAG est présent fortement au début de la croissance, et sa quantité diminue pour être quasiment totalement absente à 7h de culture. Néanmoins le gel protéines coloré au ReadyBlue indique une plus forte concentration des protéines totales de manière globale à 2h par rapport à 5h et 7h. Donc la quantité de PepA2-FLAG à 2h peut être influencée par la quantité de protéines totale présente dans la bactérie en début de croissance.

Pour les protéines extracellulaires, le peptide PepA2-FLAG semble présent majoritairement en début de croissance en milieu TSB et à l'inverse une forte présence en fin de croissance pour le milieu carencé NZM.

Le gel de protéines semble indiquer des quantités de protéines similaires entre les puits donc on peut dire que la quantité de PepA2-FLAG semble très importante à 2h et semble diminuer au cours du temps en milieu TSB alors que le phénomène inverse semble observé dans la condition NZM où le peptide est très peu présent au début de la croissance et s'accumule au cours du temps. De plus pour les protéines extracellulaires à 2h lors d'une culture en milieu TSB uniquement, nous observons que la taille du peptide semble plus grande que dans les autres conditions (**figure 126**). Cette observation a été mise en évidence de nombreuses fois dans les protéines extracellulaires seulement lors d'une croissance en milieu TSB. Nous émettons l'hypothèse que le peptide aurait pu subir une modification post-traductionnelle, et probablement une glycosylation avec l'ajout d'un sucre. Cette hypothèse s'explique par le fait que le milieu TSB est supplémenté en glucose, et que le milieu NZM n'a pas de glucose et contient uniquement des sources protéiques. De plus, au début de la croissance le glucose présent dans le milieu est plus disponible pour la bactérie, et il va être consommé au cours de la phase exponentielle de croissance (2 – 5h) donc sa disponibilité va diminuer au cours du temps.

Pour visualiser en détails la taille de PepA2-FLAG au cours de la croissance, la souche HG003 $\Delta sprA2/\Delta sprA2_{AS}$ transformée avec les plasmides pCN35-*sprA2*-FLAG et pCN35-*sprA2*-FLAG+*sprA2*_{AS} a été cultivée en milieu TSB et les protéines extracellulaires ont été extraites toutes les heures et ce durant les 4 premières heures de croissance (**figure 127**).

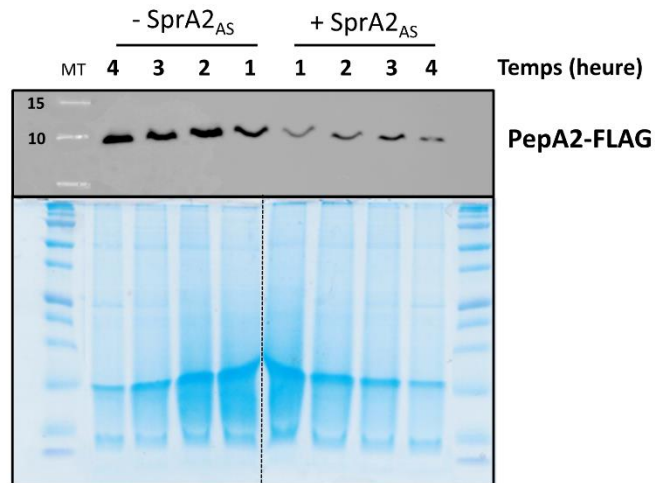


Figure 127 : Taille de PepA2-FLAG dans le milieu extracellulaire en début de croissance. En haut, le gel Western blot révélant la présence de PepA2-FLAG avec un anticorps anti-FLAG. En bas, le gel protéines révélé avec la coloration ReadyBlue (Sigma). La séparation sur le gel protéine indique que les images viennent de deux gels différents. MT : marqueur de taille protéique, les bandes à 10 et 15 kDa sont indiquées sur le gel.

Ces extraits ont été déposés sur un gel de Western blot pour révéler la présence du peptide PepA2-FLAG au cours du temps (**figure 127**). Dans les 4 premiers puits, on peut observer que la taille de PepA2-FLAG diminue au cours du temps avec une plus grande taille à 1h de culture. La taille semble diminuer progressivement toutes les heures. Pour la souche avec le plasmide pCN35-*sprA2*-FLAG+*sprA2*_{AS}, la quantité globale de PepA2-FLAG est plus faible due à la présence de l'antitoxine SprA2_{AS} qui empêche la

traduction du peptide. De plus, la même diminution de taille du peptide semble observée avec l'ajout de l'antitoxine. Ces données préliminaires tendent à confirmer la diminution de la taille de PepA2-FLAG au cours de la croissance de *S. aureus*. Les ARN de ces cultures ont été extraits en parallèle, et on peut noter qu'aucune différence de taille de l'ARN SprA2 a été observée durant les 4 premières de croissance (données non montrées).

Pour aller plus loin et confirmer que la différence de taille est due à une modification post-traductionnelle de type glycosylation, nous souhaiterions ajouter du glucose dans le milieu de culture au bout de 4-5h de croissance. Si cet ajout entraine une augmentation de la taille du peptide PepA2-FLAG, alors nous pourrions aller plus loin sur le rôle de cette modification post-traductionnelle sur la toxine d'un système TA de type I chez *S. aureus*.

4.3. Immunoprécipitation de PepA2-FLAG

Comme nous avons observé une potentielle modification post-traductionnelle sur le PepA2-FLAG en condition TSB dans le milieu extracellulaire, nous avons décidé de réaliser une immunoprécipitation du peptide en comparant les conditions de croissance avec les milieux TSB et NZM et en réalisant les extractions des protéines totales et extracellulaires. Nous avons testé différentes conditions en mettant dans un premier temps, les extraits protéiques sur les billes ou l'anticorps anti-FLAG sur les billes. Pour illustrer cette partie, sur la **figure 128** nous avons tenté de réaliser une IP avec les protéines totales extraites à partir de milieu TSB et NZM (inputs 1 et 2). Nous avons déposé les inputs et les IP sur un gel tris-tricine et réalisé le Western blot. Sur le **figure 128**, nous observons que la quantité de PepA2-FLAG est moins importante dans les deux IP que dans les inputs initiaux donc nous ne sommes pas parvenus à purifier le peptide. Nous n'avons pas eu le temps d'optimiser cette partie pour l'envoyer en spectrométrie de masse pour identifier cette potentielle modification post-traductionnelle. De plus, cette expérience serait à réitérer avec la souche HG003 $\Delta sprA2\Delta sprA2_{AS}$ + pCN35-*sprA2*-FLAG construite ultérieurement.

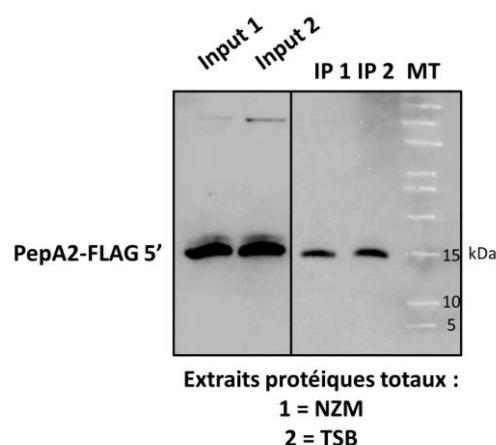


Figure 128 : Immunoprécipitation du PepA2-FLAG. MT : marqueur de taille.

En conclusion, SarA réprime la transcription du gène *srn_2230_sprG2* lors d'une croissance en milieu riche (TSB). Néanmoins le mutant HG003 $\Delta sarA$ a une croissance similaire à la souche parentale, pour autant que le ratio toxine/antitoxine semble en défaveur de l'antitoxine SprF2 et donc potentiellement plus de toxine codée par *sprG2* devrait être produite. Nous proposons donc qu'il existe un deuxième niveau de régulation empêchant la traduction de la toxine dans les conditions expérimentales étudiées, et permet à la souche HG003 $\Delta sarA$ de ne pas rentrer en bactériostase.

Donc l'équilibre du système toxine-antitoxine SprG2/SprF2 semble contrôler : à la fois au niveau ADN avec la répression transcriptionnelle du gène codant sa toxine par le FT SarA, mais aussi au niveau ARN avec l'intervention de l'antitoxine SprF2 qui interfère à un autre niveau dans la production de la toxine codée par *sprG2*. Ces types de régulation permettent à *S. aureus* de contrôler rigoureusement l'expression de ces systèmes toxine-antitoxine de type I.

Pour le système SprA2/SprA2_{AS}, lors d'une croissance en milieu carencé (NZM), la quantité de l'antitoxine SprA2_{AS} diminue alors que celle de SprA2 reste inchangée. Nous avons montré que cette diminution n'est pas en lien avec une répression transcriptionnelle plus forte par SarA. Dans ces conditions, le ratio toxine/antitoxine est en faveur de la toxine, et nous avons validé que le PepA2-FLAG est plus présent lors d'une culture en milieu NZM par rapport au milieu TSB. Donc cette carence nutritive pourrait être un signal pour induire la production de la toxine, et induire la mort d'une partie de la population par altruisme. Enfin, nous avons observé une différence de taille du PepA2-FLAG présent dans le milieu extracellulaire lors d'une culture en TSB en début de phase exponentielle de croissance (2h). Cette différence pourrait être dû à une modification post-traductionnelle modifiant les propriétés de PepA2 au début de la croissance.

Le rôle de SarA avec le contrôle de l'expression d'un partenaire d'un système TA de type I n'a pas pu être élucidé, néanmoins ces travaux ont ouvert des perspectives sur le mode de fonctionnement du système SprA2/SprA2_{AS} chez *S. aureus*.

Partie 4 : Double régulation de l'expression d'ARN régulateurs

A. RsaD, une cible régulée par CodY et SarA

Parmi les nouvelles cibles sARNs directes de SarA détaillées dans la première partie de ce manuscrit, nous avons identifié l'ARNreg *Srn_1640_RsaD*. Par conséquent, SarA s'ajoute aux 4 régulateurs qui agissent de manière directe ou indirecte sur l'expression de *rsaD* (**figure 129**). En effet, l'expression de cet ARNreg est contrôlée par l'intégration de signaux externes (stress, NO⁺, QS), par les régulateurs SigB, SrrA et par le système Agr mais aussi par des signaux internes (GTP, ILV) via la régulation par CodY (Augagneur et al., 2020).

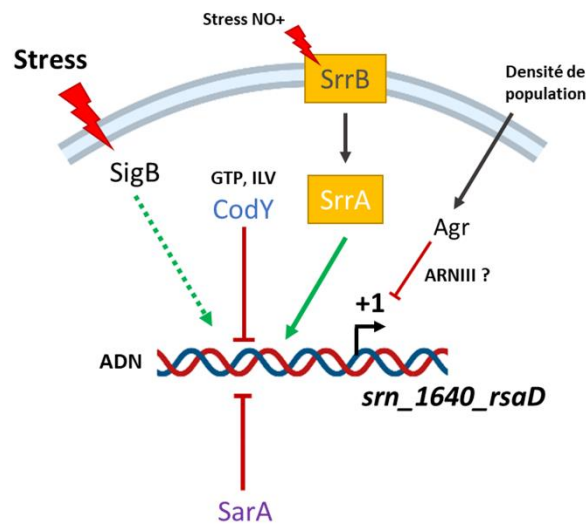


Figure 129 : Régulations du gène *srn_1640_rsaD* exprimant un ARNreg chez *S. aureus* (d'après Augagneur et al., 2020 et Oriol et al., 2021). ILV : Isoleucine, Leucine, Valine. +1 : site d'initiation de la transcription.

CodY est un régulateur présent chez les bactéries à Gram positif, et son mécanisme de régulation a été beaucoup étudié ces dernières années. CodY agit majoritairement sous forme de répresseur, et est capable d'intégrer la disponibilité en nutriments et le métabolisme avec l'expression de gènes de virulence (Rivera et al., 2012) (Montgomery et al., 2012) (Brinsmade, 2017). CodY régule de nombreuses fonctions cellulaires, comme la production d'acides aminés (Majerczyk et al., 2010), et est lié à la réponse stringente chez la bactérie (Geiger et Wolz, 2014). L'activité de CodY passe par la formation d'homodimère, et sa fixation à l'ADN est médiée à la fois par le GTP et la présence d'acides aminés à chaîne ramifiée (isoleucine, valine et leucine) (Levdikov et al., 2006). Si ces deux éléments sont liés à CodY alors sa fixation à l'ADN permettra une forte répression transcriptionnelle de ses gènes cibles. Ainsi, l'activité répressive de CodY s'opère majoritairement en début de croissance, notamment quand les acides aminés sont disponibles dans le milieu et son activité va diminuer progressivement au cours du temps (Augagneur et al., 2020).

Le FT SarA, lui est un régulateur pléiotropique présent seulement chez le genre *Staphylococcus*, et est impliqué dans la régulation de nombreuses fonctions allant de la formation de biofilm (Valle et al., 2003) à la régulation de facteurs de virulence comme la production de toxines (Chien et al., 1999) (Ziebandt et al.,

2001) (Andrey et al., 2010). SarA peut agir en tant que répresseur ou activateur en se fixant sous forme de dimère en amont des gènes qu'elle régule (Chien et al., 1999) (Rechtin et al., 1999). La spécificité de fixation à l'ADN et les modifications post-traductionnelles de SarA pour la rendre plus ou moins affine à l'ADN sont encore peu connues aujourd'hui. Ainsi, nous ne connaissons pas encore les signaux déclencheurs affectant son activité régulatrice.

Le fait que CodY et SarA contrôlent directement l'expression d'un même gène exprimant un ARNreg, nous a amené à comparer l'ensemble des cibles sARNs retrouvées dans notre RNA-Seq (Oriol et al., 2021) avec les données RNA-Seq de Augagneur et al, portant sur les sARNs régulés par CodY chez *S. aureus*.

B. D'autres cibles sARN communes aux régulateurs SarA et CodY ?

Augagneur et al, ont réalisé une analyse RNA-Seq combinée sur trois souches de *S. aureus* : Newman, USA300 et UAMS-1. Cette analyse à haut débit suivie de validations expérimentales a révélé que CodY réprime directement l'expression du gène *sm_1640_rsaD* (Augagneur et al., 2020). Nos travaux ont également montré que *rsaD* est réprimé directement par SarA (Oriol et al., 2021). Nous nous sommes alors demandés si la double régulation de *rsaD* était un cas unique ou si plusieurs gènes sARNs étaient soumis à la double régulation SarA - CodY.

Ainsi, nous avons comparé les données RNA-Seq sur l'étude du régulon CodY avec les résultats RNA-Seq portant sur le régulon SarA décrits dans la partie 1 de ce travail. Nous nous sommes concentrés sur les cibles sARNs, et plus particulièrement sur les cibles réprimées par ces deux régulateurs. En effet, CodY agit majoritairement sous forme de répresseur, de plus dans la première partie de ce manuscrit, nous nous étions focalisés sur les cibles réprimées par SarA. Enfin, le gène *rsaD* est réprimé à la fois par CodY et SarA, c'est pourquoi nous avons décidé d'étudier uniquement le statut répresseur de SarA et CodY sur de nouveaux gènes sARNs chez *S. aureus*.

L'effet de la délétion de *codY* sur le transcriptome dans les différentes souches de *S. aureus* a été mesuré en phase exponentielle de croissance, où l'activité de CodY est forte (Augagneur et al., 2020). Dans notre étude, l'impact de SarA a été évalué en phase exponentielle de croissance (2h) et en début de phase stationnaire (4h30) (Oriol et al, 2021). Ainsi, la comparaison des deux analyses transcriptomiques nous donnent un aspect de l'ensemble des régulations par CodY et SarA en phase exponentielle de croissance. Cette comparaison a mis en évidence que 11 des 37 gènes sARNs réprimés par *sarA*, le sont aussi par *codY* (**tableau 14**). La moitié de ces sARNs sont prédits comme régulateurs agissant en « *trans* » et l'autre moitié agissant en « *cis* » ou sont localisés dans des parties 5'UTR d'un gène.

Dans ces conditions, la quasi-totalité des cibles sARNs en commun réprimées par CodY et SarA sont révélées en début de phase stationnaire de croissance (4h30) dans l'étude transcriptomique du régulon SarA.

Gènes sARN	Différentiel d'expression en RNA-Seq (Augagneur et al., 2020)			Base de données SRD	Différentiel d'expression en RNA-Seq (Oriol et al., 2021) HG003 $\Delta sarA$ vs HG003	
	Newman $\Delta codY$	USA300 $\Delta codY$	UAMS-1 $\Delta codY$	Catégorie	2h	4h30
<i>srn_0050_teg1</i>	17,9	24,4	18,2	Régulateur agissant en <i>cis</i>	-	4,2
<i>srn_0860_rsaOB</i>	64,6	79,2	42,9	Régulateur agissant en <i>cis</i>	-	10,5
<i>srn_1640_rsaD</i>	102,9	139,8	137,9	Régulateur agissant en <i>trans</i>	-	10,4
<i>srn_3340_teg72</i>	2,6	-	3,2	Localisé dans 5'UTR	5,6	-
<i>srn_3500_sRNA277</i>	4,0	-	-	Localisé dans 5'UTR	-	3,2
<i>srn_3630_sau69</i>	2,4	-	2,6	Localisé dans 5'UTR	4,3	3,5
<i>srn_3950_teg16</i>	533,5	170,4	585,1	Régulateur agissant en <i>trans</i>	-	21,8
<i>srn_4680_sau19</i>	2,3	-	-	Régulateur agissant en <i>trans</i>	-	4,6
<i>srn_4970_sRNA398</i>	14,4	7,8	6,9	ND	7,4	8,8
<i>srn_9335_tsr29</i>	2,1	5,2	Absent*	Régulateur agissant en <i>trans</i>	3,1	5,5
<i>srn_9340_sRNA287</i>	2,7	-	Absent*	Régulateur agissant en <i>trans</i>	13,9	24,8

Tableau 14 : Compilations de données transcriptomiques des gènes sARNs réprimés par CodY et SarA (Augagneur et al., 2020) (Oriol et al., 2021). ND : non détecté dans les données SRD ; absent* : gènes localisés dans l'îlot de pathogénie vSa β , absent de la souche UAMS-1. Gènes sur fond bleu, gènes sélectionnés pour la suite de l'étude.

Pour les gènes *srn_0050_teg1*, *srn_0860_rsaOB*, *srn_1640_rsaD* et *srn_3950_teg16* retrouvés dans les souches Newman, UAMS-1, USA300 et HG003, leur différentiel d'expression varie entre 17 et 585 dans les souches délétées du gène *codY* et de 4 à 22 pour la souche HG003 $\Delta sarA$ (**tableau 14**), et c'est le gène *teg16* qui présente les plus forts différentiels d'expression. Donc l'expression et/ou la stabilité de ces 4 sARNs est/sont plus impactée(s) par l'absence de *codY* et de *sarA*. Nous avons choisi de sélectionner ces 4 gènes sARNs avec les différentiels d'expression les plus importants pour l'étude de la double régulation CodY - SarA chez *S. aureus*.

1. Organisation génétique et recherche *in silico* des consensus de fixation de CodY et SarA

L'exemple de l'ARNreg RsaD dont l'expression est doublement contrôlée par les régulateurs CodY et SarA, nous a incité à rechercher si des similitudes existent entre les gènes sARNs régulés par ces deux régulateurs. Ainsi, nous avons souhaité (1) étudier l'environnement génétique des 4 gènes cibles sARN sélectionnés et (2) localiser les consensus de fixation de ces deux FT sur les régions promotrices de ces 4 gènes.

1.1. Organisation génétique des gènes sARN

Les 4 gènes *srn_0050_teg1*, *srn_0860_rsaOB*, *srn_1640_rsaD* et *srn_3950_teg16* se situent tous dans le core génome, donc étudier les régulations de ces gènes permettrait d'identifier des mécanismes généraux de régulations, comme CodY et SarA sont aussi présents chez l'ensemble des souches de *S. aureus*. Les organisations génétiques ont été réalisées avec les informations disponibles dans la base de données Auréowiki (Fuchs et al., 2018).

Dans la souche *S. aureus* NCTC8325, le gène *srn_1640_rsaD* se situe sur le brin (-) à proximité, sur le brin opposé, d'un gène codant un ABC transporteur (*abcA*), d'un transporteur de nucléosides (*nupG*) et d'un gène codant une protéine hypothétique (SAOUHSC_00651) (**figure 130A**). RsaD est un ARN régulateur agissant en « *trans* », qui régule la production de l'enzyme AlsS lors d'un faible stress acide chez *S. aureus* (Augagneur et al., 2020).

Le gène *srn_3950_teg16* se situe en amont des gènes *ilv-leu* (SAOUHSC_02281-02289) (**figure 130B**). Ces gènes forment un opéron impliqué dans la biosynthèse d'acides aminés à chaîne ramifiée (BCAAs) (Kaiser et al., 2018). L'expression de cet opéron est sous le contrôle direct du répresseur CodY (Majerczyk et al., 2010).

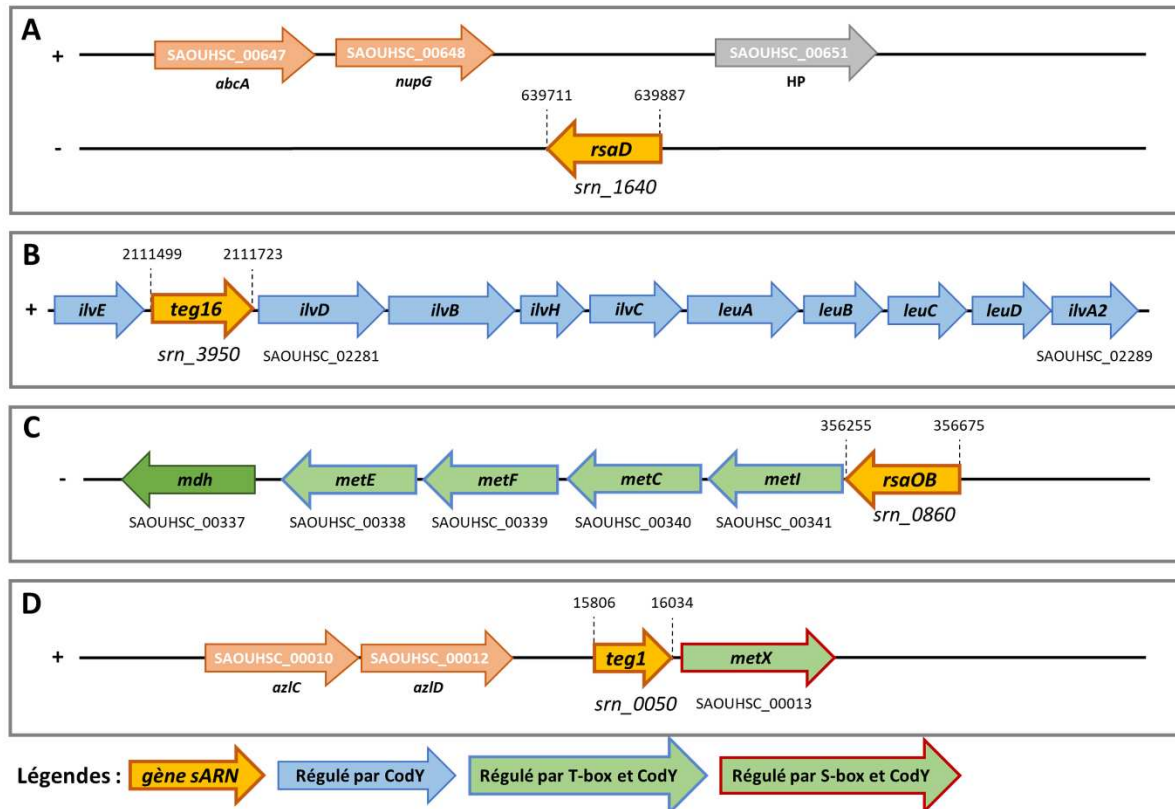


Figure 130 : Organisations génétiques chez la souche *S. aureus* NCTC8325 des 4 gènes sARNs. (A) *srn_1640_rsaD*, (B) *srn_3950_teg16*, (C) *srn_0860_rsaOB* et (D) *srn_0050_teg1*. HP : protéine hypothétique.

Les deux gènes *srn_0860_rsaOB* et *srn_0050_teg1* régulés à la fois par CodY et SarA, se situent en amont de gènes *met* impliqués dans la biosynthèse de la méthionine et de la S-adenosylméthionine (SAM). En effet, *srn_0860_rsaOB* se situe sur le brin (-) en amont de l'opéron *metICFE* (**figure 130C**). Cet opéron est soumis à différents niveaux de régulation : son expression est contrôlée par le régulateur CodY et par un mécanisme riboswitch de type T-box (Wencker et al., 2021). En présence de méthionine, le riboswitch permet de contrôler la transcription de l'opéron *met* via la fixation d'un ARNt-Met chargé qui va conduire à la formation d'une structure terminatrice de la transcription. Enfin, le gène *srn_0050_teg1* se situe sur le brin (+) en amont du gène *metX*, qui code une homosérine O-acétyltransférase (**figure 130D**). Cette enzyme intervenant au début de la voie de biosynthèse de la méthionine et de la SAM. Ce gène serait sous le contrôle de CodY et d'un mécanisme S-box riboswitch. Les gènes *azlC-azlD* sont situés à proximité de *srn_0050_teg1* et codent un transporteur d'acides aminés à chaîne ramifiée (BCAAs) (Fuchs et al., 2018).

1.2. Positionnement des consensus CodY et SarA

Nous avons recherché *in silico* les consensus de fixation pour chacun des régulateurs CodY et SarA. Ainsi, d'après Majerczyk et al, le consensus de fixation de CodY correspond à la séquence palindromique :

AATTTTCWGAAAATT (Majerczyk et al., 2010). Le site de fixation de SarA étant plus difficile à déterminer, nous avons utilisé notre analyse consensus Glam2/Glam2Scan et retenu les zones retrouvées avec le logiciel Glam2Scan de la partie 1 de ce manuscrit (**tableau 10**). Nous partons donc du principe que ces séquences Glam2Scan contiennent le consensus SarA. Comme SarA se fixe sous forme de dimère sur l'ADN, cette séquence Glam2Scan pourrait contenir deux séquences de fixation (séquence palindromique ou séquences répétées en tandem ou inversées) (Chien et al., 1999) (Rechlin et al., 1999).

Nous avons replacé les séquences promotrices -10 et -35 et le site initiateur de la transcription (+1) avec les données de Prados. Leurs données répertorient les régions promotrices prédites pour l'ensemble des gènes de *S. aureus*, y compris les gènes sARNs (Prados et al., 2016).



Figure 131 : Positionnement du consensus CodY et de la zone de fixation de SarA en amont des gènes sARNs *srn_1640_rsaD*, *srn_350_teg16*, *srn_860_rsaOB* et *srn_0050_teg1* chez la souche NCTC8325. Consensus de fixation de CodY (bleu) et zone de fixation de SarA (souligné). En orange, les régions -10 et -35 prédites par Prados et al., (2016).

Les zones de fixation de SarA et CodY se situent en amont du site d'initiation de la transcription (+1) pour les trois gènes *rsaD*, *teg16* et *rsaOB* (**figure 131**). Pour le gène *srn_0050_teg1*, il n'a pas été utilisé ni retrouvé dans l'analyse Glam2/Glam2Scan du consensus SarA, mais nous avons identifié un potentiel consensus CodY de manière manuelle. La fixation de CodY et SarA serait à vérifier par retard sur gel avec la région promotrice de *teg1*, qui expliquerait la répression transcriptionnelle par ces deux régulateurs.

Pour les gènes *rsaD*, *teg16* et *rsaOB*, la zone de fixation de SarA est cohérente avec la répression transcriptionnelle observée en Northern Blot (partie 1), car elle masque une partie ou la totalité de la région -35. SarA empêcherait donc la fixation de l'ARN polymérase. Ce mécanisme a déjà été observé dans la régulation des gènes sARNs *srn_3610_sprC* et *srn_9340* par SarA (Mauro et al., 2016).

De plus, cette analyse montre que la séquence contenant la potentielle zone de fixation de SarA chevauche toujours le consensus CodY (**figure 131**). Cette information est compatible avec la double régulation de l'expression de *rsaD*, *teg16* et *rsaOB*. Les protéines CodY et SarA sont produites de manière constante au cours de la croissance (Ratnayake-Lecamwasam et al., 2001) (Oriol et al., 2021). Dans ce cas, ce seraient les modifications post-traductionnelles au cours de la croissance qui influencerait l'activité régulatrice de CodY et SarA.

En effet, CodY pourrait réprimer l'expression de ces gènes sARNs en phase exponentielle de croissance (Augagneur et al., 2020), ce qui masquerait la zone de fixation de SarA. Comme l'activité de CodY diminue au cours du temps, il laisserait sa place à SarA qui réprimerait à son tour l'expression de *rsaD*, *teg16* et *rsaOB* (Oriol et al., 2021). Cette hypothèse expliquerait les temporalités observées en RNA-Seq, où les gènes cibles sont réprimés par CodY en phase exponentielle et en début de phase stationnaire par SarA (**tableau 14**). Une telle compétition pour une même zone ADN a déjà été observée entre CodY et le régulateur de réponse SaeR chez *S. aureus*. Tant que les nutriments sont abondants, CodY se fixe sur les gènes cibles et réprime leur expression, cette fixation masque alors le site de fixation de SaeR. Au fur et à mesure de la croissance, CodY se décroche et laisse sa place au régulateur SaeR, qui va activer la transcription des gènes cibles (Mlynek et al., 2018).

Enfin, des validations expérimentales par retard sur gel et par empreinte à la DNase I seraient nécessaires pour confirmer les zones de fixation des régulateurs CodY et SarA. L'empreinte à la DNase permettrait de mettre en évidence la zone globale de fixation, qui sera confirmée par des retards sur gel avec des régions mutées ponctuellement pour rechercher les nucléotides essentiels aux fixations.

Pour finir, les gènes *smn_0050_teg1*, *smn_0860_rsaOB* et *smn_3950_teg16* se situent tous en amont de gènes intervenant dans la biosynthèse des acides aminés chez *S. aureus* (BCAAs ou méthionine/SAM). Cette fonction métabolique pourrait donc être contrôlée de manière coordonnée par CodY et SarA chez cette bactérie.

2. Que sait-on sur le sARN Teg16 ?

2.1. Le gène *teg16* et l'opéron *ilv-leu*, liés plus que jamais

L'environnement génétique du gène *smn_3950_teg16* indique qu'il se trouve en amont l'opéron *ilv-leu*. Cet opéron est directement régulé par CodY et est impliqué dans la synthèse des acides aminés à chaîne ramifiée (BCAA), régulant eux-mêmes l'activité de CodY.

En 2010, avant l'annotation des gènes sARNs, deux sites de fixation de CodY avaient été identifiés de part et d'autre du +1 de transcription du gène *ilvD* (Majerczyk et al., 2010). En compilant les données de Majerczyk et al, avec les données recueillies jusqu'à ce jour, et notamment en plaçant le gène sARN *teg16*, on peut proposer l'organisation présentée dans la **figure 132**. CodY se fixerait donc en amont du gène *smn_3950_teg16* et dans ce dernier. Les données de Prados prédisent un unique site +1 en amont de l'opéron *ilv-leu*, ce qui confirme que *teg16* fait partie intégrante de la région 5'UTR de l'opéron. Nous proposons donc de repositionner le +1 par rapport aux régions -10 et -35 prédites, et il se situerait dans la deuxième zone de fixation de CodY. Ce +1 correspond donc au début du gène sARN *teg16*. Les prédictions de Prados sont également en accord avec les données transcriptomiques (Oriol et al., 2021). Par conséquent, la fin du gène *teg16* se situerait 83 nt en amont du codon d'initiation de la traduction ATG de *ilvD*.

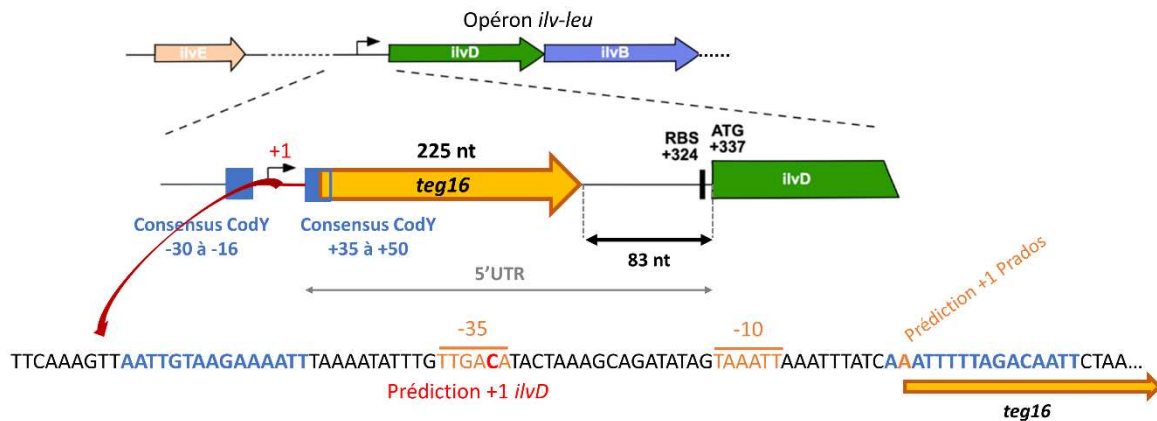


Figure 132 : Proposition de l'organisation de l'opéron *ilv-leu* en intégrant le gène *teg16*, adapté de Kaiser et al, 2018. Les consensus de CodY sont indiqués en bleu. Les régions -35 et -10 prédites sont issues des données de Prados et al, 2016. RBS : site de fixation du ribosome.

De plus, les données RNA-Seq semblent également favoriser l'hypothèse d'un seul transcrit pour *teg16-ilv-leu*. Les transcriptomes réalisés par Augagneur et al, mettent en évidence que le gène *srn_3950_teg16* et l'opéron *ilv-leu* sont les gènes les plus réprimés par CodY dans leurs conditions (différentiel d'expression entre 300 et 500) (Augagneur et al., 2020). Concernant la fixation de SarA, le ChIP-Seq a révélé uniquement une zone de fixation en amont du gène *teg16* et non à proximité du promoteur *ilvD*. Néanmoins, l'ensemble de l'opéron *ilv-leu* fait partie des cibles réprimées par SarA avec un différentiel d'expression moyen de 16 à 4h30, contre 22 pour *teg16* (**tableau 21 en annexe**). Cette unique fixation de SarA et l'ensemble des gènes *teg16-ilv-leu* qui sont réprimés par SarA, renforcent le fait que la régulation de *teg16* et *ilv-leu* a lieu uniquement en amont du gène *teg16* et conduit à la formation d'un long transcrit unique. L'ensemble de ces données expérimentales tendent à confirmer les zones de fixation de CodY et SarA identifiées *in silico* en amont du gène sARN *teg16*. La fixation de SarA ou CodY sur ces zones est responsable de la répression transcriptionnelle de *srn_3950_teg16* observée en RNA-Seq (**tableau 14**).

2.2. Quelle(s) fonction(s) pour Teg16 ?

Comme le gène sARN *teg16* se situe dans la partie 5'UTR de l'opéron *ilv-leu*, alors il pourrait être un riborégulateur agissant en « *cis* » et contrôlerait l'expression de cet opéron responsable de la biosynthèse des acides aminés à chaîne ramifiée. Les données transcriptomiques indiquent qu'une forte présence de Teg16 est accompagnée de la forte présence de l'ARNm de l'opéron *ilv-leu*. Plusieurs hypothèses peuvent donc être posées : Teg16 pourrait (1) être un régulateur de type riboswitch T-box, qui pourrait se lier aux ARNt-ILV chargés et bloquer la transcription quand les acides aminés sont disponibles dans le milieu et/ou (2) être un régulateur qui agit en « *trans* » sur d'autres cibles encore inconnues, car deux tailles de transcrits sont détectées en Northern blot pour Teg16 (Partie 1 - **figure 84**). Aucun terminateur de transcription Rho-indépendant n'a été prédit dans la séquence de cet ARN avec le logiciel ARNold (Naville et al., 2011). La détection de ces transcrits pourraient être due à l'action d'une RNase qui cliverait le long transcrit en amont du gène *ilvD* pour libérer l'ARN Teg16.

Il a été montré que RsaD est un ARN régulateur agissant en « *trans* » qui contrôle la production de l'acétolactate synthase AlsS lors d'un faible stress acide (Augagneur et al., 2020). Le second gène de l'opéron *ilv-leu* potentiellement régulé par Teg16 est le gène *ilvB* codant une acétolactate synthase. En résumé, RsaD contrôle au niveau traductionnelle la production de l'acétolactate synthase AlsS, et Teg16 pourrait agir au niveau transcriptionnel pour contrôler l'expression de l'acétolactate synthase IlvB.

Par conséquent, CodY et SarA réprimerait directement l'expression de *rsaD*, *teg16* et l'opéron *ilv-leu* et RsaD et Teg16 contrôlerait au niveau traductionnelle (AlsS) et transcriptionnelle (*ilvB*) la production de deux acétolactate synthases respectivement. Ces niveaux de régulation permettraient de contrôler de manière rigoureuse la production de cette enzyme chez *S. aureus*. Donc ces deux nouvelles cibles sARNs régulées par CodY et SarA pourraient partager des fonctions communes chez cette bactérie.

Nous avons décidé de poursuivre l'étude fonctionnelle de Teg16 en (1) validant la forte présence de Teg16 dans une souche délétée du gène *codY*, et (2) en étudiant les quantités de Teg16 et RsaD au cours du temps.

3. RsaD et Teg16, une fonction commune chez *S. aureus* ?

3.1. Vérification de la répression de *teg16* par CodY et SarA dans la souche Newman

Pour continuer l'étude de la régulation du gène sARN *smn_3950_teg16*, nous avons extrait les ARN des souches Newman, Newman $\Delta sarA$ et Newman $\Delta codY$, après culture en milieu riche TSB. Dans un premier temps, nous avons choisi la souche Newman pour valider les données transcriptomiques décrites entre la souche Newman et Newman $\Delta codY$ (Augagneur et al., 2020). Sur le Northern blot (**figure 133**), nous pouvons observer que, dans les souches Newman $\Delta sarA$ et Newman $\Delta codY$, l'ARN Teg16 est présent sous deux tailles et que la grande taille est très majoritaire dans la souche Newman. Nous avons déjà observé deux tailles de Teg16 dans la souche HG003 en Northern Blot. Dans la souche Newman $\Delta sarA$, le niveau d'ARN Teg16 est plus important que dans la souche Newman, ce qui confirme la répression transcriptionnelle observée dans la souche HG003 (Partie 1 - **figure 84**). Néanmoins, Teg16 est présent en plus grande quantité dans la souche Newman $\Delta codY$ par rapport aux deux autres souches. Ce Northern blot valide donc les données RNA-Seq, où l'ARN Teg16 est très fortement présent dans une souche Newman $\Delta codY$ par rapport à la souche sauvage (différentiel d'expression de 500) (Augagneur et al., 2020).

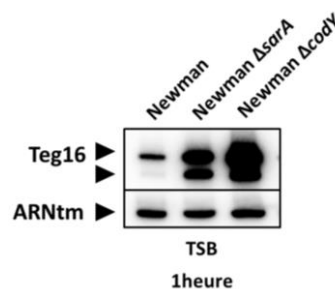


Figure 133 : Northern blot des ARN extraits dans les souches Newman, Newman $\Delta sarA$ et Newman $\Delta codY$. Les souches ont été mises en culture en TSB jusqu'à une densité optique égale à 2, et remis en culture dans un milieu TSB frais pendant une heure. On peut considérer que les ARN ont été extraits en phase exponentielle de croissance.

Dans la souche *S. aureus* Newman, l'absence de *codY* semble impacter plus fortement le niveau d'ARN *Teg16*, que l'absence de *sarA*. Nous savons que CodY et SarA se fixent sur l'ADN pour réguler l'expression des gènes cibles et que des zones de fixation chevauchante de ces deux FT ont été mises en évidence dans la région promotrice du gène *srn_3950_teg16*. Ce Northern blot pourrait donc indiquer que CodY réprime plus fortement la transcription du gène *srn_3950_teg16* que SarA dans cette condition. On peut considérer que ces ARN ont été extraits en phase exponentielle de croissance, ce qui confirmerait notre hypothèse comme quoi CodY agirait en tant que répresseur en début de croissance.

Cette observation nous a amené à nous demander si CodY ou SarA pouvait réguler mutuellement leur expression. Les données RNA-Seq disponibles ne montrent pas de variation d'expression d'un FT en absence de l'autre, SarA ne régulerait donc pas l'expression de *codY* et inversement (Augagneur et al., 2020) (Oriol et al., 2021). Néanmoins nous ne savons pas comment un FT pourrait influencer sur l'activité de l'autre, notamment dans leur capacité à se fixer à l'ADN via des modifications post-traductionnelles (GTP et ILV pour CodY par exemple).

L'ensemble des résultats décrits ci-dessus indiquent que, comme pour *srn_1640_rsaD*, SarA et CodY seraient deux répresseurs directs de l'expression du gène *srn_3950_teg16*. La fixation spécifique de SarA a été démontrée *in vitro* par un retard sur gel entre la région promotrice de *teg16* et la protéine SarA (partie 1 – **figure 85**), mais la fixation de CodY reste encore à confirmer de manière expérimentale.

Une telle situation a déjà été observée entre ces deux régulateurs, avec la répression de l'expression de l'ARNIII en phase exponentielle de croissance, ARN régulateur majeur chez *S. aureus* (Majerczyk et al., 2010). Le profil de l'ARNIII a été suivi par Northern blot en phase exponentielle et stationnaire de croissance dans les souches UAMS-1, sauvage (WT), $\Delta codY$, Δagr (*arnIII* absent), $\Delta agr/codY$, $\Delta sarA$, $\Delta agr/sarA$ et le triple mutant $\Delta agr/codY/sarA$ (**figure 134**).

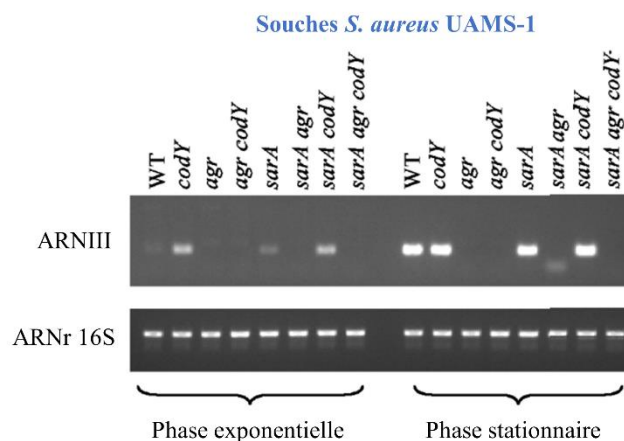


Figure 134 : Niveau de l'ARNreg ARNIII dans différents mutants UAMS-1 chez *S. aureus* (d'après Majerczyk et al., 2010). Les ARN ont été extraits dans différentes souches *S. aureus* UAMS-1 en phase exponentielle et stationnaire de croissance. L'ARNr 16S sert de contrôle de dépôt.

En phase exponentielle, l'effet de l'absence de *codY* est plus fort que l'absence de *sarA*, avec une quantité d'ARNIII supérieure dans le mutant UAMS-1 $\Delta codY$ par rapport à UAMS-1 $\Delta sarA$. Le niveau de l'ARNIII

est similaire entre le mutant UAMS-1 $\Delta codY$ et le double mutant UAMS-1 $\Delta codY/sarA$, ce qui indique que seul l'effet de *codY* est observé dans le double mutant en début de croissance. En phase stationnaire, les niveaux d'ARNIII entre les souches UAMS-1, UAMS-1 $\Delta codY$ et UAMS-1 $\Delta sarA$ sont identiques, ce qui montre la dérégulation totale du gène codant l'ARNIII par CodY et SarA dans la souche sauvage en fin de croissance.

Par conséquent, la régulation de *srn_3950_teg16* par CodY et SarA semble similaire à celle du gène exprimant l'ARNIII, avec une plus forte répression de ce gène par CodY en phase exponentielle de croissance chez la souche *S. aureus* Newman. Il serait donc intéressant de regarder (1) le niveau de l'ARN Teg16 dans les souches WT, $\Delta sarA$, $\Delta codY$ et le double mutant *sarA/codY* et (2) si le même effet est observé avec l'ARN RsaD chez ces différentes souches au cours de la croissance, comme ces deux sARNs semblent liés d'un point de vue fonctionnel.

Pour continuer dans le même contexte génétique que le début de ces travaux, nous avons décidé d'étudier le profil d'expression des sARNs Teg16 et RsaD chez la souche *S. aureus* HG003.

3.2. Construction du mutant *S. aureus* HG003 $\Delta codY$

Pour explorer l'étude de la régulation des cibles sARNs communes à CodY et SarA, nous avons tenté de construire le mutant HG003 $\Delta codY$ pour travailler dans le même fond génétique que le mutant HG003 $\Delta sarA$ et pour potentiellement faire un double mutant de ces deux FT.

Les mutants Newman et USA300 $\Delta codY$ résistants à l'érythromycine, sont disponibles au laboratoire. Nous avons construit des phages avec ces deux souches et réaliser une transduction dans les souches HG003 et HG003 $\Delta sarA$ (résistante à la kanamycine). Malgré plusieurs tentatives et modifications de protocoles, nous ne sommes jamais parvenus à obtenir les transductants souhaités dans la souche HG003.

Nous nous sommes donc tournés vers la construction du mutant HG003 $\Delta codY$ avec le plasmide pIMAY permettant une double recombinaison homologue et ne nécessitant pas de marqueur de sélection dans la souche finale (Monk et al., 2012). Cette partie a été réalisée avec l'aide d'une stagiaire en master 1 de microbiologie, Julia Papail. Après avoir validé le clonage chez *E. coli*, il a été impossible de réaliser la première étape de recombinaison permettant l'intégration du plasmide pIMAY avec les régions flanquantes du gène *codY* chez HG003. Après plusieurs contrôles, nous avons conclu que le plasmide était stable à 37°C rendant impossible la construction des mutants souhaités (Monk et al., 2012).

3.3. Niveaux des ARN Teg16 et RsaD dans les souches HG003

Nous avons fait le choix d'étudier en parallèle le niveau des ARNs Teg16 et RsaD au cours du temps, car ils sont doublement régulés par CodY et SarA. De plus, ils pourraient intervenir dans la régulation de deux acétolactate synthases chez *S. aureus* et donc pourraient contrôler de manière coordonnée ou opposée une fonction métabolique.

Dans un premier temps, nous avons extrait les ARN totaux toutes les heures dans la souche HG003 en croissance dans du milieu TSB, et révélé la quantité d'ARN Teg16 et RsaD au cours du temps en Northern

blot (**figure 135**). Les quantités des ARN Teg16 et RsaD suivent un profil similaire dans la souche HG003 au cours de la croissance en milieu TSB. Jusqu'à 4h de culture, le niveau des deux sARNs augmente progressivement, puis chute à 5h puis augmente à nouveau pour se maintenir en forte quantité jusqu'à 9h de culture. Le même profil avait été observé pour RsaD dans la souche UAMS-1, avec une diminution à 5h de culture en milieu TSB (Augagneur et *al.*, 2020). Ces profils d'expression similaires semblent favoriser l'hypothèse que ces deux sARNs agiraient dans une fonction métabolique proche, et que ce changement de profil serait accompagné d'un changement de métabolisme vers 5h (fin de la phase exponentielle de croissance).

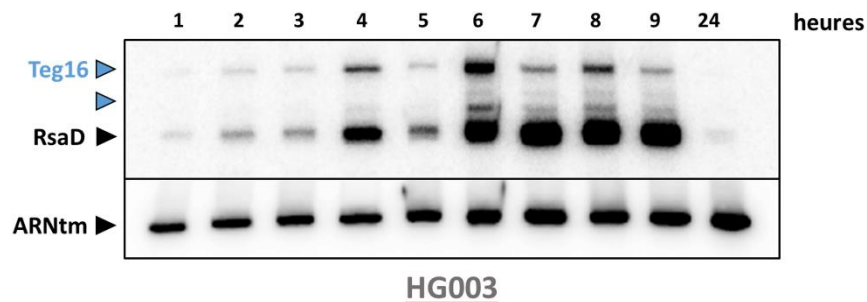


Figure 135 : Northern Blot des ARN extraits de la souche HG003 toutes les heures d'une culture en TSB. La révélation de l'ARN Teg16 révèle deux bandes distinctes. L'ARNtm sert de contrôle de dépôt. Expérience réalisée en duplicat.

Malgré l'absence de mutant HG003 $\Delta codY$, nous avons étudié la régulation temporelle de RsaD et Teg16 dans un mutant HG003 $\Delta sarA$. Nous avons réalisé une culture de la souche HG003 $\Delta sarA$ en milieu TSB et extrait les ARN totaux toutes les heures (**figure 136**). Le Northern blot nous montre un profil avec très peu d'ARN en début de croissance et une quantité d'ARNs Teg16 et RsaD qui s'intensifie au cours du temps. Néanmoins, la diminution des niveaux d'ARNs à 5h de croissance n'est plus observée dans le mutant HG003 $\Delta sarA$. Ce résultat indiquerait que SarA est nécessaire pour réprimer l'expression des gènes sARNs *teg16* et *rsaD* à 5h.

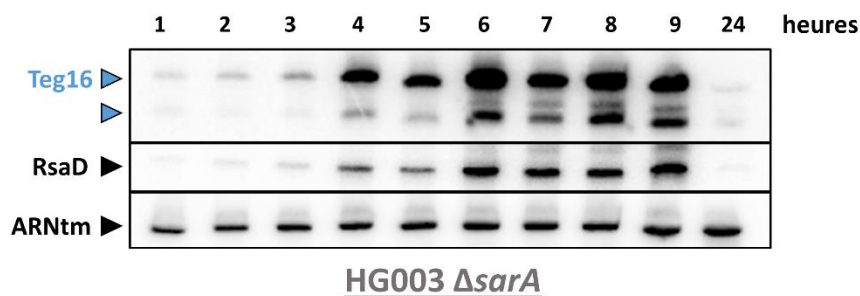


Figure 136 : Northern Blot des ARN extraits toutes les heures d'une culture en TSB de la souche HG003 $\Delta sarA$. La révélation de l'ARN Teg16 révèle deux bandes distinctes. L'ARNtm sert de contrôle de dépôt. Expérience réalisée en duplicat.

Pour pouvoir comparer les quantités de RsaD et Teg16 dans chaque souche, nous avons quantifié l'intensité des bandes en normalisant avec la quantité d'ARNtm pour chaque puits sur les Northern Blots (**figures 135**

et 136). La condition 1h a servi de calibrateur et sa quantification a été définie à 1, ainsi nous pouvons suivre le profil des ARNs au cours du temps (**figure 137**).

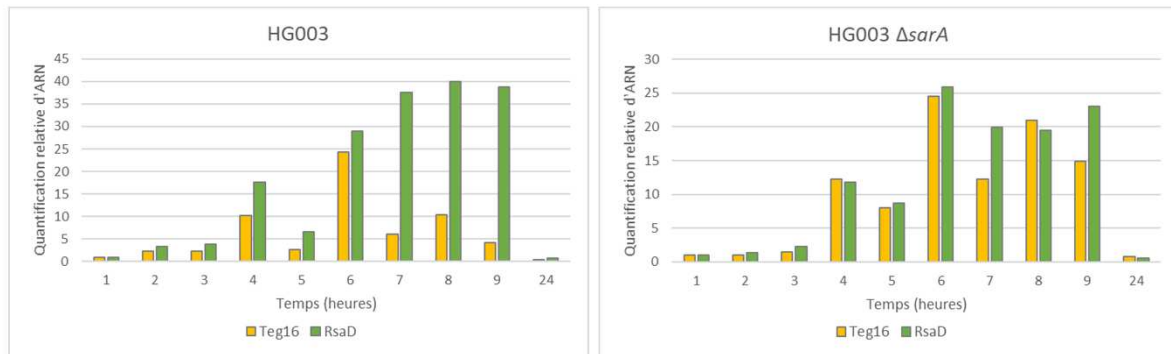


Figure 137 : Quantifications relatives des niveaux d'ARN Teg16 et RsaD dans les souches HG003 et HG003 $\Delta sarA$ au cours du temps. Quantification effectuée sur les Northern Blot en figures 135 et 136. Expérience en duplicat. Les quantifications relatives ont été normalisées par rapport à la quantité de l'ARN_m. La condition 1h a été calibrée à 1, et a servi de comparatif pour les autres conditions.

Dans la souche HG003, la quantification confirme que RsaD et Teg16 s'accumulent au cours du temps et chutent à 5h. Néanmoins, à 6h la quantité des deux ARN augmente de nouveau mais seule celle de RsaD s'accumule et se maintient jusqu'à 9h (**figure 137**). On peut également noter que la quantité de RsaD est toujours supérieure à celle de Teg16. Dans la souche HG003 $\Delta sarA$, les quantités de Teg16 et RsaD augmentent de 10 fois à 4h par rapport à la condition contrôle (1h). Leur quantité diminue légèrement à 5h et s'intensifie à 6h de culture. Enfin, la quantité de RsaD tend à se maintenir jusqu'à 9h, alors que celle de Teg16 fluctue entre 7h et 9h (**figure 137**).

Il est difficile d'aller plus loin dans la comparaison des deux souches comme les quantifications ont été réalisées sur deux membranes de Northern blots différentes. Néanmoins, on peut dire que l'expression ou la stabilité de Teg16 semble plus faible dans la souche HG003 par rapport à la souche HG003 $\Delta sarA$, dans laquelle les quantités de RsaD et Teg16 suivent un profil assez similaire au cours du temps. Les valeurs FPKM du RNA-Seq dans la souche HG003 sont de 1700 pour *rsaD* et de 340 pour *teg16* à 4h30 de culture (**tableau 20 en annexe**), ce qui confirme que Teg16 est beaucoup moins présent que RsaD dans la souche HG003. SarA pourrait donc contrôler majoritairement la répression du gène *teg16* dans la souche sauvage.

En absence des profils d'expression/stabilité des ARNs RsaD et Teg16 dans la souche HG003 $\Delta codY$, nous ne pouvons pas exclure que d'autres régulateurs pourraient rentrer dans la boucle de régulation. En effet, l'expression de *rsaD* est également sous le contrôle de SsrA et du système Agr (**figure 129**).

De plus, il faudrait suivre le profil des ARN dans le double mutant HG003 $\Delta sarA/\Delta codY$ et en réintroduisant des plasmides de complémentation pour restaurer le gène *sarA* ou *codY* dans ce double mutant.

3.4. Teg16 et RsaD : Mêmes régulateurs et profils similaires, une fonction commune ?

Augagneur et al ont montré que RsaD contrôle la traduction de l'enzyme acétolactate synthase AlsS en se fixant au niveau du site RBS sur l'ARN_m *alsS*. L'enzyme AlsS prévient l'acidification intracellulaire en favorisant l'activation de la production de BCAAs et la formation d'acétoïne (Carvalho et al., 2017) au

détriment de la formation d'acides (lactate et acétate) (**figure 138**). Le gène codant AlsS fait partie de l'opéron *alsSD*, où *alsD* code une α -acétolactate décarboxylase, qui agit à la suite de AlsS pour former de l'acétoïne. Il a été montré qu'un mutant délété du gène *rsaD* résiste mieux à un stress acide lors d'une culture en excès de glucose (Augagneur et al., 2020). Dans ce mutant, la production de l'enzyme AlsS n'est pas contrainte par RsaD, et permet donc la formation d'acétoïne au détriment du lactate qui acidifie le milieu intracellulaire et diminue la viabilité cellulaire (**figure 138**).

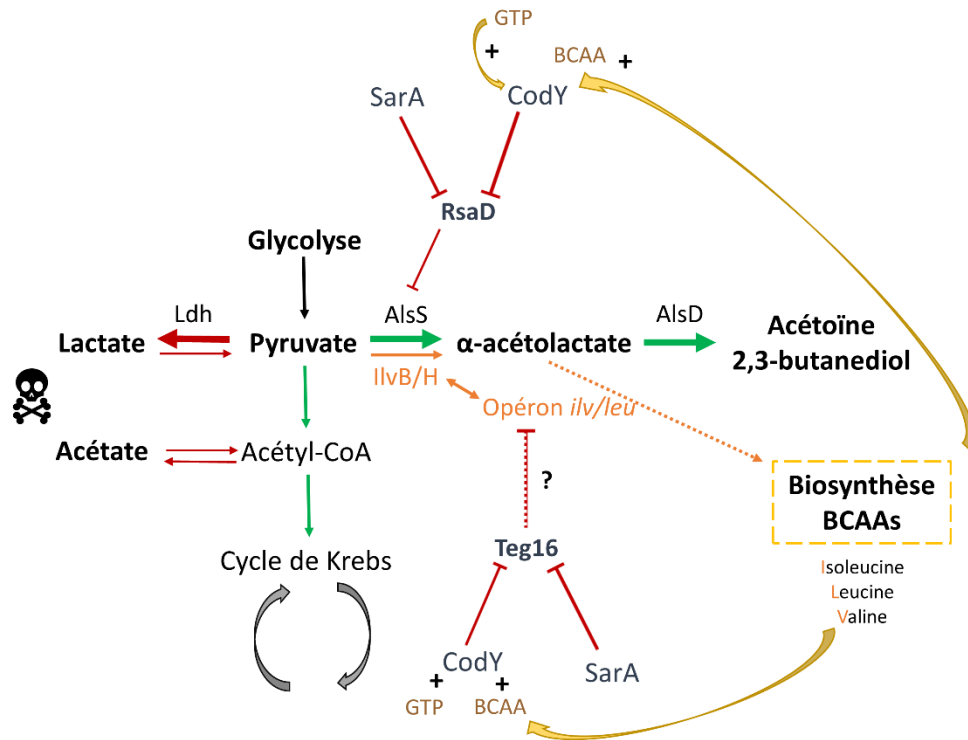


Figure 138 : Schéma de régulation proposée pour l'interconnexion entre RsaD et Teg16, et les régulateurs SarA et CodY.

Nous avons démontré que l'expression de *rsaD* est également sous le contrôle de SarA. De plus, il est connu que l'expression de l'opéron *alsSD* est activée par SarA et joue un rôle dans la formation de biofilm (Tsang et al., 2008). Ces gènes sont également retrouvés dans nos données RNA-Seq pour les ARN extraits après 2h de culture seulement (*alsSD* nommé *budAB* chez NCTC8325, SAOUHSC_02467-68). Les données ChIP-Seq indiquent la présence d'un pic de fixation de SarA dont la p-value ($1E^{-37}$) reste bien en-dessous du seuil fixé à 10^{-250} dans notre analyse. Par conséquent, la régulation de *alsSD* par SarA pourrait être indirecte via l'intermédiaire de RsaD et resterait à confirmer.

Le gène *smn_3950_teg16* réprimé par CodY et SarA se situe dans la partie 5'UTR de l'opéron *ilv-leu*. On peut donc se demander si Teg16 pourrait influencer l'expression ou la traduction d'enzymes codées par l'opéron, comme notamment l'acétolactate synthase IlvB. Si Teg16 régule en « *cis* » en tant que riboswitch, il verrouillerait l'expression de l'opéron en présence des BCAAs, synthétisés par ce dernier. Cet sARN est également présent sous deux formes d'environ 200 nt, et pourraient réguler des cibles en « *trans* ». Comme RsaD régule la traduction de AlsS, et si Teg16 régule l'expression de *ilvB*, alors deux acétolactate synthases

seraient contrôlées indirectement par CodY et SarA par l'intermédiaire d'ARN régulateurs chez *S. aureus*. Nous proposons donc le réseau de régulation représenté dans la **figure 138**.

De manière directe ou indirecte, SarA et CodY activeraient l'expression de *alsSD* mais également de l'opéron *ilv-leu* et influenceraient donc la détoxification de la bactérie et la production de BCAAs via la production commune d' α -acétolactate (**figure 138**).

L'expression de *rsaD* et *teg16* est doublement contrôlée par SarA et CodY, ce qui permettrait une réponse temporelle reliée à la quantité de GTP et de BCAAs pour CodY, qui diminuent au cours de la croissance et pour SarA à un signal qui reste à identifier.

Ainsi, ces deux ARNreg pourraient répondre à des signaux différents de manière coordonnée pour agir sur une même voie métabolique. Ce genre de coopération a déjà été démontré pour RsaD où son expression est régulée par CodY mais aussi par le système Agr, et le système TCS SrrAB qui répond aux ions NO⁺ chez *S. aureus* (**figure 129**). Concernant Teg16, à ce jour aucune étude n'a été reportée sur les signaux de régulation sur ce gène. Des études transcriptomiques ont montré que les gènes *teg16* et *rsaD* sont surexprimés dans du sérum humain par rapport à la condition contrôle TSB avec des différentiels d'expression de 16 et 11 respectivement (Carroll et al., 2016), et qu'ils étaient plus exprimés à 34°C par rapport à 40°C (Bastock et al., 2021).

La double régulation, par CodY et SarA de ces deux gènes sARNs chez *S. aureus* pourraient lui permettre de conserver la régulation d'enzymes clés de la détoxification même en cas de perte de fonction de l'un des FT. De même, le fait de multiplier les sARN régulant une même voie métabolique protègerait *S. aureus* des pertes de fonctions de ces sARN.

4. Teg1 et RsaOB : cibles communes de SarA et CodY ?

Les deux sARNs précédents RsaD et Teg16 semblent liés à la biosynthèse des acides aminés à chaîne ramifiée (BCAAs). Nous allons maintenant nous intéresser aux gènes *sm_0050_teg1* et *sm_0806_rsaOB* potentiellement régulées par CodY et SarA. Ces gènes sont situés en amont de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de la méthionine et de la SAM (**figures 130**) et sont prédits comme étant des régulateurs en « *cis* » de type riboswitchs (**tableau 14**).

Le gène *teg1* se situe en amont du gène *metX* (SAOUHSC_00013), qui code une homosérine O-acétyltransférase (**figure 130D**). L'homosérine O-acétyltransférase MetX intervient dans le début de la voie de biosynthèse de la méthionine (**figure 139**) (Wencker et al., 2021). Le gène *metX* serait régulé par deux mécanismes, à la fois un riboswitch de type S-box et par le FT CodY (Fuchs et al., 2018). Le mécanisme du riboswitch S-box est dû à la fixation de la SAM (S-Adénosylméthionine) sur l'ARN qui provoque une structure induisant l'arrêt de la transcription. La SAM est synthétisée à partir de la méthionine et d'ATP par la méthionine S-adénosyltransférase (MetK) (**figure 139**). La méthionine à l'origine de la synthèse de la SAM, peut provenir d'une synthèse endogène ou d'un apport exogène. Lorsqu'une forte concentration de SAM sera présente dans la bactérie, cette dernière se fixera sur le riboswitch S-box et provoquera un arrêt de transcription du gène *metX*, pour stopper le début de la voie de biosynthèse.

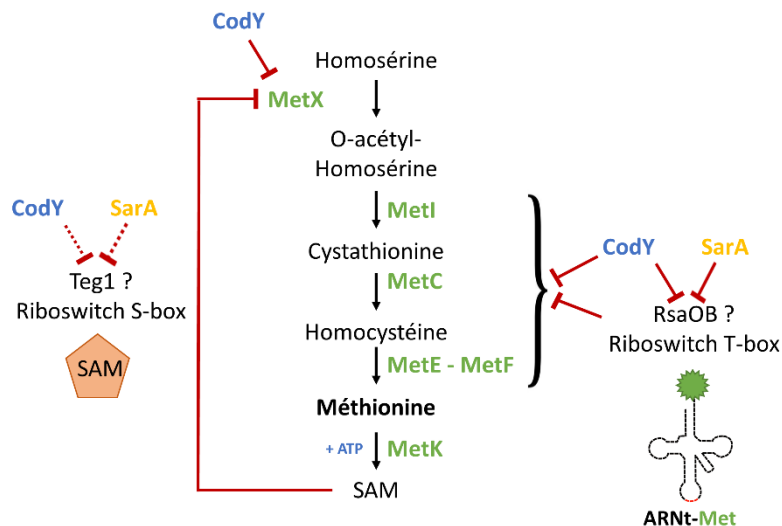


Figure 139 : Voie de biosynthèse de la méthionine et régulateurs mis en évidence par cette étude chez *S. aureus*.

Le gène *srn_0050_teg1* est décrit comme faisant partie du 5'UTR du gène *metX*, et correspondrait donc au riboswitch. Aucun Northern blot n'a révélé la présence d'un ARN indépendant pour Teg1 à l'heure actuelle, seule une analyse par RT-qPCR a montré son expression (Beaume et al., 2010). Concernant les données RNA-Seq dans le mutant HG003 $\Delta sarA$, tout comme *srn_0050_teg1*, *metX* est également retrouvé dans les cibles réprimées par SarA avec un différentiel d'expression de 4 en début de phase stationnaire de croissance (4h30) (**tableau 21 en annexe**). Pour autant, nous n'avons pas observé de pic de fixation de SarA en ChIP-Seq ni pour le gène *srn_0050_teg1* ni pour le gène *metX*. La valeur FPKM du gène *srn_0050_teg1* est faible (260 dans la souche HG003 à 4h30) (**tableau 20 en anenxe**), ce qui pourrait signifier que les expériences RNA-Seq/ChIP-Seq n'ont pas été réalisées dans les conditions optimales pour son identification. De plus, il faudra confirmer que SarA et CodY peuvent se fixer dans la région promotrice de *teg1* par expérience de gel retard pour réguler son expression. Ce gène pourrait également être une cible indirecte de ces deux régulateurs.

Pour compléter la voie de biosynthèse de la méthionine, les 4 autres enzymes sont codées par l'opéron *metICFE* situé en aval du gène *srn_0860_rsaOB* (**figure 130C**).

Pour ce gène *srn_0860_rsaOB* présent dans l'analyse comparative RNA-Seq/ChIP-Seq, nous avons démontré une fixation spécifique de SarA *in vitro* sur sa région promotrice responsable de sa répression transcriptionnelle (Oriol et al., 2021). L'ensemble de ces données nous ayant conduit à conclure à une régulation directe par SarA. Pour la régulation par CodY, seules les données RNA-Seq indiquent une régulation potentielle de *srn_0860_rsaOB* par ce dernier. Enfin, les zones de fixation de CodY et SarA ont été repositionnées dans la région promotrice de ce gène (**figure 131**). Comme précédemment pour les gènes *rsaD* et *teg16*, les consensus de SarA et CodY se chevauchent en amont du gène *rsaOB*, ce qui pourrait témoigner d'une régulation temporelle différente entre les deux FTs.

Par conséquent, les gènes *rsaOB* et *teg1* communs aux régulateurs SarA et CodY semblent liés à la voie de biosynthèse de la méthionine et de la SAM et pourraient contrôler l'expression des gènes impliqués dans cette voie métabolique par des mécanismes de riboswitchs chez *S. aureus*. Néanmoins, nous avons observé un transcrite d'environ 400 nt pour l'ARN RsaOB en Northern blot (Oriol et al., 2021) donc ce candidat pourrait également réguler en « *cis* » en tant que riboswitch mais aussi agir en « *trans* » sur d'autres cibles, ce qui a également été suspecté pour l'ARN Teg16.

Pour aller plus loin dans la régulation des gènes *sm_0050_teg1* et *sm_0860_rsaOB*, nous devrions mener des expériences *in vitro* pour suivre leur niveau d'ARN au cours du temps et mettre en évidence leur régulation directe par CodY et par SarA pour *teg1*. Nous pourrions également tester ces régulations lors de culture dans des milieux chimiquement définis, supplémentés ou non en méthionine. Ces tests pourraient être réalisés avec les souches : HG003, HG003 $\Delta sarA$, HG003 $\Delta codY$ et dans le double mutant $\Delta sarA/\Delta codY$ et en réintroduisant des plasmides de complémentation pour restaurer les gènes *sarA* ou *codY*.

La fixation spécifique de SarA sur la région promotrice de *rsaOB* a été démontrée dans la partie I de ce manuscrit, et est responsable de la répression transcriptionnelle de ce gène sARN. Une expérience de gel retard pourrait être réalisée avec la région promotrice de *teg1* et la protéine SarA pour observer la fixation de SarA sur cette séquence ADN, ainsi que des expériences avec un système rapporteur permettant de mesurer l'activité des promoteurs *teg1* et *rsaOB* dans des souches : HG003 $\Delta sarA$, HG003 $\Delta codY$ et HG003 $\Delta sarA/\Delta codY$.

En conclusion de ce travail, nous avons pu mettre en évidence des potentielles double régulations de SarA et CodY sur des gènes sARNs chez *S. aureus*. Ces deux régulateurs contrôleraient l'expression d'ARNs qui agiraient en « *cis* » en tant que riboswitchs mais également qui agiraient en « *trans* » sur d'autres cibles, c'est le cas pour Teg16 et RsaOB. La régulation par CodY est conditionnée par la quantité de GTP dans la cellule et de la disponibilité en nutriments, notamment les BCAAs pour la bactérie. Les signaux d'activation ou d'inhibition de l'activité de SarA sont encore un peu connus à l'heure actuelle. Néanmoins, l'hypothèse qui semble émerger avec les résultats décrits ci-dessus est la suivante : la double régulation des gènes sARNs serait successive avec CodY qui réprimerait leur expression en début de croissance et qui laisserait ensuite sa place à SarA pour réprimer leur expression.

Cette partie donne des perspectives sur les réseaux de régulations globaux chez *S. aureus*, avec l'intervention des régulateurs protéiques jouant sur l'expression génique, et des ARN régulateurs qui contrôleraient de manière transcriptionnelle ou traductionnelle la production d'enzymes qui répondent à la même voie métabolique. De tels mécanismes permettraient à ce pathogène de contrôler de manière rigoureuse l'expression de ces gènes mais aussi de coordonner leurs réponses pour assurer une fonction métabolique clé.

Conclusion et Perspectives

Conclusion

L'objectif principal de cette thèse était de mettre en évidence le régulon du facteur de transcription SarA chez le pathogène *S. aureus*, en se focalisant sur les cibles de type ARN régulateurs. La combinaison des données de transcriptomique (RNA-Seq) avec les zones de fixation à l'ADN (ChIP-Seq) ont mis en évidence un groupe de 140 gènes qui semblent directement régulés par SarA. Ces gènes sont majoritairement réprimés en début de phase stationnaire de croissance. Nous avons choisi de valider expérimentalement 13 gènes appartenant à ce groupe et tous se sont avérés régulés directement par SarA. Nous avons enrichi ce groupe avec quelques cibles sARN aux critères de sélection imparfaits, ainsi 9 gènes codant des protéines et 7 gènes exprimant un sARN ou un ARN régulateur connu ont été validés comme de nouvelles cibles directes de SarA. Parmi les gènes communs aux expériences de RNA-Seq et ChIP-Seq, nous avons sélectionné les régions promotrices de 15 gènes sARN et les avons utilisées pour définir un consensus de fixation pour SarA. Ce consensus a permis de rechercher et d'identifier *in silico* de nouvelles cibles de SarA. De cette manière, nous obtenons une vision globale du régulon SarA en étant détaché des conditions expérimentales. Pour valider cette démarche, nous avons choisi d'étudier un gène sARN qui n'était présent ni dans le RNA-Seq ni dans le ChIP-Seq, le gène *srn_5010_teg33*. Nous avons pu montrer que SarA se fixe spécifiquement sur la région en amont du gène *srn_teg33*, par conséquent il pourrait faire partie des cibles directes du FT SarA. La combinaison de données RNA-Seq/ChIP-Seq/bio-informatique a donc permis d'avoir une vue d'ensemble du régulon SarA chez *S. aureus* (figure 140).

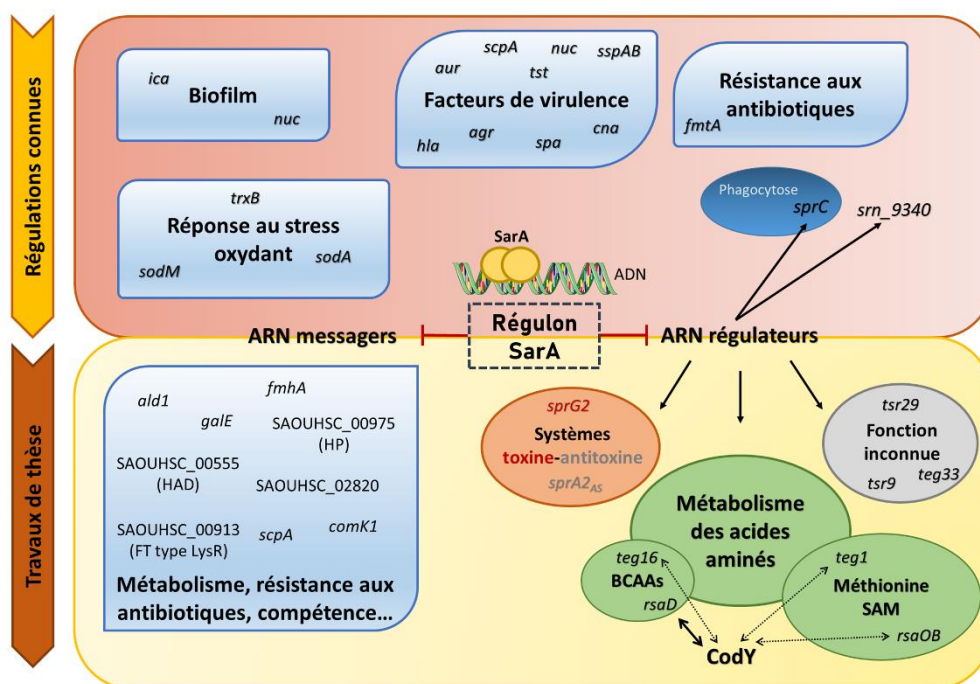


Figure 140 : Le régulon SarA chez *S. aureus* connu à nos jours.

Parmi les gènes sARNs, nous avons pu identifier des systèmes toxine-antitoxine de type I. SarA a est le répresseur de l'expression d'une toxine (*sprG2*), et d'une antitoxine (*sprA2_{AS}*), ces 2 cibles faisant parties de deux systèmes distincts. Il a été difficile de conclure sur le rôle de SarA dans la régulation de ces

deux éléments pour la bactérie, les systèmes étant à l'équilibre par eux-mêmes dans les conditions conventionnelles de croissance.

Par la suite, nous nous sommes intéressés aux gènes sARNs qui semblaient communs aux régulons SarA et CodY. En effet, après avoir démontré que RsaD était une cible directe de SarA et sachant que cet ARN régulateur est également une cible directe de CodY, nous avons voulu vérifier que ce n'était pas un cas isolé. Ainsi, bien que les expériences de RNA-Seq n'aient pas été réalisées dans les mêmes conditions ni dans les mêmes fonds génétiques, 11 sARN se sont révélés être doublement régulés par SarA et CodY. Parmi ces 11 sARN notre attention s'est portée sur 4 d'entre eux. Tout d'abord RsaD, lequel est lié à la résistance au stress acide chez *S. aureus*, avec la régulation d'une acétolactate synthase qui permet la détoxification de la bactérie. Les trois autres sARNs Teg1, RsaOB et Teg16 semblent liés au métabolisme des acides aminés. En effet, le gène *teg16* est situé en amont d'un opéron *ilv-leu*, régulé par CodY et impliqué dans la voie de biosynthèse des acides aminés à chaîne ramifiée. Cet opéron contient également une acétolactate synthase, donc RsaD et Teg16 régulés par SarA et CodY pourraient avoir une fonction cellulaire proche. Enfin, les deux gènes *teg1* et *rsaOB* sont possiblement des ARN régulateurs agissant en « *cis* » impliqués dans la voie de biosynthèse de la méthionine. L'ensemble de ces données est résumé dans la **figure 140**. Ces travaux ouvrent donc des perspectives sur des régulons croisés entre les FT CodY et SarA chez *S. aureus*, avec CodY qui agirait en début de croissance et SarA qui prendrait le relais en phase stationnaire pour réprimer les gènes cibles.

Perspectives

A. SarA et la régulation des systèmes toxine-antitoxine de type I

Les systèmes toxine-antitoxine de type I sont connus pour être impliqués dans l'entrée en persistance chez les bactéries pathogènes (Jurénas et *al.*, 2022). Dans le système TA SprG2/SprF2, l'induction de l'expression de la toxine *sprG2* sur un plasmide et grâce à un promoteur inductible conduit à une diminution de la croissance bactérienne due à l'entrée en stase (Riffaud et *al.*, 2019), alors que pour le système TA SprA2/SprA2_{AS}, l'induction de la toxine *sprA2* induit la mort intracellulaire (Germain-Amiot et *al.*, 2019). Ces systèmes pourraient être induits dans des biofilms formés par *S. aureus*. En effet, les cellules dans un biofilm présentent différents types de métabolismes : actif, ralenti ou en persistance (Reffuveille et *al.*, 2017). Par conséquent, l'induction du système SprG2/SprF2 pourrait permettre à des bactéries au cœur du biofilm, ayant peu accès aux nutriments de rentrer en stase en attendant des conditions plus favorables à la croissance. De même pour le système SprA2/SprA2_{AS}, au début de la formation de biofilm des cellules peuvent mourir pour libérer de l'ADN extracellulaire pour favoriser l'adhésion des cellules entre elles dans la matrice du biofilm (Montanaro et *al.*, 2011). On parle alors d'un comportement communautaire coopératif sous forme d'altruisme, où une partie de la population va mourir pour favoriser le maintien de la population générale, ce phénomène est appelé « mort cellulaire programmée » (PCD) (Tanouchi et *al.*, 2013). Cette PCD peut être provoquée par les systèmes TA, ce qui a pu être montré avec le système TA de type II MazEF chez *E. coli* (Amitai et *al.*, 2009) (Kolodkin-Gal et *al.*, 2007). SarA est un régulateur majeur de la formation de biofilm chez *S. aureus* (Valle et *al.*, 2003), par conséquent SarA pourrait contrôler ces deux systèmes TA dans une partie de la population du biofilm : avec une activation du système SprA2/SprA2_{AS} lors des étapes précoces de la formation du biofilm, et une activation du système SprG2/SprF2 dans le biofilm mature.

Avant de poursuivre sur l'étude de ces systèmes dans un mode de croissance en biofilm et pour aller plus loin dans l'étude des régulations de la toxine *sprG2* et de l'antitoxine *sprA2_{AS}* par SarA sur l'impact global du système TA, il faudrait travailler avec des souches possédant des versions des toxines tagguées intégrées au niveau chromosomique. Ces uniques copies des gènes codant la toxine et l'antitoxine permettront de se rapprocher du contexte physiologique, sans avoir à se soucier du nombre de copies de plasmide par souche. De même, il serait intéressant de tester différents tags pour le peptide car l'étiquette FLAG utilisée a été triplée pour améliorer la révélation en Western blot, et pourrait modifier la conformation naturelle du peptide et donc sa fonction.

En parallèle, nous étudierons la demi-vie de l'ARN SprA2_{AS} en milieu carencé NZM. En effet, dans ce milieu, la quantité de l'antitoxine SprA2_{AS} diminue alors que celle de l'ARN SprA2 codant la toxine se maintient dans la bactérie. Cette condition pourrait donc induire la production de la toxine chez *S. aureus* (Germain-Amiot et *al.*, 2019). Nous avons pu confirmer cette hypothèse en démontrant que le peptide PepA2-FLAG est présent en plus grande quantité lors d'une croissance en milieu carencé NZM par rapport à une croissance en milieu riche TSB. Ayant démontré que le niveau d'expression du gène *sprA2_{AS}* était inchangé en NZM, la différence de production de PepA2-FLAG est très probablement liée à la diminution de

l'antitoxine SprA2_{AS}. En effet, en cas de diminution de la stabilité de l'antitoxine, on observerait un déséquilibre SprA2/SprA2_{AS} qui permettrait alors la traduction de la toxine en plus grande quantité. La demi-vie de l'ARN SprA2_{AS} devra donc être étudiée lors d'une croissance en milieu NZM pour confirmer cette hypothèse.

Ces techniques permettront d'avoir une vision globale de l'activation d'un système TA, cependant l'expression de ces systèmes pourrait être hétérogène au sein de la population. Il faudrait donc passer à des techniques permettant d'étudier l'expression des systèmes TA par bactérie au sein d'une population. Une approche par Droplet digital PCR (ddPCR) pourrait nous donner un premier aperçu de l'expression de ces deux systèmes TA dans différentes conditions de stress dans l'ensemble de la population bactérienne.

B. A la croisée des régulateurs SarA et CodY chez *S. aureus*

En comparant les données transcriptomiques des souches délétées des régulateurs CodY et SarA, nous avons pu mettre en évidence que 11 gènes sARNs semblaient réprimés en présence de ces deux régulateurs. CodY et SarA sont des régulateurs majeurs chez *S. aureus*, et partagent des fonctions communes, comme la régulation de la formation de biofilm ou des facteurs de virulence (**figure 141**). Par conséquent, des gènes sARNs régulés par ces deux FT pourraient indiquer qu'ils sont impliqués dans des phénotypes communs à SarA et CodY. Nous avons décidé de nous intéresser à 4 sARNs, dont deux sont décrits comme régulateurs en *cis* : Srn_0050_Teg1 et Srn_0860_RsaOB et les deux autres comme régulateurs en *trans*, Srn_1640_RsaD et Srn_3950_Teg16 (**figure 141**).

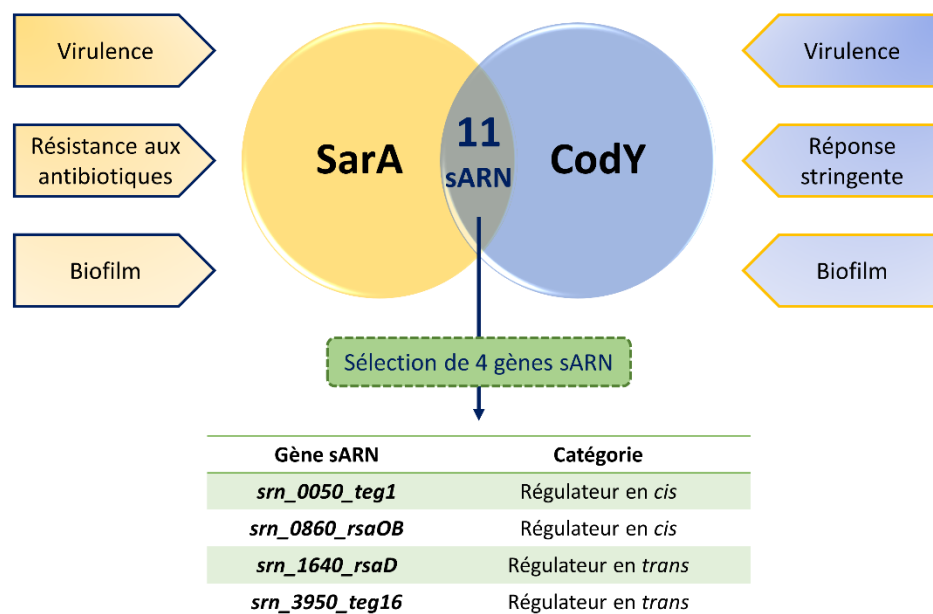


Figure 141 : Recouvrement des gènes sARN régulés par SarA et CodY chez *S. aureus*. Sélection de 4 gènes sARN pour cette étude.

1. Contrôle de la biosynthèse de la méthionine par Teg1 et RsaOB ?

Les gènes *srn_0050_teg1* et *srn_0860_rsaOB* sont localisés en amont de gènes *met* impliqués dans la biosynthèse de la méthionine et de la SAM. Les analyses transcriptomiques ont mis en évidence que les sARN RsaOB et Teg1 sont fortement présents en absence de *codY* (Augagneur et al., 2020) et *sarA* (Oriol et al., 2021). De plus, nos travaux ont pu montrer que SarA réprime directement l'expression de *srn_0860_rsaOB*. Les séquences consensus de CodY et SarA ont été retrouvées en amont du gène *rsaOB*, mais ces dernières restent encore à déterminer pour *teg1*. Nous émettons donc l'hypothèse que l'expression de ces deux gènes serait doublement régulée par SarA et CodY. Les séquences de fixation de ces régulateurs étant chevauchantes, les FT ne pourraient pas réguler en même temps, et pourraient donc répondre à des signaux cellulaires différents. Au vu des données transcriptomiques, nous posons l'hypothèse que CodY agirait en début de croissance quand la disponibilité des nutriments est abondante et SarA pourrait prendre le relais en agissant à partir de la fin de la phase exponentielle de croissance, quand l'activité de CodY diminue.

Les deux gènes *teg1* et *rsaOB* se localisent les régions 5'UTR des gènes *metX* et *metICFE* respectivement. L'opéron *metICFE* est régulé par CodY mais également un mécanisme de riboswitch T-box, donc RsaOB contient cette séquence régulatrice, et répond à la présence d'ARNt-Met chargés dans la cellule. En parallèle, le gène *metX* serait régulé par un riboswitch S-box, qui répondrait à la présence de SAM dans la cellule, donc Teg1 pourrait correspondre à ce riboswitch. Nous proposons donc le réseau de régulation décrit à la **figure 142**. En forte présence de SAM et/ou méthionine, l'expression des gènes *met* est réprimée, la bactérie utilise les ressources exogènes (**figure 142A**). En carence en SAM et/ou méthionine, la répression des gènes *met* est levée, permettant la synthèse endogène des deux sARN et l'activation de la voie de biosynthèse de la méthionine (**figure 142B**). L'ARN RsaOB a également été retrouvé sous la forme d'un transcrit unique, qui a été détecté en Northern blot (Marchais et al., 2009), mais il reste encore à déterminer si c'est le cas pour l'ARN Teg1.

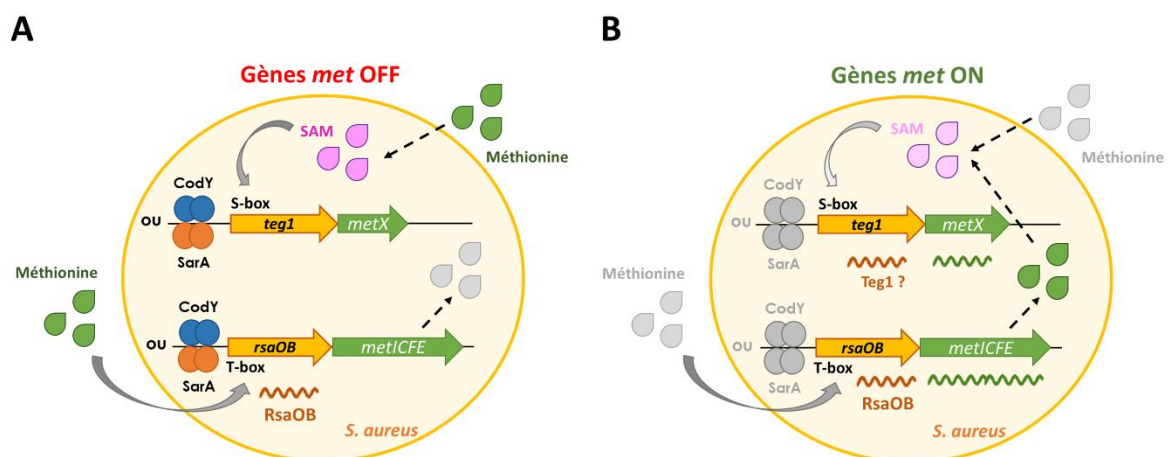


Figure 142 : Régulations proposées pour la biosynthèse de la méthionine chez *S. aureus*. (A) Forte présence de SAM et/ou méthionine, les gènes *met* sont donc réprimés (OFF). (B) Carence en SAM et/ou méthionine, les gènes *met* sont exprimés (ON) et permettent la synthèse de la SAM et de la méthionine. CodY ou SarA pourrait se fixer en amont des gènes *met* et réprimer leur expression.

1.1. Le cas de Teg1

La partie concernant la régulation du gène *teg1* semble plus hypothétique car nous possédons encore peu de données expérimentales. En premier, il faudrait valider le mécanisme de S-box riboswitch pour Teg1 (fixation de la SAM). Tout d'abord, nous pourrions tester la capacité de la région ARN Teg1 à répondre à la présence de la SAM. Pour cela, nous pourrions utiliser le système de gène rapporteur qui a été décrit chez *Xanthomonas* (Tang et al., 2020). Nous pourrions cloner la région 5'UTR contenant le potentiel S-box riboswitch en fusion avec un gène rapporteur. Dans un milieu chimiquement défini (CDM) et pauvre en SAM, l'expression du gène rapporteur devrait être forte alors que l'ajout en forte concentration de la SAM devrait éteindre l'expression du gène rapporteur. Les zones responsables de la fixation de la SAM pourraient être mise en évidence par des mutations substitutionnelles, qui empêcheraient la fixation de ce ligand sur l'ARN.

1.2. Le cas de RsaOB

En 2021, Wencker et al ont apporté de nouveaux éléments sur la régulation de l'opéron *metICFE* chez *S. aureus*, présent en aval du gène *sm_0860_rsaOB*. En effet, l'expression est contrôlée au niveau de l'ADN par CodY, par un riboswitch T-box capable de fixer un ARNt-Met chargé (appelé aussi « *met leader* ARN ») et l'action de RNases (Wencker et al., 2021).

En présence de méthionine, l'ARNt-Met chargé va se fixer dans la région 5'UTR de l'ARN et bloquer la transcription en créant une structure de terminaison de la transcription. L'ARN transcrit est alors dégradé par la RNase III (**figure 143**). A l'inverse en absence de méthionine, l'ARNt non chargé ne pourra se fixer dans la région 5'UTR. L'opéron *met* est alors transcrit et la RNase III va intervenir pour séparer l'ARN contenant le riboswitch du reste de l'ARNm *met*. Ce clivage permet de stabiliser l'ARNm qui pourra être traduit, et l'autre ARN sera dégradé par l'action de la RNase J (**figure 143**).

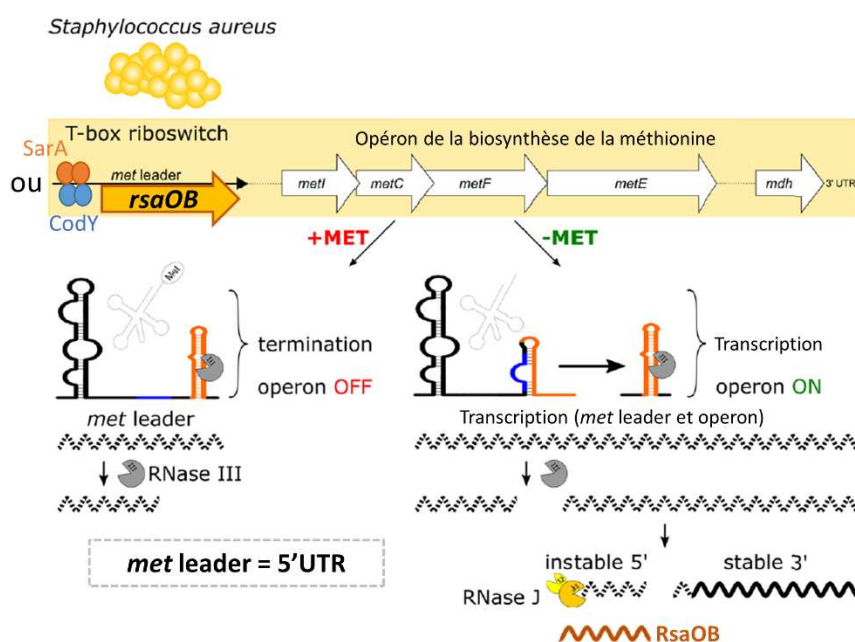


Figure 143 : Régulation de l'opéron *metICFE* chez *S. aureus* (adapté de Wencker et al., 2021).

En effet, quand nous assemblons les coordonnées de *rsaOB*, avec les données de la séquence T-box et le site de clivage de la RNase III, cela explique la taille d'environ 400 nt détectée en Northern Blot en fin de phase exponentielle. L'action de ces RNases pourrait donc libérer l'ARN RsaOB de son action en *cis*. Chez *Listeria monocytogenes*, un riboswitch fixant la SAM localisé dans une zone 5'UTR peut être clivé et former un sARN. Cet ARN va aller réguler en *trans* un régulateur de la virulence chez ce pathogène (Loh et al., 2009). Un mécanisme similaire pourrait être mis en évidence pour RsaOB où l'action de la RNase III le libérerait de son action en *cis* pour pouvoir agir en *trans* sur d'autres cibles chez *S. aureus*. Il faudrait donc tester si un mutant délété du gène codant la RNase III est impacté dans la formation du sARN RsaOB.

A ces multiples niveaux de régulations, nous ajoutons la répression de SarA sur le gène *rsaOB*, qui pourrait également impacter l'expression de l'opéron *metICFE* (**figure 143**) (Oriol et al., 2021). D'un point de vue physiologique, le gène *metI* est surexprimé par *S. aureus* dans les cavités nasales chez l'Homme. Sachant que la synthèse *de novo* de méthionine est essentielle pour l'adaptation et le maintien de la bactérie dans cette niche écologique (Krismer et al., 2014), il serait intéressant d'étudier si *rsaOB* est surexprimé en même temps que *metI*. Si tel était le cas, RsaOB pourrait jouer un rôle dans l'adaptation de la bactérie dans cet environnement.

Les données préliminaires, que nous avons obtenues, sur la recherche de cibles *in silico* de RsaOB indiquent qu'il pourrait se lier aux ARNm *hemL* et *ubiE*. Les protéines HemL et UbiE sont impliquées dans la biosynthèse de cytochromes et de la ménaquinone, essentiels au système de transport des électrons chez *S. aureus*. Le transport des électrons est le processus principal impacté chez toutes les SCVs et cela entraîne une diminution de la production d'ATP requise pour la biosynthèse de la paroi, un ralentissement de la croissance, une pigmentation moins importante et un potentiel membranaire réduit (Kahl et al., 2016). Donc l'interaction de RsaOB avec ces deux ARNm pourrait indiquer que cet sARN aurait un rôle dans la formation de SCV.

2. Teg16 et RsaD : vers une fonction commune ?

2.1. Contrôle de la production d'acétolactate synthases et production des BCAA

Nous avons pu montrer que les gènes sARNs *teg16* et *rsaD* sont régulés par SarA mais des expériences complémentaires sont nécessaires pour valider les données *in silico* recueillies dans la partie IV de ce manuscrit et pour conclure le rôle direct de CodY sur l'expression de *teg16*. RsaD et Teg16 semblent liés d'un point de vue fonctionnel car chacun pourrait contrôler la détoxification lors d'un stress acide et favoriser la production d'acides aminés branchés (BCAA). Les séquences de fixation de SarA et CodY semblent être chevauchantes donc leur répression devrait s'opérer à des moments différents.

Le mécanisme de régulation de l'ARNreg RsaD a été décrit récemment et il permet de contrôler la production de l'enzyme acétolactate synthase AlsS chez *S. aureus*. Cette enzyme est nécessaire pour répondre à un stress acide causé par un excès de glucose dans le milieu extracellulaire. En effet, lors d'un stress acide, AlsS est

produite pour détoxifier la cellule alors qu'en condition classique de culture, RsaD réprime la traduction de l'ARNm *alsS* (Augagneur et al., 2020) (**figure 144A**).

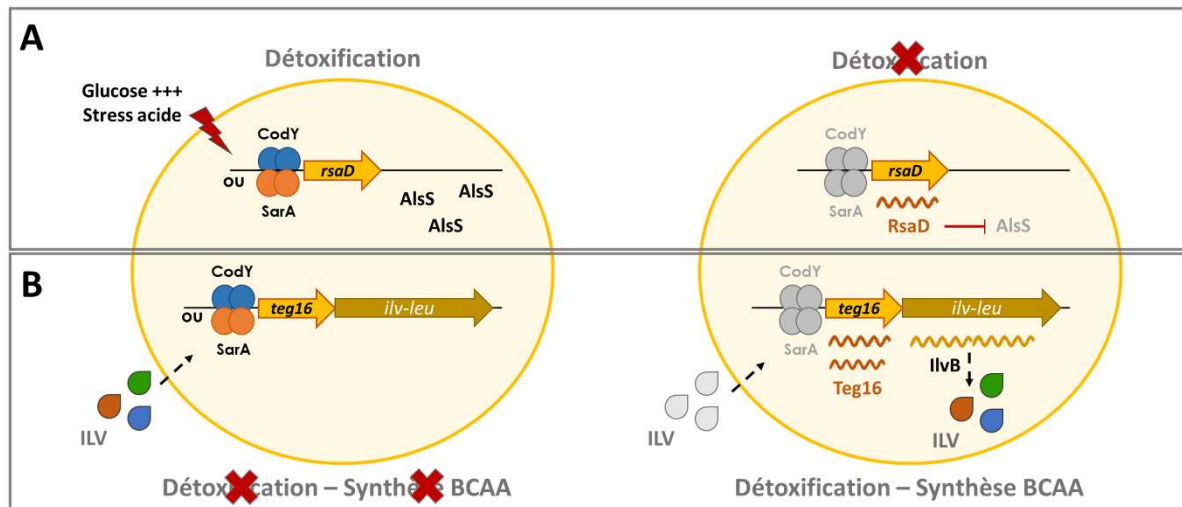


Figure 144 : Modèle proposé pour la détoxification et la synthèse de BCAA chez *S. aureus*. (A) Régulation et fonction de RsaD. Lors d'un stress acide (excès de glucose), l'expression de *rsaD* est réprimée par CodY permettant la détoxification par la production de l'acétolactate synthase AlsS. En condition classique de culture, l'ARNreg RsaD est produit et permet de limiter la production d'AlsS. (B) En présence de BCAA, ILV (Isoleucine, Leucine, Valine), l'expression des gènes *teg16* et *ilv-leu* est réprimée par CodY. La carence en ILV, permet d'activer la transcription des gènes, permettant la biosynthèse de BCAA. SarA a été montré comme réprimant l'expression de *rsaD* et *teg16* mais aucun signal n'a pu être associé à ces régulations à l'heure actuelle.

Le gène *teg16* est localisé dans la région 5'UTR de l'opéron *ilv-leu* responsable de la biosynthèse des BCAAs. L'expression de *teg16* est réprimée par SarA et par l'action de CodY dont l'activité est conditionnée elle-même par les BCAA. En carence de GTP et de BCAA, CodY perd son affinité pour l'ADN ce qui déréprimerait l'expression de *teg16* et de l'opéron *ilv-leu* et permettrait la biosynthèse des BCAAs (**figure 144B**).

RsaD régule au niveau traductionnel la production d'AlsS et Teg16 pourrait réguler au niveau transcriptionnel la production d'une seconde acétolactate synthase, IlvB chez *S. aureus*. L'enzyme IlvB intervient au début de la voie de biosynthèses des BCAA mais pourrait participer à la réponse au stress acide de la même manière que AlsS. L'expression des gènes sARN *rsaD* et *teg16* est contrôlée par les mêmes régulateurs, elle pourrait donc répondre aux mêmes signaux. Néanmoins la présence de Teg16 et RsaD auront des répercussions opposées sur le métabolisme. En effet, si RsaD est très présent, l'enzyme AlsS ne sera pas produite alors que la présence de Teg16 semble concomitante à celle de l'ARNm *ilv-leu*. Par conséquent, l'absence de RsaD permet à la bactérie de se détoxifier suite à un stress acide via AlsS mais la présence de Teg16 indiquerait que la bactérie peut répondre à la synthèse des BCAA grâce à la production de enzymes Ilv-Leu mais aussi à la détoxification avec son acétolactate synthase IlvB (**figure 144**).

Ces constatations indiquent que la capacité à produire des acétolactate synthases est probablement cruciale pour la bactérie. En effet, la bactérie a doublé les FT agissant sur leur production et mis en place des systèmes opposés via des régulateurs ARN. Nous proposons donc d'étudier le rôle de Teg16 et RsaD de manière simultanée.

2.2. Teg16 et RsaD, des phénotypes communs ?

Pour aller plus loin dans l'étude de la fonction commune entre RsaD et Teg16, nous pourrions mesurer la capacité d'un mutant délété du gène *teg16* à résister à un stress acide faible, causé par un excès de glucose. En effet, un mutant *S. aureus* UAMS-1 Δ *rsaD* résiste mieux à ce stress, comme l'enzyme AlsS peut être produite (Augagneur et al., 2020). AlsS permet de détoxifier la cellule en produisant de l'acétoïne, au détriment de l'acétate et du lactate qui en grande quantité diminuent la viabilité cellulaire. On pourrait donc tester la capacité d'un mutant Δ *teg16* à résister à un stress acide. En effet, comme la région régulatrice en *cis* aura été supprimée, l'expression de l'opéron *ilv-leu* ne sera plus contrainte par le mécanisme d'atténuation transcriptionnelle mais seulement par les régulateurs protéiques. Si lors d'un stress acide, les répresseurs tels que CodY ou SarA ne sont pas fixés en amont du +1, alors l'opéron devrait être transcrit, permettant la production de l'acétolactate synthase IlvB. Nous pourrions donc mesurer la production d'acétoïne et d'acétate dans un mutant Δ *teg16* et un double mutant Δ *teg16* Δ *rsaD* pour potentiellement observer des effets cumulatifs dû à la production de deux acétolactate synthases.

En parallèle, le profil d'expression de ces deux ARN sera observé dans les souches HG003, HG003 Δ *codY*, HG003 Δ *sarA* et HG003 Δ *codY*/ Δ *sarA* lors de culture dans les milieux : TSB classique (14mM glucose), TSB en excès de glucose (35mM) et CDM supplémenté ou non en BCAA. Ces différentes cultures permettraient d'approfondir les connaissances sur la double régulation de CodY et SarA sur ces deux gènes sARN *teg16* et *rsaD*. De plus, comme le glucose influence le phénotype en lien avec RsaD et que CcpA régule l'opéron *ilv-leu* chez *B. subtilis* (Sonenshein, 2007), on peut donc se demander si cette régulation peut être transposée chez *S. aureus* et si l'expression de *teg16* varie en présence de glucose via CcpA.

Il semble que SarA et CodY partagent également de nombreux gènes cibles codant des protéines chez *S. aureus*, comme : les protéases (*sspAB*, *aur*) ou la thermonucléase *nuc* (Oscarsson et al., 2006) (Cassat et al., 2006) (Majerczyk et al., 2010). Une fois la création des mutants HG003 Δ *codY* et HG003 Δ *codY*/ Δ *sarA*, il sera plus facile de confirmer ces régulations dans un même fond génétique. L'impact global de la double régulation entre CodY, un régulateur présent chez l'ensemble des bactéries à Gram positif et SarA, un régulateur spécifique de *S. aureus* serait donc à mesurer sur l'ensemble du génome de ce pathogène. Au cours de l'évolution, les régulations CodY et SarA se sont entrecroisées, ce qui pourrait être un avantage pour l'adaptation de *S. aureus*, de la même manière que le fait de cumuler des régulations par des FT et des régulations ARN en *cis* ou en *trans*. Les gènes qui subissent ces multiples réseaux de régulation pourraient être des gènes essentiels à la survie de *S. aureus*.

2.3. Intégration de nouvelles données sur la régulation de l'opéron *ilv-leu* chez *S. aureus*

Chez *Bacillus subtilis*, un mécanisme de T-box riboswitch dans la région 5'UTR fixe un ARNt-leucine et réprime également l'expression, c'est donc une régulation type ARN en *cis* (Marta et al., 1996). Néanmoins, chez *S. aureus* la séquence de la région 5'UTR est différente et une structure tige boucle du riboswitch décrit chez *B. subtilis* est manquante. Ce mécanisme de régulation en *cis* ne peut donc pas s'opérer chez cette bactérie.

Chez *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium*, un autre mécanisme en *cis* intervient : l'atténuation transcriptionnelle par la présence d'une ORF codant un peptide, dit « peptide leader » (Wessler et Calvo, 1981) (Searles et al., 1983). Ce dernier est riche en BCAA, et contient des codons leucine et isoleucine qui vont conditionner la vitesse de déplacement du ribosome. Chez les bactéries, la transcription et la traduction sont couplées, ce qui permet une expression rapide et efficace des gènes (Chatterjee et al., 2021) et donne également la possibilité d'agir rapidement sur la traduction pour la contrôler. En 2018, Kaiser et al ont examiné le mécanisme de régulation complet de l'opéron *ilv-leu* chez *S. aureus* (Kaiser et al., 2018). En présence d'acides aminés ILV, CodY est actif et va réprimer l'expression de l'opéron. De plus, Kaiser et ses collaborateurs ont proposé qu'un peptide leader de 26 résidus d'acides aminés soit codé en amont de *ilvD*. Notre analyse indique que ce peptide est codé au sein du sARN Teg16. Par transposition du mode de fonctionnement observé chez *E. coli* et *S. typhimurium*, en présence de BCAA, lors de la traduction du peptide leader, les ARNt chargés (Leu ou Ile) seront incorporés rapidement dans le ribosome et cette condition va permettre la formation d'une structure ARN terminatrice de la transcription dans la partie 5'UTR (**figure 145A**). A l'inverse, lors d'une carence en BCAA, CodY ne sera plus actif, et lèvera la répression transcriptionnelle. L'ARN sera transcrit et le ribosome va donc faire une pause au niveau des codons Leu et Ile présent dans le peptide leader, comme ces acides aminés sont absents dans la cellule. Cette pause dans le peptide leader va permettre la formation d'une structure anti-terminatrice de la transcription et permettre l'expression globale de l'opéron *ilv-leu* (**figure 145B**) (Kaiser et al., 2018).

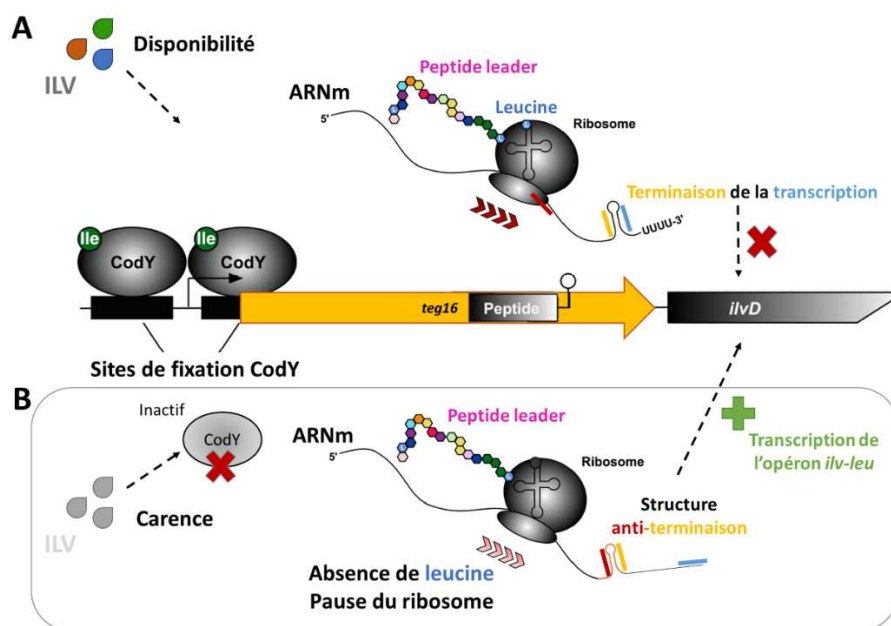


Figure 145 : Régulation de l'expression de l'opéron *ilv-leu* par un mécanisme d'atténuation transcriptionnelle par un peptide leader contenu dans le gène sARN *teg16* chez *S. aureus* (adapté de Kaiser et al., 2018). (A) Disponibilité en nutriments (ILV), le ribosome avance rapidement dû à l'incorporation de tous les ARNt chargés. Cette vitesse de déplacement conduit à la formation d'une structure terminatrice de la transcription (séquences en jaune et bleue appariées), l'opéron *ilv-leu* n'est donc pas transcrit. (B) Lors d'une carence en ILV, le ribosome va faire une pause sur l'ARN au niveau du codon Leu comme la leucine est absente (ARNt-leu non chargé). Cette pause va conduire à la formation d'une structure ARN anti-terminatrice de la transcription (séquences en rouge et jaune appariées), l'opéron *ilv-leu* sera alors transcrit entièrement et permettra la synthèse des acides aminés ILV manquants. ILV : Isoleucine (Ile), leucine, valine (BCAA).

L'ARN Teg16 serait donc un ARN agissant en *cis*, contenant cette séquence d'atténuation de la transcription (peptide leader), cependant en Northern Blot nous avons pu remarquer qu'il est présent sous la forme de deux transcrits, ce qui laisse la possibilité qu'il puisse réguler des cibles en *trans* (Loh et al., 2009). Dans ce modèle, la biosynthèse des BCAA serait donc sous le contrôle indirect des BCAA eux-mêmes : Isoleucine, Leucine, Valine (ILV). En effet, l'isoleucine régule l'activité du régulateur CodY, la leucine et l'isoleucine présent dans le peptide leader, contrôlent la transcription de l'opéron. Enfin, la valine est également essentielle car elle permet l'activation de la thréonine désaminase qui intervient dans la voie de biosynthèse de l'isoleucine (Kaiser et al., 2018).

L'opéron *ilv-leu* est également régulé par les régulateurs essentiels Gcp et YeaZ chez *S. aureus*, mais les mécanismes restent encore inconnus (Lei et al., 2012) (Lei et al., 2015). Cet opéron est essentiel à la croissance de *S. aureus*, ce qui peut expliquer ces multiples boucles de régulation. En effet, il est réprimé en *trans* par de multiples régulateurs : CodY, Gcp, YeaZ et par SarA. Chez *B. subtilis*, l'expression de cet opéron est également activée par le régulateur majeur CcpA en présence de glucose. Même si CcpA et CodY coopèrent pour réguler de nombreuses fonctions, ils régulent la biosynthèse de BCAAs de manière antagoniste. Les zones de fixation à l'ADN de CcpA et CodY se chevauchent en amont de la région promotrice -35 du gène *ilvB*. CcpA agit donc à moitié comme un régulateur positif indirect en étant en compétition avec CodY pour la fixation à l'ADN, et à moitié comme un régulateur positif direct sur l'opéron *ilv-leu* chez *B. subtilis* (Sonenshein, 2007).

Chez *S. aureus*, l'expression de l'opéron *ilv-leu* est également soumise à une régulation en *cis* avec la présence du peptide leader. L'ORF de ce peptide leader est contenu dans le gène sARN *teg16* qui a été étudié au cours de ces travaux. La transcription du gène *teg16* dans la région 5'UTR de l'opéron est donc également contrôlée par l'ensemble de ces régulations. Même si l'expression du gène *teg16* est contrôlée par la présence de BCAA, la fonction de Teg16 reste encore à élucider chez ce pathogène. Cet sARN Teg16 pourrait donc jouer un rôle clé chez *S. aureus* mais ses cibles restent encore à déterminer. Lors du portage nasal de *S. aureus*, l'isoleucine n'est pas détectée dans les sécrétions nasales chez l'Homme (Krismer et al., 2014), donc l'ARN Teg16 serait exprimé quand *S. aureus* est en état commensal chez l'hôte.

2.4. L'opéron *ilv*, au-delà de la biosynthèse des acides aminés branchés

L'expression de l'opéron *ilv-leu* est contrôlée par CodY, qui est lui-même contrôlé par le pool de GTP et les BCAA disponibles dans la cellule. Ces deux signaux sont inversement proportionnels à l'activation de la réponse stringente (RS) chez les bactéries (Geiger et Wolz, 2014). En effet, en présence de forte quantité de GTP et BCAA, CodY est actif et réprime ses gènes cibles dont *ilv-leu*. Lors d'une carence nutritive ou d'un stress, la disponibilité des BCAA et/ou le niveau de GTP peut/peuvent diminuer dans la cellule. Chez *S. aureus*, l'enzyme RSH va discerner la présence d'ARNt non chargés dans la cellule et ce qui va activer son activité synthase et produire du (p)ppGpp au détriment du GTP (Geiger et al., 2012). La présence de l'ARNm *ilvD* est un marqueur de la réponse stringente chez *S. aureus* (Reiß et al., 2012)

(Pathania et al., 2021). L'induction de cette RS peut être mimée par l'ajout de l'antibiotique, la mupirocine qui a la capacité d'inhiber de manière compétitive l'enzyme isoleucyl ARNt synthétase (Reiß et al., 2012). L'activation de la RS a montré avoir un rôle dans la formation de cellules persistantes chez *S. aureus* (Fung et al., 2020). Comme CodY est lié à la RS, on peut donc se demander si les gènes dérprimés par l'inactivation de CodY seraient impliqués dans la persistance chez ce pathogène (**figure 146**).

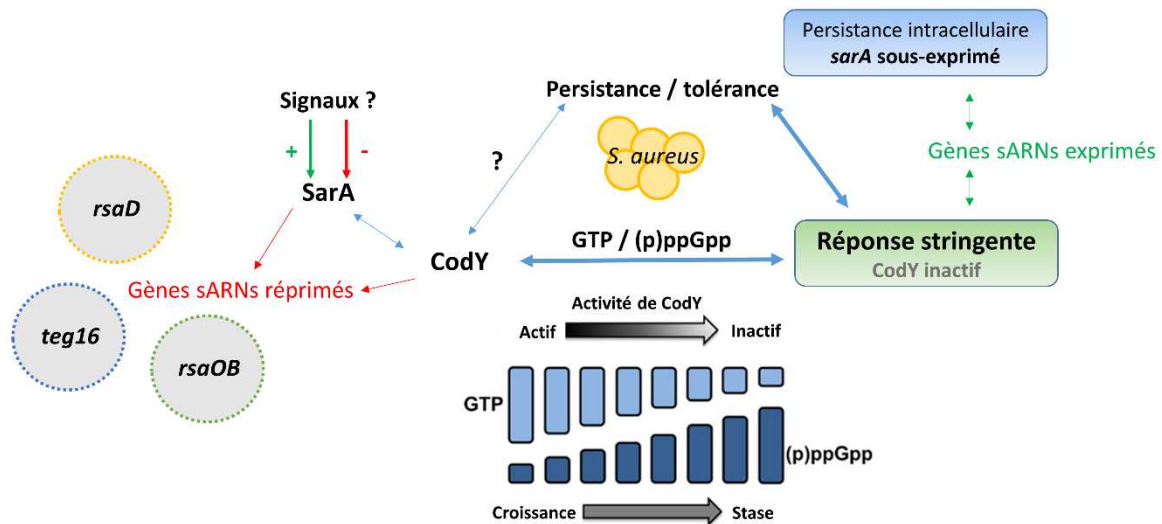


Figure 146 : Connexions des régulations sur des gènes sARN par SarA - CodY intégrant la réponse stringente et la persistance chez *S. aureus*.

Parmi les gènes dérprimés et liés à la RS, on pourrait retrouver certains gènes sARNs également régulés par SarA comme *rsaD*, *teg16* et *rsaOB*. Il a été montré que l'expression du gène *sarA* est limitée lors de la persistance intracellulaire (Tuchscher et al., 2015), ce qui pourrait induire l'expression de ces 3 gènes sARNs (**figure 146**). Ces 3 sARN RsaD, Teg16 et RsaOB pourraient donc avoir un rôle dans la persistance chez *S. aureus*. De plus, les premières analyses bio-informatiques semblent montrer que RsaOB pourrait réguler des cibles impliqués dans les phénotypes de SCV. La mise au point du modèle larvaire d'infection *G. mellonella* permettra d'analyser le profil d'expression de ces sARN au cours de l'infection et de tester les différents mutants correspondant afin de faire ressortir un phénotype *in vivo* (Ménard et al., 2021b). Des modèles de persistance ont également déjà été testés chez ce modèle d'infection invertébré avec *S. aureus* (Gao et al., 2013).

De manière générale, les dernières découvertes de ce travail mettent en avant la redondance ainsi que la coopération entre différents régulateurs protéiques ou de type ARN chez cette bactérie. Les régulations médiées par les régulateurs protéiques et les riborégulateurs s'entrecroisent et permettraient à *S. aureus* d'adapter son métabolisme en fonction des conditions environnementales rencontrées. En effet, ce pathogène opportuniste est connu pour avoir une grande flexibilité métabolique lui permettant de s'adapter et de persister dans de multiples niches écologiques et pourrait expliquer la grande diversité d'infections liées à la multiplication incontrôlée du staphylocoque doré.

Matériels et Méthodes

I. Microbiologie

1. Souches et conditions de culture

Les souches et les plasmides utilisés au cours de ces travaux sont listés dans le **tableau 15**. Les souches d'*Escherichia coli* ont été cultivées dans le milieu Luria-Bertani (LB, Sigma) et les milieux LB, TSB (Trypton Soy Broth :, OXOID), NZM (Fluka), NZM 2 (pour 1L : 10g NZ amine, 5g NaCl, 2g MgSO₄-7H₂O) ont été utilisés pour la croissance des souches de *Staphylococcus aureus*. Des antibiotiques ont été ajoutés si nécessaire, pour *E. coli* : Ampicilline (50µg/mL), Chloramphénicol (15µg/mL), et pour *S. aureus* : Chloramphénicol (10µg/mL), Tétracycline (10µg/mL), Kanamycine (250µg/mL) et Erythromycine (2 à 10µg/mL). Les croissances des souches *E. coli* et *S. aureus* sont réalisés en général à 37°C et agitées à 160rpm.

Souches		Caractéristiques		Références
<i>Escherichia coli</i>	X11-blue	Clonage <i>Δ(ara-leu) 7697 araD139 fhuA ΔlacX74 galK16 galE15 e14-φ80dlacZΔM15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (StrR) rph spoT1 Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i>		
<i>Staphylococcus aureus</i>	RN4220	Clonage		(Herbert et al., 2010)
<i>Staphylococcus aureus</i>	HG003			(Herbert et al., 2010)
<i>Staphylococcus aureus</i>	HG003 Δ sarA	Souche mutée pour le gène <i>sarA</i> (Erythromycine ^R)		Laboratoire
<i>Staphylococcus aureus</i>	Newman			(Duthie et Lorenz, 1952)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Newman Δ sarA	Souche mutée pour le gène <i>sarA</i> (Erythromycine ^R)		Laboratoire
<i>Staphylococcus aureus</i>	Newman Δ codY	Souche mutée du gène <i>codY</i> (Erythromycine ^R)		(Augagneur et al., 2020)
<i>Staphylococcus aureus</i>	HG003 Δ sarA/sarA+	<i>sarA</i> :: <i>ermC</i> ; gène <i>sarA</i> restauré au génome au locus <i>geh</i>		Cette étude
<i>Staphylococcus aureus</i>	HG003 Δ sprA2/ Δ sprA2As	Délétion du système toxine-antitoxine de type I SprA2/SprA2As		Laboratoire
<i>Staphylococcus aureus</i>	HG003 Δ sprC	Souche mutée pour le gène <i>sprC</i>		Laboratoire
<i>Staphylococcus aureus</i>	HG003 Δ srn_9340	Souche mutée pour le gène <i>srn_9340</i> (n°871)		(Le Lam et al., 2017)
Plasmides		Caractéristiques		Références
pSK236	Cm ^R			(Gaskill et Khan, 1988)
pSK236-sarA-myc	Cm ^R	Contient le gène <i>sarA</i> sous son promoteur P1 ; protéine SarA exprimée avec le tag Myc		Cette étude
pCN36	Tet ^R			(Charpentier et al., 2004)
pCN36-sarA	Tet ^R	Gène <i>sarA</i> sous son promoteur P1		(Mauro et al., 2016)
pCN35	Cm ^R			(Riffaud et al., 2019)
pCN35-sprG2-FLAG	Cm ^R	<i>sprG2</i> avec 3xFLAG en extrémité Cter		(Riffaud et al., 2019)
pCN35-sprG2-FLAG+sprF2	Cm ^R	<i>sprG2</i> avec 3xFLAG en extrémité Cter avec <i>sprF2</i> (système TA au complet)		(Riffaud et al., 2019)
pCN35-sprA2-FLAG	Cm ^R	<i>sprA2</i> avec 3xFLAG en extrémité Nter		(Germain-Amiot et al., 2019)
pCN35-sprA2-FLAG+sprA2As	Cm ^R	<i>sprA2</i> avec 3xFLAG en extrémité Nter avec <i>sprA2As</i> (système TA au complet)		Germain-Amiot et al., 2019
pCN41c	Cm ^R	Contient le gène <i>blaZ</i> sans promoteur		Mauro et al., 2016

pCN41c-P _{sprA2AS}	Cm ^R	Gène <i>blaZ</i> sous le contrôle du promoteur du gène <i>sprA2AS</i>	Germain-Amiot et al., 2019
pCN52c	Cm ^R	Contient le gène codant la GFP sans promoteur	Laboratoire
pCN52c-P _{sprC}	Cm ^R	Gène sous le contrôle du promoteur du gène <i>sprC</i>	Laboratoire
pCN52c-P _{sm_9340}	Cm ^R	Gène sous le contrôle du promoteur du gène <i>sm_9340</i>	Laboratoire
pCN52c-P _{teg16}	Cm ^R	Gène sous le contrôle du promoteur du gène <i>teg16</i>	Cette étude
pCN52c-P _{sprG2}	Cm ^R	Gène sous le contrôle du promoteur du gène <i>sprG2</i>	Cette étude
pCN52c-PSAOUHSC_00088	Cm ^R	Gène sous le contrôle du promoteur du gène SAOUHSC_00088	Cette étude
pCN52c-PSAOUHSC_00913	Cm ^R	Gène sous le contrôle du promoteur du gène SAOUHSC_00913	Cette étude
pCN52c-PSAOUHSC_02696	Cm ^R	Gène sous le contrôle du promoteur du gène SAOUHSC_02696	Cette étude
pCN52c-PSAOUHSC_02820	Cm ^R	Gène sous le contrôle du promoteur du gène SAOUHSC_02820	Cette étude
pCN38	Cm ^R		(Charpentier et al., 2004)
pCN38- <i>sm_9340</i>	Cm ^R	Gène <i>sm_9340</i> sous son propre promoteur	Laboratoire

Tableau 15 : Souches et plasmides utilisés au cours de ces travaux.

2. Transformations

2.1. *E. coli*

Pour les transformations, 50 à 100 µL de cellules X11 blue chimio-compétentes sont mises au contact de l'ADN à transformer pendant 30min dans la glace. Les cellules sont ensuite soumises à un choc thermique, elles sont placées à 42°C pendant 30sec puis sont placées directement dans la glace pendant 3min. 900µL de milieu SOC sont ajoutés aux bactéries et ces dernières sont incubées 1h à 37°C sous agitation. Les bactéries sont ensuite étalées sur gélose sélective permettant la sélection des bactéries contenant l'ADN transformé.

2.2. *S. aureus*

Les cellules électro-compétentes de *S. aureus* sont préparées selon le protocole suivant : les cultures de nuit sont diluées au 1/100^e dans 10mL de milieu et cultivées jusqu'à une densité optique de 5. Ces 10mL de culture sont ensuite placés dans 90mL de milieu préchauffé à 37°C et remis en culture pendant 30min. Les cultures sont placées dans des tubes de 50mL et refroidies dans la glace. Les bactéries sont ensuite centrifugées à 4000 rpm pendant 10min à 4°C puis les culots sont successivement lavés et concentrés avec l'eau stérile. A la fin, le culot est resuspendu dans une solution de sucrose 0,5M puis centrifugé et repris dans 500µL de solution glycérol 10% sucrose 0,5M. Les bactéries ainsi préparées sont électro-compétentes, elles peuvent être immédiatement utilisées ou congelées à -80°C.

Pour les transformations, 65µL de bactéries sont placés dans une cuve d'électroporation en présence d'ADN (2,5µL ou max 500ng) avec 4µL de DMSO. Les cellules sont électroporées à 2500V, et 900µL de TSB supplémenté en sucrose sont ajoutés immédiatement. Les bactéries sont incubées pendant une heure puis étalées sur milieu BHI supplémenté avec l'antibiotique adéquat.

3. Biofilm

A partir de cultures de nuit en TSB supplémenté en glucose 0,5%, les cultures sont diluées à une DO_{600nm} égale 1. Dans une microplaque 96 plaques (Thermo Scientific), les souches sont inoculées à une DO_{600nm} finale de 0,1 dans différents milieux : TSB supplémenté en glucose 0,5%, TSB supplémenté en glucose 0,5%

et NaCl 2,5% ou TSB supplémenté en glucose 0,5% Ethanol 8% (Kim *et al.*, 2016). 100µL sont répartis dans 3 puits pour chaque souche. La microplaque est incubée à 37°C pendant 24h sans agitation. Le lendemain la DO_{600nm} de chaque puits est lue à titre informatif pour s'assurer que tous les puits ont la même densité bactérienne. Le milieu est enlevé délicatement des puits puis deux lavages successifs au PBS (125µL) sont réalisés pour enlever les cellules non adhérentes au biofilm. L'excès de liquide est enlevé puis la solution de cristal violet ou de safranine 0,1% (125µL) est ajoutée dans les puits et la plaque est incubée à température ambiante pendant 10min. Les puits sont de nouveau lavés au PBS 3 fois (150µL) puis la plaque est mise à sécher dans l'incubateur à 37°C pour enlever le surplus de liquide. Enfin le biofilm coloré est resuspendu dans 125µL d'acide acétique 30% et la DO est lue pour chaque colorant (DO_{595nm} pour le cristal violet et DO_{492nm} pour la safranine).

4. Système rapporteur GFP

Les clonages de ces constructions ont été réalisés avec la méthode SLIC décrite par Jeong *et al.* (Jeong *et al.*, 2012), avec les amorces listées dans le **tableau 16**.

Des cultures de nuit des souches de *S. aureus* contenant le plasmide pCN52c (+/- les promoteurs d'intérêt fusionnés au gène codant la GFP) sont égalisées à une DO_{600nm} égale à 0,1. Les échantillons sont ensuite déposés en microplaque 96 puits noire puis la croissance bactérienne (DO_{600nm}) et la fluorescence sont mesurées sur un lecteur de microplaque (Biotek, logiciel Synergy2). La fluorescence est mesurée à la longueur d'onde de 509nm après excitation à 488nm. L'activité de chaque échantillon est rapportée à la mesure de fluorescence sur la valeur de DO_{600nm}.

Nom	Séquence
fmhA_SLIC_BamHI_5'	GCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCTCCCCTCCTACTATCAAC
fmhA_SLIC_EcoRI_3'	CTTCTTAAATTAATTAGTTAACGAATTCGCTATTTTTTTATTTTATCAAAAAC
lysR_SLIC_BamHI_5'	GCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCGAATATTTAAATTCATCCTCG
lysR_SLIC_EcoRI_3'	CTTCTTAAATTAATTAGTTAACGAATTCATAATATTAATATTATATCAGAGG
02820_SLIC_BamHI_5'	GCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCTCCACACAAATTGTTTTTCG
02820_SLIC_EcoRI_3'	CTTCTTAAATTAATTAGTTAACGAATTCATATAAAAATTAATTTTATCACATAGC
Srn_9340_SLIC_BamHI_5'	GCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCGTTTCATTATCTTCAAATTCCTTAAATC
Srn_9340_SLIC_EcoRI_3'	CTTCTTAAATTAATTAGTTAACGAATTCGATTATATATAATATTATTATTT
SprC_SLIC_BamHI_5'	GCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCAAGTGTATAATATCAATTTA
SprC_SLIC_EcoRI_3'	CTTCTTAAATTAATTAGTTAACGAATTCATTTATATTATAATATAAATATTTT
SprG2_SLIC_BamHI_5'	GCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCGTTATTAATTTTTAATGCTTAAA
SprG2_SLIC_EcoRI_3'	CTTCTTAAATTAATTAGTTAACGAATTCAAAAATATTATACCATTTTTATAAA
Teg16_SLIC_BamHI_5'	GCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCTCCTATATTATGCTTTTCA
Teg16_SLIC_EcoRI_3'	CTTCTTAAATTAATTAGTTAACGAATTCCTTGATAAATTTAATTTACTATATC

Tableau 16 : Amorces utilisés pour les clonages SLIC pour le système rapporteur GFP. Les séquences en gras sont complémentaires au plasmide pCN52c, la séquence soulignée correspond au site de restriction BamHI ou EcoRI.

5. Dosage d'activité β -lactamase

Les cultures de nuit des souches de *S. aureus* contenant le plasmide pCN41c (+/- les promoteurs d'intérêt fusionnés au gène *blaZ*) sont reprises dans le milieu de culture à une densité optique (DO_{600nm}) égale à 0,1. Pour chaque temps de prélèvement, les cellules sont centrifugées et remises en suspension dans du tampon PBS 1X (NaCl 137mM ; KCl 2,7mM ; Na_2HPO_4 8,1mM ; KH_2PO_4 1,8mM, pH 7,4). Pour obtenir une quantité de cellules équivalentes, le volume de PBS est ajusté en fonction de la DO_{600nm} pour chaque échantillon. La lyse des cellules est effectuée à 37°C pendant 20min par ajout de 0,7mg/mL de lysostaphine, 0,2U/ μ L de benzonase et 0,1mM de $MgCl_2$. Les échantillons sont dilués dans de l'eau, au 1/2^e au 1/5^e et au 1/10^e pour trouver la condition adéquate qui ne sature pas le signal lors du dosage. Après ajout de nitrocéfine (0,25mg/mL), l'activité β -lactamase est quantifiée par mesure colorimétrique à une longueur d'onde de 492nm à 37°C toutes les 10 minutes pendant 40 minutes (Biotek, logiciel Synergy2). L'activité est normalisée avec la quantité de protéines totales par extrait (dilution au 1/5^e), par dosage de Bradford. Le dosage de l'activité β -lactamase est exprimée en unité arbitraire (UA) par mg de protéines par échantillon.

6. Infection des larves *Galleria mellonella*

Le protocole d'infections des larves de *Galleria mellonella* est inspiré du celui de (Ménard et al., 2021b). Les larves utilisées proviennent de l'entreprise Sud-Est Appat. Dès leur arrivée, elles sont stockées à l'obscurité à 4°C pour limiter au maximum l'avancement du cycle de vie. Ces dernières sont pesées afin de sélectionner les larves dont le poids est compris entre 250-300 mg. De préférence, les larves choisies sont de couleur blanc crème, sans signe de mélanisation. Avant toute injection, les larves sont désinfectées à l'éthanol 70% avec un écouvillon. L'injection est réalisée à l'aide d'un pousse-seringue automatique KD Scientific 100, d'une seringue tuberculine 1cc (Terumo® Syringe 1mL) et d'une aiguille BD Precision Glide Needle (30G x ½ - 0.3 mm x 13 mm). Les précultures de nuit de *S. aureus* sont réalisées en milieu LB à 37°C. Le matin les cultures subissent deux lavages successifs au PBS : après centrifugation 5 minutes à 2 500 rpm, les culots de chacune des cultures sont repris dans 10 mL de PBS 1X. Cette étape est répétée une deuxième fois puis l'extrait est dilué dans du PBS de nouveau afin d'obtenir une DO_{600nm} de 0,350 correspondant à 10^8 UFC/mL. 10 μ L soit 10^6 CFU sont injectés dans la larve au niveau d'un de ses prolegs sur la face ventrale. Les larves infectées sont placées dans des boîtes de Pétri à 37°C. La mortalité est alors suivie quotidiennement pendant 7 jours. Les larves sont considérées comme mortes quand ces dernières sont immobiles, de coloration foncée à noire. En parallèle, 10 larves sont injectées avec du PBS seulement en guise de témoin pour surveiller la santé des larves tout au long de l'expérience.

Pour le dénombrement bactérien, 30 larves sont infectées par souche suivant le protocole expliqué ci-dessus. Par jour, deux larves par condition sont placées à -20°C au moins 2h avant l'expérience. Les larves sont ensuite désinfectées et broyées à l'intérieur d'une boîte de pétri vide à l'aide du piston d'une seringue 20mL après avoir pris soin d'enlever la cuticule. Le broyat obtenu est ensuite repris dans 5mL de PBS 1X et le mélange est centrifugé 5 minutes à 2 500 rpm. 2 x 2 mL de la phase intermédiaire claire (entre le corps gras flottant en surface et l'important culot au fond du tube) sont placées dans deux tubes Eppendorf de 2 mL. A nouveau les tubes sont centrifugés 5 minutes à 6000 rpm. Le premier culot est repris avec 500 μ L de PBS.

Ces mêmes 500µL vont servir à reprendre le deuxième culot. Les dilutions 10⁻⁴ à 10⁻⁶ sont déposées sur boîtes TSB agar et placées à 37°C.

II. Biologie moléculaire

1. Purification d'ADN plasmidique et fragment PCR

Les minipréparations sont réalisées grâce au kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel), et les purifications de fragments d'ADN avec le kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel), selon les recommandations du fabricant. Dans le cas des souches de *S. aureus*, une étape supplémentaire est effectuée avant extraction plasmidique : les cultures de nuit sont centrifugées et le culot est repris dans le tampon A1 supplémenté avec 0,1mg/mL de lysostaphine (Sigma) et incubé à 37°C pendant 30 minutes.

2. Extraction d'ARN

Les ARN totaux de *S. aureus* sont extraits à partir de culots bactériens selon le protocole suivant. Pour cela, le culot bactérien est repris dans 500µL tampon de lyse (0,5% SDS ; 20mM Acétate de Sodium ; 1mM EDTA ; pH 5,5) puis déposé sur un mélange de billes de verre (Sigma-Aldrich) et 500µL phénol pH 4 (Sigma Aldrich). Les cellules sont lysées mécaniquement au broyeur Fast-Prep (puissance 6,5 pendant 30 secondes). Après centrifugation à 13000 rpm à 4°C pendant 10min, le surnageant est placé sur un mélange phénol pH 4/Chloroforme/Alcool isoamylique (ratio 25/24/1), le mélange est alors vortexé et centrifugé. La phase aqueuse est ensuite récupérée et vortexée avec un mélange de Chloroforme/Alcool isoamylique (24/1) puis centrifugée. Les ARN présents dans la phase aqueuse sont précipités sur la nuit à -20°C avec 0,7 volume d'isopropanol, 0,1 volume d'acétate de sodium (3M pH 5.2). Le lendemain, après une centrifugation de 30min à 13000 rpm à 4°C, le culot contenant les ARN est lavé avec de l'éthanol 70% puis séché au SpeedVac pendant 10min. Les culots secs sont repris dans un volume d'eau sans RNase (volume ajusté en fonction de la densité optique de la culture bactérienne initiale). Les ARN totaux sont ensuite dosés au Nanodrop. Pour les expériences de PCR quantitative et de RNA-seq, les ARN totaux sont traités deux fois à la DNase Amp Grade (Invitrogen).

3. RNA-Seq

Les cultures de nuit des souches *S. aureus* ont été diluées dans du milieu TSB à une densité optique (DO_{600nm}) à 0,1 et cultivées à 37°C à 160rpm pendant 2h et 4h30. Les ARN totaux ont été extraits comme décrits ci-dessus et la suite du protocole est détaillée dans la publication Oriol et *al.*, 2021.

4. ChIP-Seq : Protocole détaillé dans la publication Oriol et *al.*, 2021.

5. Northern Blot

5.1. Pour les sARN

a) Gel acrylamide

Pour les sARN d'une taille inférieure à 500 nt, des Northern Blots sur gel de polyacrylamide (acrylamide/bis-acrylamide 19/1) ont été réalisés. Avant dépôt, le gel de polyacrylamide 8% est placé dans la cuve avec du tampon TBE 1X pour une pré-migration à 150V pendant 30min. Pendant ce temps-là, le mélange ARN (10 à 15µg) et tampon de charge 1X (Ambion II) est alors préparé. Les ARN totaux sont dénaturés 10 minutes à 65°C. Les ARN sont ensuite déposés sur le gel. La migration dure entre 1h30 et 2h à 150V dans du tampon TBE 1X. Le transfert est effectué sur une membrane de nylon (Zeta-Probe GT, BioRad) pendant 2 heures à 25V dans du tampon TBE 0,5X avec un bloc froid dans la cuve. Les ARN transférés sur la membrane sont fixés aux UV (120mJ/cm²).

b) Révélation par sonde radioactive

Pour révéler le sARN d'intérêt sur la membrane, une sonde oligonucléotide d'environ 20 nt est construite (**tableau 17**). Cette sonde va être marquée radioactivement sur son extrémité 5'-phosphate avec de la radioactivité γ . Brièvement, 1µL de l'oligo à 10µM est ajouté au mix suivant : 1µL tampon (x), 1µL d' γ -ATP radiomarqué, 1µL d'enzyme dans un volume réactionnel de 10µL. Ce mélange est incubé 30min à 37°C. 15µL d'eau sont ajoutés au mix et passé sur une colonne G25 qui permet la purification de la sonde radiomarquée.

5.2. Pour les ARN messagers et l'ARN SprG2

a) Gel agarose

Pour les ARN de plus de 500nt, le Northern Blot est réalisé avec un gel d'agarose. Le gel est composé d'1% d'agarose, du tampon MOPS 1X et de formaldéhyde. Le gel pré-migre 40 min à 60V dans du tampon MOPS 1X. Avant dépôt, 15µg ARN sont préalablement dénaturés à 65°C (10min) dans le tampon de dénaturation (Formamide 50%, Formaldéhyde 2,2M et tampon MOPS 1X). Les échantillons sont ensuite déposés sur le gel et la migration va durer environ entre 3h et 4h à 60V. Ensuite le transfert en liquide est effectué pendant 2h sous une pression de 7 à 10mm Hg dans du tampon SSC 10X sur une membrane de Nylon (Amersham Hybond XL) préalablement lavée au SSC 10X. La membrane est ensuite rincée dans du tampon SSC 10X avant fixation des ARN aux UV, puis elle est de nouveau rincée dans du SSC 2X avant hybridation.

b) Construction de la sonde radioactive par PCR

Pour révéler les ARNm, une sonde marquée d'environ 100 nt doit être construite. Pour cela, une réaction PCR est réalisée sur l'ADN génomique de la souche HG003 avec de la radioactivité α ATP qui permet d'incorporer de la radioactivité dans le fragment PCR qui servira de sonde finale (**amorces – tableau 17**). Ce fragment PCR radiomarqué est ensuite purifié sur une colonne G50.

La sonde radioactive est ajoutée à 10mL de solution Express Hyb (Ozyme) pour permettre son passage sur la membrane.

Sondes NB	Nom	Cible	Séquence
sARN	<i>srn_2230</i>	<i>sprG2</i>	AAC TTT GAC ATAG AAT GAT GGT TAA
	<i>srn_3950</i>	<i>teg16</i>	TTT GAAG TTG TCG GTT GAT G
	<i>srn_4540</i>	<i>sprA2_{AS}</i>	TTT AGAT GTT CAAT TTT ATT ATG TAA
	<i>srn_4550</i>	<i>sprA2</i>	TTT ATT GTT GCG CGT TCG TA
	<i>srn_0860</i>	<i>rsaOB</i>	ACAG TTT AAT GAA ACG TAA ACACAA CTT CCG TCC TTC GTA CCC GAA
	<i>srn_9335</i>	<i>tsr29</i>	AGGGGG TTTTATCTTTG GAAAAA CGTCTTTT CACAACCAAAGCTA
	<i>srn_1640</i>	<i>rsaD</i>	GTCTGCTATAATG TTTTAACTTCTTC AA AAC CAA GTG CAC ATG GTA ATA CAC TTG
	<i>srn_0455</i>	<i>tsr9</i>	CAA AGT TCA GAT TTG AGC TTT GCT TTT GAA TAC AAA TAA TCA AAT CAT TGA TAA
ARNm	SAOUHSC_01452	<i>ald1</i>	TTG TTT AAC CAT CTC ACG AGT ACC A ATG TTA GTT GCA GTA GTC AAA GAA TTA
	SAOUHSC_02696	<i>fmhA</i>	CAATGCAGACGGTGAAATTGTT GTTGTTGCTTTAATTGTAACGTTT
	SAOUHSC_00913	<i>lysR</i>	GAACAGCATCTCAATGTGAAACTA GCCTCAGTTAGAAGATGATTATTC
	SAOUHSC_00088	<i>galE</i>	CAA AGT TCA GAT TTG AGC TTT GCT TTT GAA TAC AAA TAA TCA AAT CAT TGA TAA
	SAOUHSC_00961	<i>comK1</i>	AGCAGAGACAAAACCGCATT CGGGATTTTTTGATATCATGCGAG
	SAOUHSC_02820		CTCTAGTTTCCAAAGCGGGA GGATAGAGTTTGTGATTTTAACTAA
	SAOUHSC_00555		TTT GAT TTT GAT GGT ACG TGG GAC CGG TAT TAA TTT CTG ATG GAT CAT TA
	SAOUHSC_00975		ATG AAA TTA GGT ATG CTT TTA ATT AGA ATTG TAG CCA TTT CTT CCA GCT GTA
	SAOUHSC_02127	<i>scpA</i>	ATG AAA AGA AAC TTT CCA AAA TTA AGA AGT TGT GGA CTT CTT CCC TGA

Tableau 17 : Sondes utilisées pour les Northern Blot (NB).

5.3. Hybridation des sondes radioactives sur les membranes

Dans un four d'hybridation, la membrane est placée dans une fiole et est pré-hybridée avec 10mL de solution Express Hyb (Ozyme) pendant 30min à 37°C. En parallèle, les sondes sont dénaturées à 50°C et sont ajoutées sur la membrane. L'hybridation aura lieu à 37°C sur la nuit en général. Le lendemain la solution contenant la sonde radioactive est retirée de la membrane, et cette dernière va subir des lavages successifs. Les deux premiers lavages de 10min sont effectués avec la solution 1 (SSC 1X + 0.05% SDS), et le dernier lavage de 15min avec la solution 2 (SSC 0.1X + 0.1% SDS). La membrane est ensuite séchée à libre et placée avec un écran dans une cassette pour exposition. Après un temps variable, l'écran est lu avec le Typhoon – logiciel Phosphoimager. Les images sont ensuite traitées sur le logiciel ImageQuant.

6. Gel retard ADN - protéine

6.1. Préparation des sondes

La sonde ADN est préparée par amplification PCR (amorces dans le **tableau 18**). Le marquage est ensuite réalisé par la T4 PNK comme suit : 400ng de la matrice ADN, 1µL de tampon PNK 10X, 1µL ATP radioactif (γ -P³²), et 1µL d'enzyme T4 polynucléotide kinase (PNK) (qsp 10µL). Le mix est incubé 30min à 37°C. 15µL d'eau sont ajoutés au mix et le tout est purifié sur une colonne G50.

6.2. Réaction

10 fmol de sondes radiomarquées sont placées dans le tampon de réaction (20mM HEPES-KOH, pH7,9 ; 20% glycérol ; 0,2mM EDTA ; 0,1M KCl ; 0,1M MgCl₂ ; 0,15µg poly(dIdC)). La protéine SarA purifiée est diluée à 0,5, 1 et 2pMol/µL dans du tampon de réaction supplémenté en 0,2% de BSA (50µg/µL) et 0,2% β-mercaptoéthanol (14M). 10fmol de sonde radiomarquée sont mis en présence des différentes concentrations de protéine SarA (1µL). La réaction de fixation s'effectue à 30°C pendant 30 minutes avant d'être déposée sur gel natif de polyacrylamide (8%) avec du bleu de charge (GLB 6X). La migration dure environ 1h à 90V dans du tampon TBS 0,5X avec un bloc froid dans la cuve. Le gel est ensuite séché et mis à exposer sur un écran autoradiographique.

EMSA	Nom	Cible	Séquence
sARN	<i>srn_2230</i>	<i>sprG2</i>	CCGTTGCACAAATTGTAGCT TTTACTCAGATAGCCACCAT
	<i>srn_3950</i>	<i>teg16</i>	GTTGATTCTCCTATATTATG TAAGCATTTTATTACTCC
	<i>srn_4540</i>	<i>sprA2_{AS}</i>	GATTTGTATCCCAATGTCCC GATTTGGTGTATTTAGATGTTT
	<i>srn_4550</i>	<i>sprA2</i>	CAGCAGAAATTGCACCATTTG GTTAAAGTAACGCCCGAGATG
	<i>srn_0860</i>	<i>rsaOB</i>	AAGAGAGAATTCTAAATATATTTTATGTATTCTAAATGA GTC AAGAGAGAATTCCTCTCTGTATAAGCAGGGTGTGT AAGAGAGAATTCGAAATTTAAGAGTTAAACAAAAATA T
	<i>srn_9335</i>	<i>tsr29</i>	AAGAGAGAATTCCTTTAACTTGCACGTCTAAATCAAGA GTC TGC TAT AAT GTT TTT AAC TTC TTC AA AAC CAA GTG CAC ATG GTA ATA CAC TTG
	<i>srn_1640</i>	<i>rsaD</i>	GAATTATGCAAAATATATATC AATAACTGCTAATTTTTTCATC
	<i>srn_5010</i>	<i>teg33</i>	AGAAAAGGAATTCGCCATTCATATCCCCTTCCATA AAGAGAGAATTCAAAAATTTATCAATGATTTGATTATT TGTA
	<i>srn_0455</i>	<i>tsr9</i>	
ARNm	SAOUHSC_01452	<i>ald1</i>	AAGAGAGAATTCAACTATAAATCAAATGGAGTATAAGA AAGAGAGAATTCCTTTCATTTGTGAATAATTCACAATTA CAATGCAGACGGTGAAATTGTT CGTTACAAAGTTCATTTTATC
	SAOUHSC_02696	<i>fmhA</i>	GAATATTAATTCATCCTCG TCATGAACCTTACCTCTTTC
	SAOUHSC_00913	<i>lysR</i>	TCTAATGCATCAGTTGAAAGC CTAAATGCGACCCAATAAAA
	SAOUHSC_00088	<i>galE</i>	GTGACAAACGCTTCTAAAG ACATAAGCAAAACCTCGC
	SAOUHSC_00961	<i>comK1</i>	CAGAATTTACCCTGTCTTCC CATCCATATCACTATCTCTCT
	SAOUHSC_02820		AAGAGAGAATTCCTTGAACAAGCATCTCAATTTTTTTA AGAGAAGAATTCATATTAACACCCCTATTCGTTTA
	SAOUHSC_00555		AAGAGAGAATTCATTTCCCTATAATCTTTGCACTAT AGAAGAGAATTCACATTCATATTTTTTAAACATA
	SAOUHSC_00975		AAGAGAGAATTCATTTCCCTATAATCTTTGCACTAT AGAAGAGAATTCACATTCATATTTTTTAAACATA
	SAOUHSC_02127	<i>scpA</i>	AAGAGAGAATTCCTTCAAATCGACTAATATATTT TCA

		AGAAGAGAATTCCTTTATTTTATTATAAAATAATT A
Contrôle	Promoteur du gène de l'ARNr 16S	CATTGAAAACCTGAATGACAA AAGTTATCCCAGTCTTATAG

Tableau 18 : Sondes utilisées pour les gel retards ADN – protéine SarA (EMSA).

7. Protéines

7.1. Protéines de taille > 10 kDa

a) Extraction de protéines : méthode billes de verre

Les protéines totales de *S. aureus* sont extraites après centrifugation, le culot de cellules est alors repris dans le tampon de lyse (50mM Tris-HCl, pH7,5 ; 3mM MgCl₂ ; 0,1mg/mL lysostaphine). Les cellules sont incubées 20 minutes à 37°C puis lysées au FastPrep (MP Bio) puissance 6,5 pendant 30 secondes après ajout de billes de verres. Le surnageant est prélevé et dosé par le système fluorimétrique Qubit.

b) Western Blot – Gel Tris-Glycine

Des quantités équivalentes d'échantillons protéiques sont déposées et migrent dans un gel dénaturant de polyacrylamide (SDS-PAGE). La migration s'effectue à 120V dans du tampon Tris-Glycine-SDS pendant un temps adapté à la taille de la protéine d'intérêt. Le transfert des protéines se fait dans du tampon Tris-Glycine-Ethanol pendant 1h15 à 40mA sur membranes Hybond PVDF (Amersham). Les membranes sont ensuite lavées et saturées par du TBS Tween 0.1% Régilait 5% puis un anticorps primaire polyclonal anti-SarA de lapin est ajouté et incubé sur à 4°C sur la nuit. L'anticorps secondaire anti-lapin couplé à la peroxidase de raifort (HRP) est placé sur la membrane. La détection des protéines est réalisée par le kit de détection ECL Prime Western Blotting (Amersham) et observée par le logiciel ImageQuant LAS 4000. Pour s'assurer du dépôt d'une même quantité de protéines totales pour chaque échantillon, un duplicata des gels est réalisé et les protéines sont révélées à l'ajout de SYPRO Ruby (Bio-Rad).

7.2. Protéines de taille < 10 kDa - Peptides

a) Extraction de protéines

Les cultures sont centrifugées (8 unités de DO) pendant 10min à 4 500 rpm à 4°C. Du TCA est ajouté au surnageant pour obtenir 10% de TCA au final et permettre la précipitation des protéines à 4°C sur la nuit. Parallèlement, le culot est resuspendu dans du tampon (Phosphate de sodium 100mM pH 8, EDTA 0,1mM et glycérol 10%) avec 10% de lysostaphine (1mg/mL). Le mix est incubé 15min à température ambiante.

b) Extraction des protéines et fractionnement

Les souches sont cultivées jusqu'à DO_{600nm} égale à 2. 4mL de culture sont centrifugées (8 unités de DO) pour chaque extraction de protéines. Le surnageant précipité en présence de 10% de TCA final dans un nouveau tube et incubé à 4°C sur la nuit. Le culot est repris dans du tampon de lyse (50 mM Tris HCl pH 7,5, 20 mM MgCl₂) supplémenté en sucrose 37%, PMSF 0,1mM et lysostaphine 0,1 mg/mL. Le mix est incubé à température ambiante pendant 20min, puis centrifugé 8min à 4000rpm à 4°C. Le surnageant (correspondant

aux protéines de la paroi) est précipité au TCA 10% sur la nuit à 4°C dans un nouveau tube. Le culot est repris dans du tampon de lyse sans sucrose avec des inhibiteurs de protéases 7X final. Des billes de verre sont ajoutées au mix et passés au FastPrep pour lyser les cellules. 500 µl de tampon de lyse supplémenté en inhibiteurs de protéase 1X sont ajoutés et le tube est centrifugé à 50 000g 1h à 4°C. Le surnageant (protéines cytoplasmiques) est précipité avec 10% de TCA sur la nuit à 4°C. Le culot (protéines membranaires) est repris dans du tampon de lyse sans sucrose avec des inhibiteurs de protéases 7X et 0,01% Triton X100, et stocké à -20°C. Le lendemain les tubes contenant les protéines précipitées au TCA sont centrifugés 30min à 13 000 rpm à 4°C, le surnageant est enlevé et le tube est de nouveau placé pour centrifugation pendant 15min. Les culots sont repris dans du tampon Laemmli 1X.

Le Gel tris-tricine a été réalisé selon le protocole de Germain-Amiot et *al.*, 2018.

c) Immunoprécipitation de PepA2-FLAG

D'un côté le lysat de protéines totales (input) a été ajouté sur des billes Dynabeads Protein G (Invitrogen) dans un tube Low-binding protein et placé sous agitation 2h à 4°C pour se débarrasser des fixations aspécifiques. En parallèle, des billes ont été incubées avec l'anticorps anti-FLAG dans un tube Low-binding protein, et incubées 4h à 4°C sous agitation. Ce mix a été lavé avec 200µL de PBS Tween20 0,01%. Le lysat a été ajouté sur ce mix prélavé et placé à 4°C sous agitation sur la nuit. Le lendemain, ce mix est lavé au PBS Tween20 0,01% et l'élution est effectuée dans du Laemmli 1X préparé extemporanément, et incubé à 10min à 70°C. Le surnageant récupéré sur les billes correspond à la fraction « IP ».

8. RT-qPCR

8.1. Traitement à la DNase

Les ARN sont traités à la DNase I avec le kit Invitrogen : 2µg d'ARN dilué dans de l'eau (qsp 16µL), 1µL DNase I et 2µL tampon DNase I 10X. Le mix est incubé 15min à température ambiante puis de nouveau 2µL de DNase I sont ajoutés. Le mix est de nouveau incubé 15min à température ambiante. Le mix est mis sur glace et 2,2µL EDTA 25mM sont ajoutés. Le mix est incubé 10min à 65°C et remis sur glace.

8.2. Reverse transcription (RT)

Deux tubes sont effectués pour chaque échantillon dit RT négative (-) et RT positive (+). Un mix (7µL) composé de tampon reverse transcriptase 10X, dNTP 100mM, d'amorces aléatoires 10X, et d'enzyme reverse transcriptase est ajouté aux ARN traités à la DNase I (5,5µ). Les échantillons sont incubés 10min à 25°C, puis 2h à 37°C et 5min à 85°C au thermocycleur. Les échantillons (ADN complémentaires - ADNc) sont dilués au 1/100^e et stockés à -20°C.

8.3. PCR quantitative (qPCR)

Dans un premier temps, les efficacités de chaque couple d'amorces sont testées sur une gamme d'ADN génomique (de 1ng à 10⁻⁴ ng). Dans une microplaque, 5µL d'ADN ou H₂O sont ajoutés à 15µL de mix (10µL de SYBR Green PCR master mix et 5µL de mix d'amorces - 0,5µM de chaque). Les amorces sont listées dans le **tableau 19**.

Dans une microplaque, les ADNc dilués au 1/100^e (5µL) sont ajoutés à 15µL de mix (10µL De SYBR Green PCR master mix et 5µL du mix d'amorces 0,5µM chacune). La plaque est placée dans le thermocycleur qPCR contrôlé par le logiciel StepOne.

Nom	Séquence
qPCR_ilmD_5'	AAATGCCTGCCCTACTTGTG
qPCR_ilmD_3'	TTAAAAGCTGCTTGGCGAAT
qPCR_ARN5S_5'	GCAAGGAGGTCACACCTGTT
qPCR_ARN5S_3'	GCCTGGCAACGTTCTACTC

Tableau 19 : Amorces utilisées pour la RT-qPCR.

Publication



Expanding the *Staphylococcus aureus* SarA Regulon to Small RNAs

 Charlotte Oriol,^a
 Liviu Cengher,^b
 Adhar C. Manna,^b
 Tony Mauro,^a
 Marie-Laure Pinel-Marie,^a
 Brice Felden,[†]
 Ambrose Cheung,^b
 Astrid Rouillon^a

^aRennes 1 University, INSERM, BRM [Bacterial Regulatory RNAs and Medicine], UMR_S 1230, Rennes, France

^bDepartment of Microbiology and Immunology, Geisel School of Medicine at Dartmouth, Hanover, New Hampshire, USA

Charlotte Oriol and Liviu Cengher contributed equally to this work. This order was chosen because BRM laboratory initiated the work. Both laboratories agreed with the order.

ABSTRACT SarA, a transcriptional regulator of *Staphylococcus aureus*, is a major global regulatory system that coordinates the expression of target genes involved in its pathogenicity. Various studies have identified a large number of SarA target genes, but an in-depth characterization of the *sarA* regulon, including small regulatory RNAs (sRNAs), has not yet been done. In this study, we utilized transcriptome sequencing (RNA-Seq) and chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-Seq) to determine a comprehensive list of SarA-regulated targets, including both mRNAs and sRNAs. RNA-Seq analysis indicated 390 mRNAs and 51 sRNAs differentially expressed in a $\Delta sarA$ mutant, while ChIP-Seq revealed 354 mRNAs and 55 sRNA targets in the *S. aureus* genome. We confirmed the authenticity of several novel SarA targets by Northern blotting and electrophoretic mobility shift assays. Among them, we characterized repression of *sprG2*, a gene that encodes the toxin of a type I toxin-antitoxin system, indicating a multilayer lockdown of toxin expression by both SarA and its cognate antitoxin, SprF2. Finally, a novel SarA consensus DNA binding sequence was generated using the upstream promoter sequences of 15 novel SarA-regulated sRNA targets. A genome-wide scan with a deduced SarA motif enabled the discovery of new potential SarA target genes which were not identified in our RNA-Seq and ChIP-Seq analyses. The strength of this new consensus was confirmed with one predicted sRNA target. The RNA-Seq and ChIP-Seq combinatory analysis gives a snapshot of the regulation, whereas bioinformatic analysis reveals a permanent view of targets based on sequence. Altogether these experimental and *in silico* methodologies are effective to characterize transcriptional factor (TF) regulons and functions.

IMPORTANCE *Staphylococcus aureus*, a commensal and opportunist pathogen, is responsible for a large number of human and animal infections, from benign to severe. Gene expression adaptation during infection requires a complex network of regulators, including transcriptional factors (TF) and sRNAs. TF SarA influences virulence, metabolism, biofilm formation, and resistance to some antibiotics. SarA directly regulates expression of around 20 mRNAs and a few sRNAs. Here, we combined high-throughput expression screening methods combined with binding assays and bioinformatics for an in-depth investigation of the SarA regulon. This combinatory approach allowed the identification of 85 unprecedented mRNAs and sRNAs targets, with at least 14 being primary. Among novel SarA direct targets, we characterized repression of *sprG2*, a gene that encodes the toxin of a toxin-antitoxin system, indicating a multilayer lockdown of toxin expression by both SarA and its cognate antitoxin, SprF2.

KEYWORDS *S. aureus*, ChIP-Seq, RNA-Seq, SarA regulon, sRNA

Citation Oriol C, Cengher L, Manna AC, Mauro T, Pinel-Marie M-L, Felden B, Cheung A, Rouillon A. 2021. Expanding the *Staphylococcus aureus* SarA regulon to small RNAs. *mSystems* 6:e00713-21. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00713-21>.

Editor Sergio Baranzini, University of California, San Francisco

Copyright © 2021 Oriol et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Ambrose Cheung, ambrose.cheung@dartmouth.edu, or Astrid Rouillon, astrid.rouillon@univ-rennes1.fr.

[†]Deceased.

Received 8 June 2021

Accepted 9 September 2021

Published 12 October 2021

The Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus* resides as a commensal in about one-third of the human population (1) but can easily become a pathogen that causes a variety of diseases, ranging from mild to life-threatening infections such as endocarditis, pneumonia, bacteremia, and toxic shock syndrome (2). The emergence of multidrug-resistant strains and the lack of an effective vaccine are responsible for the burden of hard-to-treat acute and chronic staphylococcal infections. The pathogenicity of *S. aureus* is a complex process that depends upon coordinated and timely expression of virulence factors controlled by a network of regulators, including two-component regulatory systems, transcriptional factors (TFs), small regulatory RNAs (sRNAs), and small signaling molecules (3). Among transcriptional regulators, SarA is a global regulatory transcription element in *S. aureus* (4, 5). The *sarA* promoter region is extensive (~800 bp), comprising three distinct promoters (P2, P3, and P1) that produce three distinct overlapping transcripts (P2 *sarA*, P3 *sarA*, and P1 *sarA*), each carrying the major 372-bp *sarA* open reading frame (ORF), which yields the 14.7-kDa SarA protein (6). Within this long promoter region, two sRNAs known as Teg49 and Teg48 have been characterized, with Teg49 being involved in the stability of the P3 *sarA* transcript and regulation of virulence genes independently of SarA (7, 8).

SarA, a homolog of MarR in Gram-negative bacteria, is a winged-helix DNA-binding protein that binds specific DNA sequences by interacting with specific amino acid residues within SarA (i.e., R84 and R90) for the regulation of its targets (9). The phosphorylation status of SarA, which involves *in vivo* and *in vitro* phosphorylation of threonine/serine residues, modifies its DNA binding abilities (10). Affinity of SarA for the *agr* B1/B2 binding site increases with the level of reducing agent and decreases with the level of oxidizing agent, and this involves the unique cysteine residue present in SarA protein (11). This redox-sensing residue, Cys9, is conserved between Sar family members. It may allow a thiol switch or phosphorylation and could represent the major site of phosphorylation in the SarA/MgrA family proteins (12–14). SarA binds to a conserved operator 26-bp sequence (ATTTGTATTTAATTTTATATAATTG) located in the upstream promoter region of several SarA-regulated target genes (13, 15–18). Interestingly, whereas Sterba et al. (19) proposed a 7-bp SarA consensus (ATTTTAT) motif, at least two 7-bp consensus motif sequences can, with some variation, be located within the conserved operator sequence described previously and could anchor the SarA dimer.

Considering the binding properties of SarA, which binds as a dimeric form of a flexible winged-helix structure with more than 40 Å distance between two wings (9), it is reasonable to predict that a functional SarA binding site would consist of at least two consensus binding motifs with any orientation (palindrome or inverted repeats) that could lead to regulation of a large number of targets in the *S. aureus* genome. In addition to SarA binding to DNA, it has been shown that it may bind to mRNA to influence its turnover (20). Nevertheless, published observations have suggested that SarA's regulatory effects might be more complex than those of any other transcriptional regulators. SarA upregulates the synthesis of fibronectin- and fibrinogen-binding proteins, hemolysins (alpha-, beta-, and gamma-hemolysins), enterotoxins, toxic shock syndrome toxin 1, oxidative stresses (*sodM* and *txbB*), and genes involved in biofilm formation (e.g., *icaRA* and *bap*) and repressed expression of proteases (*ssp* and *aur*), protein A (*spa*), and collagen-binding proteins (*cna*) (4, 5, 13, 18, 21, 22). SarA regulates many genes indirectly by modulating the expression of other regulatory loci (e.g., *rot*, *agr*, *sarS*, *sarV*, and *sarT*) (9, 15, 16, 23–25). Deletion of *sarA* in *S. aureus* affects large numbers of target genes (~120 genes) involved in virulence or metabolic processes, as determined by microarray analyses (26). SarA is the first and well-characterized member of a family of proteins called the SarA protein family based on protein sequence alignment. Nine other SarA paralogues (i.e., SarR, SarS, SarT, SarU, SarV, SarX, SarZ, MgrA, and Rot) have been characterized and are found to regulate a large number of target genes, including those involved in virulence, biofilm formation, autolysis, antibiotic resistance, and metabolic processes (5).

Various studies have also shown that SarA regulates transcription of at least three sRNAs: *RNAIII*, *sm_3610_sprC*, and *sm_9340* (6, 15, 27, 28). The Staphylococcal Regulatory

RNAs Database (SRD) lists around 500 potential sRNAs in *S. aureus* genomes (29), while very few of them have been characterized for their role in target gene regulation and only 50 of them have been classified as bona fide sRNAs (30). Typically, sRNA base-pairs with specific mRNA target to regulate their stability and translation efficiency (31). In the last decade, it was shown that a number of sRNAs are involved in the regulation of crucial cell processes such adaptation to environmental changes and virulence in various organisms, including *S. aureus* (32, 33). The best-described sRNA in *S. aureus* is RNAIII, a dual-function sRNA, which codes for delta toxin as well as functioning as an sRNA that binds target mRNAs to promote mRNA degradation (e.g., mRNAs for *spa*, *coa*, *sbi*, *ltaS*, *lytM*, *rot*, and others) or improve translation (e.g., *hla*, *map*, and *mgrA*) (34–36). These examples highlight the complexity and regulatory aspects of sRNA being an alternative regulator for target regulations under environmental changes. There are several well-characterized sRNAs, including RsaD, RsaA, SprC, and ArtR, for example. RsaD posttranscriptionally regulates *alsS* (acetolactate synthase) mRNA and enzyme levels (37), and its transcription is repressed by CodY, while the sRNA RsaA is known to repress the synthesis of the transcriptional regulator MgrA (38). Smn_3610_SprC, directly repressed by SarA, has been shown to reduce virulence and bacterial loads in a mouse infection model and to negatively regulate the major staphylococcal autolysin by sRNA-mRNA base-pairing (39). ArtR is involved in activating alpha toxin expression by targeting the 5' untranslated region (UTR) of *sarT* mRNA (40). When sRNA is described, type I toxin-antitoxin (TA) systems must be cited. In this TA system, an antisense RNA plays the role of antitoxin to prevent the synthesis of its cognate toxin by directly base-pairing to the mRNA (41). Type I TA systems, like other TA systems, are not essential for normal cell proliferation but allow a growth slowdown or redirect bacterial metabolic resources until growth conditions improve and therefore represent a crucial element of *S. aureus* adaptation. SprA1_{AS} and SprF1 are examples of antitoxin sRNAs from functionally characterized SprA1/SprA1_{AS} and SprG1/SprF1 type I TA systems (42, 43).

Here, we present an extensive analysis of the SarA regulon by differential transcriptome sequencing (RNA-Seq) between the wild type and a *sarA* mutant strain and chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-Seq) with anti-SarA-Myc. We obtained 441 (390 mRNAs and 51 sRNAs) and 409 (354 mRNAs and 55 sRNAs) targets regulated by SarA in RNA-Seq and ChIP-Seq, respectively. By combining both approaches, we identified 140 targets in common and 85 unprecedented characterized targets (72 mRNAs and 13 sRNAs). Among these 85 new targets, 16 targets (both mRNAs and sRNAs) were validated using genetic and biochemical approaches. We also identified three important sRNAs (i.e., *smn_2230_sprG2*, encoding type I toxin sRNA; *smn_4540_sprA2_{AS}*, encoding type I antitoxin sRNA; and *smn_1640_rsdD*), which were characterized for the authenticity of SarA-mediated regulation even if the last two sRNA targets did not appear as SarA common RNA-Seq/ChIP-Seq targets. In the SprG2/SprF2 TA system, SprG2 regulation involves SarA at the transcription level, whereas SprF2 sRNA antitoxin regulates SprG2 translation. Such a dual control probably allows *S. aureus* to finely tune the quantity of SprG2 peptide, which could lead to bacteriostasis or lethality. Finally, bioinformatics analysis led to the identification of a SarA consensus binding/regulatory DNA motif. Genome-wide scanning revealed several new SarA targets, which are not found in either RNA-Seq and ChIP-Seq analyses, among which one sRNA promoter was proven to be bound directly by SarA, using *in vitro* electrophoretic mobility shift assay (EMSA) studies. Overall, results from both approaches identified new SarA targets, including sRNAs for which identification of the TF responsible for variation in their expression may probably facilitate functional characterization.

RESULTS

Investigation of the SarA-dependent transcriptome in *S. aureus* strain HG003.

SarA is a pleiotropic transcriptional regulator involved in regulation of virulence, biofilm formation, oxidative stresses, and accessory antibiotic resistance factors, either directly by binding to the upstream promoter region or indirectly by regulating

through other regulatory systems (44–48). The known targets of SarA are mostly mRNAs, with a few sRNAs (e.g., *RNAIII*, *sm_3610_SprC*, and *srn_9340*) (6, 15, 18, 22, 25–28, 46, 49–52). At present, genome-wide annotations of sRNAs in staphylococci are available (29, 30, 53), but the regulation of their expression is largely unknown. To determine the genome-wide SarA-regulated targets, we analyzed the transcriptomes of the wild-type HG003 and isogenic $\Delta sarA$ mutant strains (Table S1A) grown to exponential (E) or early stationary (S) phase (Fig. S1). We worked with HG003, an NCTC 8325 derivative. NCTC 8325 (RN1) is a *S. aureus* strain isolated from a sepsis patient in 1960 that is widely used for genetic and physiological studies (54). This strain is defective for two main regulators encoded by *rsbU* and *tcaR*: a positive activator of the general stress response regulator σ^B and a transcriptional activator of the protein A-encoding gene, respectively. HG003 has been repaired for both *rsbU* and *tcaR* genes (55) and is increasingly used by scientific community for studying regulation, biofilm formation, or antibiotic tolerance (30, 56–58).

An HTSeq/DESeq pipeline detected genes whose expression varies in the absence of the *sarA* gene. The thresholds used to obtain SarA targets were a fold change greater than or equal to 3 between wild-type HG003 and isogenic $\Delta sarA$ mutant strains combined with a minimum number of fragments per kilobase per millions of fragments mapped (FPKM) of 10 under at least one growth condition. RNA-Seq data indicated that the expression of 142 genes is activated (128 mRNA-encoding genes and 14 sRNA-encoding genes) and 299 (262 mRNA genes and 37 sRNA genes) repressed in the *sarA* mutant compared to the wild-type strain (Table S2). Among the activated transcripts, 25 were detected at the E phase and 110 at the S phase (Fig. 1A). The expression of 3 sRNA genes and 3 mRNA genes was induced at both phases of growth. Among the repressed transcripts, 132 are mRNAs and 16 are sRNAs repressed at E phase, 231 are mRNAs and 29 are sRNAs repressed at S phase, and 101 are mRNAs and 8 are sRNAs repressed at both growth phases (Fig. 1A). The number of regulated genes is twice as great at the early stationary growth phase as at the exponential growth phase in the HG003 $\Delta sarA$ strain despite the observation that overall SarA protein levels are known not to fluctuate significantly with growth phase (18, 59, 60). The implication is that SarA mainly regulates target genes during stationary growth phase (such as secreted proteins, toxins, and metabolic processes). As SarA is a protein that can be modified in ways that change its ability to bind promoters (e.g., oxidation and phosphorylation), it is likely that the higher number of targets at early stationary phase is linked either to posttranslational modification on SarA at the Cys9 residue or to multiple transcriptional regulators working in tandem in distinct cellular phases (9, 10, 14).

Our RNA-Seq data show that the *sarA*-repressed targets are predominantly transport/binding proteins and proteins involved in protein fate, such as type VII secretion protein or proteases. The activated targets are mainly involved in central metabolism, like pyrimidine nucleotide biosynthesis (Fig. 1B; Table S2). The data confirm that among SarA-repressed targets, expression of several proteases, including those encoded by *sspA*, *sspB*, and *sspC* (SAOUHSC_00986-00988) and aureolysin (encoded by *aur*; SAOUHSC_02971) is controlled by SarA, in agreement with a known increase in protease production in *sarA* mutants (61). Moreover, *splA* to -F serine protease expression is strongly increased in the absence of *sarA*, as previously described for the *S. aureus* osteomyelitis model (62). Both serine and cysteine protease expression must be finely tuned due to their participation in biofilm formation, since it has been shown that more serine or/and cysteine proteases would lead to reduced biofilm formation (61). SarA also regulates genes involved in structure of biofilm like the *ica* operon (SAOUHSC_03002-3005) and *capA1* (SAOUHSC_03000), which are both repressed by SarA (Table 1; Table S2) (63, 64). The expression of the thermonuclease gene *nuc* (SAOUHSC_00818) was increased 130- and 269-fold in the *sarA* mutant at E and S phases, respectively (Table 1), which is in agreement with previously demonstrated repression in *sarA* mutants (65). RNA-Seq data also confirmed the repression of previously published two sRNA targets, *srn_3610_sprC* and *srn_9340* (Table 1; Table S2) (28).

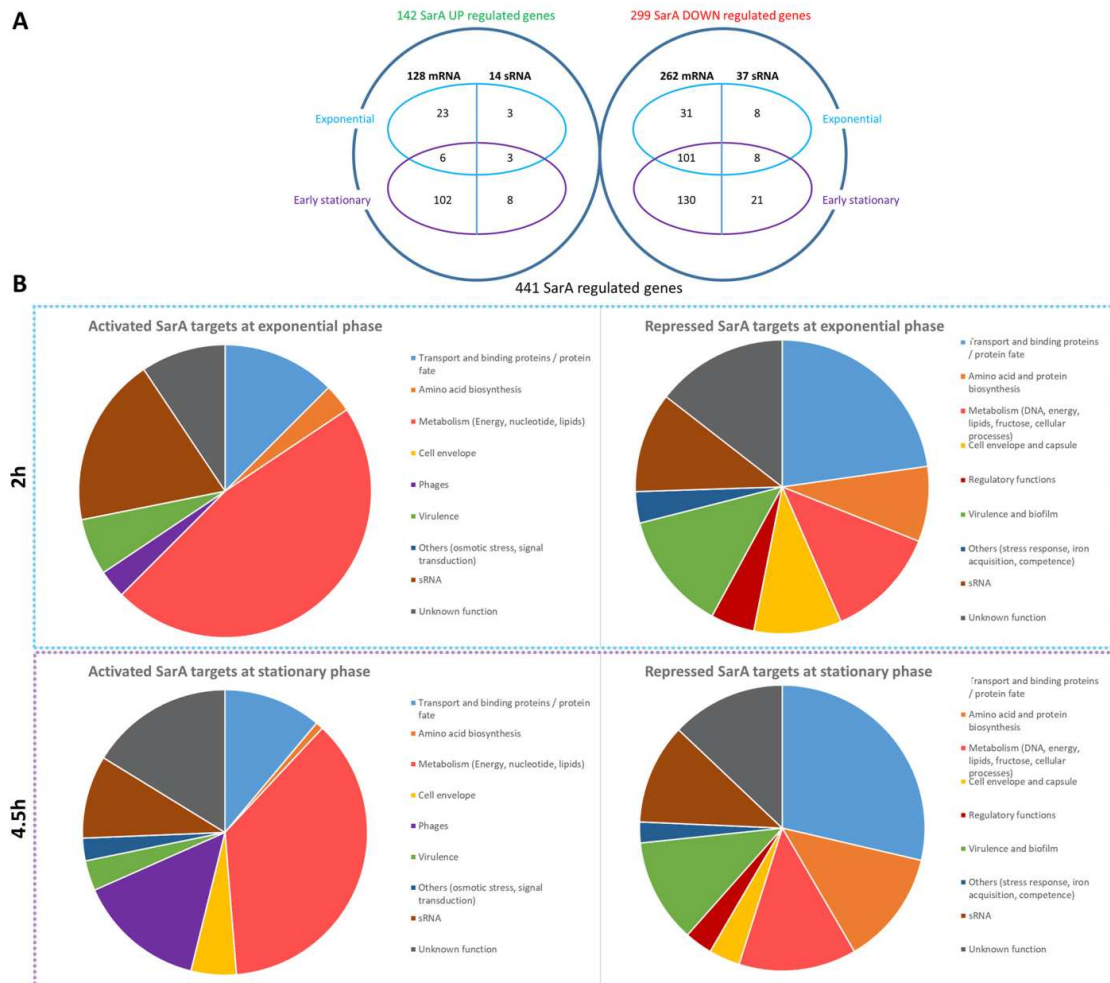


FIG 1 Transcriptomic studies of HG003 and HG003 $\Delta sarA$ strains. (A) Global visualization of SarA regulated genes detected through RNA-Seq experiments. (B) SarA target classification according to function. SarA-repressed targets are on the right, and SarA-activated targets are on the left.

Among the SarA targets previously identified, the expression of gamma-hemolysin (HlgACB) leukotoxin genes *hlgC* and *hlgB* (SAOUHSC_02709 and SAOUHSC_02710), which were previously shown by microarray to be decreased in the absence of *sarA* (26), was found in this study to be increased in the absence of *sarA* (Table S2). Leukotoxins participate in *S. aureus* virulence by targeted killing of host immune cells (66). We determined that the expression of other gene pairs producing leukotoxins are also increased in the absence of *sarA*, including *lukG-lukH* (SAOUHSC_02241-SAOUHSC_02243) and *lukD-lukE* (SAOUHSC_01954-SAOUHSC_01955). Altogether, all leukotoxin systems that are present in HG003 appear to be repressed by SarA. Although the role of SarA in the transcriptional regulation of pyrimidine operon (SAOUHSC_01165-01172) was described previously (67), *sarA*-mediated activation of the purine operon (SAOUHSC_01008-01012) and genes implicated in fatty acid metabolism (SAOUHSC_00195 to SAOUHSC_00198) are novel discoveries (Table S2).

Altogether, the RNA-Seq data revealed that the expression of 390 mRNAs and 51 sRNAs is influenced by *sarA* inactivation, of which 46 mRNAs and 3 sRNAs were previously

TABLE 1 Extraction of RNA-Seq data with genes repressed by SarA^a

Description and annotation	Gene name	Assignment	Differential expression in HG003 Δ sarA vs HG003 at growth phase			
			Exponential (2 h)		Early stationary (4.5 h)	
			Fold change	P value	Fold change	P value
Genes repressed by SarA						
Regulatory functions						
SAOUHSC_00674	<i>sarX</i>	Staphylococcal accessory regulator family	4.1	7.20E-44	3.7	3.29E-09
SAOUHSC_00694	<i>mgrA</i>	Staphylococcal accessory regulator family			3.8	6.70E-10
SAOUHSC_00818	<i>nuc</i>	Thermonuclease	130.1	4.46E-277	269.4	4.52E-115
SAOUHSC_00913	<i>lysR</i>	LysR family regulatory protein	65.1	5.18E-208	42.8	2.02E-71
SAOUHSC_00992	<i>atlR</i>	MarR family transcriptional regulator	17.3	8.53E-136	28.7	1.53E-54
SAOUHSC_01402	<i>msa</i>	Protein Msa (modulator of <i>sarA</i>)	4.8	3.48E-46	3.4	1.32E-09
SAOUHSC_02569	<i>sarY</i>	Staphylococcal accessory regulator family	8.8	8.35E-80	5.6	2.82E-16
SAOUHSC_02570		AraC family transcriptional regulator	11.4	1.21E-112	6.0	2.74E-20
Virulence						
SAOUHSC_00061		Myosin-cross-reactive antigen	11.3	1.58E-116	21.5	1.86E-46
SAOUHSC_00069	<i>spa</i>	Protein A			3.2	3.98E-08
SAOUHSC_00544	<i>sdrC</i>	Fibrinogen-binding protein SdrC	6.8	1.52E-73	5.4	8.24E-17
SAOUHSC_00545	<i>sdrD</i>	Fibrinogen-binding protein SdrD	8.0	4.39E-91	5.2	7.44E-15
SAOUHSC_00968		Bacteriocin-associated integral membrane protein			5.0	1.33E-15
SAOUHSC_01121	<i>hla</i>	Alpha-hemolysin	5.6	3.44E-39		
SAOUHSC_01448	<i>norB</i>	Quinolone resistance protein	13.3	3.53E-127	24.5	1.66E-55
SAOUHSC_01954	<i>lukD</i>	Leukotoxin LukD	6.4	5.27E-30	10.1	3.63E-27
SAOUHSC_01955	<i>lukE</i>	Leukotoxin LukE	9.5	1.76E-38	11.6	3.00E-29
SAOUHSC_02127	<i>scpA</i>	Staphopain thiol proteinase	126.7	0.00E+00	57.2	2.25E-71
SAOUHSC_02129		Staphostatin A	65.3	5.34E-258	51.5	2.25E-71
SAOUHSC_02167	<i>scn</i>	Staphylococcal complement inhibitor SCIN	3.3	7.36E-33	5.6	6.14E-17
SAOUHSC_02171	<i>sak</i>	Staphylokinase	26.7	5.60E-186	30.1	7.57E-59
SAOUHSC_02169	<i>chp</i>	Chemotaxis-inhibiting protein CHIPS	16.6	1.45E-98	4.2	9.39E-10
SAOUHSC_02241	<i>lukG</i>	Leukocidin LukG	6.0	4.85E-67	5.7	4.99E-18
SAOUHSC_02243	<i>lukH</i>	Leukocidin LukH	6.9	5.09E-75	5.9	2.85E-19
SAOUHSC_02463	<i>hysA</i>	Hyaluronate lyase	8.0	2.48E-84	3.8	6.20E-12
SAOUHSC_02611	<i>lyrA</i>	Lysostaphin resistance protein A			3.3	1.96E-08
SAOUHSC_02696	<i>fmhA</i>	Methicillin resistance determinant protein (FemAB family)	38.9	1.01E-198	21.0	2.98E-51
SAOUHSC_02706	<i>sbi</i>	Immunoglobulin G-binding protein Sbi	9.3	1.75E-98	13.3	6.55E-39
SAOUHSC_02709	<i>hlgC</i>	Leukocidin s subunit			11.2	2.96E-32
SAOUHSC_02710	<i>hlgB</i>	Leukocidin f subunit			9.8	1.27E-28
SAOUHSC_02740		Drug resistance MFS transporter, drug:H ⁺ antiporter-2			3.0	2.75E-07
SAOUHSC_02851	<i>cidA</i>	Holin-like protein CidA			4.1	7.94E-13
SAOUHSC_02883	<i>ssaA</i>	Secretory antigen SsaA (LysM domain-containing protein)	4.7	1.33E-50	4.2	4.44E-14
SAOUHSC_02963	<i>clfB</i>	Clumping factor B			5.6	7.01E-17
SAOUHSC_02971	<i>aur</i>	Zinc metalloproteinase aureolysin	467.8	0.00E+00	162.0	4.69E-103
Biofilm						
SAOUHSC_03002	<i>icaA</i>	N-Glycosyltransferase			59.4	7.71E-60
SAOUHSC_03003	<i>icaD</i>	Intracellular adhesion protein D			21.7	3.66E-14
SAOUHSC_03004	<i>icaB</i>	Intercellular adhesion protein B			15.5	1.65E-25
SAOUHSC_03005	<i>icaC</i>	Intercellular adhesion protein C			4.6	2.10E-12
Stress response						
SAOUHSC_00093	<i>sodM</i>	Superoxide dismutase	14.0	1.15E-132	4.5	3.59E-13
SAOUHSC_02949	<i>gpxA2</i>	Putative glutathione peroxidase	6.3	1.77E-61	8.0	3.35E-26
sRNA transcripts ^b						
	<i>srn_3610_sprC</i> (154 nt)		7.1	4.72E-64	8.9	6.84E-28
	<i>srn_9340_sRNA287</i> (116 nt)		13.9	1.20E-50	24.8	1.66E-52

^aEach gene pair or group in boldface is an operon structure. The AureoWiki database (https://aureowiki.med.uni-greifswald.de/Main_Page) was used to describe the gene annotation and assignment (103), and the SRD database was used for sRNA (<http://srd.genouest.org/>).

^bKnown SarA targets (28).

characterized (13, 16, 18, 22, 25–27, 46, 49–52, 68). Therefore, the transcription of 344 novel mRNAs and 48 new sRNAs was altered in the absence of *sarA*, as determined by RNA-Seq using two different phases of growth.

Identification of SarA-bound regions on a genome-wide scale. To determine *in vivo* DNA binding regions of SarA on a genomic scale, we performed ChIP-Seq analysis (69) using an anti-SarA monoclonal antibody with wild-type cell extracts or an anti-Myc antibody with cell extracts of a *sarA* mutant harboring pSK236::P1*sarA-myc*. Growth of the *sarA* mutant harboring pSK236::P1*sarA-myc* was shown to be similar to that of the wild-type HG003 strain, and Western blotting revealed an equivalent level of SarA in both strains (Fig. S2A and B). In examining SarA protein retained in cross-linked DNA fragments, an anti-Myc antibody showed cleaner pulldown than the anti-SarA antibody, which had multiple bands (Fig. S2C and D). Cross-linked protein-DNA complexes containing Myc-tagged SarA were sheared and immunoprecipitated with anti-Myc monoclonal antibody and protein A-bound Sepharose beads. The DNA fragments were then blunted, ligated to adaptors, and identified by sequencing using the Illumina HiSeq 4000 system. The resulting reads were mapped to NC_007795, the common reference for HG003 and the SRD sRNA database (29, 56). All gene sequences with enrichment peaks compatible with transcriptional regulation were listed, and some examples of local enrichment are shown for both sRNAs and mRNAs (Fig. 2A and B).

The ChIP-Seq data obtained at the early stationary phase of growth (Fig. S2A) revealed 341 SarA binding sites/peaks with a threshold peak shape score (PSS) of 30.0 and *P* value of 1×10^{-250} or less, with a mix of coordinated, convergent, and divergent gene orientations around them (Table S3). In addition, we directly looked and confirmed these peaks to be in the 5' regions of sRNAs or genes using CLC Workbench and Integrative Genomics Viewer (IGV). These stringent cutoffs were set to minimize the number of false-positive results and to increase the viability of motifs generated from selected regions. Of these 341 peaks, 307 appeared in the upstream promoter region of sRNAs or mRNAs, and 34 did not match any annotated promoters or are situated within the coding regions. Considering that SarA binding could be in the promoters of both convergent and divergent genes, we found 88 SarA binding peaks in the divergent genes. Binding of SarA occurred all along the genome with various peak intensities, though some regions seem to have higher binding than others (Fig. 2C). SarA had a lower strand coefficient (1.015) than expected for TFs, indicating some promiscuity in binding site and a wide distribution of *sarA* peaks. Overall, we identified 409 SarA binding targets in the *S. aureus* genome, which include both sRNA (55) and mRNA (354) targets (Table S3; Fig. 2D).

The SarA ChIP peaks on genes have been classified according to their putative functions (Table S4). The three sRNAs whose expression is known to be regulated by SarA (*RNAIII*, *srn_3610_sprC*, and *srn_9340*) have ChIP peaks at their promoter regions, with PSSs of 32.7, 49.9, and 54.8, respectively (Fig. 2A). This study also independently validated SarA binding to the promoters of known SarA mRNA targets like staphylococcal nuclease (SAOUHSC_00818; PSS 42.7), superoxide dismutase (encoded by *sodM*; SAOUHSC_00093; PSS 43.1), thioredoxin reductase (SAOUHSC_00785; PSS 26.4), and the pore-former alpha-hemolysin (SAOUHSC_01121; PSS 43.3) (Fig. 2B) (12, 26). Most of the targets can be divided into 3 classes of proteins: (i) transport/binding and protein fate, (ii) regulatory proteins, and (iii) proteins involved in virulence. Among novel potential SarA targets, there is the transcriptional regulator *mgrA* (SAOUHSC_00694), for which a ChIP peak (PSS, 46.6) is present in its promoter region (Table S3 and Fig. S2). Along with *sarA* (PSS, 37.8), *sarS* (PSS, 47.4), *sarT* (PSS, 34.7), *sarU* (PSS, 34.7), *sarX* (PSS, 35.9), *sarZ* (PSS, 38), *sarY* (PSS, 43.25), and *rot* (PSS, 52.3), our data show that 9 of 10 SarA family members possess a SarA ChIP binding peak in their promoter regions (Table S4). Although some of these *sarA* protein family genes (e.g., *sarA*, *sarS*, *sarT*, *sarU*, and *rot*) have been shown to be directly regulated by SarA, the presence of SarA ChIP peak in the upstream promoter region of other *sarA* paralogs may suggest a differential regulatory mechanism with either an environmental signal or involvement

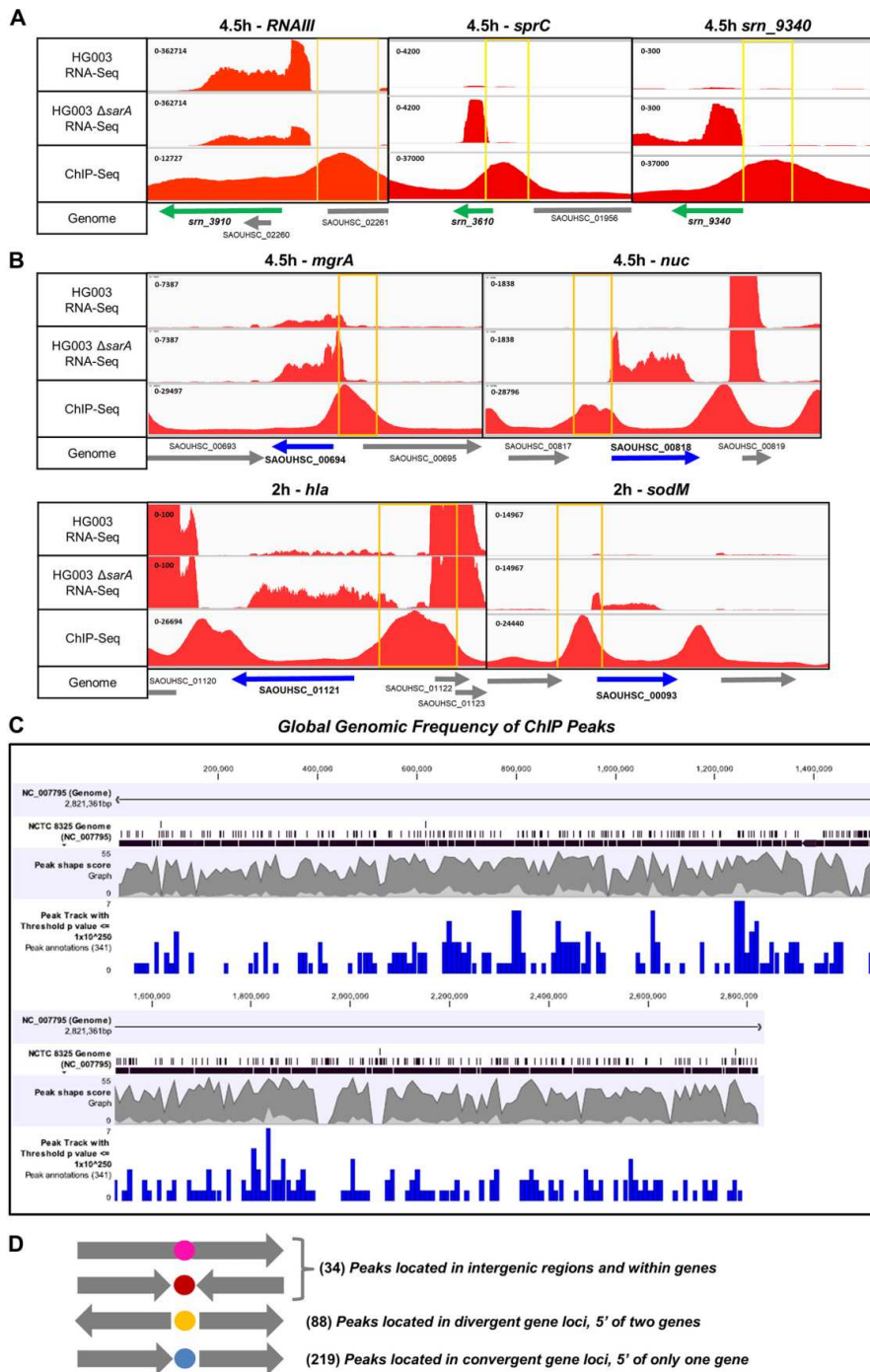


FIG 2 IGV visualization of RNA-Seq and ChIP-Seq results with known SarA targets: RNA-Seq reads and SarA DNA binding peak on chosen genomic locus. Comparison of RNA-Seq profiles of HG003 WT and HG003 Δ *sarA* strains with ChIP-Seq
(Continued on next page)

of other factors, which are yet to be elucidated. This result is in accordance with previous data showing cross regulations among SarA family proteins and also proposes some new potential regulations (5).

New sRNA and mRNA genes directly regulated by SarA: identification and validation of 12 SarA novel targets. In order to differentiate between direct and indirect targets, the intersection between RNA-Seq (Table S2) and ChIP-Seq (Table S3) was used to identify a set of shared gene targets. These genes are likely to be direct targets, since both binding to the promoter region and transcriptional regulation co-occurred. Based on this criterion, 88 mRNA promoters and 15 sRNA promoters predicted to be commonly regulated by SarA were identified (Table S5). Nine mRNAs and three sRNAs genes were selected for further analysis and validation from this set of novel gene targets (Table S5, asterisks; Table 2). We deliberately chose SarA-repressed targets because transcriptional repression seemed to occur preferentially on the promoter region close to the -10 and -35 boxes, whereas transcriptional activation is a more variable process, with the binding site being more difficult to ascertain with EMSA.

Our selection was based on (i) high repression level inferred from the RNA-Seq data, (ii) the presence of a ChIP-Seq peak with a P value of $<10^{-250}$, and (iii) a SarA ChIP peak location compatible with transcriptional repression. Thus, these genes could serve as a stringent set from which the binding of SarA to gene promoters and downstream analysis could be examined. All 12 genes had not been identified previously as SarA direct targets, except for the staphopain thiol protease (SAOUHSC_02127) (70, 71). In addition to these, a LysR-like putative regulatory protein (SAOUHSC_00913) appeared to be repressed by SarA in a previous transcriptomic experiment (50), but direct regulation between *sarA* and *lysR* had not been demonstrated until now. For each candidate, the overall RNA-Seq and ChIP-Seq data were summarized using Integrative Genomic Viewer (Fig. S3) (72).

To test the regulation of these 12 targets by SarA, we isolated total cellular RNA from various HG003-derivative strains in two phases of growth. Northern blot assays were performed on either agarose or acrylamide gels, depending on the size of the analyzed mRNAs and sRNAs. All mRNAs and sRNAs selected based on stringent criteria showed increased expression based on band intensity in the absence of *sarA*, which confirms a repressive role of SarA on the expression of these targets (Fig. 3). We observed high level of transcripts in the absence of *sarA*, while these expression levels were restored to the wild-type level in the parent/complemented strains at both phases of growth (Fig. 3A and B). These Northern blot data confirmed our RNA-Seq results, whereas Western blotting performed in parallel (Fig. 3C) confirmed the presence or the absence of SarA.

The ChIP-Seq data suggested that SarA should bind the promoter regions of the 12 mRNAs and sRNAs to downregulate expression. To confirm the direct binding of SarA to the upstream promoter region of these targets, we performed EMSAs as shown in Fig. 4. For this purpose, a 250-bp region from -200 bp upstream to $+50$ bp downstream from the transcription start site (TSS) of all 12 targets were PCR amplified, radio-labeled, and used to perform EMSA with purified recombinant His₆-SarA protein. The transcription start site (TSS) was determined by using TSS EMOTE (73). The addition of increasing amounts of SarA (from 0 to 2 pmol) led to progressive retardation of all selected DNA fragments (Fig. 4), suggesting that SarA binds each of the 12 promoter regions tested *in vitro*. To determine if SarA binding is specific, EMSA was also performed

FIG 2 Legend (Continued)

profiles with IGV visualization of (A) the known SarA sRNA targets RNAIII, Srn_3610_SprC, and Srn_9340 at 4.5 h of growth and (B) the known SarA mRNA targets SAOUHSC_00694 (*mgrA*) and SAOUHSC_00818 (*nuc*) at 4.5 h and SAOUHSC_00093 (*sodM*) and SAOUHSC_01121 (*hla*) at 2 h of growth. sRNA genes are indicated with green arrows and mRNA genes with blue arrows. The yellow box represents the ChIP-Seq peak region upstream of the SarA regulated gene. (C) Global genomic frequency of ChIP peaks across the *S. aureus* chromosome. (D) Targets sorting in different categories. The 341 putative SarA binding sites (ChIP peaks of E^{-250}) are represented with respect to staphylococcal genes. The gray arrows represent the genes and their orientation. Pink and red circles represent 34 putative SarA binding sites inside a gene region and downstream of the gene region, respectively. The yellow circle shows 88 putative SarA binding sites upstream of 2 gene regions. The blue circle indicates 219 putative SarA binding sites upstream of a single gene.

TABLE 2 mRNA and sRNA targets examined for SarA regulation and binding

Gene group and annotation	Gene name	Assignment	Differential expression in HG003 Δ sarA vs HG003 at growth phase				CHIP-Seq data	
			Exponential (2 h)		Early stationary (4.5 h)		Distance to the ATG or +1 (nt) ^a	P value
			Fold change	P value	Fold change	P value		
mRNA genes repressed by SarA								
SAOUHSC_00088	<i>galE</i>	Hypothetical protein	75.51	3.27E-239	43.02	2.25E-71	85	7.09E-242
SAOUHSC_00555		Haloacid dehalogenase-like hydrolase	15.19	4.18E-136	7.04	2.12E-23	33	0
SAOUHSC_00913	<i>lysR</i>	Hypothetical protein	65.05	5.18E-208	42.81	2.02E-71	58	0
SAOUHSC_00961	<i>comK1</i>	Hypothetical protein	15.15	3.81E-60	9.37	2.53E-27	111	0
SAOUHSC_00975		Hypothetical protein	4.74	4.74E-53	26.62	1.94E-57	440	0
SAOUHSC_01452	<i>ald1</i>	Alanine dehydrogenase	16.71	5.29E-147	38.31	9.21E-64	197	0
SAOUHSC_02127	<i>scpA</i>	Staphopain thiol proteinase	126.67	0.00E+00	57.24	2.25E-71	221	0
SAOUHSC_02696	<i>fmhA</i>	Methicillin resistance determinant	38.92	1.01E-198	20.99	2.98E-51	99	0
SAOUHSC_02820		Hypothetical protein	23.37	1.62E-165	44.41	1.11E-70	82	0
sRNA genes repressed by SarA								
<i>srm_3950_reg16</i>	Transcript	Unknown			21.83	4.41E-44	106	0
<i>srm_0860_rs008</i>	Transcript	Unknown			10.51	7.34E-29	88	1.09E-135
<i>srm_9335_bsr29</i>	Transcript	Unknown	3.09	9.40E-09	5.45	5.57E-15	113	0

^aDistance to the ATG for mRNA genes; distance to the +1 position for sRNA genes.

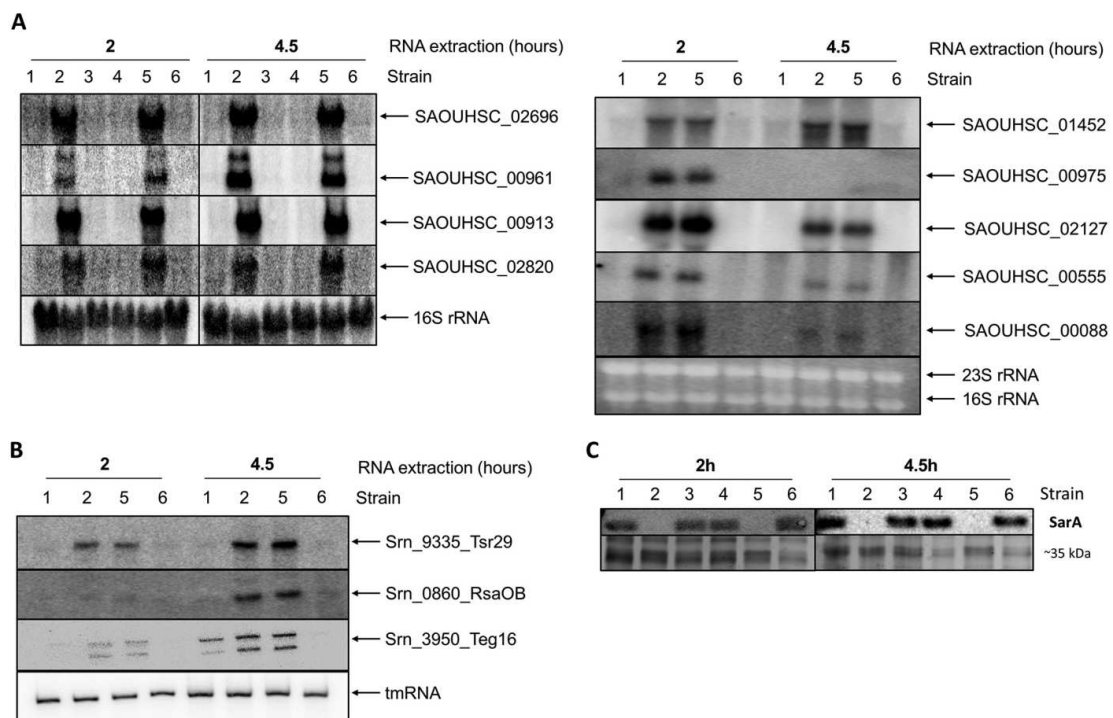


FIG 3 SarA represses new mRNA and sRNA targets. Expression levels of SarA mRNA targets (A) and sRNA targets (B) were monitored by Northern blotting. All samples were harvested after 2 h and 4.5 h of growth. A total of 10 or 15 μ g of total RNA was extracted from different *S. aureus* strains and analyzed using radioactive specific PCR-product probes. tmRNA, 16S, or 16S + 23S RNA was used as a loading control (Table S1B). (C) Western blot showing the SarA protein levels using anti-SarA antibodies (top). Deposit was controlled with Coomassie staining (bottom image). Lanes (all panels): 1, HG003 WT; 2, HG003 Δ sarA; 3, HG003 + pCN36; 4, HG003 + pCN36-sarA; 5, HG003 Δ sarA + pCN36; 6, HG003 Δ sarA + pCN36-sarA for sarA complementation.

with 1 pmol of SarA and an excess of cold specific (promoter of interest) or nonspecific (16S) upstream promoter DNA fragments, demonstrating that the cold specific probe disrupts the labeled SarA-DNA complex, whereas the addition of excess nonspecific fragment cannot outcompete binding with SarA. Taken together, Northern blotting and EMSA results clearly indicated that the hypothesis that common RNA-Seq and ChIP-Seq targets are direct SarA targets is correct.

SarA represses transcription of three novel sRNAs with imperfect selection criteria. There were three sRNAs (*srn_4540_sprA2_{AS}*, *srn_1640_rsaD*, and *srn_0455_tsr9*) that did not reach both the RNA-Seq and ChIP-Seq criteria for potential SarA direct targets. These were included in downstream studies for different reasons.

For *Srn_4540_SprA2_{AS}*, an RNA antitoxin from a type I toxin-antitoxin (TA) system, there was a well-defined SarA ChIP peak 67 nucleotides (nt) upstream (PSS 36.6) from the +1 TSS with a *P* value of 6.9×10^{-294} (Fig. 5A and Table S3), but the 62-nt *SprA2_{AS}* sRNA was not detected in the RNA-Seq experiment (74). This is likely because of its small size, which would allow it to slip past the analysis.

For *Srn_1640_RsaD*, a stress-responsive riboregulator of overflow metabolism (37), the threshold values were barely under our stringent cutoffs: RNA-Seq data show repression by SarA at the early stationary growth phase (Table S2), but the ChIP peak present at its promoter had a *P* value of only 2.1×10^{-102} (Fig. 5A).

For *Srn_0455_Tsr9*, an sRNA with a potential ORF but no identified peptide (53, 75), RNA-Seq data show repression by SarA, but the SarA ChIP-Seq peak on its promoter had a *P* value of only 2.8×10^{-90} (Fig. 5A; Table S3). We considered that the threshold for ChIP peak *P* values could have been adjusted to include sRNAs like these, because

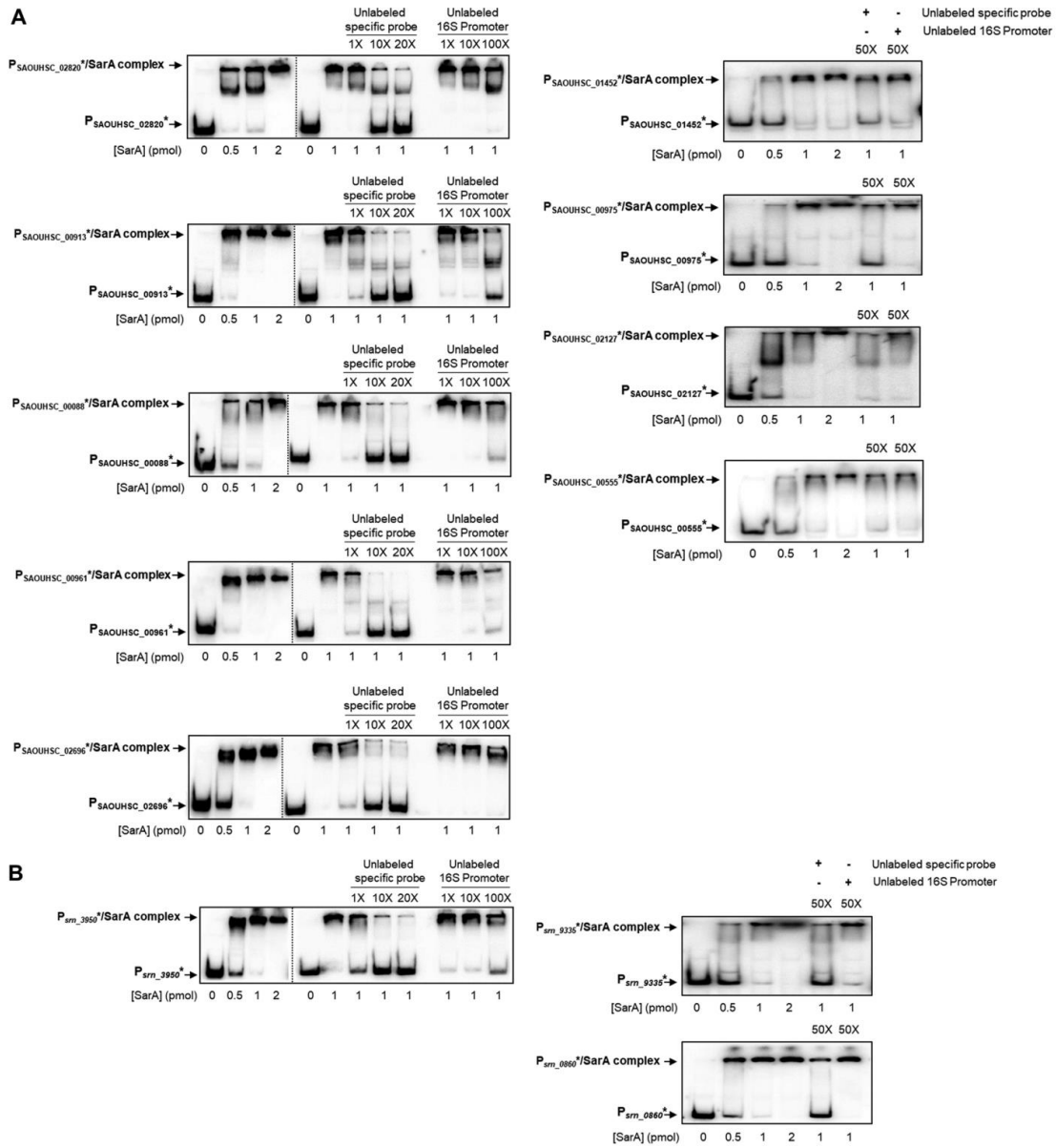


FIG 4 SarA specifically binds to the promoter region of all the selected targets *in vitro*. (A) SarA specifically binds to the 9 mRNAs promoter regions tested. (B) SarA specifically binds to the 3 sRNAs promoter regions tested. Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) were done using 10 fmol of each probe, a ³²P-labeled promoter fragment of ~250 bp, and increasing amounts of 0 to 2 pmol 6His-tagged SarA. Specificity of SarA binding was assessed with 1 pmol of SarA and increasing amounts of specific (unlabeled promoter tested) or nonspecific competitors (unlabeled 16S promoter). The promoter/SarA complex is inhibited only in the presence of excesses of the specific competitor.

due to the promiscuous nature of SarA for AT rich sequences, we chose very stringent criteria for the analysis of the intersection of RNA-Seq with ChIP-Seq data.

Northern blot analyses with RNA extracted from HG003 and HG003 Δ sarA were performed at E and S growth phases. The expression levels of *sm_4540_sprA2_{AS}*, *sm_1640_rsaD*,

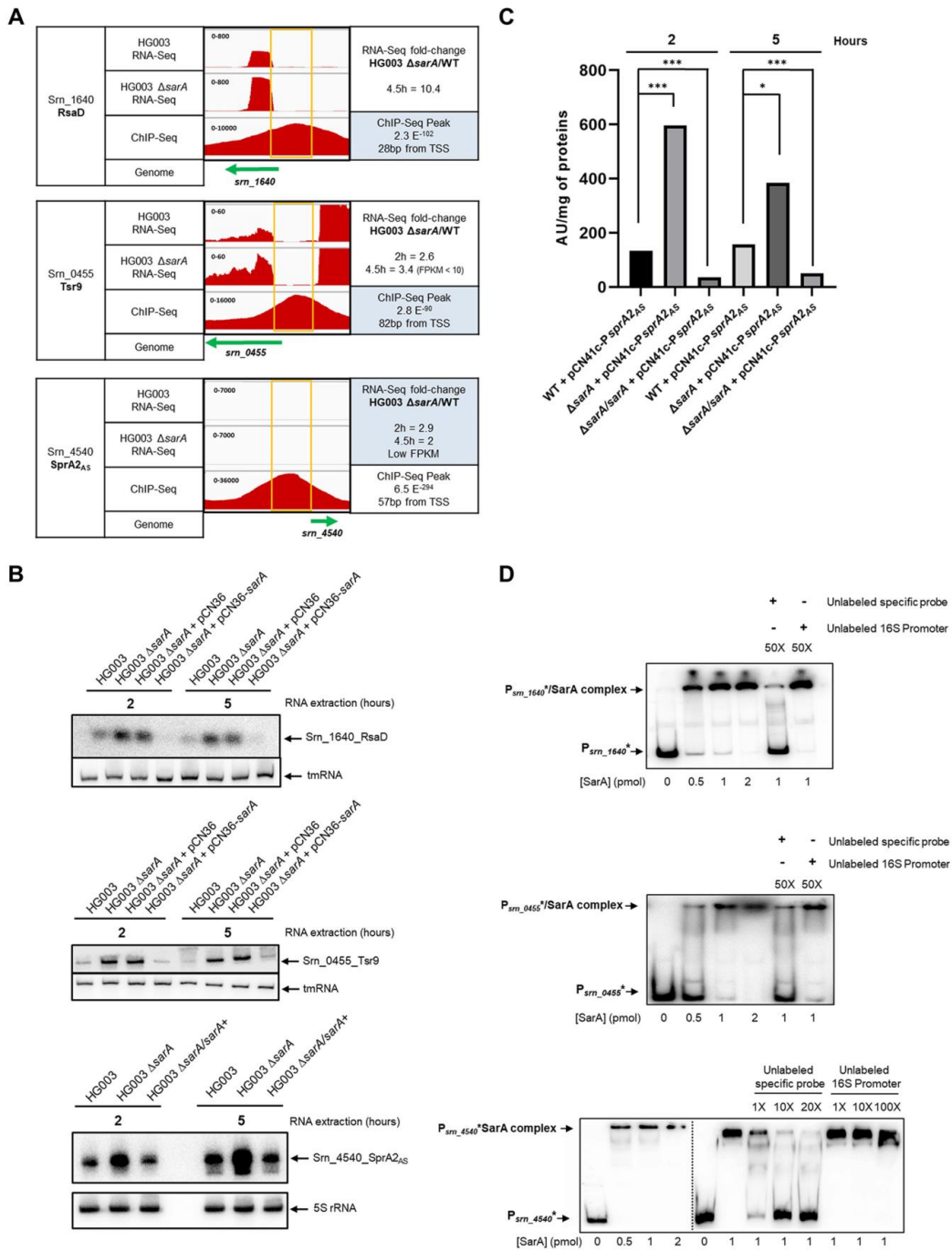


FIG 5 SarA represses 3 new sRNA. (A) IGV visualization of RNA-Seq profiles (HG003 and HG003 Δ sarA) and SarA ChIP-Seq profiles of RsaD, Tsr9, and SprA2_{AS}. sRNA genes are indicated with green arrows, and the yellow box represents the ChIP-Seq peak region upstream of the sRNA gene (Continued on next page)

and *srn_0455_tsr9* were all higher in the *sarA* mutant and returned to wild-type levels upon complementation, confirming SarA as a repressor in these cases (Fig. 5B).

We hypothesized that this regulation occurs due to SarA binding at their respective promoters. To test this hypothesis, we used a β -lactamase reporter assay for the *srn_4540_sprA2_{AS}* promoter (*PsprA2_{AS}*) using strains expressing a pCN41-*PsprA2_{AS}*-*blaZ* fusion. When wild-type HG003 and HG003 Δ *sarA* were compared for *srn_4540_sprA2_{AS}*, there were 4-fold and 2.5-fold increases in β -lactamase activity at 2 and 5 h of growth, respectively, and β -lactamase activity levels were similar to that of the parental strain in a complemented HG003 Δ *sarA* strain with the *sarA* gene introduced onto the chromosome via the *geh* locus (Fig. 5C).

When the binding of SarA to the *PrsaD*, *Ptsr9*, and *PsprA2_{AS}* promoters was examined by EMSA, SarA specifically bound the promoters of *srn_1640_rsaD*, *srn_0455_tsr9*, and *srn_4540_sprA2_{AS}* (Fig. 5D). Only a fragment of nonradioactive (cold) specific promoter was able to compete with its respective promoter, thereby demonstrating the specificity of the interaction.

All these results confirmed that SarA negatively regulates *srn_4540_sprA2_{AS}*, *srn_1640_rsaD*, and *srn_0455_tsr9* expression at the transcriptional level, with SarA acting on respective promoters to reduce RNA expression. With these three examples, we show that the use of strict criteria for selecting direct targets could, at least for sRNA, be adapted case by case.

SarA-driven repression of a type I toxin inhibits *S. aureus* toxicity. Among the sRNAs identified as SarA potential targets is *srn_2230_sprG2*, which encodes a toxin from the type I TA system SprG2/SprF2 (Table S5) (76). In this TA system, SprF2 is the antisense RNA antitoxin and regulates toxin production, under normal growth conditions, by binding to SprG2 mRNA and degrading it before it is translated.

A Northern blot experiment (Fig. 6A) clearly showed that *srn_2230_sprG2* expression was increased in the absence of *sarA*. We performed EMSA studies to verify the direct regulation of SarA on *srn_2230_sprG2* expression, showing that SarA directly and specifically binds the *srn_2230_sprG2* promoter (Fig. 6B).

In the HG003 Δ *sarA* strain, *Srn_2230_SprG2* mRNA toxin is expressed at higher levels than in isogenic HG003 (Fig. 6A). Thus, we wanted to see if this was followed by a high level of peptide production. To test our hypothesis, HG003, HG003 Δ *sarA*, and HG003 Δ *sarA/sarA*⁺ were transformed by pCN35, pCN35-*sprG2*Flag, and pCN35-*sprG2*Flag *sprF2*. In a *sarA* deletion strain, we were unable to introduce the pCN35-*sprG2*Flag in the absence of *sprF2*, whereas it was possible to express *sprG2*Flag+*sprF2* in the same strain (Fig. 6C). The fact that we did not obtain any clones suggests that vector overexpression of SprG2-Flag RNA without any SarA and/or SprF2 regulation is toxic for *S. aureus*. The latter result led us to think that SarA could, in part, regulate the SprG2/SprF2 TA system via a repression of SprG2 toxin expression in order to prevent toxicity.

Scanning the *S. aureus* genome for novel regulatory targets with a gapped “direct target” motif. We used the GLAM2 tool from the MEME suite v5.3.0 to see if we could generate a predictive motif for SarA binding to the upstream promoter region of sRNAs. We hypothesized that a sequence-based bioinformatic search would be less biased by environmental or accessory regulatory interactions that would impact *in vivo* experiments like RNA-Seq and ChIP-Seq.

FIG 5 Legend (Continued)

repressed by SarA. The RNA-Seq fold change is indicated on the right, with the distance of the ChIP peak from the transcription start site (+1) (TSS). (B) sRNA targets expression in HG003 WT and in isogenic mutant for *sarA*. Northern blots used RNA extracted from WT *S. aureus* HG003, HG003 Δ *sarA*, HG003 Δ *sarA* + pCN36, and HG003 Δ *sarA* + pCN36-*sarA* or HG003 Δ *sarA/sarA*⁺ genomic expression. All samples were harvested after 2 h and 5 h of growth. Ten micrograms of total RNA was analyzed and revealed using radioactive probes, and tmRNA or 5S RNA was used as a loading control (same membrane revealed on a different day). (C) SarA effects on transcriptional activity of the *srn_4540_sprA2_{AS}* promoter (*PsprA2_{AS}*). HG003, HG003 Δ *sarA*, and a *sarA*-complemented strain (Δ *sarA/sarA*⁺) were transformed with pCN41c or pCN41c-*PsprA2_{AS}*. *PsprA2_{AS}* activity was estimated by measuring β -lactamase substrate hydrolysis. For each lane, the indicated β -lactamase activity was normalized by subtracting the background signal from the same strain where pCN41c-*PsprA2_{AS}* was replaced by a pCN41c empty vector (not shown). Three independent experiments were done; error bars show standard deviations. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$ (Mann-Whitney test). (D) SarA specifically binds *in vitro* the promoter region of the 3 sRNA targets. SarA binds the promoter region of *srn_1640_rsaD*, *srn_0455_tsr9*, and *srn_4540_sprA2_{AS}*. EMSAs were done using 10 fmol of each ³²P-labeled promoter fragment and increasing amounts of 0 to 2 pmol 6His-tagged SarA. Specificity of the binding was assessed with the use of unlabeled *srn_1640_rsaD*, *srn_0455_tsr9*, and *srn_4540_sprA2_{AS}* promoters, and a 16S RNA promoter was used as the control for the competitive assay.

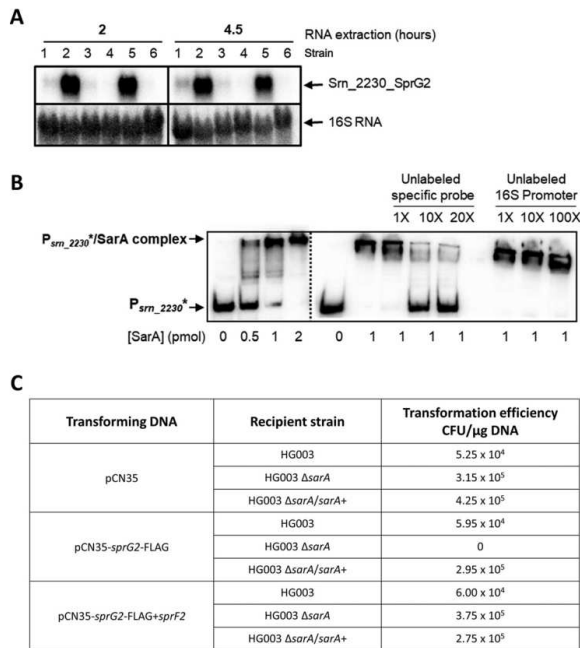


FIG 6 SarA involvement in the type I toxin-antitoxin system. (A) *smr_2230_sprG2* expression in HG003 WT and its isogenic mutant for *sarA*. Northern blots of RNA extracted from different *S. aureus* strains. Lanes: 1, HG003 WT; 2, HG003 Δ*sarA*; 3, HG003 with pCN36; 4, HG003 with pCN36-*sarA*; 5, HG003 Δ*sarA* with pCN36; 6, HG003 Δ*sarA* with pCN36-*sarA* for *sarA* complementation. All samples were harvested after 2 h and 4.5 h of growth. A total of 15 μg of total RNA was analyzed and revealed using a radioactive specific PCR-product probe and 16S RNA as a control. (B) SarA binds the *smr_2230_sprG2* promoter region. Specificity of the binding was assessed with the use of unlabeled *smr_2230_sprG2* promoter, and a 16S RNA promoter was used as control for the competitive assay. (C) Results of transformation efficiency with pCN35, pCN35-*sprG2*Flag, and pCN35-*sprG2*Flag+*sprF2* in HG003, HG003 Δ*sarA*, and HG003 Δ*sarA*/*sarA*⁺ for *sarA* complementation. It was impossible to obtain HG003 *sarA* clones with pCN35-*sprG2*Flag.

We initially used promoter sequence of different categories of SarA-repressed targets, including both sRNAs and mRNAs with promoter regions ranging from 100 to 200 bp. In preliminary tests, we saw that the use of a short promoter region (100 bp) starting before the TSS +1 in the data set for SarA direct regulation had the best chance at generating a good motif. We also elected to work with sRNA targets for which a +1 TSS was described and validated and which were identified as direct targets for SarA using the combined RNA-Seq and ChIP-Seq analysis. We did not imply a constraint that the motif be dyad symmetric on the search. Using the promoters of 15 selected sRNAs which are expected or proven to be SarA targets (Table S6), we used GLAM2 to generate a SarA position weight matrix (PWM) (Fig. S2A). The GLAM2-derived SarA PWM based on *in vivo* association is similar, but not identical, to the consensus binding operator sequence described by biochemical and genetic analysis (17, 77).

In addition, numerous previously known SarA targets contain this PWM, indicating that the GLAM2-derived SarA PWM could be a true SarA binding motif. Interestingly, both DNase I footprinting mapped SarA binding operator (77) and GLAM2-derived SarA PWM consist of AT-rich sequences, and potential canonical SarA sequence recognition motif ATTTTAT (19) or ATTTAA (27, 78) is also detected in both analyses with some variations. The SarA binding operator (ATTG**TATTTA**ATTTATATAATTG) contains at least two potential recognition motifs (in bold), whereas the deduced 35-bp SarA PWM contains more than two similar motif sequences. Although the AT-rich motif generated by GLAM2

(Fig. S2A) does not exactly match any individual promoter or SarA binding site, it has some similarity to all of them and can be matched to well-established sites with tandem repeats and palindromic SarA binding sites like that found in SarA binding to the *agr* locus (27). Overall, the earlier-mapped SarA binding operator and GLAM2-derived SarA PWM are not exactly the same but have close similarity, as both contain AT rich sequences.

Using the best motif found with the standard number of iterations in GLAM2 (Fig. S4A), the position weight matrix was used to scan the whole *S. aureus* genome using GLAM2Scan (79). The first 200 matches were used to locate putative genomic SarA binding sites and their cognate genes (Table S6).

Before categorizing the first 200 hits, we completed our bioinformatics analysis by comparing the sequence consensus obtained for *sm-3610_sprC* and *sm_9340* with the SarA protected sequence obtained by DNA footprints (28). In both of these sRNAs, the protected sequence is part of the predicted SarA consensus target site (Fig. S4B). This further validates that the consensus allows us to discern actual regulatory sites for SarA in the genome.

Moreover, putative SarA binding sequences obtained after GLAM2Scan analysis, hits 16 to 18, which correspond to unknown SarA targets (Fig. S4C), were screened and revealed tandem repeats and palindromic sequences (hits 17 and 18).

Then, we compared these 200 hits with already known SarA targets and newly identified SarA targets from this study (RNA-Seq and/or ChIP-Seq data), which allowed us to categorize targets into several groups (Table S6B).

The first group is composed of 14 targets described in the literature. This group includes SAOUHSC_02862 (*cpII*) and SAOUHSC_03001 (*icaR*) (26, 80). The second and third groups contain 43 and 38 targets found in the ChIP-Seq or RNA-Seq data, respectively. The ChIP-Seq-only group included *sarZ* and *opp4A* (SAOUHSC_00928), and the RNA-Seq group included *gltB* (SAOUHSC_00435), *gltT* (SAOUHSC_02667). The fourth group contains 24 targets that were found in both the RNA-Seq and ChIP-Seq results and therefore contains targets that are listed in Table S5. This group includes SAOUHSC_02696 (*fimhA*), SAOUHSC_00975, and SAOUHSC_01452 (*ald1*). All three targets were proved experimentally to be directly regulated by SarA. The fifth group consists of 11 targets found in literature and in at least one experimental result (RNA-Seq or ChIP-Seq). This group includes *hla* (SAOUHSC_01121), *sak* (SAOUHSC_02171), and *sarS* (SAOUHSC_00070) (51, 59, 60, 77). The sixth group correspond to 10 hits but only 5 targets that appeared in the RNA-Seq, ChIP-Seq, and literature data. This group includes *nuc* (SAOUHSC_00818), which is known to be regulated by SarA (50).

The seventh group is composed of 51 newly identified targets for which a SarA binding motif was discerned in their promoter regions. In this group, there are 45 mRNA genes and 6 sRNA genes potentially directly regulated by SarA. This group includes *srn_5010_teg33*, *gltC* (SAOUHSC_00434), and *argF* (SAOUHSC_01128). In particular, *argF* as a SarA target resonates with a known SarA involvement in arginine biosynthesis/metabolism described in the literature, where RNA-Seq results showed that *argB*, *-C*, *-D*, *-G*, *-H*, *-I*, and *-R* and *rocA* and *-D* are apparently regulated by SarA (Table S2) (26, 67). One group is composed of the 15 sRNAs that were used to create the SarA binding motif and are underlined in yellow in Table S6.

Altogether, 60% of the SarA binding targets proposed by GLAM2Scan were already described as SarA direct or indirect targets.

From the set of novel putative regulatory targets of *sarA*, we experimentally challenged the sRNA *srn_5010_teg33* using EMSA as a proof of concept (hit 16). A 265-bp DNA probe, containing a 200-bp upstream region from the transcription start site of *srn_5010_teg33* and the first 65 bp of the *srn_5010_teg33* transcript, including the predicted SarA binding site, was PCR amplified. EMSA using purified SarA protein and the *srn_5010_teg33* radiolabeled probe showed that SarA is able to bind specifically to the *srn_5010_teg33* promoter region (Fig. 7). Two picomoles of purified SarA was able to completely retard 10 fmol of radiolabeled DNA fragment, which could be disassociated using cold *srn_5010_teg33* probe but not from a nonspecific 16S DNA fragment, thus demonstrating binding specificity of SarA to the target.

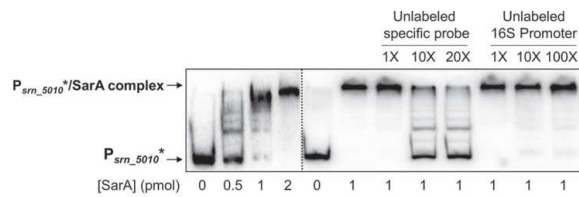


FIG 7 Validation of the *srn_5010_teg33* promoter as a SarA binding target. SarA specifically binds the *srn_5010_teg33* promoter. EMSAs were done using a 265-nt DNA probe of the *srn_5010_teg33* promoter and competed off with excess cold specific *srn_5010_teg33* promoter or a nonspecific 26-nt 16S promoter sequence.

We thus surmise that this bioinformatics GLAM2/GLAM2Scan analysis strengthened the ChIP-Seq and RNA-Seq results and uncovered the potential to discover new SarA targets not revealed experimentally under the growth conditions of the RNA-Seq and ChIP-Seq experiments.

DISCUSSION

Understanding how SarA participates in virulence, antibiotic resistance, biofilm formation, and environmental adaptation is central to understanding the biology and pathogenicity of *S. aureus*. To elucidate the comprehensive set of SarA regulation, its direct and indirect target genes should be identified. Here, we present an updated detailed analysis of the SarA regulon in *S. aureus* using both RNA-Seq and ChIP-Seq analyses focusing on sRNAs as the major SarA regulatory targets. The transcriptional profile by RNA-Seq of HG003 and its isogenic *sarA* deletion strain showed that the expression of 441 genes is impacted in the *sarA* mutant, confirming that SarA is a major regulator of gene expression in *S. aureus*. Previous microarray analysis indicated that the lack of SarA influences transcription of only ~120 genes in strain RN27 (26). Our analysis increases the size of the SarA regulon up to four times and includes many sRNAs which could not be captured by microarray techniques.

Among novel targets, we identified the repression of two gene pairs producing leukotoxins by SarA. Therefore, with *hlgC/hlgB* (SAOUHSC_02709/SAOUHSC_02710) already described as a SarA activated target by Dunman et al. (26), there are at least three leukotoxins, *hlgC-hlgB* (SAOUHSC_02709/SAOUHSC_02710), *lukG-lukH* (SAOUHSC_02241/SAOUHSC_02243), and *lukD-lukE* (SAOUHSC_01954/SAOUHSC_01955), that are regulated in the *sarA* mutant in our RNA-Seq experiment. Leukotoxins are, among other things, responsible for the targeted killing of host immune cells (66). Therefore, SarA can and does regulate leukotoxin production through its binding or release from leukotoxin promoter region. These results, in combination with ChIP-Seq analysis where a ChIP peak has been localized in the upstream regions of the 3 gene pairs producing leukotoxins (Table S3), emphasize the notion that SarA leukotoxin regulation is direct.

ChIP-Seq experiments have identified 341 DNA sequences bound to SarA, with *P* values under 10^{-250} (Table S3). The SarA-bound loci on the genome (Fig. 2D and Table S3) can be divided into two overarching subclasses. In the first subclass, the majority of the hits were peaks in the promoter regions of genes. This category includes 32 known targets that were independently validated in previous studies (6, 13, 15, 16, 18, 22, 25–28, 46, 49–52). It also included 325 mRNA and 52 sRNA promoters not previously reported as regulated by SarA; some of them have been proven by us to be SarA direct targets. The second category includes 34 hits localized in intergenic regions or situated in the middle of genes, perhaps lending credence to the hypothesis that SarA has an additional role of mediating architectural functions on the bacterial chromosome (11).

Instead of being distributed evenly across the bacterial chromosome, ChIP-Seq peaks tended to cluster in certain regions (Fig. 8A). With a SarA binding event ~3.5 times higher in pathogenicity island ν SA β (roughly 33.7 kb long, located in NC_007795 at positions



FIG 8 SarA binding locations on the $vSA\beta$ pathogenicity island in HG003. (A) Location of SarA binding sites by ChIP-Seq across the *S. aureus* chromosome. (B) Location of the $vSA\beta$ pathogenicity island in the NC_007795 chromosome (location, 1830265 to 1863962) with coding sequences (CDS) and sRNA annotations in SnapGene. (C) The $vSA\beta$ pathogenicity island rendered in CLC Genomic Workbench with tracks showing its location on the NC_007795 genome, genomic annotations, peak shape score from ChIP mapping, and annotated peaks with a threshold of $1E-250$ (blue arrowheads).

1830265 to 1863962 and 15 SarA ChIP peaks) than for the whole staphylococcal genome (2.82 Mb and 341 SarA ChIP peaks) (Fig. 8B and C), the $vSA\beta$ PI region appears as a privileged SarA binding zone. We observed that the promoter regions of 3 sRNA genes (*sm_3610_sprC*, *sm_9340*, *sm_9335*) and 5 mRNA genes (SAOUHSC_01923, SAOUHSC_01942, SAOUHSC_01944, SAOUHSC_01955, and SAOUHSC_01956) are directly bound by SarA, with up to 16 transcripts potentially under the control of the SarA regulation. Although the $vSA\beta$ PI AT content is higher than that of the whole genome (71% versus 67.3%, respectively) and SarA is known to bind AT-rich regions, such an AT content difference cannot explain the SarA binding increase. AT content variation likely impacts the DNA topology, and the higher SarA ChIP peaks events in that region could be in accordance with a possible architectural role of SarA in DNA binding (11).

Thirteen novel mRNA and sRNA gene targets of SarA were selected for validation and proven to be directly regulated by SarA, showing the merit of this multiomics approach to finding direct regulatory targets for *Staphylococcus* regulators for both mRNA and sRNA targets (Fig. 3, 4, and 7). Apart from this common target gene listing, we studied sRNAs *rsaD*, *sprA2_{AS}*, and *tsr9* and proved a direct regulation by SarA. Altogether, the expression of 10 sRNAs is directly regulated by SarA (Fig. 3 to 7), which corresponds to a fifth of sRNAs revealed as SarA targets in our RNA-Seq or ChIP-Seq studies (Tables S3 and S5; Fig. S4).

Interestingly, among the novel targets of SarA is SprG2 RNA toxin from a type I toxin-antitoxin (TA) system SprG2/SprF2. *srm_2230_sprG2*, whose expression have been shown to be repressed by SarA (Fig. 6), encodes a membrane peptide whose overexpression triggers bacteriostasis (76). Overexpression of *srm_2230_sprG2* could therefore occur in the bacterial cell when SarA detaches from the *sprG2* promoter or when *sarA* expression is lowered. Expression of *sarA* mRNA is reduced in thymidine-auxotrophic small-colony variants (SCVs) and in SCVs of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), with the possibility that *srm_2230_sprG2* is overexpressed in these cells (81–83). SCVs are associated with chronic and recurrent infections and *in vitro* with bacteria called persisters (84). These persister cells are a subpopulation of genetically identical and metabolically slow-growing bacteria that exhibits a multidrug-tolerant phenotype (85). Type I TA systems have been linked to persister cell formation (86–90). SarA-dependent *srm_2230_sprG2* overexpression may be another trigger that facilitates SCV and persister cells formation in *S. aureus* and should be examined in detail in further studies. A possible hypothesis on the role of SarA on SprG2/SprF2 TA systems is that SarA prevents toxin expression during E phase but allows their toxic activity during the S growth phase, when cell death or stasis is beneficial to the cell. Accordingly, Riffaud et al. showed that *srm_2230_sprG2* expression is higher in S phase than E phase (76).

Our study also reveals the implication of SarA in a second type I TA pair, the SprA2/SprA2_{AS} TA system. *srm_4550_sprA2* encodes PepA2, a toxic peptide which internally triggers bacterial death and is highly toxic to host cells (74). In this TA system regulated by SarA, the absence of *sarA* is responsible of an increase in antisense RNA antitoxin SprA2_{AS} (Fig. 5B and C). In this case, increased SarA binding on the *srm_4540_sprA2_{AS}* promoter could be responsible for lower *sprA2_{AS}* expression, whereas SarA release from the *srm_4540_sprA2_{AS}* promoter could lead to an increase in the amount of *srm_4540_sprA2_{AS}* RNA. Such a dual function for a type I RNA antitoxin has been described for SprF1, which is able to repress SprG1 toxin translation and to bind ribosomes to induce global translation inhibition, promoting persister cell formation (90).

By exploring novel SarA regulation targets, this work also identified Srm_1640_RsaD, which acts on carbon overflow metabolism through translation repression of the acetolactate synthase. Acetolactate synthase prevents intracellular acidification and participates in macrophage infection, antibiotic resistance, and biofilm formation (61, 91). These phenotypes fit well with the *sarA* mutant strain phenotype. Moreover, in a recent publication, *srm_1640_rsaD* expression was shown to be positively regulated by the SsrAB two-component system (TCS). Also, like *ssrAB*, *srm_1640_rsaD* expression is increased under NO stress (92). As *srm_1640_rsaD* is repressed by SarA and as SarA DNA binding abilities are sensitive to oxidative stress, the *srm_1640_rsaD* overexpression observed under NO stress could reflect SarA release from the *srm_1640_rsaD* promoter due to SarA posttranslational modifications.

Besides SarA regulation, Srm_1640_RsaD is also directly regulated by CodY, a second TF activated by branched-chain amino acids (37). A comparison between CodY and SarA sRNA regulons indicated that 11 of the 37 sRNAs repressed by SarA are also repressed by CodY, while only one of the 14 sRNAs activated by SarA is also activated by CodY (37). The number of sRNAs regulated by the two TFs is substantial, and the possible regulation of CodY by SarA should be investigated further in the future. On the other hand, genes under the control of several transcriptional factors are commonplace, and there

have been links showing SarA and CodY coregulation in the quorum-sensing operon *agrBDCA* (93).

A SarA binding motif was generated using GLAM2 from the MEME suite using 15 sRNA SarA direct targets. Using this SarA binding motif, we arrived at 200 first hits on the genome which were classified as SarA targets based on literature and/or in our experimental results. By making this ranking, we realized that 60% of the hits corresponded to previously described SarA targets, validating our RNA-Seq and ChIP-Seq data. That ranking also revealed a set of 51 potential new SarA targets (Table S6B, group 7). Then, we wondered if the presence of a SarA binding motif in a promoter region leads to SarA binding. For this purpose, we selected the sRNA gene *sm_5010_teg33* and proved that SarA binds specifically on its promoter (Fig. 7).

Whereas RNA-Seq and ChIP-Seq give a picture of the regulation at one moment or under specific conditions, bioinformatic analysis gives a permanent view of targets based on sequence and therefore reveals new targets that could be influenced under other cellular conditions. Since sequence similarity, binding, and expression are intrinsically linked, the probability of a direct SarA target is higher than an indirect target to be found in all experiments. Thus, the use of combinatory RNA-Seq, ChIP-Seq, and bioinformatics approaches enriches the value of each individual experimental approach and allows the hierarchical grouping of results based on how constantly a target gene can be found. The SarA regulon is huge, and SarA appears as a multifaceted transcriptional regulator responsible for the positive or negative regulation of diverse sRNA or mRNA genes; this work highlights how the combinatory use of transcriptomics proves to be mutually beneficial when such a complex regulon is being investigated.

Despite decades of research on SarA, we have only scratched the surface of the *sarA* regulon. While previous studies have focused on understanding key interactions with strong transparent phenotypes, like quorum sensing and biofilm production, newly developed methods have allowed us to discover finer interactions for SarA and regulators like it.

Harnessing the power of a multiomics approach and integrating the strong predictive aspects of RNA-Seq as well as concrete biochemical determinations of ChIP-Seq has allowed the precise discovery of direct regulatory targets, without the need for multiple double mutants to establish regulatory chains. Furthermore, by using unbiased *in silico* discovery methods such as GLAM2Scan and using a probabilistic matrix rather than a rigid consensus sequence, we were able to explore regulatory targets that are difficult to detect using *in vivo* approaches (which can be heavily biased by the strain tested, medium composition, growth conditions, stresses, etc.). Nevertheless, *in silico*-discovered targets need to be validated by experimental studies.

Not only does this study echo and confirm known SarA regulatory targets, it also helps fill gaps in knowledge concerning sRNAs regulated by *sarA*, shows active phases of *sarA* expression, and elucidates subtle regulatory roles. As some sRNAs have been shown to be involved in virulence, antibiotic resistance, and biofilm formation, it could be of interest to screen SarA-regulated sRNAs to determine whether some are linked to SarA virulence and antibiotic resistance phenotype (38, 39, 94, 95). We also show that SarA regulates multiple leukocidins in late stationary phase. This study also brings up some interesting implications due to the preferential binding of SarA to the $\nu SA\beta$ PI. Hopefully, this sort of two-pronged integrative approach can be used for other regulators in *S. aureus*, both to establish clear direct regulatory networks and to find novel regulatory targets that can then be examined mechanistically in subsequent studies.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and culture conditions. The strains and plasmids and the primers constructed and used in this study are summarized in Table S1A and B, respectively. *Escherichia coli* strains were grown at 37°C in LB (MoBio), and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin or kanamycin was added when necessary. *S. aureus* strains were grown at 37°C in either brain heart infusion (BHI) medium or tryptic soy broth (TSB; both from Oxoid), with antibiotics added when needed (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ erythromycin, chloramphenicol, or tetracycline

or 250 $\mu\text{g/ml}$ kanamycin). All experiments were done with *S. aureus* HG003 (55), using *S. aureus* RN4220 as an intermediate.

Purification of SarA from *E. coli*. The *sarA* coding sequence was inserted into pET42a in-frame with the 6 \times His N-terminal tag and transformed in BL21 *Escherichia coli*. SarA expression was induced by adding 1 mM isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Cells were harvested, washed, and resuspended in lysis buffer (10 mM HEPES [pH 7.5], 500 mM NaCl). Purification was done as previously described (28).

RNA extraction and Northern blotting. RNA extraction and Northern blot analyses were performed as previously described (16, 28). DNA probes for RNA detection are listed in Table S1B. For sRNA, 15 μg each of total RNAs were separated on 8% polyacrylamide–8 M urea gels and transferred onto Hybond-N+ membranes (Amersham, USA). For mRNA, 10 μg each of total RNAs were separated on 1% agarose-formaldehyde gels and transferred onto Hybond-H+ membranes (Amersham, USA). Specific ^{32}P -labeled probes were hybridized in ExpressHyb solution (Clontech), then washed, exposed, and scanned with a PhosphorImager (Molecular Dynamics). Loading controls were performed with either transfer-messenger radiolabeled RNA (tmRNA), 5S rRNA, or 16S RNA or by using 23S and 16S ethidium bromide labeling.

RNA-Seq. RNA-Seq was performed as described by Bronsard et al. (96). Overnight cultures of *S. aureus* were diluted in fresh TSB broth to an optical density at 600 nm (OD_{600}) of 0.1 and then cultured at 160 rpm for 2 h or 4.5 h at 37°C. Total RNA was extracted as described above and treated with amplification-grade DNase I (Invitrogen) to remove genomic contaminations. The absence of DNA was checked by qPCR in an Applied Biosystems 7500 instrument, and RNA integrity was verified on a Bioanalyzer (Agilent). rRNAs were depleted using a Ribo-Zero magnetic kit (Epicentre) according to the manufacturer's recommendations. Stranded cDNA libraries were prepared using the NEBNext Ultra directional RNA library preparation kit for Illumina (New England Biolabs). The concentration, quality, and purity of the libraries were determined using a Bioanalyzer, a Qubit fluorometer (Invitrogen), and a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific). Libraries were sequenced on an Illumina HiSeq 1500 system (high output, 200 cycles, paired end), per the manufacturer's instructions. Between 17.5 and 22 million reads were obtained per replicate. The NCTC8325 strain genome sequence and annotation file (in GFF format) were obtained from NCBI (<http://srd.genouest.org/browse/NCTC8325>).

All of the SRD *sm* genes described for NCTC 8325 were added to this GFF. Quality control of RNA-Seq reads and read mappings was performed as previously described (96). SAM files were filtered on bitwise flag values (97) to keep only properly paired reads and counted by HTSeq count (98) for stranded libraries. Then, differential expression analyses were calculated using DESeq (99). BAM files were visualized using the Artemis browser (100). Based on the results from HTSeq (see the supplemental material), an FPKM normalization (fragments per kilobase per millions of fragments mapped) was done for each transcript under each condition. From genes with FPKM higher than 10 under at least one condition, we selected those with three transcriptional variations between HG003 and HG003 Δ *sarA* mutant strains under at least one condition.

ChIP assay. ChIP was performed as described elsewhere (69). A *sarA* mutant of HG003 harboring the shuttle vector pSK236, containing P1 *sarA*-myc, was grown to post-exponential phase of growth (~4 h) in 100 ml of TSB medium containing 10 μg per ml of chloramphenicol. The *sarA* P1 promoter, one of the three native *sarA* promoters, allows high expression of *sarA* while retaining autoregulation.

Formaldehyde was added to a final concentration of 1% to the growing cells, and after 20 min of incubation, glycine was added to a final concentration of 0.5 M. Fixed cross-linked cells were harvested by centrifugation and washed twice with Tris-buffered saline (pH 7.5). Cells were resuspended in 5 ml of lysis buffer (25 mM Tris-Cl [pH 7.5], 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol [DTT], 0.1% Triton X-100) containing 1.0 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 50 μg per ml of lysostaphin and incubated for 30 min and 15 min at 37°C and 4°C, respectively. The lysed cells were diluted with IP buffer (50 mM HEPES-KOH [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, and 0.1% SDS), subjected to brief sonication for complete lysis, and centrifuged for 45 min at 30,000 rpm and 4°C to remove cell debris. Supernatant containing the cytosolic fraction of proteins and nucleic acids was sheared by sonication to an average DNA fragment size between 200 and 500 bp. Sheared SarA-Myc tag cross-linked protein-DNA complex was immunoprecipitated by mixing with anti-Myc monoclonal antibody (5 μg per ml) and incubated for 2 h at 4°C with gentle mixing. A control experiment was performed without any added anti-Myc antibody.

Samples were incubated with washed protein A-Sepharose beads (20 μl per ml), and incubation was continued for another 90 min. Samples were washed twice with IP buffer, once with IP buffer containing 500 mM NaCl, once with wash buffer (20 mM Tris-Cl [pH 8.0], 250 mM LiCl, 1 mM EDTA, 0.5% Nonidet-P40, and 0.5% sodium deoxycholate), and once with TE (20 mM Tris-Cl [pH 7.5], 1 mM EDTA). Finally, bound DNA-protein complexes were eluted by incubating beads with elution buffer (50 mM Tris-Cl [pH 7.5], 10 mM EDTA, 1% SDS) at 65°C for 15 min. DNA fragments were released from DNA-protein complexes by de-cross-linking in half-strength elution buffer containing 100 μg per ml of proteinase K for 1 h at 55°C. Each experiment was performed in three duplicates, and released DNA fragments were pooled for further analysis. Eluted DNA was purified using a PCR purification kit (Thermo Fisher Scientific, USA) and quantified using Nanodrop (Thermo Scientific, USA). All ChIPs were performed at least three times.

To identify the sequence of the DNA fragments isolated from ChIP experiments, direct sequencing (ChIP-Seq) was performed using an Illumina HiSeq 4000 sequencer at our Institutional Molecular Biology Core Facilities (Dartmouth-Hitchcock). DNA was quantified by using Qubit (Life Technologies), and DNA integrity was assessed with a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). An amount of 50 ng of total DNA was used for the library preparation. The libraries were pooled at equimolarity and loaded at 2 nM for clustering. HiSeq 4000 sequencing was performed, resulting in approximately 81 million total paired-end 150-bp reads for six control samples and 95 million total reads for six treatment samples. Adaptor

trimming was done before reads were mapped to *S. aureus* NCTC8325 (NC_007795.1) using CLC Genomics Workbench 11. Approximately 83 million reads aligned uniquely to the genome for the treatment samples (83%) and 51 million reads for the controls (63%).

The CLC Genomics Workbench ChIP pipeline was used for analysis and peak calling. Briefly, an initial maximum *P* value of 0.1 for peak calling of 0.1 was used for analysis. Quality control showed a high number of reads (82 million) and relative strand correlations of 0.884 but a somewhat low normalized strand coefficient of 1.012 for treatment data. Because of this, additional thresholding was done to increase the stringency, setting the *P* value cutoff to $E-250$ and the minimum peak value cutoff to 30.

Consensus motif analysis. To determine which sRNAs are regulated by SarA based on our ChIP output, we used R to scan the SRD sRNA database in *S. aureus* NCTC8325 sRNA, which had the center of a significant SarA ChIP peak up to 100 bp upstream of its TSS +1 (29). We compiled a list of direct sRNA targets for further analysis using the intersection of the sRNA sets found in ChIP-Seq and in RNA-seq.

For *de novo* motif discovery, we used the gapped-motif-finding tool GLAM2 v.1056 (from the MEME suite) for both our direct targets and previously confirmed sRNAs, adding up to 15 sequences of 100 bp from upstream of the TSS +1 of verified sRNAs (29, 79). Although AT rich, the best motif generated still had an alignment score of 243.077, followed by a similar AT-rich motif with alignment score of 236.693, indicating a good consensus for the SarA motif. Alignment with sRNA 5' sequences had an average marginal score of 23.13 ± 4.158 with a range from 16.7 to 31.8. We then used GLAM2Scan v.1056 with this motif to search the genome of *S. aureus* NCTC 8325 uid237 in the GenBank Bacterial Genome and Proteins database, using both strands for 200 alignment hits. Each hit was manually curated to find for mRNAs and sRNAs which contain the generated SarA binding motif.

EMSA. The gel shift assay was adapted from reference 28. Promoters were amplified from the *S. aureus* HG003 genome by PCR using specific primers (listed in Table S1B). DNA probes (250 nt; 400 ng) were labeled with [γ - 32 P]ATP using T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs). Binding reactions were carried out as previously described (28). Briefly, binding reaction medium containing 10 fmol DNA template, 20 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 20% glycerol, 0.2 mM EDTA, 0.1 M KCl, 0.1 M MgCl₂, 5 mM DTT, and 0.2 g poly(dI-dC) (0.15 μ g) was incubated, when necessary, with purified SarA for 30 min at 30°C. To determine specificity fixation, competition assay was performed with increasing quantities of specific probe (unlabeled promoter) and nonspecific probe (unlabeled 16S RNA promoter). Samples were loaded on native 8% polyacrylamide gels. Detection was done with a Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare).

Beta-lactamase/reporter gene assay. Overnight cultures were adjusted to an OD₆₀₀ of 0.1. For each time point, cells were centrifuged and resuspended in 1 \times phosphate-buffered saline (PBS) to obtain an equal cell density throughout the assay. Cell lysis was performed using 0.7 mg/ml lysostaphin, 0.2 U/ μ l Benzonase, and 0.1 mM MgCl₂ at 37°C for 20 min. After addition of 0.25 mg/ml nitrocefin (a β -lactamase substrate), the reaction mix was incubated 10 min at room temperature. β -Lactamase activity was quantified on a BioTek instrument every 10 min for 40 min at a wavelength of 492 nm. This activity was normalized against protein quantities as determined by a Bradford assay.

Statistical analysis. For statistical analysis, the two-tailed Mann-Whitney test was used for reporter gene experiments. Data were expressed as means \pm standard deviations.

Transformation efficiency. Wild-type HG003 and the Δ sarA and Δ sarA/sarA⁺ variants were prepared with an electrocompetent protocol (101). Two hundred nanograms of plasmids pCN35, pCN35-sprG2Flag, and pCN35-sprG2Flag+sprF2 was used to transform HG003 electrocompetent cells with dimethyl sulfoxide (DMSO) at 2,500 V. Cells were incubated 1 h at 37°C. One hundred microliters was spread on BHI with 10 μ g/ml chloramphenicol and incubated 24 h at 37°C. The transformation efficiency was calculated per bacterium per μ g of DNA.

Data visualization using IGV, SnapGene, and Civi. To visualize RNA-Seq and ChIP-Seq data, we used IGV (72), SnapGene software (Insightful Science), and the Civi circular genome visualizer (102).

Data availability. The data discussed in this publication have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus and are accessible through GEO Series accession number GSE174164.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

FIG S1, TIF file, 1.6 MB.

FIG S2, TIF file, 2.3 MB.

FIG S3, PDF file, 0.4 MB.

FIG S4, TIF file, 2.5 MB.

TABLE S1, DOCX file, 0.02 MB.

TABLE S2, DOCX file, 0.1 MB.

TABLE S3, DOCX file, 0.4 MB.

TABLE S4, DOCX file, 0.03 MB.

TABLE S5, DOCX file, 0.03 MB.

TABLE S6, DOCX file, 0.1 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the Genomics and Molecular Biology Shared Resources at the Norris Cotton Cancer Center at Dartmouth with NCI Cancer Center Support Grant 5P30 CA023108-40.

This study was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale INSERM, University of Rennes 1 (to C.O.) and Agence de l'Innovation et Défense (to C.O.).

We thank our colleagues from the Dartmouth R Club for the program's great resources in teaching bioinformatics and R, in particular Zhongyou Li, Tom Hampton, and Katja Koeppen. The BRM team thanks our colleagues and particularly Yoann Augagneur and Mohamed Sassi for their expertise on RNA-Seq analysis and Vincent Cattoir for help on CLC genomics analysis. Our thanks also go to Stephane Dréano for help on sequencing and also to the Master 2 student Steven Créteé for investment in SarA purification.

Investigation, methodology, visualization: C.O., L.C., A.C.M., T.M., A.R.; Resource: M.-L.P.-M.; Conceptualization and supervision: A.C.M. and A.R.; Funding acquisition: A.C. and B.F.; Manuscript writing: all authors.

We declare that we have no conflict of interest.

REFERENCES

- van Belkum A, Verkaik NJ, de Vogel CP, Boelens HA, Verveer J, Nouwen JL, Verbrugh HA, Wertheim HFL. 2009. Reclassification of *Staphylococcus aureus* nasal carriage types. *J Infect Dis* 199:1820–1826. <https://doi.org/10.1086/599119>.
- Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. 2015. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev* 28:603–661. <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>.
- Jenul C, Horswill AR. 2018. Regulation of *Staphylococcus aureus* virulence. *Microbiol Spectr* 6:GPP-0031-2018. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0031-2018>.
- Cheung AL, Koomey JM, Butler CA, Projan SJ, Fischetti VA. 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.14.6462>.
- Cheung AL, Nishina KA, Trotonda MP, Tamber S. 2008. The SarA protein family of *Staphylococcus aureus*. *Int J Biochem Cell Biol* 40:355–361. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.10.032>.
- Heinrichs JH, Bayer MG, Cheung AL. 1996. Characterization of the sar locus and its interaction with agr in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 178:418–423. <https://doi.org/10.1128/jb.178.2.418-423.1996>.
- Kim S, Reyes D, Beaume M, Francois P, Cheung A. 2014. Contribution of teg49 small RNA in the 5' upstream transcriptional region of sarA to virulence in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 82:4369–4379. <https://doi.org/10.1128/IAI.02002-14>.
- Manna AC, Kim S, Cengher L, Corvaglia A, Leo S, Francois P, Cheung AL. 2018. Small RNA teg49 is derived from a sarA transcript and regulates virulence genes independent of SarA in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 86:e00635-17. <https://doi.org/10.1128/IAI.00635-17>.
- Liu Y, Manna AC, Pan CH, Kriksunov IA, Thiel DJ, Cheung AL, Zhang G. 2006. Structural and function analyses of the global regulatory protein SarA from *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2392–2397. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510439103>.
- Didier JP, Cozzone AJ, Duclos B. 2010. Phosphorylation of the virulence regulator SarA modulates its ability to bind DNA in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 306:30–36. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01930.x>.
- Fujimoto DF, Higginbotham RH, Sterba KM, Maleki SJ, Segall AM, Smeltzer MS, Hurlburt BK. 2009. *Staphylococcus aureus* SarA is a regulatory protein responsive to redox and pH that can support bacteriophage lambda integrase-mediated excision/recombination. *Mol Microbiol* 74:1445–1458. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06942.x>.
- Ballal A, Manna AC. 2009. Regulation of superoxide dismutase (sod) genes by SarA in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 191:3301–3310. <https://doi.org/10.1128/JB.01496-08>.
- Ballal A, Manna AC. 2010. Control of thioredoxin reductase gene (trxB) transcription by SarA in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 192:336–345. <https://doi.org/10.1128/JB.01202-09>.
- Sun F, Ding Y, Ji Q, Liang Z, Deng X, Wong CC, Yi C, Zhang L, Xie S, Alvarez S, Hicks LM, Luo C, Jiang H, Lan L, He C. 2012. Protein cysteine phosphorylation of SarA/MgrA family transcriptional regulators mediates bacterial virulence and antibiotic resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:15461–15466. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205952109>.
- Chien Y, Manna AC, Cheung AL. 1998. SarA level is a determinant of agr activation in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 30:991–1001. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01126.x>.
- Manna AC, Ingavale SS, Maloney M, van Wamel W, Cheung AL. 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. <https://doi.org/10.1128/JB.186.16.5267-5280.2004>.
- Manna AC, Cheung AL. 2006. 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05171.x>.
- Ballal A, Manna AC. 2009. Expression of the sarA family of genes in different strains of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology (Reading)* 155:2342–2352. <https://doi.org/10.1099/mic.0.027417-0>.
- Sterba KM, Mackintosh SG, Blevins JS, Hurlburt BK, Smeltzer MS. 2003. Characterization of *Staphylococcus aureus* SarA binding sites. *J Bacteriol* 185:4410–4417. <https://doi.org/10.1128/JB.185.15.4410-4417.2003>.
- Morrison JM, Anderson KL, Beenken KE, Smeltzer MS, Dunman PM. 2012. The staphylococcal accessory regulator, SarA, is an RNA-binding protein that modulates the mRNA turnover properties of late-exponential and stationary phase *Staphylococcus aureus* cells. *Front Cell Infect Microbiol* 2:26. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00026>.
- Rechtin TM, Gillaspay AF, Schumacher MA, Brennan RG, Smeltzer MS, Hurlburt BK. 1999. Characterization of the SarA virulence gene regulator of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 33:307–316. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01474.x>.
- Blevins JS, Gillaspay AF, Rechtin TM, Hurlburt BK, Smeltzer MS. 1999. The staphylococcal accessory regulator (sar) represses transcription of the *Staphylococcus aureus* collagen adhesin gene (cna) in an agr-independent manner. *Mol Microbiol* 33:317–326. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01475.x>.
- Cheung AL, Schmidt K, Bateman B, Manna AC. 2001. SarS, a SarA homolog repressible by agr, is an activator of protein A synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 69:2448–2455. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.4.2448-2455.2001>.
- Schmidt KA, Manna AC, Gill S, Cheung AL. 2001. SarT, a repressor of alpha-hemolysin in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 69:4749–4758. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.8.4749-4758.2001>.
- Manna AC, Ray B. 2007. Regulation and characterization of rot transcription in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology (Reading)* 153:1538–1545. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/004309-0>.
- Dunman PM, Murphy E, Haney S, Palacios D, Tucker-Kellogg G, Wu S, Brown EL, Zagursky RJ, Shlaes D, Projan SJ. 2001. Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the agr and/or sarA loci. *J Bacteriol* 183:7341–7353. <https://doi.org/10.1128/JB.183.24.7341-7353.2001>.
- Reyes D, Andrey DO, Monod A, Kelley WL, Zhang G, Cheung AL. 2011. Coordinated regulation by AgrA, SarA, and SarR to control agr expression in

- Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 193:6020–6031. <https://doi.org/10.1128/JB.05436-11>.
28. Mauro T, Rouillon A, 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. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw777>.
 29. Sassi M, Augagneur Y, Mauro T, Ivain L, Chabelskaya S, Hallier M, Sallou O, Felden B. 2015. SRD: a *Staphylococcus* regulatory RNA database. *RNA* 21:1005–1017. <https://doi.org/10.1261/rna.049346.114>.
 30. Liu W, Rochat T, Toffano-Nioche C, Le Lam TN, Bouloc P, Morvan C. 2018. Assessment of bona fide sRNAs in *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol* 9:228. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00228>.
 31. Storz G, Vogel J, Wassarman KM. 2011. Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. *Mol Cell* 43:880–891. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.022>.
 32. Guillet J, Hallier M, Felden B. 2013. Emerging functions for the *Staphylococcus aureus* RNome. *PLoS Pathog* 9:e1003767. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003767>.
 33. Felden B, Augagneur Y. 2021. Diversity and versatility in small RNA-mediated regulation in bacterial pathogens. *Front Microbiol* 12:719977. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.719977>.
 34. Tomasini A, François P, Howden BP, Fechter P, Romby P, Caldelari I. 2014. The importance of regulatory RNAs in *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol* 21:616–626. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.11.016>.
 35. Gupta RK, Luong TT, Lee CY. 2015. RNAlII of the *Staphylococcus aureus* agr system activates global regulator MgrA by stabilizing mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:14036–14041. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509251112>.
 36. Bronesky D, Wu Z, Marzi S, Walter P, Geissmann T, Moreau K, Vandenesch F, Caldelari I, Romby P. 2016. *Staphylococcus aureus* RNAlII and its regulon link quorum sensing, stress responses, metabolic adaptation, and regulation of virulence gene expression. *Annu Rev Microbiol* 70:299–316. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095708>.
 37. Augagneur Y, King AN, Germain-Amiot N, Sassi M, Fitzgerald JW, Sahukhal GS, Elasi MO, Felden B, Brinsmade SR. 2020. Analysis of the CodY RNome reveals RsaD as a stress-responsive riboregulator of overflow metabolism in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 113:309–325. <https://doi.org/10.1111/mmi.14418>.
 38. Romilly C, Lays C, Tomasini A, Caldelari I, Benito Y, Hammann P, Geissmann T, Boisset S, Romby P, Vandenesch F. 2014. A non-coding RNA promotes bacterial persistence and decreases virulence by regulating a regulator in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog* 10:e1003979. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003979>.
 39. Le Pabic H, Germain-Amiot N, Bordeau V, Felden B. 2015. A bacterial regulatory RNA attenuates virulence, spread and human host cell phagocytosis. *Nucleic Acids Res* 43:9232–9248. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv783>.
 40. Xue T, Zhang X, Sun H, Sun B. 2014. ArtR, a novel sRNA of *Staphylococcus aureus*, regulates alpha-toxin expression by targeting the 5' UTR of sarT mRNA. *Med Microbiol Immunol* 203:1–12. <https://doi.org/10.1007/s00430-013-0307-0>.
 41. Masachis S, Darfeuille F. 2018. Type I toxin-antitoxin systems: regulating toxin expression via Shine-Dalgarno sequence sequestration and small RNA binding. *Microbiol Spectr* 6:RWR-0030-2018. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.RWR-0030-2018>.
 42. Sayed N, Jousselin A, Felden B. 2011. A cis-antisense RNA acts in trans in *Staphylococcus aureus* to control translation of a human cytolytic peptide. *Nat Struct Mol Biol* 19:105–112. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2193>.
 43. Pinel-Marie M-L, Brielle R, 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. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.012>.
 44. O'Leary JO, Langevin MJ, Price CTD, Blevins JS, Smeltzer MS, Gustafson JE. 2004. Effects of sarA inactivation on the intrinsic multidrug resistance mechanism of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 237:297–302. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.06.047>.
 45. Lamichhane-Khadka R, Cantore SA, Riordan JT, Delgado A, Norman AEA, Dueñas S, Zaman S, Horan S, Wilkinson BJ, Gustafson JE. 2009. sarA inactivation reduces vancomycin-intermediate and ciprofloxacin resistance expression by *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* 34:136–141. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.01.018>.
 46. Oscarsson J, Tegmark-Wisell K, Arvidson S. 2006. Coordinated and differential control of aureolysin (aur) and serine protease (sspA) transcription in *Staphylococcus aureus* by sarA, rot and agr (RNAlII). *Int J Med Microbiol* 296:365–380. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.02.019>.
 47. Abdelhady W, Bayer AS, Seidl K, Moormeier DE, Bayles KW, Cheung A, Yeaman MR, Xiong YQ. 2014. Impact of vancomycin on sarA-mediated biofilm formation: role in persistent endovascular infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 209:1231–1240. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu007>.
 48. Atwood DN, Loughran AJ, Courtney AP, Anthony AC, Meeker DG, Spencer HJ, Gupta RK, Lee CY, Beenken KE, Smeltzer MS. 2015. Comparative impact of diverse regulatory loci on *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Microbiol Bioproc* 4:436–451. <https://doi.org/10.1002/mbo3.250>.
 49. Jefferson KK, Pier DB, Goldmann DA, Pier GB. 2004. The teicoplanin-associated locus regulator (TcaR) and the intercellular adhesion locus regulator (IcaR) are transcriptional inhibitors of the ica locus in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 186:2449–2456. <https://doi.org/10.1128/JB.186.8.2449-2456.2004>.
 50. Rice KC, Murphy E, Yang S-J, Bayles KW, Smeltzer MS, Projan SJ, Beenken KE, Cassat J, Palm KJ, Dunman PM. 2006. Transcriptional profiling of a *Staphylococcus aureus* clinical isolate and its isogenic agr and sarA mutants reveals global differences in comparison to the laboratory strain RN6390. *Microbiology (Reading)* 152:3075–3090. <https://doi.org/10.1099/mic.0.29033-0>.
 51. Oscarsson J, Kanth A, Tegmark-Wisell K, 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. <https://doi.org/10.1128/JB.00866-06>.
 52. Andrey DO, Renzoni A, Monod A, Lew DP, Cheung AL, Kelley WL. 2010. Control of the *Staphylococcus aureus* toxic shock tst promoter by the global regulator SarA. *J Bacteriol* 192:677–685. <https://doi.org/10.1128/JB.00146-10>.
 53. Carroll RK, Weiss A, Broach WH, Wiemels RE, Mogen AB, Rice KC, Shaw LN. 2016. Genome-wide annotation, identification, and global transcriptomic analysis of regulatory or small RNA gene expression in *Staphylococcus aureus*. *mBio* 7:e01990-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01990-15>.
 54. Novick RP, Richmond MH. 1965. Nature and interactions of the genetic elements governing penicillinase synthesis in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 90:467–480. <https://doi.org/10.1128/jb.90.2.467-480.1965>.
 55. Herbert S, Ziebandt AK, Ohlsen K, Schafer T, Hecker M, Albrecht D, Novick R, Gotz F. 2010. Repair of global regulators in *Staphylococcus aureus* 8325 and comparative analysis with other clinical isolates. *Infect Immun* 78:2877–2889. <https://doi.org/10.1128/IAI.00088-10>.
 56. Sassi M, Felden B, Augagneur Y. 2014. Draft genome sequence of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* strain HG003, an NCTC8325 derivative. *Genome Announc* 2:e00855-14. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00855-14>.
 57. DeFrancesco AS, Masloboeva N, Syed AK, DeLoughery A, Bradshaw N, Li G-W, Gilmore MS, Walker S, Losick R. 2017. Genome-wide screen for genes involved in eDNA release during biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:E5969–E5978. <https://doi.org/10.1073/pnas.1704544114>.
 58. Coe KA, Lee W, Stone MC, Komazin-Meredith G, Meredith TC, Grad YH, Walker S. 2019. Multi-strain Tn-Seq reveals common daptomycin resistance determinants in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog* 15:e1007862. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007862>.
 59. Tegmark K, Karlsson A, Arvidson S. 2000. Identification and characterization of SarH1, a new global regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 37:398–409. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02003.x>.
 60. Ziebandt A-K, Weber H, Rudolph J, Schmid R, Höper D, Engelmann S, Hecker M. 2001. Extracellular proteins of *Staphylococcus aureus* and the role of SarA and σ B. *Proteomics* 1:480–493. [https://doi.org/10.1002/1615-9861\(200104\)1:4<480::AID-PROT480>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/1615-9861(200104)1:4<480::AID-PROT480>3.0.CO;2-O).
 61. Tsang LH, Cassat JE, Shaw LN, Beenken KE, Smeltzer MS. 2008. Factors contributing to the biofilm-deficient phenotype of *Staphylococcus aureus* sarA mutants. *PLoS One* 3:e3361. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003361>.
 62. Ramirez AM, Byrum SD, Beenken KE, Washam C, Edmondson RD, Mackintosh SG, Spencer HJ, Tackett AJ, Smeltzer MS. 2020. Exploiting correlations between protein abundance and the functional status of saeRS and sarA to identify virulence factors of potential importance in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. *ACS Infect Dis* 6:237–249. <https://doi.org/10.1021/acscinfecdis.9b00291>.
 63. Valle J, Toledo-Arana A, Berasain C, Ghigo JM, Amorena B, Penades JR, Lasa I. 2003. SarA and not sigmaB is essential for biofilm development by

- Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol 48:1075–1087. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03493.x>.
64. Beenken KE, Dunman PM, McAleese F, Macapagal D, Murphy E, Projan SJ, Blevins JS, Smeltzer MS. 2004. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. J Bacteriol 186:4665–4684. <https://doi.org/10.1128/JB.186.14.4665-4684.2004>.
 65. Kiedrowski MR, Kavanaugh JS, Malone CL, Mootz JM, Voyich JM, Smeltzer MS, Bayles KW, Horswill AR. 2011. Nuclease modulates biofilm formation in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. PLoS One 6:e26714. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026714>.
 66. Yoong P, Torres VJ. 2013. The effects of *Staphylococcus aureus* leukotoxins on the host: cell lysis and beyond. Curr Opin Microbiol 16:63–69. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.01.012>.
 67. Li L, Cheung A, Bayer AS, Chen L, Abdelhady W, Kreiswirth BN, Yeaman MR, Xiong YQ. 2016. The global regulon sarA regulates beta-lactam antibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vitro and in endovascular infections. J Infect Dis 214:1421–1429. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw386>.
 68. Shaw L, Golonka E, Potempa J, Foster SJ. 2004. The role and regulation of the extracellular proteases of *Staphylococcus aureus*. Microbiology (Reading) 150:217–228. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26634-0>.
 69. Wade JT, Reppas NB, Church GM, Struhl K. 2005. Genomic analysis of LexA binding reveals the permissive nature of the *Escherichia coli* genome and identifies unconventional target sites. Genes Dev 19:2619–2630. <https://doi.org/10.1101/gad.1355605>.
 70. Jones RC, Deck J, Edmondson RD, Hart ME. 2008. Relative quantitative comparisons of the extracellular protein profiles of *Staphylococcus aureus* UAMS-1 and its sarA, agr, and sarA agr regulatory mutants using one-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and nanocapillary liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. J Bacteriol 190:5265–5278. <https://doi.org/10.1128/JB.00383-08>.
 71. Loughran AJ, Atwood DN, Anthony AC, Harik NS, Spencer HJ, Beenken KE, Smeltzer MS. 2014. Impact of individual extracellular proteases on *Staphylococcus aureus* biofilm formation in diverse clinical isolates and their isogenic sarA mutants. Microbiol Open 3:897–909. <https://doi.org/10.1002/mbo3.214>.
 72. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP. 2011. Integrative genomics viewer. Nat Biotechnol 29:24–26. <https://doi.org/10.1038/nbt.1754>.
 73. Prados J, Linder P, Redder P. 2016. TSS-EMOTE, a refined protocol for a more complete and less biased global mapping of transcription start sites in bacterial pathogens. BMC Genomics 17:849. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3211-3>.
 74. Germain-Amiot N, Augagneur Y, Camberlein E, Nicolas I, Lecureur V, Rouillon A, Felden B. 2019. A novel *Staphylococcus aureus* cis-trans type I toxin-antitoxin module with dual effects on bacteria and host cells. Nucleic Acids Res 47:1759–1773. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1257>.
 75. Sorensen HM, Keogh RA, Wittekind MA, Caillet AR, Wiemels RE, Laner EA, Carroll RK. 2020. Reading between the lines: utilizing RNA-Seq data for global analysis of sRNAs in *Staphylococcus aureus*. mSphere 5:e00439-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00439-20>.
 76. Riffaud C, Pinel-Marie M-L, Pascreau G, Felden B. 2019. Functionality and cross-regulation of the four SprG/SprF type I toxin-antitoxin systems in *Staphylococcus aureus*. Nucleic Acids Res 47:1740–1758. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1256>.
 77. Chien Y, Manna AC, Projan SJ, Cheung AL. 1999. SarA, a global regulator of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*, binds to a conserved motif essential for sar-dependent gene regulation. J Biol Chem 274:37169–37176. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.52.37169>.
 78. Cheung AL, Nishina K, Manna AC. 2008. SarA of *Staphylococcus aureus* binds to the sarA promoter to regulate gene expression. J Bacteriol 190:2239–2243. <https://doi.org/10.1128/JB.01826-07>.
 79. Frith MC, Saunders NFW, Kobe B, Bailey TL. 2008. Discovering sequence motifs with arbitrary insertions and deletions. PLoS Comput Biol 4:e1000071. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000071>.
 80. Cerca N, Brooks JL, Jefferson KK. 2008. Regulation of the intercellular adhesin locus regulator (icaR) by SarA, σ B, and IcaR in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 190:6530–6533. <https://doi.org/10.1128/JB.00482-08>.
 81. Kahl BC, Belling G, Becker P, Chatterjee I, Wardecki K, Hilgert K, Cheung AL, Peters G, Herrmann M. 2005. Thymidine-dependent *Staphylococcus aureus* small-colony variants are associated with extensive alterations in regulator and virulence gene expression profiles. Infect Immun 73:4119–4126. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.7.4119-4126.2005>.
 82. Mirani ZA, Aziz M, Khan SI. 2015. Small colony variants have a major role in stability and persistence of *Staphylococcus aureus* biofilms. J Antibiot (Tokyo) 68:98–105. <https://doi.org/10.1038/ja.2014.115>.
 83. Häffner N, Bär J, Dengler Haunreiter V, Mairpady Shambat S, Seidl K, Crosby HA, Horswill AR, Zinkernagel AS. 2020. Intracellular environment and agr system affect colony size heterogeneity of *Staphylococcus aureus*. Front Microbiol 11:1415. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01415>.
 84. Tuchscher L, Löffler B, Proctor RA. 2020. Persistence of *Staphylococcus aureus*: multiple metabolic pathways impact the expression of virulence factors in small-colony variants (SCVs). Front Microbiol 11:1028. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01028>.
 85. Balaban NQ, Helaine S, Lewis K, Ackermann M, Aldridge B, Andersson DI, Brynildsen MP, Bumann D, Camilli A, Collins JJ, Dehio C, Fortune S, Ghigo J-M, Hardt W-D, Harms A, Heinemann M, Hung DT, Jenal U, Levin BR, Michiels J, Storz G, Tan M-W, Tenson T, Van Melderen L, Zinkernagel A. 2019. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. Nat Rev Microbiol 17:441–448. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0196-3>.
 86. Page R, Peti W. 2016. Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. Nat Chem Biol 12:208–214. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2044>.
 87. Harms A, Brodersen DE, Mitarai N, Gerdes K. 2018. Toxins, targets, and triggers: an overview of toxin-antitoxin biology. Mol Cell 70:768–784. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.01.003>.
 88. Ronneau S, Helaine S. 2019. Clarifying the link between toxin-antitoxin modules and bacterial persistence. J Mol Biol 431:3462–3471. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.03.019>.
 89. Habib G, Zhu J, Sun B. 2020. A novel type I toxin-antitoxin system modulates persister cell formation in *Staphylococcus aureus*. Int J Med Microbiol 310:151400. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2020.151400>.
 90. Pinel-Marie M-L, Brielle R, Riffaud C, Germain-Amiot N, Polacek N, Felden B. 2021. RNA antitoxin SprF1 binds ribosomes to attenuate translation and promote persister cell formation in *Staphylococcus aureus*. Nat Microbiol 6:209–220. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00819-2>.
 91. Carvalho SM, de Jong A, Kloosterman TG, Kuipers OP, Saraiva LM. 2017. The *Staphylococcus aureus* α -acetolactate synthase ALS confers resistance to nitrosative stress. Front Microbiol 8:e01273.
 92. Bronesky D, Desgranges E, Corvaglia A, François P, Caballero CJ, Prado L, Toledo-Arana A, Lasa I, Moreau K, Vandenesch F, Marzi S, Romby P, Caldelari I. 2019. A multifaceted small RNA modulates gene expression upon glucose limitation in *Staphylococcus aureus*. EMBO J 38:e99363. <https://doi.org/10.15252/embj.201899363>.
 93. Roux A, Todd DA, Velazquez JV, Cech NB, Sonenshein AL. 2014. CodY-mediated regulation of the *Staphylococcus aureus* Agr system integrates nutritional and population density signals. J Bacteriol 196:1184–1196. <https://doi.org/10.1128/JB.00128-13>.
 94. Chabelskaya S, Gaillot O, Felden B. 2010. A *Staphylococcus aureus* small RNA is required for bacterial virulence and regulates the expression of an immune-evasion molecule. PLoS Pathog 6:e1000927. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000927>.
 95. Eyraud A, Tattevin P, Chabelskaya S, Felden B. 2014. A small RNA controls a protein regulator involved in antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Nucleic Acids Res 42:4892–4905. <https://doi.org/10.1093/nar/gku149>.
 96. Bronsard J, Pascreau G, Sassi M, Mauro T, Augagneur Y, Felden B. 2017. sRNA and cis-antisense sRNA identification in *Staphylococcus aureus* highlights an unusual sRNA gene cluster with one encoding a secreted peptide. Sci Rep 7:4565. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04786-3>.
 97. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R, 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. Bioinformatics 25:2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>.
 98. Anders S, Pyl PT, Huber W. 2015. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. Bioinformatics 31:166–169. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>.
 99. Anders S, Huber W. 2010. Differential expression analysis for sequence count data. Genome Biol 11:R106. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-10-r106>.

100. Carver T, Harris SR, Otto TD, Berriman M, Parkhill J, McQuillan JA. 2013. BamView: visualizing and interpretation of next-generation sequencing read alignments. *Brief Bioinform* 14:203–212. <https://doi.org/10.1093/bib/bbr073>.
101. Monk IR, Shah IM, Xu M, Tan MW, Foster TJ. 2012. Transforming the untransformable: application of direct transformation to manipulate genetically *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *mBio* 3:e00277-11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00277-11>.
102. Overmars L, van Hijum SAFT, Siezen RJ, Francke C. 2015. CiVi: circular genome visualization with unique features to analyze sequence elements. *Bioinformatics* 31:2867–2869. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv249>.
103. Fuchs S, Mehlan H, Bernhardt J, Hennig A, Michalik S, Surmann K, Pané-Farré J, Giese A, Weiss S, Backert L, Herbig A, Niesel K, Hecker M, Völker U, Mäder U. 2018. AureoWiki—the repository of the *Staphylococcus aureus* research and annotation community. *Int J Med Microbiol* 308:558–568. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.11.011>.

Annexes

Nom du gène	2h		4h30	
	FPKM HG003	FPKM HG003 <i>ΔsarA</i>	FPKM HG003	FPKM HG003 <i>ΔsarA</i>
<i>srn_0050_teg1</i>	185,46	258,96	260,49	1 259,66
<i>srn_0455_tsr9</i>	36,66	97,95	2,35	9,11
<i>srn_0860_rsaOB</i>	1 060,22	1 528,08	190,78	2 307,16
<i>srn_1640_rsaD</i>	77,16	80,92	1 713,59	20 565,32
<i>srn_2230_sprG2</i>	2 590,74	41 140,20	4 000,89	41 373,95
<i>srn_2240_sprF2</i>	25,88	41,51	70,71	168,56
<i>srn_3610_sprC</i>	62,65	456,07	134,60	1 379,09
<i>srn_3950_teg16</i>	142,21	328,98	341,13	8 570,83
<i>srn_4540_sprA2_{AS}</i>	5,10	15,17	6,44	14,68
<i>srn_4550_sprA2</i>	970,18	1 850,59	1 547,44	2 278,56
<i>srn_5010_teg33</i>	1 247,39	905,91	922,46	981,00
<i>srn_9335</i>	14,83	46,97	27,27	171,14
<i>srn_9340</i>	3,22	45,97	6,42	183,50
SAOUHSC_00088	3,11	241,17	2,34	115,85
SAOUHC_00555	47,20	735,73	36,55	296,01
SAOUHC_00913	2,41	160,87	3,73	183,60
SAOUHC_00961	2,63	40,85	80,58	869,07
SAOUHC_00975	452,53	2 200,73	30,06	920,80
SAOUHC_01452	94,09	1 613,28	16,33	719,84
SAOUHSC_02127	76,18	9 900,90	27,91	1 838,51
SAOUHC_02696	7,93	316,70	7,65	184,87
SAOUHSC_02820	13,39	321,01	9,34	477,33

Tableau 20 : Extraction de données FPKM du RNA-Seq (Oriol et al., 2021).

Tableau 21

Tableau des données RNA-Seq

(Tableau supplémentaire S2 – Oriol et *al.*, 2021)

Gene group and annotation	Gene name	Assignment	Differential expression HG003 <i>ΔsarA</i> vs HG003			
			Exponential (2h)		Early stationary (4.5h)	
			Fold-change	p-value	Fold-change	p-value
Genes repressed by SarA						
Transport and binding proteins & protein fate						
SAOUHSC_00010	<i>azlC</i>	Azaleucine resistance protein			6.3	1.28E-20
SAOUHSC_00012	<i>azlD</i>	Type II secretion system protein F			6.4	5.43E-19
SAOUHSC_00102	<i>phnE1</i>	Phosphonates ABC transporter permease	13.4	2.75E-95	19.1	2.27E-48
SAOUHSC_00103	<i>phnE2</i>	Phosphonates ABC transporter permease	18.8	1.33E-86	21.3	1.47E-47
SAOUHSC_00104	<i>phnC</i>	Amino acid ABC transporter ATP-binding protein	39.1	1.92E-126	23.0	5.15E-51
SAOUHSC_00105	<i>phnD</i>	Phosphonate ABC transporter substrate-binding protein	41.8	2.43E-193	19.0	1.75E-49
SAOUHSC_00106		Putative ABC-type transporter	11.4	1.01E-69	10.6	7.33E-32
SAOUHSC_00168		Nickel ABC transporter			6.1	4.99E-18
SAOUHSC_00169		Nickel ABC transporter			5.5	3.42E-17
SAOUHSC_00170		Peptide ABC transporter substrate-binding protein			6.3	2.21E-21
SAOUHSC_00175	<i>malK</i>	Multiple sugar-binding transport ATP-binding protein			5.8	6.24E-18
SAOUHSC_00176	<i>malE</i>	Extracellular solute-binding protein			3.7	4.58E-10
SAOUHSC_00249		ABC transporter	5.6	4.63E-49	3.3	8.10E-09
SAOUHSC_00250		Hypothetical protein	6.6	1.18E-56	4.5	1.67E-13
SAOUHSC_00251		Hypothetical protein	7.6	1.78E-63	4.6	3.01E-13
SAOUHSC_00253		Hypothetical protein	17.0	7.79E-147	8.9	1.16E-27
SAOUHSC_00257	<i>esxA</i>	WXG100 family type VII secretion effector	18.0	6.41E-155	8.9	1.18E-24
SAOUHSC_00258	<i>esaA</i>	Type VII secretion protein	12.7	5.10E-121	11.2	7.60E-34
SAOUHSC_00259	<i>essa</i>	Type VII secretion protein	8.8	2.16E-50	9.3	1.29E-25
SAOUHSC_00260	<i>esaB</i>	Type VII secretion protein	14.4	6.94E-21	7.9	1.15E-09
SAOUHSC_00261	<i>essaB</i>	Type VII secretion protein	10.2	6.95E-80	7.3	4.02E-23
SAOUHSC_00262	<i>essaC</i>	Type VII secretion protein	7.3	3.96E-80	5.8	6.78E-19
SAOUHSC_00264	<i>essaC</i>	Type VII secretion protein	5.4	9.94E-27	6.7	7.47E-17
SAOUHSC_00265	<i>essaB</i>	Type VII secretion protein	5.1	5.43E-25	6.9	1.84E-17
SAOUHSC_00266	<i>esaE</i>	Type VII secretion protein	6.1	3.24E-43	6.2	2.99E-18
SAOUHSC_00267	<i>essaD</i>	Type VII secretion protein	6.2	8.01E-27	5.1	7.29E-12
SAOUHSC_00282	<i>brnQ2</i>	Branched-chain amino acid transport system II carrier protein			3.4	3.39E-09
SAOUHSC_00290		Phosphotransferase system, EIIC			3.6	1.72E-09
SAOUHSC_00423	<i>metN2</i>	D-methionine ABC transporter			15.6	5.85E-43
SAOUHSC_00424	<i>metP2</i>	Methionine ABC transporter permease			17.2	8.11E-47
SAOUHSC_00426	<i>metQ2</i>	ABC transporter substrate-binding protein			12.0	5.25E-33
SAOUHSC_00828		L-lysine exporter			3.1	1.23E-07
SAOUHSC_00842	<i>metN1</i>	Methionine ABC transporter			3.5	6.47E-10
SAOUHSC_00843	<i>metP1</i>	Methionine ABC transporter			4.4	1.00E-13
SAOUHSC_00844	<i>metQ1</i>	Methionine ABC transporter			5.1	3.39E-15
SAOUHSC_00903	<i>spsB</i>	Signal peptidase IB			3.3	5.55E-09

SAOUHSC_00923	<i>opp-3B</i>	Oligopeptide transport system permease			3.2	2.42E-08
SAOUHSC_00924	<i>opp-3C</i>	Oligopeptide transport system permease			4.1	3.48E-12
SAOUHSC_00925	<i>opp-3D</i>	Oligopeptide transport system permease			3.8	8.95E-11
SAOUHSC_00926	<i>opp-3F</i>	Oligopeptide transport system permease			3.8	1.41E-10
SAOUHSC_00927	<i>opp-3A</i>	Oligopeptide ABC transporter			3.5	7.54E-09
SAOUHSC_00949		Sodium/alanine symporter family protein			8.7	1.31E-28
SAOUHSC_00986	<i>sspC</i>	Cysteine protease			26.3	8.92E-55
SAOUHSC_00987	<i>sspB</i>	Cysteine protease			26.1	9.28E-51
SAOUHSC_00988	<i>sspA</i>	Glutamyl endopeptidase			34.2	1.20E-57
SAOUHSC_01180		Outer membrane assembly lipoprotein	3.1	9.88E-25	3.1	7.17E-08
SAOUHSC_01440		Conserved hypothetical integral membrane protein			3.5	1.01E-09
SAOUHSC_01935	<i>spIF</i>	Serine protease	4.2	1.31E-15	24.4	3.06E-55
SAOUHSC_01936	<i>spIE</i>	Serine protease			28.0	2.98E-59
SAOUHSC_01938	<i>spID</i>	Serine protease	6.0	1.21E-18	29.2	1.36E-59
SAOUHSC_01939	<i>spIC</i>	Serine protease	7.1	2.25E-21	36.9	4.22E-66
SAOUHSC_01941	<i>spIB</i>	Serine protease	17.5	1.22E-34	52.4	5.50E-75
SAOUHSC_01942	<i>spIA</i>	Serine protease	24.3	3.00E-50	62.3	2.62E-77
SAOUHSC_02247	<i>ktrB</i>	Potassium uptake protein	10.1	4.40E-105	7.2	9.33E-22
SAOUHSC_02270	<i>nrgA</i>	Ammonium transporter			6.7	1.21E-15
SAOUHSC_02557		Urea transporter			5.0	1.24E-14
SAOUHSC_02595		Bile acid transporter			5.9	1.11E-19
SAOUHSC_02622	<i>gltS</i>	Sodium/glutamate symporter	3.4	1.58E-33	3.6	5.72E-11
SAOUHSC_02667	<i>gltT</i>	Proton/glutamate symport protein			4.7	1.50E-13
SAOUHSC_02668		Hypothetical protein			3.1	1.50E-08
SAOUHSC_02704		Cation diffusion facilitator family transporter			4.2	2.03E-13
SAOUHSC_02763	<i>cntF</i>	Peptide ABC transporter ATP-binding protein	3.1	9.48E-13		
SAOUHSC_02766	<i>cntB</i>	Peptide ABC transporter permease	3.6	2.05E-22		
SAOUHSC_02767	<i>cntA</i>	Peptide ABC transporter substrate-binding protein	4.0	1.15E-41		
SAOUHSC_02773		Aminobenzoyl-glutamate transport protein			3.1	2.88E-07
SAOUHSC_02806	<i>gntP</i>	Gluconate permease			4.0	4.21E-10
SAOUHSC_02808	<i>gntK</i>	Gluconate kinase			10.0	1.65E-28
SAOUHSC_02809	<i>gntR</i>	Gluconate operon transcriptional repressor			13.6	8.71E-37
SAOUHSC_02820		ABC transporter ATP-binding protein	23.4	1.62E-165	44.4	1.11E-70
SAOUHSC_02821		Lantibiotic protection ABC transporter permease subunit, MutG family	18.6	3.92E-150	36.6	4.17E-64
SAOUHSC_02923		Amino acid transporter			12.3	9.01E-33
SAOUHSC_02943	<i>citM</i>	Citrate transporter	12.9	3.23E-95	10.3	3.19E-32
SAOUHSC_03018		Cobalt ECF transporter T component			9.3	3.84E-30
SAOUHSC_03019		ABC transporter ATP-binding protein			11.8	2.47E-35
SAOUHSC_03020		ECF transporter S component, folate family			21.3	5.15E-51
SAOUHSC_03021		Adenosyl-fluoride synthase			17.9	1.50E-46
Amino acids biosynthesis						
SAOUHSC_00013	<i>metX</i>	Homoserine O-acetyltransferase			4.4	4.50E-14
SAOUHSC_00147	<i>argB</i>	Acetylglutamate kinase	7.4	2.64E-75		

SAOUHSC_00148	<i>argJ</i>	Bifunctional ornithine acetyltransferase/N-acetylglutamate synthase	9.9	1.34E-99		
SAOUHSC_00149	<i>argC</i>	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	13.4	1.52E-115		
SAOUHSC_00150	<i>argD</i>	Ornithine aminotransferase	29.0	7.87E-169	3.5	4.71E-08
SAOUHSC_00338	<i>metE</i>	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-- homocysteine S-methyltransferase			3.7	2.89E-10
SAOUHSC_00339	<i>metF</i>	Bifunctional homocysteine S-methyltransferase/5,10-methylenetetrahydrofolate reductase			3.9	1.18E-11
SAOUHSC_00340	<i>metC</i>	Trans-sulfuration enzyme family protein			4.2	1.83E-11
SAOUHSC_00341	<i>metI</i>	O-succinylhomoserine (thiol)-lyase			3.2	2.99E-07
SAOUHSC_00733	<i>hisC</i>	Histidinol-phosphate aminotransferase			4.7	5.67E-15
SAOUHSC_00898	<i>argH</i>	Argininosuccinate lyase	3.7	3.89E-39		
SAOUHSC_00899	<i>argG</i>	Argininosuccinate synthase	3.3	1.09E-32		
SAOUHSC_01319	<i>thrD</i>	Aspartate kinase	6.8	4.47E-51	57.3	2.33E-75
SAOUHSC_01320	<i>hom</i>	Homoserine dehydrogenase			20.0	3.23E-44
SAOUHSC_01321	<i>thrC</i>	Threonine synthase			16.7	8.50E-40
SAOUHSC_01322	<i>thrB</i>	Homoserine kinase			19.0	4.66E-43
SAOUHSC_01371	<i>trpB</i>	Tryptophan synthase subunit beta			3.5	1.08E-07
SAOUHSC_01372	<i>trpA</i>	Tryptophan synthase subunit alpha			3.6	1.34E-08
SAOUHSC_01395	<i>asd</i>	Aspartate semialdehyde dehydrogenase			3.9	8.26E-11
SAOUHSC_01396	<i>dapA</i>	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase			3.8	8.98E-11
SAOUHSC_01397	<i>dapB</i>	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase			3.5	1.44E-09
SAOUHSC_01398	<i>dapD</i>	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-acetyltransferase			3.5	5.68E-09
SAOUHSC_01832		Phosphoserine transaminase			9.0	4.92E-28
SAOUHSC_01833	<i>serA</i>	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase			8.7	4.26E-26
SAOUHSC_02281	<i>ilvD</i>	Dihydroxy-acid dehydratase			19.2	1.75E-49
SAOUHSC_02282	<i>ilvB</i>	Acetolactate synthase large subunit			17.8	3.23E-46
SAOUHSC_02283	<i>ilvH</i>	Acetolactate synthase 1 regulatory subunit			15.1	6.07E-33
SAOUHSC_02284	<i>ilvC</i>	Ketol-acid reductoisomerase			13.4	6.98E-39
SAOUHSC_02285	<i>leuA</i>	2-isopropylmalate synthase			15.2	3.72E-41
SAOUHSC_02286	<i>leuB</i>	3-isopropylmalate dehydrogenase			15.5	3.16E-43
SAOUHSC_02287	<i>leuC</i>	Isopropylmalate isomerase large subunit			17.9	8.99E-47
SAOUHSC_02288	<i>leuD</i>	3-isopropylmalate dehydratase small subunit			15.6	1.36E-42
SAOUHSC_02289	<i>ilvA2</i>	Threonine dehydratase			15.4	2.76E-42
SAOUHSC_02970	<i>argR</i>	Arginine repressor	7.9	2.12E-43	4.8	1.26E-12
SAOUHSC_03012		Histidinol-phosphate aminotransferase	4.2	1.14E-18		
SAOUHSC_03013	<i>hisD</i>	Histidinol dehydrogenase	5.1	2.66E-34	8.3	3.05E-20
SAOUHSC_03014	<i>hisG</i>	ATP phosphoribosyltransferase catalytic subunit	4.9	7.69E-19		
SAOUHSC_03015	<i>hisZ</i>	ATP phosphoribosyltransferase regulatory subunit	4.5	2.05E-26	17.0	1.65E-27
Protein biosynthesis						
SAOUHSC_00520	<i>rplJ</i>	50S ribosomal protein L10			3.8	2.08E-11
SAOUHSC_00521	<i>rplL</i>	50S ribosomal protein L7/L12			3.3	3.84E-09

Biosynthesis of cofactors						
SAOUHSC_00171	<i>ggt</i>	Gamma-glutamyltranspeptidase			5.1	2.32E-17
SAOUHSC_00284		5'-nucleotidase	3.4	3.25E-33		
SAOUHSC_00827		Alpha-ribazole phosphatase	5.8	8.96E-53		
DNA metabolism						
SAOUHSC_00734		Putative 5'(3')-deoxyribonucleotidase			3.7	8.95E-11
SAOUHSC_01744	<i>recJ</i>	Single-stranded-DNA-specific exonuclease			3.1	1.73E-08
SAOUHSC_02911	<i>queH</i>	Adenine nucleotide alpha hydrolases superfamily protein	3.3	9.77E-32		
Energy metabolism						
SAOUHSC_00088	<i>galE</i>	UDP-glucose 4-epimerase	75.5	3.27E-239	43.0	2.25E-71
SAOUHSC_00089		Undecaprenyl-phosphate glucose phosphotransferase	76.6	6.94E-223	26.9	8.71E-56
SAOUHSC_00555		Haloacid dehalogenase-like hydrolase	15.2	4.18E-136	7.0	2.12E-23
SAOUHSC_01450		Amino acid transporter	15.3	4.58E-140	28.1	1.31E-55
SAOUHSC_01451	<i>ilvA1</i>	Threonine dehydratase	16.3	2.58E-144	32.0	1.07E-59
SAOUHSC_01452	<i>ald1</i>	Alanine dehydrogenase	16.7	5.29E-147	38.3	9.21E-64
SAOUHSC_01835		Hypothetical protein			4.8	3.37E-14
SAOUHSC_02922	<i>ldh2</i>	L-lactate dehydrogenase	3.9	2.62E-41	4.6	4.89E-13
Carbohydrates						
SAOUHSC_00113	<i>adhE</i>	Bifunctional acetaldehyde-CoA/alcohol deshydrogenase	5.5	4.86E-62		
SAOUHSC_00190		Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase, periplasmic			7.4	1.72E-24
Amino acids and derivatives						
SAOUHSC_00435	<i>gltB</i>	Glutamate synthase large subunit			37.8	1.38E-61
SAOUHSC_00436	<i>gltD</i>	Glutamate synthase subunit beta			48.1	7.01E-69
SAOUHSC_00989	<i>patA</i>	LL-diaminopimelate aminotransferase			4.8	4.97E-14
Fatty acid and phospholipid metabolism						
SAOUHSC_00300	<i>geh</i>	Lipase	5.2	4.78E-59		
SAOUHSC_00661		Esterase			3.2	4.26E-09
Fructose metabolism						
SAOUHSC_00706	<i>fruR</i>	Transcriptional repressor of the fructose operon			41.9	4.49E-64
SAOUHSC_00707	<i>fruB</i>	1-phosphofructokinase			42.1	4.30E-65

SAOUHSC_00708	<i>fruA</i>	Fructose specific permease			38.0	9.34E-62
Central intermediary metabolism						
SAOUHSC_01972	<i>prsA</i>	Protein export protein	4.0	7.52E-44	3.8	3.54E-10
SAOUHSC_02558	<i>ureA</i>	Urease subunit gamma			4.4	2.76E-12
SAOUHSC_02559	<i>ureB</i>	Urease subunit beta			3.4	6.12E-09
SAOUHSC_02561	<i>ureC</i>	Urease subunit alpha			3.7	1.93E-11
SAOUHSC_02924		4-aminobutyrate aminotransferase			15.5	8.43E-43
Cell envelope & capsule						
SAOUHSC_00090		Exopolysaccharide biosynthesis glycosyltransferase	43.2	1.61E-204	10.6	1.00E-32
SAOUHSC_00092		Membrane protein involved in the export of O-antigen, teichoic acid lipoteichoic acids	7.0	3.80E-78		
SAOUHSC_00114	<i>capA</i>	Capsular polysaccharide biosynthesis protein	5.2	5.81E-19		
SAOUHSC_00115	<i>capB</i>	Capsular polysaccharide biosynthesis protein	5.3	1.43E-18		
SAOUHSC_00116	<i>capC</i>	Capsular polysaccharide biosynthesis protein	4.3	2.02E-15		
SAOUHSC_00117	<i>capD</i>	Capsular polysaccharide biosynthesis protein	6.8	2.26E-42		
SAOUHSC_00118	<i>capE</i>	Capsular polysaccharide biosynthesis protein	3.7	1.69E-16	3.2	3.34E-08
SAOUHSC_00119	<i>capF</i>	Capsular polysaccharide biosynthesis protein	3.5	2.73E-16		
SAOUHSC_00255		LPXTG cell wall anchor domain	7.5	5.18E-65	8.9	4.90E-26
SAOUHSC_02404	<i>fmtB</i>	SasC/Mrp/FmtB intercellular aggregation domain	3.1	4.96E-30	6.9	3.67E-21
SAOUHSC_02576	<i>ssaA</i>	Secretory antigen	5.5	1.10E-60	6.7	8.97E-22
SAOUHSC_02855		LysM domain-containing protein			4.1	1.33E-12
SAOUHSC_02998	<i>cap1C</i>	Capsular polysaccharide biosynthesis protein Cap5C	90.6	6.08E-267	26.5	6.55E-57
SAOUHSC_02999	<i>capB1</i>	Capsular polysaccharide biosynthesis protein Cap5B	152.0	6.14E-279	42.4	3.30E-67
SAOUHSC_03000	<i>capA1</i>	Capsular polysaccharide biosynthesis protein CapA	213.9	2.24E-275	56.6	6.64E-73
Cellular processes						
SAOUHSC_00051	<i>plc</i>	1-phosphatidylinositol phosphodiesterase	12.2	2.63E-114	23.6	5.13E-49
SAOUHSC_00427	<i>sle1</i>	Autolysin			5.5	2.18E-16
SAOUHSC_00721	<i>queC</i>	7-cyano-7-deazaguanine synthase QueC			5.6	1.46E-16
SAOUHSC_01219	<i>lytN</i>	Cell wall hydrolase	5.7	2.44E-47	7.2	1.03E-23
SAOUHSC_01220	<i>fmhC</i>	FemAB-related protein	3.4	1.12E-27	6.4	3.63E-21
SAOUHSC_02941	<i>nrdG</i>	Anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase activating protein			12.2	1.70E-33
SAOUHSC_02942	<i>nrdR</i>	Anaerobic ribonucleoside triphosphate reductase			8.6	1.87E-24
SAOUHSC_02973		Cell division protein ZipA	5.7	3.71E-45		
SAOUHSC_02979		N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase			3.2	1.01E-07
SAOUHSC_03016		Polysaccharide deacetylase	10.1	4.23E-100	7.1	1.39E-23
SAOUHSC_03017		N-acetyltransferase			8.2	3.09E-25

Lipoproteins						
SAOUHSC_00052	<i>csaA1</i>	Staphylococcus tandem lipoproteins	16.4	3.91E-53	8.7	1.32E-22
SAOUHSC_00053		Staphylococcus tandem lipoproteins	7.2	1.09E-34	6.5	7.91E-18
SAOUHSC_00054		Staphylococcus tandem lipoproteins	4.8	4.07E-29	6.0	1.38E-17
SAOUHSC_00055		Staphylococcus tandem lipoproteins	3.9	5.38E-26	4.1	4.07E-12
Regulatory functions						
SAOUHSC_00674	<i>sarX</i>	Staphylococcal accessory regulator family	4.1	7.20E-44	3.7	3.29E-09
SAOUHSC_00694	<i>mgrA</i>	Staphylococcal accessory regulator family			3.8	6.70E-10
SAOUHSC_00818	<i>nuc</i>	Thermonuclease	130.1	4.46E-277	269.4	4.52E-115
SAOUHSC_00913	<i>lysR</i>	LysR family regulatory protein	65.1	5.18E-208	42.8	2.02E-71
SAOUHSC_00992	<i>atlR</i>	MarR family transcriptional regulator	17.3	8.53E-136	28.7	1.53E-54
SAOUHSC_01402	<i>msa</i>	Protein msa (Modulator of <i>sarA</i>)	4.8	3.48E-46	3.4	1.32E-09
SAOUHSC_02569	<i>sarY</i>	Staphylococcal accessory regulator family	8.8	8.35E-80	5.6	2.82E-16
SAOUHSC_02570		AraC family transcriptional regulator	11.4	1.21E-112	6.0	2.74E-20
Virulence						
SAOUHSC_00061		Myosin-cross-reactive antigen	11.3	1.58E-116	21.5	1.86E-46
SAOUHSC_00069	<i>spa</i>	Protein A			3.2	3.98E-08
SAOUHSC_00544	<i>sdrC</i>	Fibrinogen-binding protein SdrC	6.8	1.52E-73	5.4	8.24E-17
SAOUHSC_00545	<i>sdrD</i>	Fibrinogen-binding protein SdrD	8.0	4.39E-91	5.2	7.44E-15
SAOUHSC_00968		Bacteriocin-associated integral membrane protein			5.0	1.33E-15
SAOUHSC_01121	<i>hla</i>	Alpha-hemolysin	5.6	3.44E-39		
SAOUHSC_01448	<i>norB</i>	Quinolone resistance protein	13.3	3.53E-127	24.5	1.66E-55
SAOUHSC_01954	<i>lukD</i>	Leukotoxin LukD	6.4	5.27E-30	10.1	3.63E-27
SAOUHSC_01955	<i>lukE</i>	Leukotoxin LukE	9.5	1.76E-38	11.6	3.00E-29
SAOUHSC_02127	<i>scpA</i>	Staphopain thiol proteinase	126.7	0.00E+00	57.2	2.25E-71
SAOUHSC_02129		Staphostatin A	65.3	5.34E-258	51.5	2.25E-71
SAOUHSC_02167	<i>scn</i>	Staphylococcal complement inhibitor SCIN	3.3	7.36E-33	5.6	6.14E-17
SAOUHSC_02171	<i>sak</i>	Staphylokinase	26.7	5.60E-186	30.1	7.57E-59
SAOUHSC_02169	<i>chp</i>	Chemotaxis-inhibiting protein CHIPS	16.6	1.45E-98	4.2	9.39E-10
SAOUHSC_02241	<i>lukG</i>	Leukocidin LukG	6.0	4.85E-67	5.7	4.99E-18
SAOUHSC_02243	<i>lukH</i>	Leukocidin LukH	6.9	5.09E-75	5.9	2.85E-19
SAOUHSC_02463	<i>hysA</i>	Hyaluronate lyase	8.0	2.48E-84	3.8	6.20E-12
SAOUHSC_02611	<i>lyrA</i>	Lysostaphin resistance protein A			3.3	1.96E-08
SAOUHSC_02696	<i>fmhA</i>	Methicillin resistance determinant protein (FemAB family)	38.9	1.01E-198	21.0	2.98E-51
SAOUHSC_02706	<i>sbi</i>	Immunoglobulin G-binding protein Sbi	9.3	1.75E-98	13.3	6.55E-39
SAOUHSC_02709	<i>hlgC</i>	Leukocidin s subunit			11.2	2.96E-32
SAOUHSC_02710	<i>hlgB</i>	Leukocidin f subunit			9.8	1.27E-28
SAOUHSC_02740		Drug resistance MFS transporter, drug:H+ antiporter-2			3.0	2.75E-07
SAOUHSC_02851	<i>cidA</i>	Holin-like protein CidA			4.1	7.94E-13

SAOUHSC_02883	<i>ssaA</i>	Secretory antigen SsaA (LysM domain-containing protein)	4.7	1.33E-50	4.2	4.44E-14
SAOUHSC_02963	<i>clfB</i>	Clumping factor B			5.6	7.01E-17
SAOUHSC_02971	<i>aur</i>	Zinc metalloproteinase aureolysin	467.8	0.00E+00	162.0	4.69E-103
Biofilm						
SAOUHSC_03002	<i>icaA</i>	N-glycosyltransferase			59.4	7.71E-60
SAOUHSC_03003	<i>icaD</i>	Intracellular adhesion protein D			21.7	3.66E-14
SAOUHSC_03004	<i>icaB</i>	Intercellular adhesion protein B			15.5	1.65E-25
SAOUHSC_03005	<i>icaC</i>	Intercellular adhesion protein C			4.6	2.10E-12
Stress response						
SAOUHSC_00093	<i>sodM</i>	Superoxide dismutase	14.0	1.15E-132	4.5	3.59E-13
SAOUHSC_02949	<i>gpxA2</i>	Putative glutathione peroxidase	6.3	1.77E-61	8.0	3.35E-26
Iron acquisition and metabolism						
SAOUHSC_00074	<i>sirA</i>	Heme ABC transporter	3.2	1.02E-26		
SAOUHSC_00976		Heme ABC transporter			3.0	5.42E-08
SAOUHSC_01079	<i>isdB</i>	Cell surface receptor IsdB for hemoglobin and hemoglobin-haptoglobin complexes	5.8	1.54E-37	3.5	8.79E-09
SAOUHSC_02640	<i>hrtA</i>	Heme efflux system ATPase			3.8	1.53E-11
Competence						
SAOUHSC_00961	<i>comK1</i>	Competence transcription factor	15.1	3.81E-60	9.4	2.53E-27
sRNA						
	SRD data					
	Description	Length (nucleotides)				
<i>srm_0050_teg1</i>	Transcript	229			4.2	7.59E-12
<i>srm_0280_sRNA16</i>	ND	372			4.0	2.81E-12
<i>srm_0730_sRNA48</i>	ND	256	5.3	2.98E-06		
<i>srm_0765_tsr11</i>	5'UTR	94			3.3	2.03E-08
<i>srm_0790_sau6657</i>	ND	91	4.7	6.55E-06		
<i>srm_0795</i>	Transcript	279	4.6	4.20E-32		
<i>srm_0860_rsaOB</i>	Transcript	421			10.5	7.34E-29
<i>srm_0930_teg76</i>	Transcript	223			3.8	7.87E-11
<i>srm_1100_sau6054</i>	3'UTR	143			4.2	2.77E-08
<i>srm_1440_sRNA127</i>	ND	32			3.0	2.59E-03
<i>srm_1480_sRNA130</i>	ND	603	4.0	1.72E-03		
<i>srm_1530_sRNA133</i>	5'UTR	272	3.1	8.20E-29		
<i>srm_1640_rsaD</i>	Transcript	177			10.4	3.05E-27
<i>srm_1760_sRNA149</i>	Transcript	127			11.6	2.65E-13

<i>srn_1870_sau6428</i>	5'UTR	55			3.8	2.19E-02
<i>srn_2230_sprG2</i>	Transcript	241	15.5	1.16E-143	9.0	1.94E-25
<i>srn_2250_sprG4</i>	Transcript	369	9.8	2.19E-08		
<i>srn_2730_teg106</i>	3'UTR	46	3.6	1.35E-08	3.1	2.71E-05
<i>srn_2740_teg108</i>	Transcript	103	5.4	1.94E-05		
<i>srn_2780_sau6282</i>	5'UTR	70			10.3	2.26E-04
<i>srn_2800_sau14</i>	ND	99			33.5	1.10E-28
<i>srn_2890_sau72</i>	ND	125			5.4	2.17E-05
<i>srn_3130_teg116</i>	ND	55			3.2	8.39E-03
<i>srn_3340_teg72</i>	5'UTR	148	5.6	2.62E-24		
<i>srn_3500_sRNA277</i>	5'UTR	244			3.2	1.30E-08
<i>srn_3610_sprC</i>	Transcript	154	7.1	4.72E-64	8.9	6.84E-28
<i>srn_3630_sau69</i>	5'UTR	98	4.3	3.68E-06	3.5	3.03E-03
<i>srn_3950_teg16</i>	Transcript	225			21.8	4.41E-44
<i>srn_4500_teg127</i>	ND	37			5.8	1.87E-02
<i>srn_4666_tsr36</i>	CDS	526			3.5	6.87E-10
<i>srn_4680_sau19</i>	Transcript	75			4.6	3.85E-05
<i>srn_4970_sRNA398</i>	ND	144	7.4	6.67E-36	8.8	3.07E-23
<i>srn_4980_teg32</i>	ND	224	7.9	1.62E-21	12.0	1.10E-34
<i>srn_5040_sRNA403</i>	ND	138			5.1	3.11E-05
<i>srn_9320_sRNA258</i>	Transcript	36			3.5	4.58E-05
<i>srn_9335_tsr29</i>	Transcript	131	3.1	9.40E-09	5.5	5.57E-15
<i>srn_9340_sRNA287</i>	Transcript	369	13.9	1.20E-50	24.8	1.66E-52

Unknown function

SAOUHSC_00034	<i>cstR</i>	Hypothetical protein			3.3	7.67E-05
SAOUHSC_00047		Hypothetical protein			3.5	3.74E-09
SAOUHSC_00084		Hypothetical protein	3.4	5.09E-18		
SAOUHSC_00091		Hypothetical protein	28.5	3.37E-176	5.7	1.26E-16
SAOUHSC_00174		Hypothetical protein			4.4	1.98E-09
SAOUHSC_00182		Hypothetical protein	3.2	7.15E-23		
SAOUHSC_00254		Hypothetical protein	11.0	2.12E-76	10.4	1.71E-28
SAOUHSC_00256		Hypothetical protein	7.2	6.77E-65	3.8	1.32E-11
SAOUHSC_00330		Hypothetical protein			6.1	4.85E-20
SAOUHSC_00381a		Hypothetical protein	3.3	8.51E-06	5.0	1.72E-12
SAOUHSC_00716	<i>saeQ</i>	Hypothetical protein			3.3	9.13E-09
SAOUHSC_00737		Hypothetical protein			3.8	3.61E-03
SAOUHSC_00774		Hypothetical protein			3.1	1.76E-08
SAOUHSC_00807		Hypothetical protein	3.3	1.62E-21		
SAOUHSC_00808		Hypothetical protein	3.7	3.17E-37		
SAOUHSC_00863		Hypothetical protein			3.4	6.09E-09
SAOUHSC_00911		Hypothetical protein	4.8	3.40E-45	3.3	7.21E-09
SAOUHSC_00967		Hypothetical protein	3.3	1.79E-03	21.5	1.35E-21
SAOUHSC_00975		Hypothetical protein	4.7	4.74E-53	26.6	1.94E-57

SAOUHSC_01005	Hypothetical protein				4.8	1.41E-13
SAOUHSC_01023	Hypothetical protein				3.1	1.01E-02
SAOUHSC_01113	Hypothetical protein		4.2	9.08E-40		
SAOUHSC_01289	Hypothetical protein		23.4	6.16E-62	13.1	4.07E-33
SAOUHSC_01290	Hypothetical protein		5.5	8.64E-36	4.2	8.29E-13
SAOUHSC_01291	Hypothetical protein		4.8	4.08E-26	3.5	3.97E-09
SAOUHSC_01292	Hypothetical protein		4.4	1.59E-24		
SAOUHSC_01295	Hypothetical protein		4.3	1.26E-07	3.6	1.88E-04
SAOUHSC_01584	Hypothetical protein		3.1	4.59E-11		
SAOUHSC_01798	Hypothetical protein		4.9	2.48E-56		
SAOUHSC_01851	Hypothetical protein				4.4	8.34E-08
SAOUHSC_01899	Hypothetical protein				3.7	1.25E-10
SAOUHSC_01917	Hypothetical protein		6.3	4.48E-28	5.4	6.32E-11
SAOUHSC_01923	Hypothetical protein		6.2	4.86E-57	4.0	5.84E-12
SAOUHSC_01944	Hypothetical protein				9.4	1.32E-22
SAOUHSC_02104	Hypothetical protein				3.3	1.45E-05
SAOUHSC_02782	Hypothetical protein				5.9	1.20E-06
SAOUHSC_02856	Hypothetical protein				9.2	2.66E-26
SAOUHSC_02857	Hypothetical protein				8.5	2.74E-20
SAOUHSC_02858	Hypothetical protein				9.3	2.47E-27
SAOUHSC_02888	Hypothetical protein				32.2	1.95E-64
SAOUHSC_02950	Hypothetical protein				11.3	8.62E-31

Gene group and annotation	Gene name	Assignment	Differential expression HG003 Δ sarA vs HG003			
			Exponential (2h)		Early stationary (4.5h)	
			Fold-change	p-value	Fold-change	p-value
Genes activated by SarA						
Transport and binding proteins & protein fate						
SAOUHSC_00201	<i>opp-5A</i>	Nickel ABC transporter	3.5	7.26E-35		
SAOUHSC_00281		Formate/nitrite transporter	3.6	7.04E-37		
SAOUHSC_00310	<i>ulaA</i>	PTS system ascorbate-specific transporter			30.7	2.83E-34
SAOUHSC_00311		PTS EIIB type-2 domain-containing protein			32.7	1.43E-38
SAOUHSC_00312		PTS system, fructose subfamily, IIA component			21.1	3.65E-32
SAOUHSC_00313		PTS system, fructose subfamily, IIA component			10.9	1.04E-20
SAOUHSC_01861		Glutamyl aminopeptidase			3.2	1.56E-06
SAOUHSC_01945	<i>epiG</i>	Lantibiotic protection ABC transporter permease subunit, MutG family			3.5	1.62E-07
SAOUHSC_01947	<i>epiE</i>	Lantibiotic protection ABC transporter permease subunit, MutE/EpiE family			4.0	7.71E-09
SAOUHSC_01948	<i>epiF</i>	Lantibiotic protection ABC transporter, ATP-binding subunit			3.9	1.67E-08
SAOUHSC_02153	<i>pmtB</i>	ABC-2 transporter family protein			7.5	1.82E-16
SAOUHSC_02154	<i>pmtA</i>	ABC transporter ATP-binding protein			8.3	3.56E-17
SAOUHSC_02155	<i>pmtR</i>	Histidine utilization repressor			7.7	3.48E-17
SAOUHSC_02597	<i>glvC</i>	PTS system transporter			4.3	1.66E-09
SAOUHSC_02671	<i>narK</i>	Nitrite transporter	8.5	2.03E-94		
SAOUHSC_02864	<i>feoB</i>	Ferrous iron transport protein B	3.0	1.00E-14		

SAOUHSC_02905		Type II secretion protein		5.1	1.30E-08
Energy metabolism					
SAOUHSC_00203		Hypothetical protein		3.7	7.61E-39
SAOUHSC_00204	<i>hmp</i>	Globin domain-containing protein		3.6	5.82E-38
SAOUHSC_00535		UDP-glucose 4-epimerase		4.8	1.59E-10
SAOUHSC_00894	<i>rocD</i>	Ornithine-oxo-acid transaminase		3.3	9.21E-07
SAOUHSC_01007	<i>folD</i>	5,10-methylene-tetrahydrofolate cyclohydrolase		3.9	5.09E-08
SAOUHSC_01216	<i>sucC</i>	Succinyl CoA synthetase		3.0	9.52E-06
SAOUHSC_01794	<i>gapB</i>	Glyceraldehyde 3-phosphate deshydrogenase		3.7	9.36E-08
SAOUHSC_01801	<i>citC</i>	Isocitrate deshydrogenase		3.4	9.21E-07
SAOUHSC_01802	<i>citZ</i>	Citrate synthase		3.2	1.05E-06
SAOUHSC_01818	<i>ald2</i>	Alanine deshydrogenase		7.3	1.20E-14
SAOUHSC_01910	<i>pckA</i>	Phosphoenolpyruvate carboxykinase		4.1	1.08E-08
SAOUHSC_02151	<i>pmtD</i>	Hypothetical protein		5.0	8.74E-11
SAOUHSC_02152	<i>pmtC</i>	ABC transporter ATP-binding protein		6.2	3.48E-13
SAOUHSC_02379	<i>deoC2</i>	Aldolase		4.4	3.49E-09
SAOUHSC_02467	<i>budA1</i>	Alpha-acetolactate decarboxylase	22.3	4.29E-166	
SAOUHSC_02468	<i>budB</i>	Acetolactate synthase	20.8	3.74E-165	
SAOUHSC_02606	<i>hutI</i>	Imidazolonepropionase		13.7	4.02E-23
SAOUHSC_02607	<i>hutU</i>	Urocanate hydratase		17.9	1.61E-26
SAOUHSC_02647	<i>mqo1</i>	Malate quinone oxidoreductase		3.2	2.58E-06
SAOUHSC_02675	<i>nreC</i>	Oxygen regulatory protein	6.5	7.59E-73	
SAOUHSC_02676	<i>nreB</i>	Oxygen sensor histidine kinase	6.7	6.66E-76	
SAOUHSC_02677	<i>nreA</i>	Nif-specific regulatory protein	7.1	3.43E-79	
SAOUHSC_02678	<i>narI</i>	Respiratory nitrate reductase subunit gamma	9.6	9.80E-102	
SAOUHSC_02679	<i>narJ</i>	Respiratory nitrate reductase subunit delta	10.0	2.56E-103	
SAOUHSC_02680	<i>narH</i>	Nitrate reductase subunit beta	8.1	1.73E-90	
SAOUHSC_02681	<i>narG</i>	Nitrate reductase subunit alpha	4.8	1.62E-55	
SAOUHSC_02839	<i>sdaAA</i>	L-serine dehydratase		3.1	1.97E-06
SAOUHSC_02840	<i>sdaAB</i>	L-serine dehydratase iron-sulfur-dependent subunit beta		6.8	4.40E-13
SAOUHSC_02841		Hypothetical protein		9.2	6.03E-19
SAOUHSC_02869	<i>rocA</i>	Pyrraline-5-carboxylate dehydrogenase		4.9	4.94E-11
SAOUHSC_02975	<i>manP</i>	PTS system fructose-specific transporter		3.6	1.17E-07
SAOUHSC_02976	<i>pmi</i>	Mannose-6-phosphate isomerase		4.1	6.59E-09
Amino acids					
SAOUHSC_00144	<i>ausA</i>	Non-ribosomal peptide synthetase	3.3	6.00E-32	
SAOUHSC_01884	<i>putA</i>	Proline dehydrogenase		3.3	4.12E-07
Nucleotide metabolism					

SAOUHSC_00019	<i>purA</i>	Adenylosuccinate synthetase	4.4	1.98E-09
SAOUHSC_01008	<i>purE</i>	5-(carboxyamino)imidazole ribonucleotide mutase	4.0	2.29E-08
SAOUHSC_01009	<i>purK</i>	5-(carboxyamino)imidazole ribonucleotide mutase	4.0	1.44E-08
SAOUHSC_01010	<i>purC</i>	Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	3.6	2.12E-07
SAOUHSC_01011	<i>purS</i>	Phosphoribosylformylglycinamide synthase	3.9	1.34E-06
SAOUHSC_01012	<i>purQ</i>	Phosphoribosylformylglycinamide synthase	4.2	4.42E-09
SAOUHSC_01165	<i>pyrP</i>	Uracil permease	7.4	6.37E-14
SAOUHSC_01166	<i>pyrB</i>	Aspartate carbamoyltransferase catalytic subunit	7.7	1.89E-13
SAOUHSC_01168	<i>pyrC</i>	Dihydroorotase	5.2	2.65E-11
SAOUHSC_01169	<i>carA</i>	Carbamoyl phosphate synthase small subunit	3.3	1.07E-06
SAOUHSC_02377	<i>pdp</i>	Pyrimidine-nucleoside phosphorylase	4.2	1.21E-08
Carbohydrates				
SAOUHSC_00712		Aldo/keto reductase	3.2	2.97E-06
SAOUHSC_01845	<i>fhs</i>	Formate-tetrahydrofolate ligase	4.8	2.21E-10
Fatty acid and phospholipids metabolism				
SAOUHSC_00195	<i>fadA</i>	Acetyl-CoA acetyltransferase	17.7	6.65E-28
SAOUHSC_00196	<i>fadB</i>	Fatty acid oxidation complex, alpha subunit	11.2	2.53E-21
SAOUHSC_00197	<i>fadD</i>	Acyl-CoA dehydrogenase	7.3	3.01E-16
SAOUHSC_00198	<i>fadE</i>	O-succinylbenzoate-CoA ligase	4.4	5.16E-10
SAOUHSC_02877	<i>crtN</i>	Squalene synthase	3.1	5.12E-06
SAOUHSC_02879	<i>crtM</i>	Squalene desaturase	3.5	2.15E-07
SAOUHSC_02880	<i>crtQ</i>	4,4'-diaponeurosporenoate glycosyltransferase	3.1	5.92E-06
SAOUHSC_03006	<i>gehA</i>	Lipase	3.1	9.33E-07
Central intermediary metabolism				
SAOUHSC_00577	<i>mvaK1</i>	Mevalonate kinase	3.0	1.04E-05
SAOUHSC_02682	<i>nasF</i>	Uroporphyrin-III C-methyltransferase	6.0	1.52E-68
SAOUHSC_02683	<i>nasE</i>	Assimilatory nitrite reductase [NAD(P)H] small subunit	5.5	8.24E-62
SAOUHSC_02684	<i>nasD</i>	Assimilatory nitrite reductase [NAD(P)H] large subunit	4.5	3.76E-50
SAOUHSC_02685	<i>nirR</i>	Hypothetical protein	3.7	9.05E-39
Cell envelope				
SAOUHSC_00156		Hypothetical protein	3.8	1.09E-08
SAOUHSC_00157	<i>murQ</i>	Estherase	5.0	1.01E-11
SAOUHSC_00158		PTS system transporter	6.0	5.63E-13
SAOUHSC_00160		Hypothetical protein	7.7	2.90E-16
SAOUHSC_00294	<i>nanT</i>	Hypothetical protein	3.9	1.72E-09
SAOUHSC_00295	<i>nanA</i>	N-acetylneuraminate lyase	3.7	6.79E-09

Osmotic stress						
SAOUHSC_02932	<i>betA</i>	Choline dehydrogenase			3.7	2.71E-08
SAOUHSC_02933	<i>betB</i>	Betaine aldehyde dehydrogenase			5.6	7.60E-13
Signal transduction						
SAOUHSC_01799	<i>phoR</i>	Histidine kinase			3.4	9.31E-07
Virulence						
SAOUHSC_00232	<i>lrgA</i>	Murein hydrolase regulator LrgA	8.7	3.52E-87		
SAOUHSC_00233	<i>lrgB</i>	Antiholin-like protein	7.3	2.38E-81	3.8	1.75E-08
SAOUHSC_00812	<i>clfA</i>	Clumping factor			3.6	1.55E-07
SAOUHSC_01135	<i>psmβ1</i>	Staphylococcus haemolytic protein			19.0	7.67E-28
SAOUHSC_01136	<i>psmβ2</i>	Staphylococcus haemolytic protein			18.1	1.50E-26
sRNA						
	SRD data	Description	Length (nucleotides)			
<i>srn_0510_rsaG</i>	Transcript		194		8.8	4.06E-19
<i>srn_0910_sRNA73</i>	CDS		160	4.0	9.54E-04	
<i>srn_1070_sau41</i>	Transcript		469		25.5	8.11E-33
<i>srn_1550_teg49</i>	Transcript		517	3.7	4.65E-36	30.5
<i>srn_1900_sau15</i>	Antisense		92		4.9	1.78E-07
<i>srn_2590_sau46</i>	3'UTR		65	3.1	5.49E-03	9.4
<i>srn_3760_sau7009</i>	ND		50		5.1	1.17E-06
<i>srn_4015_tsr31</i>	3'UTR		72		3.8	9.29E-04
<i>srn_4390_rsaOG</i>	Transcript		111		8.8	1.58E-19
<i>srn_4450_sau6307</i>	ND		75		3.2	7.80E-03
<i>srn_4470_rsaX28</i>	Transcript		1177	3.0	7.62E-28	6.2
<i>srn_4480_teg126</i>	5'UTR		91	8.5	3.55E-48	
<i>srn_4490_sRNA365</i>	ND		229	4.2	3.55E-10	
<i>srn_4790_sRNA387</i>	CDS		305		5.7	2.72E-13
Phage						
SAOUHSC_02016		Phage protein			6.3	2.32E-11
SAOUHSC_02017		Hypothetical protein	3.8	4.08E-06	5.4	1.52E-06
SAOUHSC_02020		Holin			3.8	9.80E-06
SAOUHSC_02034		Hypothetical protein			3.4	1.28E-05
SAOUHSC_02035		Hypothetical protein			3.4	3.23E-06
SAOUHSC_02036		Phage structural protein			4.1	1.92E-09

SAOUHSC_02037		Hypothetical protein			3.2	7.79E-06		
SAOUHSC_02040		Hypothetical protein			3.6	3.90E-06		
SAOUHSC_02041		Phi Mu50B-like protein			3.6	1.45E-06		
SAOUHSC_02042		Phi Mu50B-like protein			3.9	1.46E-06		
SAOUHSC_02043		Phage head protein			4.0	1.40E-09		
SAOUHSC_02044		Phage capsid protein			3.7	1.24E-08		
SAOUHSC_02061		Phi PVL orf 50-like protein			3.2	2.86E-05		
SAOUHSC_02064		Phi ETA orf 25-like protein			3.2	2.69E-05		
SAOUHSC_02065		Hypothetical protein			3.2	5.94E-05		
SAOUHSC_02066		Hypothetical protein			3.5	7.27E-04		
SAOUHSC_02068		Hypothetical protein			3.1	6.68E-06		
Unknown function								
SAOUHSC_00134		Hypothetical protein			3.2	2.55E-19	4.4	7.60E-10
SAOUHSC_00181		Hypothetical protein					3.1	4.06E-07
SAOUHSC_00193		Hypothetical protein					8.6	9.55E-12
SAOUHSC_00205		Hypothetical protein			3.1	7.31E-05		
SAOUHSC_00413	<i>mpsB</i>	Hypothetical protein					3.9	2.75E-08
SAOUHSC_00414	<i>mpsC</i>	Hypothetical protein					3.4	1.81E-07
SAOUHSC_00617		Hypothetical protein					3.5	4.73E-07
SAOUHSC_00820		Hypothetical protein					4.0	6.94E-09
SAOUHSC_00821		Hypothetical protein					3.6	5.84E-08
SAOUHSC_00838		Hypothetical protein					7.0	9.37E-16
SAOUHSC_00839		Hypothetical protein					5.8	7.01E-13
SAOUHSC_00971		Hypothetical protein			5.1	9.56E-57	5.2	6.83E-12
SAOUHSC_01138		Hypothetical protein					3.4	7.24E-07
SAOUHSC_01817		Hypothetical protein					3.1	6.30E-06
SAOUHSC_01918		Calcium-binding protein					3.3	1.47E-06
SAOUHSC_01919		Hypothetical protein					3.4	4.89E-07
SAOUHSC_01956		Pseudogene					3.5	1.61E-06
SAOUHSC_02054		Hypothetical protein					3.3	5.67E-04
SAOUHSC_02701		Hypothetical protein					19.3	2.77E-20
SAOUHSC_02906		Hypothetical protein					4.5	4.46E-07

Tableau 21 : Données totales du RNA-Seq comparant les transcriptomes des souches HG003 et HG003 *AsarA*. La sélection montre les gènes ayant un différentiel d'expression supérieur ou égal à 3 et une valeur FPKM supérieure à 10 dans au moins une des conditions. Les gènes encadrés sont ou sont prédits comme des structures en opéron avec la base de données Auréowiki (Fuchs et al., 2018).

Tableau 22

Tableau des gènes communs retrouvés en RNA-Seq et en ChIP-Seq

(Tableau supplémentaire S5 – Oriol et *al.*, 2021)

Gene group and annotation	Gene name	Assignment	RNA-seq Data		ChIP-seq Data		
			Differential expression HG003 Δ sarA vs HG003		Distance to the ATG (nt)	Score	p-value
			Exponential (2h)	Early stationary (4.5h)			
			Fold-change	Fold-change			
SAOUHSC_00047	HP	Hypothetical protein	-	3.5	124	39.4	0
SAOUHSC_00051	<i>plc</i>	1-phosphatidyli-sitol phosphodiesterase	12.2	23.6	41	38.3	1.59E-321
SAOUHSC_00069	<i>spa</i>	Protein A	-	3.2	151	39.4	0.00E+00
SAOUHSC_00084	HP	Hypothetical protein	3.4	-	61		
SAOUHSC_00088*	<i>galE</i>	UDP-glucose 4-epimerase	75.5	43.02	85	33.2	7.09E-242
SAOUHSC_00089		Undecaprenyl-phosphate glucose phosphotransferase	76.6	27.0			
SAOUHSC_00093	<i>sodM</i>	Superoxide dismutase	14.0	4.5	63	43.1	0
SAOUHSC_00102	<i>phnE1</i>	Phosphonates ABC transporter permease	13.4	19.9			
SAOUHSC_00103	<i>phnE2</i>	Phosphonates ABC transporter permease	18.8	21.3			
SAOUHSC_00104	<i>phnC</i>	Amino-acid ABC transporter ATP-binding protein	39.1	23.0			
SAOUHSC_00105	<i>phnD</i>	Phosphonate ABC transporter substrate binding protein	41.8	19.0	114	43.5	0.00E+00
SAOUHSC_00106	HP	Putative ABC-type transporter	11.4	10.6	115	43.5	0.00E+00
SAOUHSC_00113	<i>adhE</i>	Bifunctional acetaldehyde-CoA/alcohol deshydrogenase	5.5	-	114	40.2	0
SAOUHSC_00114	<i>capA/cap5A</i>	Capsular polysaccharide biosynthesis protein	5.2	-	65	41.2	0
SAOUHSC_00115	<i>capB</i>	Capsular polysaccharide biosynthesis protein	5.3	-			
SAOUHSC_00116	<i>capC</i>	Capsular polysaccharide biosynthesis protein	4.3	-			
SAOUHSC_00117	<i>capD</i>	Capsular polysaccharide biosynthesis protein	6.8	-			
SAOUHSC_00118	<i>capE</i>	Capsular polysaccharide biosynthesis protein	3.7	3.2			
SAOUHSC_00119	<i>capF</i>	Capsular polysaccharide biosynthesis protein	3.5	-			
SAOUHSC_00144	<i>ausA</i>	Non-ribosomal peptide synthetase	3.3	-	400	34.8	1.91E-265
SAOUHSC_00249		ABC transporter	5.6	3.3			
SAOUHSC_00250		Hypothetical protein	6.6	4.5			
SAOUHSC_00251		Hypothetical protein	7.6	4.6			
SAOUHSC_00253	HP	Hypothetical protein	17.1	8.9	48	41.5	0.00E+00
SAOUHSC_00254	HP	Hypothetical protein	11.0	10.4	223	41.5	0
SAOUHSC_00256	HP	Hypothetical protein	7.2	3.8	51	37.1	2.51E-301
SAOUHSC_00257	<i>esxA</i>	WXG100 family type VII secretion effector	18.0	8.9	197	37.1	2.51E-301
SAOUHSC_00282	<i>brnQ</i>	Branched-chain amino-acid transport system II carrier protein	-	3.4	550	37.0	6.50E-300
SAOUHSC_00284	HP	Hypothetical protein	-	3.4	64	37.0	6.50E-300
SAOUHSC_00300	<i>geh</i>	Lipase	5.2	-	171	49.5	0
SAOUHSC_00381a	HP		3.3	5.0	38	42.9	0
SAOUHSC_00544	<i>sdrC</i>	Fibrinogen-binding protein SdrC	6.8	5.4	74	49.3	0
SAOUHSC_00545	<i>sdrD</i>	Fibrinogen-binding protein SdrD	8.0	5.2	142	41.5	0
SAOUHSC_00555*		Haloacid dehalogenase-like hydrolase	15.2	7.0	33	45.3	0
SAOUHSC_00577	<i>mvaK1</i>	Mevalonate kinase	-	3.0	455	42.7	0
SAOUHSC_00674	<i>sarX</i>	Staphylococcal accessory regulator family	4.1	3.7	85	35.9	4.89E-282
SAOUHSC_00694	<i>mgrA</i>	Staphylococcal accessory regulator family	-	3.8	157	46.6	0
SAOUHSC_00712	HP	Aldo/keto reductase	-	3.2	140	38.4	2.17E-322

SAOUHSC_00808	HP		3.7	-	150	39.5	0
SAOUHSC_00812	<i>clfA</i>	Clumping factor	-	3.6	97	34.9	1.48E-267
SAOUHSC_00818	<i>nuc</i>	Thermonuclease	130.1	269.4	176	42.7	0
SAOUHSC_00828	HP	L-lysine exporter	-	3.1	111	35.9	3.02E-282
SAOUHSC_00842	<i>metN1</i>	Methionine ABC transporter		3.5			
SAOUHSC_00843	<i>metP1</i>	Methionine ABC transporter		4.4			
SAOUHSC_00844	<i>metQ1</i>	Methionine ABC transporter		5.1	6	35.0	2.64E-269
SAOUHSC_00911	HP	Hypothetical protein	4.8	3.3	207	53.6	0
SAOUHSC_00913*	<i>lysR</i>	LysR family regulatory protein	65.1	42.8	58	50.4	0
SAOUHSC_00923	<i>opp-3B</i>	Oligopeptide transport system permease		3.2	41	43.7	0
SAOUHSC_00924	<i>opp-3C</i>	Oligopeptide transport system permease		4.1			
SAOUHSC_00925	<i>opp-3D</i>	Oligopeptide transport system permease		3.8			
SAOUHSC_00926	<i>opp-3F</i>	Oligopeptide transport system permease		3.8			
SAOUHSC_00927	<i>opp-3A</i>	Oligopeptide ABC transporter		3.5			
SAOUHSC_00949	HP	Sodium/alanine symporter family protein	-	8.7	144	34.9	1.03E-266
SAOUHSC_00961*	<i>comK1</i>	Competence transcription factor	15.15	9.4	111	46.7	0
SAOUHSC_00971	HP	Hypothetical protein	5.1	5.2	159	46.9	0
SAOUHSC_00975*	HP	Hypothetical protein	4.74	26.62	440	47.8	0
SAOUHSC_00976	HP	Heme ABC transporter	4.7	26.6	144	47.8	0
SAOUHSC_00987	<i>sspB</i>	Cysteine protease		26.1			
SAOUHSC_00988	<i>sspA</i>	Glutamyl endopeptidase		34.2	134	46.2	0
SAOUHSC_00992	<i>atlR</i>	MarR family transcriptional regulator	17.3	28.7	77	38.3	2.88E-321
SAOUHSC_01005	HP	Hypothetical protein	-	4.8	135	37.5	2.22E-307
SAOUHSC_01079	<i>isdB</i>	Cell surface receptor IsdB for hemoglobin and hemoglobin-haptoglobin complexes	5.8	3.5	119	48.4	0.00E+00
SAOUHSC_01113	HP	Hypothetical protein	4.2	-	247	52.3	0
SAOUHSC_01121	<i>hla</i>	Alpha-hemolysin	5.6	-	392	50.8	0
SAOUHSC_01180	HP	Hypothetical protein	3.1	3.1	245	48.3	0
SAOUHSC_01289	HP	Outer membrane assembly lipoprotein	23.4	13.1	4	46.2	0
SAOUHSC_01290	HP	Hypothetical protein	5.5	4.2	96	34.9	4.79E-267
SAOUHSC_01291	HP	Hypothetical protein	4.8	3.5	385	46.3	0
SAOUHSC_01292	HP	Hypothetical protein	4.4	-	83	41.7	0
SAOUHSC_01295	HP	Hypothetical protein	4.3	3.6	31	38.4	1E-323
SAOUHSC_01450		Amino-acid transporter	15.3	28.1			
SAOUHSC_01451	<i>ilvA1</i>	Threonine dehydratase	16.3	32.0			
SAOUHSC_01452*	<i>ald1</i>	Alanine dehydrogenase	16.7	38.3	197	52.1	0
SAOUHSC_01584	HP	Hypothetical protein	3.1	-	125	41.0	0
SAOUHSC_01744	<i>recJ</i>	Single-stranded-DNA-specific exonuclease	-	3.1	52	38.6	0
SAOUHSC_01798		Hypothetical protein	4.9	-	166	46.8	0
SAOUHSC_01845	<i>fts</i>	Formate-tetrahydrofolate ligase	-	4.8	172	34.1	1.09E-254
SAOUHSC_01899	HP	Hypothetical protein	-	3.7	73	36.0	4.56E-284
SAOUHSC_01917	HP	Hypothetical protein	6.3	5.4	55	45.8	0
SAOUHSC_01918	HP	Calcium-binding protein	-	3.3	248	45.8	0
SAOUHSC_01923	HP	Hypothetical protein	6.2	4.0	73	44.5	0
SAOUHSC_01938	<i>spID</i>	Serine protease	6.0	29.2			
SAOUHSC_01939	<i>spIC</i>	Serine protease	7.1	36.9			
SAOUHSC_01941	<i>spIB</i>	Serine protease	17.5	52.4			

SAOUHSC_01942	<i>splA</i>	Serine protease	24.3	62.3	93	49.3	0
SAOUHSC_01944	HP	Hypothetical protein	-	9.4	91	41.9	0
SAOUHSC_01954	<i>lukD</i>	Leukotoxin LukD	6.4	10.1			
SAOUHSC_01955	<i>lukE</i>	Leukotoxin LukE	9.5	11.6	101	49.7	0
SAOUHSC_01956	HP	Pseudogene	-	3.5	114	49.9	0
SAOUHSC_01972	<i>prsA</i>	Protein export protein	4.0	3.8	250	51.0	0
SAOUHSC_02127*	<i>scpA</i>	Staphopain thiol proteinase	126.7	57.2	221	51.0	0
SAOUHSC_02151		Hypothetical protein	-	5.0			
SAOUHSC_02152	<i>pmtC</i>	ABC transporter ATP-binding protein	-	6.2	68	37.8	1.334E-313
SAOUHSC_02241	<i>lukG</i>	Leukocidin LukG	6.0	5.7			
SAOUHSC_02243	<i>lukH</i>	Leukocidin LukH	6.9	5.9	197	41.4	0
SAOUHSC_02247	<i>ltrB</i>	Potassium uptake protein	10.1	7.2	85	43.2	0
SAOUHSC_02281	<i>ilvD</i>	Dihydroxy-acid dehydratase	-	19.2	415	44.7	0
SAOUHSC_02282	<i>ilvB</i>	Acetolactate synthase large subunit	-	17.8			
SAOUHSC_02283	<i>ilvH</i>	Acetolactate synthase 1 regulatory subunit	-	15.1			
SAOUHSC_02557		Urea transporter	-	5.0	140	48.5	0
SAOUHSC_02558	<i>ureA</i>	Urease subunit gamma	-	4.4	135	48.5	0
SAOUHSC_02559	<i>ureB</i>	Urease subunit beta	-	3.4			
SAOUHSC_02561	<i>ureC</i>	Urease subunit alpha	-	3.7			
SAOUHSC_02569	<i>sarY</i>	Staphylococcal accessory regulator family	8.8	5.6			
SAOUHSC_02570		AraC family transcriptional regulator	11.4	6.0	161	52.8	0
SAOUHSC_02576	<i>ssaA</i>	Secretory antigen	5.5	6.7	195	35.7	6.62E-280
SAOUHSC_02622	<i>gltS</i>	Sodium/glutamate symporter	3.4	3.6	138	35.2	7.06E-272
SAOUHSC_02667	<i>gltT</i>	Proton/glutamate symport protein	-	4.7			
SAOUHSC_02668	HP	Hypothetical protein	-	3.1	217	38.0	1.138E-316
SAOUHSC_02696*	<i>fmhA</i>	Methicillin resistance determinant protein (FemAB family)	38.9	21.0	99	41.7	0
SAOUHSC_02706	<i>sbi</i>	Immu-globulin G-binding protein	9.3	13.3	43	41.9	0
SAOUHSC_02709	<i>hglC</i>	Leukocidin s subunit	-	11.2	358	40.9	0
SAOUHSC_02710	<i>hlgB</i>	Leukocidin f subunit	-	9.8			
SAOUHSC_02782	HP	Hypothetical protein	-	5.9	256	39.9	0
SAOUHSC_02820*	HP	ABC transporter ATP-binding protein	23.4	44.4	82	43.3	0
SAOUHSC_02858	HP	Hypothetical protein	-	9.3	48	35.3	1.00E-273
SAOUHSC_02911	<i>queH</i>	Adenine nucleotide alpha hydrolases superfamily protein	3.3	-	60	45.0	0
SAOUHSC_02950	HP	Hypothetical protein	-	11.3	75	38.5	0
SAOUHSC_02963	<i>clfB</i>	Clumping factor B	-	5.6	75	37.6	4.244E-310
SAOUHSC_02971	<i>aur</i>	Zinc metalloproteinase aureolysin	467.8	162.0	138	46.0	0
SAOUHSC_02973	HP	Cell division protein ZipA	5.7	-	162	41.2	0
SAOUHSC_02998	<i>cap1C</i>	Capsular polysaccharide biosynthesis protein Cap5C	90.6	26.5			
SAOUHSC_02999	<i>capB1</i>	Capsular polysaccharide biosynthesis protein Cap5B	152.0	42.4			
SAOUHSC_03000	<i>cap1A</i>	Capsular polysaccharide biosynthesis protein CapA	213.9	56.6	145	44.5	0
SAOUHSC_03006	<i>gehA</i>	Lipase	-	3.1	236	38.1	6.699E-318
sRNA					Distance to the 5' (nt)	Score	p-value
	<i>sm_0765_tsr11</i>		-	3.3	542	37.0	6.5E-300
	<i>sm_0860_rsaOB*</i>		-	10.5	88	24.8	1.09E-135
	<i>sm_0930_teg76</i>		-	3.8	113	38.8	0

<i>sm_1530_sRNA133</i>			3.1	-	126	51.0	0
<i>sm_1550_teg49</i>			3.7	30.5	149	37.8	2.952E-313
<i>sm_2230_sprG2</i>			15.5	9.0	54	33.7	9.01E-249
<i>sm_2780_sau6282</i>			-	10.3	(+) 39	36.9	4.52E-299
<i>sm_3500_sRNA277</i>			-	3.2	7	52.3	0
<i>sm_9335_tsr29*</i>			3.1	5.5	113	40.5	0
<i>sm_3610_sprC</i>			7.1	8.9	17	49.9	0
<i>sm_9340_sRNA287</i>			13.9	24.8	51	54.8	0
<i>sm_3630_sau69</i>			4.3	3.5	111	51.0	0
<i>sm_3950_teg16*</i>			-	21.8	106	44.7	0
<i>sm_4680_sau19</i>			-	4.6	32	39.9	0
<i>sm_4980_teg32</i>			7.9	12.0	117	46.4	0

Tableau 22 : Gènes communs aux analyses RNA-Seq et ChIP-Seq (tableau S5 de la publication Oriol et al., 2021). Les structures en opéron apparaissent avec un fond gris, le premier gène de l'opéron est en gras. * : gènes sélectionnés pour validation expérimentale de la régulation directe par SarA. En rouge, les gènes réprimés par SarA et en vert les gènes activés par SarA.

<p>>Srn_9340 – NCTC8325 (NC_007795) – 117 nt (Mauro et al., 2016)</p> <p>AAUCGGCAUCUACGUGCGGAUUAUAAAGUAAAGCGUAGCAUAACCAGGAGUUAGUCG AUUUUUAUAAAUUCGACUAAAUUAUUAUAAAGGCUAAAGUAAUAGUUUACUUUA GCC</p>
<p>> Srn_9340 – Newman (NC_009641) – 156 nt (Base de données SRD - Sassi et al., 2015)</p> <p>UCUACGUGCGGAUUAUAAAGUAAAGCGUAGCAUAACCAGGAGUUAGUCGAUUUUAA UAAAUUCGACUAAAUUAUUAUAAAGGCUAAAGUAAUAGUUUACUUUAGCCUUUAU UGCAUUUGUAAUUUAUAGAACUGCGAACAGGUGACUACUGUU</p>
<p>> Srn_9340 – USA300 (NC_007793.1) – 156 nt (Base de données SRD - Sassi et al., 2015)</p> <p>UCUACGUGCGGAUUAUAAAGUAAAGCGUAGCAUAACCAGGAGUUAGUCGAUUUUAA UAAAUUCGACUAAAUUAUUAUAAAGGCUAAAGUAAUAGUUUACUUUAGCCUUUAU UGCAUUUGUAAUUUAUAGAACUGCGAACAGGUGACUACUGUU</p>
<p>>Srn_0860_RsaOB – NCTC8325 (NC_007795) – 421 nt (Base de données SRD - Sassi et al., 2015)</p> <p>UUAUAACAGUUUAAUGAAACGUAAACACAAUAAAGAGGAAAGUAAAACACACCCUGCUU AUACAGAGAGUCUUUAGUAGCUGAGAGAAGAUUUUGAAAGCGUGUUUGAAAAUGGCCU UGGAGUGUUGAUGCCAAUUAUGAGGUGUCUACGGGUUCGCCCGUUUAUAGCGAUACAGUAU UAACAUUGAUGUUAAAUGGCGUACUGGAUUCUUUACGCACGAUUUUUUGUUAAUAAGU AUGGGAUAGCACAUUACUUAUACCUUACUACUGACUUUAAUUGUGAUAAUUGUUCAGU AAGCAUAAUUACUUUAAUGCGUACUGAAUAAGGUUAAUUCAGCGAUGGAAUAACAAA UAAAGGUGGUACCGCGAAACAUAAGCUUUCGUCCUUUUUAUCCGAUUCAUUCGGGUACG AAGGACGGAAG</p>
<p>>Srn_3980_Teg16 – NCTC8325 (NC_007795) – 225 nt (Base de données SRD - Sassi et al., 2015)</p> <p>UUAUCAAAUUUUUAGACAAUUCUAACUUAUAAAGUGAUUAUACCAUUCACGGAAGGA GUAUAAUAAAUGCUUAAUCAUAUACUGAACAUCAACCGACAACUCAAUAUUAUUA UUUUAUUUAUACUCUUUAGGACUCGAACGUUAGUAAAUAUUUACUAAACGCUUUAAGUCC UAUUUCUGUUUGAAUGGGACUUGUAAACGUCCCAAUAUAUUGGGACGU</p>

Tableau 23 : Séquences des sARNs utilisées pour les analyses bio-informatiques pour la prédiction de cibles *in silico*.

Posters

Highlighting the SarA regulon and its involvement in virulence in the human pathogen *Staphylococcus aureus*

Charlotte ORIOL¹, A. CHEUNG², A. MANNA², L. CENGHER², M-L. PINEL-MARIE¹, A. ROUILLON^{1*} and B. FELDEN^{1*}

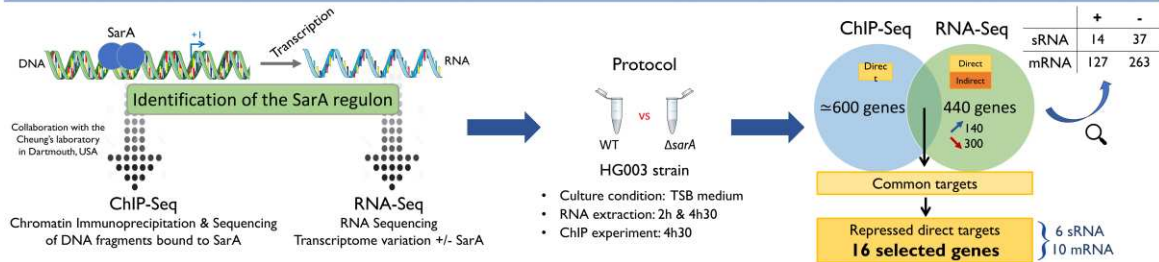
*Co-corresponding authors

¹U1230 - Laboratoire de Biochimie Pharmaceutique «ARN Régulateurs Bactériens et Médecine», 2 avenue du Professeur Léon Bernard, Université de Rennes 1, France

²Department of Microbiology, Dartmouth Medical School, Hanover, New Hampshire, USA

Introduction

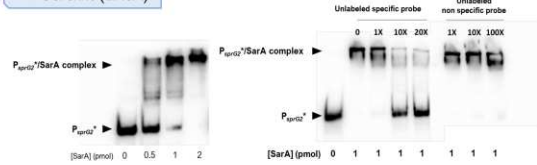
Staphylococcus aureus is a commensal bacterium and an opportunist pathogen for humans. It is responsible for community-acquired and nosocomial infections, from benign to severe infections. The success of an infection relies on the expression timing of virulence factors which are regulated by regulatory RNAs (sRNA) or by transcriptional factors (TF), such as the major virulence factor SarA. SarA is involved in virulence, biofilm formation and antibiotic resistance [1,2]. As a TF, SarA was shown to activate or repress the transcription of multiple genes. Recently it was shown that SarA was also responsible for the transcriptional repression of two sRNAs, Srn_3610_SprC and Srn_9340 [3]. This project aims at determining the SarA regulon including mRNA and sRNA targets. In doing so, we expect a better understanding of the role of SarA in *S. aureus* virulence and its connections with sRNA.



1. Validation process of direct targets: example of *sprG2*

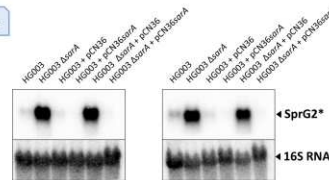
Type I toxin - antitoxin system SprG2/SprF2
sprG2 encodes a toxic peptide and *sprF2* is the RNA antitoxin [4]

✓ Gel shift (EMSA)



✓ SarA specifically binds the *sprG2* promoter

✓ Northern blot

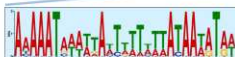


✓ SarA represses *sprG2* gene expression

✓ Validation of the 16 selected targets including sRNA and mRNA

2. Search for a SarA binding consensus using the 16 validated targets to identify novel targets

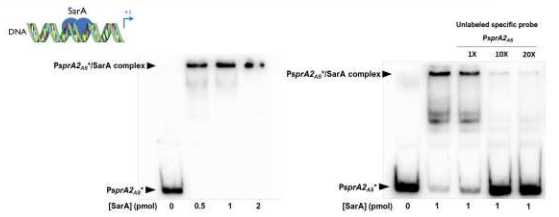
16 promoter sequences (150+1) → Consensus analysis → Whole genome scanning → Novel targets identification



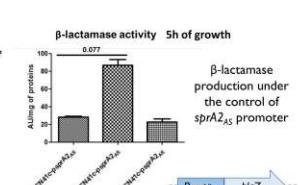
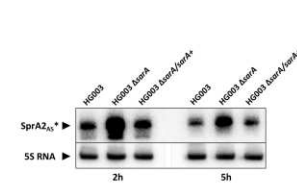
TTTTTGAATACTTAATCTAATATAAATAATTCATTTATGTAATATGCAAAAATACATTCACACCTTGTTCCATCA
ATGCTATAATTAATACATAATAAATGAACATCTAAATACACCAAAATCCCTCACTACTGCCATAGTGAGGGGA
sprA2_{AS}

3. Characterization of one target candidate: *sprA2_{AS}*

Type I toxin - antitoxin system SprA2/SprA2_{AS}
sprA2 encodes a toxic peptide and *sprA2_{AS}* is the RNA antitoxin [5]



✓ SarA specifically binds the *sprA2_{AS}* promoter and represses its expression



β-lactamase production under the control of *sprA2_{AS}* promoter

References

- Vallé J, Toledo-Arana A, Beraïn C, Ghigo JM, Amorina B, Penadés JR, Lass I. 2003. SarA and not oB is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology* 48:1075-1087
- Trotodaro MP, Xiong YQ, Memmi G, Bayer AS, Cheung AL. 2009. Role of mgrA and sarA in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Autolysis and Resistance to Cell Wall-Active Antibiotics. *J INFECT DIS* 199:209-218.
- Mauro T, Rouillon A, Felden B. 2016. Insights into the regulation of small RNA expression: SarA represses the expression of two sRNAs in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Research*.
- Riffaud C, Pinel-Marie M-L, Pascreau G, Felden B. 2019. Functionality and cross-regulation of the four SprG/SprF type I toxin-antitoxin systems in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Research* 47:1740-1758.
- Germain-Amiot N, Augagneur Y, Camberlein E, Nicolas I, Lecreur V, Rouillon A, Felden B. 2019. A novel *Staphylococcus aureus* cis-trans type I toxin-antitoxin module with dual effects on bacteria and host cells. *Nucleic Acids Research* 47:1759-1773.

Conclusion

The combination of RNA-Seq and ChIP-Seq data allowed to identify new mRNA and especially sRNA direct targets which are part of the SarA regulon. This process coupled with bioinformatic consensus analysis provided the identification of novel potential SarA binding sites which were never reported earlier.

Perspectives

- ✓ DNA footprints between SarA and its direct targets to improve the consensus analysis
- ✓ Correlate SarA targets with physiological roles (biofilm formation, antibiotic resistance)

Etude du régulon SarA chez le pathogène *Staphylococcus aureus* Implication dans les systèmes toxine-antitoxine de type I

Charlotte ORIOL¹, Liviu Cengher², Adhar Manna², Tony Mauro¹, Marie-Laure Pinel-Marie¹, Brice Felden¹, Ambrose Cheung², Astrid Rouillon¹

¹U1230 - Laboratoire de Biochimie Pharmaceutique « ARN Régulateurs Bactériens et Médecine », 2 avenue du Professeur Léon Bernard, Université de Rennes 1, France

²Department of Microbiology, Dartmouth Medical School, Hanover, New Hampshire, USA

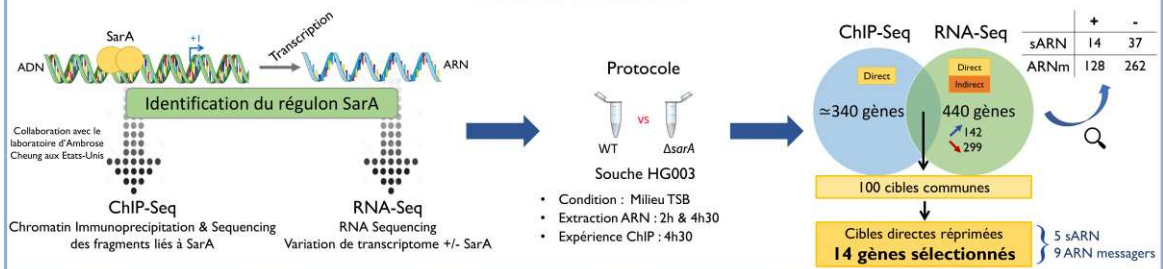
mSystems

charlotte.oriol@univ-rennes1.fr

Introduction

Staphylococcus aureus est un pathogène opportuniste de l'Homme, responsable d'infections communautaires et nosocomiales. Ces infections sont conduites grâce aux facteurs de virulence régulés par des facteurs de transcription (FT) comme le FT majeur SarA, et par des ARN régulateurs (sARNs). SarA est connue pour jouer un rôle clé dans la virulence et dans la formation de biofilms [1]. Une vingtaine de ses cibles directes ont déjà été caractérisées dont deux sARNs, *Srn_3610_SprC* et *Srn_9340* [2]. En parallèle, une étude de puce à ADN a révélé que l'expression de 120 gènes était affectée dans une souche Δ sarA [3]. Cette étude a donc pour objectif d'aller plus loin dans la caractérisation du régulon SarA chez *S. aureus*, et surtout de l'étendre à l'étude des sARNs afin de mieux comprendre les réseaux de régulation entre les FT et les sARN.

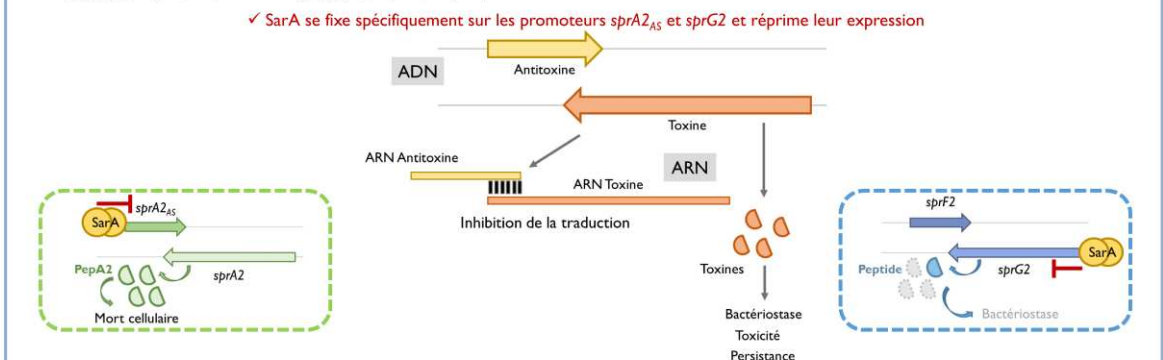
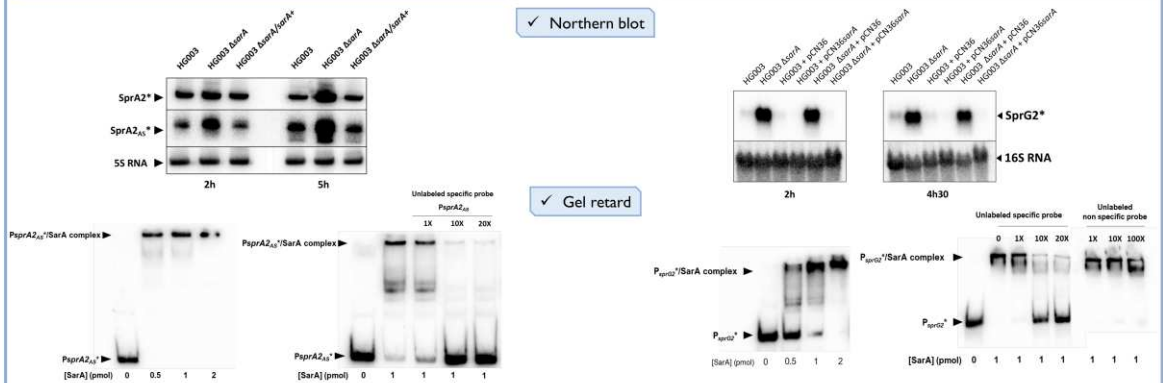
Matériels et Méthodes



Système toxine – antitoxine de type I *SprA2/SprA2_{AS}*
sprA2 code le peptide toxique et *sprA2_{AS}* est l'ARN antitoxine [4]

Résultats

Système toxine – antitoxine de type I *SprG2/SprF2*
sprG2 code le peptide toxique et *sprF2* est l'ARN antitoxine [5]



Références

- [1] Valle J, Toledo-Arana A, Berrassin C, Ghigo J-M, Amorena B, Penadés JR, Lasa I. 2003. SarA and not oB is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology* 48:1075–1087
- [2] Mauro T, Rouillon A, Felden B. 2016. Insights into the regulation of small RNA expression: SarA represses the expression of two sRNAs in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Research*.
- [3] Dunman PM, Murphy E, Haney S, Palacios D, Tucker-Kallings G, Wu S, Brown EL, Zgursky RJ, Shales D, Projan SJ. 2001. Transcription Profiling-Based Identification of *Staphylococcus aureus* Genes Regulated by the *agr* and/or *sarA* Loci. *J. Bacteriol* 183:7341–7353.
- [4] Riffaud C, Pinel-Marie M-L, Pascreau G, Felden B. 2019. Functionality and cross-regulation of the four SprG/SprF type I toxin-antitoxin systems in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Research* 47:1740–1758.
- [5] Germain-Antioz N, Auguin Y, Camberlain E, Nicolas I, Lecœur V, Rouillon A, Felden B. 2019. A novel *Staphylococcus aureus* cis-trans type I toxin-antitoxin module with dual effects on bacteria and host cells. *Nucleic Acids Research* 47:1759–1773.

Conclusion

L'analyse combinée des données RNA-Seq et ChIP-Seq a permis d'identifier de nouveaux ARN régulateurs faisant partie du régulon SarA.

SarA : Régulateur des systèmes TA de type I renforçant son implication dans la virulence.
Régulations croisées entre les FT et les sARN pour contrôler les systèmes TA.

Perspectives

➢ Corréler les cibles de SarA avec des rôles physiologiques (formation de biofilm, résistance aux antibiotiques)

➢ Impact sur l'expression de la toxine, liée à une régulation par SarA ?

Bibliographie

- Allard, M., Moisan, H., Brouillette, É., Gervais, A.L., Jacques, M., Lacasse, P., Diarra, M.S., Malouin, F., 2006. Transcriptional modulation of some *Staphylococcus aureus* iron-regulated genes during growth in vitro and in a tissue cage model in vivo. *Microbes Infect.* 8, 1679–1690. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.01.022>
- Alonzo, F., Torres, V.J., 2014. The Bicomponent Pore-Forming Leucocidins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78, 199–230. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00055-13>
- Amitai, S., Kolodkin-Gal, I., Hananya-Meltabashi, M., Sacher, A., Engelberg-Kulka, H., 2009. *Escherichia coli* MazF Leads to the Simultaneous Selective Synthesis of Both “Death Proteins” and “Survival Proteins.” *PLOS Genet.* 5, e1000390. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000390>
- Anderson, K.L., Roberts, C., Disz, T., Vonstein, V., Hwang, K., Overbeek, R., Olson, P.D., Projan, S.J., Dunman, P.M., 2006. Characterization of the *Staphylococcus aureus* Heat Shock, Cold Shock, Stringent, and SOS Responses and Their Effects on Log-Phase mRNA Turnover. *J. Bacteriol.* 188, 6739–6756. <https://doi.org/10.1128/JB.00609-06>
- Andrey, D.O., Jousselin, A., Villanueva, M., Renzoni, A., Monod, A., Barras, C., Rodriguez, N., Kelley, W.L., 2015. Impact of the Regulators SigB, Rot, SarA and sarS on the Toxic Shock Tst Promoter and TSST-1 Expression in *Staphylococcus aureus*. *PLOS ONE* 10, e0135579. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135579>
- Andrey, D.O., Renzoni, A., Monod, A., Lew, D.P., Cheung, A.L., Kelley, W.L., 2010. Control of the *Staphylococcus aureus* Toxic Shock tst Promoter by the Global Regulator SarA. *J. Bacteriol.* 192, 6077–6085. <https://doi.org/10.1128/JB.00146-10>
- Antunes, D., Jorge, N.A.N., Caffarena, E.R., Passetti, F., 2018. Using RNA Sequence and Structure for the Prediction of Riboswitch Aptamer: A Comprehensive Review of Available Software and Tools. *Front. Genet.* 8.
- Arciola, C.R., Campoccia, D., Ravaioli, S., Montanaro, L., 2015. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5, 7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00007>
- Arya, R., Ravikumar, R., Santhosh, R.S., Princy, S.A., 2015. SarA based novel therapeutic candidate against *Staphylococcus aureus* associated with vascular graft infections. *Front. Microbiol.* 6, 416. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00416>
- Augagneur, Y., King, A.N., Germain-Amiot, N., Sassi, M., Fitzgerald, J.W., Sahukhal, G.S., Elasri, M.O., Felden, B., Brinsmade, S.R., 2020. Analysis of the CodY RNome reveals RsaD as a stress-responsive riboregulator of overflow metabolism in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 113, 309–325. <https://doi.org/10.1111/mmi.14418>
- Bæk, K.T., Frees, D., Renzoni, A., Barras, C., Rodriguez, N., Manzano, C., Kelley, W.L., 2013. Genetic Variation in the *Staphylococcus aureus* 8325 Strain Lineage Revealed by Whole-Genome Sequencing. *PLOS ONE* 8, e77122. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077122>
- Balázsi, G., Barabási, A.-L., Oltvai, Z.N., 2005. Topological units of environmental signal processing in the transcriptional regulatory network of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 7841–7846. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500365102>
- Ballal, A., Manna, A.C., 2010. Control of Thioredoxin Reductase Gene (*trxB*) Transcription by SarA in *Staphylococcus aureus*. *J BACTERIOL* 192, 10. <https://doi.org/10.1128/JB.01202-09>
- Ballal, Anand, Manna, A.C., 2009. Expression of the sarA family of genes in different strains of *Staphylococcus aureus* 11.
- Ballal, A., Manna, A.C., 2009. Regulation of Superoxide Dismutase (*sod*) Genes by SarA in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 191, 3301–3310. <https://doi.org/10.1128/JB.01496-08>
- Ballal, A., Ray, B., Manna, A.C., 2009. sarZ, a sarA Family Gene, Is Transcriptionally Activated by MgrA and Is Involved in the Regulation of Genes Encoding Exoproteins in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* <https://doi.org/10.1128/JB.01555-08>
- Barquist, L., Vogel, J., 2015. Accelerating Discovery and Functional Analysis of Small RNAs with New Technologies. *Annu. Rev. Genet.* 49, 367–394. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-112414-054804>
- Bastock, R.A., Marino, E.C., Wiemels, R.E., Holzschu, D.L., Keogh, R.A., Zapf, R.L., Murphy, E.R., Carroll, R.K., 2021. *Staphylococcus aureus* Responds to Physiologically Relevant Temperature Changes by Altering Its Global Transcript and Protein Profile. *mSphere*. <https://doi.org/10.1128/mSphere.01303-20>
- Beaume, M., Hernandez, D., Farinelli, L., Deluen, C., Linder, P., Gaspin, C., Romby, P., Schrenzel, J., Francois, P., 2010. Cartography of Methicillin-Resistant *S. aureus* Transcripts: Detection,

- Orientation and Temporal Expression during Growth Phase and Stress Conditions. *PLoS ONE* 5, e10725. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010725>
- Beenken, K.E., 2004. Global Gene Expression in *Staphylococcus aureus* Biofilms [WWW Document]. <https://doi.org/10.1128/JB.186.14.4665-4684.2004>
- Beenken, K.E., Blevins, J.S., Smeltzer, M.S., 2003. Mutation of *sarA* in *Staphylococcus aureus* Limits Biofilm Formation. *Infect. Immun.* 71, 4206–4211. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.7.4206-4211.2003>
- Benson, M.A., Lilo, S., Wasserman, G.A., Thoendel, M., Smith, A., Horswill, A.R., Fraser, J., Novick, R.P., Shopsin, B., Torres, V.J., 2011. *Staphylococcus aureus* regulates the expression and production of the staphylococcal superantigen-like secreted proteins in a Rot-dependent manner. *Mol. Microbiol.* 81, 659–675. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07720.x>
- Bischoff, M., 2004. Microarray-Based Analysis of the *Staphylococcus aureus* σ B Regulon [WWW Document]. <https://doi.org/10.1128/JB.186.13.4085-4099.2004>
- Bischoff, M., Wonnenberg, B., Nippe, N., Nyffenegger-Jann, N., Voss, M., Beisswenger, C., Sunderkötter, C., Molle, V., Dinh, Q.T., Lammert, F., Bals, R., Herrmann, M., Somerville, G.A., Tschernig, T., Gaupp, R., 2017. Frontiers | CcpA Affects Infectivity of *Staphylococcus aureus* in a Hyperglycemic Environment | Cellular and Infection Microbiology [WWW Document]. URL <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2017.00172/full> (accessed 12.28.21).
- Blevins, J.S., 2002. Strain-Dependent Differences in the Regulatory Roles of *sarA* and *agr* in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 70, 470–480. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.2.470-480.2002>
- Blevins, J.S., Elasri, M.O., Allmendinger, S.D., Beenken, K.E., Skinner, R.A., Thomas, J.R., Smeltzer, M.S., 2003. Role of *sarA* in the Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Musculoskeletal Infection. *Infect. Immun.* 71, 516–523. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.1.516-523.2003>
- Boakes, E., Kearns, A.M., Ganner, M., Perry, C., Hill, R.L., Ellington, M.J., 2011. Distinct Bacteriophages Encoding Pantan-Valentine Leukocidin (PVL) among International Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones Harboring PVL. *J. Clin. Microbiol.* <https://doi.org/10.1128/JCM.01917-10>
- Bohn, C., Rigoulay, C., Bouloc, P., 2007. No detectable effect of RNA-binding protein Hfq absence in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* 7, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-10>
- 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., Bouloc, P., 2010. Experimental discovery of small RNAs in *Staphylococcus aureus* reveals a riboregulator of central metabolism. *Nucleic Acids Res.* 38, 6620–6636. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq462>
- Boisset, S., Geissmann, T., Huntzinger, E., Fechter, P., Bendridi, N., Possedko, M., Chevalier, C., Helfer, A.C., Benito, Y., Jacquier, A., Gaspin, C., Vandenesch, F., 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. <https://doi.org/10.1101/gad.423507>
- Boles, B.R., Horswill, A.R., 2008. *agr*-Mediated Dispersal of *Staphylococcus aureus* Biofilms. *PLOS Pathog.* 4, e1000052. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000052>
- Bonelli, R.R., Schneider, T., Sahl, H.-G., Wiedemann, I., 2006. Insights into In Vivo Activities of Lantibiotics from Gallidermin and Epidermin Mode-of-Action Studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 1449–1457. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.4.1449-1457.2006>
- Bonilla, C.Y., 2020. Generally Stressed Out Bacteria: Environmental Stress Response Mechanisms in Gram-Positive Bacteria. *Integr. Comp. Biol.* 60, 126–133. <https://doi.org/10.1093/icb/icaa002>
- Boyle-Vavra, S., 2013. *VraT/YvqF* Is Required for Methicillin Resistance and Activation of the *VraSR* Regulon in *Staphylococcus aureus* [WWW Document]. <https://doi.org/10.1128/AAC.01651-12>
- Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O., Balaban, N.Q., 2016. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 320–330. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.34>
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., Zychlinsky, A., 2004. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science.* <https://doi.org/10.1126/science.1092385>
- Brinsmade, S.R., 2017. CodY, a master integrator of metabolism and virulence in Gram-positive bacteria. *Curr. Genet.* 63, 417–425. <https://doi.org/10.1007/s00294-016-0656-5>
- 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., Caldelari, I., 2019. A multifaceted small RNA

- modulates gene expression upon glucose limitation in *Staphylococcus aureus*. *EMBO J.* e99363. <https://doi.org/10.15252/emj.201899363>
- Bronsard, J., Pascreau, G., Sassi, M., Mauro, T., Augagneur, Y., Felden, B., 2017. sRNA and cis-antisense sRNA identification in *Staphylococcus aureus* highlights an unusual sRNA gene cluster with one encoding a secreted peptide. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04786-3>
- Brötz, H., Josten, M., Wiedemann, I., Schneider, U., Götz, F., Bierbaum, G., Sahl, H.-G., 1998. Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Mol. Microbiol.* 30, 317–327. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01065.x>
- Brown, M.L., O'Hara, F.P., Close, N.M., Mera, R.M., Miller, L.A., Suaya, J.A., Amrine-Madsen, H., 2012. Prevalence and Sequence Variation of Panton-Valentine Leukocidin in Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Strains in the United States. *J. Clin. Microbiol.*
- Browning, D.F., Butala, M., Busby, S.J.W., 2019. Bacterial Transcription Factors: Regulation by Pick “N” Mix | Elsevier Enhanced Reader [WWW Document]. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.011>
- Brückner, R., 1997. Gene replacement in *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus xylosus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 151, 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10387.x>
- Brunskill, E.W., Bayles, K.W., 1996. Identification of LytSR-regulated genes from *Staphylococcus aureus* [WWW Document]. <https://doi.org/10.1128/jb.178.19.5810-5812.1996>
- Buchad, H., Nair, M., 2021. The small RNA SprX regulates the autolysin regulator WalR in *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Res.* 250, 126785. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126785>
- Bui, L.M.G., Conlon, B.P., Kidd, S.P., 2017. Antibiotic tolerance and the alternative lifestyles of *Staphylococcus aureus*. *Essays Biochem.* 61, 71–79. <https://doi.org/10.1042/EBC20160061>
- Bulock, L.L., 2021. Metabolic heterogeneity and the roles of CodY and CcpA in central metabolism and *S. aureus* biofilm formation. 95.
- Butrico, C.E., Cassat, J.E., 2020. Quorum Sensing and Toxin Production in *Staphylococcus aureus* Osteomyelitis: Pathogenesis and Paradox. *Toxins* 12, 516. <https://doi.org/10.3390/toxins12080516>
- Campbell, E.A., Westblade, L.F., Darst, S.A., 2008. Regulation of bacterial RNA polymerase σ factor activity: a structural perspective - ScienceDirect [WWW Document]. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527408000209> (accessed 12.29.21).
- Cao, S., Huseby, D.L., Brandis, G., Hughes, D., 2017. Alternative Evolutionary Pathways for Drug-Resistant Small Colony Variant Mutants in *Staphylococcus aureus*. *mBio* 8. <https://doi.org/10.1128/mBio.00358-17>
- Carroll, R.K., Weiss, A., Broach, W.H., Wiemels, R.E., Mogen, A.B., Rice, K.C., Shaw, L.N., 2016. Genome-wide Annotation, Identification, and Global Transcriptomic Analysis of Regulatory or Small RNA Gene Expression in *Staphylococcus aureus*. *mBio* 7. <https://doi.org/10.1128/mBio.01990-15>
- Carvalho, S.M., de Jong, A., Kloosterman, T.G., Kuipers, O.P., Saraiva, L.M., 2017. The *Staphylococcus aureus* α -Acetolactate Synthase ALS Confers Resistance to Nitrosative Stress. *Front. Microbiol.* 8, 1273. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01273>
- Cassat, J., Dunman, P.M., Murphy, E., Projan, S.J., Beenken, K.E., Palm, K.J., Yang, S.-J., Rice, K.C., Bayles, K.W., Smeltzer, M.S., 2006. Transcriptional profiling of a *Staphylococcus aureus* clinical isolate and its isogenic agr and sarA mutants reveals global differences in comparison to the laboratory strain RN6390. *Microbiology* 152, 3075–3090. <https://doi.org/10.1099/mic.0.29033-0>
- Cassat, J.E., Hammer, N.D., Campbell, J.P., Benson, M.A., Perrien, D.S., Mrak, L.N., Smeltzer, M.S., Torres, V.J., Skaar, E.P., 2013. A Secreted Bacterial Protease Tailors the *Staphylococcus aureus* Virulence Repertoire to Modulate Bone Remodeling during Osteomyelitis. *Cell Host Microbe* 13, 759–772. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.05.003>
- Cerca, N., Brooks, J.L., Jefferson, K.K., 2008. Regulation of the Intercellular Adhesin Locus Regulator (icaR) by SarA, σ B, and IcaR in *Staphylococcus aureus* [WWW Document]. <https://doi.org/10.1128/JB.00482-08>
- Cevost, J., Vaillant, C., Meyer, S., 2018. ThreaDNA: predicting DNA mechanics' contribution to sequence selectivity of proteins along whole genomes. *Bioinformatics* 34, 609–616. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx634>
- Chabelskaya, S., Bordeau, V., Felden, B., 2014. Dual RNA regulatory control of a *Staphylococcus aureus* virulence factor. *Nucleic Acids Res.* 42, 4847–4858. <https://doi.org/10.1093/nar/gku119>
- Chabelskaya, S., Gaillot, O., Felden, B., 2010. A *Staphylococcus aureus* Small RNA Is Required for Bacterial Virulence and Regulates the Expression of an Immune-Evasion Molecule. *PLOS Pathog.* 6, e1000927. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000927>

- Chan, P.F., Foster, S.J., 1998. Role of SarA in Virulence Determinant Production and Environmental Signal Transduction in *Staphylococcus aureus*. *J BACTERIOL* 180, 10.
- Charpentier, E., Anton, A.I., Barry, P., Alfonso, B., Fang, Y., Novick, R.P., 2004. Novel Cassette-Based Shuttle Vector System for Gram-Positive Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6076–6085. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.6076-6085.2004>
- Chatterjee, S., Chauvier, A., Dandpat, S.S., Artsimovitch, I., Walter, N.G., 2021. A translational riboswitch coordinates nascent transcription–translation coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2023426118>
- Cheung, A.L., Bayer, A.S., Zhang, G., Gresham, H., Xiong, Y.-Q., 2004. Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 40, 1–9. [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(03\)00309-2](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(03)00309-2)
- Cheung, A.L., Nishina, K.A., Trottonda, M.P., Tamber, S., 2008. The SarA protein family of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 355–361. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.10.032>
- Cheung, G.Y.C., Wang, R., Khan, B.A., Sturdevant, D.E., Otto, M., 2011. Role of the Accessory Gene Regulator agr in Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Pathogenesis. *Infect. Immun.* 79. <https://doi.org/10.1128/IAI.00046-11>
- Chien, Y., Cheung, A.L., 1998. Molecular Interactions between Two Global Regulators, sar and agr, in *Staphylococcus aureus* *. *J. Biol. Chem.* 273, 2645–2652. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.5.2645>
- Chien, Y., Manna, A.C., Projan, S.J., Cheung, A.L., 1999. SarA, a Global Regulator of Virulence Determinants in *Staphylococcus aureus*, Binds to a Conserved Motif Essential for sar -dependent Gene Regulation. *J. Biol. Chem.* 274, 37169–37176. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.52.37169>
- Choi, J.S., Kim, W., Suk, S., Park, H., Bak, G., Yoon, J., Lee, Y., 2018. The small RNA, SdsR, acts as a novel type of toxin in *Escherichia coli*. *RNA Biol.* 15, 1319–1335. <https://doi.org/10.1080/15476286.2018.1532252>
- Christner, M., Heinze, C., Busch, M., Franke, G., Hentschke, M., Bayard Dühning, S., Büttner, H., Kotasinska, M., Wischniewski, V., Kroll, G., Buck, F., Molin, S., Otto, M., Rohde, H., 2012. sarA negatively regulates *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by modulating expression of 1 MDa extracellular matrix binding protein and autolysis-dependent release of eDNA. *Mol. Microbiol.* 86, 394–410. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08203.x>
- Chunhua, M., Yu, L., Yaping, G., Jie, D., Qiang, L., Xiaorong, T., Guang, Y., 2012. The expression of LytM is down-regulated by RNAIII in *Staphylococcus aureus*. *J. Basic Microbiol.* 52, 636–641. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100426>
- Cordwell, S.J., Larsen, M.R., Cole, R.T., Walsh, B.J., 2002. Comparative proteomics of *Staphylococcus aureus* and the response of methicillin-resistant and methicillin-sensitive strains to Triton X-100 17.
- Costa, A.R., Batista, D.W.F., Ribas, R.M., Sousa, A.M., Pereira, O., Botelho, C.M., 2013. *Staphylococcus aureus* virulence factors and disease 9.
- Crosby, H.A., Schlievert, P.M., Merriman, J.A., King, J.M., Salgado-Pabón, W., Horswill, A.R., 2016. The *Staphylococcus aureus* Global Regulator MgrA Modulates Clumping and Virulence by Controlling Surface Protein Expression. *PLOS Pathog.* 12, e1005604. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005604>
- Crosby, H.A., Tiwari, N., Kwiecinski, J.M., Xu, Z., Dykstra, A., Jenul, C., Fuentes, E.J., Horswill, A.R., 2020. The *Staphylococcus aureus* ArIRS two-component system regulates virulence factor expression through MgrA. *Mol. Microbiol.* 113, 103–122. <https://doi.org/10.1111/mmi.14404>
- Cross, A.S., 2008. What is a virulence factor? *Crit. Care* 12, 196. <https://doi.org/10.1186/cc7127>
- Cue, D., Junecko, J.M., Lei, M.G., Blevins, J.S., Smeltzer, M.S., Lee, C.Y., 2015. SaeRS-Dependent Inhibition of Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus* Newman. *PLOS ONE* 10, e0123027. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123027>
- Dave, U.C., Kadeppagari, R.-K., 2019. Alanine dehydrogenase and its applications - A review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 39, 648–664. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1594153>
- Delauné, A., Dubrac, S., Blanchet, C., Poupel, O., Mäder, U., Hiron, A., Leduc, A., Fitting, C., Nicolas, P., Cavaillon, J.-M., Adib-Conquy, M., 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. <https://doi.org/10.1128/IAI.00195-12>
- Desgranges, E., Barrientos, L., Herrgott, L., Marzi, S., Toledo-Arana, A., Moreau, K., Vandenesch, F., Romby, P., Caldelari, I., 2021. The 3'UTR-derived sRNA RsaG coordinates redox homeostasis and metabolism adaptation in response to glucose-6-phosphate uptake in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* n/a. <https://doi.org/10.1111/mmi.14845>

- Desgranges, E., Caldelari, I., Marzi, S., Lalaouna, D., 2020. Navigation through the twists and turns of RNA sequencing technologies: Application to bacterial regulatory RNAs. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* 1863, 194506. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2020.194506>
- Deurenberg, R.H., Stobberingh, E.E., 2008. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Genet. Evol.* 8, 747–763. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.07.007>
- Didier, J.-P., Cozzone, A.J., Duclos, B., 2010. Phosphorylation of the virulence regulator SarA modulates its ability to bind DNA in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 306, 30–36. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01930.x>
- Donegan, N.P., Cheung, A.L., 2009. Regulation of the mazEF Toxin-Antitoxin Module in *Staphylococcus aureus* and Its Impact on sigB Expression [WWW Document]. <https://doi.org/10.1128/JB.01713-08>
- Draper, L.A., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P., 2015. Lantibiotic Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 79. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00051-14>
- Dubin, G., 2002. Extracellular Proteases of *Staphylococcus* spp. 383, 1075–1086. <https://doi.org/10.1515/BC.2002.116>
- Dubrac, S., Bisicchia, P., Devine, K.M., Msadek, T., 2008. A matter of life and death: cell wall homeostasis and the WalKR (YycGF) essential signal transduction pathway. *Mol. Microbiol.* 70, 1307–1322. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06483.x>
- Dubrac, S., Boneca, I.G., Poupel, O., 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. <https://doi.org/10.1128/JB.00645-07>
- Dubrac, S., Msadek, T., 2004. Identification of Genes Controlled by the Essential YycG/YycF Two-Component System of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 186, 1175–1181. <https://doi.org/10.1128/JB.186.4.1175-1181.2004>
- DuMont, A.L., Nygaard, T.K., Watkins, R.L., Smith, A., Kozhaya, L., Kreiswirth, B.N., Shopsin, B., Unutmaz, D., Voyich, J.M., Torres, V.J., 2011. Characterization of a new cytotoxin that contributes to *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 79, 814–825. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07490.x>
- DuMont, A.L., Yoong, P., Liu, X., Day, C.J., Chumbler, N.M., James, D.B.A., Alonzo, F., Bode, N.J., Lacy, D.B., Jennings, M.P., Torres, V.J., 2014. Identification of a crucial residue required for *Staphylococcus aureus* LukAB cytotoxicity and receptor recognition. *Infect. Immun.* 82, 1268–1276. <https://doi.org/10.1128/IAI.01444-13>
- Dunman, P.M., Murphy, E., Haney, S., Palacios, D., Tucker-Kellogg, G., Wu, S., Brown, E.L., Zagursky, R.J., Shlaes, D., 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. <https://doi.org/10.1128/JB.183.24.7341-7353.2001>
- Dunyach-Remy, C., Ngba Essebe, C., Sotto, A., Lavigne, J.-P., 2016. *Staphylococcus aureus* Toxins and Diabetic Foot Ulcers: Role in Pathogenesis and Interest in Diagnosis. *Toxins* 8, 209. <https://doi.org/10.3390/toxins8070209>
- Duraisamy, S., Balakrishnan, S., Ranjith, S., Husain, F., Sathyan, A., Peter, A.S., Prahalathan, C., Kumarasamy, A., 2020. Bacteriocin—a potential antimicrobial peptide towards disrupting and preventing biofilm formation in the clinical and environmental locales. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 44922–44936. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10989-5>
- Durand, S., Braun, F., Helfer, A.-C., Romby, P., Condon, C., 2017. sRNA-mediated activation of gene expression by inhibition of 5'-3' exonucleolytic mRNA degradation. *eLife* 6, e23602. <https://doi.org/10.7554/eLife.23602>
- Durand, S., Braun, F., Lioliou, E., Romilly, C., Helfer, A.-C., Kuhn, L., Quittot, N., Nicolas, P., Romby, P., Condon, C., 2015. A Nitric Oxide Regulated Small RNA Controls Expression of Genes Involved in Redox Homeostasis in *Bacillus subtilis*. *PLOS Genet.* 11, e1004957. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004957>
- Duthie, E.S., Lorenz, L.L.Y. 1952, 1952. Staphylococcal Coagulase: Mode of Action and Antigenicity. *Microbiology* 6, 95–107. <https://doi.org/10.1099/00221287-6-1-2-95>
- Edwards, J., Gehret, A., O'Handley, S., 2015. A Phosphoglycolate Phosphatase Virulence Factor from *Staphylococcus aureus*. *FASEB J.* 29, 721.11. https://doi.org/10.1096/fasebj.29.1_supplement.721.11

- Eggenhofer, F., Tafer, H., Stadler, P.F., Hofacker, I.L., 2011. RNAPredator: fast accessibility-based prediction of sRNA targets. *Nucleic Acids Res.* 39, W149–W154. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr467>
- Ehlert, K., Schröder, W., Labischinski, H., 1997. Specificities of FemA and FemB for different glycine residues: FemB cannot substitute for FemA in staphylococcal peptidoglycan pentaglycine side chain formation. *J. Bacteriol.* 179, 7573–7576. <https://doi.org/10.1128/jb.179.23.7573-7576.1997>
- Eyraud, A., Tattevin, P., Chabelskaya, S., Felden, B., 2014. A small RNA controls a protein regulator involved in antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res.* 42, 4892–4905. <https://doi.org/10.1093/nar/gku149>
- Fagerlund, A., Granum, P.E., Håvarstein, L.S., 2014. *Staphylococcus aureus* competence genes: mapping of the SigH, ComK1 and ComK2 regulons by transcriptome sequencing. *Mol. Microbiol.* 94, 557–579. <https://doi.org/10.1111/mmi.12767>
- Felden, B., Augagneur, Y., 2021. Diversity and Versatility in Small RNA-Mediated Regulation in Bacterial Pathogens. *Front. Microbiol.* 12, 2273. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.719977>
- Formosa-Dague, C., Feuillie, C., Beaussart, A., Derclaye, S., Kucharíková, S., Lasa, I., Van Dijck, P., Dufrêne, Y.F., 2016. Sticky Matrix: Adhesion Mechanism of the Staphylococcal Polysaccharide Intercellular Adhesin. *ACS Nano* 10, 3443–3452. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.5b07515>
- Foster, T.J., 2005. Immune evasion by staphylococci. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 948–958. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1289>
- Fozo, E.M., Makarova, K.S., Shabalina, S.A., Yutin, N., Koonin, E.V., 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. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq054>
- Frees, D., Brøndsted, L., Ingmer, H., 2013. Bacterial Proteases and Virulence, in: Dougan, D.A. (Ed.), *Regulated Proteolysis in Microorganisms, Subcellular Biochemistry*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 161–192. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5940-4_7
- Frith, M.C., Saunders, N.F.W., Kobe, B., Bailey, T.L., 2008. Discovering Sequence Motifs with Arbitrary Insertions and Deletions. *PLOS Comput. Biol.* 4, e1000071. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000071>
- Fuchs, S., Mehlan, H., Bernhardt, J., Hennig, A., Michalik, S., Surmann, K., Pané-Farré, J., Giese, A., Weiss, S., Backert, L., Herbig, A., Nieselt, K., Hecker, M., Völker, U., Mäder, U., 2018. AureoWiki-The repository of the *Staphylococcus aureus* research and annotation community. *Int. J. Med. Microbiol., Infections by Gram-positive pathobionts Staphylococcus aureus and Streptococcus pneumoniae – from colonization to invasive infections* 308, 558–568. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.11.011>
- Fuchs, S., Pané-Farré, J., Kohler, C., Hecker, M., Engelmann, S., 2007. Anaerobic Gene Expression in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 189, 4275–4289. <https://doi.org/10.1128/JB.00081-07>
- Fung, D.K., Barra, J.T., Schroeder, J.W., Ying, D., Wang, J.D., 2020. A shared alarmone-GTP switch underlies triggered and spontaneous persistence. <https://doi.org/10.1101/2020.03.22.002139>
- Gao, W., Cameron, D.R., Davies, J.K., Kostoulias, X., Stepnell, J., Tuck, K.L., Yeaman, M.R., Peleg, A.Y., Stinear, T.P., Howden, B.P., 2013. The RpoB H481Y Rifampicin Resistance Mutation and an Active Stringent Response Reduce Virulence and Increase Resistance to Innate Immune Responses in *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* 207, 929–939. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis772>
- Gaskill, M.E., Khan, S.A., 1988. Regulation of the enterotoxin B gene in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 263, 6276–6280. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)68782-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)68782-4)
- Geiger, T., Francois, P., Liebeke, M., Fraunholz, M., Goerke, C., Krismer, B., Schrenzel, J., Lalk, M., Wolz, C., 2012. The Stringent Response of *Staphylococcus aureus* and Its Impact on Survival after Phagocytosis through the Induction of Intracellular PSMs Expression. *PLoS Pathog.* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003016>
- Geiger, T., Goerke, C., Mainiero, M., Kraus, D., Wolz, C., 2008. The Virulence Regulator Sae of *Staphylococcus aureus*: Promoter Activities and Response to Phagocytosis-Related Signals. *J. Bacteriol.* <https://doi.org/10.1128/JB.01927-07>
- Geiger, T., Wolz, C., 2014. Intersection of the stringent response and the CodY regulon in low GC Gram-positive bacteria. *Int. J. Med. Microbiol., Pathophysiology of Staphylococci in the Post-Genomic Era* 304, 150–155. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.11.013>
- Geissmann, T., Chevalier, C., Cros, M.-J., Boisset, S., Fechter, P., Noirot, C., Schrenzel, J., François, P., Vandenesch, F., Gaspin, C., Romby, P., 2009. A search for small noncoding RNAs in *Staphylococcus aureus* reveals a conserved sequence motif for regulation. *Nucleic Acids Res.* 37, 7239–7257. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp668>

- Georg, J., Lalaouna, D., Hou, S., Lott, S.C., Caldelari, I., Marzi, S., Hess, W.R., Romby, P., 2020. The power of cooperation: Experimental and computational approaches in the functional characterization of bacterial sRNAs. *Mol. Microbiol.* n/a. <https://doi.org/10.1111/mmi.14420>
- Germain-Amiot, N., Augagneur, Y., Camberlein, E., Nicolas, I., Lecureur, V., Rouillon, A., Felden, B., 2019. A novel *Staphylococcus aureus* cis–trans type I toxin–antitoxin module with dual effects on bacteria and host cells. *Nucleic Acids Res.* 47, 1759–1773. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1257>
- Giner-Lamia, J., Hernández-Prieto, M.A., Futschik, M.E., 2018. ChIP-seq Experiment and Data Analysis in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Bio-Protoc.* 8, e2895. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2895>
- Giraud, A.T., Cheung, A.L., Nagel, R., 1997. The *sae* locus of *Staphylococcus aureus* controls exoprotein synthesis at the transcriptional level. *Arch. Microbiol.* 168, 53–58. <https://doi.org/10.1007/s002030050469>
- Giudice, P., 2020. Skin Infections Caused by *Staphylococcus aureus*. *Acta Derm. Venereol.* 100, adv00110-215. <https://doi.org/10.2340/00015555-3466>
- Goldberger, O., Livny, J., Bhattacharyya, R., Amster-Choder, O., 2021. Wisdom of the crowds: A suggested polygenic plan for small-RNA-mediated regulation in bacteria | Elsevier Enhanced Reader. *iScience* 24. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103096>
- Gonzalez, D.J., Okumura, C.Y., Hollands, A., Kersten, R., Akong-Moore, K., Pence, M.A., Malone, C.L., Derieux, J., Moore, B.S., Horswill, A.R., Dixon, J.E., Dorrestein, P.C., Nizet, V., 2012. Novel Phenol-soluble Modulins in Community-associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Identified through Imaging Mass Spectrometry *. *J. Biol. Chem.* 287, 13889–13898. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.349860>
- Groma, M., Horst, S.A., Das, S., Huettel, B., Klepsch, M., Rudel, T., Medina, E., Fraunholz, M., 2020. Identification of a Novel LysR-Type Transcriptional Regulator in *Staphylococcus aureus* That Is Crucial for Secondary Tissue Colonization during Metastatic Bloodstream Infection. *mBio* 11, e01646-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.01646-20>
- Gupta, R.K., Luong, T.T., Lee, C.Y., 2015. RNAIII of the *Staphylococcus aureus* agr system activates global regulator MgrA by stabilizing mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 14036–14041. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509251112>
- Gupta, R.K., Alba, J., Xiong, Y.Q., Bayer, A.S., Lee, C.Y., 2013. MgrA Activates Expression of Capsule Genes, but Not the α -Toxin Gene in Experimental *Staphylococcus aureus* Endocarditis. *J. Infect. Dis.* 208, 1841–1848. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit367>
- Haag, A.F., Bagnoli, F., 2015. The Role of Two-Component Signal Transduction Systems in *Staphylococcus aureus* Virulence Regulation, in: Bagnoli, F., Rappuoli, R., Grandi, G. (Eds.), *Staphylococcus Aureus, Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 145–198. https://doi.org/10.1007/82_2015_5019
- Han, A., Kang, H.-R., Son, J., Kwon, D.H., Kim, S., Lee, W.C., Song, H.K., Song, M.J., Hwang, K.Y., 2016. The structure of the pleiotropic transcription regulator CodY provides insight into its GTP-sensing mechanism. *Nucleic Acids Res.* 44, 9483–9493. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw775>
- Harms, A., Maisonneuve, E., Gerdes, K., 2016. Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.aaf4268>
- Herbert, S., Ziebandt, A.-K., Ohlsen, K., Schäfer, T., Hecker, M., Albrecht, D., Novick, R., Götz, F., 2010. Repair of Global Regulators in *Staphylococcus aureus* 8325 and Comparative Analysis with Other Clinical Isolates. *Infect. Immun.* 78, 2877–2889. <https://doi.org/10.1128/IAI.00088-10>
- Homerová, D., Surdová, K., Kormanec, J., 2004. Optimization of a two-plasmid system for the identification of promoters recognized by RNA polymerase containing *Mycobacterium tuberculosis* stress response σ factor, σ F. *Folia Microbiol. (Praha)* 49, 685–691. <https://doi.org/10.1007/BF02931550>
- Houston, P., Rowe, S.E., Pozzi, C., Waters, E.M., 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. <https://doi.org/10.1128/IAI.00364-10>
- Huntzinger, E., Boisset, S., Saveanu, C., Geissmann, T., Namane, A., Lina, G., Etienne, J., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Jacquier, A., Vandenesch, F., Romby, P., 2005. *Staphylococcus aureus* RNAIII and the endoribonuclease III coordinately regulate *spa* gene expression. *EMBO J.* 24, 824–835. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600572>
- Hussein, H., Fris, M.E., Salem, A.H., Wiemels, R.E., Bastock, R.A., Righetti, F., Burke, C.A., Narberhaus, F., Carroll, R.K., Hassan, N.S., Mohamed, S.A., Fahmy, A.S., Murphy, E.R., 2019. An

- unconventional RNA-based thermosensor within the 5' UTR of *Staphylococcus aureus* cidA. PLOS ONE 14, e0214521. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214521>
- Ingavale, S., van Wamel, W., Luong, T.T., Lee, C.Y., Cheung, A.L., 2005. Rat/MgrA, a Regulator of Autolysis, Is a Regulator of Virulence Genes in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 73, 1423–1431. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.3.1423-1431.2005>
- Jansen, A., Türck, M., Szekat, C., Nagel, M., Clever, I., Bierbaum, G., 2007. Role of insertion elements and yycFG in the development of decreased susceptibility to vancomycin in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* 297, 205–215. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.02.002>
- Jarick, M., Bertsche, U., Stahl, M., Schultz, D., Methling, K., Lalk, M., Stigloher, C., Steger, M., Schlosser, A., Ohlsen, K., 2018. The serine/threonine kinase Stk and the phosphatase Stp regulate cell wall synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Sci. Rep.* 8, 13693. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32109-7>
- Jenul, C., Horswill, A.R., 2019. Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence, in: Fischetti, V.A., Novick, R.P., Ferretti, J.J., Portnoy, D.A., Braunstein, M., Rood, J.I. (Eds.), *Gram-Positive Pathogens*. ASM Press, Washington, DC, USA, pp. 669–686. <https://doi.org/10.1128/9781683670131.ch41>
- Jeong, J.-Y., Yim, H.-S., Ryu, J.-Y., Lee, H.S., Lee, J.-H., Seen, D.-S., Kang, S.G., 2012. One-Step Sequence- and Ligation-Independent Cloning as a Rapid and Versatile Cloning Method for Functional Genomics Studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5440–5443. <https://doi.org/10.1128/AEM.00844-12>
- Jin, Z., Jiang, Q., Fang, B., Sun, B., 2019. The ArlR-MgrA regulatory cascade regulates PIA-dependent and protein-mediated biofilm formation in Rbf-dependent and Rbf-independent pathways. *Int. J. Med. Microbiol.* 309, 85–96. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.12.006>
- Johns, B.E., Purdy, K.J., Tucker, N.P., Maddocks, S.E., 2015. Phenotypic and Genotypic Characteristics of Small Colony Variants and Their Role in Chronic Infection. *Microbiol. Insights* 8, MBI.S25800. <https://doi.org/10.4137/MBI.S25800>
- Jones, C.J., Newsom, D., Kelly, B., Irie, Y., Jennings, L.K., Xu, B., Limoli, D.H., Harrison, J.J., Parsek, M.R., White, P., Wozniak, D.J., 2014. ChIP-Seq and RNA-Seq Reveal an AmrZ-Mediated Mechanism for Cyclic di-GMP Synthesis and Biofilm Development by *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog.* 10, e1003984. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003984>
- Junecko, J.M., 2012. Transcribing virulence in *Staphylococcus aureus*. *World J. Clin. Infect. Dis.* 2, 63. <https://doi.org/10.5495/wjcid.v2.i4.63>
- Jurénas, D., Fraikin, N., Goormaghtigh, F., Van Melderen, L., 2022. Biology and evolution of bacterial toxin–antitoxin systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 20, 335–350. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00661-1>
- Kahl, B.C., Becker, K., Löffler, B., 2016. Clinical Significance and Pathogenesis of Staphylococcal Small Colony Variants in Persistent Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 29, 401–427. <https://doi.org/10.1128/CMR.00069-15>
- Kaiser, J.C., King, A.N., Grigg, J.C., Sheldon, J.R., Edgell, D.R., Murphy, M.E.P., Brinsmade, S.R., Heinrichs, D.E., 2018. Repression of branched-chain amino acid synthesis in *Staphylococcus aureus* is mediated by isoleucine via CodY, and by a leucine-rich attenuator peptide. *PLOS Genet.* 14, e1007159. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007159>
- Kaiser, J.C., Sen, S., Sinha, A., Wilkinson, B.J., Heinrichs, D.E., 2016. The role of two branched-chain amino acid transporters in *Staphylococcus aureus* growth, membrane fatty acid composition and virulence. *Mol. Microbiol.* 102, 850–864. <https://doi.org/10.1111/mmi.13495>
- Kaito, C., Saito, Y., Nagano, G., Ikuo, M., Omae, Y., Hanada, Y., Han, X., Kuwahara-Arai, K., Hishinuma, T., Baba, T., Ito, T., Hiramatsu, K., Sekimizu, K., 2011. Transcription and Translation Products of the Cytolysin Gene psm-mec on the Mobile Genetic Element SCCmec Regulate *Staphylococcus aureus* Virulence. *PLOS Pathog.* 7, e1001267. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001267>
- Karlsson, A., Saravia-Otten, P., Tegmark, K., Morfeldt, E., Arvidson, S., 2001. Decreased Amounts of Cell Wall-Associated Protein A and Fibronectin-Binding Proteins in *Staphylococcus aureus* sarA Mutants due to Up-Regulation of Extracellular Proteases | *Infection and Immunity* [WWW Document]. URL <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/IAI.69.8.4742-4748.2001> (accessed 1.12.22).
- Kathirvel, M., Buchad, H., Nair, M., 2016. Enhancement of the pathogenicity of *Staphylococcus aureus* strain Newman by a small noncoding RNA SprX1. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 205, 563–574. <https://doi.org/10.1007/s00430-016-0467-9>

- Keinhörster, D., Salzer, A., Duque-Jaramillo, A., George, S.E., Marincola, G., Lee, J.C., Weidenmaier, C., Wolz, C., 2019. Revisiting the regulation of the capsular polysaccharide biosynthesis gene cluster in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 112, 1083–1099. <https://doi.org/10.1111/mmi.14347>
- Kery, M.B., Feldman, M., Livny, J., Tjaden, B., 2014. TargetRNA2: identifying targets of small regulatory RNAs in bacteria. *Nucleic Acids Res.* 42, W124–W129. <https://doi.org/10.1093/nar/gku317>
- Kiedrowski, M.R., Kavanaugh, J.S., Malone, C.L., Mootz, J.M., Voyich, J.M., Smeltzer, M.S., Bayles, K.W., Horswill, A.R., 2011. Nuclease Modulates Biofilm Formation in Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* 6, e26714. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026714>
- Kim, B.-R., Bae, Y.-M., Lee, S.-Y., 2016. Effect of Environmental Conditions on Biofilm Formation and Related Characteristics of *Staphylococcus Aureus*: BIOFILM FORMATION OF *S. AUREUS*. *J. Food Saf.* 36, 412–422. <https://doi.org/10.1111/jfs.12263>
- King, A.N., de Mets, F., Brinsmade, S.R., 2020. Who’s in control? Regulation of metabolism and pathogenesis in space and time. *Curr. Opin. Microbiol.* S1369527420300680. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.05.009>
- Kinkel, T.L., Roux, C.M., Dunman, P.M., Fang, F.C., 2013. The *Staphylococcus aureus* SrrAB Two-Component System Promotes Resistance to Nitrosative Stress and Hypoxia. *mBio.* <https://doi.org/10.1128/mBio.00696-13>
- Kittinger, C., Toplitsch, D., Folli, B., Masoud Landgraf, L., Zarfel, G., 2019. Phenotypic Stability of *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCV) Isolates from Cystic Fibrosis (CF) Patients. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 16, 1940. <https://doi.org/10.3390/ijerph16111940>
- Kloos, W.E., Bannerman, T.L., 1994. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* <https://doi.org/10.1128/CMR.7.1.117>
- Kobayashi, S.D., DeLeo, F.R., 2013. *Staphylococcus aureus* Protein A Promotes Immune Suppression. *mBio* 4. <https://doi.org/10.1128/mBio.00764-13>
- Kolodkin-Gal, I., Hazan, R., Gaathon, A., Carmeli, S., Engelberg-Kulka, H., 2007. A Linear Pentapeptide Is a Quorum-Sensing Factor Required for mazEF-Mediated Cell Death in *Escherichia coli*. *Science.* <https://doi.org/10.1126/science.1147248>
- Kreuzer, K.D., Henkin, T.M., 2018. The T-Box Riboswitch: tRNA as an Effector to Modulate Gene Regulation. *Microbiol. Spectr.* <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.RWR-0028-2018>
- Krismer, B., Liebeke, M., Janek, D., Nega, M., Rautenberg, M., Hornig, G., Unger, C., Weidenmaier, C., Lalk, M., Peschel, A., 2014. Nutrient Limitation Governs *Staphylococcus aureus* Metabolism and Niche Adaptation in the Human Nose. *PLOS Pathog.* 10, e1003862. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003862>
- Kundra, S., Colomer-Winter, C., Lemos, J.A., 2020. Survival of the Fittest: The Relationship of (p)ppGpp With Bacterial Virulence. *Front. Microbiol.* 11.
- Kuroda, H., Kuroda, M., Cui, L., Hiramatsu, K., 2007. Subinhibitory concentrations of β -lactam induce haemolytic activity in *Staphylococcus aureus* through the SaeRS two-component system. *FEMS Microbiol. Lett.* 268, 98–105. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00568.x>
- Lalaouna, D., Baude, J., Wu, Z., Tomasini, A., Chicher, J., Marzi, S., Vandenesch, F., Romby, P., Caldelari, I., Moreau, K., 2019. RsaC sRNA modulates the oxidative stress response of *Staphylococcus aureus* during manganese starvation. *Nucleic Acids Res.* gkz728. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz728>
- Lam, K.H.E., Chow, K.C., Wong, W.K.R., 1998. Construction of an efficient *Bacillus subtilis* system for extracellular production of heterologous proteins. *J. Biotechnol.* 63, 167–177. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(98\)00041-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(98)00041-8)
- Lamichhane-Khadka, R., Cantore, S.A., Riordan, J.T., Delgado, A., Norman, A.E.A., Dueñas, S., Zaman, S., Horan, S., Wilkinson, B.J., Gustafson, J.E., 2009. sarA inactivation reduces vancomycin-intermediate and ciprofloxacin resistance expression by *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 34, 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.01.018>
- Langlois, J.-P., 2019. ÉTUDE DE LA SYNERGIE ENTRE LA TOMATIDINE ET LES AMINOSIDES ENVERS STAPHYLOCOCCUS AUREUS ET MÉCANISMES DE RÉSISTANCE.
- Le, K.Y., Dastgheyb, S., Ho, T.V., Otto, M., 2014. Molecular determinants of staphylococcal biofilm dispersal and structuring. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4, 167. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00167>
- Le Lam, T.N., Morvan, C., Liu, W., Bohn, C., Jaszczyszyn, Y., Bouloc, P., 2017. Finding sRNA-associated phenotypes by competition assays: An example with *Staphylococcus aureus* | Elsevier Enhanced Reader [WWW Document]. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.11.018>

- Le Loir, Y., Gautier, M., Pellerin, J.-L., 2010. Taxonomie et habitat, in: *Staphylococcus Aureus*, Monographies de Microbiologie. Editions Tec & Doc Lavoisier, p. 283 p.
- Le Huyen, K.B., Gonzalez, C.D., Pascreau, G., Bordeau, V., Cattoir, V., Liu, W., Bouloc, P., Felden, B., Chabelskaya, S., 2021. A small regulatory RNA alters *Staphylococcus aureus* virulence by titrating RNAIII activity. *Nucleic Acids Res.* gkab782. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab782>
- Lei, M.G., Lee, C.Y., 2020. MgrA Activates Staphylococcal Capsule via SigA-Dependent Promoter [WWW Document]. <https://doi.org/10.1128/JB.00495-20>
- Lei, T., Yang, J., Ji, Y., 2015. Determination of essentiality and regulatory function of staphylococcal YeaZ in branched-chain amino acid biosynthesis. *Virulence* 6, 75–84. <https://doi.org/10.4161/21505594.2014.986415>
- Lei, T., Yang, J., Zheng, L., Markowski, T., Witthuhn, B.A., Ji, Y., 2012. The Essentiality of Staphylococcal Gcp Is Independent of Its Repression of Branched-Chain Amino Acids Biosynthesis. *PLOS ONE* 7, e46836. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046836>
- Leiba, J., Hartmann, T., Cluzel, M.-E., Cohen-Gonsaud, M., Delolme, F., Bischoff, M., Molle, V., 2012. A Novel Mode of Regulation of the *Staphylococcus aureus* Catabolite Control Protein A (CcpA) Mediated by Stk1 Protein Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 287, 43607–43619. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.418913>
- Le Pabic, H., Germain-Amiot, N., Bordeau, V., Felden, B., 2015. A bacterial regulatory RNA attenuates virulence, spread and human host cell phagocytosis. *Nucleic Acids Res.* 43, 9232–9248. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv783>
- Levdikov, V.M., Blagova, E., Joseph, P., Sonenshein, A.L., Wilkinson, A.J., 2006. The Structure of CodY, a GTP- and Isoleucine-responsive Regulator of Stationary Phase and Virulence in Gram-positive Bacteria. *J. Biol. Chem.* 281, 11366–11373. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513015200>
- Li, L., Cheung, A., Bayer, A.S., Chen, L., Abdelhady, W., Kreiswirth, B.N., Yeaman, M.R., Xiong, Y.Q., 2016. The Global Regulon sarA Regulates β -Lactam Antibiotic Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* In Vitro and in Endovascular Infections. *J. Infect. Dis.* 214, 1421–1429. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw386>
- Li, L., Wang, G., Cheung, A., Abdelhady, W., Seidl, K., Xiong, Y.Q., 2019. MgrA Governs Adherence, Host Cell Interaction, and Virulence in a Murine Model of Bacteremia Due to *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* 220, 1019–1028. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz219>
- Liang, X., Yu, C., Sun, J., Liu, H., Landwehr, C., Holmes, D., Ji, Y., 2006. Inactivation of a Two-Component Signal Transduction System, SaeRS, Eliminates Adherence and Attenuates Virulence of *Staphylococcus aureus* | Infection and Immunity. *Infect. Immun.* 74.
- Liang, X., Zheng, L., Landwehr, C., Lunsford, D., Holmes, D., 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. <https://doi.org/10.1128/JB.187.15.5486-5492.2005>
- Lin, M.H., Shu, J.C., Lin, L.P., Chong, K. yu, Cheng, Y.W., Du, J.F., Liu, S.-T., 2015. Elucidating the Crucial Role of Poly N-Acetylglucosamine from *Staphylococcus aureus* in Cellular Adhesion and Pathogenesis. *PLOS ONE* 10, e0124216. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124216>
- Liu, W., Rochat, T., Toffano-Nioche, C., Le Lam, T.N., Bouloc, P., Morvan, C., 2018. Assessment of Bona Fide sRNAs in *Staphylococcus aureus*. *Front. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00228>
- Liu, Y., Breukink, E., 2016. The Membrane Steps of Bacterial Cell Wall Synthesis as Antibiotic Targets. *Antibiotics* 5, 28. <https://doi.org/10.3390/antibiotics5030028>
- Loh, E., Dussurget, O., Gripenland, J., Vaitkevicius, K., Tiensuu, T., Mandin, P., Repoila, F., Buchrieser, C., Cossart, P., Johansson, J., 2009. A trans-Acting Riboswitch Controls Expression of the Virulence Regulator PrfA in *Listeria monocytogenes*. *Cell* 139, 770–779. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.046>
- Luong, T.T., Dunman, P.M., Murphy, E., Projan, S.J., Lee, C.Y., 2006. Transcription Profiling of the mgrA Regulon in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 188, 1899–1910. <https://doi.org/10.1128/JB.188.5.1899-1910.2006>
- Majerczyk, C.D., Dunman, P.M., Luong, T.T., Lee, C.Y., Sadykov, M.R., Somerville, G.A., Bodi, K., Sonenshein, A.L., 2010. Direct Targets of CodY in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 192, 2861–2877. <https://doi.org/10.1128/JB.00220-10>
- Mandal, M., Breaker, R.R., 2004. Gene regulation by riboswitches. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 451–463. <https://doi.org/10.1038/nrm1403>

- Mann, E.E., Rice, K.C., Boles, B.R., Endres, J.L., Ranjit, D., Chandramohan, L., Tsang, L.H., Smeltzer, M.S., Horswill, A.R., Bayles, K.W., 2009. Modulation of eDNA Release and Degradation Affects *Staphylococcus aureus* Biofilm Maturation. *PLoS ONE* 4, e5822. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005822>
- Manna, A.C., Ingavale, S.S., Maloney, M., van Wamel, W., 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. <https://doi.org/10.1128/JB.186.16.5267-5280.2004>
- Manna, A.C., Kim, S., Cengher, L., Corvaglia, A., Leo, S., Francois, P., Cheung, A.L., 2017. Small RNA teg49 Is Derived from a *sarA* Transcript and Regulates Virulence Genes Independent of SarA in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 86. <https://doi.org/10.1128/IAI.00635-17>
- Marchais, A., Naville, M., Bohn, C., Bouloc, P., Gautheret, D., 2009. Single-pass classification of all noncoding sequences in a bacterial genome using phylogenetic profiles. *Genome Res.* 19, 1084–1092. <https://doi.org/10.1101/gr.089714.108>
- Marta, P.T., Ladner, R.D., Grandoni, J.A., 1996. A CUC triplet confers leucine-dependent regulation of the *Bacillus subtilis* *ilv-leu* operon. *J. Bacteriol.*
- Martínez-Antonio, A., 2006. Internal-sensing machinery directs the activity of the regulatory network in *Escherichia coli* - ScienceDirect [WWW Document]. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X05003057> (accessed 12.21.21).
- Martis B., S., Forquet, R., Reverchon, S., Nasser, W., Meyer, S., 2019. DNA Supercoiling: an Ancestral Regulator of Gene Expression in Pathogenic Bacteria? *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 17, 1047–1055. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.07.013>
- Mashruwala, Ameya A., Gries, C.M., Scherr, T.D., Kielian, T., Boyd, J.M., 2017. SaeRS Is Responsive to Cellular Respiratory Status and Regulates Fermentative Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* <https://doi.org/10.1128/IAI.00157-17>
- Mashruwala, Ameya A., Guchte, A. van de, Boyd, J.M., 2017. Impaired respiration elicits SrrAB-dependent programmed cell lysis and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *eLife* 6, e23845. <https://doi.org/10.7554/eLife.23845>
- 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.
- Mauro, T., Rouillon, A., Felden, B., 2016. Insights into the regulation of small RNA expression: SarA represses the expression of two sRNAs in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res.* gkw777. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw777>
- Mayer, S., Steffen, W., Steuber, J., Götz, F., 2014. The *Staphylococcus aureus* NuoL-Like Protein MpsA Contributes to the Generation of Membrane Potential. *J. Bacteriol.* <https://doi.org/10.1128/JB.02127-14>
- McAleese, F.M., Walsh, E.J., Sieprawska, M., Potempa, J., Foster, T.J., 2001. Loss of Clumping Factor B Fibrinogen Binding Activity by *Staphylococcus aureus* Involves Cessation of Transcription, Shedding and Cleavage by Metalloprotease *. *J. Biol. Chem.* 276, 29969–29978. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102389200>
- McCarthy, A.J., Lindsay, J.A., 2013. *Staphylococcus aureus* innate immune evasion is lineage-specific: A bioinformatics study - ScienceDirect [WWW Document]. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1567134813002372> (accessed 1.12.22).
- McGavin, M.J., Zahradka, C., Rice, K., Scott, J.E., 1997. Modification of the *Staphylococcus aureus* fibronectin binding phenotype by V8 protease. *Infect. Immun.* <https://doi.org/10.1128/iai.65.7.2621-2628.1997>
- Meier, S., Goerke, C., Wolz, C., Seidl, K., Homerova, D., Schulthess, B., Kormanec, J., Berger-Bachi, B., Bischoff, M., 2007. σ B and the σ B-Dependent *arlRS* and *yabJ-spoVG* Loci Affect Capsule Formation in *Staphylococcus aureus* [WWW Document]. <https://doi.org/10.1128/IAI.00392-07>
- Melamed, S., Adams, P.P., Zhang, A., Zhang, H., Storz, G., 2020. RNA-RNA Interactomes of ProQ and Hfq Reveal Overlapping and Competing Roles. *Mol. Cell* 77, 411–425.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.10.022>
- Memmi, G., Nair, D.R., Cheung, A., 2012. Role of *ArlRS* in Autolysis in Methicillin-Sensitive and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. *J. Bacteriol.* 194, 759–767. <https://doi.org/10.1128/JB.06261-11>
- Ménard, G., Rouillon, A., Cattoir, V., Donnio, P.-Y., 2021a. *Galleria mellonella* as a Suitable Model of Bacterial Infection: Past, Present and Future. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11.

- Ménard, G., Rouillon, A., Ghukasyan, G., Emily, M., Felden, B., Donnio, P.-Y., 2021b. *Galleria mellonella* Larvae as an Infection Model to Investigate sRNA-Mediated Pathogenesis in *Staphylococcus aureus*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.631710>
- Méric, G., Miragaia, M., de Been, M., Yahara, K., Pascoe, B., Mageiros, L., Mikhail, J., Harris, L.G., Wilkinson, T.S., Rolo, J., Lamble, S., Bray, J.E., Jolley, K.A., Hanage, W.P., Bowden, R., Maiden, M.C.J., Mack, D., de Lencastre, H., Feil, E.J., Corander, J., Sheppard, S.K., 2015. Ecological Overlap and Horizontal Gene Transfer in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Genome Biol. Evol.* 7, 1313–1328. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv066>
- Méthot, P.-O., Alizon, S., 2014. What is a pathogen? Toward a process view of host-parasite interactions. *Virulence* 5, 775–785. <https://doi.org/10.4161/21505594.2014.960726>
- Mirończuk, A.M., Mañu, A., Kuipers, O.P., Kovács, Á.T., 2011. Distinct Roles of ComK1 and ComK2 in Gene Regulation in *Bacillus cereus*. *PLOS ONE* 6, e21859. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021859>
- Mlynek, K.D., Bullock, L.L., Stone, C.J., Curran, L.J., Sadykov, M.R., Bayles, K.W., Brinsmade, S.R., 2020. Genetic and Biochemical Analysis of CodY-Mediated Cell Aggregation in *Staphylococcus aureus* Reveals an Interaction between Extracellular DNA and Polysaccharide in the Extracellular Matrix. *J. Bacteriol.* <https://doi.org/10.1128/JB.00593-19>
- Mlynek, K.D., Sause, W.E., Moormeier, D.E., Sadykov, M.R., Hill, K.R., Torres, V.J., Bayles, K.W., Brinsmade, S.R., 2018. Nutritional Regulation of the Sae Two-Component System by CodY in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* <https://doi.org/10.1128/JB.00012-18>
- Monk, I.R., Shah, I.M., Xu, M., Tan, M.-W., Foster, T.J., 2012. Transforming the Untransformable: Application of Direct Transformation To Manipulate Genetically *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *mBio* 3, e00277-11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00277-11>
- Montanaro, L., Poggi, A., Visai, L., Ravaioli, S., Campoccia, D., Speziale, P., Arciola, C.R., 2011. Extracellular DNA in Biofilms. *Int. J. Artif. Organs* 34, 824–831. <https://doi.org/10.5301/ijao.5000051>
- Monteiro, J.M., Covas, G., Rausch, D., Filipe, S.R., Schneider, T., Sahl, H.-G., Pinho, M.G., 2019. The pentaglycine bridges of *Staphylococcus aureus* peptidoglycan are essential for cell integrity. *Sci. Rep.* 9, 5010. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41461-1>
- Montgomery, C.P., Boyle-Vavra, S., Daum, R.S., 2010. Importance of the Global Regulators Agr and SaeRS in the Pathogenesis of CA-MRSA USA300 Infection. *PLOS ONE* 5, e15177. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015177>
- Montgomery, C.P., Boyle-Vavra, S., Roux, A., Ebine, K., Sonenshein, A.L., Daum, R.S., 2012. CodY Deletion Enhances In Vivo Virulence of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clone USA300. *Infect. Immun.* <https://doi.org/10.1128/IAI.06172-11>
- Moormeier, D.E., Bayles, K.W., 2017. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Mol. Microbiol.* 104, 365–376. <https://doi.org/10.1111/mmi.13634>
- Moormeier, D.E., Bose, J.L., Horswill, A.R., Bayles, K.W., 2014. Temporal and Stochastic Control of *Staphylococcus aureus* Biofilm Development. *mBio* 5, e01341-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01341-14>
- Moran, G.J., Gorwitz, R.J., McDougal, L.K., 2006. Methicillin-Resistant *S. aureus* Infections among Patients in the Emergency Department. *N Engl J Med* 9.
- Morikawa, K., Inose, Y., Okamura, H., Maruyama, A., Hayashi, H., Takeyasu, K., 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. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2003.00668.x>
- Morrison, J., 2012. The staphylococcal accessory regulator, SarA, is an RNA-binding protein that modulates the mRNA turnover properties of late-exponential and stationary phase *Staphylococcus aureus* cells. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00026>
- Muller, L.M.A.J., Gorter, K.J., Hak, E., Goudzwaard, W.L., Schellevis, F.G., Hoepelman, A.I.M., Rutten, G.E.H.M., 2005. Increased Risk of Common Infections in Patients with Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus. *Clin. Infect. Dis.* 41, 281–288. <https://doi.org/10.1086/431587>
- Münzenmayer, L., Geiger, T., Daiber, E., Schulte, B., Autenrieth, S.E., Fraunholz, M., Wolz, C., 2016. Influence of Sae-regulated and Agr-regulated factors on the escape of *Staphylococcus aureus* from human macrophages. *Cell. Microbiol.* 18, 1172–1183. <https://doi.org/10.1111/cmi.12577>

- Muthaiyan, 2008. Transcriptional Profiling Reveals that Daptomycin Induces the *Staphylococcus aureus* Cell Wall Stress Stimulon and Genes Responsive to Membrane Depolarization [WWW Document]. <https://doi.org/10.1128/AAC.01121-07>
- Nagarajan, V., Smeltzer, M.S., Elasri, M.O., 2009. Genome-scale transcriptional profiling in *Staphylococcus aureus* : bringing order out of chaos. *FEMS Microbiol. Lett.* 295, 204–210. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01595.x>
- Naville, M., Ghuillot-Gaudeffroy, A., Marchais, A., Gautheret, D., 2011. ARNold: A web tool for the prediction of Rho-independent transcription terminators. *RNA Biol.* 8, 11–13. <https://doi.org/10.4161/rna.8.1.13346>
- Ng, E.Y., Trucksis, M., Hooper, D.C., 1994. Quinolone resistance mediated by *norA*: physiologic characterization and relationship to *flqB*, a quinolone resistance locus on the *Staphylococcus aureus* chromosome. *Antimicrob. Agents Chemother.* <https://doi.org/10.1128/AAC.38.6.1345>
- Nonin-Lecomte, S., Fermon, L., Felden, B., Pinel-Marie, M.-L., 2021. Bacterial Type I Toxins: Folding and Membrane Interactions. *Toxins* 13, 490. <https://doi.org/10.3390/toxins13070490>
- Novick, R.P., 2003. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol. Microbiol.* 48, 1429–1449. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03526.x>
- Novick, R.P., Jiang, D., 2003. The staphylococcal *saeRS* system coordinates environmental signals with *agr* quorum sensing. *Microbiology* 149, 2709–2717. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26575-0>
- O’Gara, J.P., 2007. *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 270, 179–188. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00688.x>
- Olson, M.E., Nygaard, T.K., Ackermann, L., Watkins, R.L., Zurek, O.W., Pallister, K.B., Griffith, S., Kiedrowski, M.R., Flack, C.E., Kavanaugh, J.S., Kreiswirth, B.N., Horswill, A.R., Voyich, J.M., 2013. *Staphylococcus aureus* Nuclease Is an *SaeRS*-Dependent Virulence Factor. *Infect. Immun.*
- Oriol, C., Cengher, L., Manna, A.C., Mauro, T., Pinel-Marie, M.-L., Felden, B., Cheung, A., Rouillon, A., 2021. Expanding the *Staphylococcus aureus* SarA Regulon to Small RNAs | mSystems. *mSystems* 6. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00713-21>
- Oscarsson, J., Kanth, A., Tegmark-Wisell, K., Arvidson, S., 2006. SarA Is a Repressor of *hla* (-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. <https://doi.org/10.1128/JB.00866-06>
- Oscarsson, Jan, Tegmark-Wisell, K., Arvidson, S., 2006. Coordinated and differential control of aureolysin (*aur*) and serine protease (*sspA*) transcription in *Staphylococcus aureus* by *sarA*, *rot* and *agr* (RNAIII). *Int. J. Med. Microbiol.* 296, 365–380. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.02.019>
- Otto, M., 2009. *Staphylococcus epidermidis* — the “accidental” pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 555–567. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2182>
- Ouyang, Z., Zheng, F., Chew, J.Y., Pei, Y., Zhou, J., Wen, K., Han, M., Lemieux, M.J., Hwang, P.M., Wen, Y., 2019. Deciphering the activation and recognition mechanisms of *Staphylococcus aureus* response regulator *ArlR*. *Nucleic Acids Res.* 47, 11418–11429. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz891>
- Pagels, M., Fuchs, S., Pané-Farré, J., Kohler, C., Menschner, L., Hecker, M., McNamarra, P.J., Bauer, M.C., Von Wachenfeldt, C., Liebeke, M., Lalk, M., Sander, G., Von Eiff, C., Proctor, R.A., Engelmann, S., 2010. Redox sensing by a Rex-family repressor is involved in the regulation of anaerobic gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 76, 1142–1161. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07105.x>
- Pané-Farré, J., Jonas, B., Förstner, K., Engelmann, S., Hecker, M., 2006. The σ B regulon in *Staphylococcus aureus* and its regulation. *Int. J. Med. Microbiol.* 296, 237–258. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2005.11.011>
- Panthee, S., Hamamoto, H., Paudel, A., Ohgi, S., Sekimizu, K., 2021. Contribution of *rsaC*, a small non-coding RNA, towards the pathogenicity of *Staphylococcus aureus* in a mouse systemic infection model (preprint). *Microbiology.* <https://doi.org/10.1101/2021.10.19.465069>
- Parlet, C.P., Brown, M.M., Horswill, A.R., 2019. Commensal *Staphylococci* Influence *Staphylococcus aureus* Skin Colonization and Disease. *Trends Microbiol.* 27, 497–507. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.01.008>
- Pathania, A., Anba-Mondoloni, J., Gominet, M., Halpern, D., Dairou, J., Dupont, L., Lamberet, G., Trieu-Cuot, P., Gloux, K., Gruss, A., 2021. (p)ppGpp/GTP and Malonyl-CoA Modulate *Staphylococcus aureus* Adaptation to FASII Antibiotics and Provide a Basis for Synergistic Bi-Therapy. *mBio* 12. <https://doi.org/10.1128/mBio.03193-20>

- Pendleton, J.N., Gorman, S.P., Gilmore, B.F., 2013. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 11, 297–308. <https://doi.org/10.1586/eri.13.12>
- Peng, H., Zhang, Y., Palmer, L.D., Kehl-Fie, T.E., Skaar, E.P., Trinidad, J.C., Giedroc, D.P., 2017. Hydrogen Sulfide and Reactive Sulfur Species Impact Proteome S-Sulfhydration and Global Virulence Regulation in *Staphylococcus aureus*. *ACS Infect. Dis.* 3, 744–755. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.7b00090>
- Pereira, M.F., Rossi, C.C., da Silva, G.C., Rosa, J.N., Bazzolli, D.M.S., 2020. *Galleria mellonella* as an infection model: an in-depth look at why it works and practical considerations for successful application. *Pathog. Dis.* 78, ftaa056. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftaa056>
- Periasamy, S., Chatterjee, S.S., Cheung, G.Y.C., Otto, M., 2012. Phenol-soluble modulins in staphylococci. *Commun. Integr. Biol.* 5, 275–277. <https://doi.org/10.4161/cib.19420>
- Pichon, C., Felden, B., 2005. Small RNA genes expressed from *Staphylococcus aureus* genomic and pathogenicity islands with specific expression among pathogenic strains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 14249–14254. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503838102>
- Pinel-Marie, M.-L., Brielle, R., 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. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.012>
- Pinel-Marie, M.-L., Brielle, R., Riffaud, C., Germain-Amiot, N., Polacek, N., Felden, B., 2021. RNA antitoxin SprF1 binds ribosomes to attenuate translation and promote persister cell formation in *Staphylococcus aureus*. *Nat. Microbiol.* 6, 209–220. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00819-2>
- Plata, K., Rosato, A.E., Wegrzyn, G., 2009. *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. *Acta Biochim. Pol.* 56. https://doi.org/10.18388/abp.2009_2491
- Pohl, K., Francois, P., Stenz, L., Schlink, F., Geiger, T., Herbert, S., Goerke, C., Schrenzel, J., Wolz, C., 2009. CodY in *Staphylococcus aureus*: a Regulatory Link between Metabolism and Virulence Gene Expression. *J. Bacteriol.* 191, 2953–2963. <https://doi.org/10.1128/JB.01492-08>
- Prados, J., Linder, P., Redder, P., 2016. TSS-EMOTE, a refined protocol for a more complete and less biased global mapping of transcription start sites in bacterial pathogens. *BMC Genomics* 17. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3211-3>
- Price, E.E., Boyd, J.M., 2020. Genetic Regulation of Metal Ion Homeostasis in *Staphylococcus aureus* | Elsevier Enhanced Reader [WWW Document]. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.04.004>
- Queck, S.Y., Jameson-Lee, M., Villaruz, A.E., Bach, T.-H.L., Khan, B.A., Sturdevant, D.E., Ricklefs, S.M., Li, M., Otto, M., 2008. RNAIII-Independent Target Gene Control by the agr Quorum-Sensing System: Insight into the Evolution of Virulence Regulation in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Cell* 32, 150–158. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.08.005>
- Raafat, D., Otto, M., Reppschläger, K., Iqbal, J., Holtfreter, S., 2019. Fighting *Staphylococcus aureus* Biofilms with Monoclonal Antibodies | Elsevier Enhanced Reader [WWW Document]. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.12.009>
- Ramsey, M.M., Freire, M.O., Gabriliska, R.A., Rumbaugh, K.P., Lemon, K.P., 2016. *Staphylococcus aureus* Shifts toward Commensalism in Response to *Corynebacterium* Species. *Front. Microbiol.* 7, 1230. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01230>
- Ranganathan, N., Johnson, R., Edwards, A.M., 2020. The general stress response of *Staphylococcus aureus* promotes tolerance of antibiotics and survival in whole human blood. *Microbiology* 166, 1088–1094. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000983>
- Ratnayake-Lecamwasam, M., Serror, P., Wong, K.-W., Sonenshein, A.L., 2001. *Bacillus subtilis* CodY represses early-stationary-phase genes by sensing GTP levels. *Genes Dev.* 15, 1093–1103. <https://doi.org/10.1101/gad.874201>
- Ravcheev, D.A., Best, A.A., Tintle, N., DeJongh, M., Osterman, A.L., Novichkov, P.S., Rodionov, D.A., 2011. Inference of the Transcriptional Regulatory Network in *Staphylococcus aureus* by Integration of Experimental and Genomics-Based Evidence. *J. Bacteriol.* 193, 3228–3240. <https://doi.org/10.1128/JB.00350-11>
- Rechtin, T.M., Gillaspay, A.F., Schumacher, M.A., Brennan, R.G., Smeltzer, M.S., Hurlburt, B.K., 1999. Characterization of the SarA virulence gene regulator of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 33, 307–316. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01474.x>
- Reffuveille, F., Josse, J., Vallé, Q., Mongaret, C., Gangloff, S.C., 2017. *Staphylococcus aureus* Biofilms and their Impact on the Medical Field, in: Enany, S., Crotty Alexander, L.E. (Eds.), *The Rise of*

- Virulence and Antibiotic Resistance in *Staphylococcus Aureus*. InTech. <https://doi.org/10.5772/66380>
- Reiß, S., Pané-Farré, J., Fuchs, S., Francois, P., Liebeke, M., Schrenzel, J., Lindequist, U., Lalk, M., Wolz, C., Hecker, M., Engelmann, S., 2012. Global Analysis of the *Staphylococcus aureus* Response to Mupirocin [WWW Document]. <https://doi.org/10.1128/AAC.05363-11>
- Resch, A., Leicht, S., Saric, M., Pásztor, L., Jakob, A., Götz, F., Nordheim, A., 2006. Comparative proteome analysis of *Staphylococcus aureus* biofilm and planktonic cells and correlation with transcriptome profiling. *PROTEOMICS* 6, 1867–1877. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500531>
- Reyes, D., Andrey, D.O., Monod, A., Kelley, W.L., Zhang, G., Cheung, A.L., 2011. Coordinated Regulation by AgrA, SarA, and SarR To Control agr Expression in *Staphylococcus aureus*. *J BACTERIOL* 193, 12.
- Rice, K.C., Bayles, K.W., 2008. Molecular Control of Bacterial Death and Lysis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 85–109. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00030-07>
- Richardson†, A.R., Somerville†, G.A., Sonenshein†, A.L., 2015. Regulating the Intersection of Metabolism and Pathogenesis in Gram-positive Bacteria. *Microbiol. Spectr.* <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MBP-0004-2014>
- Riffaud, C., Pinel-Marie, M.-L., Pascreau, G., Felden, B., 2019. Functionality and cross-regulation of the four SprG/SprF type I toxin–antitoxin systems in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res.* 47, 1740–1758. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1256>
- Rivera, F.E., Miller, H.K., Kolar, S.L., Stevens Jr., S.M., Shaw, L.N., 2012. The impact of CodY on virulence determinant production in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PROTEOMICS* 12, 263–268. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100298>
- 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., Gautheret, D., Bouloc, P., 2018. The conserved regulatory RNA RsaE down-regulates the arginine degradation pathway in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res.* 46, 8803–8816. <https://doi.org/10.1093/nar/gky584>
- Rogasch, K., 2006. Influence of the Two-Component System SaeRS on Global Gene Expression in Two Different *Staphylococcus aureus* Strains [WWW Document]. <https://doi.org/10.1128/JB.00555-06>
- Romilly, C., Lays, C., Tomasini, A., Caldelari, I., Benito, Y., Hammann, P., Geissmann, T., Boisset, S., Romby, P., Vandenesch, F., 2014. A Non-Coding RNA Promotes Bacterial Persistence and Decreases Virulence by Regulating a Regulator in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog.* 10, e1003979. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003979>
- Roux, A., Todd, D.A., Velazquez, J.V., Cech, N.B., Sonenshein, A.L., 2014. CodY-Mediated Regulation of the *Staphylococcus aureus* Agr System Integrates Nutritional and Population Density Signals. *J. Bacteriol.* 196, 1184–1196. <https://doi.org/10.1128/JB.00128-13>
- Rowe, S.E., Beam, J.E., Conlon, B.P., 2021. Recalcitrant *Staphylococcus aureus* Infections: Obstacles and Solutions. *Infect. Immun.* <https://doi.org/10.1128/IAI.00694-20>
- Rudra, P., Boyd, J.M., 2020. Metabolic control of virulence factor production in *Staphylococcus aureus*. *Curr. Opin. Microbiol.* 55, 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.03.004>
- Sadykov, M.R., Bayles, K.W., 2012. The control of death and lysis in staphylococcal biofilms: a coordination of physiological signals. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 211–215. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.12.010>
- Said-Salim, B., Dunman, P.M., McAleese, F.M., Macapagal, D., Murphy, E., McNamara, P.J., Arvidson, S., Projan, S.J., Foster, T.J., Kreiswirth, B.N., 2003. Global Regulation of *Staphylococcus aureus* Genes by Rot [WWW Document]. <https://doi.org/10.1128/JB.185.2.610-619.2003>
- Salgado-Pabón, W., Schlievert, P.M., 2014. Models matter: the search for an effective *Staphylococcus aureus* vaccine. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 585–591. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3308>
- Sassi, M., Augagneur, Y., Mauro, T., Ivain, L., Chabelskaya, S., Hallier, M., Sallou, O., Felden, B., 2015. SRD: a *Staphylococcus* regulatory RNA database. *RNA* 21, 1005–1017. <https://doi.org/10.1261/rna.049346.114>
- Sayed, N., Jousselin, A., Felden, B., 2012a. A cis-antisense RNA acts in trans in *Staphylococcus aureus* to control translation of a human cytolytic peptide. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 105–112. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2193>
- Sayed, N., Nonin-Lecomte, S., Réty, S., Felden, B., 2012b. Functional and Structural Insights of a *Staphylococcus aureus* Apoptotic-like Membrane Peptide from a Toxin-Antitoxin Module *. *J. Biol. Chem.* 287, 43454–43463. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.402693>

- Schell, M.A., 1993. MOLECULAR BIOLOGY OF THE LysR FAMILY OF TRANSCRIPTIONAL REGULATORS. *Annu. Rev. Microbiol.* 47, 597–626. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.47.100193.003121>
- Schoenfelder, S.M.K., Lange, C., Prakash, S.A., Marincola, G., Lerch, M.F., Wencker, F.D.R., Förstner, K.U., Sharma, C.M., Ziebuhr, W., 2019. The small non-coding RNA RsaE influences extracellular matrix composition in *Staphylococcus epidermidis* biofilm communities. *PLOS Pathog.* 15, e1007618. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007618>
- Schoenfelder, S.M.K., Marincola, G., Geiger, T., Goerke, C., Wolz, C., Ziebuhr, W., 2013. Methionine Biosynthesis in *Staphylococcus aureus* Is Tightly Controlled by a Hierarchical Network Involving an Initiator tRNA-Specific T-box Riboswitch. *PLOS Pathog.* 9, e1003606. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003606>
- Schumacher, M.A., Hurlburt, B.K., Brennan, R.G., 2001. Crystal structures of SarA, a pleiotropic regulator of virulence genes in *S. aureus* 409, 5.
- Schuster, C.F., Bertram, R., 2016. Toxin-Antitoxin Systems of *Staphylococcus aureus*. *Toxins* 8, 140. <https://doi.org/10.3390/toxins8050140>
- Searles, L.L., Wessler, S.R., Calvo, J.M., 1983. Transcription attenuation is the major mechanism by which the leu operon of *Salmonella typhimurium* is controlled. *J. Mol. Biol.* 163, 377–394. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(83\)90064-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(83)90064-5)
- Seidl, K., Goerke, C., Wolz, C., Mack, D., Berger-Bachi, B., Bischoff, M., 2008. *Staphylococcus aureus* CcpA Affects Biofilm Formation [WWW Document]. <https://doi.org/10.1128/IAI.00035-08>
- Seidl, K., Müller, S., Francois, P., Kriebitzsch, C., Schrenzel, J., Engelmann, S., Bischoff, M., Berger-Bachi, B., 2009. Effect of a glucose impulse on the CcpA regulon in *Staphylococcus aureus* | BMC Microbiology | Full Text [WWW Document]. URL <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-9-95> (accessed 12.28.21).
- Seidl, K., Stucki, M., Rugg, M., Goerke, C., Wolz, C., Harris, L., Berger-Bachi, B., Bischoff, M., 2006. *Staphylococcus aureus* CcpA Affects Virulence Determinant Production and Antibiotic Resistance | Antimicrobial Agents and Chemotherapy [WWW Document]. URL <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AAC.50.4.1183-1194.2006> (accessed 12.28.21).
- Seilie, E.S., Wardenburg, J.B., 2017. *Staphylococcus aureus* pore-forming toxins: the interface of pathogen and host complexity. *Semin. Cell Dev. Biol.* 72, 101–116. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.04.003>
- Seshasayee, A.S., Bertone, P., Fraser, G.M., Luscombe, N.M., 2006. Transcriptional regulatory networks in bacteria: from input signals to output responses [WWW Document]. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.08.007>
- Shaw, L., Golonka, E., Potempa, J., Foster, S.J., 2004. The role and regulation of the extracellular proteases of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 150, 217–228. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26634-0>
- Shaw, L.N., Lindholm, Catharina, Prajsnar, T.K., Miller, H.K., Brown, M.C., Golonka, E., Stewart, G.C., Tarkowski, A., Potempa, J., 2008. Identification and Characterization of σ S, a Novel Component of the *Staphylococcus aureus* Stress and Virulence Responses [WWW Document]. URL <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0003844> (accessed 12.29.21).
- Sheehan, G., Dixon, A., Kavanagh, K., 2019. Utilization of *Galleria mellonella* larvae to characterize the development of *Staphylococcus aureus* infection. *Microbiology* 165, 13. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000813>
- Sieprawska-Lupa, M., Mydel, P., Krawczyk, K., Wójcik, K., Puklo, M., Lupa, B., Suder, P., Silberring, J., Reed, M., Pohl, J., Shafer, W., McAleese, F., Foster, T., Travis, J., Potempa, J., 2004. Degradation of Human Antimicrobial Peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-Derived Proteinases. *Antimicrob. Agents Chemother.* <https://doi.org/10.1128/AAC.48.12.4673-4679.2004>
- Silva Rosa da Luz, B., Azevedo, V., Le-loir, Y., Guedon, E., 2021. Extracellular Vesicles and Their Role in *Staphylococcus aureus* Resistance and Virulence, in: Aqib, A. (Ed.), *Infectious Diseases*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.96023>
- Singkum, P., Suwanmanee, S., Pumeesat, P., Luplertlop, N., 2019. A powerful in vivo alternative model in scientific research: *Galleria mellonella*. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 66, 31–55. <https://doi.org/10.1556/030.66.2019.001>
- Smagur, J., Guzik, K., Magiera, L., Bzowska, M., Gruca, M., Thøgersen, I.B., Enghild, J.J., Potempa, J., 2009. A New Pathway of Staphylococcal Pathogenesis: Apoptosis-Like Death Induced by Staphopain B in Human Neutrophils and Monocytes. *J. Innate Immun.* 1, 98–108. <https://doi.org/10.1159/000181014>

- Smith, E.J., Visai, L., Kerrigan, S.W., Speziale, P., Foster, T.J., 2011. The Sbi Protein Is a Multifunctional Immune Evasion Factor of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 79, 3801–3809. <https://doi.org/10.1128/IAI.05075-11>
- Snowden, J.N., Beaver, M., Beenken, K., Smeltzer, M., Horswill, A.R., Kielian, T., 2013. *Staphylococcus aureus* sarA Regulates Inflammation and Colonization during Central Nervous System Biofilm Formation. *PLOS ONE* 8, e84089. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084089>
- Sonenshein, A.L., 2007. Control of key metabolic intersections in *Bacillus subtilis*. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 917–927. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1772>
- Sorensen, H.M., Keogh, R.A., Wittekind, M.A., Caillet, A.R., Wiemels, R.E., Laner, E.A., Carroll, R.K., 2020. Reading between the Lines: Utilizing RNA-Seq Data for Global Analysis of sRNAs in *Staphylococcus aureus*. *mSphere* 5, e00439-20, [/msphere/5/4/mSphere439-20.atom](https://doi.org/10.1128/mSphere.00439-20). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00439-20>
- Spaan, A.N., van Strijp, J.A.G., Torres, V.J., 2017. Leukocidins: staphylococcal bi-component pore-forming toxins find their receptors. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 435–447. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.27>
- Sterba, K.M., Mackintosh, S.G., Blevins, J.S., Hurlburt, B.K., Smeltzer, M.S., 2003. Characterization of *Staphylococcus aureus* SarA Binding Sites. *J. Bacteriol.* 185, 4410–4417. <https://doi.org/10.1128/JB.185.15.4410-4417.2003>
- Stoneham, S.M., Cantillon, D.M., Waddell, S.J., Llewelyn, M.J., 2020. Spontaneously Occurring Small-Colony Variants of *Staphylococcus aureus* Show Enhanced Clearance by THP-1 Macrophages. *Front. Microbiol.* 11, 1300. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01300>
- Strandén, A.M., Ehlert, K., Labischinski, H., Berger-Bächi, B., 1997. Cell wall monoglycine cross-bridges and methicillin hypersusceptibility in a femAB null mutant of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 179, 9–16. <https://doi.org/10.1128/jb.179.1.9-16.1997>
- Sun, F., Ding, Y., Ji, Q., Liang, Z., Deng, X., Wong, C.C.L., Yi, C., Zhang, L., Xie, S., Alvarez, S., Hicks, L.M., Luo, C., Jiang, H., Lan, L., He, C., 2012. Protein cysteine phosphorylation of SarA/MgrA family transcriptional regulators mediates bacterial virulence and antibiotic resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 15461–15466. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205952109>
- Sun, F., Zhou, L., Zhao, B.-C., Deng, X., Cho, H., Yi, C., Jian, X., Song, C.-X., Luan, C.-H., Bae, T., Li, Z., He, C., 2011. Targeting MgrA-Mediated Virulence Regulation in *Staphylococcus aureus*. *Chem. Biol.* 18, 1032–1041. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.05.014>
- Svensson, S.L., Sharma, C.M., 2016. Small RNAs in Bacterial Virulence and Communication, in: Kudva, I.T., Cornick, N.A., Plummer, P.J., Zhang, Q., Nicholson, T.L., Bannantine, J.P., Bellaire, B.H. (Eds.), *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*, Fifth Edition. American Society of Microbiology, pp. 169–212. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0028-2015>
- Tam, K., Torres, V.J., 2019. *Staphylococcus aureus* Secreted Toxins and Extracellular Enzymes [WWW Document]. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0039-2018>
- Tang, D.-J., Du, X., Shi, Q., Zhang, J.-L., He, Y.-P., Chen, Y.-M., Ming, Z., Wang, D., Zhong, W.-Y., Liang, Y.-W., Liu, J.-Y., Huang, J.-M., Zhong, Y.-S., An, S.-Q., Gu, H., Tang, J.-L., 2020. A SAM-I riboswitch with the ability to sense and respond to uncharged initiator tRNA. *Nat. Commun.* 11, 2794. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16417-z>
- Tanouchi, Y., Lee, A.J., Meredith, H., You, L., 2013. Programmed cell death in bacteria and implications for antibiotic therapy. *Trends Microbiol.* 21, 265–270. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.04.001>
- Tao, L., Wu, X., Sun, B., 2010. Alternative Sigma Factor σ H Modulates Prophage Integration and Excision in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog.* 6, e1000888. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000888>
- Thammavongsa, V., Kim, H.K., Missiakas, D., Schneewind, O., 2015. Staphylococcal manipulation of host immune responses. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 529–543. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3521>
- The UniProt Consortium, 2021. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res.* 49, D480–D489. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1100>
- Tong, S.Y.C., Davis, J.S., Eichenberger, E., Holland, T.L., Fowler, Jr, V.G., 2015. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management [WWW Document]. <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>
- Tormo, M.A., Marti, M., Valle, J., Manna, A.C., Cheung, A.L., Lasa, I., Penades, J.R., 2005. SarA Is an Essential Positive Regulator of *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Development. *J. Bacteriol.* 187, 2348–2356. <https://doi.org/10.1128/JB.187.7.2348-2356.2005>
- Trotonda, M.P., Tamber, S., Memmi, G., Cheung, A.L., 2008. MgrA Represses Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* <https://doi.org/10.1128/IAI.00735-08>

- Truong-Bolduc, Q.C., Dunman, P.M., Eidem, T., Hooper, D.C., 2011. Transcriptional Profiling Analysis of the Global Regulator NorG, a GntR-Like Protein of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 193, 6207–6214. <https://doi.org/10.1128/JB.05847-11>
- Truong-Bolduc, Q.C., Hooper, D.C., 2007. The Transcriptional Regulators NorG and MgrA Modulate Resistance to both Quinolones and β -Lactams in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 189, 2996–3005. <https://doi.org/10.1128/JB.01819-06>
- Truong-Bolduc, Q.C., Strahilevitz, J., Hooper, D.C., 2006. NorC, a New Efflux Pump Regulated by MgrA of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* <https://doi.org/10.1128/AAC.50.3.1104-1107.2006>
- Truong-Bolduc, Q.C., Zhang, X., Hooper, D.C., 2003. Characterization of NorR Protein, a Multifunctional Regulator of *norA* Expression in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* <https://doi.org/10.1128/JB.185.10.3127-3138.2003>
- Tsang, L.H., Cassat, J.E., Shaw, L.N., Beenken, K.E., Smeltzer, M.S., 2008. Factors Contributing to the Biofilm-Deficient Phenotype of *Staphylococcus aureus sarA* Mutants. *PLoS ONE* 3, e3361. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003361>
- Tuchscher, L., Bischoff, M., Lattar, S.M., Noto Llana, M., Pfortner, H., Niemann, S., Geraci, J., Van de Vyver, H., Fraunholz, M.J., Cheung, A.L., Herrmann, M., Völker, U., Sordelli, D.O., Peters, G., Löffler, B., 2015. Sigma Factor SigB Is Crucial to Mediate *Staphylococcus aureus* Adaptation during Chronic Infections. *PLOS Pathog.* 11, e1004870. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004870>
- Tuchscher, L., Löffler, B., Proctor, R.A., 2020. Persistence of *Staphylococcus aureus*: Multiple Metabolic Pathways Impact the Expression of Virulence Factors in Small-Colony Variants (SCVs). *Front. Microbiol.* 11, 1028. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01028>
- Ulrich, M., Bastian, M., Cramton, S.E., Ziegler, K., Pragman, A.A., Bragonzi, A., Memmi, G., Wolz, C., Schlievert, P.M., Cheung, A., Döring, G., 2007. The staphylococcal respiratory response regulator SrrAB induces *ica* gene transcription and polysaccharide intercellular adhesin expression, protecting *Staphylococcus aureus* from neutrophil killing under anaerobic growth conditions. *Mol. Microbiol.* 65, 1276–1287. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05863.x>
- Valle, J., Echeverz, M., Lasa, I., 2019. σ B Inhibits Poly-N-Acetylglucosamine Exopolysaccharide Synthesis and Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 201, e00098-19. <https://doi.org/10.1128/JB.00098-19>
- Valle, J., Toledo-Arana, A., Berasain, C., Ghigo, J.-M., Amorena, B., Penadés, J.R., Lasa, I., 2003. SarA and not σ B is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 48, 1075–1087. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03493.x>
- Ventura, C.L., Malachowa, N., Hammer, C.H., Nardone, G.A., Robinson, M.A., Kobayashi, S.D., DeLeo, F.R., 2010. Identification of a Novel *Staphylococcus aureus* Two-Component Leukotoxin Using Cell Surface Proteomics. *PLoS ONE* 5, e11634. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011634>
- Villanueva, M., García, B., Valle, J., Rapún, B., Ruiz de los Mozos, I., Solano, C., Martí, M., Penadés, J.R., Toledo-Arana, A., Lasa, I., 2018. Sensory deprivation in *Staphylococcus aureus*. *Nat. Commun.* 9, 523. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02949-y>
- Vitko, N.P., Spahich, N.A., Richardson, A.R., 2015. Glycolytic Dependency of High-Level Nitric Oxide Resistance and Virulence in *Staphylococcus aureus*. *mBio.* <https://doi.org/10.1128/mBio.00045-15>
- von Eiff, C., Friedrich, A.W., Peters, G., Becker, K., 2004. Prevalence of genes encoding for members of the staphylococcal leukotoxin family among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 49, 157–162. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2004.03.009>
- Wang, L., Li, M., Dong, D., Bach, T.-H.L., Sturdevant, D.E., Vuong, C., Otto, M., Gao, Q., 2008. SarZ Is a Key Regulator of Biofilm Formation and Virulence in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Infect. Dis.* 197, 1254–1262. <https://doi.org/10.1086/586714>
- Wang, X., Yao, J., Sun, Y.-C., Wood, T.K., 2021. Type VII Toxin/Antitoxin Classification System for Antitoxins that Enzymatically Neutralize Toxins | Elsevier Enhanced Reader. *Trends Microbiol.* <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.12.001>
- Waters, E.M., Rowe, S.E., O’Gara, J.P., Conlon, B.P., 2016. Convergence of *Staphylococcus aureus* Persister and Biofilm Research: Can Biofilms Be Defined as Communities of Adherent Persister Cells? *PLOS Pathog.* 12, e1006012. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006012>
- Weinrick, 2004. Effect of Mild Acid on Gene Expression in *Staphylococcus aureus* [WWW Document]. <https://doi.org/10.1128/JB.186.24.8407-8423.2004>
- Wencker, F.D.R., Marincola, G., Schoenfelder, S.M.K., Maaß, S., Becher, D., Ziebuhr, W., 2021. Another layer of complexity in *Staphylococcus aureus* methionine biosynthesis control: unusual RNase III-

- driven T-box riboswitch cleavage determines *met* operon mRNA stability and decay. *Nucleic Acids Res.* 49, 2192–2212. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1277>
- Wertheim, H.F., Melles, D.C., Vos, M.C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H.A., Nouwen, J.L., 2005. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect. Dis.* 5, 751–762. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)70295-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70295-4)
- Wertheim, H.F.L., Vos, M.C., Ott, A., van Belkum, A., Voss, A., Kluytmans, J.A.J.W., van Keulen, P.H.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Meester, M.H.M., Verbrugh, H.A., 2004. Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. *Lancet Lond. Engl.* 364, 703–705. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16897-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16897-9)
- Wessler, S.R., Calvo, J.M., 1981. Control of *leu* operon expression in *Escherichia coli* by a transcription attenuation mechanism. *J. Mol. Biol.* 149, 579–597. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90348-X](https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90348-X)
- Willing, S., Dyer, E., Schneewind, O., Missiakas, D., 2020. FmhA and FmhC of *Staphylococcus aureus* incorporate serine residues into peptidoglycan crossbridges. *J. Biol. Chem.* <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.014371>
- Wolz, C., Pöhlmann-Dietze, P., Steinhuber, A., Chien, Y.-T., Manna, A., Van Wamel, W., Cheung, A., 2000. Agr-independent regulation of fibronectin-binding protein(s) by the regulatory locus *sar* in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 36, 230–243. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01853.x>
- Wright, P.R., Georg, J., Mann, M., Sorescu, D.A., Richter, A.S., Lott, S., Kleinkauf, R., Hess, W.R., Backofen, R., 2014. CopraRNA and IntaRNA: predicting small RNA targets, networks and interaction domains. *Nucleic Acids Res.* 42, W119–W123. <https://doi.org/10.1093/nar/gku359>
- Wu, S., Lencastre, H. de, Tomasz, A., 1996. Sigma-B, a putative operon encoding alternate sigma factor of *Staphylococcus aureus* RNA polymerase: molecular cloning and DNA sequencing. *J. Bacteriol.* <https://doi.org/10.1128/jb.178.20.6036-6042.1996>
- Wu, Y., Wang, J., Xu, T., Liu, J., Yu, W., Lou, Q., Zhu, T., He, N., Ben, H., Hu, J., Götz, F., Qu, D., 2012. The Two-Component Signal Transduction System ArlRS Regulates *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Formation in an *ica*-Dependent Manner. *PLOS ONE* 7, e40041. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040041>
- Wünsche, A., Hammer, E., Bartholomae, M., Völker, U., Burkovski, A., Seidel, G., Hillen, W., 2012. CcpA forms complexes with CodY and RpoA in *Bacillus subtilis*. *FEBS J.* 279, 2201–2214. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08604.x>
- Xue, T., Zhang, X., Sun, H., Sun, B., 2014. ArtR, a novel sRNA of *Staphylococcus aureus*, regulates α -toxin expression by targeting the 5' UTR of *sarT* mRNA. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 203, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00430-013-0307-0>
- Yamashita, K., Kawai, Y., Tanaka, Y., Hirano, N., Kaneko, J., Tomita, N., Ohta, M., Kamio, Y., Yao, M., Tanaka, I., 2011. Crystal structure of the octameric pore of staphylococcal γ -hemolysin reveals the β -barrel pore formation mechanism by two components. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 17314–17319. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110402108>
- Zapotoczna, M., O'Neill, E., O'Gara, J.P., 2016. Untangling the Diverse and Redundant Mechanisms of *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation. *PLOS Pathog.* 12, e1005671. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005671>
- Zhang, Z., Wang, J., Zhang, B., Liu, H., Song, W., He, J., Lv, D., Wang, S., Xu, X., 2013. Activity of antibacterial protein from maggots against *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo. *Int. J. Mol. Med.* 31, 1159–1165. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2013.1291>
- Zhao, H., Hu, F., Yang, H., Ding, B., Xu, X., He, C., Cui, Z., Shu, W., 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. <https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0033>
- Zhao, Y., Verma, V., Belcheva, A., Singh, A., Fridman, M., Golemi-Kotra, D., 2012. *Staphylococcus aureus* Methicillin-Resistance Factor *fmtA* Is Regulated by the Global Regulator SarA. *PLoS ONE* 7, e43998. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043998>
- Ziebandt, A.-K., Weber, H., Rudolph, J., Schmid, R., Höper, D., Engelmann, S., Hecker, M., 2001. Extracellular proteins of *Staphylococcus aureus* and the role of SarA and σ B. *PROTEOMICS* 1, 480–493. [https://doi.org/10.1002/1615-9861\(200104\)1:4<480::AID-PROT480>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/1615-9861(200104)1:4<480::AID-PROT480>3.0.CO;2-O)

Titre : Le régulon SarA chez *Staphylococcus aureus* : Analyse combinée RNA-Seq, ChIP-Seq et bio-informatique. Focus sur des cibles sARN.

Mots clés : *Staphylococcus aureus*, SarA, régulation, RNA-Seq, ChIP-Seq, ARN régulateurs.

Résumé : *Staphylococcus aureus* est un pathogène opportuniste de l'Homme. La régulation de sa virulence est assurée par l'action coordonnée de facteurs de transcription comme SarA et d'ARN régulateurs. SarA est un régulateur majeur, impliqué dans la formation de biofilm, la résistance aux antibiotiques et l'expression de facteurs de virulence. La détermination de l'ensemble des cibles régulées par SarA présentée dans cette étude permettra de mieux appréhender les réseaux de régulation chez *S. aureus*. La combinaison d'analyses transcriptomiques (RNA-Seq), de ChIP-Seq et de bio-informatique a mis en évidence 140 gènes régulés par SarA. La régulation transcriptionnelle directe de 9 gènes codant des protéines, et 7 gènes exprimant un sARN a été validée expérimentalement (un sARN se définissant comme un potentiel ARN régulateur). SarA réprime l'expression d'une

toxine (*sprG2*) et d'une antitoxine (*sprA2_{AS}*) appartenant à deux systèmes toxine-antitoxine de type I distincts. Par ailleurs, l'analyse comparative entre les cibles sARN de SarA et celles publiées pour le facteur de transcription CodY révèle que les gènes sARN *teg1*, *rsaOB*, *rsaD* et *teg16* seraient régulés par CodY et SarA de manière coordonnée au cours de la croissance. Ces sARN sont connus ou prédits pour être impliqués dans la synthèse d'acides aminés (méthionine et acides aminés branchés) chez *S. aureus*. De plus, Teg16 et RsaD semblent partager des fonctions métaboliques communes puisque chacun régule la production d'une acétolactate synthase distincte. Ces travaux mettent en lumière les doubles régulations de gènes sARN par des facteurs de transcription, avec ici l'exemple de SarA et CodY chez *S. aureus*.

Title: The SarA regulon in *Staphylococcus aureus*: Combinatory approach using RNA-Seq, ChIP-Seq and bioinformatic analyses. Focus on a subset of sRNA targets.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, SarA, regulation, RNA-Seq, ChIP-Seq, regulatory RNAs.

Abstract: *Staphylococcus aureus* is an opportunistic human pathogen. Its virulence potential relies on a coordinate regulation by transcription factors and regulatory RNAs. SarA is a major regulator in this pathogen with implication in biofilm formation, antibiotic resistance and expression of virulence factors. Here, we present an extensive analysis of the SarA regulon by differential transcriptomes (RNA-Seq), ChIP-Seq and bioinformatic analyses. 140 SarA target genes were identified using this combinatory approach. 9 protein-coding genes and 7 sRNA genes targets were validated experimentally (a sRNA being a potential regulatory RNA). Among those sRNA targets, we showed that SarA represses toxin gene expression (*sprG2*) and antitoxin gene expression (*sprA2_{AS}*) being a part of two distinct

type I toxin- antitoxin system. In addition, the comparison of our RNA-Seq data with published RNA-seq data from CodY transcription factor showed that SarA and CodY share common sRNA targets. Among them, we focused on *teg1*, *rsaOB*, *rsaD* and *teg16*, which seem to be regulated by both transcription factors in a coordinated manner during growth. These sRNA are known or predicted to be involved in amino acids biosynthesis (methionine and branched-chain amino acids) in *S. aureus*. Additionally, Teg16 and RsaD appear to share common metabolic function, since they both control the production of two distinct acetolactate synthases. This study highlights the cross-regulations of sRNA genes by transcription factors like the major regulators SarA and CodY in *S. aureus*.