



ARN régulateurs et adaptation aux antibiotiques chez *Staphylococcus aureus* : exemple de l'ARN 6S et de la sensibilité à la rifampicine

Marick Esberard

► To cite this version:

Marick Esberard. ARN régulateurs et adaptation aux antibiotiques chez *Staphylococcus aureus* : exemple de l'ARN 6S et de la sensibilité à la rifampicine. Bactériologie. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASL003 . tel-03968921

HAL Id: tel-03968921

<https://theses.hal.science/tel-03968921>

Submitted on 2 Feb 2023

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.

ARN régulateurs et adaptation aux antibiotiques
chez *Staphylococcus aureus* : exemple de l'ARN 6S
et de la sensibilité à la rifampicine

*Regulatory RNAs and adaptation to antibiotics in
Staphylococcus aureus: example of 6S RNA and
rifampicin susceptibility*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°577, Structure et Dynamique des Systèmes Vivants (SDSV)

Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé

Graduate School : Life Science and Health. Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Institute for Integrative Biology of the Cell**
(I2BC, Université Paris-Saclay, CEA, CNRS), sous la direction de **Philippe BOULOC**,
Directeur de Recherche.

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 31 janvier 2022, par

Marick ESBERARD

Composition du Jury

Olga SOUTOURINA

Professeure des Universités, Université Paris-Saclay

Konstantin BRODOLIN

Directeur de Recherche, Université de Montpellier

Peter REDDER

Professeur des Universités, Université Toulouse III

Sarah DUBRAC

Chargée de Recherche, Université de Paris

Françoise NOREL

Directrice de Recherche, Université de Paris

Philippe BOULOC

Directeur de Recherche, Université Paris-Saclay

Présidente

Rapporteur & Examineur

Rapporteur & Examineur

Examinatrice

Examinatrice

Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, Philippe Bouloc, pour sa confiance et sa bienveillance. Je lui suis reconnaissante de n'avoir jamais douté de mes capacités. J'espère que son engagement pour la transmission du savoir et la pédagogie continuera d'éveiller les esprits de nombreux jeunes chercheurs.

Je remercie les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail de longue haleine.

Je remercie également les membres du laboratoire SRRB, anciens et actuels, qui ont été de formidables collègues durant ces quatre années. Une page se tourne et de nouvelles paillasses vous attendent. Que l'enrichissement mutuel que nous nous sommes apporté sème en chacun de nous la graine d'une Science meilleure.

Je remercie chaleureusement mes ami·e·s, les Pharmacien·ne·s, les expatrié·e·s (ou presque), les Parisiennes d'adoption et les Marseillaises de cœur. Vous m'avez tant donné... Aujourd'hui de nouvelles voies s'offrent à nous mais reste ce lien fidèle qui nous unit. Je vous kiffe.

Je dédie cette thèse à ma famille, mes parents, mes frères et mon compagnon. La fierté dans votre regard me rappelle chaque jour la chance que j'ai de vous avoir.

A ceux qui m'ont tendu la main, merci.

Tien bo, larg' pa

Abréviations

α -CTD = α -C-Terminal Domain

α -NTD = α -N-Terminal Domain

agr = accessory gene regulator

AIP = AutoInducing Peptide

ARNpol = ARN polymerase

ARNrég = ARN régulateur

ARNt = ARN de transfert

ARNtm = ARN transfert-messenger

AUR = auréothricine

BHI = *Brain Heart Infusion*

CET = Complexe d'Elongation de Transcription

ClfA = *Clumping Factor A*

ClfB = *Clumping Factor B*

CMI = Concentration Minimale Inhibitrice

EI = Endocardite Infectieuse

ECF = *ExtraCytoplasmic Function*

FDX = fidaxomicine

FMN = Flavine MonoNucléotide

FnBPA = *Fibronectin Binding Protein A*

FnBPB = *Fibronectin Binding Protein B*

IAS = Infections Associées aux Soins

IOA = Infections Ostéo-Articulaires

LPV = Leucocidine de Panton-Valentine

LB = *Lysogeny Broth*

MSCRAMM = *Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules*

PLP2a = Protéine Liant la Pénicilline 2a

pARN = produit ARN

RB = rifabutine

RF = *Release Factor*

RIF = rifampicine

RNase = ribonucléase

SAIV = *S. aureus* à sensibilité Intermédiaire à la Vancomycine

SARM = *S. aureus* Résistant à la Méricilline

SARV = *S. aureus* Résistant à la Vancomycine

SCT = Syndrome du Choc Toxique

SD = Shine-Dalgarno

TIAC = Toxi-Infections Alimentaires Collectives

TPP = Thiamine PyroPhosphate

TSB = *Tryptic Soy Broth*

TSST-1 = *Toxic Shock Syndrom Toxin-1*

UTR = *UnTranslated Regions*

VAN = vancomycine

Table des matières

Table des figures et tableau	6
INTRODUCTION	7
<i>Staphylococcus aureus</i> , une bactérie aux multiples facettes.....	8
Caractéristiques générales	8
Physiopathologie des infections staphylococciques	8
Evolution de la résistance aux antibiotiques chez <i>S. aureus</i>	10
Concentrations sublétales et résistance aux antimicrobiens.....	12
Prise en charge générale des infections staphylococciques	13
L'ARN polymérase bactérienne	14
Le noyau de l'ARN polymérase.....	14
Les facteurs σ	15
Généralités	15
Les facteurs σ staphylococciques	17
La transcription en trois étapes.....	18
L'initiation.....	18
L'élongation.....	21
La terminaison	22
Quelques inhibiteurs de l'ARN polymérase.....	23
Les rifamycines	23
La fidaxomicine.....	25
L'auréothricine, un possible inhibiteur de l'ARN polymérase ?	26
Les ARN régulateurs	27
Les interactions ARNrég/ARNm.....	28
Les ARNrég agissant en <i>trans</i>	28
Les ARNrég agissant en <i>cis</i>	30
Cas particulier des ARNrég à double fonction.....	32

Les interactions ARNrég/protéines	34
Généralités	34
L'ARN 6S, David contre Goliath ?	36
Contexte de la découverte de l'ARN 6S.....	36
Répartition dans le domaine bactérien	36
Caractéristiques de l'ARN 6S chez <i>E. coli</i>	38
Particularités de l'ARN 6S chez <i>B. subtilis</i>	40
L'ARN 6S chez <i>S. aureus</i>	42
RESULTATS	43
Chapitre 1 : Sensibilité aux antibiotiques dépendante de l'ARN 6S	44
Résultats complémentaires.....	97
Résistance à la rifampicine (Rif ^R) et ARN 6S.....	97
Contrôle transcriptionnel de l'ARN 6S.....	98
Etude des cibles putatives de l'ARN 6S dépendantes de CymR	100
Analyse de la paroi du mutant $\Delta ssrS^{Sa}$	101
Chapitre 2 : Un ARN régulateur issu de la région 5' non traduite (5'UTR) de <i>malk</i> cible la néoglucogénèse chez les vibrions	104
DISCUSSION	123
Un nouveau phénotype associé à l'absence d'ARN 6S	124
Les interactions entre l'ARN 6S et l'ARNpol holoenzyme	126
L'ARN 6S est-il un régulateur global chez <i>S. aureus</i> ?	127
Bibliographie.....	132

Table des figures et tableau

Figure 1. Les quatre vagues épidémiques de <i>S. aureus</i> (Chambers and DeLeo, 2009).	11
Figure 2. L'ARN polymérase des Firmicutes.	15
Figure 3. Structure primaire des facteurs σ du groupe 1 (Murakami and Darst, 2003).	16
Figure 4. L'initiation de la transcription (Murakami and Darst, 2003).	20
Figure 5. L'insertion nucléotidique (Belogurov and Artsimovitch, 2015).	22
Figure 6. Les inhibiteurs de l'initiation de la transcription (Chen et al., 2021).	23
Figure 7. Structures de la rifampicine et de la rifabutine (d'après Floss and Yu, 2005).	25
Figure 8. Structure de la fidaxomicine.	25
Figure 9. Structure de l'auréothricine.	26
Figure 10. Classification des ARN régulateurs selon leur type d'interaction.	27
Figure 11. Principales interactions ARNrég/ARNm en <i>trans</i> .	28
Figure 12. Principales fonctions des riboswitches.	31
Figure 13. Le réseau de régulation de RNAIII (d'après Raina et al., 2018).	33
Figure 14. La <i>trans</i> -traduction (Janssen and Hayes, 2012).	35
Figure 15. Prédictions structurales de l'ARN 6S chez <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> (Wassarman, 2018) et <i>S. aureus</i> (Pichon and Felden, 2005).	37
Figure 16. Mécanisme d'action de l'ARN 6S chez <i>E. coli</i> .	38
Figure 17. Profil d'expression de l'ARN 6S dans différentes conditions (d'après Mäder et al., 2016).	42
Figure 18. Fréquence d'apparition des mutations Rif ^R chez $\Delta ssrS^{Sa}$ et sa souche parentale.	97
Figure 19. Profil transcriptionnel de la souche $\Delta ssrS^{Sa}$ après induction du gène <i>ssrS^{Sa}</i> .	99
Figure 20. Exploration des phénotypes dépendants de CymR dans un contexte génétique $\Delta ssrS^{Sa}$.	100
Figure 21. Test de sensibilité à la vancomycine.	101
Tableau 1. Principales pathologies staphylococciques.	10

INTRODUCTION

Introduction

Staphylococcus aureus, une bactérie aux multiples facettes

Caractéristiques générales

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) est une bactérie Gram positive aéro-anaérobie facultative appartenant au phylum des Firmicutes. Décrite pour la première fois en 1880 en tant qu'agent étiologique d'abcès purulents par le chirurgien Alexander Ogston (Ogston, 1882, 1881), l'espèce fut ensuite caractérisée par Anton Rosenbach en 1884 (Rosenbach, 1884). Comme son nom l'indique, ce coque a été nommé en raison de l'aspect caractéristique de ses colonies, en amas ou en grappes de couleur jaune-dorée.

Ce commensal de la peau et des muqueuses est présent chez environ 30 % de la population. Dans ce groupe de porteurs sains, c'est au niveau des fosses nasales que l'on retrouve principalement cette bactérie (Pilly et al., 2019). Bien qu'inoffensif dans la majorité des cas, ce micro-organisme se révèle être un redoutable pathogène opportuniste.

Physiopathologie des infections staphylococciques

Les infections dues au staphylocoque doré s'étendent du panaris bénin aux fulgurantes endocardite infectieuse ou pneumopathies nécrosantes (**Tableau 1** ; (Lowy, 1998; Pilly et al., 2019; Tong et al., 2015)). Les plus fréquentes et les plus bénignes sont les infections superficielles de la peau et des tissus mous. *S. aureus* colonise la peau grâce à des protéines de surface, les MSCRAMM (*Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules*). Parmi ces adhésines, on retrouve la protéine A, les protéines de liaison au fibrinogène (ClfA et ClfB) et à la fibronectine (FnBPA et FnBPB) ou encore les protéines de liaison au collagène (Cna) (Brière et al., 2014; Clarke and Foster, 2006). L'infection se développe après rupture de la barrière cutanéomuqueuse, lorsque l'équilibre commensal est rompu. La dissémination bactérienne au sein de l'organisme peut donner naissance à des infections invasives plus rares mais pouvant engager le pronostic vital. Ces affections plus graves sont souvent des complications d'atteintes locales, entraînant la diffusion des bactéries par voie hématogène (appelée bactériémie) et le développement de localisations secondaires septiques grâce à des protéines immunomodulatrices et à des enzymes dégradant les tissus de l'hôte. En France, 10% des bactériémies sont associées à une endocardite infectieuse (EI) (Pilly et al., 2019). Les facteurs d'adhésion exprimés par *S. aureus* facilitent le développement de l'EI et la formation de greffe bactérienne pouvant à son tour être source de foyers infectieux secondaires. Les infections ostéo-

articulaires (IOA) sont aussi associées à un mode de contamination par voie hématogène mais également par inoculation directe. Ces infections sont caractérisées par une destruction de l'articulation par chondrolyse et/ou de l'os par ostéolyse, induite par l'inflammation. Généralement, les mécanismes de colonisation ou de formation de biofilm sont favorisés chez les porteurs de dispositifs médicaux implantables (intracardiaques ou articulaires) ou en cas de pathologies préexistantes type valvulopathie pour l'EI ou diabète pour les IOA (infection du pied diabétique). Les staphylocoques sont la principale cause des infections cutanéomuqueuses bactériennes, des bactériémies (30% *S. aureus*, à égalité avec *Escherichia coli*), des EI (40% dont 30% *S. aureus*) et des IOA (Pilly et al., 2019).

Dans son arsenal de facteurs de virulence, *S. aureus* possède de puissants atouts : les toxines. Par exemple, la leucocidine de Panton-Valentine (LPV), essentiellement sécrétée par les SARM (*S. aureus* Résistants à la Méricilline) communautaires, est corrélée à des infections plus graves, nécrosantes et récidivantes (Pilly et al., 2019). Les syndromes toxiques sont classés à part car ils reposent sur un mécanisme physiopathologique différent. Les signes cliniques associés à ses syndromes sont la conséquence des toxines produites par *S. aureus*. Associé dès les années 1980 à l'utilisation de tampons hygiéniques pendant les menstruations (Davis et al., 1980; Osterholm and Forfang, 1982; Shands et al., 1980), le syndrome du choc toxique (SCT) ou choc toxique staphylococcique est le plus connu d'entre eux. Une exotoxine appelée TSST-1 (*Toxic Shock Syndrome Toxin-1*), superantigène entraînant un relargage massif de cytokines pro-inflammatoires (See et al., 1992), est à l'origine du choc septique accompagné de défaillances d'organes et d'un rash maculaire diffus érythémateux. Les TIAC (Toxi-Infections Alimentaires Collectives) résultent également de la production de toxines. Thermorésistantes, ces entérotoxines contaminent les aliments préparés dans le non-respect des mesures d'hygiène. Les principaux symptômes observés sont des troubles gastro-intestinaux, apparaissant 4 à 48h après l'ingestion d'aliments contaminés. De ce fait, les TIAC sont des maladies à déclaration obligatoire étroitement surveillées en France par l'Anses et Santé Publique France.

Caractéristique supplémentaire, *S. aureus* est une des principales causes d'infections associées aux soins (IAS), anciennement nommées infections nosocomiales. On estime qu'entre 7% et 10% des patients hospitalisés dans le monde sont atteints d'IAS (World Health Organization, 2011). Ces infections alarment depuis de nombreuses années puisque l'environnement hospitalier est souvent le creuset idéal favorisant l'émergence de nouvelles souches multirésistantes aux antibiotiques.

Tableau 1. Principales pathologies staphylococciques.

Infections de la peau et des tissus mous		Infections invasives	Syndromes toxiques
Affections superficielles	Affections profondes	-Bactériémie -Endocardite infectieuse -Infections ostéo-articulaires	-Choc toxique staphylococcique -Syndrome d'exfoliation généralisée -Pneumopathies nécrosantes -TIAC
-Panaris -Impétigo -Onyxis -Folliculite -Furoncle -Abscess	-Dermo-hypodermes		

Evolution de la résistance aux antibiotiques chez *S. aureus*

La résistance aux antibiotiques, acquise grâce à des mutations *de novo* ou par transfert horizontal de gènes, est la bête noire des infectiologues depuis l'introduction des antibiotiques dans les protocoles de soins. Elle s'exprime par la modification de la cible de l'antibiotique, de la perméabilité membranaire (*i.e.* augmentation des systèmes d'efflux) ou par la dégradation enzymatique de l'antibiotique (Andersson and Hughes, 2010).

Depuis plus de 80 ans, la plasticité du génome de *S. aureus* lui a permis de développer de nombreuses résistances face aux antibiotiques utilisés pour le contrer (**Figure 1** ; (Chambers and DeLeo, 2009)). Cette capacité à s'adapter a classé *S. aureus* parmi les pathogènes majeurs faisant partie des priorités de l'OMS (World Health Organization, 2014). Découverte en 1928 par Alexander Flemming, la benzylpénicilline (ou pénicilline G) a révolutionné la prise en charge des maladies infectieuses. Cependant, peu de temps après les débuts de son utilisation en routine dans les années 1940, les premières souches hospitalières sécrétrices de pénicillinase ont été identifiées (Barber and Rozwadowska-Dowzenko, 1948; Kirby, 1944). Cette résistance à la pénicilline s'est ensuite largement disséminée et a pris le dessus sur les souches communautaires. En 2010, 9 souches sur 10 de *S. aureus* étaient résistantes à la pénicilline (Dumitrescu et al., 2010).

A la fin des années 1950, un nouvel antibiotique entre dans les stratégies thérapeutiques anti-staphylococciques. Il s'agit de la méticilline, un dérivé de la pénicilline résistant aux pénicillinases. Antibiotique très prometteur, il ne fallut pourtant que quelques mois avant l'apparition sous-estimée des premières souches SARM (Barber, 1961; Jevons, 1961). Grâce à une transpeptidase de faible affinité pour la pénicilline, la PLP2a (Protéine Liant la Pénicilline 2a) codée par le gène *mecA* (Ito et al., 2003), les souches de staphylocoques sont non seulement résistantes à la méticilline mais également aux β -lactamines de manière générale (Peacock and Paterson, 2015). Les SARM sont à l'origine de deux vagues épidémiques hospitalières dont une encore active aujourd'hui (**Figure 1** ; (Chambers and

DeLeo, 2009)). Enfin, depuis les années 1990, une troisième vague épidémique de SARM (quatrième au total) s'est mise en place mais cette fois-ci au sein des infections communautaires (Herold, 1998; Udo, 1993). L'émergence de SARM communautaires ne s'était jamais produite auparavant ; ces souches s'immiscent même désormais dans l'environnement nosocomial (Chambers and DeLeo, 2009).

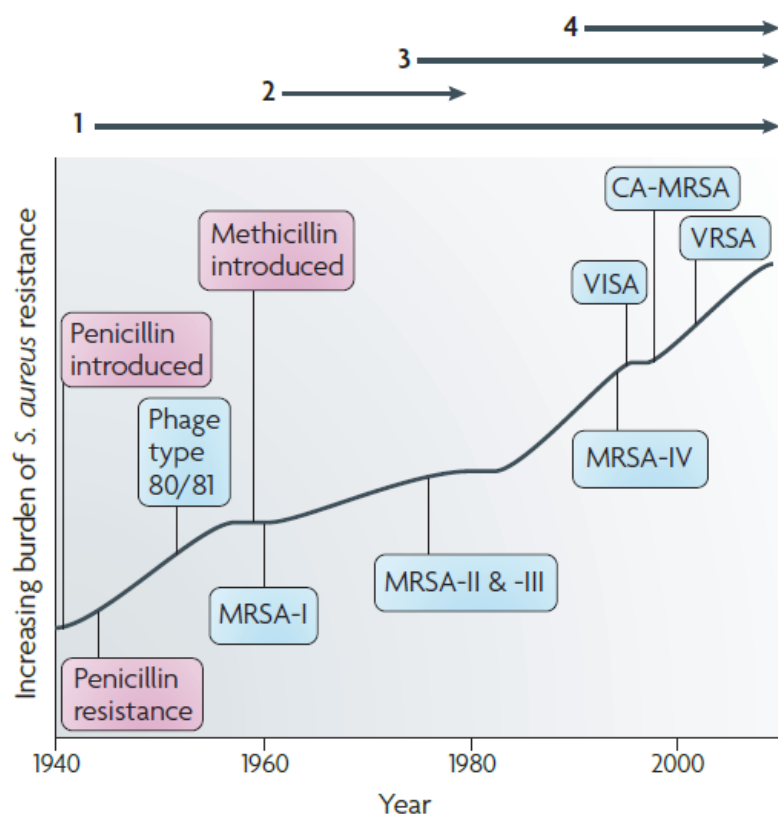


Figure 1. Les quatre vagues épidémiques de *S. aureus* (Chambers and DeLeo, 2009).

Le profil de résistance aux antibiotiques du staphylocoque doré est représenté sur 7 décennies. Les nombres et les flèches représentent respectivement les vagues de résistance successives ainsi que leur durée. MRSA : Methicillin-Resistant *S. aureus* ; CA-MRSA : Community-Associated MRSA ; VISA : Vancomycin-Intermediate *S. aureus* ; VRSA : Vancomycin-Resistant *S. aureus*.

Pour faire face à l'incidence croissante des infections dues aux SARM, peu d'alternatives pharmacologiques sont disponibles. Parmi ces alternatives, la vancomycine. Ce glycopeptide, isolé de *Streptomyces orientalis* en 1952 et inhibant la biosynthèse de la paroi via un mécanisme distinct de celui des β -lactamines, a fait office d'arme de dernier recours dans les années 1980 (Levine, 2006). L'histoire se répétant, la forte pression de sélection exercée sur les SARM a provoqué l'émergence de

souches à sensibilité intermédiaire à la vancomycine (SAIV) et plus rarement totalement résistante à la vancomycine (SARV) (McGuinness et al., 2017). Ces souches se différencient par leur concentration minimale inhibitrice (CMI) de vancomycine (4-8 µg/mL pour les SAIV et ≥ 16 µg/mL pour les SARV) et par leur mécanisme de résistance à la vancomycine. En effet, les SAIV possèdent une résistance partielle à la vancomycine conférée par des mutations variables de gènes impliqués dans la biosynthèse de la paroi bactérienne tandis que les SARV sont totalement résistante à la vancomycine grâce à l'opéron *vanA* dont l'expression aboutit à la modification de la cible de l'antibiotique (Howden et al., 2010; McGuinness et al., 2017).

Ces résistances sont d'autant plus redoutables qu'on les retrouve combinées à d'autres types de résistance au sein de souches multirésistantes. Par exemple, les souches SAIV sont principalement associées à la résistance à la méticilline (Appelbaum, 2007; Howden et al., 2010), cas de figure beaucoup plus rare pour les souches SARV (Vestergaard et al., 2019). Les antibiotiques introduits dans les années 2000 dans la prise en charge thérapeutique n'échappent pas à la règle. La résistance à la daptomycine, un lipopeptide provoquant la mort cellulaire par perméabilisation (Miller et al., 2016), est souvent associée à la résistance à la vancomycine grâce à des mécanismes de résistance similaires impactant le métabolisme de la paroi (Foster, 2017). Un des mécanismes de résistance au linézolide, une oxazolidinone inhibitrice de la synthèse protéique (Leach et al., 2007), est lié au gène *cfr* (Toh et al., 2007). Ce gène code pour une méthyltransférase ribosomique également impliquée dans la résistance au chloramphénicol ainsi qu'aux apparentés aux macrolides (Long et al., 2006). La résistance à la rifampicine, dont l'usage anti-staphylococcique est empirique, peut être associée à une sensibilité diminuée à la vancomycine et à la daptomycine (Guérillot et al., 2018). Cette résistance repose sur un mécanisme différent de ceux décrits précédemment puisqu'elle est provoquée par une mutation ponctuelle du gène *rpoB* codant la sous-unité β de l'ARN polymérase (ARNpol).

Cette liste non exhaustive de résistances croisées souligne l'importance d'adapter les stratégies thérapeutiques anti-infectieuses. Cependant, l'émergence de souches résistantes est multifactorielle et s'étend bien au-delà du chevet du patient.

Concentrations sublétales et résistance aux antimicrobiens

Pendant de nombreuses années, l'effet des concentrations sublétales ou subinhibitrices d'antibiotiques sur la sélection de mutants a été sous-estimé. Aujourd'hui l'on sait que de faibles quantités d'antibiotique peuvent sélectionner progressivement des mutants à haut niveau de résistance et induire de la variabilité génétique plus globalement, ou perturber la physiologie bactérienne (Andersson and Hughes, 2014; Hershberg, 2017; Lorian, 1975). De plus, les concentrations

d'antibiotiques inférieures à la CMI peuvent favoriser le développement de bactéries tolérantes, métaboliquement ralenties et capables de survivre à de fortes expositions antibiotiques sans avoir de marqueurs de résistance, ou de cellules persistantes lorsque la tolérance ne concerne qu'une sous-population bactérienne (Brauner et al., 2016; Johnson and Levin, 2013). Or la tolérance semble être l'étape préliminaire nécessaire à la mise en place de la résistance (Levin-Reisman et al., 2017). Ces traces d'antibiotique sont présentes dans le corps des patients lorsque le traitement est sous-dosé ou terminé, mais également dans l'environnement. Les cours d'eau et les sols sont facilement contaminés par les eaux usées dans lesquelles sont éliminés les antibiotiques que nous utilisons tous les jours. Ces antibiotiques proviennent de nos usages phytopharmaceutiques, thérapeutiques (y compris vétérinaires) ou de rejets industriels (Andersson and Hughes, 2014). La pression de sélection s'exerce donc partout, y compris sur les agents responsables de zoonoses, même si l'impact des résistances sélectionnées en milieu agricole sur la santé humaine n'est pas totalement établi (Ter Kuile et al., 2016). Il est donc essentiel d'optimiser l'utilisation des antibiotiques, quel qu'en soit le domaine d'application.

Prise en charge générale des infections staphylococciques

Le panel de résistances existant chez *S. aureus* conditionne la prise en charge thérapeutique des staphylococcies qui s'appuie, lorsque cela est requis, sur l'analyse de l'antibiogramme. Le traitement de référence des affections staphylococciques repose sur l'utilisation de molécules de la famille des Pénicillines M. En tant que premier représentant, la méticilline a donné son initiale (« M ») à cette famille de β -lactamines mais elle a laissé sa place de chef de file à l'oxacilline, moins toxique. Dans le cas d'infections causées par des SARM, les glycopeptides (dont la vancomycine) sont utilisés en première intention (Pilly et al., 2019).

Certaines situations imposent l'utilisation de combinaisons thérapeutiques. C'est par exemple le cas de la rifampicine, utilisée en association pour traiter les infections compliquées, en particulier sur matériel implantable (Pilly et al., 2019). Cependant, son utilisation est de plus en plus restreinte. L'étude ARREST publiée en 2018 et menée sur 758 patients (Thwaites et al., 2018) a démontré que l'utilisation concomitante de rifampicine dans le traitement des bactériémies à *S. aureus* n'était pas justifiée.

Un paragraphe consacré à la rifampicine est développé dans le chapitre « **Quelques inhibiteurs de l'ARN polymérase** ».

L'ARN polymérase bactérienne

L'ARN polymérase est le moteur du processus transcriptionnel, élément central de l'expression génique. C'est un complexe protéique essentiel composé de différentes sous-unités, extrêmement conservé parmi les procaryotes et au-delà (Ebright, 2000; Griesenbeck et al., 2017; Werner and Grohmann, 2011). Chez les bactéries, on distingue le noyau de l'enzyme, formé principalement des sous-unités α , β , β' et ω , de l'holoenzyme composée des éléments précédents couplés au facteur σ . Lorsque l'enzyme est ADN-dépendante, elle permet de synthétiser des transcrits d'ARN à partir de brins d'ADN matrice. Ce phénomène de transcription englobe trois étapes ; l'initiation, l'élongation et la terminaison.

Le noyau de l'ARN polymérase

En 1999, Zhang et al. ont déterminé pour la première fois la structure d'une ARNpol bactérienne, celle de *Thermus aquaticus* (Zhang et al., 1999). Classiquement, le cœur de l'enzyme comprend quatre sous-unités essentielles ($\alpha_2\beta\beta'$) et une sous-unité accessoire ω (**Figure 2** ; (Darst, 2001; Murakami, 2015; Murakami and Darst, 2003)), le tout formant une « pince de crabe ». Chaque sous-unité joue un rôle dans la stabilité, la cohésion, l'interaction ou l'activité catalytique de l'ARNpol.

Les sous-unités α (RpoA) se situent à la jonction des sous-unités $\beta\beta'$. Elles possèdent chacune un domaine C-terminal (α -CTD) relié à un domaine N-terminal (α -NTD) par une région interdomaine flexible (Blatter et al., 1994). Le dimère α_2 forme le socle d'assemblage de la pince grâce au domaine α -NTD (Zhang, 1998; Zhang et al., 1999). Le domaine α -CTD participe à la reconnaissance de l'ADN en amont des régions promotrices (Blatter et al., 1994; Gourse et al., 2000) et interagit également avec les facteurs σ (notamment σ^{70} chez *E. coli*) qui sont les acteurs principaux de la spécificité transcriptionnelle (Chen et al., 2003; Ross et al., 2003).

Les sous-unités β (RpoB) et β' (RpoC) constituent la pince à proprement parlé. Elles forment deux conduits communicants : le premier accueille d'un côté l'ADN et les duplex ADN/ARN puis expulse l'ADN et l'ARN nouvellement synthétisé de l'autre, et le second permet l'entrée des nucléotides (Lee and Borukhov, 2016). Le site catalytique, siège de la formation des liaisons phosphodiester, est composé d'un ion Mg^{2+} . Ce dernier est lié à trois acides aspartiques appartenant au motif conservé NADFDGD dans la séquence de β' (Darst, 2001). Ce site actif se situe au niveau du premier conduit, entouré par cinq domaines mobiles caractéristiques de β et β' (Ghosh et al., 2010; Nudler, 2009).

La sous-unité accessoire ω (RpoZ) interagit directement avec l'extrémité C-terminale de β' (Lee and Borukhov, 2016), ce qui garantit l'assemblage et assure l'intégrité du noyau de l'enzyme (Kurkela et al., 2021; Weiss and Shaw, 2015). En effet, ω agirait comme une chaperonne en contrôlant le

repliement de β' et en la protégeant de la dégradation. ω influence également le recrutement des facteurs σ (Kurkela et al., 2021). Chez *S. aureus*, la délétion de *rpoZ* engendre un changement de profil transcriptionnel, suggérant un recrutement accru du facteur σ^B , ainsi qu'un défaut de formation de biofilm (Weiss et al., 2017).

Ce complexe d'environ 400 kDa peut varier en fonction des clades bactériens. En effet, les bactéries Gram positives possèdent deux sous-unités accessoires supplémentaires, δ (RpoE) et ϵ (RpoY) (**Figure 2** ; (Weiss and Shaw, 2015)). δ interagit avec les sous-unités β/β' et serait un élément important pour la spécificité transcriptionnelle de l'ARNpol, la virulence et la survie au long terme (Weiss et al., 2014; Weiss and Shaw, 2015). ϵ est la dernière sous-unité identifiée chez les Firmicutes. Autrefois assimilée à ω , elle aurait un rôle dans la protection contre les bactériophages par homologie de structure avec un inhibiteur transcriptionnel viral (Keller et al., 2014).

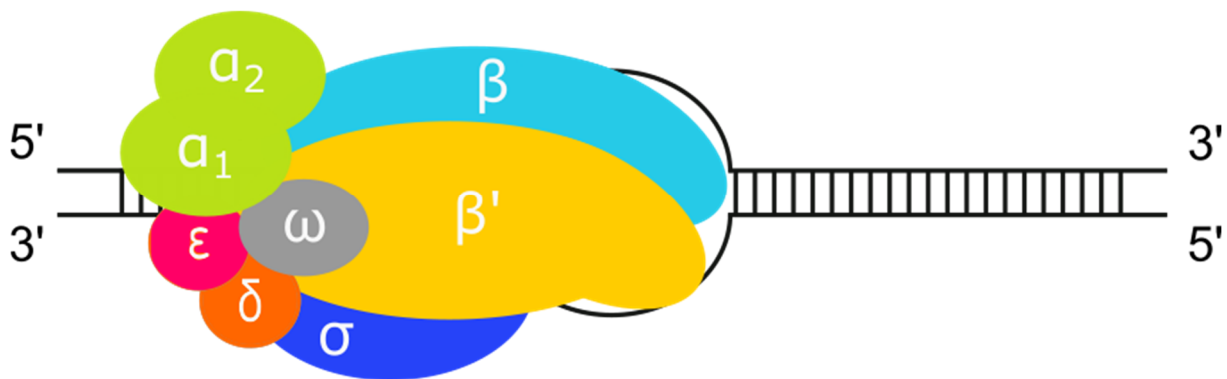


Figure 2. L'ARN polymérase des Firmicutes.

L'ARN polymérase bactérienne est composée de deux sous-unités α , auxquelles s'ajoutent les sous-unités β , β' , ω et σ . On retrouve deux sous-unités accessoires supplémentaires chez les Gram positifs, δ et ϵ (spécifique des Firmicutes). L'ARN polymérase est représentée en début de transcription, en interaction avec le complexe ouvert de l'ADN.

Les facteurs σ

Généralités

Les facteurs σ sont indispensables à la formation transitoire du complexe holoenzyme ($\alpha_2\beta\beta'\omega(\delta\epsilon)\sigma$) afin d'initier la transcription. Ils contribuent aux changements de profil transcriptionnel en fonction des conditions environnementales grâce à leurs capacités de reconnaissance des

séquences promotrices et d'interaction avec d'autres facteurs de transcription. Leur contrôle de l'initiation de la transcription s'exprime également par leur aptitude à dissocier les deux brins de l'ADN et à stabiliser le complexe ouvert de transcription (Davis et al., 2017). Il existe un nombre variable de facteurs σ selon les espèces, pouvant aller jusqu'à plus de soixante pour *Streptomyces coelicolor* (Feklístov et al., 2014; Gruber and Gross, 2003). Sept facteurs ont été identifiés chez *E. coli* (σ^{70}/σ^D , σ^{38}/σ^S , σ^{32}/σ^H , σ^{28}/σ^F , σ^E , σ^{54}/σ^N et σ^{feca}) (Burgess, 2001) et constituent la base de la classification des facteurs σ . Il existe deux grandes familles de facteurs σ (les familles σ^{70} et σ^{54}), sachant que ces facteurs sont pour la plupart des homologues de σ^{70} (Feklístov et al., 2014; Gruber and Gross, 2003). Généralement, on différencie les facteurs σ végétatifs (facteurs primaires), responsables de la transcription des gènes de ménage, des facteurs σ alternatifs en charge de l'adaptation aux conditions de croissance. La famille σ^{54} est liée au métabolisme de l'azote. Au sein de la famille σ^{70} , il existe 4 groupes de facteurs classés selon leur degré d'identité et leurs fonctions (Feklístov et al., 2014; Gruber and Gross, 2003). Les facteurs σ du groupe 1 représentent les facteurs primaires (dont σ^{70}). Le groupe 2 de la famille σ^{70} comprend des facteurs non essentiels comme σ^S chez *E. coli*, pouvant être mis en jeu dans la réponse au stress ou l'adaptation à la phase stationnaire. Le troisième ensemble regroupe des facteurs impliqués dans la réponse au choc thermique ou encore la sporulation. Le groupe 4 comprend entre autres la famille des *ECF* (*extracytoplasmic function*), des facteurs aux fonctions périmembranaires sensibles aux stimuli environnementaux et régulés par des anti- σ transmembranaires (Helmann, 2002).

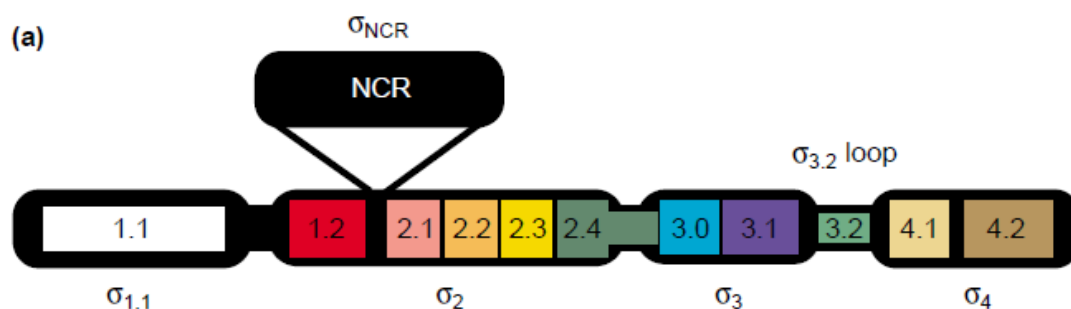


Figure 3. Structure primaire des facteurs σ du groupe 1 (Murakami and Darst, 2003).

Les régions conservées au sein de chaque domaine sont indiquées en couleurs et identifiables par un code. NCR : nonconserved region.

Les facteurs de la famille σ^{70} sont structurés en domaines. Les plus documentés sont les facteurs du groupe 1 : ils sont composés de quatre principaux domaines, $\sigma_{1.1}$, σ_2 , σ_3 et σ_4 (Figure 3 ; (Campbell et al., 2002; reviewed in Murakami and Darst, 2003)). La flexibilité de ces domaines facilite

la reconnaissance des promoteurs. Le domaine $\sigma_{1.1}$ (région N-terminale) inhibe la reconnaissance des promoteurs lorsque σ est sous forme libre et favorise dans certains cas la formation du complexe ouvert de transcription (« open complex ») (Murakami and Darst, 2003). σ_2 , σ_3 et σ_4 interagissent respectivement avec les éléments -10, -10 étendu et -35. Le domaine σ_2 , en contact avec β' , est également important pour l'ouverture du brin d'ADN, stabilisée par σ_3 . σ_4 forme une poche dans laquelle vient se loger un des domaines de la sous-unité β , facilitant ainsi l'interaction de l'ADN en amont avec les sous-unités α et les facteurs de transcriptions (Campbell et al., 2002; Davis et al., 2017; Murakami and Darst, 2003). De récents travaux indiquent que le domaine σ_4 stabilise le duplex ADN/ARN nouvellement formé et encourage l'activité processive de l'ARNpol (Brodolin and Morichaud, 2021). L'organisation en domaines diffère selon les groupes mais la structure tertiaire des domaines σ_2 et σ_4 semble particulièrement conservée parmi les membres de la famille σ^{70} (Feklistov et al., 2014; Gruber and Gross, 2003).

Les facteurs σ staphylococciques

S. aureus possède quatre facteurs σ . Les deux principaux facteurs sont σ^A et σ^B tandis que σ^S et σ^H sont considérés comme cryptiques.

σ^A est le facteur σ primaire de *S. aureus*. Caractérisé par Deora et Misra en 1996 (Deora and Misra, 1996) à partir des données de *B. subtilis*, il est considéré comme l'*alter ego* de σ^{70} chez *E. coli*. En effet, ce facteur essentiel assure l'expression de la majorité des gènes et en particulier des gènes de ménage durant la phase exponentielle de croissance (Mäder et al., 2016).

Identifié peu de temps après le facteur végétatif σ^A (Deora et al., 1997), σ^B est le principal facteur σ alternatif du staphylocoque doré. Appartenant à la famille σ^{70} , il est présent chez de nombreux Gram positifs riches en AT des genres *Bacillus*, *Listeria* et *Staphylococcus* (van Schaik and Abee, 2005). Il s'agit du principal facteur de réponse au stress : stress physico-chimique (choc thermique ou osmotique, variation de pH, oxydation (Kullik et al., 1998; Pané-Farré et al., 2006)), stress physiologique (entrée en phase stationnaire (Pané-Farré et al., 2006), défenses de l'hôte (Tuchscher et al., 2015), formation de biofilm (Mitchell et al., 2010; Valle et al., 2019)), stress antibiotique (résistance aux antibiotiques ciblant la paroi (Singh et al., 2003; Wu et al., 1996)). Cependant le facteur σ^B n'intervient pas seulement dans des situations de stress ; il régule des processus relatifs au métabolisme basal comme la biosynthèse de la paroi ou la pigmentation et il est l'élément clé de la virulence chez *S. aureus* (Bischoff et al., 2004; Kullik et al., 1998; Pané-Farré et al., 2006). Un peu plus de 9% des promoteurs sont σ^B -dépendants. Le niveau d'expression basal du régulon σ^B est assez élevé même s'il est plus fortement exprimé en phase stationnaire (Mäder et al., 2016). La régulation de σ^B

est particulière puisqu'il s'agit à ce jour du seul facteur staphylococcal pour lequel un anti-sigma, RsbW, a été identifié (Miyazaki et al., 1999). Chez *S. aureus*, il existe seulement trois protéines Rsb homologues à celles de *B. subtilis* : RsbU, un activateur de σ^B (Giachino et al., 2001), RsbW, l'anti-sigma, et RsbV, l'antagoniste de RsbW (Palma and Cheung, 2001; van Schaik and Abee, 2005). Les gènes codant σ^B et ses protéines régulatrices (*sigB*, *rsbU*, *rsbV*, *rsbW*) appartiennent à la même unité de transcription et la synténie est conservée par rapport à *B. subtilis* (Miyazaki et al., 1999).

σ^H et σ^S sont des facteurs cryptiques possédant des fonctions très spécifiques. σ^H , caractérisé au début des années 2000, est un orthologue du facteur éponyme retrouvé chez *B. subtilis* (Morikawa et al., 2003). Ce facteur est impliqué dans la régulation positive de la compétence naturelle via l'induction de l'expression des opérons *comE* et *comG* malgré une faible efficacité de transformation (Morikawa et al., 2012, 2003). Une des hypothèses avancées serait l'absence de régulation par σ^H de certains gènes essentiels pour la compétence (Fagerlund et al., 2014). Il est également impliqué dans la régulation génétique de certains prophages staphylococciques (Tao et al., 2010). σ^S est le dernier facteur identifié chez *S. aureus* (Shaw et al., 2008). Il a été classé comme potentiel facteur extra-cytoplasmique (ECF) par homologie de séquence. Les travaux menés sur ce facteur suggèrent un rôle dans la survie au long court, la virulence et le maintien de l'intégrité de la paroi et de l'ADN suite à un stress (Miller et al., 2012; Shaw et al., 2008).

La transcription en trois étapes

La transcription est un processus actif de synthèse de l'ARN orientée 5' $\rightarrow$ 3', à partir des précurseurs nucléosidiques adénosine, guanosine, cytidine et uridine. Elle repose notamment sur la flexibilité des sous-unités de l'ARNpol décrites précédemment. Trois principales étapes sont identifiables pendant la transcription : l'initiation, l'élongation et la terminaison. Les premiers éléments structuraux de ces mécanismes ont été décrits chez *T. aquaticus* (Murakami and Darst, 2003).

L'initiation

L'initiation de la transcription se décompose elle-même en six étapes (**Figure 4** ; (Chen et al., 2021; Murakami and Darst, 2003)). L'holoenzyme reconnaît le promoteur qui interagit principalement avec les régions σ_2 et σ_4 . Le complexe d'initiation nouvellement formé est appelé complexe initial fermé (**Figure 4(a)**). La région $\sigma_{1.1}$ et la boucle $\sigma_{3.2}$ sont dans le conduit principal près du site actif Mg^{2+} , maintenus en place grâce à des liaisons électrostatiques indiquées par des symboles + ou – sur le schéma. Il s'ensuit un état intermédiaire durant lequel l'élément -10 de la région promotrice se déforme (**Figure 4(b)**), conduisant à la formation d'un complexe ouvert de transcription (**Figure 4(c)**).

L'ADN se déroule alors au-delà du site d'initiation de la transcription, aussi appelé +1 de transcription. La bulle de transcription ainsi formée s'ouvre et s'approche du site catalytique via son brin matrice. Les nucléotides arrivent par le conduit secondaire et s'incorporent au nouveau brin d'ARN qui se heurte à la boucle $\sigma_{3.2}$ toujours présente dans l'embouchure principale. Plusieurs cycles d'initiation abortive, durant lesquels l'ARNpol produit les mêmes petits transcrits, vont s'enchaîner. Ce phénomène itératif s'achève lorsque la bulle de transcription s'étend suffisamment en aval et que l'ARN en cours de synthèse est assez long (environ 12 nucléotides) pour pouvoir déplacer la boucle $\sigma_{3.2}$ et libérer ainsi le conduit de sortie de l'ARN (**Figure 4(d)**). Le brin d'ARN nouvellement synthétisé engendre ainsi un changement de conformation et une déstabilisation des interactions entre régions promotrices (-35) et complexe σ_4/β (**Figure 4(e)**), ce qui permet à l'ARNpol d'entamer l'élongation du brin d'ARN et de se détacher du facteur σ (**Figure 4(f)**).

Figure 4. L'initiation de la transcription (Murakami and Darst, 2003).

L'étape de l'initiation est détaillée en six états successifs : (a) complexe initial fermé (RPC : « initial closed promoter complex »), (b) état intermédiaire, (c) complexe ouvert promoteur-ARNpol (RPO : « open RNAP-promoter complex ») et initiation abortive, (d) fin de l'initiation abortive, (e) échappement de l'ARNpol du promoteur et (f) complexe d'élongation de transcription (TEC : « transcription elongation complex »). L'ARNpol holoenzyme est représentée en gris exceptés une région de la sous-unité β (« β flap » en bleu) et le facteur σ (en orange). La majeure partie de la sous-unité β a été retirée pour plus de visibilité. L'ADN est symbolisé par deux hélices vertes, l'ARN néo-synthétisé par un filament rouge et le site catalytique par une sphère jaune.

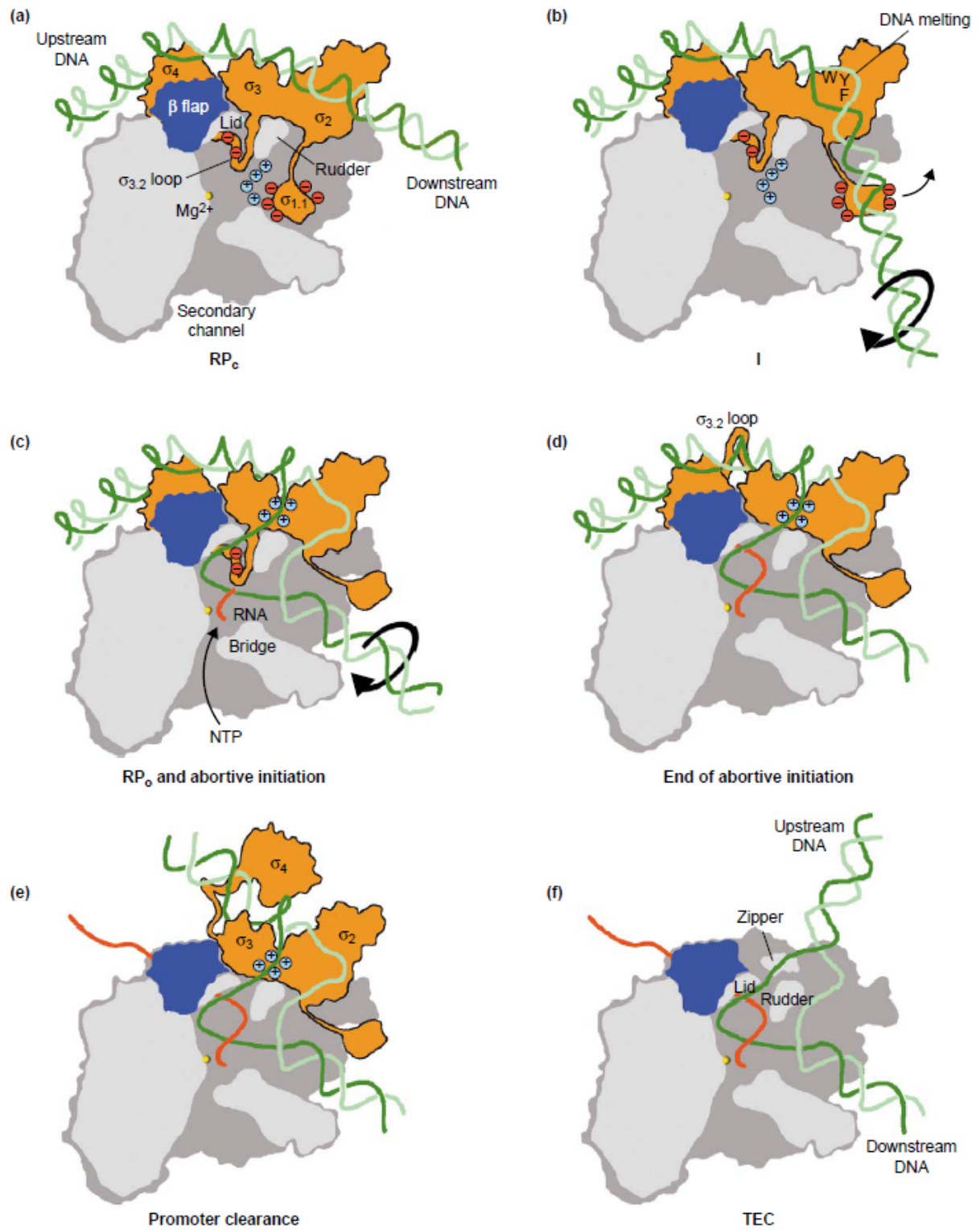


Figure 4. L'initiation de la transcription (Murakami and Darst, 2003).

Cf. légende page précédente.

L'élongation

L'élongation est un phénomène processif durant lequel l'ARNpol se déplace le long de l'ADN et poursuit la synthèse de l'ARN correspondant. Le complexe d'élongation ternaire (CET) est composé du noyau de l'enzyme en interaction avec l'ADN et l'ARN néo-synthétisé. Parallèlement au relargage du facteur σ , les sous-unités β et β' se réarrangent pour former un conduit principal plus étroit et créer une cavité de sortie pour l'ARN, favorisant ainsi la stabilité du CET (Mustaev et al., 2017). Le site actif, à cheval sur des régions β et β' , est symbolisé par trois éléments : le site *i* (*insertion*), siège de la réaction d'élongation composé de trois résidus aspartate et d'un ion Mg^{2+} ; le site *i+1*, futur site d'insertion nucléotidique ; et la boucle G, « trigger loop », qui obstrue le passage des nucléotides et empêche l'accès au site actif grâce à une autre région β' appelée « bridge helix » (**Figure 5** ; (Vassilyev et al., 2007b). Les ribonucléotides sont donc incorporés un par un au niveau de l'extrémité 3' de l'ARN. L'ADN double brin en aval est stabilisé grâce à des interactions électrostatiques et de van der Waals. L'hybride ADN/ARN (9-10 pb) est maintenu au cœur de la zone catalytique grâce à des liaisons polaires et des liaisons de van der Waals. L'ARN est stabilisé par des liaisons hydrogène dans le conduit de sortie. La région « lid » de la sous-unité β' pourrait induire par encombrement stérique la séparation de l'hybride et de l'ADN en amont tout en favorisant l'appariement des bases en aval (Vassilyev et al., 2007a). L'activité du CET est influencée par différents éléments comme les acides nucléiques ou des facteurs protéiques, pouvant engendrer des pauses plus ou moins réversibles pendant l'élongation. Certaines pauses de l'ARNpol sont associées à un phénomène de retour en arrière de l'ARNpol. Cela entraîne un déplacement de l'extrémité 3' de l'ARN du site catalytique qui se retrouve coincé dans le conduit secondaire réservé au passage des ribonucléotides. Le CET est doté d'une activité hydrolase stimulée par les facteurs GreA et B, permettant de cliver l'ARN bloqué et de faire redémarrer la machinerie transcriptionnelle (Mustaev et al., 2017). L'atténuation transcriptionnelle est également un moyen de contrôler l'élongation. Une des régulations de l'opéron tryptophane en est un exemple. En début d'opéron, il existe un site atténuateur appartenant à la séquence *leader*. Lors de la transcription de cette séquence leader, l'ARNpol ralentit sur le site atténuateur, ce qui lui permet d'attendre le recrutement des ribosomes. Si des ARNt non chargés en tryptophane viennent à manquer lors de la synthèse du peptide *leader*, les ribosomes s'arrêtent sur l'ARNm qui adopte en aval une conformation anti-terminatrice ; ce mécanisme permet donc à l'ARNpol de poursuivre la transcription de l'opéron tryptophane (Yanofsky, 1981).

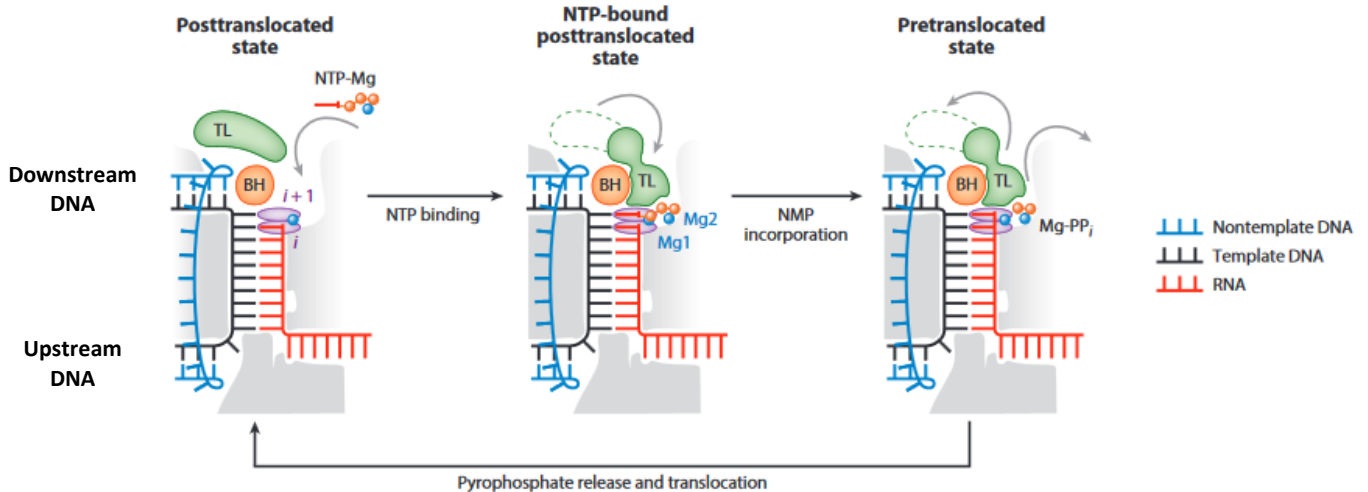


Figure 5. L'insertion nucléotidique (Belogurov and Artsimovitch, 2015).

Les nucléotides complexés avec un ion magnésium s'insèrent au niveau du site $i+1$ puis ils sont incorporés à l'ARN au niveau du site i (site de la réaction) sur lequel est présent un second ion Mg^{2+} . La formation du pont phosphodiester entraîne la libération d'un pyrophosphate couplé au magnésium ($Mg-PP_i$). BH : « Bridge Helix » ; TL : « Trigger Loop ».

La terminaison

Il existe deux principaux mécanismes de terminaison de la transcription chez les procaryotes, la terminaison intrinsèque et la terminaison dépendante du facteur ρ . La terminaison intrinsèque ou ρ indépendante est la conséquence d'un changement de conformation de l'ARN en cours de synthèse. Ce dernier adopte une structure secondaire caractéristique en épingle à cheveux appelée terminateur, entraînant la déstabilisation du complexe d'élongation et le décrochage de l'ARNpol *in fine*. Le terminateur est en général riche en GC (bases ayant une plus forte énergie de liaison par rapport au couple AU) et il est suivi d'une séquence poly-U à l'origine du ralentissement puis du désengagement de la polymérase (Ray-Soni et al., 2016). La terminaison ρ -dépendante requiert l'action d'un facteur supplémentaire, le facteur ρ , une hélicase ATP-dépendante. Le mécanisme consensuel proposé jusqu'alors impliquait la liaison de cette hélicase à certaines séquences ribonucléiques appelées *rut* (« Rho-Utilization element ») suivie d'une étape de glissement autour de l'ARN jusqu'à atteindre le complexe d'élongation (Ray-Soni et al., 2016). De récents travaux remettent en cause ce précepte et confirment l'hypothèse de déstabilisation de l'ARNpol par modulation allostérique avancée 10 ans plus tôt (Epshtein et al., 2010). En effet, ρ interagit directement avec l'ARNpol grâce à deux autres facteurs, NusA et NusG ; tous ces éléments sont capables de former un complexe pré-terminal dès le début de l'élongation, avant que ρ ne rencontre l'ARN (Hao et al., 2021; Said et al., 2021).

Quelques inhibiteurs de l'ARN polymérase

La transcription étant un phénomène biologique essentiel, l'ARNpol est naturellement devenue une cible de choix pour le développement de nouveaux antibiotiques. Les nombreux inhibiteurs identifiés et caractérisés ont participé à la découverte des différentes étapes de la transcription (**Figure 6** ; (Chen et al., 2021; Mosaei and Harbottle, 2019)). Dans ce chapitre seront détaillées les caractéristiques des inhibiteurs de l'ARNpol utilisés en thérapeutique, la rifampicine, la rifabutine et la fidaxomicine, ainsi que celles d'une molécule moins connue, l'auréothricine.

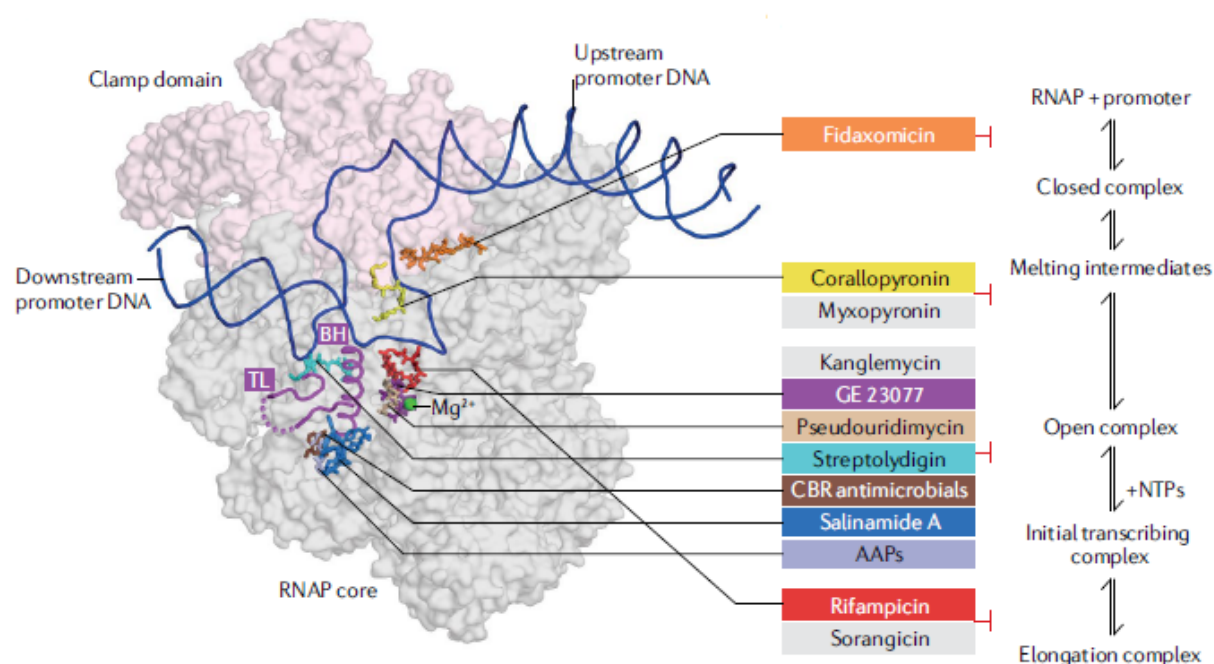


Figure 6. Les inhibiteurs de l'initiation de la transcription (Chen et al., 2021).

A gauche, les structures disponibles de différents inhibiteurs (en couleurs ; liste non exhaustive) sont représentées en association avec l'ARNpol (grisée). Les structures de la kanglemycine et de la sorangicine ont été supprimées car leur position se superpose à celle de la rifampicine, idem pour la myxopyronine vis-à-vis de la coralopyronine. Dans la partie droite du schéma, les inhibiteurs sont regroupés en fonction de la phase transcriptionnelle qu'ils affectent. La sphère verte Mg^{2+} indique le site actif. AAPs : $N\alpha$ -aroyl- N -arylphenylalaninamides ; BH : « Bridge Helix » ; TL : « Trigger Loop ».

Les rifamycines

Les rifamycines constituent un sous-groupe de la famille des ansamycines, molécules possédant une structure en forme d'anse. Les rifamycines ont été nommées ainsi en référence à un

film français très populaire au moment de leur découverte à la fin des années 1950, « Du rififi chez les hommes » (Floss and Yu, 2005; Sensi et al., 1959).

La rifampicine (3-(4-méthyl-1-piperazinyl-imminométhyl)-rifamycine) est une molécule semi-synthétique qui dérive de la rifamycine B, produite par *Amycolatopsis mediterranei* (anciennement *Streptomyces mediterranei*) (**Figure 7** ; (Floss and Yu, 2005)). Cet antibiotique bactéricide inhibe l'ARNpol bactérienne par encombrement stérique ; il se lie à la sous-unité β de l'ARNpol grâce à des liaisons hydrogène ou de van der Waals, précisément dans le conduit principal ADN/ARN et près du site actif, empêchant ainsi l'élongation de la transcription entre les deuxième et troisième nucléotides synthétisés (Campbell et al., 2001; McClure and Cech, 1978). Cette molécule rouge-orangée possède une fenêtre d'action très étroite pendant l'étape d'initiation de la transcription puisqu'elle n'empêche pas l'incorporation du premier nucléotide et n'a plus aucun effet au-delà de quelques nucléotides synthétisés (Campbell et al., 2001; Sippel and Hartmann, 1968). Certains auteurs ont proposé un autre mécanisme d'inhibition de l'ARNpol, par modulation allostérique de la liaison du Mg^{2+} au site catalytique (Artsimovitch et al., 2005), mais cette hypothèse fut réfutée peu de temps après (Feklistov et al., 2008). La rifampicine est principalement indiquée dans la prise en charge des infections mycobactériennes comme la tuberculose. Elle peut également être utilisée pour lutter contre les infections staphylococciques en fonction de la localisation, du type d'infection (en particulier sur matériel implantable) et de l'antibiogramme. En curatif, elle est toujours utilisée en association afin d'éviter l'émergence rapide de mutants résistants (Pilly et al., 2019). Ces mutants sont en majorité caractérisés par une mutation ponctuelle au sein du gène *rpoB* engendrant la substitution d'un acide aminé de la sous-unité β impliqué plus ou moins directement dans l'interaction avec la rifampicine (Campbell et al., 2001; Goldstein, 2014). Chez la plupart des bactéries initialement sensibles à la rifampicine, ces mutations se répartissent au sein de *clusters* appelés *Rif^R-determining region* (RRDR). Une équipe a référencé toutes les mutations décrites chez *S. aureus* (Guérillot et al., 2018). La résistance à la rifampicine (Rif^R), peu coûteuse, peut être à l'origine de résistances croisées avec d'autres inhibiteurs de l'ARNpol ou d'autres antibiotiques (i.e. β -lactamines, vancomycine ou daptomycine chez *S. aureus* (Guérillot et al., 2018)).

La rifabutine, dérivé spiropipéridyle de la rifamycine S mis en évidence dans les années 1980 (Bruna et al., 1983; Sanfilippo et al., 1980), est mécaniquement et structuralement très proche de la rifampicine (**Figure 7**). Les différences entre ces deux molécules sont essentiellement d'ordre pharmacocinétique (meilleure pénétration intracellulaire et interactions

médicamenteuses moindres avec la rifabutine) (Bruna et al., 1983; Crabol et al., 2016). La rifabutine est majoritairement utilisée dans le traitement des infections mycobactériennes non tuberculeuses (Pilly et al., 2019).

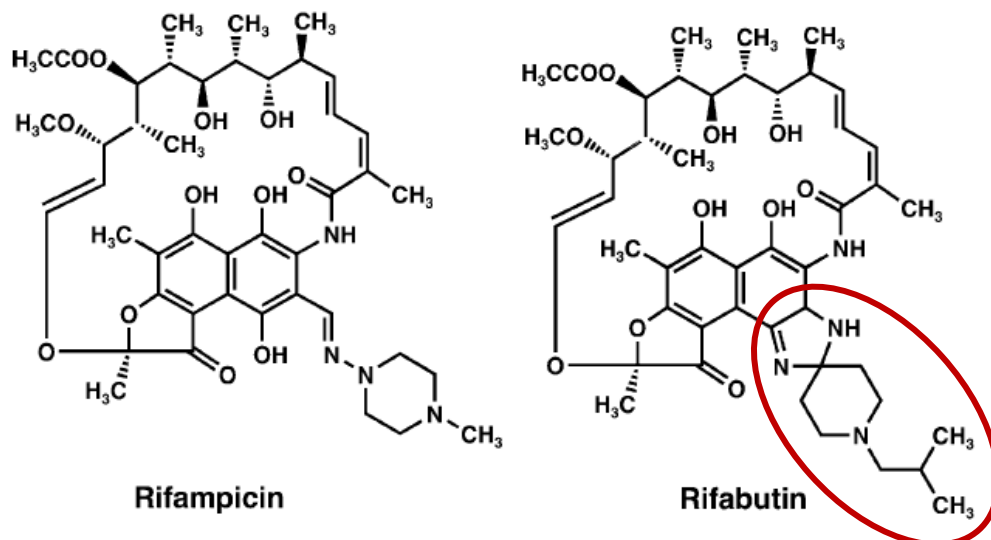


Figure 7. Structures de la rifampicine et de la rifabutine (d'après Floss and Yu, 2005).

La rifampicine et la rifabutine sont deux rifamycines. Le noyau naphthoquinone de la rifabutine est substitué par un groupement spiropipéridyle (entouré en rouge).

La fidaxomicine

La fidaxomicine est la forme active d'une molécule extraite pour la première fois à partir d'*Actinoplanes deccanensis* dans les années 1970. Au moment de sa découverte, cette molécule est nommée lipiarmycine, en référence à la date d'isolation de la souche productrice, le 29 février 1972, année bissextile ou « leap year » en anglais (Coronelli et al., 1975; Parenti et al., 1975). Dès 1986, des molécules similaires, nommées tiacumicine B et clostomicine B1, ont été isolées à partir de *Dactylosporangium aurantiacum* subsp. *hamdenensis* (Theriault

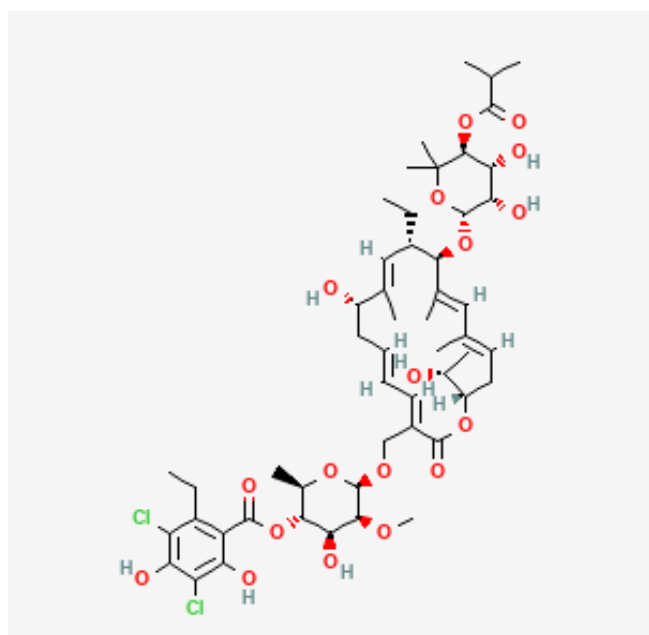
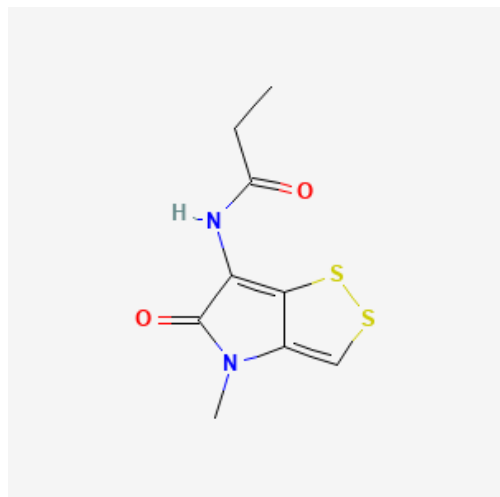


Figure 8. Structure de la fidaxomicine.

et al., 1987) et *Micromonospora echinospora* subsp. *armeniaca* (Omura et al., 1986) respectivement. L'action inhibitrice de l'ARN polymérase associée à la fidaxomicine a été mise en évidence dès la première isolation (Coronelli et al., 1975; Talpaert et al., 1975) mais son mécanisme d'action n'est que partiellement élucidé. Cet antibiotique macrocyclique inhibe l'initiation de la transcription avant la formation du complexe ouvert (Artsimovitch et al., 2012; Tupin et al., 2010); il bloquerait la pince de l'ARNpol en position ouverte empêchant ainsi l'interaction complète du complexe transcriptionnel avec les régions promotrices (Lin et al., 2018). Son spectre antibactérien est étroit ; la fidaxomicine est active essentiellement contre les bactéries anaérobies et contre quelques Gram positifs dont *S. aureus*, réduisant ses indications thérapeutiques aux infections causées par *Clostridioides difficile* (Pilly et al., 2019). La résistance à la fidaxomicine est peu fréquente ; elle est due à une mutation ponctuelle au niveau des gènes *rpoB* ou *rpoC*. Il n'y a pas de résistance croisée avec les autres inhibiteurs de l'ARNpol (Babakhani et al., 2014).

L'auréothricine, un possible inhibiteur de l'ARN polymérase ?

L'auréothricine est une ancienne molécule de la famille des dithiolopyrrolones, découverte à la fin des années 1940 à Tokyo. Comme de nombreux antibiotiques, elle est issue de bactéries du genre *Streptomyces*. Cette poudre cristalline jaune possède un large spectre antibiotique puisqu'elle est



capable d'agir aussi bien contre les Gram positifs que contre les Gram négatifs. La cible et le mécanisme d'action de cette pyrrothine sont inconnus. Au sein de la même famille, d'autres molécules agiraient comme des inhibiteurs de l'ARNpol, suggérant un mode d'action similaire pour l'auréothricine. Ce bactériostatique ne connut pourtant pas son heure de gloire thérapeutique en raison d'une toxicité avérée, identifiée dès son isolation (Qin et al., 2013; Umezawa et al., 1948).

Figure 9. Structure de l'auréothricine.

Les ARN régulateurs

L'expression des gènes est un processus complexe régulé à de nombreux niveaux. Ce sont essentiellement des protéines qui remplissent ce rôle régulateur, comme les facteurs σ évoqués précédemment ou les facteurs de transcription. Cependant, ce rôle est également endossé par des éléments de nature nucléique, les ARN régulateurs (ARNrég).

Les ARNrég sont des éléments régulateurs contribuent à l'ajustement précis de l'expression génique au sein de la cellule. Ils sont généralement constitués d'une centaine de nucléotides (à l'origine de leur qualification de petits ARN et de leur nom anglais, *sRNA*, *small RNA*) et ne possèdent pas de séquence codante sauf exceptions. Les propriétés régulatrices de ces ARN sont intimement liées à leurs propriétés structurales et à leurs capacités d'interaction avec leurs cibles, ARNm ou protéines. Les ARNrég contrôlent des événements transcriptionnels, post-transcriptionnels ou traductionnels grâce à la formation de duplex terminateurs ou anti-terminateurs, stabilisateurs ou déstabilisateurs de transcrits, ou régulateurs d'accès aux sites de liaison des ribosomes (SD, Shine-Dalgarno) (**Figures 10 et 11** ; (Waters and Storz, 2009)).

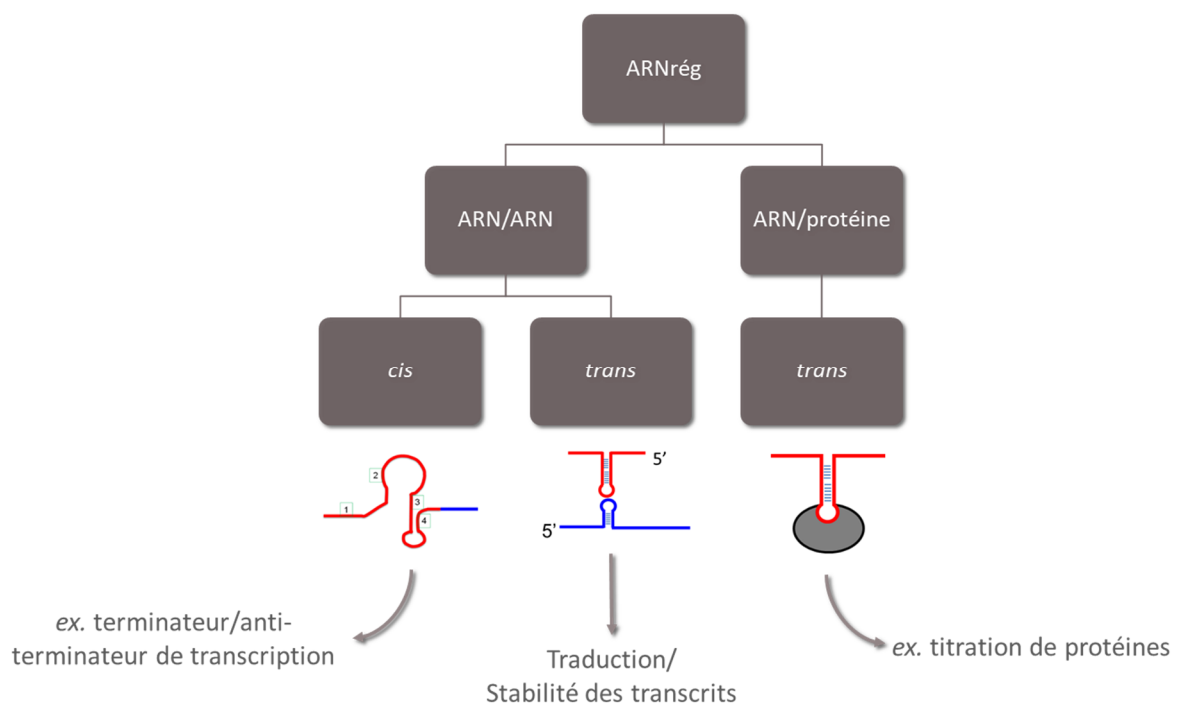


Figure 10. Classification des ARN régulateurs selon leur type d'interaction.

Parmi les exemples d'interactions, les ARNrég sont représentés en rouge, les ARNm en bleu et une protéine en gris.

Les interactions ARNrég/ARNm

Les principales cibles des ARNrég sont des ARN, fréquemment ARNm. Ces interactions ARN/ARN peuvent être de nature *cis*, lorsque les ARNrég sont physiquement liés aux extrémités 5' ou 3' de leur cible, ou *trans*, si les ARNrég exercent leur action par diffusion.

Les ARNrég agissant en *trans*

Les interactions en *trans* représentent la majorité des interactions ARN/ARN. Elles reposent sur les propriétés diffusibles des ARNrég lorsqu'ils sont codés en *trans*, c'est-à-dire à des *loci* différents de ceux de leurs cibles. Ces ARN antisens impactent en général négativement la traduction et/ou la stabilité des ARNm (**Figure 11**). L'appariement des bases, en moyenne sur une vingtaine de nucléotides, est imparfait, ce qui permet à un seul ARNrég d'interagir avec plusieurs cibles (Waters and Storz, 2009).

Cet appariement est favorisé par l'action concomitante d'une protéine, Hfq. Chez les entérobactéries, Hfq facilite la formation de duplex ARN/ARN, contrôle les quantités d'ARNrég disponibles et influence leur stabilité via le recrutement de la RNase E (Vogel and Luisi, 2011). Cependant, Hfq n'a pas les mêmes effets chez toutes les bactéries. Chez *S. aureus*, Hfq est non essentielle et aucune interaction ARN/ARN dépendante de Hfq n'a pour l'instant été mise en évidence (Bohn et al., 2007; Boulloc and Repoila, 2016).

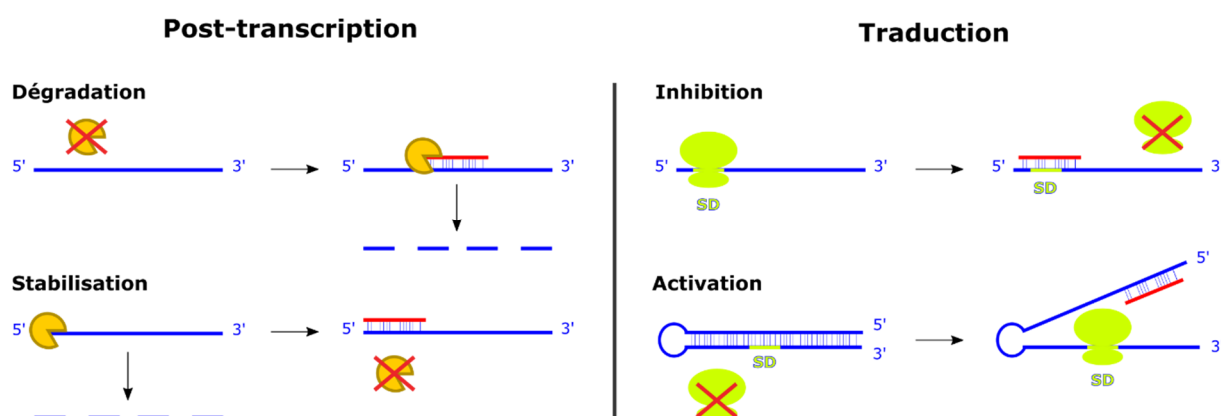


Figure 11. Principales interactions ARNrég/ARNm en trans.

Au niveau post-transcriptionnel (à gauche), les ARNrég (en rouge) peuvent influencer la demi-vie des ARNm (en bleu) en favorisant ou en empêchant le recrutement de ribonucléases (en jaune). Les ARNrég peuvent également inhiber ou activer l'initiation de la traduction (à droite) en bloquant ou en libérant l'accès des ribosomes (en vert) au niveau de la séquence Shine-Dalgarno (SD).

Parmi les ARN agissant en *trans* caractérisés chez *S. aureus*, on retrouve RsaE. Il est conservé chez les Bacillales et interagit avec ses cibles ARNm en s'appariant avec leur séquence SD, créant ainsi un substrat pour la RNase III. Cet ARN régulateur intervient dans le métabolisme à différents niveaux ; il inhibe la traduction de différentes protéines du cycle de Krebs, du métabolisme du folate et du catabolisme de l'arginine. En s'accumulant en fin de phase exponentielle, RsaE permet de réguler des éléments centraux du métabolisme lorsque les sources de carbone s'amenuisent (Bohn et al., 2010; Geissmann et al., 2009; Rochat et al., 2018).

Certains ARN antisens régulent d'autres ARN régulateurs par un phénomène de titration. Ces éponges ARN (« sponge » en anglais) existent sous différentes formes et agissent comme des leurres (résumé dans Figueroa-Bossi and Bossi, 2018). C'est chez *Salmonella Typhimurium* (Figueroa-Bossi et al., 2009) et *E. coli* (Overgaard et al., 2009) qu'a été caractérisé ChiX (MicM), un ARNrég qui réprime *chiP* (*ybfM*), codant une chitoporine, en se liant à l'extrémité 5' de son ARNm. En présence de chitosaccharides, un leurre ribonucléique anti-ChiX est synthétisé et forme un duplex déstabilisateur avec sa cible ChiX, permettant ainsi l'expression de *chiP*. Ce réseau de régulation est d'autant plus complexe que ChiX n'est pas seulement la cible de l'anti-ChiX ; il est aussi son régulateur (Plumbridge et al., 2014). Chez *E. coli*, un fragment d'ARN issu de la maturation de l'extrémité 3' du pre-ARN^{LeuZ} est capable de s'apparier avec d'autres ARNrég comme RyhB, régulateur de l'homéostasie du fer en condition de carence, ou RybB, impliqué dans le maintien de l'intégrité de la membrane externe. Cet appariement empêche RyhB et RybB d'interagir avec leurs cibles respectives. Ce mécanisme permet d'éliminer le bruit de fond transcriptionnel d'un ARNrég normalement réprimé (Lalaouna et al., 2015).

Les ARN impliqués dans des interactions en *trans* sont pour la plupart génétiquement distants. Cependant, il existe une catégorie d'ARN antisens codés en *cis*, c'est-à-dire sur le même locus que les éléments qu'ils régulent. Ces ARNrég opèrent en *trans* car ils sont codés par le brin d'ADN complémentaire. Par rapport aux ARN antisens décrits précédemment, l'appariement cible/ARNrég est donc quasi parfait. En général, les duplex formés par les ARN cis/trans et leur cible empêchent la reconnaissance des sites SD par les ribosomes, agissent comme des terminateurs de transcription ou deviennent des sites de clivage pour les RNases et participent ainsi à la maturation des ARNm polycistroniques (Waters and Storz, 2009). Dernièrement, une régulation de ce type potentiellement associée à la virulence de *S. aureus* a été mise en évidence. Il s'agit d'un système toxine/anti-toxine de type I composé de la toxine PepA2 (codée par *sprA2*) et de l'anti-toxine ribonucléique SprA2_{AS}. PepA2 est toxique pour certains types cellulaires eucaryotes (polynucléaires neutrophiles et érythrocytes) et pour les cellules qui la produisent lorsqu'elle est intracellulaire. La synthèse de PepA2 est inhibée à cause du masquage de la séquence SD de l'ARNm *sprA2* par l'anti-toxine SprA2_{AS} (Germain-Amiot et al., 2019).

Les ARNrég agissant en *cis*

Les interactions ARN/ARN en *cis* impliquent généralement des ARNrég codés dans les régions 5' ou 3' UTR (*UnTranslated Regions*) de leur cible. Ces ARNrég ont souvent une structure sensible aux conditions environnementales leur permettant ainsi de moduler l'activité de leur cible (Waters and Storz, 2009).

Les riboswitches sont un exemple d'élément régulateur en *cis* dont la conformation dépend de la présence d'un métabolite. Ils sont plus abondants chez les bactéries mais on les retrouve dans tous les Règnes du vivant. Ces senseurs possèdent une séquence aptamère conservée, site de liaison du ligand capable de modifier la configuration de la plateforme d'expression (**Figure 12**). Il n'existe pas moins de vingt classes de riboswitches, hiérarchisés en fonction de leurs ligands et de leurs aptamères. Ces riborégulateurs sont en général responsables de rétrocontrôle négatif, au niveau transcriptionnel ou traductionnel (Serganov and Nudler, 2013). C'est le cas des premiers riboswitches décrits au début des années 2000, impliqués dans la régulation de la synthèse des vitamines B₁ et B₂ (Mironov et al., 2002) et du transport de la vitamine B₁₂ via le transporteur BtuB chez *E. coli* (Nahvi et al., 2002). En regard des voies de biosynthèse qu'ils contrôlent, leurs ligands sont la vitamines B₁₂ ou des coenzymes dérivés des vitamines B₁ (Thiamine PyroPhosphate, TPP) et B₂ (Flavine MonoNucléotide, FMN).

Les ligands reconnus par les riboswitches sont de nature très variable (molécules ou ions) mais ils sont liés de près ou de loin aux produits finis régulés par les mêmes riboswitches (Serganov and Nudler, 2013). Une classe particulière de riboswitch repose sur l'utilisation des ARN de transfert (ARNt) en tant que ligands. Ces riboswitches, appelés T-box, régulent l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme ou la synthèse des acides aminés, en particulier chez les Firmicutes. Les ARNt non chargés qui interagissent avec la région aptamère du riboswitch induisent la formation d'un anti-terminateur de transcription ou libèrent un SD, conduisant à l'expression des gènes en aval. Cette interaction repose sur la reconnaissance des trois extrémités de l'ARNt : l'anticodon, le coude et le bras accepteur non chargé. Ce dernier est essentiel pour stabiliser la structure anti-terminatrice ou anti-sequestratrice de SD et donc permettre la transcription ou la traduction du gène régulé en aval (Kreuzer and Henkin, 2018). Au-delà de leurs caractéristiques générales, les T-box peuvent se démarquer grâce à des mécanismes de régulation originaux. Par exemple, la synthèse de la méthionine chez *S. aureus* est en partie régulée par un riboswitch T-box au niveau transcriptionnel. Récemment, des chercheurs ont mis en évidence l'action régulatrice coordonnée inhabituelle de deux ribonucléases, RNase III ciblant la tige terminatrice du T-box met, et RNase J modulant la demi-vie de l'ARNm met (Wencker et al., 2021).

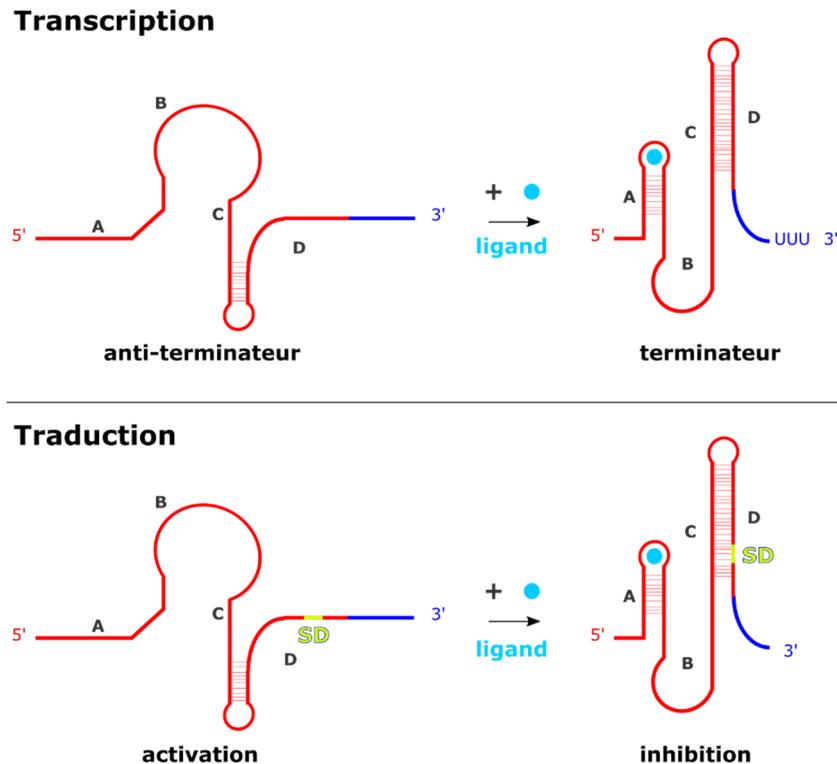


Figure 12. Principales fonctions des riboswitches.

Après liaison au ligand (en bleu), l'aptamère (régions A et B) se réagence et change la conformation du plateau d'expression (régions C et D). Ce phénomène aboutit la plupart du temps à une action inhibitrice de la transcription (formation d'un terminateur) ou de la traduction (SD inaccessible aux ribosomes).

Contrairement à certains T-box, d'autres riboswitches n'ont pas besoin d'enzyme auxiliaire pour exercer leur fonction auto-lytique. C'est le cas du riboswitch *glmS* chez les bactéries Gram positives. Après liaison à la glucosamine-6-phosphate (son ligand), ce ribozyme est capable de se cliver et de libérer l'extrémité 5' de son ARNm, rendant ce dernier dégradé par la RNase J (Collins et al., 2007).

Parmi les éléments *cis*-régulateurs, certaines architectures sont sensibles à des signaux environnementaux d'ordre physico-chimiques comme la température. Chez *Listeria monocytogenes*, l'expression d'un régulateur de virulence, *PrfA*, est modulée par une de ces structures appelée thermosenseur. En-deçà de 30°C, le thermosenseur emprisonne la région SD empêchant ainsi la traduction de *PrfA*. A 37°C, température optimale pour un pathogène humain, il adopte une toute autre conformation qui libère le site SD de l'ARNm *prfA* et permet en conséquence l'expression de nombreux gènes de virulence (Johansson et al., 2002). Cependant, *PrfA* bénéficie d'une double régulation unique. L'ARNm *prfA* n'est pas seulement thermorégulé ; il est aussi contrôlé négativement

par deux autres riborégulateurs, les riboswitches *sreA* et *sreB* agissant en *trans*, initialement impliqués dans la *cis*-régulation du métabolisme de la méthionine et de la cystéine (Loh et al., 2009).

Les structures régulatrices décrites dans les précédents paragraphes sont localisées presque exclusivement au niveau des régions 5' non traduites des ARNm (5'-UTR). Cependant, il existe des régulations *cis* faisant également intervenir les régions 3'-UTR. Chez *S. aureus*, un mécanisme de régulation original repose d'ailleurs sur l'interaction des régions 5' et 3' d'un même ARN, *icaR*. Le gène *icaR* code pour un répresseur de l'opéron *icaADBC*. Les enzymes codées par cet opéron sont responsables de la synthèse du principal polysaccharide de biofilm, la poly- β -1,6-N-acétylglucosamine. L'appariement des régions 5' et 3'-UTR séquestre le site SD et peut circulariser l'ARNm *icaR* en *cis*. La tige ainsi formée par les extrémités devient alors cible de la RNase III. Les mécanismes de levée de l'inhibition traductionnelle sont en revanche non encore élucidés (Ruiz de los Mozos et al., 2013).

Cas particulier des ARNrég à double fonction

A l'instar des ARN messagers ou de transfert aux extrémités 5' ou 3'-UTR régulatrices décrits précédemment, les ARN peuvent endosser plusieurs rôles physiologiques et être impliqués dans diverses voies de régulation. Certains ARN, dits à double fonction, sont à la fois régulateurs et codants. Leur séquence génique contient donc un cadre de lecture ouvert traduit en protéine. Le terme autrefois utilisé d'ARN « non codant » n'est donc plus approprié pour désigner les ARN régulateurs.

L'exemple le plus connu d'ARN à double fonction est RNAIII, acteur essentiel de la régulation de la virulence chez *S. aureus*. Cet ARN régulateur est une exception à plus d'un titre. Avec ses 514 nucléotides, c'est l'un des plus longs ARN régulateurs jamais décrits. Une partie de sa séquence code pour un facteur de virulence, l'hémolysine δ (*hld*) (Janzon et al., 1989). RNAIII est au cœur du système de *quorum sensing agr* (*accessory gene regulator*) (Novick et al., 1993). L'opéron *agrBDCA* produit les éléments senseurs du système ainsi qu'un peptide auto-inducteur (AIP, « autoinducing peptide »). Plus il y a de cellules, plus la quantité d'AIP sécrété augmente et entraîne, grâce à une cascade de régulations, la phosphorylation du facteur de transcription AgrA. En fin de phase exponentielle, le facteur AgrA ainsi phosphorylé active l'expression de RNAIII, à l'origine d'une pléiade de régulations (**Figure 13**). RNAIII inhibe l'expression de protéines de virulence nécessaires lors de la phase précoce de l'infection comme certaines adhésines (protéine A et protéine de liaison au complément) ou le régulateur Rot, « Repressor of toxins ». Parallèlement, RNAIII active la synthèse de facteurs de virulence essentiels aux stades plus tardifs de l'infection comme l'hémolysine α (*hla*). Les régulations

de RNAIII s'exercent principalement au niveau traductionnel via les interactions entre ses différentes boucles et les régions SD ou limitrophes de ses cibles (Raina et al., 2018).

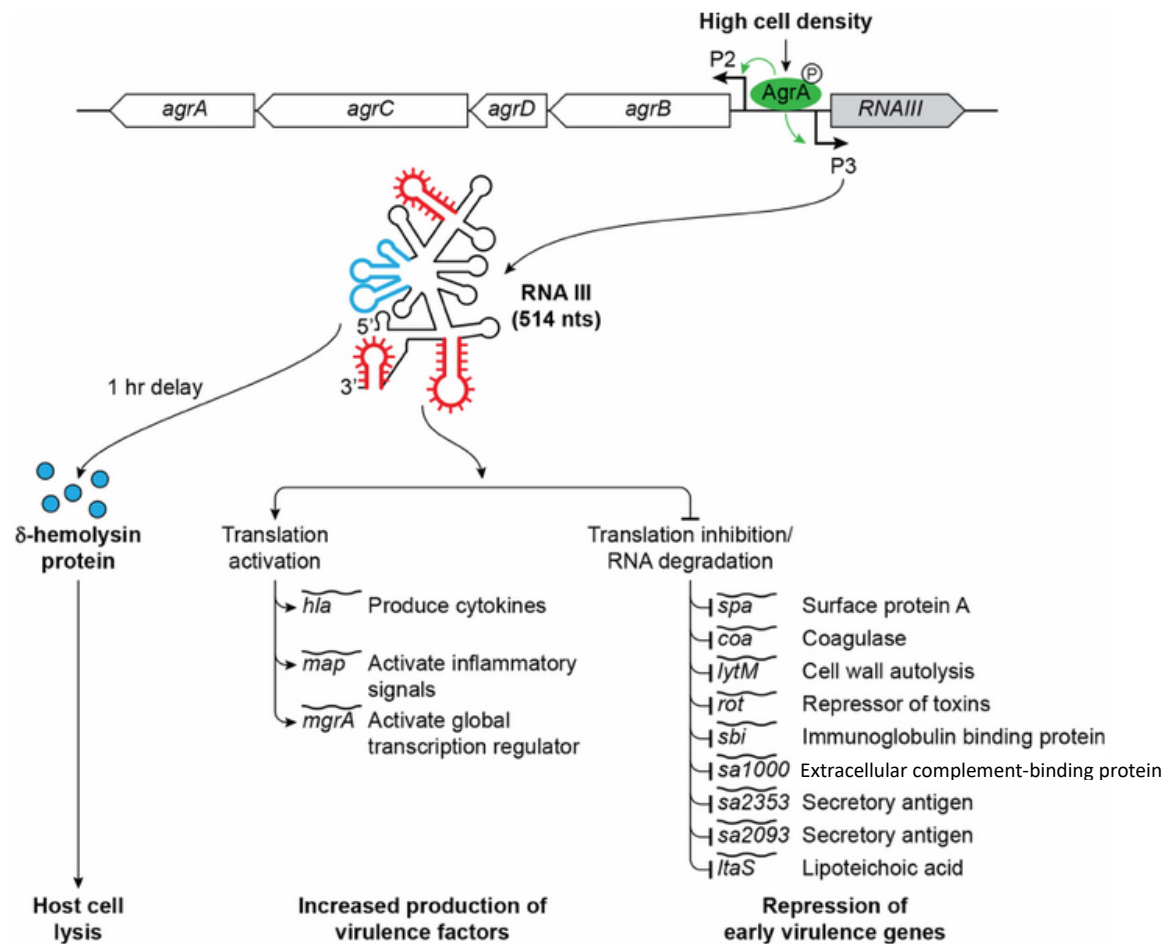


Figure 13. Le réseau de régulation de RNAIII (d'après Raina et al., 2018).

L'opéron *agr*, sous le contrôle du promoteur P2, exprime un peptide auto-inducteur (AIP) grâce aux gènes *agrB* et *D*, combiné à une kinase *AgrC* AIP-dépendante et à un facteur de transcription *AgrA*. RNAIII est codé au locus *agr* sous la dépendance du promoteur P3. Suite à une cascade de régulation déclenchée par la densité cellulaire, *AgrA* phosphorylée par *AgrC* active les promoteurs divergents P2 et P3 du locus *agr*. Au niveau traductionnel et/ou post-transcriptionnel, RNAIII réprime neuf protéines de virulence précoces et active la biosynthèse de trois facteurs de virulence tardifs. Les structures tiges-boucles impliquées dans l'appariement de RNAIII avec ses cibles ARNm sont indiquées en rouge. RNAIII code également l'hémolysine δ (en bleu), responsable de la lyse des cellules hôtes.

Les bactéries Gram négatives ne sont pas en reste. SgrS est à ce jour le seul exemple d'ARNrég à double fonction décrit chez les entérobactéries. Ce riborégulateur participe à la réponse au stress

glucose-phosphate qui a lieu lorsqu'il y a désynchronisation entre le transport des sucres et leur métabolisation, entraînant une accumulation de glucose-6-phosphate. Le stress glucose-phosphate est détecté par la protéine SgrR qui va en retour activer la transcription du gène *sgrS*. L'ARN SgrS a plusieurs cibles ; il inhibe d'une part la traduction de protéines impliquées dans l'import des sucres ou l'ajustement du métabolisme et augmente d'autre part la déphosphorylation des sucres phosphorylés en stabilisant l'ARNm codant la phosphatase YigL. SgrS possède en 5' une portion codant SgrT, une protéine également impliquée dans la réponse au stress glucose-phosphate. SgrS et SgrT agissent de concert sur le principal transporteur de glucose PtsG, mais via des mécanismes différents. SgrS inhibe la production *de novo* de PtsG au niveau traductionnel alors que SgrT inactive PtsG en post-traductionnel (Raina et al., 2018; Wadler and Vanderpool, 2007).

Les interactions ARNrég/protéines

Généralités

Les ARN régulateurs n'interagissent pas uniquement avec d'autres ARN. Il existe des exceptions, des ARN qui régulent l'activité de protéines. Ces ARN fonctionnent souvent par titration, c'est-à-dire en piégeant leur protéine cible. C'est le cas du système Csr, « Carbon storage regulator », qui intervient dans de nombreuses voies métaboliques ou physiologiques et dans la virulence. Dans ce système, CsrB/RsmB est une famille d'ARN interagissant avec les protéines homologues CsrA ou RsmA (« Repressor of stationary phase metabolites »). CsrA/Rsm sont des protéines régulatrices post-transcriptionnelles ayant pour cibles des ARNm via leur région SD, diminuant ainsi leur traduction. CsrB agit donc comme un leurre vis-à-vis de CsrA/Rsm. Cet ARNrég possède de nombreux motifs conservés de type GGA situés aux extrémités de leurs structures tiges-boucles qui leur permettent de séquestrer plusieurs protéines CsrA à la fois (Babitzke and Romeo, 2007; Pourciau et al., 2020). Certaines bactéries comme les vibrions possèdent plusieurs copies du gène *csrB*. Une espèce pathogène d'huîtres, *Vibrio tasmaniensis* LGP32, se démarque du genre avec quatre copies de *csrB* au lieu de deux ou trois habituellement. Le système Csr connu pour réguler la virulence via le *quorum sensing* chez *V. cholerae* pourrait avoir la même résonance chez *V. tasmaniensis* LGP32 grâce à la régulation partielle de deux métalloprotéases cytotoxiques, Vsm et PrtV (Nguyen et al., 2018).

L'ARN transfert-messenger (ARNtm) est un exemple unique de régulation traductionnelle. Cet ARN est à la fois ARN de transfert et ARN messenger. Avec l'aide de la protéine SmpB, l'ARNtm intervient dans le processus de *trans*-traduction qui consiste au sauvetage des ribosomes coincés en cours de traduction (**Figure 14**). Dans un premier temps, l'ARNtm reconnu comme un ARNt se lie au ribosome bloqué sur l'extrémité 3' d'un ARNm sans codon STOP. Puis il endosse sa casquette d'ARNm

permettant ainsi le marquage C-terminal de la protéine dont la synthèse s'est interrompue par une étiquette AANDENYALAA (peptide SsrA) (Keiler et al., 1996). Cette étiquette a deux fonctions : elle décroche les ribosomes de l'ARNm et signale la protéine qu'elle marque comme indésirable. Ce système de contrôle des ARNm défectueux permet l'éviction et la dégradation de peptides tronqués potentiellement toxiques pour la cellule bactérienne par l'intermédiaire de différentes protéases appartenant notamment à la famille des ATPase AAA+ (Herman et al., 1998). Une fois libérés, les ARNm incomplets sont également détruits par des ribonucléases (Janssen and Hayes, 2012). L'ARNtm est recruté dans différentes conditions générant un blocage du ribosome, par exemple lors de la réponse à un défaut de sécrétion ou pour réguler la cinétique d'expression de certaines protéines (Collier et al., 2004, 2002).

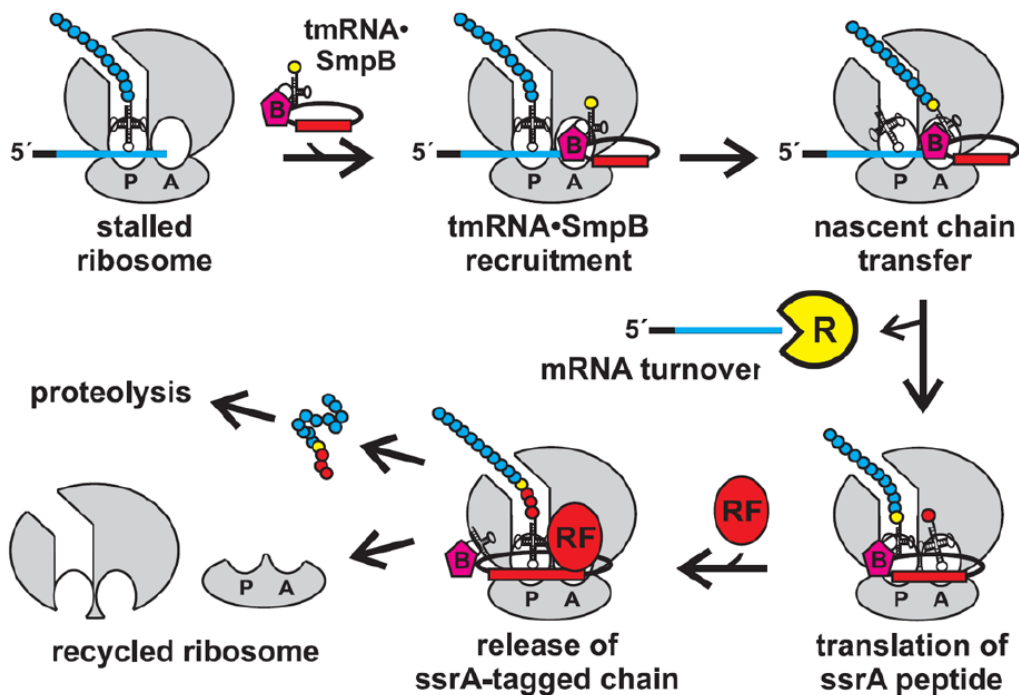


Figure 14. La trans-traduction (Janssen and Hayes, 2012).

Pendant la traduction, le blocage du ribosome sur un ARNm sans codon STOP (en bleu) déclenche le recrutement du couple ARNtm/SmpB au niveau du site A. La chaîne polypeptidique tronquée est transférée sur l'ARNtm chargé par une alanine (en jaune dans la chaîne polypeptidique), libérant de ce fait l'ARNm assujéti à dégradation. Le peptide SsrA codé par l'ARNtm (en rouge) complète l'extrémité C-terminale de la protéine tronquée et induit l'arrêt conventionnel de la traduction grâce au facteur RF (« Release Factor »). Le ribosome est alors recyclé et la protéine marquée par SsrA est dégradée.

L'ARN 6S, David contre Goliath ?

Contexte de la découverte de l'ARN 6S

Il faut remonter aux années 1960 pour retrouver les premières traces de l'ARN 6S. Cet ARN au profil électrophorétique unique différent de celui des ARNt (Hindley, 1967) a été isolé lors d'expériences de chromatographie par filtration sur gel dans une fraction spécifique ne correspondant pas non plus aux ARN ribosomiques (Goldstein and Harewood, 1969). L'ARN 6S a été séquencé chez *E. coli* en 1971 mais aucune donnée ne permet de prédire sa fonction à l'époque (Brownlee, 1971). A la fin des années 1970, des chercheurs poursuivent la caractérisation de petits ARN stables d'*E. coli*, l'ARN 4.5S, l'ARN 10S (futur ARNtm) et l'ARN 6S (Lee et al., 1978). C'est la première fois que l'appartenance de l'ARN 6S à un complexe ARN/protéine est suggéré. Six ans plus tard, une équipe de l'Université du Massachussetts s'intéresse à l'organisation en opéron du gène *ssr* (aujourd'hui *ssrS*) codant l'ARN 6S (Hsu et al., 1985) et découvre par hasard que l'ARN 6S n'est pas essentiel pour la croissance en milieu riche chez *E. coli* (Lee et al., 1985). Ce n'est qu'au début du XXI^e siècle que les recherches de Karen Wassarman et Gisela Storz confirment la nature ribonucléoprotéique de l'ARN 6S et mettent en évidence l'interaction entre l'ARN 6S et l'ARN polymérase bactérienne (Wassarman and Storz, 2000), ouvrant le champs à de nombreuses autres découvertes.

Répartition dans le domaine bactérien

En complément des travaux expérimentaux menés chez de nombreuses espèces, plusieurs analyses computationnelles ont permis d'apprécier la répartition du gène *ssrS* chez les procaryotes. Ces analyses *in silico* sont basées sur la séquence et la structure secondaire de l'ARN 6S, particulièrement conservée parmi les bactéries (Barrick, 2005; Panek et al., 2011; Trotochaud and Wassarman, 2005; Wehner et al., 2014). L'ARN 6S est schématiquement composé de deux tiges situées de part et d'autre d'une boucle centrale (**Figure 15**). Dans l'analyse la plus récente, au moins un gène *ssrS* a été détecté dans 1610 génomes bactériens (Wehner et al., 2014). Les protéobactéries et les Firmicutes sont les clades dans lesquels *ssrS* est le plus représenté. Chez les Firmicutes, seules quelques bactéries dont trois *Lactobacillus* ne possèdent pas le gène *ssrS*. Phénomène fréquent chez les *Bacillaceae*, certaines bactéries présentent plus d'une copie du gène *ssrS*, soit potentiellement plusieurs ARN 6S. C'est le cas de *B. subtilis* qui possède deux ARN 6S issus de deux gènes différents. De manière générale, les fonctions de ces paralogues ne sont pas entièrement élucidées et restent source de débat (Wehner et al., 2014).

Concernant l'environnement génomique de *ssrS*, la synténie est particulièrement conservée chez les protéobactéries et plus particulièrement chez les *Enterobacteriaceae* (Trotochaud and

Wassarman, 2005; Wehner et al., 2014). Les gènes *ssrS* et *ygfA* partagent la même unité de transcription (Hsu et al., 1985), *ygfA* codant une enzyme, la 5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase, impliquée dans le métabolisme des folates. En fonction de la classe considérée, d'autres gènes sont regroupés à proximité de *ssrS* comme *zapA*, codant la protéine de division cellulaire du même nom, des gènes codant des métallopeptidases impliqués dans le métabolisme de la proline, ou encore des gènes du métabolisme des purines. Chez les Firmicutes, ce sont plutôt des gènes codant des protéines de la famille des ATPases AAA+ que l'on retrouve près du gène *ssrS* (Wehner et al., 2014).

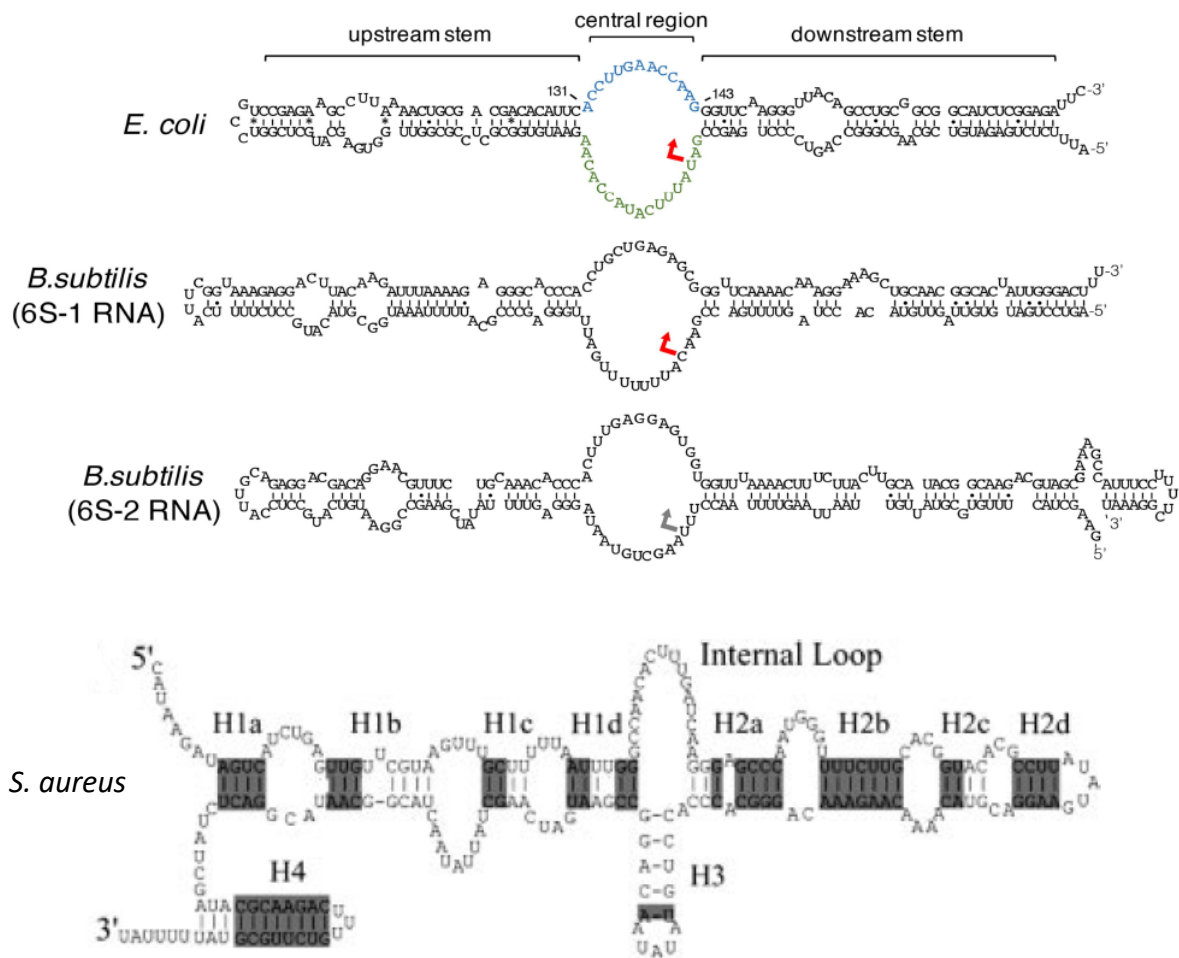


Figure 15. Prédictions structurales de l'ARN 6S chez *E. coli*, *B. subtilis* (Wassarman, 2018) et *S. aureus* (Pichon and Felden, 2005).

La structure de l'ARN 6S est composée d'une bulle centrale simple brin entourée de deux tiges double brin. Les flèches indiquent le site d'initiation de la transcription du pARN.

Caractéristiques de l'ARN 6S chez *E. coli*

Les données actuellement disponibles sur l'ARN 6S proviennent essentiellement de travaux menés chez *E. coli* (Wassarman, 2018). Au début des années 2000, l'interaction entre ARN 6S et ARN polymérase est démontrée (Wassarman and Storz, 2000). L'ARN 6S inhibe l'activité de l'ARNpol couplée préférentiellement au facteur σ^{70} grâce à sa structure mimant le complexe ouvert d'un promoteur lors de l'initiation de la transcription (**Figure 16** ; (Chen et al., 2017; Trotochaud and Wassarman, 2005). De par sa structure secondaire, l'ARN 6S agit donc comme un leurre vis-à-vis de l'holoenzyme ARNpol, ce qui aurait pour conséquence de changer le profil transcriptionnel de la cellule en favorisant l'expression de gènes dépendant de facteurs σ alternatifs (Trotochaud and Wassarman, 2005). Cette bascule transcriptionnelle nécessaire au moment de la transition entre phases exponentielle et stationnaire serait possible grâce à l'accumulation de l'ARN 6S tout au long de la croissance (Wassarman and Storz, 2000).

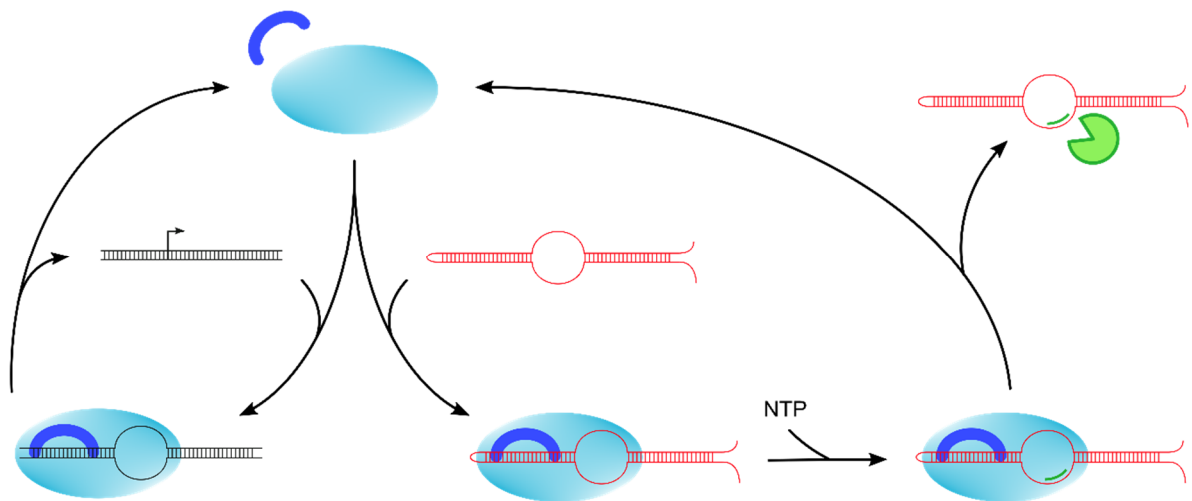


Figure 16. Mécanisme d'action de l'ARN 6S chez *E. coli*.

L'ARN 6S (en rouge) s'accumule tout au long de la croissance jusqu'à atteindre son seuil maximal en phase stationnaire. Sa structure en complexe ouvert lui permet d'être en compétition avec les promoteurs (en noir) vis-à-vis de l'ARNpol (en bleu clair) couplée au facteur σ^{70} (en bleu foncé). L'apport de nucléotides (NTP) initie la synthèse d'un transcrit appelé pARN (en vert foncé) à partir de l'ARN 6S. Le duplex ARN 6S/pARN nouvellement formé (i) engendre un réarrangement structural libérant l'ARNpol holoenzyme de son complexe avec l'ARN 6S et (ii) devient cible potentielle de la RNase BN (en vert clair).

Cette hypothèse de contrôle transcriptionnel évoquée dès 2000 (Wassarman and Storz, 2000) s'est précisée les années suivantes. Premièrement, les promoteurs σ^{70} ne sont pas tous inhibés par l'ARN 6S (Trotochaud and Wassarman, 2004). Un modèle initial de promoteurs sensibles à l'ARN 6S présentait une région -10 étendue couplée à une région -35 faible divergente de la séquence consensus TTGACA (Cavanagh et al., 2008; Trotochaud and Wassarman, 2004). Au-delà des particularités des séquences promotrices, de récents résultats suggèrent que les promoteurs affectés par l'ARN 6S sont avant tout les promoteurs les plus faibles (Lal et al., 2018). Deuxièmement, d'autres discordances ont perduré pendant plusieurs années quant à la spécificité des promoteurs affectés par l'ARN 6S et leur caractère phase-dépendant (Gildehaus et al., 2007; Kim et al., 2004; Neusser et al., 2010; Trotochaud and Wassarman, 2004). Ces contradictions pourraient s'expliquer par la variété des conditions expérimentales et des méthodes utilisées. Les dernières analyses transcriptomiques indiquent que l'ARN 6S favorise la transcription dépendante de σ^{38} en agissant de concert avec l'anti- σ^{70} Rsd mais que son inhibition n'est ni limitée à la phase stationnaire, ni au facteur σ^{70} (Geißen et al., 2010; Lal et al., 2018; Neusser et al., 2010). Selon les analyses, les profils de régulation sont différents. En général, le régulon de l'ARN 6S est en lien avec le métabolisme des acides aminés, le transport, la réponse au stress, le cycle de Krebs, la traduction (*i.e.* gènes de protéines ribosomiques), la transcription (*rpoB/rpoC*) ou encore d'autres voies de régulation (Geißen et al., 2010; Lal et al., 2018; Neusser et al., 2010).

On pourrait s'attendre à ce que l'absence d'un élément ayant un rôle aussi important au sein de la cellule bactérienne donne lieu à des phénotypes tout aussi délétères. Il n'en est rien ; bien souvent, les mutants *ssrS* se comportent comme leur parentale en milieu riche (Lee et al., 1985). Seules certaines conditions désavantagent le mutant *ssrS* par rapport à la souche isogénique comme la phase stationnaire prolongée, surtout lorsqu'il y a compétition pour l'accès aux ressources (Trotochaud and Wassarman, 2004). Ces défaillances seraient dues à un défaut d'adaptation rapide et efficace à diverses situations de stress. A l'inverse, les cellules n'exprimant pas l'ARN 6S survivent mieux à pH basique en phase stationnaire tardive grâce à la levée de répression de l'ARN 6S sur un gène qui participe à la réponse au stress à pH élevé, *pspF* (Trotochaud and Wassarman, 2006).

L'ARN 6S est en compétition avec l'ADN pour l'ARNpol et il s'accumule au cours de la croissance, ce qui a tendance à déplacer l'équilibre en faveur de l'ARN 6S. En effet, l'ARNpol- σ^{70} est majoritairement complexée à l'ARN 6S en phase stationnaire (Wassarman and Storz, 2000) ; cette observation est également vraie chez *Streptococcus pneumoniae* (Hör et al., 2020). Comment alors l'ARNpol se libère-t-elle de l'emprise de l'ARN 6S ? Tout simplement grâce à la synthèse d'un produit ARN (pARN) de 14 à 20 nucléotides, à partir de l'ARN 6S servant alors de brin matrice (Gildehaus et al., 2007; Wassarman and Saecker, 2006; Wurm et al., 2010). L'hybridation pARN/ARN 6S induit un

changement de conformation de l'ARN 6S entraînant l'éjection du facteur σ^{70} puis la dissociation du complexe ARNpol/ARN 6S (Panchapakesan and Unrau, 2012; Steuten and Wagner, 2012). Ce phénomène a lieu lorsque les conditions nutritionnelles permettent le redémarrage de la croissance. Le duplex pARN/ARN6S est ensuite très probablement dégradé par la RNase BN dont la cinétique d'expression est inverse à celle de l'ARN 6S (Chen et al., 2016).

Chez *E. coli*, *ssrS* est en opéron avec *ygfA*. Très tôt s'est posée la question de régulations communes impliquant ces deux gènes mais aussi des mécanismes régulateurs de cette unité de transcription (Hsu et al., 1985). *ssrS* possède deux promoteurs, P1, dépendant de σ^{70} , et P2, dépendant de σ^{70} et σ^S , ce qui permet d'adapter la production d'ARN 6S en fonction des conditions de croissance (Kim and Lee, 2004). Des travaux plus récents suggèrent un rétrocontrôle positif sur P1 et négatif sur P2 (Lee et al., 2013). Les transcrits discistroniques issus de P1 sont clivés en position 5' par les ribonucléases E et G ; ceux issus de P2 ne sont clivés en position 5' que par la ribonucléase E (Kim and Lee, 2004). L'extrémité 3' de l'ARN 6S est générée par terminaison ρ -dépendante dans le cadre de lecture ouvert de *ygfA* suivie d'une maturation exoribonucléolytique (Chae et al., 2011). Le gène *ssrS* est également sensible aux régulateurs globaux H-NS, StpA, LRP et FIS (Lee et al., 2013; Neußer et al., 2008).

Particularités de l'ARN 6S chez *B. subtilis*

Après *E. coli*, *B. subtilis* est l'organisme chez lequel nous avons le plus de données sur l'ARN 6S; il ne possède pas moins de deux ARN 6S, nommés ARN 6S-1 et ARN 6S-2 et codés respectivement par les gènes *bsrA* et *bsrB*. Un troisième ARN 6S a même été identifié chez *B. subtilis* BEST7613. Son gène aurait été acquis par transfert horizontal artificiel à partir d'une bactérie du genre *Synechocystis* (Wehner et al., 2014).

Les ARN 6S-1 et -2 ont été identifiés grâce à des approches computationnelles (Barrick, 2005) et biochimiques (Trotochaud and Wassarman, 2005). L'ARN 6S-1 existe sous deux formes, anciennement nommée ARN BS201 et BS190 à cause de leur taille respective (201 et 190 nucléotides), BS201 étant le précurseur mûré en position 5' de BS190 (Suzuma et al., 2002). La cinétique d'accumulation de l'ARN 6S-1 (de 10 à 18 fois plus abondant en phase stationnaire) ressemble à celle observée chez *E. coli* (Barrick, 2005; Suzuma et al., 2002; Thüring et al., 2021; Trotochaud and Wassarman, 2005). L'ARN 6S-2, initialement appelé ARN BS203 (203 nucléotides) (Ando et al., 2002), a un profil d'expression difficile à appréhender ; certains n'observent aucune différence quantitative entre phase exponentielle et phase stationnaire (Trotochaud and Wassarman, 2005), alors que d'autres affirment que son pic d'expression est maximal en milieu de phase exponentielle (Ando et al.,

2002; Barrick, 2005; Thüring et al., 2021). Globalement, le niveau d'expression de l'ARN 6S-1 est plus important que celui de l'ARN 6S-2 (Barrick, 2005). Un point rassemble ces deux paralogues : leur structure conservée leur permettant d'interagir avec l'ARNpol- σ^A avec la même affinité, σ^A étant le facteur végétatif de *B. subtilis* (Barrick, 2005; Burenina et al., 2014; Trotochaud and Wassarman, 2005).

Plusieurs ARN 6S laisseraient entendre plusieurs fonctions distinctes au sein de la cellule. D'un point de vue phénotypique, les analyses peuvent varier d'une souche à l'autre. Chez certaines souches, seul le mutant *bsrA* (ARN 6S-1) présente un retard au redémarrage, un défaut de croissance ou d'adaptation en phase stationnaire prolongée comparé à sa souche isogénique en conditions standards (Ando et al., 2002; Cavanagh et al., 2012; Hoch et al., 2015; Suzuma et al., 2002; Thüring et al., 2021). Ces observations sont également valables pour le double mutant *bsrA/bsrB* de la souche PY79 malgré quelques différences pour $\Delta bsrA$ (Hoch et al., 2015). L'ARN 6S-1 contrôlerait également le démarrage de la sporulation (Cavanagh and Wassarman, 2013). Chez *B. subtilis* NCIB 3610, l'ARN 6S-2 serait impliqué dans la motilité bactérienne, l'inhibition de la formation de biofilm via la répression de marqueurs comme *tasA*, *epsA* and *bslA* et la retardation de la sporulation (Thüring et al., 2021). De manière surprenante, le phénotype de sporulation lié à l'ARN 6S-2 n'existe pas chez la souche *B. subtilis* 168 (Cavanagh and Wassarman, 2013). Le double mutant *bsrAB* possède aussi des phénotypes contradictoires selon les souches : il redémarre plus lentement et accuse un retard de croissance en conditions de stress physico-chimiques (stress oxydatif, pH élevé, choc osmotique) par rapport à la souche parentale NCIB 3610 (Thüring et al., 2021) alors que le phénotype inverse est décrit lors d'un stress alcalin chez la souche PY79 (Hoch et al., 2015). Les auteurs attribuent principalement ces différences au fond génétique bactérien. Par exemple, les souches PY79 et 168 dérivent de la souche NCIB 3610 mais elles ont perdu certaines aptitudes liées à la formation de biofilm, la motilité ou la sporulation par rapport à leur souche ancestrale (Hoch et al., 2015; Thüring et al., 2021). Les avis divergent également quant aux fonctions de ces deux homologues, entre ceux qui penchent pour des fonctions redondantes au sein de la cellule (Hoch et al., 2015) et ceux qui plaident l'inverse (Cavanagh and Wassarman, 2013). Malgré certaines incohérences, les auteurs semblent toutefois s'accorder sur des fonctions relatives à l'utilisation et à la disponibilité des nutriments dans l'environnement bactérien.

A l'instar d'*E. coli*, *B. subtilis* recycle l'holoenzyme ARNpol- σ^A prisonnière de l'ARN 6S grâce au pARN par un mécanisme similaire de réarrangement structural, principalement au moment du redémarrage (Beckmann et al., 2012, 2011; Cavanagh et al., 2012). On a longtemps pensé que le pARN n'était synthétisé qu'à partir de l'ARN 6S-1, sans pouvoir élucider clairement le devenir du complexe ARN 6S-2/ARNpol- σ^A . Cependant, une équipe allemande a démontré en 2016 que l'ARN 6S-2 pouvait servir de matrice *in vivo* comme l'ARN 6S-1 pour la transcription du pARN (Hoch et al., 2016).

L'ARN 6S chez *S. aureus*

Très peu de données sont actuellement disponibles concernant l'ARN 6S chez *S. aureus*. Les premières analyses phylogénétiques ont permis d'identifier un homologue de *bsrA* (ARN 6S-1) de *B. subtilis* chez *S. aureus* qui sera appelé *ssrS* (Trotochaud and Wassarman, 2005) mais aucun homologue de *bsrB* n'a été retrouvé chez les *Staphylococcaceae* (Wehner et al., 2014). Une analyse comparative a permis de d'établir une projection de la structure de l'ARN 6S staphylococcique, semblable aux prédictions proposées pour *B. subtilis* (ARN 6S-1 et -2) et *E. coli* (**Figure 15** ; (Pichon and Felden, 2005)).

L'ARN 6S est fortement exprimé chez *S. aureus*, d'autant plus en phase stationnaire (**Figure 17** ; (Mäder et al., 2016; Pichon and Felden, 2005)). Il pourrait être une des cibles de la RNase III, une endoribonucléase, bien qu'aucun clivage n'est pu être mis en évidence (Lioliou et al., 2012).

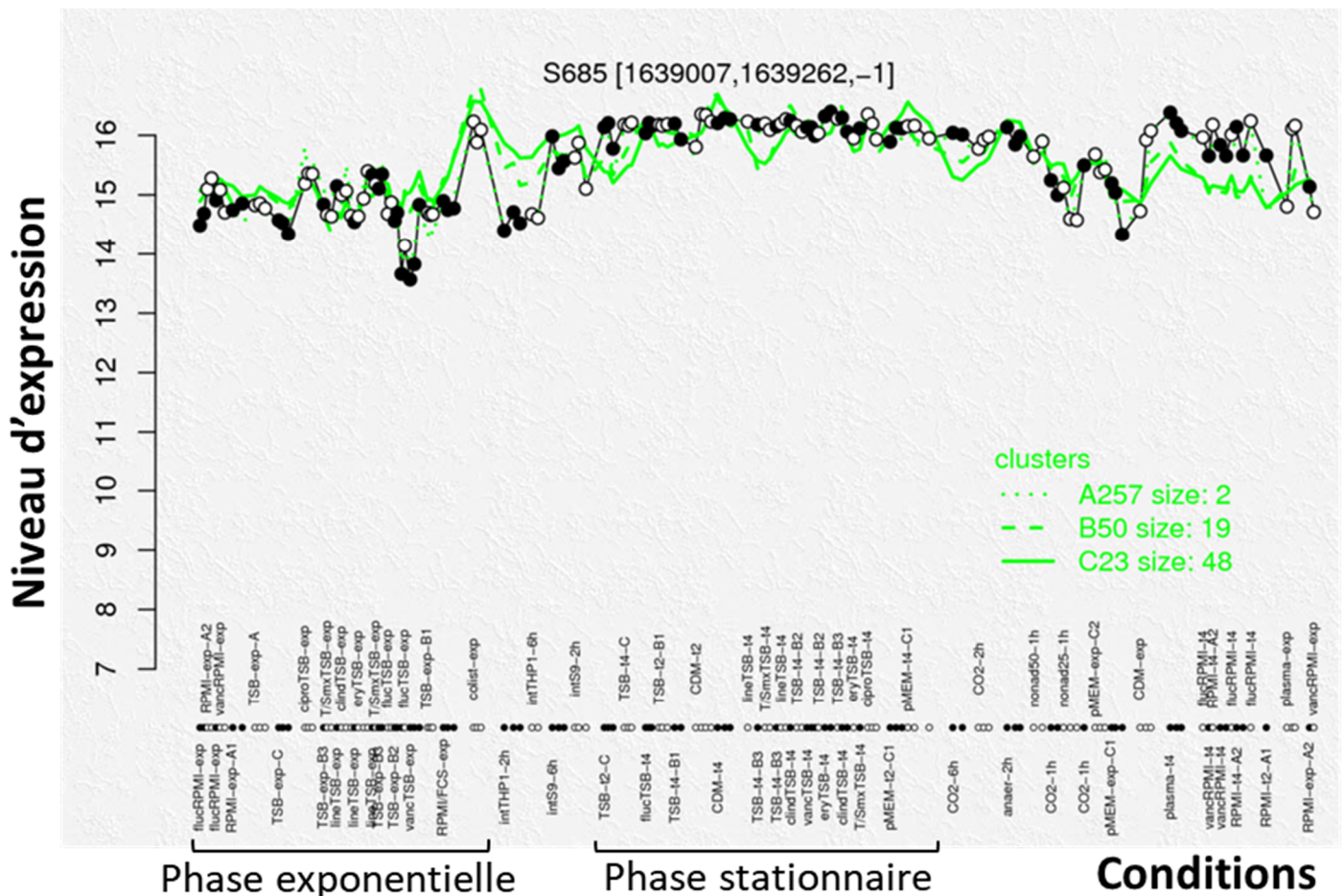


Figure 17. Profil d'expression de l'ARN 6S dans différentes conditions (d'après Mäder et al., 2016).

Les conditions de phase stationnaire ou exponentielle sont indiquées sous l'axe des abscisses. Le niveau d'expression de l'ARN 6S (S685) chez *S. aureus* est exprimé selon une échelle relative logarithmique.

(<https://genoscapist.migale.inrae.fr/aeb/viewer/?id=S685>)

RESULTATS

Chapitre 1

Sensibilité aux antibiotiques dépendante de l'ARN 6S

Marick Esberard¹, Marc Hallier², Wenfeng Liu¹, Claire Morvan^{1,3}, Lionello Bossi¹, Nara Figueroa-Bossi¹, Brice Felden² and Philippe Boulloc¹

¹Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC), Gif-sur-Yvette, France

²Université de Rennes 1, BRM (*Bacterial regulatory RNAs and Medicine*) UMR_S 1230, Rennes, France

³Institut Pasteur, Université de Paris, CNRS UMR2001, Laboratoire Pathogenèse des Bactéries Anaérobies, Paris, France

Les ARN régulateurs (ARNrég) sont des outils polyvalents permettant à la cellule bactérienne d'ajuster son expression génique au plus proche des conditions environnementales. Du métabolisme à la virulence, en passant par la résistance aux antibiotiques, les ARNrég interviennent dans une multitude de processus. Commensal mais pathogène opportuniste, *Staphylococcus aureus* est sous haute surveillance ces dernières années à cause de l'émergence de souches résistantes voire multirésistantes aux antibiotiques, tout comme *Salmonella spp.* Le bon usage des antibiotiques est un enjeu majeur de santé publique ; même de faibles concentrations peuvent avoir de lourdes conséquences sur la sélection de mutants résistants ou de bactéries pathogènes comme *Clostridioides difficile*. Grâce à des expériences de fitness chez *S. aureus*, nous avons identifié un ARNrég, l'ARN 6S, dont l'absence provoque un désavantage compétitif en présence de concentrations sublétales de rifampicine. Chez *Escherichia coli*, l'ARN 6S, codé par le gène *ssrS*, interagit avec l'ARN polymérase (ARNpol) couplée au facteur σ^{70} ; sa structure en complexe ouvert lui permet d'entrer en compétition avec les promoteurs et de moduler l'activité de sa cible.

Nous avons montré :

- (i) L'élargissement du phénotype d'hypersensibilité à la rifampicine à d'autres inhibiteurs de l'ARNpol (rifabutine et fidaxomicine) et à d'autres bactéries (*Salmonella* Typhimurium LT2 pour la rifampicine, *C. difficile* pour la fidaxomicine)
- (ii) Le rôle transcriptionnel limité de l'ARN 6S au cours de la transition entre phase exponentielle et phase stationnaire chez *S. aureus*. Une fusion rapporteuse transcriptionnelle suggère que l'expression dépendante du principal facteur alternatif σ^B pourrait être affectée par la délétion *ssrS^{sa}* plus tardivement, en phase stationnaire prolongée
- (iii) L'interaction préférentielle *in vitro* de l'ARN 6S avec l'holoenzyme ARNpol- σ^A ainsi que le rôle de l'ARN 6S dans le maintien de l'intégrité de cette holoenzyme.

Deux nouvelles fonctions sont donc attribuables à l'ARN 6S : un rôle de bouclier protecteur vis-à-vis de certains inhibiteurs de l'ARNpol associé à une faculté stabilisatrice de l'holoenzyme ARNpol- σ^A . Des résultats complémentaires présentés en fin de chapitre proposent des perspectives quant à l'éventuelle implication de l'ARN 6S dans la réponse au stress pariétal.

J'ai réalisé ou participé à toutes les expériences présentées dans ce chapitre, exceptées celles décrites **Fig. 3B** et **6A** issues de collaborations. La première version de l'article ci-après a été rédigée par mes soins.

6S RNA-dependent antibiotic susceptibility

Marick Esberard¹, Marc Hallier², Wenfeng Liu¹, Claire Morvan^{1,3}, Lionello Bossi¹, Nara Figueroa-Bossi¹, Brice Felden^{2§} and Philippe Bouloc^{1*}

¹Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), F-91198 Gif-sur-Yvette, France

²Université de Rennes 1, BRM (Bacterial Regulatory RNAs and Medicine) UMR_S 1230, F-35000 Rennes, France

³Institut Pasteur, Université de Paris, CNRS UMR2001, Laboratoire Pathogénèse des Bactéries Anaérobies, 75015 Paris, France

§ This work is dedicated to the memory of our colleague Brice Felden who passed away unexpectedly on March 5, 2021

* Correspondance: philippe.bouloc@i2bc.paris-saclay.fr

6S RNA / rifampicin / *Staphylococcus aureus* / RNAP / antibiotic resistance

Abstract

Bacterial small RNAs (sRNAs) contribute to a variety of regulatory mechanisms that modulate wide ranging pathways, including metabolism, virulence, and antibiotic resistance. We investigated the involvement of sRNAs in rifampicin resistance in the opportunistic pathogen *Staphylococcus aureus*. Using a competition assay with an sRNA mutant library, we identified 6S RNA as being required for protection against low concentrations of rifampicin, an RNA polymerase (RNAP) inhibitor. This effect applied to rifabutin and fidaxomicin, two other RNAP-targeting antibiotics. 6S RNA is highly conserved in bacteria and its absence in two other major pathogens, *Salmonella enterica* and *Clostridioides difficile*, also impaired susceptibility to RNAP inhibitors. In *S. aureus*, 6S RNA is produced from an autonomous gene and accumulates in stationary phase. In contrast to what was reported in *Escherichia coli*, *S. aureus* 6S RNA does not appear to play a critical role in the transition from exponential to stationary phase, but affects σ^B -regulated expression in prolonged stationary phase. Nevertheless, its protective effect against rifampicin is independent of alternative sigma factor σ^B activity. Our results suggest that 6S RNA helps maintain RNAP- σ^A integrity in *S. aureus*, which could in turn help bacteria withstand low concentrations of RNAP inhibitors.

Introduction

Staphylococcus aureus is a commensal Gram-positive bacterium but also an opportunistic pathogen responsible for diseases ranging from benign (mostly cutaneous forms) to life-threatening (visceral or osteoarticular forms) infections (reviewed in (1, 2)). Due to the emergence of resistant strains, mainly methicillin-resistant (MRSA) and vancomycin-intermediate *S. aureus* (VISA), *S. aureus* has become a high priority target for the discovery of new antibiotics (3).

In standard antibiotic treatment regimens, if penicillin M and glycopeptides give unsatisfactory results, combination therapy with rifampicin may be considered, particularly in complicated prosthetic device-associated infections (4). Rifampicin, a rifamycin derivative, is an inhibitor of bacterial RNA polymerase (RNAP) (5-7). The molecule binds to the RNAP β -subunit in the DNA/RNA channel to prevent transcription by steric hindrance. This effect occurs during a narrow window, just after the synthesis of the first ribonucleotides; rifampicin is ineffective on transcripts once they are elongated (7).

Highly conserved among bacteria, the core RNA polymerase contains four essential subunits (two α , β and β') and one accessory subunit (ω) (8-10). Among Gram-positive bacteria, RNA polymerase includes two other accessory subunits: δ and ϵ (ϵ is specific to Firmicutes). These accessory subunits may enhance transcriptional specificity and recycle RNAP. A sigma (σ) factor subunit completes the core enzyme: when present, the complex is called RNAP holoenzyme. σ factors recognize bacterial promoters and participate in adaptation to changing growth conditions (11). The σ factors are associated with specific transcriptional programs whose function and features may differ among species (11). The number of σ factors varies between species. For example, seven σ factors were described in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* (12), and twenty-two in the spore-forming bacterium *Clostridioides difficile* (13). In contrast, *S. aureus* possesses only four σ factors, σ^A , σ^B , σ^H and σ^S . σ^A is the vegetative factor responsible for transcription of housekeeping genes (14), σ^B is the main alternative sigma factor contributing to stress adaptation (15-17). The last two factors are expressed only in response to specific conditions: σ^H is involved in the regulation of competence (18, 19) and σ^S in response to miscellaneous environmental stresses (20). A number of transcriptional factors participate together with σ factors in modulating bacterial transcription (21).

Small RNAs (sRNAs) are recognized as ubiquitous elements that fine-tune gene expression at transcriptional and post-transcriptional levels (22, 23). sRNAs are well studied in Gram-negative bacteria. However, in Gram-positive bacteria, including *S. aureus*, their roles in virulence, metabolism and antibiotic resistance are less understood, although there is

no doubt about their involvement in these processes (24-26). The majority of characterized sRNAs interact with mRNAs. However, some sRNAs interact directly with protein complexes. This is the case for 6S RNA, one of the first described sRNAs, identified in *Escherichia coli* in 1967 (27) and sequenced in 1970 (28). In *E. coli*, 6S RNA binds preferentially to RNAP associated with the σ^{70} factor. 6S RNA accumulates during exponential growth, and reaches its maximum levels in stationary phase (29). The 6S RNA / RNAP interaction leads to inhibition of numerous *E. coli* σ^{70} -dependent promoters and consequently re-orientates the transcription dependent of alternative sigma factors, allowing adaptation to many environmental conditions (reviewed in (30, 31)). Although conserved among bacteria (32), the 6S RNA role(s) and function(s) in many of them remain unknown.

We recently developed a platform to assess *S. aureus* sRNAs required for fitness based on an sRNA mutant library (33). Using this platform, we identified a rifampicin susceptibility phenotype associated with the lack of 6S RNA, pointing to a possible new mechanism of resistance against low rifampicin concentrations. We showed that this phenotype is neither restricted to rifampicin nor to *S. aureus* but extends to other RNAP inhibitors and bacterial species. Characterization of 6S RNA in *S. aureus* indicates its partial involvement in σ^B -dependent transcription regulation at late stationary phase, rather than during transition from exponential to stationary phase. Additional experimental evidence suggests that *S. aureus* 6S RNA has a role in RNAP holoenzyme cohesion.

Results

Absence of 6S RNA confers increased susceptibility to rifampicin in *S. aureus* and *S. enterica*.

At the beginning of this study we examined the possible involvement of sRNAs in processes underlying *S. aureus* susceptibility to antibiotics. To uncover sRNA-associated phenotypes, our laboratory has previously developed a fitness assay based on competition between sRNA-tagged mutants within a library that includes mutants of most *S. aureus bona fide* sRNAs, defined as expressed by an autonomous gene without antisense transcription (33, 34). Briefly, the fitness of individual sRNA deletion mutants growing within a collection of mutants is tested by comparing their proportion in the presence or absence of different compounds. The accumulation or reduction of individual strains are identified by monitoring the tagged sequences. This method distinguishes strains showing even subtle growth differences. Three identical libraries containing 74 putative sRNA mutants and 3 control mutants were challenged with rifampicin at a sub-lethal concentration ($6 \mu\text{g.L}^{-1}$). After three days of growth, one mutant was under-represented ≈ 100 -fold compared to the other mutants when normalized to the same libraries grown in the same medium, without rifampicin (Fig. 1). The mutant with reduced fitness due to the presence of rifampicin carried a deletion of the *ssrS* gene (referred to here as *ssrS^{Sa}*), which encodes 6S RNA, an sRNA known to interact with RNAP, the rifampicin target (5-7).

We asked whether *ssrS^{Sa}* mutant susceptibility to rifampicin observed in the fitness experiment is detectable in monocultures. Serial dilutions of WT and *ssrS^{Sa}* overnight cultures were spotted on solid medium containing low levels of rifampicin ($5 \mu\text{g.L}^{-1}$); in this condition, the *ssrS^{Sa}* mutant was 100-fold more sensitive to rifampicin than the parental strain (Fig. 2A). This susceptibility was reversed by insertion of an *ssrS^{Sa}* copy at an ectopic chromosomal locus ($\Delta\text{ssrS^{Sa}}}$ *ecto-ssrS^{Sa}*) (Fig. S1; Fig. 2A, left panel). A longer growth lag in rifampicin-containing liquid medium was also observed for the *ssrS^{Sa}* mutant compared to the wild-type or complemented strains (Fig. 2C). These two tests indicated that the rifampicin susceptibility phenotype was solely due the absence of 6S RNA. This phenotype is observed within a narrow window of rifampicin concentrations, below the minimal inhibitory concentration (MIC, $12 \mu\text{g.L}^{-1}$). We conclude that 6S RNA protects *S. aureus* cells against sub-lethal concentrations of rifampicin.

As 6S RNA is widely conserved in the bacterial kingdom, we examined its protective role against rifampicin in the enteric pathogen *Salmonella enterica*, a Gram-negative species. The *ssrS* gene of *S. enterica* (*ssrS^{LT2}*) was deleted (Fig. S2). As in *S. aureus*, *ssrS^{LT2}* deletion led to a rifampicin susceptibility phenotype when compared to its parental strain (Fig. 2B, left

panel). However, this phenotype was only partly complemented by insertion of *ssrS*^{LT2} wild-type gene at a chromosomal ectopic position (Fig. 2B, left panel).

6S RNA protection against rifampicin is partially interchangeable between *S. aureus* and *S. enterica*

Since *S. aureus* and *S. enterica* *ssrS* mutants show a similar rifampicin susceptibility phenotype, we investigated whether the 6S RNA genes would be functional in heterologous backgrounds. For this, gene swaps were performed, replacing i) the native *S. enterica* LT2 *ssrS*^{LT2} gene by the *S. aureus* *ssrS*^{Sa} homolog (*S. enterica* Δ *ssrS*^{LT2}::*ssrS*^{Sa}; Fig S2), and ii) the native *S. aureus* *ssrS* gene (*ssrS*^{Sa}) by the *S. enterica* *ssrS*^{LT2} homolog (*S. aureus* Δ *ssrS*^{Sa}::*ssrS*^{LT2}; Fig. S1).

The *ssrS*^{Sa} gene failed to compensate the *S. enterica* Δ *ssrS*^{LT2} strain rifampicin susceptibility (Fig. 2B, left panel). This is possibly due reduced synthesis of staphylococcal 6S RNA in the *S. enterica* background as suggested by the results of Northern blot analysis (Fig. S3A). Interestingly, however, the reverse swap in *S. aureus* Δ *ssrS*^{Sa} partially restored growth in rifampicin (Fig. 2A, left panel). Complementation of *ssrS*^{Sa} by *ssrS* from an evolutionary distant species suggests that different 6S RNAs shield against rifampicin using similar mechanisms.

6S RNA protects RNAP against different RNA polymerase inhibitors

The family of RNAP inhibitors comprises molecules with different mechanisms of action. We chose two RNAP inhibitors, rifabutin, fidaxomicin and a putative RNAP inhibitor, aureothricin, to test the impact of *ssrS*^{Sa} on drug susceptibility.

Rifabutin, a spiro-piperidyl-rifamycin, is a rifampicin analog (35, 36). Fidaxomicin (also known as lipiarmycin (37, 38) and tiacumicin B (39)) is a narrow spectrum antibiotic (40) that inhibits transcription initiation by locking RNAP through an open-clamp state that prevents an efficient interaction with the promoter (41-44). Aureothricin is a member of the dithiolopyrrolones group and has broad-spectrum activity (45). However, the mechanism of action of this molecule remains unclear. For each drug, the appropriate sub-lethal concentrations to use were first established using the HG003 *S. aureus* strain. The *ssrS*^{Sa} mutant showed a ~4 log-fold greater susceptibility to rifabutin than the HG003 strain (Fig. 3A). The *ssrS*^{Sa} mutant was also negatively affected by fidaxomicin compared to the parental strain, with visibly smaller colonies (Fig. 3A). As seen with rifabutin, the susceptibility phenotype was not fully complemented by ectopic expression of *ssrS*^{Sa} with either drug. Contrary to rifabutin and fidaxomicin, no aureothricin phenotype was associated with the absence of 6S RNA (Fig. 3A), possibly reflecting its poorly characterized mode of action.

Fidaxomicin is mainly active against *C. difficile*, a major human intestinal pathogen (40). We decided to test whether *ssrS* deletion also impacts RNAP inhibitor susceptibility in this species. For this, we constructed a $\Delta ssrS$ derivative ($\Delta ssrS^{Cd}$) of *C. difficile* 630 Δerm . *C. difficile* $\Delta ssrS^{Cd}$ was 1000-fold more susceptible to fidaxomicin compared to its parental strain (Fig. 3B, left panel). A plasmid carrying the *ssrS^{Cd}* gene introduced in the $\Delta ssrS^{Cd}$ strain complemented the phenotype by restoring wild-type level of susceptibility to fidaxomicin (Fig. 3B, left panel).

We conclude that *ssrS*-related susceptibility to antibiotics is a common feature of different RNAP inhibitors in evolutionary distant bacterial species. The mechanism associated with this susceptibility phenotype is likely the same for different RNAP-targeted antibiotics and different species, one possibility being 6S RNA protection of RNAP via steric occlusion.

Growth phase-dependent expression of *ssrS* in *S. aureus*

The expression profile of 6S RNA differs according to species (30). We performed Northern experiments to evaluate 6S RNA expression in *S. aureus* (Fig. 4A). 6S RNA was strongly expressed and accumulates to 20-fold higher levels in stationary phase, as determined in *S. aureus* HG003. The expression profile of *S. aureus* 6S RNA was similar to that reported in *Salmonella* (46), *E. coli* (29) and *B. subtilis* 6S-1 RNA, which carries a second 6S RNA (47-50).

In overnight (O/N) samples where 6S RNA is the most abundant, a second, faster-migrating band was also observed (Fig. 4A and S3A). A second band was reported in *C. difficile* even during exponential phase (51). To determine a potential alternative 6S RNA form in *S. aureus*, also previously suggested (52), we performed 5'-3' RACE on samples collected at different time points during growth in rich medium: OD₆₀₀=7 (OD7, corresponding to entry into stationary phase), O/N, and on day 4 (D4). At all sampling points, the major Transcription Start Site (TSS) is the same (Fig. 4B) and in agreement with the site determined by a global TSS mapping (53). Concerning the 3'-end, the longest form ending with a T is the most abundant in OD7 samples, representing 28.6% of analyzed sequences. These data confirm that the size of the longest most abundant form is 231 nucleotides (predicted at 230 nt (52)). Samples from overnight or day 4 cultures exhibited shorter forms that may result from processing or degradation by 3' exonucleases.

Moderate impact of 6S RNA on the global *S. aureus* transcription profile.

The role of 6S RNA in transcriptional regulation was suggested early (29) and then validated by transcriptomic analysis in *E. coli* (54-56); in RNA-seq data, 35 genes were at least 2-fold differentially expressed in a 6S RNA deficient strain compared to the parental at

the onset of stationary phase. To determine whether *S. aureus* 6S RNA could play a similar role, the transcriptional profile of the $\Delta ssrS^{Sa}$ mutant was compared with that of its parental strain by RNA-seq on samples collected at OD₆₀₀=7, which corresponds to the entry into stationary phase of *S. aureus* (Table 1). Transcriptome analyses were performed on biological triplicates and features with a p-value < 0.05 were retained for interpretation. Surprisingly, the transcriptional profiles of parental and $\Delta ssrS^{Sa}$ strains were highly similar. Only three genes were more than 2-fold down-regulated in $\Delta ssrS^{Sa}$ (FC < 0.5; Table 1 top panel). They encode a hypothetical epoxyqueuosine reductase (QueH/SAOUHSC_02911), a hemin transporter (HrtA/SAOUHSC_02640 (its co-functional partner HrtB/SAOUHSC_02641 is also down-regulated), and a 30 amino-acid peptide (SAOUHSC_01817) of unknown function. Other genes related to transporters, cell wall metabolism and redox state were also significantly reduced but with a lower-fold change. All of these genes are regulated by σ^A , except *bstA*, a σ^B DNA-damage-induced gene coding a putative DinB superfamily protein. Taken together, these results suggest that 6S RNA does not redirect transcription during the stationary phase transition in a sigma-dependent manner.

Transcriptome results, as performed in the early period of stationary phase, did not provide evidence linking σ^B transcriptional activity to the presence of 6S RNA. We used a reporter fusion strategy to pursue this question: the gene encoding the fluorescent protein mAmetrine was placed under the transcriptional control of the σ^B -regulated SAOUHSC_00624 promoter (57) (pPsigB-mAmetrine; Fig. 5A). No significant difference of fluorescence was observed between *ssrS^{Sa}* and parental strains when measured for the first 18h of growth in rich liquid medium. Thus, in keeping with transcriptomic findings, we conclude that 6S RNA does not appear to redirect transcription during transition from exponential to stationary phase in *S. aureus*, which differs from what was reported in *E. coli* (56-58). Interestingly, however, after 18h of culture, mAmetrine expression continues to increase in the parental strain, compared to markedly lower expression in $\Delta ssrS^{Sa}$. This result, suggesting that 6S RNA could be important for efficient σ^B -dependent gene expression during starvation, remains to be investigated.

Since the absence of 6S RNA in *S. aureus* leads to an increased susceptibility to rifampicin, we questioned if this phenotype was related to σ^B regulation. The HG002 strain is a HG003 isogenic strain containing an 11 bp-deletion in the *rsbU* gene encoding a σ^B activator (59). Consequently, HG002 is deficient in σ^B activity, illustrated by the absence of yellow pigmentation (60). We first noticed a greater susceptibility to rifampicin of HG002 compared to HG003 (Fig. 5). This observation indicates that lower σ^B activity *per se* confers increased rifampicin susceptibility, as described in *C. difficile sigB* mutant (61). This effect is probably due to a stress adaptation deficiency related to the absence of σ^B regulation. To

determine the effect of 6S RNA in this genetic context, the *ssrS^{Sa}* deletion was introduced in HG002. The resulting strain (HG002 Δ *ssrS^{Sa}*) was considerably more susceptible to rifampicin than the parental strain HG002 (Fig. 5B). This observation indicates that the absence of 6S RNA leads to increased rifampicin susceptibility through a pathway that is independent of σ^B activity.

6S RNA plays a role in RNAP stability in *S. aureus*

6S RNA binds to RNAP- σ^{70} in *E. coli* (29, 47). As RNAP holoenzyme is a protein complex with accessory subunits (especially σ factors), an element binding to this complex could directly influence its stability or composition. We first performed an electrophoretic mobility shift assay (EMSA) in *S. aureus* with radiolabeled 6S RNA (P^{32} -6S RNA), purified sigma factors (σ^A -His and σ^B -His) and RNAP (with His-tagged RpoC) to assess the interaction with 6S RNA (Fig. 6A). A P^{32} -labelled unrelated sRNA, SprB (62), was used as a control. No interactions were detected with SprB. In contrast, our results showed interaction between 6S RNA and RNAP coupled to the vegetative sigma factor, σ^A , to a lesser extent with RNAP- σ^B .

We questioned if the absence of 6S RNA could alter RNAP holoenzyme composition. The amounts of σ^A and β/β' subunits were evaluated in *ssrS^{Sa}* and parental strain cultures at different time points. Western blots were performed with antibodies raised against σ^A and RNAP (Fig. 6B). Interestingly, σ^A pools were lower in the *ssrS^{Sa}* mutant compared to the parental strain and complemented strains in all tested conditions. At day 3 (D3), σ^A pools were decreased by nearly 2-fold in the *ssrS^{Sa}* mutant compared to the parental strain. These results suggest that 6S RNA plays a role in RNAP holoenzyme stability and could act as a protective belt for RNAP- σ^A . We hypothesized that a reduced amount of σ^A could modify strain outgrowth. Growth from HG003 (parental strain), HG003 Δ *ssrS^{Sa}* and its complemented mutant HG003 Δ *ssrS^{Sa}* *ecto-ssrS^{Sa}* from pre-cultures that had grown O/N, 2 days and 3 days were compared (Fig. 6C). Surprisingly, no growth difference was observed between the three strains in BHI, regardless of the pre-culture age. Despite the significant effect on σ^A levels, 6S RNA is not an essential factor for *S. aureus* growth in rich medium.

Discussion

Here we demonstrated that the absence of 6S RNA in *S. aureus* leads to a fitness loss in the presence of low rifampicin concentrations. This marked phenotype was associated with only one sRNA gene (*ssrS^{Sa}*) out of 77 tested mutants in a competition experiment. This phenotype is conserved from Gram-positive to Gram-negative bacteria suggesting a common protective effect.

In *S. aureus*, the rifampicin phenotype was fully restored by ectopic gene complementation, indicating that it was solely due to the absence of 6S RNA. In *S. enterica* however, similarly done complementation of the *ssrS^{LT2}* deletion was only partial, while the native and ectopic copies had similar expression levels (Fig. S3A). In *E. coli*, the *ssrS* and *ygfA* genes are in an operon (48, 63) and mature 6S RNA results from a 5'- and 3'-transcript ends processing (64, 65); similar organisation and regulation is expected in *S. enterica*. Two hypotheses may explain the incomplete complementation of $\Delta ssrS^{LT2}$ rifampicin phenotype: (i) The ectopic *ssrS^{LT2}* copy is subjected to a slightly different processing pathway (not detected in the gel in Fig. S3A) and (ii) $\Delta ssrS^{LT2}$ could exert a polar effect on *ygfA* expression, however, no growth defect has been observed for the mutant so far.

Despite weak similarity between *S. aureus ssrS^{Sa}* and the cognate *S. enterica ssrS^{LT2}* gene, we observed partial complementation of the rifampicin phenotype in *S. aureus* $\Delta ssrS^{Sa}$ by the $\Delta ssrS^{LT2}$ allele. The lack of the reverse complementation (*ssrS^{Sa}* into *S. enterica* $\Delta ssrS^{LT2}$) might be ascribable to the lower expression of *ssrS^{Sa}* in *S. enterica* (Fig. S3A) and/or to any of the hypothesis raised above for the *S. enterica* $\Delta ssrS^{LT2}$ ecto-*ssrS^{LT2}* phenotype.

Susceptibility of the *ssrS* mutants was not observed for all the compounds tested. Differences in the mechanisms of action, binding sites and drug entry efficiencies could explain this observation (42, 66). The $\Delta ssrS^{Sa}$ mutant showed increased susceptibility of *S. aureus* to rifampicin, rifabutin, and fidaxomicin. Similarly, cognate $\Delta ssrS$ *S. enterica* and *C. difficile* mutants showed marked sensitivities to rifampicin and fidaxomicin, respectively. These drugs bind RNAP close to sites interacting with DNA, suggesting that 6S RNA interaction with the enzyme may, at least partially, prevent antibiotic access to their sites. Based on this reasoning, our results suggest that aureothricin, for which toxicity was unaffected by *ssrS^{Sa}* deletion, does not bind RNAP at the interface with DNA.

Our findings suggest differences in the regulatory roles of 6S RNA in *S. aureus* compared to those reported in *E. coli* (54). In the latter species, 6S RNA interaction with the RNAP holoenzyme is proposed to coordinate transcriptional regulation with growth (29). Accordingly, numerous transcriptome analyses performed under different conditions,

indicated that in *E. coli*, many of 6S RNA-regulated genes were related to translational/transcriptional machinery or amino acid metabolism (29, 54-56, 67-70). In contrast, our *S. aureus* transcriptomic analysis and promoter assay reveal no obvious 6S RNA-related differential expression during transition to stationary phase. Two major features of *S. aureus* could explain this phenomenon: (i) lower diversity of sigma factors in *S. aureus* with only four σ factors, among which σ^A and σ^B control the majority of transcribed genes. Knowing that the main alternative sigma factor σ^B is involved in stress response and not only in stationary phase adaptation, σ^B -promoters could be less sensitive to 6S RNA during the transition phase; (ii) the compensatory effect of a co-regulator. The levels of the alarmone ppGpp increases in *E. coli* *ssrS* mutants, and might compensate the lack of 6S RNA (55, 56, 58). This possibility provides an attractive explanation in *S. aureus*, as ppGpp is synthesized in response to nutrient starvation, and drives growth adaptation (71). Further experiments are needed to explore this pathway in *S. aureus*.

Our promoter assay (Fig. 5A) suggests a 6S RNA-dependent expression of σ^B -promoters in late stationary phase, after 18h of culture. Among its known roles in *E. coli*, 6S RNA also influences transcription during long-term starvation (54, 67). Whether *S. aureus* 6S RNA interacts with σ^B for alternative promoter expression during late stationary phase remains unclear. In particular, in the absence of a functional σ^B , the absence of 6S RNA still generates rifampicin inhibition indicating that this phenotype was not due to a lack of reprogramming transcription from σ^A to σ^B . The relationship between 6S RNA and σ^B remains to be characterized.

We showed that *S. aureus* 6S RNA interacts directly with RNAP- σ^A , raising the question of whether this could directly affect the holoenzyme stability. Of note, the $\Delta sau60$ mutant exhibits a moderate reduction in fitness in the presence of rifampicin (Fig. 1B). $\Delta sau60$ corresponds to a deletion within the intergenic sequence upstream of *rpoB* encoding the β subunit of RNA polymerase; this deletion may alter the ratio of RNAP subunits and possibly the RNAP stability, leading to a rifampicin phenotype. However, this attenuated phenotype was not detected by a spot test. In *E. coli*, the majority of 6S RNA is coupled to RNAP- σ^{70} (29). In *Streptococcus pneumoniae*, 6S RNA bound to RNAP was recently proposed to be a stockpile for inactive RNAP (72). In *S. aureus*, the absence of 6S RNA leads to a reduced amount of σ^A in prolonged stationary phase cultures. A similar effect was observed with σ^{70} in *E. coli* (29) and in soluble sigma fraction of *Synechocystis* sp. (73). In *S. aureus*, σ^A is unstable (74); our results indicate that it is probably stabilized by RNAP core enzyme and 6S RNA. Knowing that σ^A is the vegetative sigma factor in *S. aureus*, decreased levels in the $\Delta ssrS^{Sa}$ strain could have a negative impact on growth, and particularly on outgrowth recovery. As comparison, in *B. subtilis*, which expresses two different 6S RNAs,

outgrowth is delayed in cells lacking 6S-1 RNA (75), whereas no extended lag phase was noticed in *E. coli* 6S RNA deficient cells (29). Similar to *E. coli* (29), no lag linked to *ssrS* was observed during *S. aureus* outgrowth from stationary phase, suggesting that reduced σ^A pools in the *ssrS*^{Sa} mutant are enough to manage growth restart and that 6S RNA is not essential for growth in rich medium.

RNAP inhibitors remain in use in combination therapies against difficult-to-treat infections (4). Antibiotic concentrations below the MIC are encountered by bacteria in many environmental conditions including hosts undergoing antimicrobial treatments (76). We demonstrated that 6S RNA provides protection against low concentrations of RNAP inhibitors. 6S RNA is highly conserved, and the effects of *ssrS* deletion on RNAP inhibitor susceptibility were observed in unrelated pathogens. 6S RNA may significantly enhanced fitness to RNAP inhibitors under these conditions. Our studies implicate the importance of 6S RNA in stabilizing RNAP interactions with σ^A , and suggest that it exerts its main roles in prolonged stationary phase. Our findings give insight into the mode of action of 6S RNA in an important pathogen, and suggest the need to develop strategies that prevent low level rifampicin from persisting in the antibiotic-treated host.

This protective effect is possibly due to steric hindrance, as the presence of 6S RNA would reduce the accessibility of the RNAP to its inhibitors. A second non-exclusive proposal is that the destabilization of σ^A associated with the absence of 6S RNA affects the transcriptional program to adapt to low concentrations of RNAP inhibitors. Note that in *S. aureus*, this shielding effect is not associated with the sigma stress factor σ^B .

Material and methods

Bacterial strains and culture. All strains used in this study and their genotypes are listed in Table S1. Strains were cultured at 37°C, with 180 rpm agitation for liquid cultures except for *C. difficile*. The latter was cultured in anaerobic conditions (5% H₂, 5% CO₂, 90% N₂) with 7.5 µg.mL⁻¹ (precultures) or 15 µg.mL⁻¹ thiamphenicol (plates) for plasmid selection. *E. coli* and *S. enterica* (serovar Typhimurium) strains were cultured in lysogeny broth (LB), *S. aureus* strains in brain heart infusion (BHI) or tryptic soy broth (TSB) and *C. difficile* in BHI. When necessary, media were supplemented with antibiotics.

S. aureus mutants were constructed in HG003 or HG002 background (59) by allelic exchange using pIMAY (77) derivatives (except strains for RNAP purification) as described (33). Plasmids used in this study are described in Table S2. Most plasmids constructed for this study were obtained by Gibson assembly (78) as described using primers from Table S3, and cloned in *E. coli* IM08B (79). Genetic features of the main *S. aureus* mutants used in this study are represented in Fig.S1.

To purify *S. aureus* σ factors, *sigA* and *sigB* from HG003 were PCR amplified using primers F-SigA/R-SigA-His and F-SigB/R-SigB-His respectively, and cloned into the NdeI/XhoI restriction sites of pET-21C vector. The resulting pET-21C-sigA and pET-21C-sigB plasmids were transformed into *E. coli* strain BL21(DE3) pLysS leading to strains producing σ^A and σ^B (His)₆-tagged in their C-terminal portions upon IPTG induction.

A HG003 strain expressing a chromosomally encoded His-tagged RpoC for the purification of the RNAP core enzyme was constructed as followed. The recombinational transfer of the Histidine sequence into *rpoC* gene was achieved by two-steps PCR. A sequence encoding for ten Histidines was added upstream from the termination codon, in frame with RpoC (β' subunit of RNA polymerase). The *rpoC*-His fragment was generated by long-flanking homology PCR using the primers listed in table S3 and cloned between the BamH1 and PstI restriction sites of temperature-sensitive pBT2 vector (80) to obtain pBT2-rpoC-His plasmid. The resulting plasmid was electroporated into *S. aureus* RN4220 and then transferred to HG003 strain. The gene encoding for His-tagged RpoC protein was integrated in the *S. aureus* HG003 chromosome by double cross-over recombination as described (81) to obtain the HG003 *rpoC*-his strain.

S. enterica serovar Typhimurium mutants were constructed in the background of strain LT2-derived MA7455 (82) using λ Red recombineering (83). See Fig.S2 for constructions.

C. difficile mutants were constructed in 630 Δ erm background (84). The knock out mutant was obtained using an allelic chromosomal exchange following the published method (85) with primers CM57/CM58 and CM59/CM60 and pMSR vector pDIA7052. To

complement, *ssrS^{Cd}* sequence and its promoter region were PCR amplified using the primer pair CM77/CM78 and cloned into pMTL84121 to produce pDIA7065. Two *E. coli* strains were used as intermediate: NEB 10-Beta for plasmid construction (Table S2) and HB101 RP4 for conjugation.

MIC determination. Antimicrobial susceptibility testing by broth microdilution for rifampicin, rifabutin, fidaxomicin and aureothricin MIC determination in *S. aureus* were performed as described (86). *S. enterica* serovar Typhimurium rifampicin MIC was determined as described (87).

Fitness experiment. The experiment was performed as described (33) with three independent sRNA tagged-mutant libraries grown simultaneously in TSB +/- 6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ rifampicin and sampled at four points: $\text{OD}_{600}=1$, O/N, $\text{OD}_{600}=1$ after the first dilution and $\text{OD}_{600}=1$ after the second dilution. All the mutants were tag-sequenced with an adapted Illumina protocol. The amount of each mutant was normalized to the total amount of bacteria with/without rifampicin and to the inoculum (Fig. 1A). Totally, three mutants (*locus1*, *rsaD(tag26)* and *teg146*) were discarded from the analysis because of experimental troubleshooting. Concerning *sprD* and *sau5949*, only two values were taken in account in the 3rd dilution sampling.

Spot test. Overnight cultures were 10-fold serial diluted in NaCl 0.9% (*S. aureus* and *S. enterica*) or BHI (*C. difficile*) until 10^{-8} and spotted on agar plates containing different sublethal antibiotic concentrations, namely less than MIC (rifampicin $< 12 \mu\text{g.L}^{-1}$ for *S. aureus* or $< 12 \mu\text{g.mL}^{-1}$ for *S. enterica*, rifabutin $< 15.6 \mu\text{g.L}^{-1}$, aureothricin $< 6.25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, fidaxomicin $< 4 \text{ mg.L}^{-1}$ for *S. aureus* or $< 30 \mu\text{g.L}^{-1}$ for *C. difficile*). Pictures were taken after O/N growth or 24h for *C. difficile*.

Growth curves. *S. aureus* strains were cultured in microplates from O/N triplicates cultures 1/1000 diluted in BHI +/- $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ rifampicin. Two and three day-cultures were also used as pre-cultures in Fig. 6C. Absorbance at 600 nm (OD_{600}) was measured overtime with a plate reader (Clariostar).

Fluorescence measurement. mAmetrine expression ($\lambda_{\text{exc}} = 425 \pm 15 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 525 \pm 15 \text{ nm}$) was monitored overtime in microplates by a plate reader (Clariostar), simultaneously to absorbance measurement of overnight triplicates cultures diluted 1:1000 in TSB to limit auto-fluorescence.

RNA extraction. Strains were cultured until the desired OD_{600} . After centrifugation, pellets were frozen in dry-ice ethanol. RNAs were then extracted by phenol-chloroform treatment as described (88). When necessary, RNAs were incubated with Turbo DNase treatment (Thermo Fisher Scientific) prior to a second phenol-chloroform extraction.

Northern Blot. 10 µg total RNAs per well were separated on 1.3% agarose or 10% TBE-urea polyacrylamide gel (Criterion Precast gel) as described (89). For polyacrylamide gels, electrophoresis in TBE 1X was followed by transfer to Hybond-N⁺ membrane in TBE 0.5X using TE70 ECL Semi-Dry Transfer Unit (Amersham Pharmacia Biotech). Probes (Table S3) were [α -³²P]dCTP-labelled.

RNA-seq and transcriptomic analysis. RNAs (DNA-free) from triplicate cultures sampled at OD₆₀₀ = 7 were sequenced using NextSeq 500/550 High Output Kit v2 (75 cycles). Sequences were aligned to the reference genome (CP000253-1-NCTC8325) with Bowtie2 tool and quantified with Feature Counts program. Differential gene expression analysis was performed using DESeq2 algorithm (90). The data for this study have been deposited in the European Nucleotide Archive (ENA) at EMBL-EBI under accession number PRJEB50160 (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJEB50160>).

5'-3' RACE. 5' and 3' ends were determined using circularization method described in (51). 10 µg total RNA of wild-type strain (HG003) were extracted from samplings at OD₆₀₀ 7, O/N and day 4 (D4). Primers used to amplify the 5'/3' junction with Phusion high-fidelity DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific) are listed in Table S3. CloneJET PCR cloning kit (Thermo Fisher Scientific) was used to clone the final PCR products.

Purification of σ^A , σ^B and RNAP core enzyme. For σ purification, *E. coli* strains BL21(DE3) pET-21C-*sigA* and BL21(DE3) pET-21C-*sigB* were grown in 1 L of LB broth at 37°C to OD₆₀₀ 0.5. After induction with 1 mM isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside for 3 h, bacteria were collected by centrifugation, resuspended in 10 mL of buffer A (10 mM HEPES, pH 7.5, 200 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 20 mM Imidazol, 5% glycerol) with 0.25 mg.mL⁻¹ lysozyme per gram of pellet and frozen and thawed two times. Lysates were treated with DNase I (100 units.mL⁻¹) for 20 min at 30°C, and supernatants containing σ^A -His or σ^B -His proteins were obtained by centrifugation at 8000 g for 15 min. For RNA polymerase purification, a fresh overnight culture of *S. aureus* HG003 *rpoC-his* was used to inoculate 500 mL of BHI at OD₆₀₀ 0.1 and grown 5 hours at 37°C. The culture was harvested by centrifugation at 4000 g for 15 min. The cell-pellet was resuspended in 10 mL of buffer A with 1 mg of lysostaphin and DNase I (100 units.mL⁻¹). After an incubation of 20 min at 37°C, the lysate was clarified by centrifuging 30 min at 40000 g. For affinity purification of σ^A -His, σ^B -His and (His)₁₀-tagged RNAP, HisTRAPTM TALON column (5 mL, GE healthcare) was connected to an AKTA prime chromatography system (GE healthcare) equilibrated with buffer B (10 mM HEPES, pH 7.5, 1 M NaCl, 20 mM Imidazol, 5 % glycerol). After loading the lysate containing either σ^A -His, σ^B -His or (His)₁₀-tagged RNAP, the column was washed with 100 mL of buffer B. His-tagged proteins were then eluted using an imidazole gradient, dialyzed in buffer C (10 mM HEPES, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 5 % glycerol) and then subjected to a second step of

purification on heparin column. Proteins were loaded on a HiTrap Heparin HP column (1 mL, GE healthcare) equilibrated with buffer C. After a wash with 20 mL of buffer C, proteins were eluted using a NaCl gradient, dialyzed in buffer C and then concentrated in a centrifugal concentrator with a 10-kDa molecular weight cutoff membrane (Merck Millipore).

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA). *ssrS^{Sa}* and *sprB* were *in vitro* transcribed from a PCR product template T7 promoter-containing (primers listed in Table S3) with MEGAscript T7 transcription kit (Thermo Fisher Scientific). RNAs were separated on 8 % polyacrylamide-7 M urea gel electrophoresis and eluted overnight in G50 elution buffer (20 mM Tris-HCl pH7.5, 2 mM EDTA and 0.25 % SDS). RNAs were precipitated in cold ethanol and 0.3 M of sodium acetate and dephosphorylated using Calf-intestinal alkaline phosphatase (New England Biolabs), according to manufacturer protocol. Obtained RNAs were 5'-radiolabelled with T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs) and [$\gamma^{32}\text{P}$] adenosine triphosphate (ATP) and purified with MicroSpin G-50 column (Amersham Pharmacia Biotech). 140 nM of RNAP alone or preincubated 10 minutes at 37°C with 420 nM of Sigma factors were mixed with 4 nM of radiolabelled 6S RNA or SprB in buffer D (15 mM Hepes pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 5 % glycerol, 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ BSA, 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ *E. coli* tRNA). Complex formation was performed at 37°C during 10 min and samples were loaded on 5 % polyacrylamide-5 % glycerol gel under non-denaturing conditions. Gels were dried and visualized using a Typhoon Phosphorimager (Molecular Dynamic).

σ^A and β subunits quantification. *S. aureus* strains were cultured in triplicates until the desired OD₆₀₀. Frozen pellets were lysed in 50 mM TRIS-HCl buffer pH 7.5 with glass beads. Total protein amount in the supernatant was determined by Bradford protein assay. Western-Blot electrophoresis was performed with 3 μg proteins per well, using 8% Bis-TRIS Plus polyacrylamide gel (Bolt, Invitrogen). Transfer and hybridization followed iBlot and iBind manufacturer instructions (Invitrogen) respectively. Membranes were pre-hybridized at 4°C O/N with human serum 1/10000e to saturate unspecific binding. Rabbit primary antibodies were used for immunodetection of σ^A (anti- σ^A , 1:5000 dilution) and β subunit (anti-RNAP, 1:10000 dilution). A HRP-conjugated goat anti-rabbit (Advansta, 1:4000 dilution) was chosen as secondary antibody. Pictures were taken with a CCD Camera.

Acknowledgments

We are grateful to our colleague Sandy Gruss (INRAE, MICALIS) for critical reading of the manuscript. We thank Patricia Kerboriou (I2BC), Claire Toffano-Nioche (I2BC) and Mehdi El Sadek Fadel (I2BC) for technical, bioinformatics and statistical support. We are grateful to Masaya Fujita (University of Houston) who graciously provided anti- σ^A antibodies. We thank Dodo Bourbon for helpful discussions and warm support. We acknowledge the high-throughput sequencing facility of I2BC for its sequencing and bioinformatics expertise and for its contribution to this study.

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche [ANR-19-CE12-0006-01 (RRARE)]. M.E. and W. L were the recipient of scholarships from the *Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation* (MESRI) and Chinese scholarship council (CSC), respectively.

Bibliography

1. Lowy FD. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med 339:520-32.
2. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG, Jr. 2015. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. Clin Microbiol Rev 28:603-61.
3. Mancuso G, Midiri A, Gerace E, Biondo C. 2021. Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens. Pathogens 10.
4. Zimmerli W, Sendi P. 2019. Role of rifampin against staphylococcal biofilm infections in vitro, in animal models, and in orthopedic-device-related infections. Antimicrob Agents Chemother 63.
5. Sippel A, Hartmann G. 1968. Mode of action of rifamycin on the RNA polymerase reaction. Biochim Biophys Acta 157:218-9.
6. Hartmann G, Honikel KO, Knusel F, Nuesch J. 1967. The specific inhibition of the DNA-directed RNA synthesis by rifamycin. Biochim Biophys Acta 145:843-4.
7. Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A, Darst SA. 2001. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. Cell 104:901-12.
8. Darst SA. 2001. Bacterial RNA polymerase. Curr Opin Struct Biol 11:155-62.
9. Murakami KS. 2015. Structural biology of bacterial RNA polymerase. Biomolecules 5:848-64.
10. Murakami KS, Darst SA. 2003. Bacterial RNA polymerases: the whole story. Curr Opin Struct Biol 13:31-9.
11. Feklistov A, Sharon BD, Darst SA, Gross CA. 2014. Bacterial sigma factors: a historical, structural, and genomic perspective. Annu Rev Microbiol 68:357-76.
12. Gruber TM, Gross CA. 2003. Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. Annu Rev Microbiol 57:441-66.
13. Soutourina O, Dubois T, Monot M, Shelyakin PV, Saujet L, Boudry P, Gelfand MS, Dupuy B, Martin-Verstraete I. 2020. Genome-wide transcription start site mapping and promoter assignments to a sigma factor in the human enteropathogen *Clostridioides difficile*. Front Microbiol 11:1939.
14. Deora R, Misra TK. 1996. Characterization of the primary sigma factor of *Staphylococcus aureus*. J Biol Chem 271:21828-34.
15. Deora R, Tseng T, Misra TK. 1997. Alternative transcription factor sigma^{SB} of *Staphylococcus aureus*: characterization and role in transcription of the global regulatory locus *sar*. J Bacteriol 179:6355-9.

16. Kullik I, Giachino P, Fuchs T. 1998. Deletion of the alternative sigma factor sigmaB in *Staphylococcus aureus* reveals its function as a global regulator of virulence genes. J Bacteriol 180:4814-20.
17. van Schaik W, Abee T. 2005. The role of sigmaB in the stress response of Gram-positive bacteria -- targets for food preservation and safety. Curr Opin Biotechnol 16:218-24.
18. 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.
19. Fagerlund A, Granum PE, Havarstein LS. 2014. *Staphylococcus aureus* competence genes: mapping of the SigH, ComK1 and ComK2 regulons by transcriptome sequencing. Mol Microbiol 94:557-79.
20. Shaw LN, Lindholm C, Prajsnar TK, Miller HK, Brown MC, Golonka E, Stewart GC, Tarkowski A, Potempa J. 2008. Identification and characterization of sigma, a novel component of the *Staphylococcus aureus* stress and virulence responses. PLoS One 3:e3844.
21. Browning DF, Butala M, Busby SJW. 2019. Bacterial Transcription Factors: Regulation by Pick "N" Mix. J Mol Biol 431:4067-4077.
22. Waters LS, Storz G. 2009. Regulatory RNAs in bacteria. Cell 136:615-28.
23. Wagner EGH, Romby P. 2015. Small RNAs in Bacteria and Archaea: Who They Are, What They Do, and How They Do It. Advances in Genetics, Vol 90 90:133-208.
24. Romby P, Charpentier E. 2010. An overview of RNAs with regulatory functions in gram-positive bacteria. Cell Mol Life Sci 67:217-37.
25. Boulloc P, Felden B. 2011. Ribonucleic acids: regulators of *Staphylococcus aureus* and role in bacterial virulence. M S-Medecine Sciences 27:238-241.
26. Boulloc P, Repoila F. 2016. Fresh layers of RNA-mediated regulation in Gram-positive bacteria. Curr Opin Microbiol 30:30-35.
27. Hindley J. 1967. Fractionation of 32P-labelled ribonucleic acids on polyacrylamide gels and their characterization by fingerprinting. J Mol Biol 30:125-36.
28. Brownlee GG. 1971. Sequence of 6S RNA of *E. coli*. Nat New Biol 229:147-9.
29. Wassarman KM, Storz G. 2000. 6S RNA regulates *E. coli* RNA polymerase activity. Cell 101:613-23.
30. Wassarman KM. 2018. 6S RNA, a Global Regulator of Transcription. Microbiol Spectr 6.
31. Cavanagh AT, Wassarman KM. 2014. 6S RNA, a global regulator of transcription in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and beyond. Annu Rev Microbiol 68:45-60.

32. Wehner S, Damm K, Hartmann RK, Marz M. 2014. Dissemination of 6S RNA among bacteria. *RNA Biol* 11:1467-78.
33. Le Lam TN, Morvan C, Liu W, Bohn C, Jaszczyszyn Y, Boulloc P. 2017. Finding sRNA-associated phenotypes by competition assays: An example with *Staphylococcus aureus*. *Methods* 117:21-27.
34. Liu W, Rochat T, Toffano-Nioche C, Le Lam TN, Boulloc P, Morvan C. 2018. Assessment of Bona Fide sRNAs in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology* 9:228.
35. Della Bruna C, Schioppacassi G, Ungheri D, Jabes D, Morvillo E, Sanfilippo A. 1983. LM 427, a new spiropiperidylrifamycin: *in vitro* and *in vivo* studies. *J Antibiot (Tokyo)* 36:1502-6.
36. Sanfilippo A, Della Bruna C, Marsili L, Morvillo E, Pasqualucci CR, Schioppacassi G, Ungheri D. 1980. Biological activity of a new class of rifamycins. Spiro-piperidyl-rifamycins. *J Antibiot (Tokyo)* 33:1193-8.
37. Coronelli C, White RJ, Lancini GC, Parenti F. 1975. Lipiarmycin, a new antibiotic from Actinoplanes. II. Isolation, chemical, biological and biochemical characterization. *J Antibiot (Tokyo)* 28:253-9.
38. Parenti F, Pagani H, Beretta G. 1975. Lipiarmycin, a new antibiotic from Actinoplanes. I. Description of the producer strain and fermentation studies. *J Antibiot (Tokyo)* 28:247-52.
39. Theriault RJ, Karwowski JP, Jackson M, Girolami RL, Sunga GN, Vojtko CM, Coen LJ. 1987. Tiacumicins, a novel complex of 18-membered macrolide antibiotics. I. Taxonomy, fermentation and antibacterial activity. *J Antibiot (Tokyo)* 40:567-74.
40. Zhanel GG, Walkty AJ, Karlowsky JA. 2015. Fidaxomicin: A novel agent for the treatment of *Clostridium difficile* infection. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 26:305-12.
41. Talpaert M, Campagnari F, Clerici L. 1975. Lipiarmycin: an antibiotic inhibiting nucleic acid polymerases. *Biochem Biophys Res Commun* 63:328-34.
42. Lin W, Das K, Degen D, Mazumder A, Duchi D, Wang D, Ebright YW, Ebright RY, Sineva E, Gigliotti M, Srivastava A, Mandal S, Jiang Y, Liu Y, Yin R, Zhang Z, Eng ET, Thomas D, Donadio S, Zhang H, Zhang C, Kapanidis AN, Ebright RH. 2018. Structural basis of transcription inhibition by fidaxomicin (lipiarmycin A3). *Mol Cell* 70:60-71 e15.
43. Artsimovitch I, Seddon J, Sears P. 2012. Fidaxomicin is an inhibitor of the initiation of bacterial RNA synthesis. *Clin Infect Dis* 55 Suppl 2:S127-31.
44. Tupin A, Gualtieri M, Leonetti JP, Brodolin K. 2010. The transcription inhibitor lipiarmycin blocks DNA fitting into the RNA polymerase catalytic site. *EMBO J* 29:2527-37.

45. Qin Z, Huang S, Yu Y, Deng H. 2013. Dithiolopyrrolone natural products: isolation, synthesis and biosynthesis. *Mar Drugs* 11:3970-97.
46. Kroger C, Colgan A, Srikumar S, Handler K, Sivasankaran SK, Hammarlof DL, Canals R, Grissom JE, Conway T, Hokamp K, Hinton JC. 2013. An infection-relevant transcriptomic compendium for *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Cell Host Microbe* 14:683-95.
47. Trotochaud AE, Wassarman KM. 2005. A highly conserved 6S RNA structure is required for regulation of transcription. *Nat Struct Mol Biol* 12:313-9.
48. Barrick JE, Sudarsan N, Weinberg Z, Ruzzo WL, Breaker RR. 2005. 6S RNA is a widespread regulator of eubacterial RNA polymerase that resembles an open promoter. *RNA* 11:774-84.
49. Ando Y, Asari S, Suzuma S, Yamane K, Nakamura K. 2002. Expression of a small RNA, BS203 RNA, from the yocI-yocJ intergenic region of *Bacillus subtilis* genome. *FEMS Microbiol Lett* 207:29-33.
50. Thuring M, Ganapathy S, Schluter MAC, Lechner M, Hartmann RK. 2021. 6S-2 RNA deletion in the undomesticated *B. subtilis* strain NCIB 3610 causes a biofilm derepression phenotype. *RNA Biol* 18:79-92.
51. Soutourina OA, Monot M, Boudry P, Saujet L, Pichon C, Sismeiro O, Semenova E, Severinov K, Le Bouguenec C, Coppee JY, Dupuy B, Martin-Verstraete I. 2013. Genome-wide identification of regulatory RNAs in the human pathogen *Clostridium difficile*. *PLoS Genet* 9:e1003493.
52. Pichon C, Felden B. 2005. Small RNA genes expressed from *Staphylococcus aureus* genomic and pathogenicity islands with specific expression among pathogenic strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:14249-14254.
53. 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.
54. Lal A, Krishna S, Seshasayee ASN. 2018. Regulation of Global Transcription in *Escherichia coli* by Rsd and 6S RNA. *G3 (Bethesda)* 8:2079-2089.
55. Geissen R, Steuten B, Polen T, Wagner R. 2010. *E. coli* 6S RNA: a universal transcriptional regulator within the centre of growth adaptation. *RNA Biol* 7:564-8.
56. Neusser T, Polen T, Geissen R, Wagner R. 2010. Depletion of the non-coding regulatory 6S RNA in *E. coli* causes a surprising reduction in the expression of the translation machinery. *BMC Genomics* 11:165.
57. Mader U, Nicolas P, Depke M, Pane-Farre J, Debarbouille M, van der Kooi-Pol MM, Guerin C, Derozier S, Hiron A, Jarmer H, Leduc A, Michalik S, Reilman E, Schaffer

- M, Schmidt F, Bessieres P, Noirot P, Hecker M, Msadek T, Volker U, van Dijl JM. 2016. *Staphylococcus aureus* Transcriptome Architecture: From Laboratory to Infection-Mimicking Conditions. PLoS Genet 12.
58. Cavanagh AT, Chandrangu P, Wassarman KM. 2010. 6S RNA regulation of relA alters ppGpp levels in early stationary phase. Microbiology (Reading) 156:3791-3800.
59. 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 78:2877-89.
60. Liu W, Boudry P, Bohn C, Bouloc P. 2020. *Staphylococcus aureus* pigmentation is not controlled by Hfq. BMC Res Notes 13:63.
61. Kint N, Janoir C, Monot M, Hoys S, Soutourina O, Dupuy B, Martin-Verstraete I. 2017. The alternative sigma factor sigma(B) plays a crucial role in adaptive strategies of *Clostridium difficile* during gut infection. Environ Microbiol 19:1933-1958.
62. Bordeau V, Cady A, Revest M, Rostan O, Sassi M, Tattevin P, Donnio PY, Felden B. 2016. *Staphylococcus aureus* regulatory RNAs as potential biomarkers for bloodstream infections. Emerg Infect Dis 22:1570-8.
63. Hsu LM, Zagorski J, Wang Z, Fournier MJ. 1985. *Escherichia coli* 6S RNA gene is part of a dual-function transcription unit. J Bacteriol 161:1162-70.
64. Kim KS, Lee Y. 2004. Regulation of 6S RNA biogenesis by switching utilization of both sigma factors and endoribonucleases. Nucleic Acids Res 32:6057-68.
65. Chae H, Han K, Kim KS, Park H, Lee J, Lee Y. 2011. Rho-dependent termination of *ssrS* (6S RNA) transcription in *Escherichia coli*: implication for 3' processing of 6S RNA and expression of downstream *ygfA* (putative 5-formyl-tetrahydrofolate cyclo-ligase). J Biol Chem 286:114-22.
66. Chen J, Boyaci H, Campbell EA. 2021. Diverse and unified mechanisms of transcription initiation in bacteria. Nat Rev Microbiol 19:95-109.
67. Cavanagh AT, Klocko AD, Liu X, Wassarman KM. 2008. Promoter specificity for 6S RNA regulation of transcription is determined by core promoter sequences and competition for region 4.2 of sigma70. Mol Microbiol 67:1242-56.
68. Gildehaus N, Neusser T, Wurm R, Wagner R. 2007. Studies on the function of the riboregulator 6S RNA from *E. coli*: RNA polymerase binding, inhibition of *in vitro* transcription and synthesis of RNA-directed *de novo* transcripts. Nucleic Acids Res 35:1885-96.
69. Kim EY, Shin MS, Rhee JH, Choy HE. 2004. Factors influencing preferential utilization of RNA polymerase containing sigma-38 in stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. J Microbiol 42:103-10.

70. Trotochaud AE, Wassarman KM. 2004. 6S RNA function enhances long-term cell survival. *J Bacteriol* 186:4978-85.
71. Hauryliuk V, Atkinson GC, Murakami KS, Tenson T, Gerdes K. 2015. Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nat Rev Microbiol* 13:298-309.
72. Hor J, Garriss G, Di Giorgio S, Hack LM, Vanselow JT, Forstner KU, Schlosser A, Henriques-Normark B, Vogel J. 2020. Grad-seq in a Gram-positive bacterium reveals exonucleolytic sRNA activation in competence control. *EMBO J* 39:e103852.
73. Heilmann B, Hakkila K, Georg J, Tyystjarvi T, Hess WR, Axmann IM, Dienst D. 2017. 6S RNA plays a role in recovery from nitrogen depletion in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *BMC Microbiol* 17:229.
74. Mondal R, Ganguly T, Chanda PK, Bandhu A, Jana B, Sau K, Lee CY, Sau S. 2010. Stabilization of the primary sigma factor of *Staphylococcus aureus* by core RNA polymerase. *BMB Rep* 43:176-81.
75. Cavanagh AT, Sperger JM, Wassarman KM. 2012. Regulation of 6S RNA by pRNA synthesis is required for efficient recovery from stationary phase in *E. coli* and *B. subtilis*. *Nucleic Acids Res* 40:2234-46.
76. Andersson DI, Hughes D. 2014. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat Rev Microbiol* 12:465-78.
77. 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.
78. Gibson DG. 2011. Enzymatic assembly of overlapping DNA fragments. *Methods Enzymol* 498:349-61.
79. Monk IR, Tree JJ, Howden BP, Stinear TP, Foster TJ. 2015. Complete Bypass of Restriction Systems for Major *Staphylococcus aureus* Lineages. *MBio* 6:e00308-15.
80. Bruckner R. 1997. Gene replacement in *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus xylosus*. *FEMS Microbiol Lett* 151:1-8.
81. 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.
82. Figueroa-Bossi N, Coissac E, Netter P, Bossi L. 1997. Unsuspected prophage-like elements in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 25:161-73.
83. Datsenko KA, Wanner BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6640-5.
84. Hussain HA, Roberts AP, Mullany P. 2005. Generation of an erythromycin-sensitive derivative of *Clostridium difficile* strain 630 (630Deltaerm) and demonstration that the

- conjugative transposon Tn916DeltaE enters the genome of this strain at multiple sites. J Med Microbiol 54:137-141.
85. Peltier J, Hamiot A, Garneau JR, Boudry P, Maikova A, Hajnsdorf E, Fortier LC, Dupuy B, Soutourina O. 2020. Type I toxin-antitoxin systems contribute to the maintenance of mobile genetic elements in *Clostridioides difficile*. Commun Biol 3:718.
86. Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nat Protoc 3:163-75.
87. Brandis G, Pietsch F, Alemayehu R, Hughes D. 2015. Comprehensive phenotypic characterization of rifampicin resistance mutations in *Salmonella* provides insight into the evolution of resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. J Antimicrob Chemother 70:680-5.
88. Oh ET, So JS. 2003. A rapid method for RNA preparation from Gram-positive bacteria. J Microbiol Methods 52:395-8.
89. Luo X, Esberard M, Bouloc P, Jacq A. 2021. A Small Regulatory RNA Generated from the malK 5' Untranslated Region Targets Gluconeogenesis in *Vibrio* Species. mSphere doi:10.1128/mSphere.00134-21:e0013421.
90. Love MI, Huber W, Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biology 15.

750 **Table 1**

Locus tag / gene name	FC	P-adj	Function / relevant data	Classification	Regulation	TU
SAOUHSC_02911	0.48	2.2E-28	<i>Epoxyqueuosine reductase</i>	tRNA modification	σ^A	
SAOUHSC_02640 / <i>hrtA</i>	0.48	4.2E-10	Hemin efflux ATP-binding protein HrtA	transport and binding	σ^A , HssR	b
SAOUHSC_01817	0.49	5.9E-10	<i>integral component of membrane</i>		σ^A	c
SAOUHSC_01736	0.52	1.0E-08	<i>Unknown.</i> Downstream <i>ssrS</i> (34)		σ^A	a
SAOUHSC_02641 / <i>hrtB</i>	0.53	3.7E-08	Hemin efflux system permease protein HrtB	Transport and binding	σ^A , HssR	b
SAOUHSC_01818 / <i>ald2</i>	0.55	8.0E-07	Alanine dehydrogenase	Energy metabolism	σ^A , CcpA	c
SAOUHSC_00874	0.56	3.5E-10	<i>Thioredoxin-like protein</i>	Hypothetical protein	σ^A	
SAOUHSC_02297	0.57	3.7E-14	S1 RNA-binding domain-containing protein	Protein synthesis	σ^A	d
SAOUHSC_02590	0.60	3.7E-09	<i>Amino acid permease</i>	Transport and binding	σ^A , CcpA, CodY	
SAOUHSC_02296	0.62	1.7E-08	<i>SprT-like protein</i>		σ^A	d
SAOUHSC_00561 / <i>vraX</i>	0.64	4.2E-10	<i>VraX</i>		σ^A	
SAOUHSC_00704	0.64	2.0E-08	<i>ABC-2 transporter</i>		σ^A	
SAOUHSC_03028 / <i>bstA</i>	0.64	1.2E-03	<i>DinB-like protein</i>		σ^B	
SAOUHSC_01735 / <i>tcdA</i>	0.65	1.9E-06	<i>ThiF domain-containing protein</i>	Cofactors biosynthesis	σ^A	a
SAOUHSC_02656	0.65	4.0E-10	<i>Cytochrome c oxidase-like protein</i>		σ^A	
SAOUHSC_00157 / <i>murQ</i>	1.51	1.6E-03	N-acetylmuramic acid-6-phosphate etherase	Cell envelope	σ^A , MurR, CcpA	e
SAOUHSC_00156 / <i>mupG</i>	1.52	1.2E-03	<i>6-phospho-N-acetylmuramidase</i>	Cell envelope	σ^A , MurR, CcpA	e
SAOUHSC_01121 / <i>hla</i>	1.56	1.6E-05	Alpha-hemolysin	Virulence / toxin	σ^A , SaeR, CcpA, RNAIII	
SAOUHSC_02169 / <i>chp</i>	1.60	1.8E-04	Chemotaxis-inhibiting protein CHIPS	Virulence	σ^A	
SAOUHSC_00961 / <i>comK1</i>	1.85	4.3E-08	<i>Competence protein</i>		σ^A , CodY	

751

Table 1. Transcriptomic analysis of $\Delta ssrS^{Sa}$ vs. HG003 in late exponential phase. Fold change (FC) represents the gene expression ratio between $\Delta ssrS^{Sa}$ and its parental strain at OD₆₀₀ of 7. Genes with FC < 0.66 (top panel) or > 1.5 (down panel) are presented. Transcription unit (TU) are indicated by letters. *Italic characters*, hypothetical proteins; P-adj, adjusted p-value.

Figure legends

FIG 1. Fitness loss of the *ssrS*^{Sa} mutant in the presence of sub-lethal concentration of rifampicin.

(A) Scheme of the fitness experiment sampling. Three libraries were cultured during three days in Tryptic Soy Broth (TSB) +/- rifampicin. Cultures were diluted 1:1000 at 24h and 48h. After each dilution step (t= 0, 24 and 48h), samples were withdrawn for tag counting in both growth conditions, when optical density at 600 nm (OD₆₀₀) reached the value of 1 (samplings 1, 3 and 4) and after the first overnight growth (sampling 2) as indicated. (B) Results of the competition assay between *S. aureus* sRNA mutants in presence of rifampicin 6 µg.L⁻¹. y axis, mutant strain names; x axis, relative proportion of each mutant within the population grown in the presence of rifampicin normalized to the inoculum and to the corresponding sample grown in the absence of rifampicin. For each mutant, four histograms are shown; the color code corresponds to samplings indicated in Fig. 1A. Locus 2 and 3 mutants have tag insertion in loci likely not transcribed and not expected to alter the strain fitness. Error bars represent the experimental standard deviation between the three different libraries.

FIG 2. *ssrS* deletions confer a conserved rifampicin susceptibility phenotype from *S. aureus* to *S. enterica*

Three independent clones were grown overnight for each indicated strain. (A) Serial dilutions of overnight *S. aureus* cultures were spotted on Brain Heart Infusion (BHI) agar +/- 5 µg.L⁻¹ rifampicin (RIF). (B) Serial dilutions of overnight *S. enterica* cultures were spotted on Lysogeny Broth (LB) agar +/- 5 µg.mL⁻¹ rifampicin. (C) Growth kinetics of *S. aureus* strains in BHI +/- 5 µg.L⁻¹ rifampicin. OD₆₀₀ is an arbitrary value due to plate reader conditions, not representative of absorbance measurements of *S. aureus* in flasks. Error bars represent standard deviation of three experiments.

FIG 3. Susceptibility to RNAP inhibitors. (A) Serial dilution of *S. aureus* overnight cultures plated on solid medium containing or not antibiotics as indicated: rifabutin, RB; fidaxomicin, FDX; aureothricin, AUR; numbers (1, 2 and 3), independent clones. The antibiotic concentrations used were below the MIC. (B) Serial dilutions of *C. difficile* overnight cultures plated on solid medium containing or not fidaxomicin (FDX) as indicated. Pictures are representative of four replicates. Thiamphenicol was added in all plates (15 µg.mL⁻¹) to maintain the plasmid. p, empty vector pMTL84121; pssrS^{Cd}, pMTL84121-ssrS^{Cd}.

FIG 4. *ssrS* gene expression and 6S RNA sequence in *S. aureus*.

(A) *ssrS*^{Sa} expression. Cultures of HG003 grown in BHI were sampled at OD₆₀₀=1, 4, 7 and O/N. A Northern blot probing for 6S RNA and tmRNA (for normalisation) was performed. A quantification of 6S RNA normalized to tmRNA is presented. The standard deviation is based on biological triplicates. (B) Identification of 6S RNA ends by 5'/3'-RACE mapping. Sequences were analysed separately at different time points (OD7, O/N and day4, D4) and compiled (mix). Coloured letters represent extremities found in analysed sequences. A scale of colours highlights the frequency of each 5' or 3'-end. The highest frequencies are indicated below the corresponding nucleotides.

FIG 5. 6S RNA and σ^B interplay in late stationary phase and in rifampicin response in *S. aureus*.

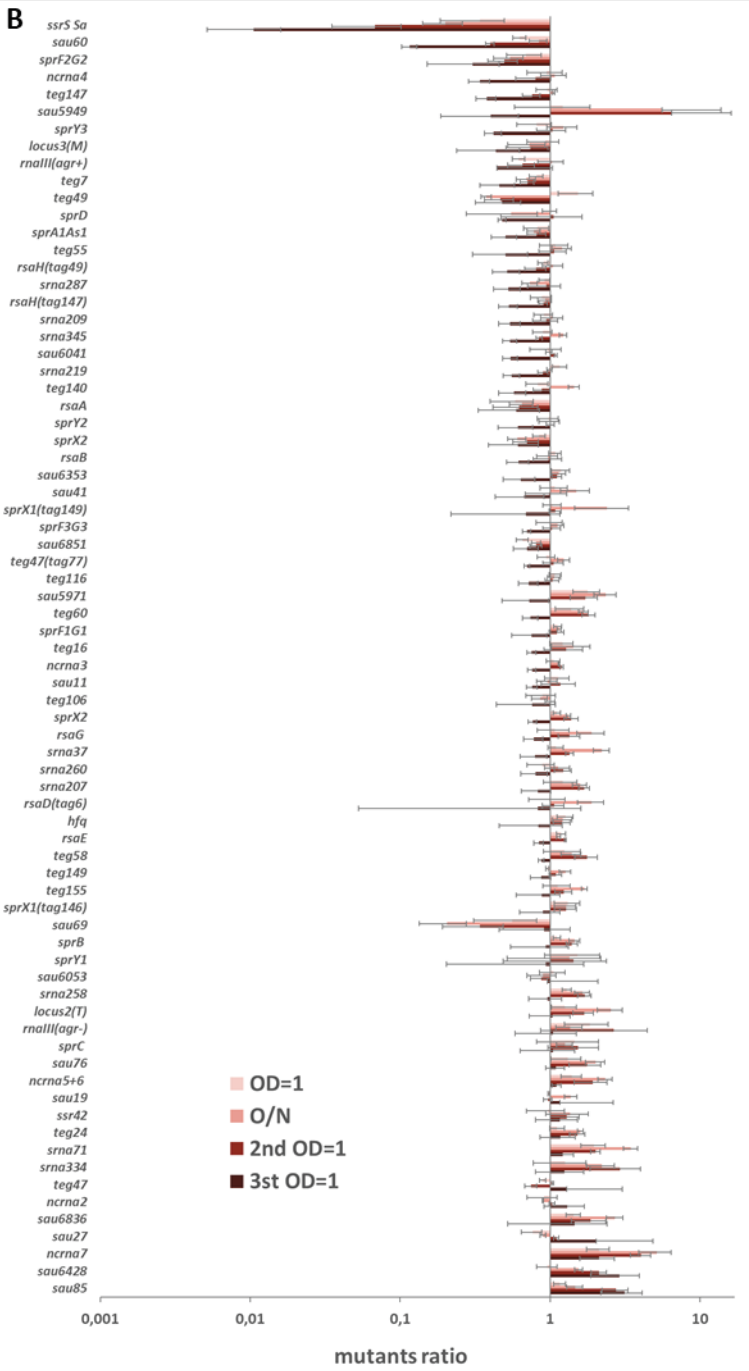
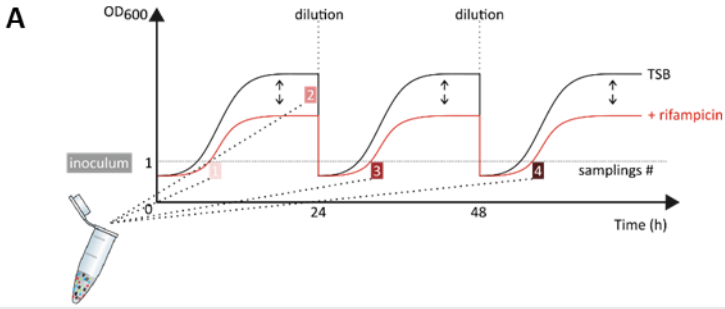
(A) Fluorescence and OD₆₀₀ were monitored simultaneously in three strains (HG003 [parental], HG003 Δ *ssrS*^{Sa} and HG002) expressing a fluorescent protein (mAmetrine) under the control of the σ^B promoter of *SAOUHSC_00624* from a plasmid (pPsigB-mAmetrine). HG002, *rsbU* strain equivalent to σ^B strain, is a negative control. Error bars represent standard deviation of biological triplicates. (B) Spot test comparing HG003 and HG002 (parental and Δ *ssrS*^{Sa} strains, respectively) with sub-lethal concentration of rifampicin (3.13 μ g.L⁻¹). Arbitrary values are shown as OD₆₀₀. Experiment was done with independent duplicates.

FIG 6. 6S RNA and RNAP holoenzyme interactions in *S. aureus*.

(A) EMSA with P³²-6S RNA (6S RNA), RNAP, σ^A and σ^B . All the proteins are His-tagged purified. P³²-SprB (SprB) is a control RNA. (B) Immunodetection of σ^A performed by Western-blot from samplings at OD₆₀₀=1 and 7, O/N and day 3 (D3). Quantification of σ^A is relative to the amount of RNAP β/β' subunits. Experience realized in biological triplicates. W: wild-type (HG003); Δ : *ssrS*^{Sa} mutant; e: Δ *ssrS*^{Sa} ecto-*ssrS*^{Sa}. (C) Growth curves of HG003, *ssrS*^{Sa} mutant (Δ *ssrS*^{Sa}) and complemented (Δ *ssrS*^{Sa} ecto-*ssrS*^{Sa}) strains in BHI. Strains were cultured in independent triplicates from O/N, two days or three days precultures. Error bars represent standard deviation.

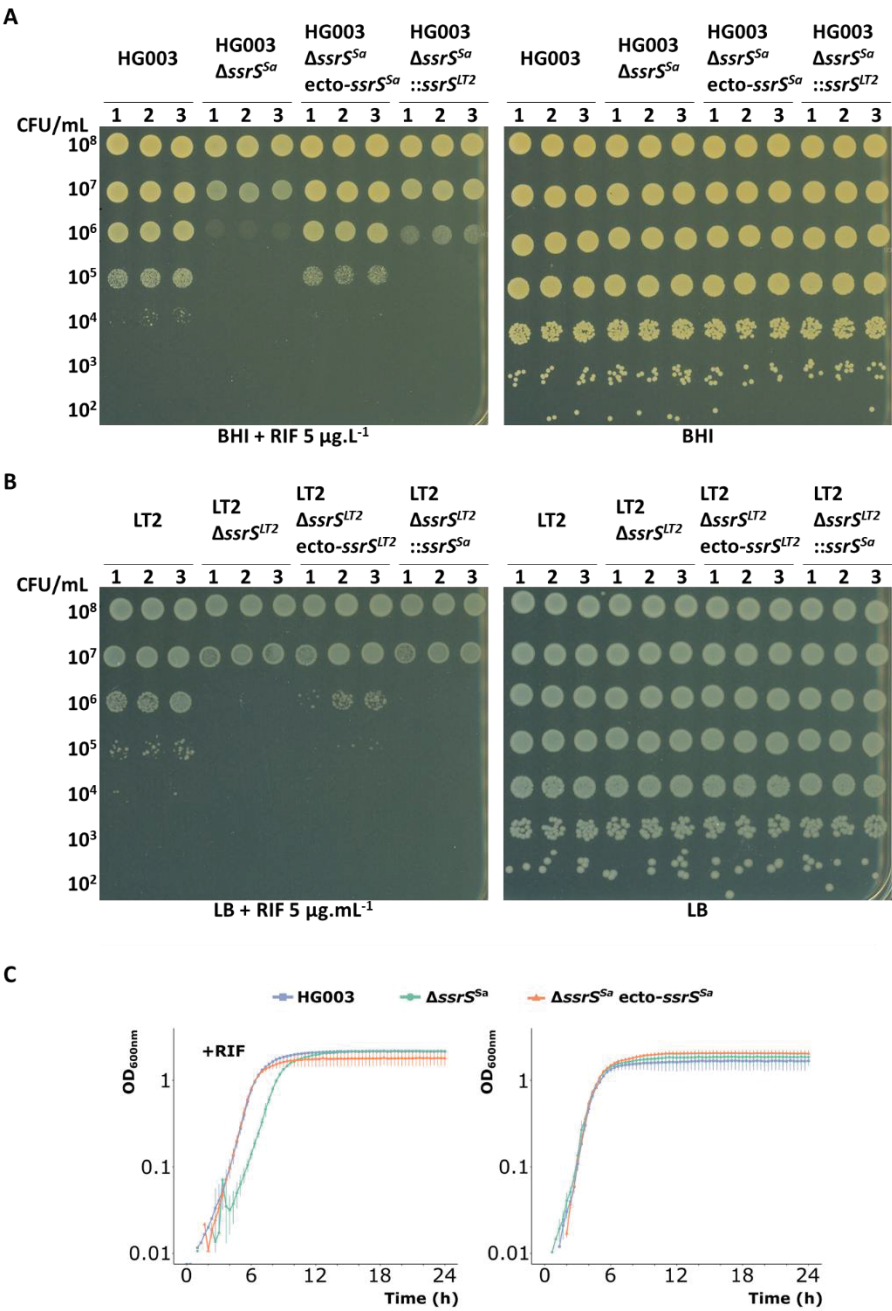
826

Figure 1



828

Figure 2



829

830

Figure 3

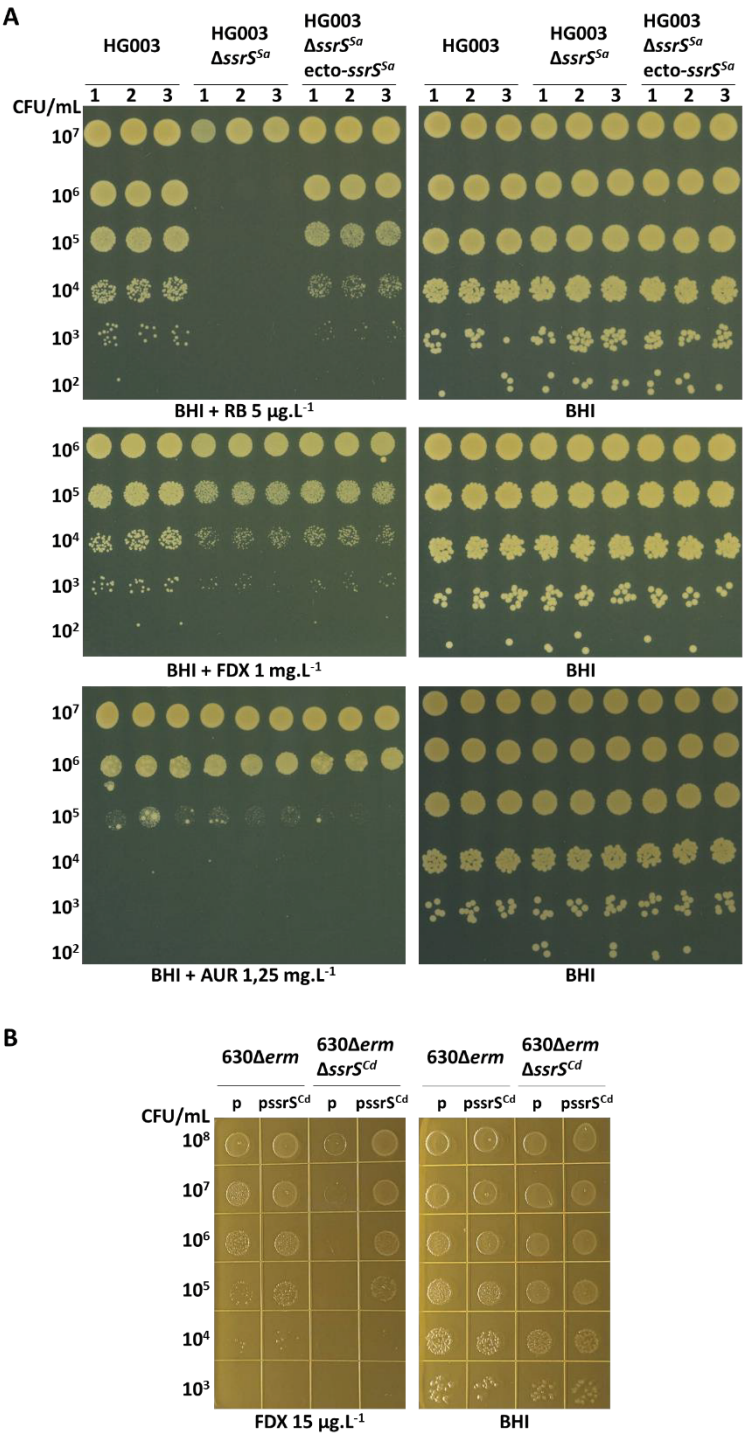


Figure 4

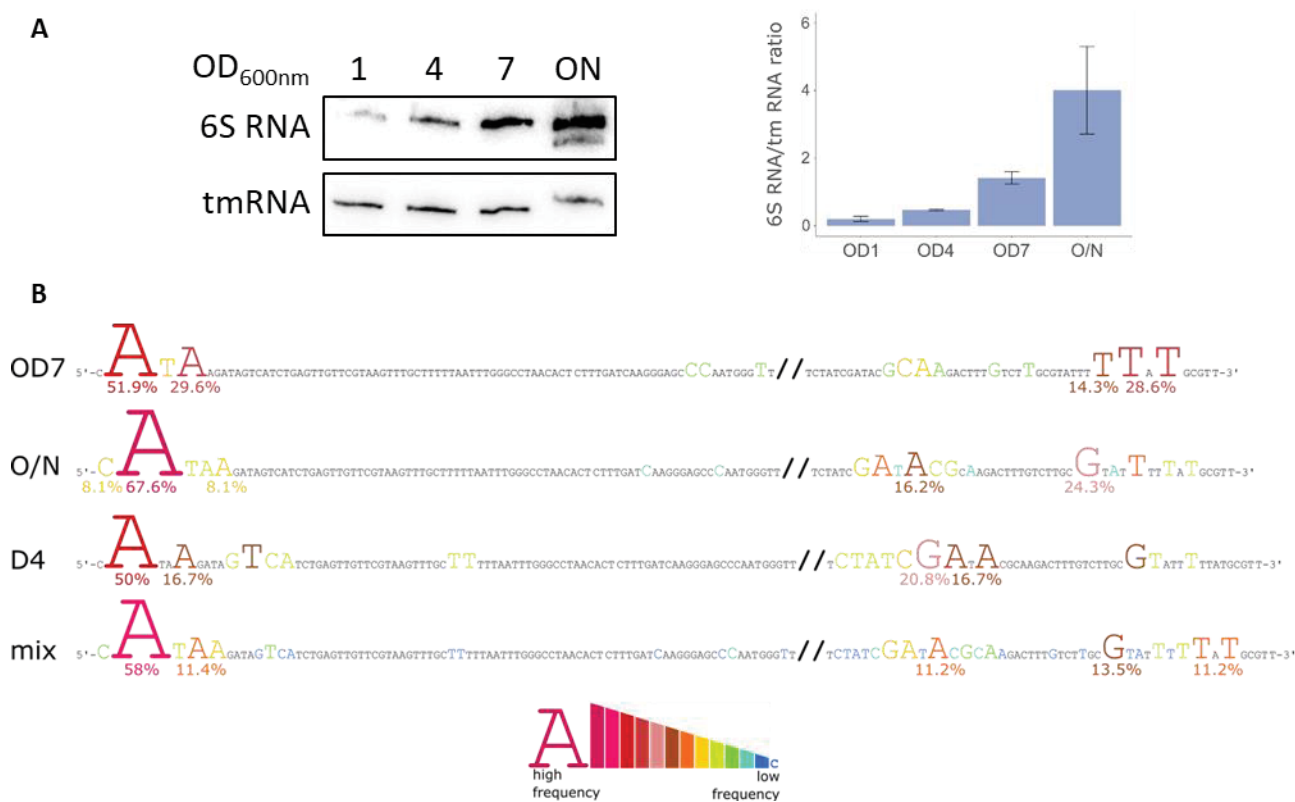


Figure 5

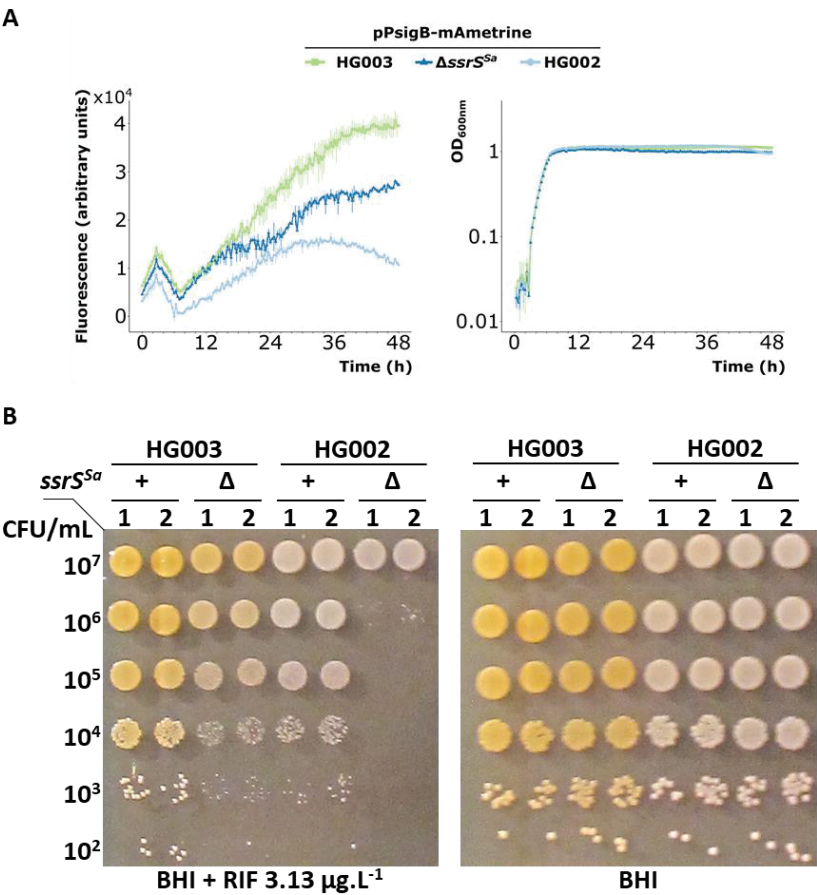
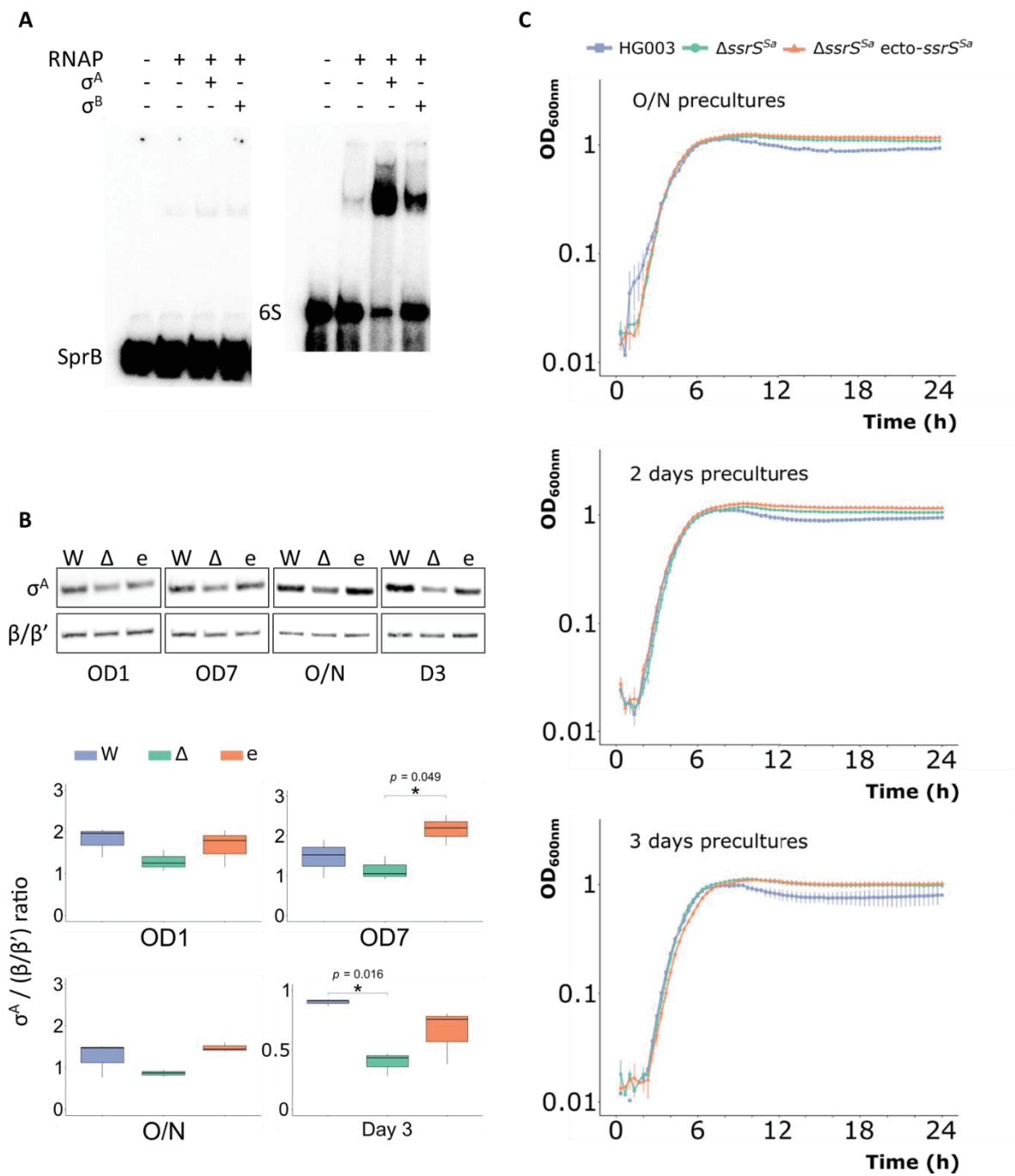


Figure 6



Supplementary data

6S RNA-dependent antibiotic susceptibility

Marick Esberard¹, Marc Hallier², Wenfeng Liu¹, Claire Morvan^{1,3}, Lionello Bossi¹, Nara Figueroa-Bossi¹, Brice Felden^{2§} and Philippe Boulloc^{1*}

¹Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), F-91198 Gif-sur-Yvette, France

²Université de Rennes 1, BRM (Bacterial regulatory RNAs and Medicine) UMR_S1230, F-35000 Rennes, France

³Institut Pasteur, Université de Paris, CNRS UMR2001, Laboratoire Pathogénèses des Bactéries Anaérobies, 75015 Paris, France

§ This work is dedicated to the memory of our colleague Brice Felden who passed away unexpectedly on March 5, 2021

* Correspondance: philippe.boulloc@i2bc.paris-saclay.fr

6S RNA / rifampicin / *Staphylococcus aureus* / RNAP / antibiotic resistance

Table S1. Bacterial strains

Name	Relevant genotype and properties	Reference or construction
<i>E. coli</i>		
IM08B	To engineer plasmids transformable into <i>S. aureus</i>	(1)
NEB 10-Beta	DH10B derivative with high efficiency of transformation	New England Biolabs
HB101 RP4	For conjugation into <i>C. difficile</i>	
<i>σ factors purification</i>		
BL21(DE3)pLysS	IPTG induction of T7 RNA polymerase from a lac promoter	(2)
-	BL21(DE3)pLysS pET-21C- <i>sigA</i>	BL21(DE3)pLysS + pET-21C- <i>sigA</i>
-	BL21(DE3)pLysS pET-21C- <i>sigB</i>	BL21(DE3)pLysS + pET-21C- <i>sigB</i>
<i>S. aureus</i>		
RN4220	NCTC8325 derivative used for transformations with pBT2 plasmid	(3)
HG002	NCTC8325 <i>tcaR</i> repaired	(4)
HG003	NCTC8325 <i>rsbU</i> and <i>tcaR</i> repaired	(4)
<i>Fitness experiment</i>		
SAPhB343	as HG003 Δ <i>sau60::tag003</i>	(5)
SAPhB618	as HG003 Δ <i>malI::tag004</i>	(5)
SAPhB345	as HG003 Δ <i>rsaD::tag006</i>	(5)
SAPhB347	as HG003 Δ <i>rsaOG::tag009</i>	(5)
SAPhB349	as HG003 Δ <i>rsaG::tag011</i>	(5)
SAPhB360	as HG003 Δ <i>sau6041::tag014</i>	(5)
SAPhB364	as HG003 Δ <i>sau6428::tag016</i>	(5)
SAPhB366	as HG003 Δ <i>sau6836::tag017</i>	(5)
SAPhB368	as HG003 Δ <i>teg147::tag018</i>	(5)
SAPhB370	as HG003 Δ <i>teg47(rsaOI)::tag019</i>	(5)
SAPhB372	as HG003 Δ <i>teg49::tag020</i>	(5)
SAPhB374	as HG003 Δ <i>sau6053::tag021</i>	(5)
SAPhB376	as HG003 Δ <i>teg58::tag022</i>	(5)
SAPhB378	as HG003 Δ <i>teg60::tag023</i>	(5)
SAPhB380	as HG003 Δ <i>rsaB::tag025</i>	(5)
SAPhB682	as HG003 Δ <i>rsaD::tag026</i>	(5)

SAPhB382	as HG003 Δ sau69::tag027	(5)
SAPhB386	as HG003 Δ teg116::tag030	(5)
SAPhB390	as HG003 Δ sau6851::tag032	(5)
SAPhB391	as HG003 Δ sau11::tag033	(5)
SAPhB393	as HG003 Δ sau27::tag036	(5)
SAPhB397	as HG003 Δ sau85::tag038	(5)
SAPhB402	as HG003 Δ sau6353::tag042	(5)
SAPhB404	as HG003 Δ rsaE::tag045	(5)
SAPhB302	as HG003 Δ maIII(agr-)::tag047	(5)
SAPhB407	as HG003 Δ sau19::tag048	(5)
SAPhB409	as HG003 Δ rsaH::tag049	(5)
SAPhB412	as HG003 Δ ssr42::tag050	(5)
SAPhB415	as HG003 Δ teg155::tag053	(5)
SAPhB960	as HG003 Δ sprF3::tag070	lab collection
SAPhB961	as HG003 Δ sprF3::tag070	lab collection
SAPhB962	as HG003 Δ sprF3::tag070	lab collection
SAPhB862	as HG003 Δ sRNA334::tag073	lab collection
SAPhB863	as HG003 Δ sRNA334::tag073	lab collection
SAPhB864	as HG003 Δ sRNA334::tag073	lab collection
SAPhB943	as HG003 Δ rsaA::tag075	lab collection
SAPhB944	as HG003 Δ rsaA::tag075	lab collection
SAPhB945	as HG003 Δ rsaA::tag075	lab collection
SAPhB890	as HG003 Δ sau76::tag076	lab collection
SAPhB891	as HG003 Δ sau76::tag076	lab collection
SAPhB962	as HG003 Δ sau76::tag076	lab collection
SAPhB883	as HG003 Δ rsaOI::tag077	lab collection
SAPhB884	as HG003 Δ rsaOI::tag077	lab collection
SAPhB885	as HG003 Δ rsaOI::tag077	lab collection
SAPhB865	as HG003 Δ teg16::tag080	lab collection
SAPhB866	as HG003 Δ teg16::tag080	lab collection
SAPhB867	as HG003 Δ teg16::tag080	lab collection
SAPhB871	as HG003 Δ sRNA287::tag085	lab collection
SAPhB872	as HG003 Δ sRNA287::tag085	lab collection
SAPhB873	as HG003 Δ sRNA287::tag085	lab collection
SAPhB874	as HG003 Δ sRNA71::tag086	lab collection
SAPhB875	as HG003 Δ sRNA71::tag086	lab collection

SAPhB876	as HG003 $\Delta sRNA71::tag086$	lab collection
SAPhB907	as HG003 $\Delta sRNA209::tag093$	lab collection
SAPhB908	as HG003 $\Delta sRNA209::tag093$	lab collection
SAPhB909	as HG003 $\Delta sRNA209::tag093$	lab collection
SAPhB899	as HG003 $\Delta teg106::tag095$	lab collection
SAPhB900	as HG003 $\Delta teg106::tag095$	lab collection
SAPhB946	as HG003 $\Delta teg106::tag095$	lab collection
SAPhB921	as HG003 $\Delta sRNA260::tag096$	lab collection
SAPhB922	as HG003 $\Delta sRNA260::tag096$	lab collection
SAPhB947	as HG003 $\Delta sRNA260::tag096$	lab collection
SAPhB910	as HG003 $\Delta sRNA345::tag097$	lab collection
SAPhB911	as HG003 $\Delta sRNA345::tag097$	lab collection
SAPhB912	as HG003 $\Delta sRNA345::tag097$	lab collection
SAPhB932	as HG003 $\Delta ncRNA2::tag099$	lab collection
SAPhB933	as HG003 $\Delta ncRNA2::tag099$	lab collection
SAPhB934	as HG003 $\Delta ncRNA2::tag099$	lab collection
SAPhB940	as HG003 $\Delta ncRNA3::tag100$	lab collection
SAPhB941	as HG003 $\Delta ncRNA3::tag100$	lab collection
SAPhB942	as HG003 $\Delta ncRNA3::tag100$	lab collection
SAPhB954	as HG003 $\Delta ssrS^{Sa}::tag107$	lab collection
SAPhB955	as HG003 $\Delta ssrS^{Sa}::tag107$	lab collection
SAPhB956	as HG003 $\Delta ssrS^{Sa}::tag107$	lab collection
SAPhB1006	as HG003 $\Delta sprF1::tag110$	lab collection
SAPhB1007	as HG003 $\Delta sprF1::tag110$	lab collection
SAPhB1008	as HG003 $\Delta sprF1::tag110$	lab collection
SAPhB974	as HG003 $\Delta sprX2::tag111$	lab collection
SAPhB975	as HG003 $\Delta sprX2::tag111$	lab collection
SAPhB997	as HG003 $\Delta sprX2::tag111$	lab collection
SAPhB978	as HG003 $\Delta sprY2::tag112$	lab collection
SAPhB979	as HG003 $\Delta sprY2::tag112$	lab collection
SAPhB980	as HG003 $\Delta sprY2::tag112$	lab collection
SAPhB957	as HG003 $\Delta sprY3::tag113$	lab collection
SAPhB958	as HG003 $\Delta sprY3::tag113$	lab collection
SAPhB959	as HG003 $\Delta sprY3::tag113$	lab collection
SAPhB901	as HG003 $\Delta sau41::Tag115$	lab collection
SAPhB902	as HG003 $\Delta sau41::Tag115$	lab collection

SAPhB903	as HG003 Δ <i>sau41</i> ::Tag115	lab collection
SAPhB948	as HG003 Δ <i>sau5949</i> ::tag117	lab collection
SAPhB949	as HG003 Δ <i>sau5949</i> ::tag117	lab collection
SAPhB950	as HG003 Δ <i>sau5949</i> ::tag117	lab collection
SAPhB966	as HG003 Δ <i>sprF2</i> ::tag118	lab collection
SAPhB967	as HG003 Δ <i>sprF2</i> ::tag118	lab collection
SAPhB998	as HG003 Δ <i>sprF2</i> ::tag118	lab collection
SAPhB1031	as HG003 Δ <i>sprB</i> ::tag121	lab collection
SAPhB1032	as HG003 Δ <i>sprB</i> ::tag121	lab collection
SAPhB1033	as HG003 Δ <i>sprB</i> ::tag121	lab collection
SAPhB1015	<i>locus3</i> ::tag139	lab collection
SAPhB1016	<i>locus3</i> ::tag139	lab collection
SAPhB1017	<i>locus3</i> ::tag139	lab collection
SAPhB1012	<i>locus2</i> ::tag140	lab collection
SAPhB1013	<i>locus2</i> ::tag140	lab collection
SAPhB1014	<i>locus2</i> ::tag140	lab collection
SAPhB1009	<i>locus1</i> ::tag141	lab collection
SAPhB1010	<i>locus1</i> ::tag141	lab collection
SAPhB1011	<i>locus1</i> ::tag141	lab collection
SAPhB1018	as HG003 Δ <i>sau5971</i> ::tag142	lab collection
SAPhB1019	as HG003 Δ <i>sau5971</i> ::tag142	lab collection
SAPhB1020	as HG003 Δ <i>sau5971</i> ::tag142	lab collection
SAPhB976	as HG003 Δ <i>sprA1</i> ::tag144	lab collection
SAPhB977	as HG003 Δ <i>sprA1</i> ::tag144	lab collection
SAPhB996	as HG003 Δ <i>sprA1</i> ::tag144	lab collection
SAPhB1027	as HG003 Δ <i>sprX2</i> ::tag145 Δ <i>sprX1</i> ::tag149	lab collection
SAPhB1028	as HG003 Δ <i>sprX2</i> ::tag145 Δ <i>sprX1</i> ::tag149	lab collection
SAPhB1029	as HG003 Δ <i>sprX2</i> ::tag145 Δ <i>sprX1</i> ::tag149	lab collection
SAPhB1003	as HG003 Δ <i>sprX1</i> ::tag146	lab collection
SAPhB1004	as HG003 Δ <i>sprX1</i> ::tag146	lab collection
SAPhB1005	as HG003 Δ <i>sprX1</i> ::tag146	lab collection
SAPhB971	as HG003 Δ <i>rsaH</i> ::tag147	lab collection
SAPhB972	as HG003 Δ <i>rsaH</i> ::tag147	lab collection
SAPhB973	as HG003 Δ <i>rsaH</i> ::tag147	lab collection
SAPhB1021	as HG003 Δ <i>sprY1</i> ::tag148	lab collection
SAPhB1022	as HG003 Δ <i>sprY1</i> ::tag148	lab collection

SAPhB1023	as HG003 $\Delta sprY1::tag148$	lab collection
SAPhB880	as HG003 $\Delta teg146::tag071$	lab collection
SAPhB882	as HG003 $\Delta teg146::tag071$	lab collection
SAPhB886	as HG003 $\Delta srna37::tag072$	lab collection
SAPhB887	as HG003 $\Delta srna37::tag072$	lab collection
SAPhB888	as HG003 $\Delta srna37::tag072$	lab collection
SAPhB877	as HG003 $\Delta teg149::tag078$	lab collection
SAPhB878	as HG003 $\Delta teg149::tag078$	lab collection
SAPhB879	as HG003 $\Delta teg149::tag078$	lab collection
SAPhB868	as HG003 $\Delta teg7::tag079$	lab collection
SAPhB869	as HG003 $\Delta teg7::tag079$	lab collection
SAPhB870	as HG003 $\Delta teg7::tag079$	lab collection
SAPhB913	as HG003 $\Delta srna207::tag087$	lab collection
SAPhB914	as HG003 $\Delta srna207::tag087$	lab collection
SAPhB915	as HG003 $\Delta srna207::tag087$	lab collection
SAPhB896	as HG003 $\Delta teg140::tag090$	lab collection
SAPhB897	as HG003 $\Delta teg140::tag090$	lab collection
SAPhB898	as HG003 $\Delta teg140::tag090$	lab collection
SAPhB904	as HG003 $\Delta teg55::tag092$	lab collection
SAPhB905	as HG003 $\Delta teg55::tag092$	lab collection
SAPhB906	as HG003 $\Delta teg55::tag092$	lab collection
SAPhB916	as HG003 $\Delta srna219::tag094$	lab collection
SAPhB917	as HG003 $\Delta srna219::tag094$	lab collection
SAPhB918	as HG003 $\Delta srna219::tag094$	lab collection
SAPhB935	as HG003 $\Delta ncrna4::tag101$	lab collection
SAPhB936	as HG003 $\Delta ncrna4::tag101$	lab collection
SAPhB937	as HG003 $\Delta ncrna4::tag101$	lab collection
SAPhB929	as HG003 $\Delta ncrna5+6::tag102$	lab collection
SAPhB930	as HG003 $\Delta ncrna5+6::tag102$	lab collection
SAPhB931	as HG003 $\Delta ncrna5+6::tag102$	lab collection
SAPhB968	as HG003 $\Delta ncrna7::tag106$	lab collection
SAPhB969	as HG003 $\Delta ncrna7::tag106$	lab collection
SAPhB970	as HG003 $\Delta ncrna7::tag106$	lab collection
SAPhB963	as HG003 $\Delta sprC::tag109$	lab collection
SAPhB964	as HG003 $\Delta sprC::tag109$	lab collection
SAPhB965	as HG003 $\Delta sprC::tag109$	lab collection

SAPhB893	as HG003 $\Delta srna258::tag116$	lab collection
SAPhB894	as HG003 $\Delta srna258::tag116$	lab collection
SAPhB895	as HG003 $\Delta srna258::tag116$	lab collection
SAPhB1000	as HG003 $\Delta sprD::tag122$	lab collection
SAPhB1001	as HG003 $\Delta sprD::tag122$	lab collection
SAPhB1002	as HG003 $\Delta sprD::tag122$	lab collection
SAPhB1024	as HG003 $\Delta hfq::tag143$	lab collection
SAPhB1025	as HG003 $\Delta hfq::tag143$	lab collection
SAPhB1026	as HG003 $\Delta hfq::tag143$	lab collection
SAPhB981	as HG003 $\Delta sprX1::tag149$	lab collection
SAPhB982	as HG003 $\Delta sprX1::tag149$	lab collection
SAPhB983	as HG003 $\Delta sprX1::tag149$	lab collection
<i>Complementation, swap studies and others</i>		
SAPhB1566	as HG002 $\Delta ssrS^{Sa}::tag107$ (HG002 $\Delta ssrS^{Sa}$)	HG002 + pIM- $ssrS^{Sa}::tag107$
SAPhB1496	as HG003 $\Delta ssrS^{Sa}::tag107$ <i>locus2::ssrS^{Sa}</i> ($\Delta ssrS^{Sa}$ ecto- $ssrS^{Sa}$)	SAPhB954 + pIM- <i>locus2::ssrS^{Sa}</i>
SAPhB1570	as HG003 $\Delta ssrS^{Sa}::ssrS^{LT2}$	HG003 + pIM- $ssrS^{LT2}$
<i>Fluorescence assay</i>		
SAPhB1713	as HG002 pPsigB-mAmetrine	HG002 + pPsigB- mAmetrine
SAPhB1697	as HG003 pPsigB-mAmetrine	HG003 + pPsigB- mAmetrine
SAPhB1699	as HG003 $\Delta ssrS^{Sa}::tag107$ pPsigB-mAmetrine ($\Delta ssrS^{Sa}$ pPsigB-mAmetrine)	SAPhB954 + pPsigB- mAmetrine
<i>RNAP purification</i>		
-	HG003 <i>rpoC-His</i>	HG003 + pBT2-rpoC- His
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium		
MA7455	STM LT2 Gifsy-1[-]	lab collection
MA14033	as LT2 Gifsy-1[-] $\Delta ssrS^{LT2}$	lab collection
MA14032	as LT2 Gifsy-1[-] $\Delta ssrS^{LT2}::ssrS^{Sa}$	lab collection
PhB5168	as LT2 $\Delta ssrS^{LT2}$ <i>chiPQ::ssrS^{LT2}::cat</i> ($\Delta ssrS^{LT2}$ ecto- $ssrS^{LT2}$)	lab collection
<i>C. difficile</i>		
630 Δerm		(6)
CDIP1622	as 630 Δerm $\Delta ssrS^{Cd}$	630 Δerm + pDIA7052
CDIP1456	as 630 Δerm pMTL84121	630 Δerm + pMTL84121

CDIP1680	as 630 Δ <i>erm</i> Δ <i>ssrS</i> ^{Cd} pMTL84121	CDIP1622 + pMTL84121
CDIP1678	as 630 Δ <i>erm</i> pMTL84121- <i>ssrS</i> ^{Cd}	630 Δ <i>erm</i> + pMTL84121- <i>ssrS</i> ^{Cd}
CDIP1679	as 630 Δ <i>erm</i> Δ <i>ssrS</i> ^{Cd} pMTL84121- <i>ssrS</i> ^{Cd}	CDIP1622 + pMTL84121- <i>ssrS</i> ^{Cd}

Table S2. Plasmids

Name	Relevant properties	Reference or construction*
<i>S. aureus</i>		
pRN12	Expresses the fluorescent protein mAmetrine	(7)
pIMAY	Replication Ts plasmid for genetic engineering in <i>S. aureus</i>	(8)
pIM-ssrS ^{Sa} ::tag107	For <i>ssrS</i> ^{Sa} replacement by tag107	A: 1536/1537 + B: 2119/2120 + C: 1870/1871 + D: 2121/2122
pIM-ssrS ^{LT2}	For <i>ssrS</i> ^{Sa} replacement by <i>ssrS</i> ^{LT2} Vector derived from pIM-ssrS ^{Sa} ::tag107	A: 1536/2597 + B: 2598/2122 + C: 2595/2596
pIM-locus2	SAOUHSC_03030-locus2- SAOUHSC_03031 region cloned in pIMAY	A: 1536/1537 + B: 2228/2231
pIM-locus2::ssrS ^{Sa}	For insertion of <i>ssrS</i> ^{Sa} at locus 2 Vector derived from pIM-locus2	A: 2259/2260 + B: 2463/2464
pPsigB-mAmetrine	mAmetrine reporter fusion of σ^B promoter activity (from SAOUHSC_00624)	A: 2659/2660 + B: 2663/2664
pET-21C-sigA	For overexpression of His-tagged σ^A	c.f. Material and Method
pET-21C-sigB	For overexpression of His-tagged σ^B	c.f. Material and Method
pBT2-rpoC-His	For <i>rpoC</i> replacement by <i>rpoC-his</i>	c.f. Material and Method
<i>C. difficile</i>		
pDIA7052	For <i>ssrS</i> ^{Cd} deletion	c.f. Material and Method
pMTL84121	<i>C. difficile</i> shuttle plasmid	(9)
pDIA7065	As pMTL84121-ssrS ^{Cd} for plasmidic <i>ssrS</i> ^{Cd} expression	c.f. Material and Method

* ##/## indicates primer couples for PCR amplification of products that were assembled by isothermal assembly (10). For primer sequences, see Table S3. pIM plasmids: pIMAY derivatives for *S. aureus* chromosomal modifications. pIM vectors are amplified with primer couple A, inserts with primer couple(s) B +/- C +/- D on HG003, LT2 or 630 Δ erm genomic DNA. Methodology for tag replacement is described (5).

Table S3. Probes and primers

Name	5'-3' sequence	Construction
<i>S. aureus</i> construction primers		
1536/pIMAY_linear_F	GGTACCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGG	pIMAY derivatives
1537/pIMAY_linear_R	GAGCTCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCG	pIMAY derivatives
1870/Tag_amplification_R	ATATACCTAGGTTGTGGGTACAGCAATGAC	pIM-ssrS ^{Sa} ::tag107
1871/Tag_amplification_F	ATATACCTAGGTCCATACGCAGCTATGCAAT	pIM-ssrS ^{Sa} ::tag107
2119/Up-ssrS(6s)-F	CGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCACTC GTAAAGATATGGATGCTT	pIM-ssrS ^{Sa} ::tag107
2120/Up-ssrS(6s)-R	GCGTATGGACCTAGGTATATTATCTTATGATG TTATATTACCACATAATT	pIM-ssrS ^{Sa} ::tag107
2121/ Down-ssrS(6s)-F	ACCCACAACCTAGGTATATTCTATCGATACG CAAGACTTTGTC	pIM-ssrS ^{Sa} ::tag107
2122/Down-ssrS(6s)-R	CCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGGTACCGG TGGCATTGTCTCTTTTCG	pIMAY derivatives
2595/6S_SeT_Sa_F	CATTAATTTTAATTATGTGGTAATATAACATC ATTTCTCTGAGATGTTTGCAAGCGG	pIM-ssrS ^{LT2}
2596/6S_SeT_Sa_R	TCGATAGAGTCCGTATTGCCGAATCTCCGAGA TGCCGCCG	pIM-ssrS ^{LT2}
2597/6S_up_R	GATGTTATATTACCACATAATTAAAATTAATG	pIM-ssrS ^{LT2}
2598/6S_down_F	GGCAATACGGAATCTATCGA	pIM-ssrS ^{LT2}
2228/Up-03030-F	CGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCCTTG TTTCCTTAATTGTTGTACCT	pIM-locus2
2231/Down-03031-R	CCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGGTACCGT CACGTCCTACAAACAAGT	pIM-locus2
2259/F-pIMAY-locus2	TCACTGAAAATTTGTATAAAGATTTAAGTC	pIM-locus2::ssrS ^{Sa}
2260/R-pIMAY-locus2	AGCACGCAATGATTTAAAGGAT	pIM-locus2::ssrS ^{Sa}
2463/pLocus2-6S-F	ATCCTTTAAATCATTTGCGTGCTCGAATGCGCC TAGTGAAGTT	pIM-locus2::ssrS ^{Sa}
2464/pLocus2-6S-R	GACTTAAATCTTTATACAAATTTTCAGTGAAC GCTATAAAACCAACTAATTCT	pIM-locus2::ssrS ^{Sa}
2663/PsigB_U284_F	gactctagaggatccgctagcACCTCCTTTCA CACTATATATCGAA	pPsigB-mAmetrine
2664/PsigB_U284_R	gaaaccattaataatcatcctCCTTGCTTTAA GTGTCTTAATCATAGCTAT	pPsigB-mAmetrine
2659/pRN12_mAmetrine_F	aggatgattattaatggtttcaaaagggt	pPsigB-mAmetrine
2660/pRN12_R	gctagcggatcctctagagtc	pPsigB-mAmetrine

F-SigA	GAAGGAGATATACATATGTCTGATAACACAGT TAAAATT	pET-21C-sigA
R-SigA-His	GTGGTGGTGGTGGTGGTGGTCTCGAGATCCATAA AGTCTTTCAAAC	pET-21C-sigA
F-SigB	GAAGGAGATATACATATGGCGAAAGAGTCGAA ATCAGC	pET-21C-sigB
R-SigB-His	GTGGTGGTGGTGGTGGTGGTCTCGAGTTGATGTGCTG CTTCTTGTAATTTTC	pET-21C-sigB
FpBT2BamH1RpoC	CAGGGTAATGTACCCGGGGATCCCTGAAACTG ATGAAATAATCATTC	pBT2-rpoC-His
RpBT2PstIRpoC	CATTAAAGCTTGCATGCCTGCAGCTAACTTAG AGTTATGAATTGGATC	pBT2-rpoC-His
FHisRpoC	CACCATCACCATCACCATCACCATCACCATTA ACAAGTATATAACAGAGGC	pBT2-rpoC-His
RHisRpoC	TTAATGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT GTTCCGTTACTTCAGTTTGAGA	pBT2-rpoC-His
C. difficile construction primers		
CM57/5'-F-6S	tggtcatgagattatcaaaaggGAAATTATAG ATGTATTCCCAGAAA	pDIA7052
CM58/5'-R-6S	CGTATGTTTCAGGATTTTCATATTATTATTAT	pDIA7052
CM59/3'-F 6S	ATAATAATAATATGAAATCCTGAAACATACGG TGCTACTATTTCAAATAGTAGTACTT	pDIA7052
CM60/3'-R-6S	atcgtagaaatacgggtgttttttGTCTATAAC GATTCCATCATTACTT	pDIA7052
CM77/F_nc410	gagcaaggcaagaccgatcATCCGAATACAAT TATAATGAAAAA	pDIA7065
CM78/R_nc410	CGATTAAGTTGGGTAACGCCAGTCTTAATTGT TACTTGCTTTTTTGAA	pDIA7065
Northern Blot probes		
2528/6S RNA	GTACGCTGCAAGAAAACCCATTGG	-
2828/tmRNA	GCTGTTAGGCGATGCAGAGTGC	-
2829/5S RNA	CGACTACCATCGACGCTAAGGAGC	-
2875/6S RNA-LT2	GGACGAACCGAGCATGCTCAC	-
2876/tmRNA-LT2	GCGTCCGAAATTCCTACATCCTCG	-
EMSA		
T7-6S	TAATACGACTCACTATAGGGATAAGATAGTCA TCTGAGTTGTTTCG	-
AS-6S	AGACAAAGTCTTGCATATCGATAGA	-
T7-sprB	TAATACGACTCACTATAGGGTAAAAATAAGAC GACAT	-
AS-sprB	AAATAAAAAAACCATTCC	-

FIG S1. Construction layout of *S. aureus* mutants. All constructions shown were made in the chromosome.

$\Delta ssrS^{Sa}$

TAATTTTCATTAATTTTAATTATGTGGTAATATAACATC  *ssrS^{Sa}*
tag insert
CTATGCAATAAGCTTAACTCCCACACTAGACCGAGAACCCGCACCCAACCACCCAAGCTTGTCATTG
CTGTACCCCAACCTAGGTATAT **TCTATCGATACGCAAGACTTTGTCTTGCGTATTTTTAT** GCGTTT
CTTTAAG

$\Delta ssrS^{Sa}::ssrS^{LT2}$

TAATTTTCATTAATTTTAATTATGTGGTAATATAACATC **ATTTCTCTGAGATGTTTGCAAGCGGGCCAG**
TCCCCTGAGCCGATATTTCATACCACAAGAATGTGGCGCTCCGCGGTTGGTGAGCATGCTCGGTTCGT
CCGAGAAGCCTTAAACTGTGACGACACATTACCTTGAACCAAGGGTTCAAGGGTTACAGCCTGCGG
CGGCATCTCGGAGATTCGGCAATACGGACTCTATCGATACGCAAGACTTTGTCTTGCGTATTTTTATG
CGTTTCTTTAAG

$\Delta ssrS^{Sa}$ ecto*ssrS*^{Sa}

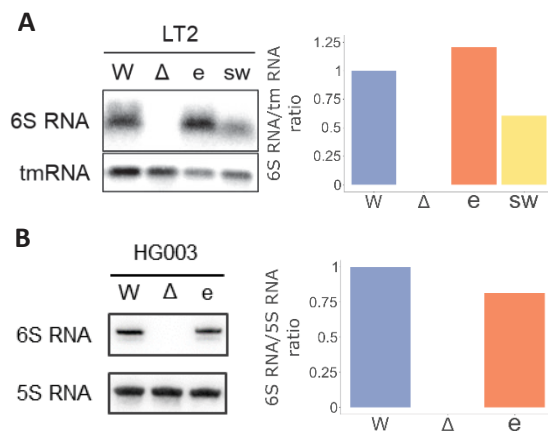
SAOUHSC_03030
GATGAAAGTAATTGGTATATTTTAAATATTTAAATTAGCGCTCGAATCTCATTGATTTGGGCGCTTT
TTAATTTGTATTTAAATCAACCTTTGCTAAATCAAGACTCCCTTTTAAATACGTTTATCCTTTAA
ATCATTGCGTGCTCGAATGCGCCTAGTGAAGTTTCTGATAACAATTAGAAGAACTTTCTTTGCGAAT
TCGTCATAAATTTTAAAAATCAATAAACTTTGGTTTGTATAATTCATTAATTTAATTATGTGG
TAATATAACATC  **ATAAGATAGTCATCTGAGTTGTTGCTAAGTTTGCTTTTTAATTGGGCCTAACACT**
CTTTGATCAAGGGAGCCCAATGGGTTTTCTTGACGCTACACGCCTTATATGAAGGACGTACAAAACA
AGAAACAGGGCACCCACCTGTATATAACAGGCCGAATGATCAAGCTATTATAACTACGGCAATACGGA
CTCTATCGATACGCAAGACTTTGTCTTGCGTATTTTTATGCGTTTCTTTAAGTTTTTAATAAAGAATT
AGTTGGGTTTTATAGCGTTCACTGAAAATTTGTATAAAGATTTAAGTCATTACGTAACATCACATAAA
ATACATTTCTATACTATTCCGCTTCATTGATTAACATTACGTATGCCCTCATAAATCATCATACAAAA
AACACCTTCGTTTAAATTCATTTAATTGCGAATTCACGAAAGTGCCTTATTTATATTTAATGTTT
CAAATTTATACGTCTGTCACTGTTACTGCACACATACCTCAGTCTCACCTCATCATGACACAAAGGAT
ATTGAAAACACGTATAATTATCTTTCTCGTATTT**TTATAGGGTTTTTGCGACCGGATGTTTCT**
SAOUHSC_03031

 locus 2

FIG S2. Construction layout of *S. enterica* serovar Typhimurium LT2 mutants. All constructions shown are chromosomal. Annotations of *ssrS*^{LT2} are predicted from *E. coli* data.



FIG S3. 6S RNA quantification in *S. enterica* (A) and *S. aureus* (B). (A) Northern blot (agarose gel) in LT2 background. Data are normalized to tmRNA expression. W, wild-type; Δ , *ssrS*^{LT2} mutant; e, Δ *ssrS*^{LT2} ecto-*ssrS*^{LT2}; sw, Δ *ssrS*^{LT2::ssrS}^{Sa}. (B) Northern blot (polyacrylamide gel) in HG003 background. 5S RNA is a loading control used for normalization. W, wild-type; Δ , *ssrS*^{Sa} mutant; e, Δ *ssrS*^{Sa} ecto-*ssrS*^{Sa}. Quantification was made from biological duplicates.



References

1. Monk IR, Tree JJ, Howden BP, Stinear TP, Foster TJ. 2015. Complete Bypass of Restriction Systems for Major *Staphylococcus aureus* Lineages. *mBio* 6:e00308-15.
2. Studier FW. 1991. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J Mol Biol* 219:37–44.
3. Kreiswirth BN, Löfdahl S, Betley MJ, O'Reilly M, Schlievert PM, Bergdoll MS, Novick RP. 1983. The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. *Nature* 305:709–712.
4. 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.
5. Le Lam TN, Morvan C, Liu W, Bohn C, Jaszczyszyn Y, Boulloc P. 2017. Finding sRNA-associated phenotypes by competition assays: An example with *Staphylococcus aureus*. *Methods* 117:21–27.
6. Hussain HA, Roberts AP, Mullany P. 2005. Generation of an erythromycin-sensitive derivative of *Clostridium difficile* strain 630 (630Δerm) and demonstration that the conjugative transposon Tn916ΔE enters the genome of this strain at multiple sites. *J Med Microbiol* 54:137–141.
7. de Jong NWM, van der Horst T, van Strijp JAG, Nijland R. 2017. Fluorescent reporters for markerless genomic integration in *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep* 7:43889.
8. Monk IR, Shah IM, Xu M, Tan M-W, Foster TJ. 2012. Transforming the Untransformable: application of direct transformation to manipulate genetically *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *mBio* 3:e00277-11-e00277-11.

9. Heap JT, Pennington OJ, Cartman ST, Minton NP. 2009. A modular system for *Clostridium* shuttle plasmids. *J Microbiol Methods* 78:79–85.
10. Gibson DG. 2011. Enzymatic assembly of overlapping DNA fragments, p. 349–361. *In* *Methods in Enzymology*. Elsevier.

Résultats complémentaires

Résistance à la rifampicine (Rif^R) et ARN 6S

Nous avons précédemment démontré que l'ARN 6S était un déterminant de la protection de l'ARNpol contre la rifampicine. Cependant, ce mécanisme n'a rien à voir avec la résistance à la rifampicine Rif^R due à une mutation ponctuelle au sein du gène *rpoB* codant la sous-unité β de l'ARNpol. Nous nous sommes donc demandés s'il existait un lien entre ces deux phénomènes. Pour cela, j'ai réalisé une sélection Rif^R chez le mutant *ssrS^{Sa}* et sa souche isogénique avec 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de rifampicine ($> 4\times\text{CMI}$; **Figure 18**). J'ai identifié des mutations communes aux deux souches ainsi que des mutations spécifiques à la souches WT ou $\Delta\text{ssrS}^{\text{Sa}}$, précédemment caractérisées chez *S. aureus*. J'ai également retrouvé deux nouvelles mutations Rif^R chez la souche WT en positions 474 et 484. Toutes les mutations obtenues se situent au niveau des clusters Rif^R, sauf une, S746Y, déjà décrite et sélectionnée *in vitro* par la vancomycine (Matsuo et al., 2013). La fréquence d'apparition de la résistance à la rifampicine entre le mutant *ssrS^{Sa}* ($8,9.10^{-8}$) et sa parentale ($2,1.10^{-7}$) ne diffère pas significativement (test-t de Welch, $t(12,6) = 1,63$, $p > 0,05$, $n = 40$). Ces résultats suggèrent que l'ARN 6S n'a pas d'incidence sur la sélection des mutations Rif^R.



Figure 18. Fréquence d'apparition des mutations Rif^R chez $\Delta\text{ssrS}^{\text{Sa}}$ et sa souche parentale.

La séquence protéique de la sous-unité β de l'ARNpol est représentée schématiquement. Les chiffres I, II et III représentent les clusters identifiés comme régions regroupant la majorité des mutations conférant la résistance à la rifampicine (Rif^R). Les substitutions sont indiquées au-dessus de la séquence suivant un code couleur : celles en noir sont les mutations communes aux deux souches déjà décrites dans la littérature, celles en bleu-gris sont les mutations retrouvées chez la souche wild-type (WT) déjà décrites dans la littérature, celles en bleu turquoise sont les nouvelles mutations identifiées chez la

souche WT et celles en vert sont les mutations observées chez le mutant $\Delta ssrS^{Sa}$ ayant déjà été répertoriées chez *S. aureus*. Les résultats présentés sont issus de dix cultures indépendantes pour chaque souche, étalées sur boîte BHI agar 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ rifampicine. Deux clones isolés par culture ont été purifiés sur BHI agar 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ rifampicine. La zone des principaux clusters mutagènes a été séquencée à partir de produits de PCR sur colonies.

Contrôle transcriptionnel de l'ARN 6S

Nous avons vu précédemment que l'ARN 6S ne contrôlait pas l'entrée en phase stationnaire ($\text{DO}_{600\text{nm}} = 7$) chez *S. aureus* mais que son rôle pourrait être plus critique en phase stationnaire prolongée. Afin d'identifier le régulon potentiel de l'ARN 6S, nous avons mimé artificiellement un taux très élevé d'ARN 6S grâce au système d'expression inductible *tet* (**Figure 19A**). L'expression de l'ARN 6S a été induite à $\text{DO}_{600\text{nm}} = 2$ car les cellules sont plus métaboliquement actives qu'en phase stationnaire. Seuls trois gènes σ^B dépendants ont un changement d'expression significatif lié à l'ARN 6S. L'un d'entre eux, *SAOUHSC_00624*, est le gène dont le promoteur a été utilisé dans le système rapporteur précédent, pSigB-mAmetrine. La quantité du messager *SAOUHSC_00624* s'accumule après l'induction de l'expression de *ssrS^{Sa}* ; cette observation corrobore le déclin de fluorescence de la fusion rapporteuse pSigB-mAmetrine chez la souche $\Delta ssrS^{Sa}$ à partir de 18h de culture, lorsque la quantité d'ARN 6S est la plus élevée dans la souche parentale. L'analyse transcriptomique a révélé un groupe de gènes contrôlés par CymR, régulateur du métabolisme de la cystéine (Soutourina et al., 2009), dont l'expression augmente significativement après induction du gène *ssrS^{Sa}* ($\text{FC} > 2$). Ces gènes en grande majorité des protéines hypothétiques impliqués dans le transport des composés soufrés comme la cystéine ou la méthionine représentent 35 % des gènes activés par l'ARN 6S dans notre expérience. Tous régulateurs confondus, les transporteurs, pour la plupart membranaires, sont les plus sensibles à l'induction du gène *ssrS^{Sa}* : ils correspondent à 48 % des gènes surexprimés. Enfin, deux gènes régulés positivement par l'ARN 6S, *opuD2* et *SAOUHSC_02855*, sont impliqués dans la réponse au stress osmotique et le métabolisme de la paroi (**Figure 19B**).

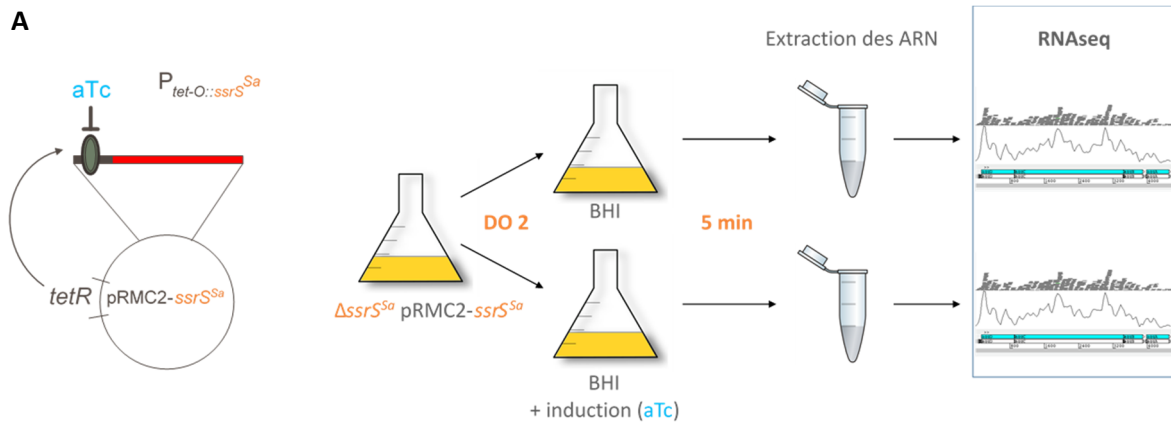


Figure 19. Profil transcriptionnel de la souche $\Delta ssrS^{Sa}$ après induction du gène *ssrS^{Sa}*.

(A) Le gène *ssrS^{Sa}* a été cloné dans le vecteur pRMC2 sous le contrôle d'un promoteur (P_{tet-O}) inducible à l'anhydrotétracycline (aTc) et réprimé par TetR. La souche $\Delta ssrS^{Sa}$ a été transformée par ce plasmide puis cultivée en triplicatas indépendants en BHI à 37°C. A $DO_{600nm} = 2$, chaque culture est divisée dans deux erlenmeyers : l'expression de *ssrS^{Sa}* est induite par l'ajout d'aTc ($0,1 \mu g \cdot mL^{-1}$) dans l'une des deux fioles, l'autre servant de contrôle. Les échantillons sont prélevés 5 minutes après l'induction. Les ARN sont ensuite extraits et traités à la TurboDNase comme décrit précédemment avant d'être séquencés.

(B) Analyse DESeq2 du transcriptome réalisée sur des duplicatas indépendants suite à un problème d'homogénéité au sein d'un échantillon après induction. Les cibles représentées ont une différence d'expression au moins deux fois inférieure ou supérieure par rapport à la condition contrôle (Fold Change, $FC < 0,5$ ou > 2) et une p-value ajustée (P-adj) inférieure à 0,05. Les couleurs associées aux gènes correspondent aux opérons.

Etude des cibles putatives de l'ARN 6S dépendantes de CymR

CymR est un répresseur du métabolisme de la cystéine et des composés soufrés, impliqué dans la virulence, la réponse au stress oxydatif ou la formation de biofilm (Soutourina et al., 2010, 2009). Parmi les transporteurs régulés par CymR, TcyP participe à l'import de cystine chez *S. aureus* (Lensmire et al., 2020). Afin de tester cette cible dont le gène est surexprimé après induction du gène *ssrS^{Sa}*, j'ai réalisé un test de sensibilité à la sélénocystine (**Figure 20A**), un analogue toxique de la cystine, par diffusion (Lensmire et al., 2020). Les diamètres d'inhibition de croissance sont quasi-identiques entre les souches WT, $\Delta ssrS^{Sa}$ et $\Delta ssrS^{Sa}$ *ectossrS^{Sa}*. Les résultats obtenus ne permettent donc pas de confirmer *tcyP* comme possible cible de l'ARN 6S. Pour explorer d'autres phénotypes liés à CymR et donc potentiellement à l'ARN 6S, j'ai effectué un test de croissance en biofilm avec et sans glucose (**Figure 20B**), ce dernier améliorant la formation de biofilm. Toutes les souches utilisées (WT, $\Delta ssrS^{Sa}$ et $\Delta ssrS^{Sa}$ *ectossrS^{Sa}*) sont capables de former un biofilm avec ou sans glucose adjuvant. Cependant, l'absorbance à 595 nm des cellules colorées au cristal violet n'a pas permis de mettre en évidence une différence de croissance entre les souches.

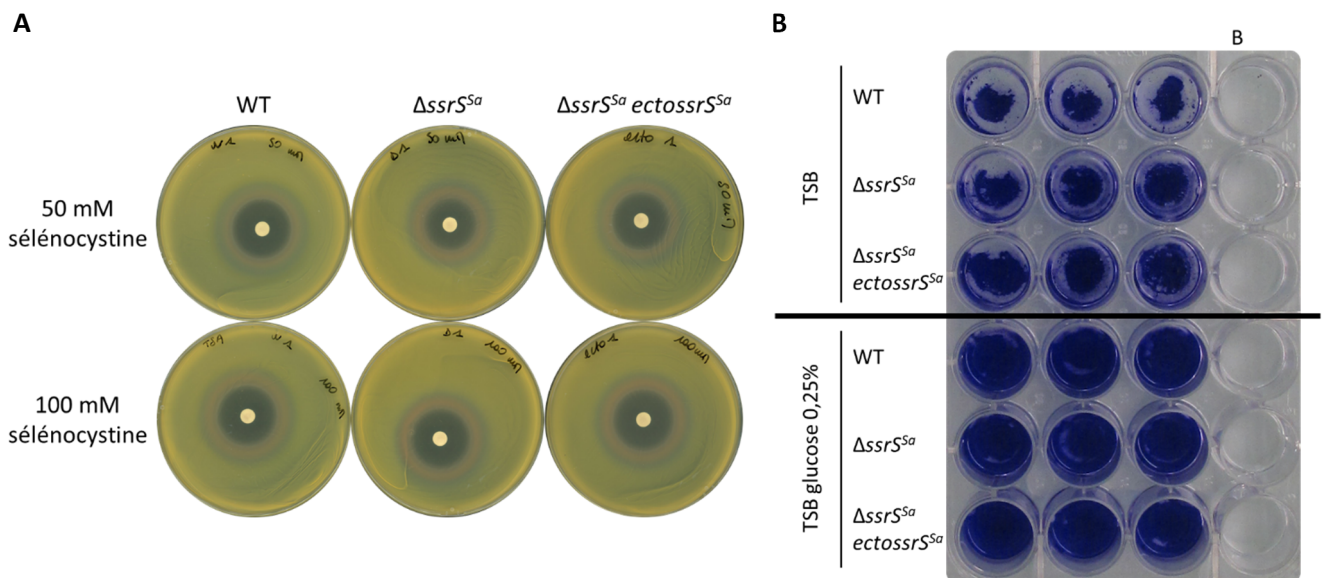


Figure 20. Exploration des phénotypes dépendants de CymR dans un contexte génétique $\Delta ssrS^{Sa}$.

(A) Test de sensibilité à la sélénocystine par la méthode de diffusion. Des boîtes TSA (Tryptic Soy Agar) ont été ensemencées avec des cultures saturées (O/N) de *S. aureus* WT, $\Delta ssrS^{Sa}$ ou $\Delta ssrS^{Sa}$ *ectossrS^{Sa}*. 10 μ L de sélénocystine à 50 mM ou 100 mM (HCl 1M) ont été déposés sur des disques de diffusion. Les photos ont été prises après incubation O/N à 37°C. Cultures réalisées en triplicatas indépendants. (B) Biofilm en microplaque. 1 mL de cultures O/N WT, $\Delta ssrS^{Sa}$ ou $\Delta ssrS^{Sa}$ *ectossrS^{Sa}* ajustées à 10^5 bactéries/mL de TSB +/- 0,25 % glucose a été déposé dans chaque puits. Les cultures ont été pré-

incubées 1h à 37°C puis les puits ont été rincés et remplis à nouveau avec 1 mL de TSB +/- 0,25 % glucose. La plaque a été incubée 4-5h à 37°C avant de renouveler le milieu de culture et de la ré-incuber O/N à 37°C. Les puits ont ensuite été lavés deux fois au NaCl 0,9 % avant d'être colorés avec 300 μ L de cristal violet 0.1 % suivant le protocole Peterson et al., 2011. Expérience réalisée avec des triplicatas indépendants. B : Blanc.

Analyse de la paroi du mutant $\Delta ssrS^{Sa}$

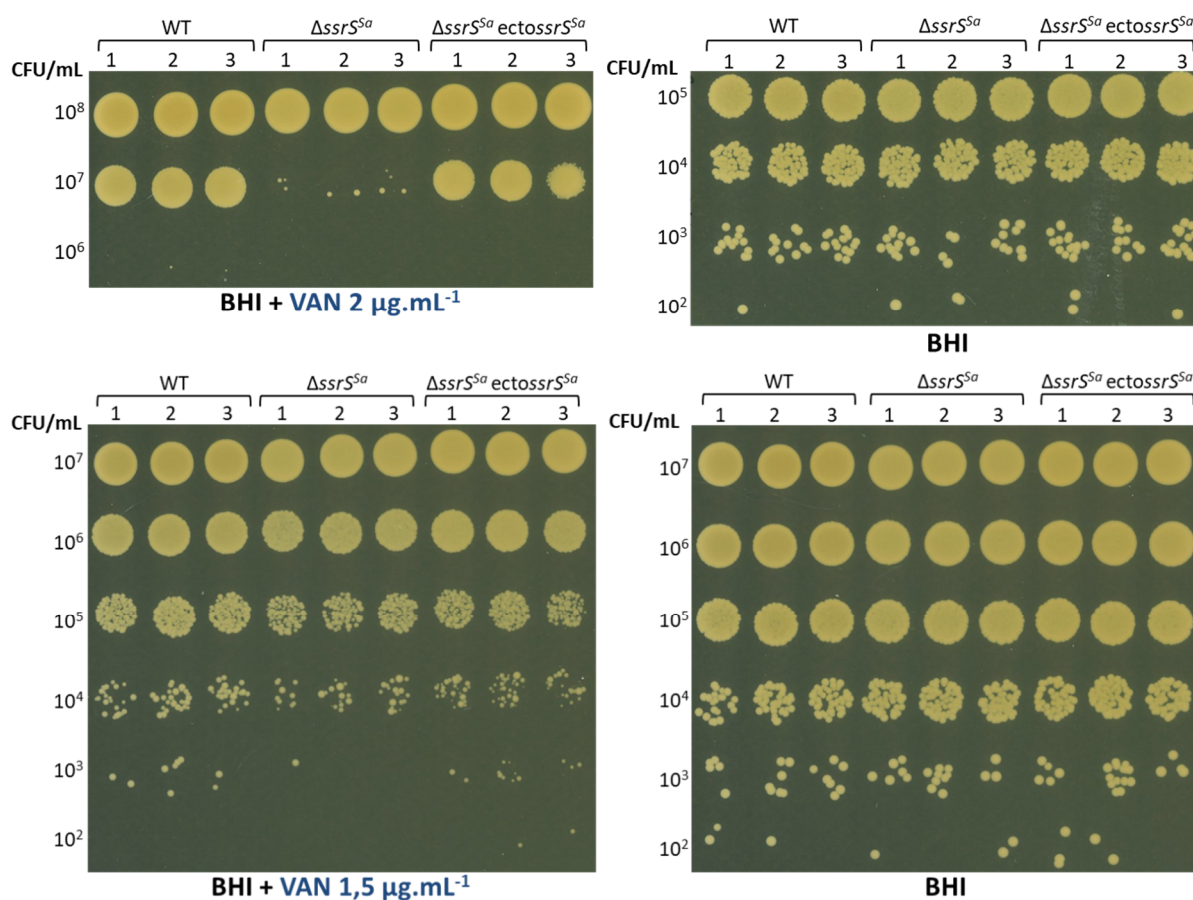


Figure 21. Test de sensibilité à la vancomycine.

Des dilutions de cultures saturées (O/N ; 5 μ L par goutte) ont été déposées sur des boîtes BHI contenant différentes concentrations sublétales de vancomycine (VAN). Cultures provenant de triplicatas indépendants. CMI (vancomycine) = 2 μ g.mL⁻¹.

Les résultats transcriptomiques après induction du gène $ssrS^{Sa}$ et le comportement sédimentaire du mutant $ssrS^{Sa}$ dans certains milieux (notamment chimiquement définis) nous ont amené à tester indirectement la paroi de $\Delta ssrS^{Sa}$ par rapport à sa parentale. Pour cela, j'ai réalisé un

test en goutte en présence d'un inhibiteur de la synthèse de la paroi, la vancomycine (**Figure 21**). Les résultats obtenus indiquent que la souche $\Delta ssrS^{Sa}$ est environ 10 fois plus sensible à de faibles concentrations de vancomycine par rapport à la souche isogénique. Ce phénotype d'hypersensibilité, visible dans une fenêtre de concentrations étroite, est complété par la souche $\Delta ssrS^{Sa} \text{ ectossrS}^{Sa}$.

Chapitre 2

**Un ARN régulateur issu de la région 5' non traduite (5'UTR) de *malk*
cible la néoglucogenèse chez les vibrions.**

Xing Luo, Marick Esberard, Philippe Bouloc et Annick Jacq

Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC), Gif-sur-Yvette,
France

Les vibrions sont des bactéries marines appréciant les eaux saumâtres. Ces bacilles Gram négatif mobiles font partie du microbiote des animaux marins mais certains peuvent être des agents zoonotiques comme *Vibrio parahaemolyticus* ou *V. cholerae* (dont les sérogroupes O1 et O139 sont strictement humains), ou responsables de vibrioses animales comme *V. tasmaniensis* LGP32 (anciennement *V. splendidus* LGP32). Les huîtres juvéniles sont particulièrement sensibles à *V. tasmaniensis* LGP32, pathogène intracellulaire facultatif responsable d'épisodes de mortalités estivales délétères pour l'industrie ostréicole. Ce pathogène opportuniste s'attaque aux cellules immunitaires des huîtres, les hémocytes. De manière générale, les cellules préfèrent utiliser les sucres déjà présents dans leur environnement comme substrats énergétiques plutôt que de les synthétiser *de novo*. Pour profiter du maltose provenant de son hôte bivalve riche en glycogène, *V. tasmaniensis* LGP32 a besoin de l'importer grâce à un transporteur. Une des sous-unités de ce transporteur, Malk, est une ATPase de la famille ABC. Le gène éponyme codant Malk se situe en aval du gène *vsr217*, surexprimé au moment de l'infection. Nous nous sommes donc demandés si *vsr217* appartenait au régulon maltose et s'il codait un ARNrég agissant en *cis* vis-à-vis de *malk* ou en *trans* sur d'autres cibles liées au métabolisme des sucres. Nous avons montré :

- (i) La conservation au sein de différentes espèces de *Vibrio* de la synténie *vsr217-malk* et de l'opérateur de MalT (activateur du régulon maltose chez les entérobactéries) dans la séquence promotrice de *vsr217*.
- (ii) La transcription de *vsr217* à partir du promoteur P1 de *malk* et son induction par le maltose via MalT.
- (iii) L'activité *cis* de Vsr217 dans la stabilité de l'ARNm *malk*. L'absence de Vsr217 divise par deux la demi-vie de l'ARNm *malk*.
- (iv) L'existence d'un motif terminal polyU nécessaire à la stabilité de Vsr217.
- (v) L'activité *trans* inhibitrice de Vsr217 sur l'expression d'une enzyme de la néoglucogenèse, Fbp (fructose-1,6-bisphosphatase) grâce à des analyses computationnelles, protéomiques et génétiques. Nos résultats suggèrent que cette inhibition post-transcriptionnelle est dépendante de la chaperonne Hfq.

La caractérisation de Vsr217, un nouvel ARNrég de *V. tasmaniensis* LGP32, a permis de mettre en évidence sa double action en *cis* et en *trans* dans la régulation fine parallèle de deux voies métaboliques basées sur la consommation du maltose ou la néosynthèse de glucose à partir d'élément non glucidique.

J'ai participé à ces travaux en réalisant l'expérience présentée **Fig. 4B** ainsi qu'une relecture critique de l'article.



A Small Regulatory RNA Generated from the *malk* 5' Untranslated Region Targets Gluconeogenesis in *Vibrio* Species

Xing Luo,^{a*} Marick Esberard,^a Philippe Bouloc,^a Annick Jacq^a

^aUniversité Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Gif-sur-Yvette, France

ABSTRACT Vsr217 is a small RNA from *Vibrio tasmaniensis* LGP32, a pathogen associated with mortality events affecting juvenile oysters. The *vsr217* gene is located within the 5' untranslated region (UTR) of *malk*, encoding the ATPase component of the maltose importer, and is conserved within the genus *Vibrio*. In the presence of maltose, *vsr217* is regulated by Malt, the positive regulator of the maltose regulon. *vsr217* is required in *cis* for the full expression of *malk*. In addition, Vsr217 acts in *trans* to downregulate the expression of *fbp* encoding fructose-1,6-bisphosphatase, an enzyme involved in gluconeogenesis. Thus, in the presence of maltose, the induction of Vsr217 is expected to promote glycolysis by negatively regulating the expression of a key enzyme of gluconeogenesis.

IMPORTANCE Juvenile pacific oysters have been subject in recent years to summer mortality episodes with deep economic consequences. The pathogen *Vibrio tasmaniensis* has been associated with such mortality events. For bacterial pathogens, survival within the host requires profound metabolic adaptations according to available resources. All kinds of regulatory elements, including noncoding RNAs, orchestrate this response. Oysters are rich in glycogen, a precursor of maltose, and we previously reported that *V. tasmaniensis* maltose-regulated genes are strongly induced during oyster infection. Here, we report the dual mechanism by which a small regulatory RNA, generated from the 5' untranslated region of a gene belonging to the maltose regulon, acts both in *cis* and *trans*. In *cis*, it stimulates growth on maltose, and in *trans*, it downregulates the expression of a gene associated with gluconeogenesis, thus coordinating maltose utilization with central carbon metabolism.

KEYWORDS *Vibrio*, sRNA, 5' UTR, maltose regulon, gluconeogenesis

In the last 20 years, the importance of noncoding RNAs (sRNAs) in bacterial regulatory networks has become widely recognized. The development of genome-wide transcriptomic studies has led to the exploration of transcriptomic landscapes of nonmodel bacterial organisms, either pathogens or those of environmental interest, leading to the discovery of many sRNAs (for reviews, see references 1–3). While classical bona fide sRNAs are expressed from intergenic regions, a newly recognized class of sRNAs includes sRNAs generated from 5' and 3' untranslated regions (UTRs) of coding genes that act in *trans* on genetically unlinked targets. A genome-wide search of small regulatory RNAs in *Escherichia coli* led to the identification of several sRNAs expressed from 5' or 3' UTRs (4), but only a few of them, mostly stemming from 3' UTRs, have been characterized. For instance, CpxQ is generated from the 3' UTR of *cpxP* mRNA, which encodes a periplasmic chaperone involved in the inner membrane stress response. CpxQ was shown to repress several inner membrane proteins, thus mitigating membrane stress (5). Another example is MicL, which is transcribed from a σ^E -dependent promoter internal to the upstream protein coding sequence, and then cleaved to a shorter product to act in *cis* to regulate the expression of the major outer membrane lipoprotein Lpp (6). A few examples are associated with *Vibrio* species. In *Vibrio*

Citation Luo X, Esberard M, Bouloc P, Jacq A. 2021. A small regulatory RNA generated from the *malk* 5' untranslated region targets gluconeogenesis in *Vibrio* species. mSphere 6:e00134-21. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00134-21>.

Editor Paul Dunman, University of Rochester

Copyright © 2021 Luo et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Annick Jacq, annickjacq@universite-paris-saclay.fr.

* Present address: Xing Luo, Laboratory of Molecular Biology, National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, USA.

Received 11 February 2021

Accepted 9 June 2021

Published 30 June 2021

cholerae, MicX is generated by an internal promoter within the *malG* open reading frame. The transcript is processed, and the shorter version, more stable and corresponding largely to the *malG* 3' UTR, regulates an outer membrane protein, ChiP, annotated as a chitoporin, and an ABC transporter (7). Recently, two *V. cholerae* sRNAs, CarZ and OppZ, generated by processing of the 3'UTRs of *carAB* and *oppABCD* mRNA, respectively, were shown to negatively regulate their respective operons (8).

trans-acting sRNAs can also be generated from 5' UTRs. In the human pathogen *Listeria monocytogenes*, PrfA is a virulence regulator whose expression is controlled at the translational level by a thermosensor located in the 5' UTR of the *prfA* transcript (9). However, two *S*-adenosylmethionine (SAM) riboswitches, SreA and SreB, not only regulate their downstream gene expression in *cis*, but also act in *trans* to target the 5' UTR of the *prfA* mRNA (10). Another recent example is the sRNA rnTrpL (11) in *Sinorhizobium meliloti*, which is derived from a transcriptional attenuator of one of the three tryptophan operons and regulate in *trans* a second tryptophan operon, which does not possess the leader peptide-encoding attenuator. Other examples include Teg49 in *Staphylococcus aureus*, derived from the 5' UTR of the virulence regulator gene *sarA* (12), or *malS* 5' UTR, a *Salmonella enterica* noncoding RNA generated from the 5' UTR of *malS* that was proposed to regulate in *trans* *hisG*, a gene involved in the histidine biosynthetic pathway (13).

Vibrio tasmaniensis LGP32 (previously *V. splendidus* LGP32) is a member of the *V. splendidus* clade (14) that has been associated with summer mortalities of juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* (15). It is a facultative intracellular pathogen of oysters, invading the oyster hemocytes, the host immune cells (16–18). A genome-wide search for noncoding sRNAs in *V. tasmaniensis* LGP32 by transcriptome sequencing (RNA-seq) led us to identify 250 potential sRNAs, among which, several were confirmed by Northern blots and reverse transcription-PCRs (RT-PCRs) (19). More recently, a transcriptomic analysis of LGP32 within the host revealed that *vsr217* was one of the most highly induced genes compared to that during growth under seawater conditions (18). Interestingly, *vsr217* is located upstream of *malk*, a gene encoding the ATPase subunit of the maltose transporter, a member of the ABC transporter family (reviewed in reference 20). In addition, the maltose regulon was highly induced in oysters, a metabolic switch that can be related to the fact that oysters are rich in glycogen, a precursor of maltose (18).

Here, we show that *vsr217* is a member of the maltose regulon and is positively controlled by the transcriptional regulator MalT. While, within the 5' UTR of *malk* mRNA, the *Vsr217* sequence acts in *cis* to stabilize *malk* mRNA, it also generates an sRNA that acts in *trans* to repress the expression of a key gene involved in gluconeogenesis.

RESULTS

The genetic organization of *vsr217-malk* is conserved in different *Vibrio* species.

Vsr217 is an sRNA from *V. tasmaniensis* expressed from the *malk* 5' UTR. We investigated its conservation within the *Vibrio* genus by sequence comparison of *malk* upstream sequences from species representative of different *Vibrio* clades (14) (Fig. 1). Five regions are especially conserved. Region I is immediately upstream of a predicted –35 promoter sequence (P1). Region II overlaps with the –10 sequence of the P1 promoter and includes a putative MalT operator. MalT is the positive regulator of the maltose regulon in *E. coli* and other *Enterobacteriaceae* (21) which binds to MalT consensus sequences (22). Region III corresponds to the 5' end of *Vsr217* (see below) and includes the 32 first nucleotides of the sRNA. Region IV contains a conserved TTTC motif present at the 3' end of *vsr217*. Region V is the largest conserved sequence and contains a second predicted σ^{70} promoter (P2) as well as the ribosome binding site for *malk*. No Rho-independent terminator was predicted between the 3' end of *vsr217* and *malk*. This analysis highlights the conservation of a large putative regulatory region upstream of *malk* in *Vibrio*.

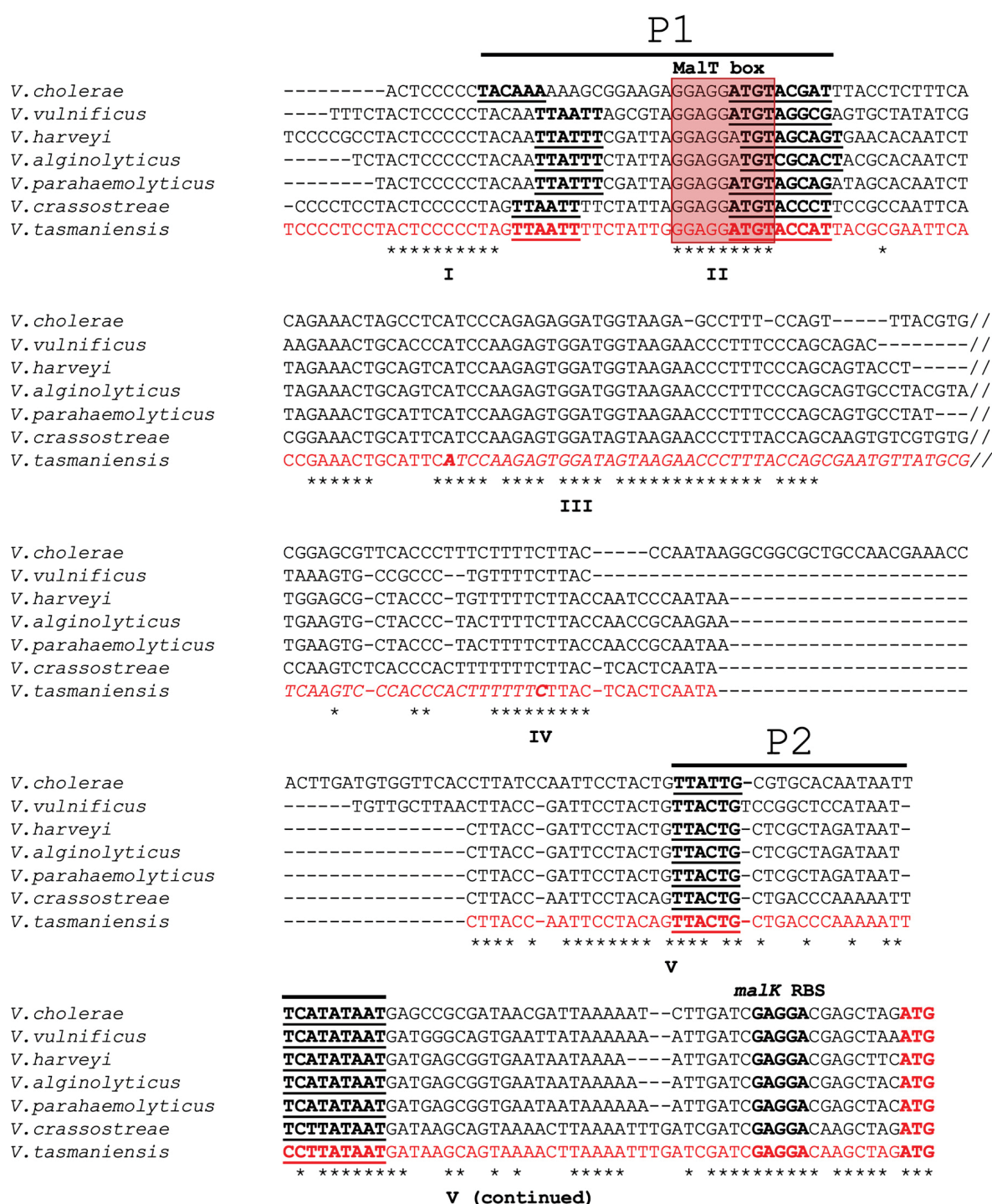


FIG 1 Vsr217 is conserved among *Vibrio* strains. The upstream regions of the *malK* gene of several *Vibrio* strains belonging to different clades (14) were aligned using Muscle (39). For reason of space, a less-conserved sequence between regions III and IV is not shown, as indicated by two slashes. Conserved nucleotides are indicated by * under the alignment. *V. tasmaniensis* sequence is in red, with the *vsr217* sequence in italic font. Important features are in boldface font, including Vsr217 5' and 3' ends; -35 and -10 regions of promoters predicted using BPROM (see Materials and Methods) are underlined. *malK* initiation codon is indicated in boldface red font.

Vsr217 is induced by maltose in a MalT-dependent manner and is generated from the 5' UTR of *malK*. The conserved localization of *vsr217* upstream of *malK* and the presence of a MalT box overlapping the putative P1 promoter of *vsr217* (Fig. 1) suggested that Vsr217 is a member of the maltose regulon controlled by MalT. The production of Vsr217 and *malK* mRNA was tested by Northern blots in the presence or absence of maltose (Fig. 2A). Both Vsr217 and *malK* mRNA were strongly induced by

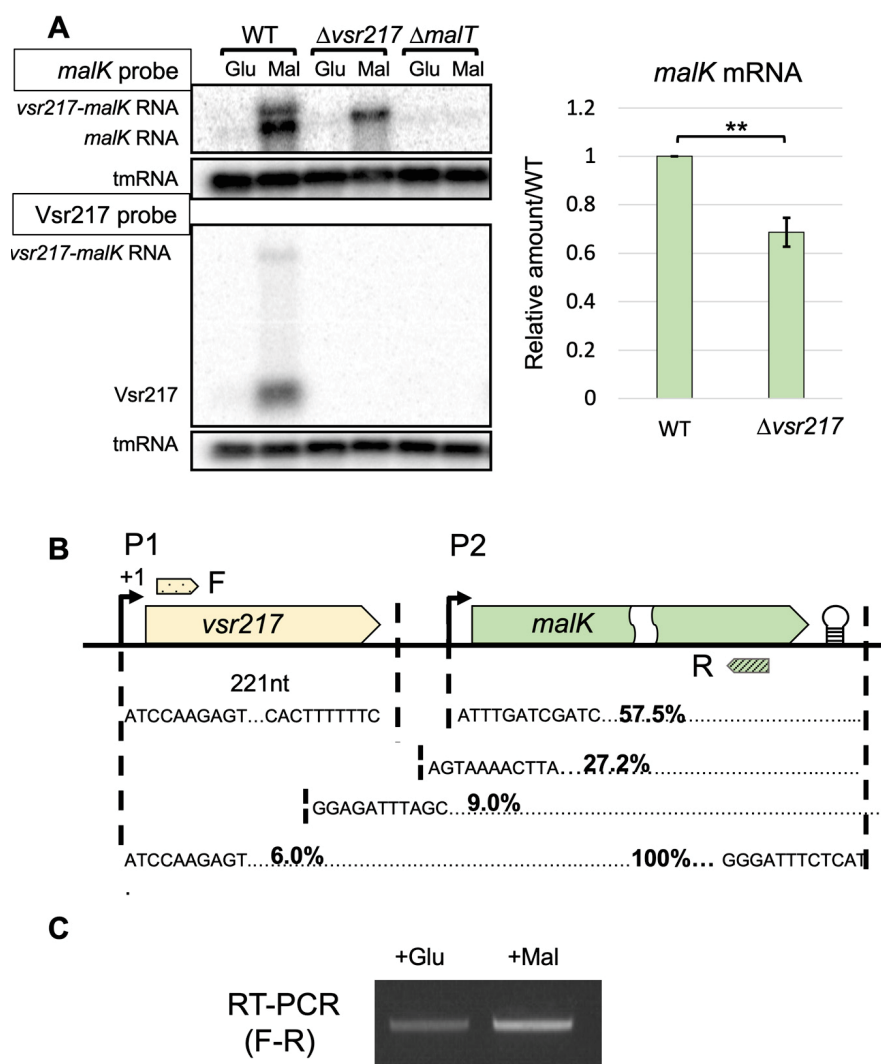


FIG 2 Vsr217 is induced by maltose in a MalT-dependent manner and is generated from the 5' UTR of *malK*. Cells were grown in Zobell supplemented with glucose or maltose as indicated. (A, top left) Northern blots of *malK* in LGP32 WT, $\Delta vsr217$, and $\Delta malT$ strains, using a *malK* probe. tmRNA was used for normalization. (Bottom left) Same membrane using a probe complementary to Vsr217. (A, right) Quantification of *malK* mRNA by ImageJ software. Error bars correspond to the standard errors of the means ($n=3$). Significance was determined using a Student's unpaired *t* test. **, $P < 0.01$. (B) Determination of 5' and 3' ends of Vsr217 and *malK* mRNA of cells grown in maltose. In each case, 20 clones were analyzed. The genetic organization is represented on top (not drawn to scale). Approximate position of primers used for RT-PCR is indicated (F and R). (C) Evidence for the existence of a Vsr217-*malK* transcript by RT-PCR using LGP32 WT total RNA extracted from cultures in either glucose or maltose as indicated.

maltose, whereas no expression was detected in the presence of glucose. Vsr217 and *malK* mRNA were not detected in the *malT* mutant, indicating that their expression is MalT dependent. Under the maltose condition, a high-molecular-weight band was detected with both *vsr217* and *malK* probes, indicating the existence of a large transcript encompassing the two genes. A smaller band was detected with the *malK* probe but not with the *vsr217* probe, indicating the existence of a transcript including *malK* RNA without Vsr217. The transcription of *malK* was also tested in a mutant harboring a complete deletion of the *vsr217* sequence (see below and Fig. 2B). Using the *malK* probe, a single band was observed whose size was compatible with that of a *malK* transcript originating from the putative promoter P1, shortened by the absence of *vsr217* (Fig. 1A). Of note, *malK* mRNA quantity was reduced in the $\Delta vsr217$ mutant compared to that in its parental strain (Fig. 2A).

The 5' and 3' ends of transcripts from the *vsr217-malk* locus were determined by 5' and 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE) mappings (Fig. 2B). For Vsr217, all clones displayed the same extremities. The Vsr217 5' end was compatible with a transcription stemming from the P1 promoter, while the transcript terminated at the level of a conserved TTTTC motif. In contrast, for *malk* mRNA, if the 3' end was unique, due to the presence of a Rho-independent terminator, different *malk* 5' ends were identified. The majority of them (57.5%) corresponded to a transcription start site from the P2 promoter. Other 5' end sequences mapped upstream of P2, some of them within *vsr217*. Among them, 6% had a 5' end corresponding to a transcription initiation from P1, hence including the whole Vsr217 sequence (Fig. 2B). The existence of a *vsr217-malk* transcript was also confirmed by RT-PCR, whose amount increased in the presence of maltose (Fig. 2C).

We concluded that Vsr217 originates from the *malk* P1 promoter. The existence of transcripts encompassing Vsr217-*malk* mRNA suggested that Vsr217 is generated from *malk* 5' UTR and that processing of the 5' end of this larger transcript generates *malk* transcripts.

Deletion of *vsr217* results in *malk* mRNA instability. The amount of *malk* mRNA was reduced in the absence of *vsr217* (Fig. 2A), possibly because of *malk* mRNA destabilization. To check this, the half-life of Vsr217 and *malk* and *vsr217-malk* transcripts was determined in the wild-type (WT) and $\Delta vsr217$ strains (Fig. 3A and B). Vsr217 was a stable sRNA (half-life [$t_{1/2}$], ~ 7.5 min), whereas *malk* and *vsr217-malk* transcripts were unstable ($t_{1/2}$, ~ 30 s). Deletion of *vsr217* resulted in an even more unstable *malk* transcript ($t_{1/2}$, ~ 15 s).

The 5' end of the *malk* mRNA in the $\Delta vsr217$ mutant was determined by 5' RACE. In contrast to the parental strain, the majority of the *malk* transcripts (64.2%) in the $\Delta vsr217$ mutant had a 5' end generated from the P1 promoter, whereas only 21.4% corresponded to transcripts generated from the P2 promoter (Fig. 3C).

Does the *malk* mRNA level reduction in the $\Delta vsr217$ mutant affect growth in the presence of maltose as the sole carbon source? Indeed, when grown in minimal medium supplemented with maltose, the $\Delta vsr217$ mutant had a lower growth rate than its parental strain. This difference was not observed in minimal medium supplemented with glucose (see Fig. S1 in the supplemental material). The maltose-dependent growth defect of the $\Delta vsr217$ mutant was corrected by the presence of a plasmid expressing *malk* only but not by a plasmid expressing *vsr217* under the P1 promoter (Table 1). We concluded that the growth defect in the mutant is due to the *cis* effect of the deletion of *vsr217* on *malk* mRNA stability, leading to the decrease of the message.

A U-rich terminal motif of Vsr217 is a stabilizing factor for Vsr217 but not for *malk* mRNA. Vsr217 contains a conserved U-rich motif at its 3' end (Fig. 1A). We hypothesized that it could play a role in generating Vsr217, either by promoting transcription termination, by being a processing site, or by contributing to its stability. To test this, we constructed a *vsr217* mutant lacking its 13 last nucleotides ($\Delta polyT$) and checked by Northern blotting how the deletion would affect the amounts of Vsr217, *malk* mRNA, and their precursor (Fig. 4A).

The absence of the last 13 nucleotides ($\Delta polyT$ mutant) led to a 100-fold reduction of Vsr217 compared to that in the WT strain, whereas the amount of *malk* mRNA was not affected in contrast to what was observed in the $\Delta vsr217$ mutant. Consistent with this result, we observed that *malk* mRNA stability did not decrease in the $\Delta polyT$ mutant compared to that in the WT strain, contrary to Vsr217 stability (Fig. 4B). Surprisingly, the quantity of the precursor transcript *vsr217-malk* mRNA was also not affected in the $\Delta polyT$ mutant as could have been expected if the deleted terminal motif was involved in a processing event generating Vsr217 and *malk* mRNA. Altogether, our results suggest that the U-rich terminal motif is involved in Vsr217 stability but not in *malk* mRNA stability.

In addition, no growth difference was observed between the $\Delta polyT$ mutant and its parental strain in minimal medium supplemented with either glucose or maltose

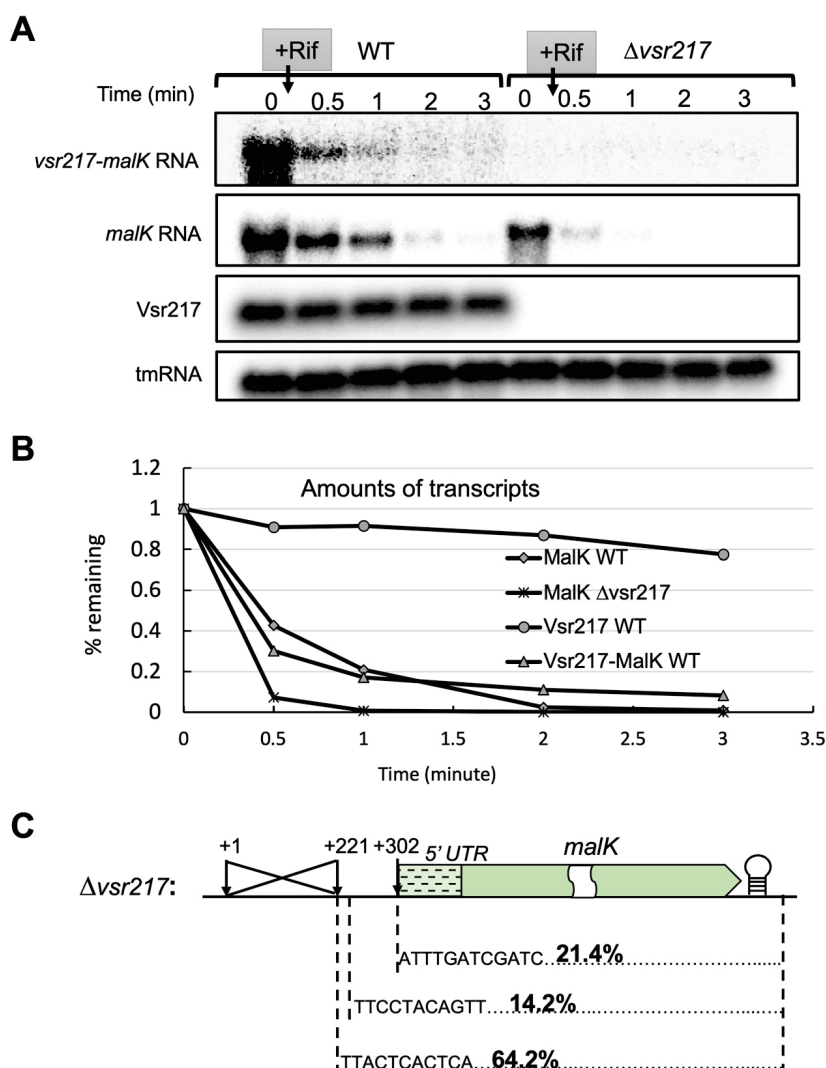


FIG 3 Deleting *vsr217* leads to an instability of *malK* mRNA. (A) Amounts of *malK* mRNA and Vsr217 from cells growing in minimal medium supplemented with maltose ($OD_{600} \approx 0.4$) were determined by Northern blotting over time after adding rifampicin to block transcription. (B) Kinetics of degradation of *malK* mRNA and Vsr217 determined from the experiment presented in panel A. (C) 5' ends of the *malK* mRNAs in the $\Delta vsr217$ mutant.

(Fig. 4C), confirming that the growth defect observed in the $\Delta vsr217$ mutant was due to a *cis* effect on *malK* expression and not to the absence of Vsr217 production.

Vsr217 affects the expression of *fbp*, a gluconeogenic enzyme. The existence of a stable, abundant Vsr217 sRNA suggests a *trans*-acting function on targets possibly not directly related to maltose utilization but nevertheless regulated in response to maltose. Putative Vsr217 targets were searched by identifying proteins whose expression levels varied between the WT and $\Delta vsr217$ strains, especially when grown in maltose. Using a proteomic mass spectrometry approach, 2,104 proteins from 4,371 coding DNA sequences (CDSs) harbored by the *V. tasmaniensis* genome were identified. In glucose, the protein contents were the same between the two strains. However, in maltose, the amounts of 22 proteins were significantly altered (fold change of >2 or <0.5 , P value < 0.05) in the mutant, with 11 increasing and 11 decreasing (Table 2). Among them, MalK decreased in the $\Delta vsr217$ mutant, consistent with the reduced amount of *malK* mRNA (Fig. 2).

Among these 22 potential targets of Vsr217, to identify candidates for direct mRNA targets, we used the software CopraRNA, which predicts sRNA targets and their pairing regions with the sRNA by comparative genomics (23). From the list of proteins whose

TABLE 1 Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Reference or source
Strains		
<i>V. tasmaniensis</i>		
LGP32	Pathogen of oyster <i>C. gigas</i>	40
Δ vsr217	LGP32 carrying a deletion of <i>vsr217</i>	This study
Δ malT	LGP32 carrying a deletion of <i>malT</i>	This study
Δ polyT	LGP32 carrying a deletion of polyT at the 3' end of <i>vsr217</i>	This study
<i>E. coli</i>		
DH5 α	F [−] <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 ϕ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 hsdR17 (r_K[−] m_K⁺) λ[−]</i>	Lab collection
MG1655	F [−] λ [−] <i>ilvG[−] rfb-50 rph-1</i>	Lab collection
MG1655 Δ hfq	F [−] λ [−] <i>ilvG[−] rfb-50 rph-1 Δhfq</i>	41
IT3813	<i>E. coli</i> K-12 <i>lacIQ thi1 supE44 endA1 recA1 hsdR17 gyrA462 zei298::tn10 [Tc] ΔthyA::(erm-pir116)[Er]; cloning host</i>	42
GEB883	<i>E. coli</i> K-12 Δ dapA::erm pir [Er] RP4-2 Δ recA gyrA462 zei298::Tn10 [Tc]; donor strain for conjugation	34
Plasmids		
pSW7848	Suicide vector with an R6K origin, requiring the Pir protein for its replication, pBAD-ccdB, Cm ^r	35, 43
pSW7848- Δ vsr217	pSW7848 carrying the mutant allele Δ vsr217, Cm ^r	This study
pSW7848- Δ malT	pSW7848 carrying an in-frame deletion of <i>malK</i> , Cm ^r	This study
pSW7848- Δ polyT	pSW7848 carrying the polyT 13-nt deletion at the 3' end of <i>vsr217</i> , Cm ^r	This study
pGEB12	Replicative, pSU18 with <i>oriP15A</i> , <i>oriT_{RP4}</i> , Cm ^r	44
pP1-P2-MalK	pGEB12, Cm ^r , <i>malK</i> under the control of P1-P2 promoters	This study
pP1-Vsr217	pGEB12, Cm ^r , <i>vsr217</i> under the control of <i>vsr217-malK</i> P1 promoter	This study
pZE12MCS	Based on pZE12-Luc, P _{LlacO} , <i>ColE1 Ori1</i> , Amp ^r	26
pPlac-Vsr217	pZE12MCS, P _{LlacO} - <i>vsr217</i> , Amp ^r	This study
pXG-10	pSC101* origin of replication (low copy), P _{LtetO} promoter, <i>gfp⁺</i> , Cm ^r	26
pTet-Fbp-GFP	pXG-10 [−125, +3]- <i>fbp::gfp</i> , Cm ^r	This study
pXG-10 Δ alpha	pXG-10, Δ alpha, Cm ^r	This study

levels were affected in the Δ vsr217 mutant, only one came out in the list of the first 100 best candidates for direct interaction: VS_2771, ranked 8th by CopraRNA, corresponds to Fbp, a class 1 fructose-1,6-bisphosphatase that catalyzes the conversion of fructose-1,6-bisphosphate to fructose-6-phosphate, a rate-limiting step of the gluconeogenesis pathway (Table 2). Fbp expression increased in the Δ vsr217 mutant, suggesting that Vsr217 could be a negative regulator of *fbp*.

Since posttranscriptional inhibition by sRNAs often leads to a stability reduction of target mRNAs (24), we determined by Northern blotting the amount of *fbp* mRNA in minimal medium supplemented by either glucose or maltose (Fig. 5). To circumvent the *cis* effect of *vsr217* RNA on *malK* expression, we took advantage of the Δ polyT mutant, which has a drastically reduced amount of Vsr217 but still retains a wild-type expression level of *malK*. *fbp* was repressed in maltose compared to that in glucose in the WT, a difference that was abolished in the Δ polyT mutant, suggesting that Vsr217 downregulates *fbp* expression.

***fbp* mRNA is a direct target of Vsr217.** A biocomputing analysis using IntaRNA identified a potential base-pairing region between Vsr217 and *fbp* mRNA, ending 29 nucleotides (nt) upstream of the *fbp* initiation codon (Fig. 6A). To confirm a putative direct interaction, the Vsr217 *trans* activity on *fbp* expression was tested in *E. coli* using a two-plasmid-based reporter system (25, 26). The first plasmid carried the *vsr217* gene cloned under a P_{LlacO} promoter (pPlac-Vsr217). The second plasmid contained an in-frame gene fusion between the predicted pairing region of *fbp* mRNA including *fbp* initiation codon and the second codon of the *gfp* CDS (Table 1). The reporter fusion was cloned under the control of a P_{Ltet} promoter, which is constitutive in the absence of a TetR repressor. pTet-Fbp-GFP was introduced in *E. coli* together with pPlac-Vsr217, and the effect of Vsr217 production on the expression of *fbp* was monitored via fluorescence measurements (see Materials and Methods).

The presence of pPlac-Vsr217 plasmid led to a 20% reduction in the expression of the *fbp-gfp* fusion compared to that in the strain containing a control empty plasmid

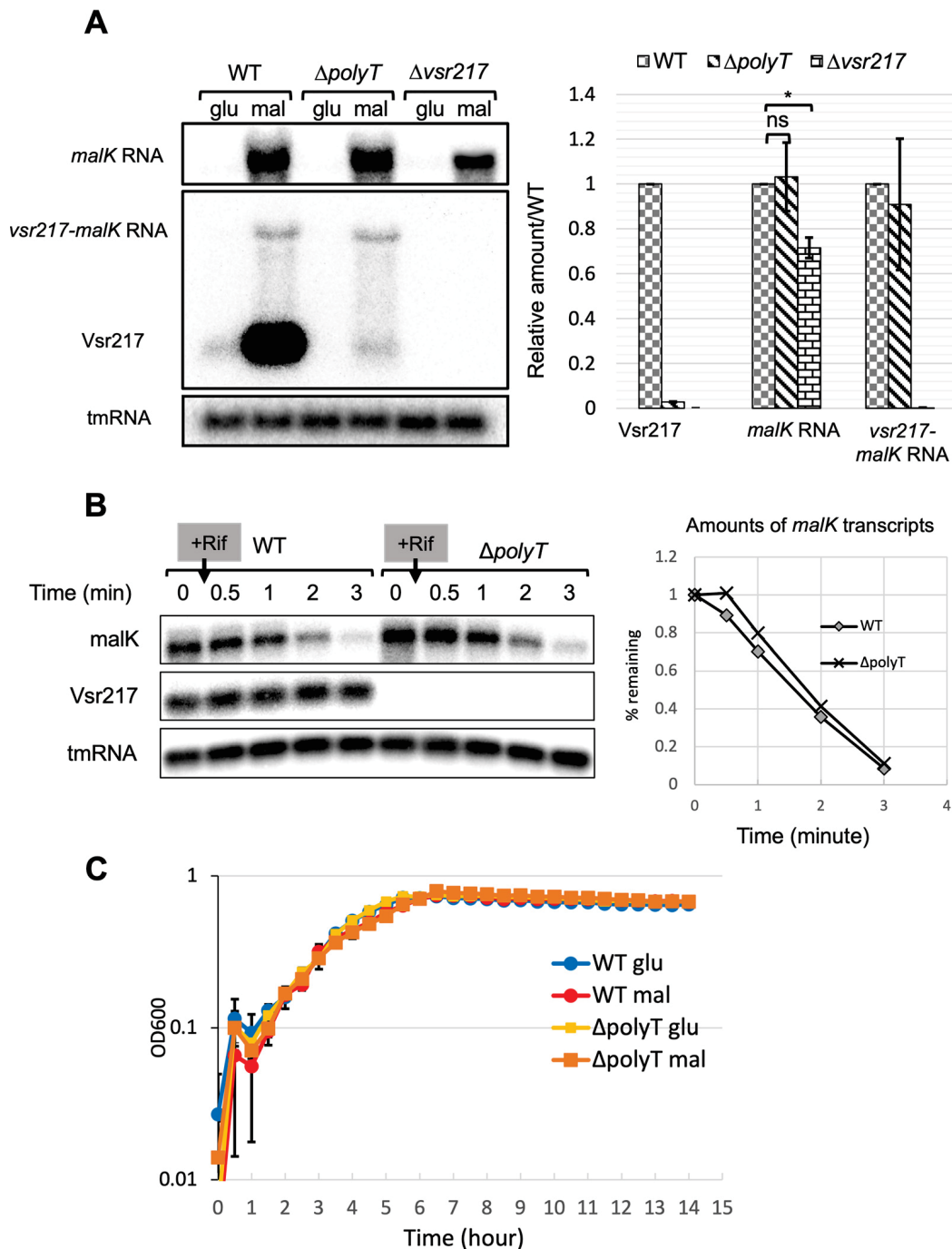


FIG 4 Role of the polyU motif at the 3' end of *vsr217* in the expression of *vsr217* and *malK*. (A, left) Northern blots with probes for *malK* mRNA (top) and Vsr217 (bottom) in WT, $\Delta polyT$, and *vsr217* mutant strains grown in minimal medium supplemented with glucose (glu) or maltose (mal). (Right) Northern blot RNA quantifications by ImageJ software. Results are the means from two experiments. Error bars correspond to the standard errors of the means. Significance was determined using a Student's unpaired *t* test: *, $P < 0.05$. (B) Amounts of *malK* mRNA from cells growing in minimal medium supplemented with maltose (OD₆₀₀ ≈ 0.4) were determined over time in the WT and $\Delta polyT$ mutant by Northern blotting after adding rifampicin to block transcription. (Right) Kinetics of degradation of *malK* mRNA determined from the experiment presented on the left. (C) Growth of the WT and $\Delta polyT$ strains in minimal medium supplemented with glucose or maltose.

(Fig. 6B). Expression was further reduced to ~40% when isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to fully induce *vsr217* expression.

The RNA chaperone Hfq is often required for the interaction of sRNAs with their targets, including in *Vibrio* (27–29). To determine whether the potential interaction

TABLE 2 Proteins whose level is affected by Vsr217 in maltose

Locus tag	Fasta header	No. of peptides	Fold change for $\Delta vsr217$ /WT in Mal	P value	Fold change $\Delta vsr217$ /WT in Glu	P value	Rank CopraRNA	CopraRNA FDR ^a
Upregulated proteins								
VS_II0899	Prolyl aminopeptidase	10	6.81	0.00	0.88	0.89	>100	>0.23
VS_II0126	Oxidoreductase	8	5.84	0.05	1.00	NaN	>100	>0.23
VS_II0346	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	18	3.33	0.01	1.11	0.81	>100	>0.23
	GapC							
VS_II0148	Catalase	10	3.03	0.04	1.00	NaN	>100	>0.23
VS_1054	Histidine transport ATP-binding protein HisP	4	3.02	0.03	1.00	NaN	>100	>0.23
VS_1129	Signal transduction histidine kinase	4	2.57	0.01	1.00	NaN	>100	>0.23
VS_II1090	Phosphomethylpyrimidine kinase	2	2.40	0.03	1.00	NaN	>100	>0.23
VS_2771	Fructose-1,6-bisphosphatase Fbp	17	2.36	0.00	1.16	0.18	8	0.101
VS_II1225	Phosphoenolpyruvate synthase PpsA	40	2.11	0.01	1.21	0.67	>100	>0.23
VS_2300	Arsenate reductase	3	2.09	0.02	0.97	0.97	>100	>0.23
VS_II0877	MoxR-like ATPase	6	2.01	0.03	1.00	NaN	>100	>0.23
Downregulated proteins								
VS_2926	Ornithine carbamoyltransferase	17	0.49	0.04	1.17	0.76	>100	>0.23
VS_2263	Glutathione-regulated potassium-efflux system protein kefB	4	0.48	0.03	1.07	0.83	>100	>0.23
VS_II0953	Nitrate reductase, large subunit	3	0.45	0.04	1.00	NaN	>100	>0.23
VS_2312	Arsenate reductase	4	0.45	0.04	1.00	NaN	>100	>0.23
VS_II0935	ABC transporter substrate-binding protein	7	0.43	0.04	1.42	0.35	>100	>0.23
VS_II0219	Maltose/maltodextrin transporter ATP-binding protein Malk	23	0.42	0.00	0.47	0.10	>100	>0.23
VS_1158	Hypothetical protein VS_1158	15	0.39	0.03	2.01	0.15	>100	>0.23
VS_II0405	TRAP dicarboxylate transporter subunit DctP	14	0.37	0.03	0.67	0.29	>100	>0.23
VS_2935	Sodium/solute symporter	3	0.23	0.04	1.00	NaN	>100	>0.23
VS_0474	Glutamate synthase (NADPH) large chain	64	0.19	0.00	1.02	0.39	>100	>0.23
VS_1157	Histidine kinase	8	0.13	0.00	0.75	0.71	>100	>0.23

^aFDR, false-discovery rate.

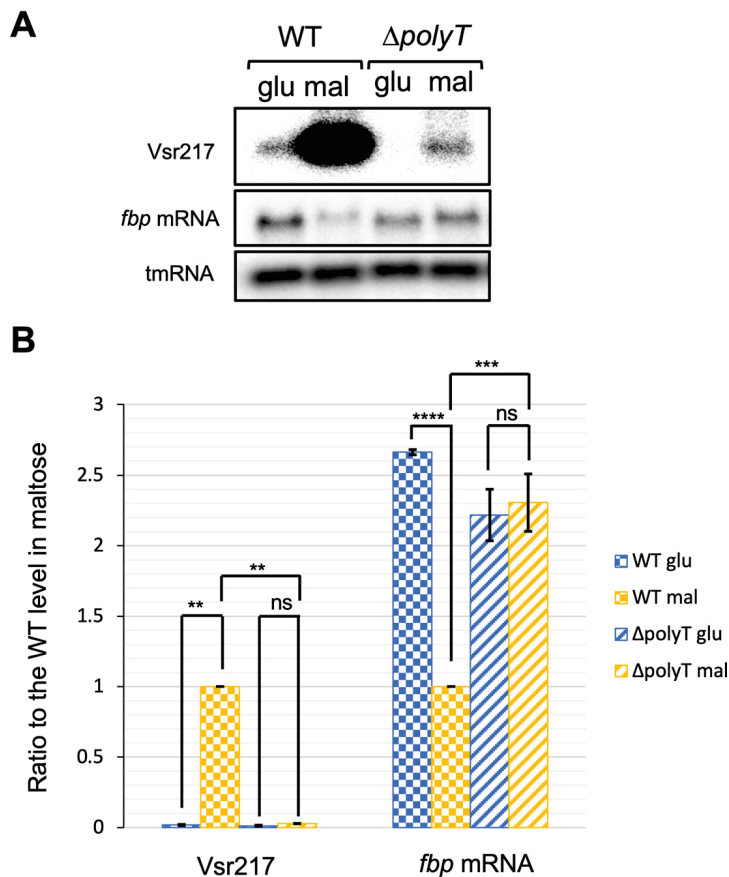


FIG 5 Decrease of Vsr217 results in an increase of *fbp* mRNA. (A) Detection of *fbp* mRNA in the WT strain and the $\Delta polyT$ mutant. (B) Quantification of Northern blot results using ImageJ software. Results are the means from two independent experiments, and error bars correspond to the standard errors of the means. The significance of observed differences was determined by two-way analysis of variance (ANOVA). ns, $P > 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.00001$.

between Vsr217 and *fbp* mRNA was dependent upon Hfq, we also transformed a MG1655 Δhfq mutant with the same set of plasmids.

The *fbp-gfp* fusion had a 2-fold reduction of expression in the Δhfq mutant compared to that in the WT strain, but the presence of pPlac-Vsr217 had no effect in the absence of Hfq, indicating that the interaction was Hfq dependent. Altogether, these results indicate that *fbp* mRNA is submitted to posttranscriptional inhibition by Vsr217 in an Hfq-dependent manner.

DISCUSSION

V. tasmaniensis LGP32 Vsr217, identified in a genome-wide search for sRNAs (19), is highly induced during oyster infection (18). In this study, we show that *vsr217* is a conserved gene in *Vibrio*, located upstream of *malk*, which is inducible by maltose in a MalT-dependent manner. Induction of Vsr217 by maltose could account for its high expression in oysters. Indeed, the latter are rich in glycogen, a precursor of maltose, and the maltose regulon of *V. tasmaniensis* is induced upon oyster colonization (18).

An original feature of Vsr217 is that it is generated from the 5' UTR of *malk* mRNA as attested by the detection of a *vsr217-malk* RNA. *malk* is transcribed from two promoters, P1, upstream of *vsr217*, and P2, located in the intergenic region between *vsr217* and *malk*. P2 is responsible for the transcription of more than half of *malk* transcripts. The other half was distributed between transcripts with several 5' ends that could correspond to the results of processing of transcripts stemming from the P1 promoter. Altogether, these results are in favor of Vsr217 being generated by the

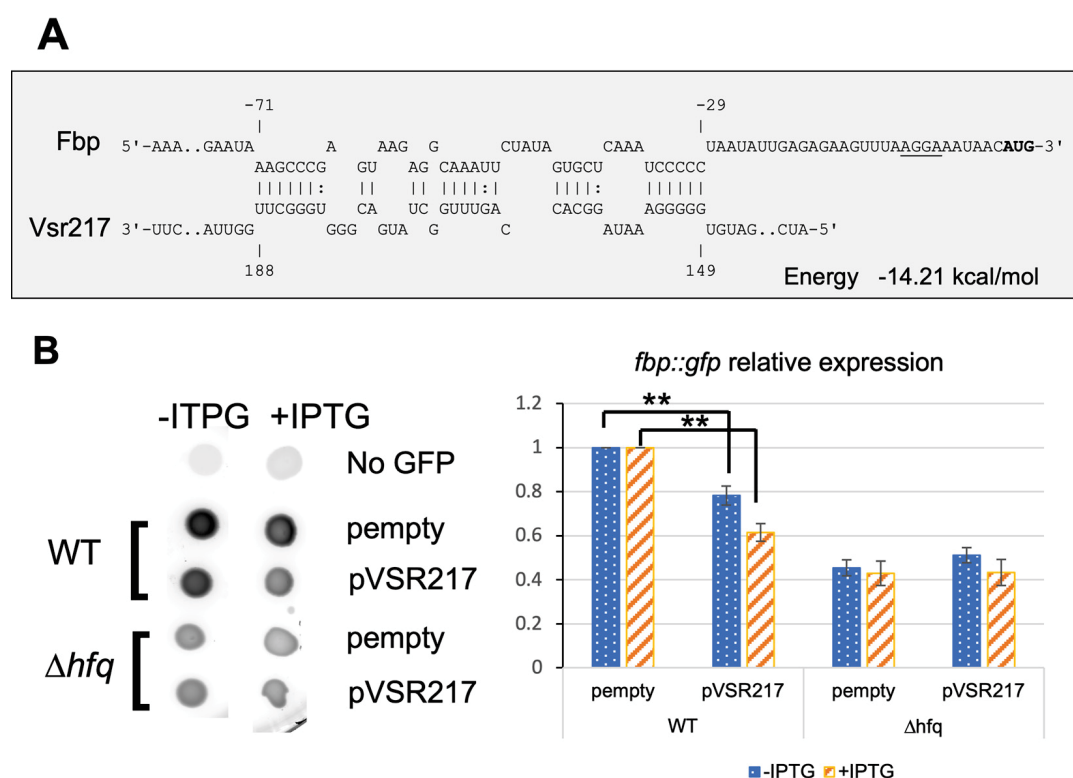


FIG 6 Posttranscriptional *fbp* mRNA downregulation by Vsr217. (A) Interaction between Vsr217 and *fbp* mRNA predicted by IntaRNA (23). (B) Effect of pPlac-Vsr217 on the expression of a translational fusion *fbp::gfp* including the putative interaction region between Vsr217 and *fbp* mRNA. Overnight (O/N) cultures were spotted onto a rich medium supplemented or not with IPTG. (Left) Following incubation, plates were scanned for fluorescence using a Typhoon imager. (Right) Fluorescence quantification by ImageJ software ($n=4$). Values obtained for cells not producing GFP were deducted. Signal was then normalized to the level of the parental strain carrying the empty plasmid. Significance was determined by pairwise Student's unpaired t tests. **, $P < 0.01$.

processing of the larger transcript stemming from the P1 promoter, although we cannot exclude that Vsr217, which is much more stable than the *malK* transcript(s), is generated by termination of transcription at its unique 3' end. However, no Rho-independent terminator was detected to support this hypothesis. In addition, we found that deleting the conserved 13 last nucleotides of *vsr217* (called here polyT motif) led to a nearly complete absence of Vsr217 but had no effect on *vsr217-malK* or *malK* mRNA levels. These results suggest that the polyT motif is important for Vsr217 stability but not for *vsr217-malK* processing.

Vsr217 RNA has two functions. In *cis*, it affects the stability of the *malK* mRNA, which decreases in the $\Delta vsr217$ deletion strain, leading to a reduction of MalK and a decreased ability to use maltose as a carbon source, which is suppressed by the expression in *trans* of *malK* but not of *vsr217*. In addition, Vsr217 acts as a bona fide sRNA to control the expression of *fbp*, a gene involved in the neoglucogenesis/glycolytic pathway. A decrease of *fbp* mRNA was observed in the presence of maltose, when Vsr217 is strongly induced, whereas no change was observed in glucose. This decrease was abolished in the $\Delta polyT$ mutant, confirming that it is Vsr217 dependent in the WT strain. Direct interaction between Vsr217 and *fbp* was further supported by Vsr217-dependent downregulation of a *fbp-gfp* reporter fusion in *E. coli* (Fig. 6). In addition, we found that the Vsr217-dependent posttranscriptional downregulation of the *fbp-gfp* fusion is indeed dependent upon Hfq in *E. coli*. *V. tasmaniensis* Hfq has 94% identity and 99% similarity with *E. coli* Hfq. Accordingly, it is likely that the Vsr217-*fbp* interaction is dependent upon Hfq in *V. tasmaniensis* as well.

Interestingly, *fbp* encodes one of the two enzymes in the glycolytic/gluconeogenesis pathway that catalyze the two irreversible reactions distinguishing neoglucogenesis from glycolysis, the other one being *ppsA*, encoding phosphoenolpyruvate synthase.

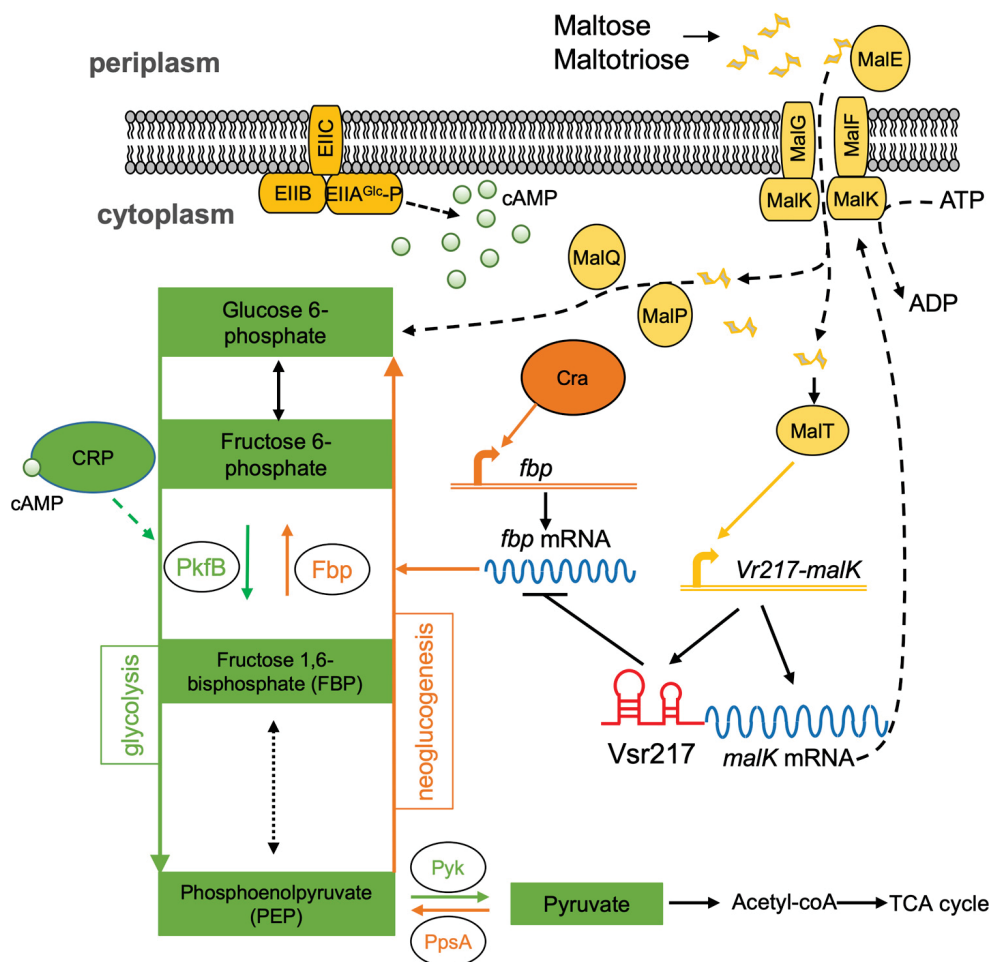


FIG 7 Role of Vsr217 in carbon metabolism regulation of *V. tasmaniensis*. The model is inferred from knowledge in enterobacteria and the existence of CRP (VS_2855) and Cra (VS_II1031) orthologs in *V. tasmaniensis*. In the presence of maltose or maltotriose as a carbon source instead of glucose, EIIA(glc) is phosphorylated and activates adenylate cyclase (not shown). cAMP accumulates and activates the cAMP receptor protein (CRP), which regulates positively glycolysis. On the other hand, the catabolite repressor activator Cra stimulates gluconeogenesis by activating *fbp* (and possibly *ppsA*). Maltose activates the MalT regulon including maltose transport genes such as *malK*, *malE*, *malFG* and maltose metabolic genes *malPQ*, which transform maltose into the first compound of glycolysis, glucose 6-phosphate. Vsr217 is highly expressed and represses *fbp* expression, inhibiting gluconeogenesis and favoring optimal maltose utilization. Glycolysis is in green, with only relevant steps for this study being shown. Gluconeogenesis, orange; maltose regulon, yellow; glucose PTS transporter, dark yellow; mRNAs, blue; Vsr217, red.

PpsA was also identified in our proteomic approach as increasing in the Δ *vsr217* mutant, suggesting that it could also be negatively regulated by Vsr217. However, *ppsA* mRNA was not predicted as a target by CopraRNA. Further studies will be required to determine the potential involvement of Vsr217 in *ppsA* expression.

In *E. coli*, two major transcriptional regulators have been described to regulate the central carbon metabolism, CRP (catabolite repressor protein) and Cra (catabolite repressor activator, also known as FruR) (30–32). Whereas on neoglucogenic substrates such as acetate, CRP activates key enzymes of glycolysis, Cra downregulates the majority of enzymes in the glycolytic pathway and activates the two gluconeogenesis genes *fbp* and *ppsA*. The action of Cra is dominant over that of CRP (33). Both CRP and Cra have homologues in *V. tasmaniensis*, VS_2855 and VS_II1031, respectively. We propose that Vsr217 contributes to fine-tuning the production of a gluconeogenic enzyme, bringing an additional control to *Vibrio* metabolic regulations (Fig. 7).

In the presence of maltose and absence of glucose, the subunit EIIA of the glucose phosphotransferase system (PTS) transporter is phosphorylated and activates

adenylate cyclase: cAMP accumulates in the cell, activating CRP, which upregulates glycolysis. Maltose is transformed into glucose-6-phosphate and enters the glycolytic pathway. However, upregulation of glycolysis is counteracted by Cra, which drives the carbon flux toward gluconeogenesis. On the other hand, induction of the maltose regulon leads to a strong increase of Vsr217 that will inhibit the expression of the gluconeogenic enzyme Fbp, thus favoring glycolysis. Hence, in oysters, which are rich in the maltose precursor glycogen, Vsr217, a member of the growing family of *trans*-acting sRNAs derived from a 5' UTR, may contribute to the fitness of *V. tasmaniensis* by optimizing maltose utilization through inhibition of gluconeogenesis.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and plasmids. Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *V. tasmaniensis* LGP32 mutants were constructed by allele replacement through homologous recombination as described previously (34). The presence of the desired mutations was confirmed by sequencing. Plasmids were constructed by one-step isothermal assembly (Gibson assembly) (35). Their main features are indicated in Table 1, and details of construction are presented in Fig. S2 in the supplemental material. We also constructed a derivative of the cloning vector pXG-10 (26), deleting the fragment coding for the alpha peptide present upstream of the *gfp* gene which led to a background expression of *gfp*. The resulting plasmid, pXG-10Δalpha was used as a control plasmid to determine the basal intrinsic cellular fluorescence level. Plasmids expressing either Vsr217 or MalK alone, under the control of their native promoters P1 and P2, were constructed by deleting either coding region from a parental plasmid carrying the complete locus P1-*vsr217*-P2-*malK* (Fig. S2). Primers used for DNA amplification are listed in Table 3.

Media and bacterial growth. *E. coli* strains were cultured at 37°C in Luria-Bertani (LB) broth. *V. tasmaniensis* LGP32 and its derivative were grown at 20°C in Zobell medium (4 g/liter peptone, 1 g/liter yeast extract, 0.1 g/liter ferric phosphate, and 30 g/liter sea salt) or minimal medium [3 g/liter KH₂PO₄, 7 g/liter K₂HPO₄, 2 g/liter (NH₄)₂SO₄, 0.5 × 10⁻³ g/liter FeSO₄, 2 × 10⁻³ M MgSO₄ and 30 g/liter NaCl] supplemented with 2 g/liter D-glucose or D-maltose, where indicated. Antibiotics were used as follows: chloramphenicol (Cm) at 20 μg/ml and ampicillin (Amp) at 100 μg/ml for *E. coli* and Cm at 2 μg/ml for LGP32. IPTG was used at 0.5 mM.

To measure growth of LGP32, bacteria (3 replicate cultures in each case) were cultured overnight in minimal medium supplemented with 2 g/liter D-glucose or D-maltose. If needed, Cm was added. Overnight cultures were diluted to an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of ~0.05 in the same medium, and growth was monitored in a 96-well plate, by measuring cell density at OD₆₀₀ at regular time intervals in a CLARIOstar (BMG Labtech, France) microplate reader.

RT-PCR and Northern blotting. Overnight cultured bacteria were diluted to an OD₆₀₀ of ~0.05 in minimal medium, supplemented by glucose or maltose where indicated, except for the results presented in Fig. 2, where cells were grown in Zobell medium, since the *malT* mutant does not grow in minimal medium plus maltose. Cells were grown with continuous shaking at 180 rpm at 20°C. When the OD₆₀₀ reached ~0.4, bacteria were collected by centrifugation and resuspended in TRI reagent (Sigma) before total RNA extraction and purification, which was carried out using Direct-zol MiniPrep Plus (Zymo research). DNA was removed by TURBO DNase (Ambion) treatment. RNA was further purified by phenol-chloroform extraction and RNA precipitation. Ten micrograms (5 μg in the case shown in Fig. 4B) purified RNA was used for Northern blotting as described previously (19). Oligonucleotide probes (Table 3) complementary to the gene to be assayed were labeled at their 3' ends using terminal transferase (Fermentas, USA) and [α-³²P]dCTP, according to the manufacturer's instructions. Transfer-messenger RNA (tmRNA) was used as a loading control. Membranes were scanned using an Amersham Typhoon biomolecular imager (GE Healthcare) in the phosphorimager mode. Transcript signals were quantified by ImageJ (36) and normalized to the signal of tmRNA.

For RT-PCR, 1 μg RNA was used as a template for the first-strand synthesis catalyzed by SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen). Amplification of the *vsr217-malK* transcript was then carried out using DreamTaq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific) and primers Vsr217-RT-F and MalK-RT-R (Table 3).

5' and 3' rapid amplification of cDNA ends. Overnight cultures of LGP32 WT and Δ*vsr217* strains were diluted to an OD₆₀₀ of ~0.05 and grown in minimal medium supplemented with 2 g/liter D-maltose. Bacteria were collected by centrifugation when the OD₆₀₀ reached ~0.4 and were resuspended in TRI reagent followed by RNA extraction, DNase treatment, and RNA purification. 5' and 3' ends of *Vsr217* and *malK* transcripts were determined using the 5'/3' RACE system for rapid amplification of cDNA ends (Invitrogen). RNA primers used are listed in Table 3. In each case, the subsequent PCR products were cloned in the pJET1.2 vector (Thermo Fisher Scientific). Twenty plasmids were prepared from randomly chosen colonies, and inserts were sequenced using oligonucleotides pJET1.2-F/R (Table 3).

RNA stability measurement. LGP32 WT, Δ*vsr217*, and Δ*polyT* strains were grown overnight in minimal medium supplemented with 2 g/liter D-maltose at 20°C. Bacteria were diluted to an OD₆₀₀ of ~0.05 and grown in the same medium until an OD₆₀₀ of ~0.4 and rifampicin was added to a final concentration of 500 μg/ml. Bacteria were collected for RNA extraction at 0, 0.5, 1.0, 2.0, and 3.0 min after the addition of rifampicin. Northern blot analysis was performed to determine the amount of Vsr217 and *malK* transcripts.

TABLE 3 Oligonucleotides used in this study

Name	Sequence (5'→3') ^a	Target/goal
Northern blot probes		
NB-vs-MalK	CATACCTACACCACGTTTTGATGGCC	<i>malk</i>
NB-vs-Vsr217	CCCGTGATTCAATCACAGATTAGCTCGA	Vsr217
NB-vs-Fbp	ATCTCACGGTTAACAATTTTGCAG	<i>fbp</i>
NB-vs-tmRNA	AGCCACGCTAGCTAGTTGGGTTTGATCT	tmRNA
RT-PCR		
Vsr217-RT-F	ACCAGCGAATGTTATGCGTT	Vsr217
MalK-RT-R	CAAGCGACGACATGCTCTAC	<i>malk</i>
5' and 3' RACE		
Oligo(dT)-anchor primer	GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTT	RACE product cloning
PCR Anchor primer	GACCACGCGTATCGATGTCGAC	RACE product cloning
5' Malk-GSP1	GAATACCATACTACACACGTTTT	<i>malk</i>
5' Malk-GSP2	ACGTAATATCTTCTAGACCTGCGAT	<i>malk</i>
5' Malk-GSP3	GAATCACCTTCGTTGATGTCTAAG	<i>malk</i>
5' Vsr217-GSP1	GGTGGGACTTGAATTCTTTAACCA	Vsr217
5' Vsr217-GSP2	CACCCGTCATAGCCAACTG	Vsr217
5' Vsr217-GSP3	CCAATAAATGAACAATGCGTCAAC	Vsr217
3' Malk-GSP1	TGCGACGATTGAAGCTGATG	<i>malk</i>
3' Malk-GSP2	GGTATTCTGACACACCGTTG	<i>malk</i>
3' Vsr217-GSP1	ACCAGCGAATGTTATGCGTT	Vsr217
3' Vsr217-GSP2	CTGCCGCTGTTGCTTTAT	Vsr217
<i>vsr217</i>- and <i>malk</i>-expressing plasmids		
pGEB12-F	CACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCG	pGEB12
pGEB12-R	CAAGCTTGCATGCGCTGCAGGTCGAC	pGEB12
Vsr217-malK-F	aggcatgcaagcttgCCCTTTATCTACTCTCCCC	P1- <i>vsr217</i> -P2- <i>malk</i> plasmid
Vsr217-malK-R	aaacgacggccagtgAACAGACAAAGCGCGATC	P1- <i>vsr217</i> -P2- <i>malk</i> plasmid
del <i>vsr217</i> -F	TTACTCACTCAATACTTACCAATTCCTACAGTTACTGCTG	Deleting <i>vsr217</i> to get pP1-P2-MalK
del <i>vsr217</i> -R	GGTAAGTATTGAGTGAGTAAGAATGCAGTTTCGGTGAATT	Deleting <i>vsr217</i> to get pP1-P2-MalK
del <i>malk</i> -F	TCGGTTCGCTTTTTAGAATATAACTTGCCCGTATCGAAT	Deleting <i>malk</i> to get pP1-Vsr217
del <i>malk</i> -R	TTCTAAAAAGACGAACCGAATTGAGTGAGTAAGAAAAAGTGGGTGGG	Deleting <i>malk</i> to get pP1-Vsr217
Mutagenesis		
pSW7848-F	GTCTGATTCTTACCAATTATGACAAC	Vector amplification
pSW7848-R	GAATTCGATATCAAGCTTATCGATAC	Vector amplification
Vsr217-up-F	aagcttgatcgaattcTCTTCCCAAGACTTAGGTGGGTTAGGGACAAG	Upstream of <i>vsr217</i>
Vsr217-up-R	agtgagtaaGAATGCAGTTTCGGTGAATTCGCGTAATGG	Upstream of <i>vsr217</i>
Vsr217-down-F	ctgcattcTTACTCACTCAATACTTACCAATTCCTACAGTTACTGCTGAC	Downstream of <i>vsr217</i>
Vsr217-down-R	ttggaacgaatcagacCCAGCAACGAAACGGTTTTGAGGATAGTGG	Downstream of <i>vsr217</i>
malT-up-F	aagcttgatcgaattcTATTCGTAGTGAAGACCGTAGCC	Upstream of <i>malT</i>
malT-up-R	cgaatcgtCTATTCCGTGGCGTATGTTTTG	Upstream of <i>malT</i>
malT-down-F	cggaaatagACGATTCGAGATTGATTCCG	Downstream of <i>malT</i>
malT-down-R	ttggaacgaatcagacTAATGCTGTAAGCGAAGG	Downstream of <i>malT</i>
polyT up-F	ataagcttgatcgaattcAGACTTAGGTGGGTTAGG	Upstream of last 13 nt of <i>vsr217</i>
polyT up-R	gagtgagtaaGGGACTTGAATTCTTTAACC	Upstream of last 13 nt of <i>vsr217</i>
polyT down-F	ttcaagtcctTACTCACTCAATACTTACCAATTC	Downstream of last 13 nt of <i>vsr217</i>
polyT down-R	taattggtaacgaatcagacCAATCGTCGCATCACCTG	Downstream of last 13 nt of <i>vsr217</i>
sRNA interaction system		
pZE12-F	CTAGAGGCATCAATAAAACGAAAGGCTCA	pZE12MCS
pZE12-R	GGTACCTTTCTCCTCTTAATGAATTCGGT	pZE12MCS
Vsr217-F	ttaaagaggagaaggtaccCCCTTTATCTACTCCTCCC	<i>vsr217</i>
Vsr217-R	gttttatttgatgcctctagAACAGACAAAGCGCGATC	<i>vsr217</i>
pXG-10_fwd	GCTAGCAAAGGAGAAGAATTTTC	pXG-10 (vector amplification)
pXG-10_rev	GTGCTCAGTATCTCTATCA	pXG-10 (vector amplification)
pZE-CAT	TGGGATATATCAACGGTGGT	pXG-10 (sequencing insert) (26)
JV0-155	CCGTATGTAGCATCACCTTC	pXG-10 (sequencing insert) (26)
Vibtas_FBP_UTR_F	atagagatactgagcacATTACCATTAAGATCTAACCTTTAG	<i>fbp</i> 5' UTR (–125, +3)
Vibtas_FBP_UTR_R_bis	agttcttctcttGCTAGCCATGTTATTTCCITTAACCTCTCTC	<i>fbp</i> 5' UTR (–125, +3)
Ptet-R-2	GTGCTCAGTATCTCTATCACTGATA	Deleting the alpha peptide encoding fragment from pXG-10
GFP-F	GCTAGCAAAGGAGAAGAATTTTC	Deleting the alpha peptide encoding fragment from pXG-10

^aNontarget bases complementary to the cloning vector are indicated by lowercase letters.

GFP fluorescence measurement. To monitor green fluorescent protein (GFP) fluorescence, strains to be assayed (derived from *E. coli* MG1655) were grown overnight in LB supplemented with Cm and Amp. Five microliters of the overnight culture was spotted onto LB agar supplemented with Cm, Amp, and IPTG where indicated, and the plates were incubated at 37°C. Plates were then scanned with an Amersham Typhoon model 5 biomolecular imager (GE Healthcare), using the fluorescence mode (excitation [Exc], 488 nm; emission [Em], 525 nm; filter Cy2 525BP20). Signal intensity of the bacterial spots was determined using ImageJ and the formula (integrated density of the spot – [spot area × mean background signal]), where the background signal was the signal obtained for cells containing the non-GFP-expressing plasmid, to remove the intrinsic fluorescence of bacterial cells. Significance of the relative differences was determined by a Student's unpaired *t* test, with four biological replicates.

Proteomics. *V. tasmaniensis* LGP32 and Δ vsr217 strains were grown in triplicates in Zobell with glucose or maltose until an OD₆₀₀ of ~0.4 (12 samples in total). After centrifugation of 2 ml, cells were washed in Tris/EDTA (pH 7.5) plus 20% sucrose and then resuspended in NuPAGE LDS buffer (Thermo Fisher Scientific) to a final concentration equivalent to an OD₆₀₀ of 20. Samples were heated at 95°C for 10 min before loading 10 μ l of each sample on a 4% to 12% polyacrylamide gradient gel (Invitrogen). After a 5-min migration to let the samples enter the gels, they were stained in Coomassie blue and then destained.

For tandem mass spectrometry (MS/MS), proteins were subjected to an in-gel enzymatic digestion with trypsin. Nanoscale liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (nLC-ESI-MS-MS; Triple-TOF) was carried out (gradient of 120 min), and the peptides were identified by Mascot and Andromeda and quantified by MaxQuant. Statistical analyses were carried out using Perseus (37). *P* values were calculated using a Welch's *t* test.

Bioinformatic predictions. Promoters were predicted using the BPROM software, and Rho-independent terminators were predicted using the FindTerm software (38). *Vibrio* *malK* upstream sequences were aligned using Muscle at the EBI (39). Putative Vsr217 targets were identified using CopraRNA, and interaction between Vsr217 and the *fbp* mRNA upstream region was predicted using IntaRNA (23).

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

FIG S1, PDF file, 0.1 MB.

FIG S2, PDF file, 0.1 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

The present study was supported by the ANR project 616 DECIPHER (ANR-14-CE19-0023). X.L. was the recipient of a Ph.D. fellowship from the China Scholarship Council. M.E. was the recipient of a Ph.D. fellowship from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation.

This work has benefited from the facilities and expertise of the SiCaPS platform of I2BC (Institut de Biologie Intégrative de la Cellule). We thank David Cornu for his expert assistance with the proteomics experiment. We also thank Mac Allan for useful discussions.

REFERENCES

- van der Meulen SB, de Jong A, Kok J. 2016. Transcriptome landscape of *Lactococcus lactis* reveals many novel RNAs including a small regulatory RNA involved in carbon uptake and metabolism. *RNA Biol* 13:353–366. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1146855>.
- Liu JM, Camilli A. 2010. A broadening world of bacterial small RNAs. *Curr Opin Microbiol* 13:18–23. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.11.004>.
- Miotto P, Forti F, Ambrosi A, Pellin D, Veiga DF, Balazsi G, Gennaro ML, Di Serio C, Ghisotti D, Cirillo DM. 2012. Genome-wide discovery of small RNAs in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* 7:e51950. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051950>.
- Kawano M, Reynolds AA, Miranda-Rios J, Storz G. 2005. Detection of 5'- and 3'-UTR-derived small RNAs and *cis*-encoded antisense RNAs in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 33:1040–1050. <https://doi.org/10.1093/nar/gki256>.
- Chao Y, Vogel J. 2016. A 3' UTR-derived small RNA provides the regulatory noncoding arm of the inner membrane stress response. *Mol Cell* 61:352–363. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.12.023>.
- Guo MS, Updegrove TB, Gogol EB, Shabalina SA, Gross CA, Storz G. 2014. MicL, a new sigmaE-dependent sRNA, combats envelope stress by repressing synthesis of Lpp, the major outer membrane lipoprotein. *Genes Dev* 28:1620–1634. <https://doi.org/10.1101/gad.243485.114>.
- Davis BM, Waldor MK. 2007. RNase E-dependent processing stabilizes MicX, a *Vibrio cholerae* sRNA. *Mol Microbiol* 65:373–385. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05796.x>.
- Hoyos M, Huber M, Forstner KU, Papenfort K. 2020. Gene autoregulation by 3' UTR-derived bacterial small RNAs. *Elife* 9:e58836. <https://doi.org/10.7554/eLife.58836>.
- Johansson J, Mandin P, Renzoni A, Chiaruttini C, Springer M, Cossart P. 2002. An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell* 110:551–561. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00905-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00905-4).
- 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>.
- Melior H, Li S, Madhugiri R, Stotzel M, Azarderakhsh S, Barth-Weber S, Baumgardt K, Ziebuhr J, Evgueniev-Hackenberg E. 2019. Transcription attenuation-derived small RNA rTrpL regulates tryptophan biosynthesis gene expression in *trans*. *Nucleic Acids Res* 47:6396–6410. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz274>.
- 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>.

13. Zhang Y, Yan D, Xia L, Zhao X, Osei-Adjei G, Xu S, Sheng X, Huang X. 2017. The *malS*-5'UTR regulates *hisG*, a key gene in the histidine biosynthetic pathway in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Can J Microbiol* 63:287–295. <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0490>.
14. Sawabe T, Ogura Y, Matsumura Y, Feng G, Amin AR, Mino S, Nakagawa S, Sawabe T, Kumar R, Fukui Y, Satomi M, Matsushima R, Thompson FL, Gomez-Gil B, Christen R, Maruyama F, Kurokawa K, Hayashi T. 2013. Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonius* sp. nov. *Front Microbiol* 4:414. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00414>.
15. Gay M, Renault T, Pons AM, Le Roux F. 2004. Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. *Dis Aquat Organ* 62:65–74. <https://doi.org/10.3354/dao062065>.
16. Duperthuy M, Schmitt P, Garzon E, Caro A, Rosa RD, Le Roux F, Lautredou-Audouy N, Got P, Romestand B, de Lorgeril J, Kieffer-Jaquinod S, Bachere E, Destoumieux-Garzon D. 2011. Use of OmpU porins for attachment and invasion of *Crassostrea gigas* immune cells by the oyster pathogen *Vibrio splendidus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:2993–2998. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015326108>.
17. Vanhove AS, Duperthuy M, Charriere GM, Le Roux F, Goudenege D, Gourbal B, Kieffer-Jaquinod S, Coute Y, Wai SN, Destoumieux-Garzon D. 2015. Outer membrane vesicles are vehicles for the delivery of *Vibrio tasmaniensis* virulence factors to oyster immune cells. *Environ Microbiol* 17:1152–1165. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12535>.
18. Vanhove AS, Rubio TP, Nguyen AN, Lemire A, Roche D, Nicod J, Vergnes A, Poirier AC, Disconzi E, Bachere E, Le Roux F, Jacq A, Charriere GM, Destoumieux-Garzon D. 2016. Copper homeostasis at the host *Vibrio* interface: lessons from intracellular *Vibrio* transcriptomics. *Environ Microbiol* 18:875–888. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13083>.
19. Toffano-Nioche C, Nguyen AN, Kuchly C, Ott A, Gautheret D, Boulloc P, Jacq A. 2012. Transcriptomic profiling of the oyster pathogen *Vibrio splendidus* opens a window on the evolutionary dynamics of the small RNA repertoire in the *Vibrio* genus. *RNA* 18:2201–2219. <https://doi.org/10.1261/rna.033324.112>.
20. Boos W, Shuman H. 1998. Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism, and regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:204–229. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.1.204-229.1998>.
21. Schlegel A, Bohm A, Lee SJ, Peist R, Decker K, Boos W. 2002. Network regulation of the *Escherichia coli* maltose system. *J Mol Microbiol Biotechnol* 4:301–307.
22. Vidal-Ingigliardi D, Richet E, Raibaud O. 1991. Two MalT binding sites in direct repeat. A structural motif involved in the activation of all the promoters of the maltose regulons in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Mol Biol* 218:323–334. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90715-i](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90715-i).
23. Wright PR, Georg J, Mann M, Sorescu DA, Richter AS, Lott S, Kleinkauf R, Hess WR, Backofen R. 2014. CopraRNA and IntaRNA: predicting small RNA targets, networks and interaction domains. *Nucleic Acids Res* 42:W119–23. <https://doi.org/10.1093/nar/gku359>.
24. Gottesman S, Storz G. 2011. Bacterial small RNA regulators: versatile roles and rapidly evolving variations. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a003798. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003798>.
25. Urban JH, Vogel J. 2009. A green fluorescent protein (GFP)-based plasmid system to study post-transcriptional control of gene expression *in vivo*. *Methods Mol Biol* 540:301–319. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-558-9_22.
26. Urban JH, Vogel J. 2007. Translational control and target recognition by *Escherichia coli* small RNAs *in vivo*. *Nucleic Acids Res* 35:1018–1037. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl1040>.
27. Vogel J, Luisi BF. 2011. Hfq and its constellation of RNA. *Nat Rev Microbiol* 9:578–589. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2615>.
28. Lenz DH, Mok KC, Lilley BN, Kulkarni RV, Wingreen NS, Bassler BL. 2004. The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*. *Cell* 118:69–82. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.009>.
29. Vincent HA, Henderson CA, Ragan TJ, Garza-Garcia A, Cary PD, Gowers DM, Malfois M, Driscoll PC, Sobott F, Callaghan AJ. 2012. Characterization of *Vibrio cholerae* Hfq provides novel insights into the role of the Hfq C-terminal region. *J Mol Biol* 420:56–69. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.03.028>.
30. Saier MH, Jr, Ramseier TM. 1996. The catabolite repressor/activator (Cra) protein of enteric bacteria. *J Bacteriol* 178:3411–3417. <https://doi.org/10.1128/jb.178.12.3411-3417.1996>.
31. Ramseier TM. 1996. Cra and the control of carbon flux via metabolic pathways. *Res Microbiol* 147:489–493. [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(96\)84003-4](https://doi.org/10.1016/0923-2508(96)84003-4).
32. Green TJ, Vergnes A, Montagnani C, de Lorgeril J. 2016. Distinct immune responses of juvenile and adult oysters (*Crassostrea gigas*) to viral and bacterial infections. *Vet Res* 47:72. <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0356-7>.
33. Kim D, Seo SW, Gao Y, Nam H, Guzman GI, Cho BK, Palsson BO. 2018. Systems assessment of transcriptional regulation on central carbon metabolism by Cra and CRP. *Nucleic Acids Res* 46:2901–2917. <https://doi.org/10.1093/nar/gky069>.
34. Nguyen AN, Disconzi E, Charriere GM, Destoumieux-Garzon D, Boulloc P, Le Roux F, Jacq A. 2018. *csrB* gene duplication drives the evolution of redundant regulatory pathways controlling expression of the major toxic secreted metalloproteases in *Vibrio tasmaniensis* LGP32. *mSphere* 3: e00582-18. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00582-18>.
35. Gibson DG. 2011. Enzymatic assembly of overlapping DNA fragments. *Methods Enzymol* 498:349–361. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385120-8.00015-2>.
36. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9:671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>.
37. Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, Mann M, Cox J. 2016. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods* 13:731–740. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3901>.
38. Solov'yev VV, Shahmuradov IA, Salamov AA. 2010. Identification of promoter regions and regulatory sites. *Methods Mol Biol* 674:57–83. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-854-6_5.
39. Madeira F, Park YM, Lee J, Buso N, Gur T, Madhusoodanan N, Basutkar P, Tivey ARN, Potter SC, Finn RD, Lopez R. 2019. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res* 47:W636–W641. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz268>.
40. Le Roux F, Zouine M, Chakroun N, Binesse J, Saulnier D, Bouchier C, Zidane N, Ma L, Rusniok C, Lajus A, Buchrieser C, Medigue C, Polz MF, Mazel D. 2009. Genome sequence of *Vibrio splendidus*: an abundant planktonic marine species with a large genotypic diversity. *Environ Microbiol* 11:1959–1970. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01918.x>.
41. Douchin V, Bohn C, Boulloc P. 2006. Down-regulation of porins by a small RNA bypasses the essentiality of the regulated intramembrane proteolysis protease RseP in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 281:12253–12259. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600819200>.
42. Le Roux F, Binesse J, Saulnier D, Mazel D. 2007. Construction of a *Vibrio splendidus* mutant lacking the metalloprotease gene *vsm* by use of a novel counterselectable suicide vector. *Appl Environ Microbiol* 73:777–784. <https://doi.org/10.1128/AEM.02147-06>.
43. Val ME, Skovgaard O, Ducos-Galand M, Bland MJ, Mazel D. 2012. Genome engineering in *Vibrio cholerae*: a feasible approach to address biological issues. *PLoS Genet* 8:e1002472. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002472>.
44. Lakhal F, Bury-Mone S, Nomane Y, Le Goic N, Paillard C, Jacq A. 2008. DjlA, a membrane-anchored DnaJ-like protein, is required for cytotoxicity of clam pathogen *Vibrio tapetis* to hemocytes. *Appl Environ Microbiol* 74:5750–5758. <https://doi.org/10.1128/AEM.01043-08>.

DISCUSSION

Discussion

Un nouveau phénotype associé à l'absence d'ARN 6S

L'ARN 6S, découvert chez *E. coli* (Hindley, 1967), a ouvert un peu plus le champ des ARN régulateurs interagissant avec des partenaires protéiques au début des années 2000 (Wassarman and Storz, 2000). Sa liaison avec un élément aussi essentiel que l'ARNpol (Wassarman and Storz, 2000) et son extraordinaire conservation parmi les bactéries (Wehner et al., 2014) ont laissé entendre que l'ARN 6S serait responsable d'une pléiade de régulations et donc de phénotypes. En réalité, les cibles et les phénotypes de l'ARN 6S sont difficiles à identifier, varient selon les espèces et sont observables dans des conditions très spécifiques. Chez *E. coli*, il n'y a aucune différence de croissance en milieu riche (Lee et al., 1985) mais un défaut d'adaptation du mutant *ssrS* à la phase stationnaire a été mis en évidence lorsqu'il est en compétition pour l'accès aux ressources (Trotochaud and Wassarman, 2004). Chez *B. subtilis*, la délétion d'un de ses deux gènes codant l'ARN 6S suffit à provoquer un défaut de croissance malgré certaines incohérences de résultats entre les souches utilisées et les laboratoires (Ando et al., 2002; Cavanagh et al., 2012; Hoch et al., 2015; Suzuma et al., 2002; Thüring et al., 2021). Chez d'autres bactéries, ce sont des phénotypes propres à leur mode de vie qui ont été mis en lumière. Par exemple, *Legionella pneumophila*, agent de la légionellose, croît moins bien lors de l'infection intracellulaire en absence d'ARN 6S mais là encore, aucune différence n'est visible en milieu riche (Faucher et al., 2010). Pour compléter cette liste non exhaustive, nous avons mis en évidence un nouveau phénotype lié à l'absence d'ARN 6S : l'hypersensibilité à la rifampicine. D'abord découvert lors d'expériences de compétition entre mutants d'ARNrég chez *S. aureus*, nous avons démontré que l'effet protecteur de l'ARN 6S n'était pas limité à la rifampicine et qu'il s'appliquait à d'autres bactéries comme *S. Typhimurium* LT2 et *C. difficile* (Fig. 1, 2 et 3 ; chapitre 1). Le phénotype est complété par l'expression d'une copie ectopique de *ssrS* chez *S. aureus* (rifampicine, rifabutine et fidaxomicine) et *C. difficile* (fidaxomicine). En revanche, le phénotype d'hypersensibilité à la rifampicine n'est que partiellement complété chez *S. Typhimurium* LT2, peut-être à cause d'un défaut de maturation. En effet, *ssrS* est situé dans le même opéron que *ygfA* et la forme mature de l'ARN 6S est issue de clivages en 5' et en 3' chez *E. coli*. La synténie étant quasi-parfaitement conservée entre *E. coli* et *S. Typhimurium* LT2, on peut supposer que les régulations sont les mêmes. L'expression totale ectopique ou *in situ* de *ssrS*^{LT2} est équivalente chez *Salmonella* (Fig. S3A ; chapitre 1). Cependant, même de légères modifications d'expression ou d'équilibre entre préformes et forme mature d'un ARN fortement exprimé peuvent engendrer des effets toxiques. L'ARN 6S étant très conservé parmi les bactéries (Wehner et al., 2014), nous avons décidé d'intervertir les gènes *ssrS* entre *S. aureus* et *S. Typhimurium* LT2 afin d'évaluer la compatibilité de l'ARN 6S entre différents micro-organismes. Le

remplacement s'est effectué chez *Salmonella* au niveau du promoteur P1 de *ssrS*^{LT2} avec le +1 de transcription de *ssrS*^{Sa} de *S. aureus*, et chez *S. aureus* au niveau du +1 de transcription de *ssrS*^{Sa} avec la séquence de la forme mature de l'ARN 6S de *S. Typhimurium*. La complémentation chez *S. aureus* ($\Delta ssrS^{Sa}::ssrS^{LT2}$) est partielle mais elle est nulle chez *Salmonella* ($\Delta ssrS^{LT2}::ssrS^{Sa}$). Là encore, des problèmes de maturation peuvent être en jeu mais également des problèmes d'expression ; chez *Salmonella*, l'expression ectopique de l'ARN 6S à partir du gène *ssrS*^{Sa} est moindre par rapport à celle du gène natif *ssrS*^{LT2} (**Fig. S3A, chapitre 1**). Les résultats chez *S. Typhimurium* rappellent ceux observés lors d'une expérience similaire chez *B. subtilis*. Les chercheurs n'ont pas réussi à compléter le défaut d'adaptation à la phase stationnaire associé au double mutant *bsrAB* avec le gène *ssrS* d'*E. coli* (Hoch et al., 2015). Toutefois, *B. subtilis* possède deux ARN 6S, ce qui n'est pas le cas de *S. Typhimurium*.

D'un point de vue mécanistique, la sensibilité accrue aux inhibiteurs de l'ARNpol pourrait s'expliquer par un phénomène d'encombrement stérique. L'accès des inhibiteurs de l'ARNpol à leur site de liaison serait facilité par l'absence d'ARN 6S. Cela pourrait également expliquer pourquoi il existe un différent degré de sensibilité du mutant *ssrS*^{Sa} en fonction des inhibiteurs testés. On peut imaginer que les inhibiteurs ayant des sites d'interaction proches de ceux de l'ARN 6S et de l'ARNpol soient les molécules conférant les phénotypes les plus forts en absence d'ARN 6S. De la même manière, l'absence de phénotype dépendant de la délétion *ssrS*^{Sa} en présence d'auréothricine pourrait être un indice concernant le site d'interaction de cet antibiotique méconnu.

Dans la lignée de l'hypothèse d'encombrement stérique, nous nous sommes demandé s'il existait un lien entre la résistance « classique » à la rifampicine, due à une mutation ponctuelle Rif^R de la sous-unité β de l'ARNpol, et la forme de résistance conférée par l'ARN 6S, en comparant les profils de mutations Rif^R du mutant *ssrS*^{Sa} et de la souche isogénique (**Figure 18**). La sélection de mutants Rif^R n'a montré aucune différence significative de fréquence entre les souches $\Delta ssrS^{Sa}$ et WT. La nature des résistances obtenues était sensiblement la même entre les deux souches et correspondait à ce qui avait déjà été décrit chez *S. aureus* (Guérillot et al., 2018). Cependant, de nouvelles mutations identifiées aussi bien chez le mutant *ssrS*^{Sa} que chez sa souche parentale, y compris lors de précédents essais, indiquent que nous ne sommes pas arrivés à saturation. L'absence d'ARN 6S n'a, a priori, aucun impact sur l'apparition des mutations Rif^R mais l'expérience devrait être répétée, de préférence avec une concentration en rifampicine comprise entre 8 à 16 fois la CMI, soit au minimum 96 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Les interactions entre l'ARN 6S et l'ARNpol holoenzyme

Après avoir exploré le rôle protecteur de l'ARN 6S contre les inhibiteurs de l'ARNpol, nous nous sommes intéressés à ses interactions avec l'ARNpol. Chez *E. coli* et *B. subtilis*, l'ARN 6S se lie à l'holoenzyme contenant le facteur végétatif (Barrick, 2005; Burenina et al., 2014; Trotochaud and Wassarman, 2005) ; il s'agit même de la forme majoritaire de l'ARNpol lorsqu'elle est inactive chez *S. pneumoniae* et *E. coli* (Hör et al., 2020; Wassarman and Storz, 2000). Grâce à des expériences de retard sur gel (**Fig. 6A, chapitre 1**), nous avons montré que l'interaction de l'ARN 6S avec l'ARNpol était de même nature chez *S. aureus*. Nous nous sommes donc demandé si l'absence d'ARN 6S pouvait perturber la cohésion ou l'intégrité des sous-unités de l'ARNpol. En réalisant un western-blot à partir de cultures âgées de J0 à J3 (**Fig. 6B, chapitre 1**), nous avons mis en évidence une diminution progressive de la quantité de σ^A , atteignant moins de 50 % de la quantité attendue. Ce phénomène de manque de facteur végétatif en absence d'ARN 6S a déjà été observé chez *E. coli* (Gildehaus et al., 2007; Trotochaud and Wassarman, 2005; Wassarman and Storz, 2000). Toujours chez *E. coli*, différents travaux ont mis en évidence un contact direct entre σ^{70} (Klocko and Wassarman, 2009; Steuten et al., 2013), β , β' et l'ARN 6S (Gildehaus et al., 2007; Wassarman and Storz, 2000). De plus, de précédentes études ont rapporté une certaine instabilité de facteur σ^A chez *S. aureus* (Mondal et al., 2010). La forme prédominante de l'ARNpol- σ^A étant probablement couplée à l'ARN 6S en dehors de la transcription, nos résultats suggèrent que le facteur σ^A est d'autant plus instable sans ARN 6S. L'ARN 6S semble donc être nécessaire au maintien de l'intégrité et à la stabilité de l'ARNpol holoenzyme en agissant comme une boucle protectrice. Cependant, cette différence de concentration en σ^A ne semble pas influencer la reprise de croissance en milieu riche (**Fig. 6C, chapitre 1**). Concernant le mécanisme de recyclage de l'ARNpol via le pARN, des contraintes techniques liées au séquençage nous empêchent de l'identifier chez *S. aureus*. Des investigations supplémentaires sont nécessaires.

L'interaction ARNpol/facteurs σ est dépendante de la concentration des facteurs σ les uns par rapport aux autres et de leur affinité pour le cœur de l'enzyme (Ishihama, 2000). L'absence d'ARN 6S pourrait conduire à une augmentation de la quantité de σ végétatif libre, plus particulièrement en phase stationnaire. Un changement d'ordre compétitif entre les facteurs sigma pourrait contribuer aux défauts d'adaptation observés chez *B. subtilis* ou *E. coli*. Nous avons voulu tester l'hypothèse selon laquelle l'ARN 6S privilégierait l'utilisation de facteurs alternatifs lorsque les conditions environnementales l'imposent chez *S. aureus*, comme initialement proposé chez *E. coli* (Trotochaud and Wassarman, 2005). Les trois facteurs σ alternatifs staphylococciques sont σ^B , σ^H et σ^S . J'ai donc réalisé des fusions transcriptionnelles combinant des promoteurs dépendants des facteurs sus-cités au gène de la mAmetrine, une protéine fluorescente. La fusion rapporteuse *PsigB-mAmetrine* supporte cette hypothèse mais seulement après 18h de culture, soit en phase stationnaire tardive. En revanche,

les autres fusions, dépendantes des facteurs σ^H et σ^S , n'ont pas produit de résultats interprétables. Malgré l'utilisation de milieux de culture favorisant l'expression de ces deux facteurs, le niveau d'expression des fusions rapporteuses était très faible. En effet, σ^H et σ^S sont cryptiques : ils sont exprimés dans des proportions variables selon les souches de *S. aureus* et les conditions environnementales et peu de travaux leur ont été consacrés. Des expériences supplémentaires et des ajustements sont nécessaires pour évaluer d'une part l'expression de ces protéines et d'autre part l'expression des systèmes rapporteurs dans les souches que nous utilisons.

L'ARN 6S est-il un régulateur global chez *S. aureus* ?

Au-delà du faible nombre de phénotypes caractérisés associés à l'ARN 6S, des changements transcriptionnels causés par l'absence d'expression de cet ARN rég ont été identifiés chez différents genres bactériens. Les différences observées s'articulent autour du métabolisme, de l'acquisition des nutriments et de la réponse au stress (Faucher et al., 2010; Geißen et al., 2010; Lal et al., 2018; Neusser et al., 2010). Chez *E. coli*, les différentes analyses transcriptomiques ont montré que certains gènes étaient sensibles à l'ARN 6S au moment de la transition entre phase exponentielle et phase stationnaire de croissance (Lal et al., 2018; Neusser et al., 2010). Cependant, même si elles ne s'accordent pas forcément sur la nature des gènes concernés, ces analyses mettent en évidence le caractère fonctionnel phase-indépendant de l'ARN 6S. En effet, l'ARN 6S jouerait également sur l'expression de gènes en phase exponentielle ou en phase stationnaire prolongée. Chez *S. aureus*, l'ARN 6S pourrait avoir un impact transcriptionnel plus tardif. Nos résultats suggèrent que le rôle transcriptionnel de l'ARN 6S est plus important en phase stationnaire tardive et que l'effet de l'ARN 6S est quasi-inexistant lors de la transition de phase (**Fig. 5A** et **Table 1**, **chapitre 1**). L'ARN 6S continuant à s'accumuler après la transition phase exponentielle/phase stationnaire (**Fig. 4A**, **chapitre 1**), le transcriptome WT/ Δ ssrS^{ss} en conditions physiologiques a peut-être été réalisé trop tôt pour pouvoir identifier le régulon de l'ARN 6S.

Chez *E. coli*, des chercheurs ont avancé l'argument d'une compensation par le tetraphosphate de guanosine (ppGpp) qui pourrait masquer certains effets de la délétion *ssrS* (Lal et al., 2018; Neusser et al., 2010). Le ppGpp est une alarmone ayant un rôle important au moment de la bascule vers la phase stationnaire ; elle permet (i) de diminuer la synthèse des ARN ribosomiques en inhibant l'initiation de la transcription et (ii) d'augmenter l'expression de gènes impliqués dans la biogenèse ou le transport d'acides aminés (Haurlyuk et al., 2015). En revanche les arguments concernant son origine divergent ; certains avancent que l'augmentation du taux de ppGpp au moment de la transition de phase serait dû à la levée de répression de *relA*, codant la ppGpp synthase, par l'ARN 6S (Cavanagh et

al., 2010) alors que d'autres affirment que cette augmentation serait due à SpoT (Neusser et al., 2010). En effet, le ppGpp est issu de deux protéines indissociables ; lors de la réponse stringente, il est produit par RelA suite à la carence en acides aminés, ou par SpoT, sensible à de nombreux signaux comme les sources de carbone ou le fer disponibles, qui équilibre les niveaux de ppGpp (Hauryliuk et al., 2015). Toujours chez *E. coli*, l'ARN 6S contrôle la synthèse de ppGpp mais ses promoteurs sont insensibles à la réponse stringente (Neußer et al., 2008). Chez *S. aureus*, des analyses transcriptomiques ont montré que le ppGpp influençait le métabolisme général mais également la virulence (AlHoufie and Foster, 2016; Geiger et al., 2010; Reiß et al., 2012). Le transcriptome que nous avons réalisé à $DO_{600} = 7$ n'a révélé aucune différence d'expression des gènes des trois ppGpp synthases (*relA*, *relP* et *relQ*) entre $\Delta ssrS^{Sa}$ et la souche isogénique mais un gène codant une perméase d'acide aminé (*SAOUHSC_025990*) est réprimé (FC = 0,61) chez le mutant $ssrS^{Sa}$. En utilisant la mupirocine, un antibiotique déclenchant la réponse stringente en mimant la carence en isoleucine, nous pourrions examiner le niveau de ppGpp en présence ou non d'ARN 6S.

La gestion des ressources nutritionnelles est un point important à explorer. Chez *B. subtilis*, le mutant n'exprimant l'ARN 6S-1 épuiserait plus rapidement le milieu de culture que sa souche parentale (Cavanagh and Wassarman, 2013). Chez *Lactococcus lactis*, l'ARN 6S est régulé par le répresseur catabolique CcpA et donc exprimé différemment en fonction des sources de carbone disponibles. Il pourrait également contrôler une partie du régulon CcpA (van der Meulen et al., 2016). Dans notre analyse transcriptomique des souches WT/ $\Delta ssrS^{Sa}$, quatre gènes différentiellement exprimés en absence d'ARN 6S sont régulés par CcpA. L'ARN 6S pourrait donc jouer un rôle dans l'utilisation des ressources carbonées chez *S. aureus*. Des expériences complémentaires en milieu minimum ont été réalisées au laboratoire mais elles doivent être adaptées car la variabilité d'absorbance associée au mutant $\Delta ssrS^{Sa}$ en milieu chimiquement défini rend l'interprétation des résultats impossibles. Un second transcriptome a été réalisé après induction du gène $ssrS^{Sa}$, ce qui nous a donné des indices supplémentaires quant aux potentiels gènes régulés par l'ARN 6S chez *S. aureus* (**Figure 19**). Peu de gènes activés par l'ARN 6S sont dépendants du principal facteur alternatif σ^B . Ces résultats se rapprochent de ceux observés chez *E. coli* mettant en évidence des promoteurs inhibés par l'ARN 6S ne dépendant pas de σ^{70} (Geißen et al., 2010; Lal et al., 2018; Neusser et al., 2010). Ils sont toutefois moins surprenants chez *S. aureus* dont les gènes sont contrôlés en grande majorité par seulement deux facteurs sigma, σ^A et σ^B . Le caractère phase-dépendant de ces facteurs est moins marqué par rapport à *E. coli* ; par opposition à σ^{38} chez *E. coli*, σ^B n'est pas qu'un facteur d'adaptation à la phase stationnaire ou à la carence nutritionnelle chez *S. aureus* puisqu'il intervient dans des processus beaucoup plus variés tels que la virulence ou la réponse au stress (van Schaik and Abee, 2005). Malgré le maigre régulon σ^B mis en lumière, ces cibles semblent plus que plausibles puisque l'une d'entre elles

a été confirmée par fusion transcriptionnelle (*SAOUHSC_00624* ; pPsigB-mAmetrine, **Fig. 5A, chapitre 1**).

Un autre groupe de gènes important est ressorti de l'analyse après induction de *ssrS^{Sa}* ; il s'agit de gènes codant des transporteurs appartenant au régulon CymR. Ces protéines sont impliquées dans le transport de composés soufrés (Lensmire et al., 2020; Soutourina et al., 2010, 2009). L'analyse transcriptomique suggère une action antagoniste de l'ARN 6S par rapport au répresseur CymR. J'ai réalisé différentes expériences préliminaires, formation de biofilms et test d'inhibition de croissance en présence de sélénocystéine (**Figure 20**), un analogue toxique de la cystéine, mais elles n'ont pas permis de mettre en évidence de lien direct entre ARN 6S et cibles régulées par CymR comme suggéré par les résultats du transcriptome après induction. J'ai également réalisé des cinétiques de croissance en présence de cystine (plus stable que la cystéine) mais ces essais nécessitent une mise au point en raison des contraintes techniques rencontrées et de résultats contradictoires. Des tests complémentaires sont à envisager, notamment pour explorer le stress oxydatif dépendant de CymR chez le mutant *ssrS^{Sa}*.

Globalement, les modifications relevées au travers de ce transcriptome sont relatives à la paroi. Même si les cibles liées au transport n'ont pas ou pas encore été validées, elles témoignent d'une certaine fragilité de la paroi chez *ΔssrS^{Sa}*, qui fait écho à mes observations. En effet, le mutant *ssrS^{Sa}* exhibait un profil de sédimentation différent de celui de sa souche parentale, avec des cellules plus difficiles à resuspendre, particulièrement en milieu chimiquement défini. Ce faisceau d'indices m'a amené à tester la paroi de *ΔssrS^{Sa}* en évaluant sa sensibilité à un inhibiteur de synthèse de la paroi bactérienne, la vancomycine (**Figure 21**). Les résultats obtenus montrent une hypersensibilité à la vancomycine liée à la délétion *ssrS^{Sa}*. Chez *S. aureus*, la vancomycine induit deux ppGpp synthases, RelP et RelQ (Geiger et al., 2014). S'il existe un lien entre l'ARN 6S et la régulation des niveaux de ppGpp comme abordé précédemment, l'absence d'ARN 6S pourrait conduire à un défaut d'adaptation au stress pariétal induit par la vancomycine. Ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle l'ARN 6S est un bouclier protecteur de l'ARNpol et suggèrent que l'absence d'ARN 6S a un impact indirect sur la nature de la paroi bactérienne. Parmi les résultats du transcriptome après induction du gène *ssrS^{Sa}*, *SAOUHSC_02855*, a attiré notre attention. Ce gène, deux fois plus exprimé après l'induction, code pour une protéine avec un domaine LysM lui conférant une activité N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase que l'on retrouve chez certaines autolysines comme Atl. Comme leur nom l'indique, ces autolysines permettent de lyser le peptidoglycane en différents morceaux qui seront ensuite substrat de nouvelles hydrolases du peptidoglycane. Le recyclage du peptidoglycane est un processus important pour la croissance des bactéries. Les Gram positifs y ont recours pour survivre en situation de carence nutritionnelle (Mayer et al., 2019). Walk/R est un système à deux composants formé d'une histidine

kinase Walk et d'un facteur de transcription WalR. Ce duo contrôle positivement l'expression de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme de la paroi dont *atl* et *SAOUHSC_02855*, favorisant ainsi les phénomènes de lyse et de recyclage du peptidoglycane (Delauné et al., 2012; Dubrac et al., 2007). Nos résultats transcriptomiques montrent que l'ARN 6S active l'expression d'un gène codant une protéine à activité autolysine régulé par WalR. Ce contrôle pourrait donc s'effectuer directement ou indirectement via Walk/R. Un autre phénotype observé par les mêmes chercheurs met en évidence un lien entre défaillance Walk/R et augmentation de l'agrégation (Dubrac et al., 2007), ce qui corrèle avec nos propres observations sur la sédimentation du mutant $\Delta ssrS^{Sa}$ en milieux chimiquement définis. Il pourrait donc bien y avoir un lien régulateur entre l'ARN 6S et le système Walk/R. Cependant, nous ne connaissons pas la structure exacte de la paroi du mutant $\Delta ssrS^{Sa}$. La surexpression d'une protéine s'apparentant à une autolysine, peut-être partiellement compensée par les systèmes de recyclage du peptidoglycane, pourrait aboutir à la formation d'une paroi plus fragile. La sensibilité accrue à la vancomycine de $\Delta ssrS^{Sa}$ conforte cette hypothèse. Il serait tentant d'établir un lien entre l'hypersensibilité à la vancomycine de $\Delta ssrS^{Sa}$ et une dérégulation potentielle de Walk/R. En effet, Walk/R a déjà été décrit comme étant un effecteur de la résistance intermédiaire à la vancomycine lorsque son activité diminue (Howden et al., 2011) ou bien lorsqu'il est surexprimé (Kuroda et al., 2019). Cependant, ce phénotype n'est pas cohérent avec le précédent. Si nous considérons que l'augmentation de la sédimentation de $\Delta ssrS^{Sa}$ est due à une augmentation de l'agrégation liée à un déficit Walk/R, la paroi du mutant $\Delta ssrS^{Sa}$ devrait alors être plus épaisse (Dubrac et al., 2007). De manière générale, une paroi épaissie confère une diminution de sensibilité aux glycopeptides, ce qui est contraire à nos résultats. Des expériences supplémentaires sont donc nécessaires pour comprendre les mécanismes de l'hypersensibilité du mutant $ssrS^{Sa}$ à la vancomycine et son potentiel lien avec Walk/R. Bien que l'absence et l'excès de fonction ne soient pas forcément complémentaires et qu'un seul gène du régulon WalR semble significativement activé par l'ARN 6S, nous pouvons faire un parallèle avec le premier RNAseq. Les résultats du transcriptome WT/ $\Delta ssrS^{Sa}$ indiquent également que deux gènes sont activés en absence d'ARN 6S, *mupG* et *murQ* (FC = 1,52). Ces deux gènes en opéron régulés par MurR sont impliqués dans le recyclage du peptidoglycane. Chez *S. aureus*, MupG est une phosphomuramidase qui hydrolyse les disaccharides de peptidoglycane importés en acide N-acétylmuramique (MurNAc) 6-Phosphate et N-acétylglucosamine (GlcNAc). MurQ, présente chez de nombreuses bactéries, est une MurNAc 6-phosphate étherase qui hydrolyse le MurNAc 6-Phosphate en N-acétylglucosamine 6-Phosphate et D-lactate (Mayer et al., 2019). Contrairement à *SAOUHSC_02855*, *mupG* et *murQ* ne dépendent pas de Walk/R. Si l'on considère que Walk/R est partiellement régulé par l'ARN 6S, nos résultats suggèrent que l'augmentation de l'expression des gènes *mupG* et *murQ* chez le mutant $\Delta ssrS^{Sa}$ pourrait être un mécanisme compensateur du système Walk/R.

Encore une fois, les ARNrég dévoilent progressivement la complexité de leurs régulations. Nous avons identifié l'ARN 6S comme acteur protecteur face aux inhibiteurs de l'ARNpol et garant de la stabilité de l'holoenzyme ARNpol- σ^A chez *S. aureus*. Son rôle de régulateur global est remis en question chez *S. aureus* mais il pourrait intervenir dans des réponses plus spécifiques liées par exemple au métabolisme de la paroi. Nous avons également abordé le possible lien entre l'ARN 6S et l'utilisation des ressources carbonées via certains gènes du régulon CcpA. Ce phénomène lié au métabolisme central et à l'utilisation des sucres n'est pas nouveau parmi les ARNrég bactériens. Chez *V. tasmaniensis* LGP32, nous avons décrit un petit ARN, Vsr217, dont l'expression est dépendante du maltose, un sucre prédominant chez les huîtres (**chapitre 2**). Enfin, nous nous sommes concentrés sur les inhibiteurs de l'ARNpol et un glycopeptide mais l'ARN 6S pourrait jouer un rôle dans la sensibilité à d'autres familles d'antibiotiques.

Bibliographie

- AlHoufie, S.T.S., Foster, H.A., 2016. Effects of sub-lethal concentrations of mupirocin on global transcription in *Staphylococcus aureus* 8325-4 and a model for the escape from inhibition. *J. Med. Microbiol.* 65, 858–866. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000270>
- Andersson, D.I., Hughes, D., 2014. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 465–478. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3270>
- Andersson, D.I., Hughes, D., 2010. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 260–271. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2319>
- Ando, Y., Asari, S., Suzuma, S., Yamane, K., Nakamura, K., 2002. Expression of a small RNA, BS203 RNA, from the *yocI-yocJ* intergenic region of *Bacillus subtilis* genome. *FEMS Microbiol. Lett.* 207, 29–33. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11023.x>
- Appelbaum, P.C., 2007. Reduced glycopeptide susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Int. J. Antimicrob. Agents* 30, 398–408. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.07.011>
- Artsimovitch, I., Seddon, J., Sears, P., 2012. Fidaxomicin Is an Inhibitor of the Initiation of Bacterial RNA Synthesis. *Clin. Infect. Dis.* 55, S127–S131. <https://doi.org/10.1093/cid/cis358>
- Artsimovitch, I., Vassilyeva, M.N., Svetlov, D., Svetlov, V., Perederina, A., Igarashi, N., Matsugaki, N., Wakatsuki, S., Tahirov, T.H., Vassilyev, D.G., 2005. Allosteric Modulation of the RNA Polymerase Catalytic Reaction Is an Essential Component of Transcription Control by Rifamycins. *Cell* 122, 351–363. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.07.014>
- Babakhani, F., Seddon, J., Sears, P., 2014. Comparative microbiological studies of transcription inhibitors fidaxomicin and the rifamycins in *Clostridium difficile*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 2934–2937. <https://doi.org/10.1128/AAC.02572-13>
- Babitzke, P., Romeo, T., 2007. CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.03.007>
- Barber, M., 1961. Methicillin-resistant staphylococci. *J. Clin. Pathol.* 14, 385–393. <https://doi.org/10.1136/jcp.14.4.385>
- Barber, M., Rozwadowska-Dowzenko, M., 1948. Infection by penicillin-resistant staphylococci. *Lancet Lond. Engl.* 2, 641–644. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(48\)92166-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(48)92166-7)
- Barrick, J.E., 2005. 6S RNA is a widespread regulator of eubacterial RNA polymerase that resembles an open promoter. *RNA* 11, 774–784. <https://doi.org/10.1261/rna.7286705>
- Beckmann, B.M., Burenina, O.Y., Hoch, P.G., Kubareva, E.A., Sharma, C.M., Hartmann, R.K., 2011. In vivo and in vitro analysis of 6S RNA-templated short transcripts in *Bacillus subtilis*. *RNA Biol.* 8, 839–849. <https://doi.org/10.4161/rna.8.5.16151>
- Beckmann, B.M., Hoch, P.G., Marz, M., Willkomm, D.K., Salas, M., Hartmann, R.K., 2012. A pRNA-induced structural rearrangement triggers 6S-1 RNA release from RNA polymerase in *Bacillus subtilis*: pRNA length-dependent change in 6S-1 RNA structure. *EMBO J.* 31, 1727–1738. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.23>
- Belogurov, G.A., Artsimovitch, I., 2015. Regulation of Transcript Elongation. *Annu. Rev. Microbiol.* 69, 49–69. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104047>
- Bischoff, M., Dunman, P., Kormanec, J., Macapagal, D., Murphy, E., Mounts, W., Berger-Bächi, B., Projan, S., 2004. Microarray-Based Analysis of the *Staphylococcus aureus* σ^B Regulon. *J. Bacteriol.* 186, 4085–4099. <https://doi.org/10.1128/JB.186.13.4085-4099.2004>
- Blatter, E.E., Ross, W., Tang, H., Gourse, R.L., Ebright, R.H., 1994. Domain organization of RNA polymerase α subunit: C-terminal 85 amino acids constitute a domain capable of dimerization and DNA binding. *Cell* 78, 889–896. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(94\)90682-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(94)90682-3)
- Bohn, C., Rigoulay, C., Boulloc, 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., Boulloc, 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>
- Bouloc, P., Repoila, F., 2016. Fresh layers of RNA-mediated regulation in Gram-positive bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 30, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.12.008>
- 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>
- Brière, M., Boutoille, D., Caillon, J., Potel, G., Batard, E., 2014. Infections à staphylocoques : aspects physiopathologiques, bactériologiques et cliniques 10.
- Brodolin, K., Morichaud, Z., 2021. Region 4 of the RNA polymerase σ subunit counteracts pausing during initial transcription. *J. Biol. Chem.* 296, 100253. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.016299>
- Brownlee, G.G., 1971. Sequence of 6S RNA of *E. coli*. *Nature. New Biol.* 229, 147–149. <https://doi.org/10.1038/newbio229147a0>
- Bruna, C.D., Schioppacassi, G., Ungheri, D., Jabès, D., Morvillo, E., Sanfilippo, A., 1983. LM 427, a new spiropiperidylrifamycin: In vitro and in vivo studies. *J. Antibiot. (Tokyo)* 36, 1502–1506. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.36.1502>
- Burenina, O.Y., Hoch, P.G., Damm, K., Salas, M., Zatsepin, T.S., Lechner, M., Oretskaya, T.S., Kubareva, E.A., Hartmann, R.K., 2014. Mechanistic comparison of *Bacillus subtilis* 6S-1 and 6S-2 RNAs--commonalities and differences. *RNA* 20, 348–359. <https://doi.org/10.1261/rna.042077.113>
- Burgess, R.R., 2001. Sigma Factors, in: *Encyclopedia of Genetics*. Elsevier, pp. 1831–1834. <https://doi.org/10.1006/rwgn.2001.1192>
- Campbell, E.A., Korzheva, N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S., Goldfarb, A., Darst, S.A., 2001. Structural Mechanism for Rifampicin Inhibition of Bacterial RNA Polymerase. *Cell* 104, 901–912. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00286-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00286-0)
- Campbell, E.A., Muzzin, O., Chlenov, M., Sun, J.L., Olson, C.A., Weinman, O., Trester-Zedlitz, M.L., Darst, S.A., 2002. Structure of the bacterial RNA polymerase promoter specificity σ subunit. *Mol. Cell* 9, 527–539.
- Cavanagh, A.T., Chandrangu, P., Wassarman, K.M., 2010. 6S RNA regulation of *relA* alters ppGpp levels in early stationary phase. *Microbiology* 156, 3791–3800. <https://doi.org/10.1099/mic.0.043992-0>
- Cavanagh, A.T., Klocko, A.D., Liu, X., Wassarman, K.M., 2008. Promoter specificity for 6S RNA regulation of transcription is determined by core promoter sequences and competition for region 4.2 of σ^{70} . *Mol. Microbiol.* 67, 1242–1256. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06117.x>
- Cavanagh, A.T., Sperger, J.M., Wassarman, K.M., 2012. Regulation of 6S RNA by pRNA synthesis is required for efficient recovery from stationary phase in *E. coli* and *B. subtilis*. *Nucleic Acids Res.* 40, 2234–2246. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1003>
- Cavanagh, A.T., Wassarman, K.M., 2013. 6S-1 RNA Function Leads to a Delay in Sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 195, 2079–2086. <https://doi.org/10.1128/JB.00050-13>
- Chae, H., Han, K., Kim, K., Park, H., Lee, J., Lee, Y., 2011. Rho-dependent Termination of *ssrS* (6S RNA) Transcription in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 286, 114–122. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.150201>
- Chambers, H.F., DeLeo, F.R., 2009. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 629–641. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2200>
- Chen, H., Dutta, T., Deutscher, M.P., 2016. Growth Phase-dependent Variation of RNase BN/Z Affects Small RNAs. *J. Biol. Chem.* 291, 26435–26442. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.757450>
- Chen, H., Tang, H., Ebright, R.H., 2003. Functional interaction between RNA polymerase alpha subunit C-terminal domain and sigma70 in UP-element- and activator-dependent transcription. *Mol. Cell* 11, 1621–1633. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00201-6](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00201-6)
- Chen, J., Boyaci, H., Campbell, E.A., 2021. Diverse and unified mechanisms of transcription initiation in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 19, 95–109. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00450-2>

- Chen, J., Wassarman, K.M., Feng, S., Leon, K., Feklistov, A., Winkelman, J.T., Li, Z., Walz, T., Campbell, E.A., Darst, S.A., 2017. 6S RNA Mimics B-Form DNA to Regulate Escherichia coli RNA Polymerase. *Mol. Cell* 68, 388–397.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.09.006>
- Clarke, S.R., Foster, S.J., 2006. Surface adhesins of Staphylococcus aureus. *Adv. Microb. Physiol.* 51, 187–224. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(06\)51004-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(06)51004-5)
- Collier, J., Binet, E., Boulloc, P., 2002. Competition between SsrA tagging and translational termination at weak stop codons in Escherichia coli: SsrA tagging and translational termination. *Mol. Microbiol.* 45, 745–754. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03045.x>
- Collier, J., Bohn, C., Boulloc, P., 2004. SsrA Tagging of Escherichia coli SecM at Its Translation Arrest Sequence. *J. Biol. Chem.* 279, 54193–54201. <https://doi.org/10.1074/jbc.M314012200>
- Collins, J.A., Irnov, I., Baker, S., Winkler, W.C., 2007. Mechanism of mRNA destabilization by the glmS ribozyme. *Genes Dev.* 21, 3356–3368. <https://doi.org/10.1101/gad.1605307>
- Coronelli, C., White, R.J., Lancini, G.C., Parenti, F., 1975. Lipiarmycin, a new antibiotic from Actinoplanes. II. Isolation, chemical, biological and biochemical characterization. *J. Antibiot. (Tokyo)* 28, 253–259. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.28.253>
- Craboli, Y., Catherinot, E., Veziris, N., Jullien, V., Lortholary, O., 2016. Rifabutin: where do we stand in 2016? *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 1759–1771. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw024>
- Darst, S.A., 2001. Bacterial RNA polymerase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 155–162. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(00\)00185-8](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(00)00185-8)
- Davis, J.P., Chesney, P.J., Wand, P.J., LaVenture, M., the Investigation and Laboratory Team, 1980. Toxic-Shock Syndrome: Epidemiologic Features, Recurrence, Risk Factors, and Prevention. *N. Engl. J. Med.* 303, 1429–1435. <https://doi.org/10.1056/NEJM198012183032501>
- Davis, M.C., Kesthely, C.A., Franklin, E.A., MacLellan, S.R., 2017. The essential activities of the bacterial sigma factor. *Can. J. Microbiol.* 63, 89–99. <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0576>
- 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>
- Deora, R., Misra, T.K., 1996. Characterization of the Primary σ Factor of Staphylococcus aureus. *J. Biol. Chem.* 271, 21828–21834. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.36.21828>
- Deora, R., Tseng, T., Misra, T.K., 1997. Alternative transcription factor sigmaSB of Staphylococcus aureus: characterization and role in transcription of the global regulatory locus sar. *J. Bacteriol.* 179, 6355–6359. <https://doi.org/10.1128/jb.179.20.6355-6359.1997>
- 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>
- Dumitrescu, O., Dauwalder, O., Boisset, S., Reverdy, M.-É., Tristan, A., Vandenesch, F., 2010. Résistance aux antibiotiques chez Staphylococcus aureus: Les points-clés en 2010. *médecine/sciences* 26, 943–949. <https://doi.org/10.1051/medsci/20102611943>
- Ebright, R.H., 2000. RNA Polymerase: Structural Similarities Between Bacterial RNA Polymerase and Eukaryotic RNA Polymerase II. *J. Mol. Biol.* 304, 687–698. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4309>
- Epshtein, V., Dutta, D., Wade, J., Nudler, E., 2010. An allosteric mechanism of Rho-dependent transcription termination. *Nature* 463, 245–249. <https://doi.org/10.1038/nature08669>
- Fagerlund, A., Granum, P.E., Håvarstein, L.S., 2014. S. taphylococcus aureus competence genes: mapping of the SigH, ComK1 and ComK2 regulons by transcriptome sequencing: Mapping of staphylococcal competence regulons. *Mol. Microbiol.* 94, 557–579. <https://doi.org/10.1111/mmi.12767>
- Faucher, S.P., Friedlander, G., Livny, J., Margalit, H., Shuman, H.A., 2010. Legionella pneumophila 6S RNA optimizes intracellular multiplication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 7533–7538. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911764107>

- Feklistov, A., Mekler, V., Jiang, Q., Westblade, L.F., Irschik, H., Jansen, R., Mustaev, A., Darst, S.A., Ebright, R.H., 2008. Rifamycins do not function by allosteric modulation of binding of Mg²⁺ to the RNA polymerase active center. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 14820–14825. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802822105>
- Feklistov, A., Sharon, B.D., Darst, S.A., Gross, C.A., 2014. Bacterial Sigma Factors: A Historical, Structural, and Genomic Perspective. *Annu. Rev. Microbiol.* 68, 357–376. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155737>
- Figueroa-Bossi, N., Bossi, L., 2018. Sponges and Predators in the Small RNA World. *Microbiol. Spectr.* 6. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.RWR-0021-2018>
- Figueroa-Bossi, N., Valentini, M., Malleret, L., Bossi, L., 2009. Caught at its own game: regulatory small RNA inactivated by an inducible transcript mimicking its target. *Genes Dev.* 23, 2004–2015. <https://doi.org/10.1101/gad.541609>
- Floss, H.G., Yu, T.-W., 2005. Rifamycin Mode of Action, Resistance, and Biosynthesis. *Chem. Rev.* 105, 621–632. <https://doi.org/10.1021/cr030112j>
- Foster, T.J., 2017. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, 430–449. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux007>
- Geiger, T., Goerke, C., Fritz, M., Schäfer, T., Ohlsen, K., Liebeke, M., Lalk, M., Wolz, C., 2010. Role of the (p)ppGpp Synthase RSH, a RelA/SpoT Homolog, in Stringent Response and Virulence of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 78, 1873–1883. <https://doi.org/10.1128/IAI.01439-09>
- Geiger, T., Kästle, B., Gratani, F.L., Goerke, C., Wolz, C., 2014. Two Small (p)ppGpp Synthases in *Staphylococcus aureus* Mediate Tolerance against Cell Envelope Stress Conditions. *J. Bacteriol.* 196, 894–902. <https://doi.org/10.1128/JB.01201-13>
- Geißén, R., Steuten, B., Polen, T., Wagner, R., 2010. *E. coli* 6S RNA: A universal transcriptional regulator within the centre of growth adaptation. *RNA Biol.* 7, 564–568. <https://doi.org/10.4161/rna.7.5.12969>
- Geissmann, T., Chevalier, C., Cros, M.-J., Boisset, S., Fechter, P., Noirot, C., Schrenzel, J., François, P., Vandenesch, F., Gaspin, C., Rombly, 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>
- 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>
- Ghosh, T., Bose, D., Zhang, X., 2010. Mechanisms for activating bacterial RNA polymerase. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 611–627. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00239.x>
- Giachino, P., Engelmann, S., Bischoff, M., 2001. Sigma(B) activity depends on RsbU in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 183, 1843–1852. <https://doi.org/10.1128/JB.183.6.1843-1852.2001>
- Gildehaus, N., Neußer, T., Wurm, R., Wagner, R., 2007. Studies on the function of the riboregulator 6S RNA from *E. coli*: RNA polymerase binding, inhibition of in vitro transcription and synthesis of RNA-directed de novo transcripts. *Nucleic Acids Res.* 35, 1885–1896. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm085>
- Goldstein, B.P., 2014. Resistance to rifampicin: a review. *J. Antibiot. (Tokyo)* 67, 625–630. <https://doi.org/10.1038/ja.2014.107>
- Goldstein, J., Harewood, K., 1969. Another species of ribonucleic acid in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 39, 383–387. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(69\)90325-8](https://doi.org/10.1016/0022-2836(69)90325-8)
- Gourse, R.L., Ross, W., Gaal, T., 2000. UPs and downs in bacterial transcription initiation: the role of the alpha subunit of RNA polymerase in promoter recognition. *Mol. Microbiol.* 37, 687–695. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01972.x>
- Griesenbeck, J., Tschochner, H., Grohmann, D., 2017. Structure and Function of RNA Polymerases and the Transcription Machineries, in: Harris, J.R., Marles-Wright, J. (Eds.), *Macromolecular Protein Complexes, Subcellular Biochemistry*. Springer International Publishing, Cham, pp. 225–270. https://doi.org/10.1007/978-3-319-46503-6_9

- Gruber, T.M., Gross, C.A., 2003. Multiple Sigma Subunits and the Partitioning of Bacterial Transcription Space. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 441–466. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090913>
- Guérillot, R., Gonçalves da Silva, A., Monk, I., Giulieri, S., Tomita, T., Alison, E., Porter, J., Pidot, S., Gao, W., Peleg, A.Y., Seemann, T., Stinear, T.P., Howden, B.P., 2018. Convergent Evolution Driven by Rifampin Exacerbates the Global Burden of Drug-Resistant *Staphylococcus aureus*. *mSphere* 3, e00550-17. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00550-17>
- Hao, Z., Epshtein, V., Kim, K.H., Proshkin, S., Svetlov, V., Kamarthapu, V., Bharati, B., Mironov, A., Walz, T., Nudler, E., 2021. Pre-termination Transcription Complex: Structure and Function. *Mol. Cell* 81, 281–292.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.11.013>
- Hauryliuk, V., Atkinson, G.C., Murakami, K.S., Tenson, T., Gerdes, K., 2015. Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 298–309. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3448>
- Helmann, J.D., 2002. The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv. Microb. Physiol.* 46, 47–110. [https://doi.org/10.1016/s0065-2911\(02\)46002-x](https://doi.org/10.1016/s0065-2911(02)46002-x)
- Herman, C., Thévenet, D., Boulloc, P., Walker, G.C., D'Ari, R., 1998. Degradation of carboxy-terminal-tagged cytoplasmic proteins by the *Escherichia coli* protease HflB (FtsH). *Genes Dev.* 12, 1348–1355. <https://doi.org/10.1101/gad.12.9.1348>
- Herold, B.C., 1998. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Children With No Identified Predisposing Risk. *JAMA* 279, 593. <https://doi.org/10.1001/jama.279.8.593>
- Hershberg, R., 2017. Antibiotic-Independent Adaptive Effects of Antibiotic Resistance Mutations. *Trends Genet.* 33, 521–528. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.05.003>
- Hindley, J., 1967. Fractionation of ³²P-labelled ribonucleic acids on polyacrylamide gels and their characterization by fingerprinting. *J. Mol. Biol.* 30, 125–136. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(67\)90248-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(67)90248-3)
- Hoch, P.G., Burenina, O.Y., Weber, M.H.W., Elkina, D.A., Nesterchuk, M.V., Sergiev, P.V., Hartmann, R.K., Kubareva, E.A., 2015. Phenotypic characterization and complementation analysis of *Bacillus subtilis* 6S RNA single and double deletion mutants. *Biochimie* 117, 87–99. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.12.019>
- Hoch, P.G., Schlereth, J., Lechner, M., Hartmann, R.K., 2016. *Bacillus subtilis* 6S-2 RNA serves as a template for short transcripts in vivo. *RNA* 22, 614–622. <https://doi.org/10.1261/rna.055616.115>
- Hör, J., Garriss, G., Di Giorgio, S., Hack, L., Vanselow, J.T., Förstner, K.U., Schlosser, A., Henriques-Normark, B., Vogel, J., 2020. Grad-seq in a Gram-positive bacterium reveals exonucleolytic sRNA activation in competence control. *EMBO J.* 39. <https://doi.org/10.15252/embj.2019103852>
- Howden, B.P., Davies, J.K., Johnson, P.D.R., Stinear, T.P., Grayson, M.L., 2010. Reduced Vancomycin Susceptibility in *Staphylococcus aureus*, Including Vancomycin-Intermediate and Heterogeneous Vancomycin-Intermediate Strains: Resistance Mechanisms, Laboratory Detection, and Clinical Implications. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 99–139. <https://doi.org/10.1128/CMR.00042-09>
- Howden, B.P., McEvoy, C.R.E., Allen, D.L., Chua, K., Gao, W., Harrison, P.F., Bell, J., Coombs, G., Bennett-Wood, V., Porter, J.L., Robins-Browne, R., Davies, J.K., Seemann, T., Stinear, T.P., 2011. Evolution of Multidrug Resistance during *Staphylococcus aureus* Infection Involves Mutation of the Essential Two Component Regulator WalkR. *PLoS Pathog.* 7, e1002359. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002359>
- Hsu, L.M., Zagorski, J., Wang, Z., Fournier, M.J., 1985. *Escherichia coli* 6S RNA gene is part of a dual-function transcription unit. *J. Bacteriol.* 161, 1162–1170. <https://doi.org/10.1128/jb.161.3.1162-1170.1985>
- Ishihama, A., 2000. Functional Modulation of *Escherichia Coli* RNA Polymerase. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 499–518. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.499>

- Ito, T., Okuma, K., Ma, X.X., Yuzawa, H., Hiramatsu, K., 2003. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist. Updat.* 6, 41–52. [https://doi.org/10.1016/S1368-7646\(03\)00003-7](https://doi.org/10.1016/S1368-7646(03)00003-7)
- Janssen, B.D., Hayes, C.S., 2012. The tmRNA ribosome-rescue system, in: *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. Elsevier, pp. 151–191. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386497-0.00005-0>
- Janzon, L., Löfdahl, S., Arvidson, S., 1989. Identification and nucleotide sequence of the delta-lysin gene, hld, adjacent to the accessory gene regulator (agr) of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Gen. Genet.* 219, 480–485. <https://doi.org/10.1007/BF00259623>
- Jevons, M.P., 1961. “Celbenin” - resistant *Staphylococci*. *BMJ* 1, 124–125. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.5219.124-a>
- Johansson, J., Mandin, P., Renzoni, A., Chiaruttini, C., Springer, M., Cossart, P., 2002. An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell* 110, 551–561.
- Johnson, P.J.T., Levin, B.R., 2013. Pharmacodynamics, population dynamics, and the evolution of persistence in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Genet.* 9, e1003123. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003123>
- Keiler, K.C., Waller, P.R., Sauer, R.T., 1996. Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. *Science* 271, 990–993. <https://doi.org/10.1126/science.271.5251.990>
- Keller, A.N., Yang, X., Wiedermannova, J., Delumeau, O., Krasny, L., Lewis, P.J., 2014. ϵ , a New Subunit of RNA Polymerase Found in Gram-Positive Bacteria. *J. Bacteriol.* 196, 3622–3632. <https://doi.org/10.1128/JB.02020-14>
- Kim, E.Y., Shin, M.-S., Rhee, J.H., Choy, H.E., 2004. Factors influencing preferential utilization of RNA polymerase containing sigma-38 in stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Seoul Korea* 42, 103–110.
- Kim, K.-s., Lee, Y., 2004. Regulation of 6S RNA biogenesis by switching utilization of both sigma factors and endoribonucleases. *Nucleic Acids Res.* 32, 6057–6068. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh939>
- Kirby, W.M., 1944. EXTRACTION OF A HIGHLY POTENT PENICILLIN INACTIVATOR FROM PENICILLIN RESISTANT STAPHYLOCOCCI. *Science* 99, 452–453. <https://doi.org/10.1126/science.99.2579.452>
- Klocko, A.D., Wassarman, K.M., 2009. 6S RNA binding to $E\sigma^{70}$ requires a positively charged surface of σ^{70} region 4.2. *Mol. Microbiol.* 73, 152–164. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06758.x>
- Kreuzer, K.D., Henkin, T.M., 2018. The T-Box Riboswitch: tRNA as an Effector to Modulate Gene Regulation. *Microbiol. Spectr.* 6. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.RWR-0028-2018>
- Kullik, I., Giachino, P., Fuchs, T., 1998. Deletion of the Alternative Sigma Factor ζ^B in *Staphylococcus aureus* Reveals Its Function as a Global Regulator of Virulence Genes. *J. Bacteriol.* 180, 4814–4820. <https://doi.org/10.1128/JB.180.18.4814-4820.1998>
- Kurkela, J., Fredman, J., Salminen, T.A., Tyystjärvi, T., 2021. Revealing secrets of the enigmatic omega subunit of bacterial RNA polymerase. *Mol. Microbiol.* 115, 1–11. <https://doi.org/10.1111/mmi.14603>
- Kuroda, M., Sekizuka, T., Matsui, H., Ohsuga, J., Ohshima, T., Hanaki, H., 2019. IS256-Mediated Overexpression of the WalkR Two-Component System Regulon Contributes to Reduced Vancomycin Susceptibility in a *Staphylococcus aureus* Clinical Isolate. *Front. Microbiol.* 10, 1882. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01882>
- Lal, A., Krishna, S., Seshasayee, A.S.N., 2018. Regulation of Global Transcription in *Escherichia coli* by Rsd and 6S RNA. *G3 GenesGenomesGenetics* 8, 2079–2089. <https://doi.org/10.1534/g3.118.200265>

- Lalaouna, D., Carrier, M.-C., Semsey, S., Brouard, J.-S., Wang, J., Wade, J.T., Massé, E., 2015. A 3' External Transcribed Spacer in a tRNA Transcript Acts as a Sponge for Small RNAs to Prevent Transcriptional Noise. *Mol. Cell* 58, 393–405. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.03.013>
- Leach, K.L., Swaney, S.M., Colca, J.R., McDonald, W.G., Blinn, J.R., Thomasco, L.M., Gadwood, R.C., Shinabarger, D., Xiong, L., Mankin, A.S., 2007. The Site of Action of Oxazolidinone Antibiotics in Living Bacteria and in Human Mitochondria. *Mol. Cell* 26, 393–402. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.04.005>
- Lee, C.A., Fournier, M.J., Beckwith, J., 1985. *Escherichia coli* 6S RNA is not essential for growth or protein secretion. *J. Bacteriol.* 161, 1156–1161. <https://doi.org/10.1128/jb.161.3.1156-1161.1985>
- Lee, J., Borukhov, S., 2016. Bacterial RNA Polymerase-DNA Interaction—The Driving Force of Gene Expression and the Target for Drug Action. *Front. Mol. Biosci.* 3. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2016.00073>
- Lee, J.Y., Park, H., Bak, G., Kim, K., Lee, Y., 2013. Regulation of transcription from two *ssrS* promoters in 6S RNA biogenesis. *Mol. Cells* 36, 227–234. <https://doi.org/10.1007/s10059-013-0082-1>
- Lee, S.Y., Bailey, S.C., Apirion, D., 1978. Small Stable RNAs from *Escherichia coli*: Evidence for the Existence of New Molecules and for a New Ribonucleoprotein Particle Containing 6S RNA. *J. Bacteriol.* 133, 1015–1023. <https://doi.org/10.1128/jb.133.2.1015-1023.1978>
- Lensmire, J.M., Dodson, J.P., Hsueh, B.Y., Wischer, M.R., Delekta, P.C., Shook, J.C., Ottosen, E.N., Kies, P.J., Ravi, J., Hammer, N.D., 2020. The *Staphylococcus aureus* Cystine Transporters TcyABC and TcyP Facilitate Nutrient Sulfur Acquisition during Infection. *Infect. Immun.* 88. <https://doi.org/10.1128/IAI.00690-19>
- Levine, D.P., 2006. Vancomycin: A History. *Clin. Infect. Dis.* 42, S5–S12. <https://doi.org/10.1086/491709>
- Levin-Reisman, I., Ronin, I., Gefen, O., Braniss, I., Shores, N., Balaban, N.Q., 2017. Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. *Science* 355, 826–830. <https://doi.org/10.1126/science.aaj2191>
- Lin, W., Das, K., Degen, D., Mazumder, A., Duchi, D., Wang, D., Ebright, Y.W., Ebright, R.Y., Sineva, E., Gigliotti, M., Srivastava, A., Mandal, S., Jiang, Y., Liu, Y., Yin, R., Zhang, Z., Eng, E.T., Thomas, D., Donadio, S., Zhang, H., Zhang, C., Kapanidis, A.N., Ebright, R.H., 2018. Structural Basis of Transcription Inhibition by Fidaxomicin (Liparmycin A3). *Mol. Cell* 70, 60–71.e15. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.02.026>
- Lioliou, E., Sharma, C.M., Caldelari, I., Helfer, A.-C., Fechter, P., Vandenesch, F., Vogel, J., Romby, P., 2012. Global Regulatory Functions of the *Staphylococcus aureus* Endoribonuclease III in Gene Expression. *PLoS Genet.* 8, e1002782. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002782>
- 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>
- Long, K.S., Poehlsgaard, J., Kehrenberg, C., Schwarz, S., Vester, B., 2006. The Cfr rRNA Methyltransferase Confers Resistance to Phenicol, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutilins, and Streptogramin A Antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 2500–2505. <https://doi.org/10.1128/AAC.00131-06>
- Lorian, V., 1975. Some effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on bacteria. *Bull. N. Y. Acad. Med.* 51, 1046–1055.
- Lowy, F.D., 1998. *Staphylococcus aureus* Infections. *N. Engl. J. Med.* 339, 520–532. <https://doi.org/10.1056/NEJM199808203390806>
- Mäder, U., Nicolas, P., Depke, M., Pané-Farré, J., Debarbouille, M., van der Kooi-Pol, M.M., Guérin, C., Dérozier, S., Hiron, A., Jarmer, H., Leduc, A., Michalik, S., Reilman, E., Schaffer, M., Schmidt, F., Bessières, P., Noirot, P., Hecker, M., Msadek, T., Völker, U., van Dijk, J.M., 2016. *Staphylococcus aureus* Transcriptome Architecture: From Laboratory to Infection-Mimicking Conditions. *PLoS Genet.* 12, e1005962. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005962>

- Matsuo, M., Cui, L., Kim, J., Hiramatsu, K., 2013. Comprehensive Identification of Mutations Responsible for Heterogeneous Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* (hVISA)-to-VISA Conversion in Laboratory-Generated VISA Strains Derived from hVISA Clinical Strain Mu3. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 5843–5853. <https://doi.org/10.1128/AAC.00425-13>
- Mayer, C., Kluj, R.M., Mühleck, M., Walter, A., Unsleber, S., Hottmann, I., Borisova, M., 2019. Bacteria's different ways to recycle their own cell wall. *Int. J. Med. Microbiol.* 309, 151326. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2019.06.006>
- McClure, W.R., Cech, C.L., 1978. On the mechanism of rifampicin inhibition of RNA synthesis. *J. Biol. Chem.* 253, 8949–8956.
- McGuinness, W.A., Malachowa, N., DeLeo, F.R., 2017. Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Yale J. Biol. Med.* 90, 269–281.
- Miller, H.K., Carroll, R.K., Burda, W.N., Krute, C.N., Davenport, J.E., Shaw, L.N., 2012. The Extracytoplasmic Function Sigma Factor σ^S Protects against both Intracellular and Extracytoplasmic Stresses in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 194, 4342–4354. <https://doi.org/10.1128/JB.00484-12>
- Miller, W.R., Bayer, A.S., Arias, C.A., 2016. Mechanism of Action and Resistance to Daptomycin in *Staphylococcus aureus* and Enterococci. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6, a026997. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026997>
- Mironov, A.S., Gusarov, I., Rafikov, R., Lopez, L.E., Shatalin, K., Kreneva, R.A., Perumov, D.A., Nudler, E., 2002. Sensing Small Molecules by Nascent RNA. *Cell* 111, 747–756. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01134-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01134-0)
- Mitchell, G., Brouillette, E., Séguin, D.L., Asselin, A.-E., Jacob, C.L., Malouin, F., 2010. A role for sigma factor B in the emergence of *Staphylococcus aureus* small-colony variants and elevated biofilm production resulting from an exposure to aminoglycosides. *Microb. Pathog.* 48, 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2009.10.003>
- Miyazaki, E., Chen, J.-M., Ko, C., Bishai, W.R., 1999. The *Staphylococcus aureus* *rsbW* (*orf159*) Gene Encodes an Anti-Sigma Factor of SigB. *J. Bacteriol.* 181, 2846–2851. <https://doi.org/10.1128/JB.181.9.2846-2851.1999>
- Mondal, R., Ganguly, T., Chanda, P.K., Bandhu, A., Jana, B., Sau, K., Lee, C.Y., Sau, S., 2010. Stabilization of the primary sigma factor of *Staphylococcus aureus* by core RNA polymerase. *BMB Rep.* 43, 176–181. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2010.43.3.176>
- 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: Staphylococcal new sigma factor. *Genes Cells* 8, 699–712. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2003.00668.x>
- Morikawa, K., Takemura, A.J., Inose, Y., Tsai, M., Nguyen Thi, L.T., Ohta, T., Msadek, T., 2012. Expression of a Cryptic Secondary Sigma Factor Gene Unveils Natural Competence for DNA Transformation in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog.* 8, e1003003. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003003>
- Mosaei, H., Harbottle, J., 2019. Mechanisms of antibiotics inhibiting bacterial RNA polymerase. *Biochem. Soc. Trans.* 47, 339–350. <https://doi.org/10.1042/BST20180499>
- Murakami, K., 2015. Structural Biology of Bacterial RNA Polymerase. *Biomolecules* 5, 848–864. <https://doi.org/10.3390/biom5020848>
- Murakami, K.S., Darst, S.A., 2003. Bacterial RNA polymerases: the whole story. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13, 31–39. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(02\)00005-2](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(02)00005-2)
- Mustaev, A., Roberts, J., Gottesman, M., 2017. Transcription elongation. *Transcription* 8, 150–161. <https://doi.org/10.1080/21541264.2017.1289294>
- Nahvi, A., Sudarsan, N., Ebert, M.S., Zou, X., Brown, K.L., Breaker, R.R., 2002. Genetic Control by a Metabolite Binding mRNA. *Chem. Biol.* 9, 1043–1049. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(02\)00224-7](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(02)00224-7)

- Neußer, T., Gildehaus, N., Wurm, R., Wagner, R., 2008. Studies on the expression of 6S RNA from *E. coli*: involvement of regulators important for stress and growth adaptation. *Biol. Chem.* 389, 285–297. <https://doi.org/10.1515/BC.2008.023>
- Neusser, T., Polen, T., Geissen, R., Wagner, R., 2010. Depletion of the non-coding regulatory 6S RNA in *E. coli* causes a surprising reduction in the expression of the translation machinery. *BMC Genomics* 11, 165. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-165>
- Nguyen, A.N., Disconzi, E., Charrière, G.M., Destoumieux-Garzón, D., Bouloc, P., Le Roux, F., Jacq, A., 2018. *csrB* Gene Duplication Drives the Evolution of Redundant Regulatory Pathways Controlling Expression of the Major Toxic Secreted Metalloproteases in *Vibrio tasmaniensis* LGP32. *mSphere* 3. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00582-18>
- Novick, R.P., Ross, H.F., Projan, S.J., Kornblum, J., Kreiswirth, B., Moghazeh, S., 1993. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J.* 12, 3967–3975. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb06074.x>
- Nudler, E., 2009. RNA Polymerase Active Center: The Molecular Engine of Transcription. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 335–361. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.052705.164655>
- Ogston, A., 1882. Micrococcus Poisoning. *J. Anat. Physiol.* 16, 526–567.
- Ogston, A., 1881. Report upon Micro-Organisms in Surgical Diseases. *BMJ* 1, 369–375. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.1054.369>
- Omura, S., Imamura, N., Oiwa, R., Kuga, H., Iwata, R., Masuma, R., Iwai, Y., 1986. Clostomicins, new antibiotics produced by *Micromonospora echinospora* subsp. *armeniaca* subsp. nov. I Production, isolation, and physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot. (Tokyo)* 39, 1407–1412. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.39.1407>
- Osterholm, M.T., Forfang, J.C., 1982. Toxic-Shock Syndrome in Minnesota: Results of an Active-Passive Surveillance System. *J. Infect. Dis.* 145, 458–464. <https://doi.org/10.1093/infdis/145.4.458>
- Overgaard, M., Johansen, J., Møller-Jensen, J., Valentin-Hansen, P., 2009. Switching off small RNA regulation with trap-mRNA. *Mol. Microbiol.* 73, 790–800. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06807.x>
- Palma, M., Cheung, A.L., 2001. sigma(B) activity in *Staphylococcus aureus* is controlled by RsbU and an additional factor(s) during bacterial growth. *Infect. Immun.* 69, 7858–7865. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.12.7858-7865.2001>
- Panchapakesan, S.S.S., Unrau, P.J., 2012. *E. coli* 6S RNA release from RNA polymerase requires 70 ejection by scrunching and is orchestrated by a conserved RNA hairpin. *RNA* 18, 2251–2259. <https://doi.org/10.1261/rna.034785.112>
- 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>
- Panek, J., Krasny, L., Bobek, J., Jezkova, E., Korelusova, J., Vohradsky, J., 2011. The suboptimal structures find the optimal RNAs: homology search for bacterial non-coding RNAs using suboptimal RNA structures. *Nucleic Acids Res.* 39, 3418–3426. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1186>
- Parenti, F., Pagani, H., Beretta, G., 1975. Lipiarmycin, a new antibiotic from *Actinoplanes*. I. Description of the producer strain and fermentation studies. *J. Antibiot. (Tokyo)* 28, 247–252. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.28.247>
- Peacock, S.J., Paterson, G.K., 2015. Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu. Rev. Biochem.* 84, 577–601. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034516>
- Peterson, S.B., Irie, Y., Borlee, B.R., Murakami, K., Harrison, J.J., Colvin, K.M., Parsek, M.R., 2011. Different Methods for Culturing Biofilms In Vitro, in: Bjarnsholt, T., Jensen, P.Ø., Moser, C., Høiby, N. (Eds.), *Biofilm Infections*. Springer New York, New York, NY, pp. 251–266. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6084-9_15
- Pichon, C., Felden, B., 2005. From The Cover: 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>

- Pilly, E., Chirouze, C., Épaulard, O., Le Berre, R., Collège des universitaires de maladies infectieuses et tropicales (France), 2019. Maladies infectieuses et tropicales.
- Plumbridge, J., Bossi, L., Oberto, J., Wade, J.T., Figueroa-Bossi, N., 2014. Interplay of transcriptional and small RNA-dependent control mechanisms regulates chitosugar uptake in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Coregulation of a sugar porin and PTS transporter. *Mol. Microbiol.* 92, 648–658. <https://doi.org/10.1111/mmi.12573>
- Pourciau, C., Lai, Y.-J., Gorelik, M., Babitzke, P., Romeo, T., 2020. Diverse Mechanisms and Circuitry for Global Regulation by the RNA-Binding Protein CsrA. *Front. Microbiol.* 11, 601352. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.601352>
- Qin, Z., Huang, S., Yu, Y., Deng, H., 2013. Dithiopyrrolone Natural Products: Isolation, Synthesis and Biosynthesis. *Mar. Drugs* 11, 3970–3997. <https://doi.org/10.3390/md11103970>
- Raina, M., King, A., Bianco, C., Vanderpool, C.K., 2018. Dual-Function RNAs. *Microbiol. Spectr.* 6. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.RWR-0032-2018>
- Ray-Soni, A., Bellecourt, M.J., Landick, R., 2016. Mechanisms of Bacterial Transcription Termination: All Good Things Must End. *Annu. Rev. Biochem.* 85, 319–347. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014844>
- Reiß, S., Pané-Farré, J., Fuchs, S., François, 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. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 787–804. <https://doi.org/10.1128/AAC.05363-11>
- 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., Boulloc, 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>
- Rosenbach, A.J.F., 1884. Mikro-organismen bei den Wund-infections-krankheiten des Menschen. JF Bergmann.
- Ross, W., Schneider, D.A., Paul, B.J., Mertens, A., Gourse, R.L., 2003. An intersubunit contact stimulating transcription initiation by *E. coli* RNA polymerase: interaction of the alpha C-terminal domain and sigma region 4. *Genes Dev.* 17, 1293–1307. <https://doi.org/10.1101/gad.1079403>
- Ruiz de los Mozos, I., Vergara-Irigaray, M., Segura, V., Villanueva, M., Bitarte, N., Saramago, M., Domingues, S., Arraiano, C.M., Fechter, P., Romby, P., Valle, J., Solano, C., Lasa, I., Toledo-Arana, A., 2013. Base Pairing Interaction between 5'- and 3'-UTRs Controls *icaR* mRNA Translation in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Genet.* 9, e1004001. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004001>
- Said, N., Hilal, T., Sunday, N.D., Khatr, A., Bürger, J., Mielke, T., Belogurov, G.A., Loll, B., Sen, R., Artsimovitch, I., Wahl, M.C., 2021. Steps toward translocation-independent RNA polymerase inactivation by terminator ATPase p. *Science* 371, eabd1673. <https://doi.org/10.1126/science.abd1673>
- Sanfilippo, A., Bruna, C.D., Marsili, L., Morvillo, E., Pasqualucci, C.R., Schioppacassi, G., Ungheri, D., 1980. Biological activity of a new class of rifamycins Spiro-piperidyl-rifamycins. *J. Antibiot. (Tokyo)* 33, 1193–1198. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.33.1193>
- See, R.H., Kum, W.W., Chang, A.H., Goh, S.H., Chow, A.W., 1992. Induction of tumor necrosis factor and interleukin-1 by purified staphylococcal toxic shock syndrome toxin 1 requires the presence of both monocytes and T lymphocytes. *Infect. Immun.* 60, 2612–2618. <https://doi.org/10.1128/iai.60.7.2612-2618.1992>
- Sensi, P., Margalith, P., Timbal, M.T., 1959. Rifomycin, a new antibiotic; preliminary report. *Il Farm. Ed. Sci.* 14, 146–147.
- Serganov, A., Nudler, E., 2013. A Decade of Riboswitches. *Cell* 152, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.024>
- Shands, K.N., Schmid, G.P., Dan, B.B., Blum, D., Guidotti, R.J., Hargrett, N.T., Anderson, R.L., Hill, D.L., Broome, C.V., Band, J.D., Fraser, D.W., 1980. Toxic-Shock Syndrome in Menstruating Women:

- Association with Tampon Use and *Staphylococcus aureus* and Clinical Features in 52 Cases. N. Engl. J. Med. 303, 1436–1442. <https://doi.org/10.1056/NEJM198012183032502>
- Shaw, L.N., Lindholm, C., 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. PLoS ONE 3, e3844. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003844>
- Singh, V.K., Schmidt, J.L., Jayaswal, R.K., Wilkinson, B.J., 2003. Impact of sigB mutation on *Staphylococcus aureus* oxacillin and vancomycin resistance varies with parental background and method of assessment. Int. J. Antimicrob. Agents 21, 256–261. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(02\)00359-X](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(02)00359-X)
- Sippel, A., Hartmann, G., 1968. Mode of action of rifamycin on the RNA polymerase reaction. Biochim. Biophys. Acta BBA - Nucleic Acids Protein Synth. 157, 218–219. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(68\)90286-4](https://doi.org/10.1016/0005-2787(68)90286-4)
- Soutourina, O., Dubrac, S., Poupel, O., Msadek, T., Martin-Verstraete, I., 2010. The Pleiotropic CymR Regulator of *Staphylococcus aureus* Plays an Important Role in Virulence and Stress Response. PLoS Pathog. 6, e1000894. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000894>
- Soutourina, O., Poupel, O., Coppée, J.-Y., Danchin, A., Msadek, T., Martin-Verstraete, I., 2009. CymR, the master regulator of cysteine metabolism in *Staphylococcus aureus*, controls host sulphur source utilization and plays a role in biofilm formation. Mol. Microbiol. 73, 194–211. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06760.x>
- Steuten, B., Setny, P., Zacharias, M., Wagner, R., 2013. Mapping the Spatial Neighborhood of the Regulatory 6S RNA Bound to Escherichia coli RNA Polymerase Holoenzyme. J. Mol. Biol. 425, 3649–3661. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.07.008>
- Steuten, B., Wagner, R., 2012. A conformational switch is responsible for the reversal of the 6S RNA-dependent RNA polymerase inhibition in Escherichia coli. Biol. Chem. 393, 1513–1522. <https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0237>
- Suzuma, S., Asari, S., Bunai, K., Yoshino, K., Ando, Y., Kakeshita, H., Fujita, M., Nakamura, K., Yamane, K., 2002. Identification and characterization of novel small RNAs in the aspS–yrvM intergenic region of the Bacillus subtilis genome. Microbiology 148, 2591–2598. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-8-2591>
- Talpaert, M., Campagnari, F., Clerici, L., 1975. Lipiarmycin: An antibiotic inhibiting nucleic acid polymerases. Biochem. Biophys. Res. Commun. 63, 328–334. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(75\)80047-7](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(75)80047-7)
- 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>
- Ter Kuile, B.H., Kraupner, N., Brul, S., 2016. The risk of low concentrations of antibiotics in agriculture for resistance in human health care. FEMS Microbiol. Lett. 363, fnw210. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw210>
- Theriault, R.J., Karwowski, J.P., Jackson, M., Girolami, R.L., Sunga, G.N., Vojtko, C.M., Coen, L.J., 1987. Tiacumicins, a novel complex of 18-membered macrolide antibiotics. I. Taxonomy, fermentation and antibacterial activity. J. Antibiot. (Tokyo) 40, 567–574. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.40.567>
- Thüring, M., Ganapathy, S., Schlüter, M.A.C., Lechner, M., Hartmann, R.K., 2021. 6S-2 RNA deletion in the undomesticated *B. subtilis* strain NCIB 3610 causes a biofilm derepression phenotype. RNA Biol. 18, 79–92. <https://doi.org/10.1080/15476286.2020.1795408>
- Thwaites, G.E., Scarborough, M., Szubert, Alexander, Nsutebu, E., Tilley, R., Greig, J., Wyllie, S.A., Wilson, P., Auckland, C., Cairns, J., Ward, D., Lal, P., Guleri, A., Jenkins, N., Sutton, J., Wiselka, M., Armando, G.-R., Graham, C., Chadwick, P.R., Barlow, G., Gordon, N. Claire, Young, B., Meisner, S., McWhinney, P., Price, David A, Harvey, D., Nayar, D., Jeyaratnam, D., Planche, T., Minton, J., Hudson, F., Hopkins, S., Williams, John, Török, M Estee, Llewelyn, M.J., Edgeworth, J.D., Walker, A Sarah, Scarborough, M., Kamfose, M., de Veciana, A., Gordon, Nicola Claire,

Peto, L., Pill, G., Clarke, T., Watson, L., Young, B., Griffiths, D., Vaughn, A., Anson, L., Liu, E., Perera, S., Rylance-Knight, L., Cantell, C., Moroney, R., Edgeworth, J.D., Thwaites, G., Bisnauthsing, K., Querol-Rubiera, A., Gibbs, C., Patel, A., Hemsley, C., Goodman, A.L., Wyncoll, D., Biswas, J., Fitzpatrick, J., Roberts, L., Millard, J., Stone, N., Cape, A., Hurley, L., Tam, C.K., Nsutebu, E., Hoyle, M.-C., Maitland, K., Trainor, L., Reynolds, H., Harrison, J., Anson, J., Lewis, J., Folb, J., Goodwin, L., Beeching, N., Dyas, S., Winslow, H., Foote, E., Roberts, P., Natarajan, P., Chrdle, A., Fenech, M., Allsop, H., Tilley, R., Austin-Hutchison, R., Barrett, L., Brookes, K., Carwithen, L., Conbeer, A., Cunningham, R., Eglinton, C., Fok, R., Gott, H., Hughes, S., Jones, L., Kalita, M., King, A., March, L., Marner, M., Mynes, T., Plant, A., Price, S., Sercombe, J., Stolton, A., Wallis, M., West, M.-C., Westcott, J., Williams, C., Wosley, R., Yabsley, L., Greig, J., Butland, L., Sorrell, J., Mitchell, T., Alli, A., Meiring, J., Masake, B., Rowson, C., Smart, L., Makey, L., Moll, S., Cunningham, J., Ryalls, K., Birchall, K., Middle, J., Jackson, Y., Swift, D., Cole, J., Subramanian, B., Okhuoya, F., Edwards, M., Bailey, C., Warren, R., Islam, G., Ankorn, M., Birchall, S., Jones, P., Humphries, J., Booth, S., Evan, C., Wyllie, S., Flatt, A., Strakova, L., Hayes, M., Valentine, S., James, C., Wands, M., Cortes, N., Khan, N., Porter, Robert, Martin, Z., Yip, K., Preedy, H., Chesterfield, H., Dobson, T., Walker, C., Llewelyn, M., Dunne, A., Latter, L., Porges, A., Price, J., Paul, J., Behar, L., Robinson, L., Murray, A., Fitzpatrick, J., Sargent, T., Ridley, C., de Gordo, L.O.-R., Gilliam, D., McPherson, C., Matthews, S., Foreman, E., Jarghese, R., Beddoe, A., Martin, S., Shaw, S., Wlazly, D., Cole, M., Gihawi, A., Cole, K., Török, M Estée, Gouliouris, T., Bedford, L., Saunderson, R.B., Mariolis, I., Bousfield, R., Ramsay, I., Greaves, D., Aliyu, S., Cox, K., Mlemba, L., Whitehead, L., Vyse, N., Bolton, M., Williams, John, Lambert, P., Chadwick, D., Baillie, K., Cain, M., Bellamy, R., Wong, J., Thompson, J., Vassallo, H., Skotnicka, A., Boyce, A., Donnelly, A., Wilson, P., FitzGerald, G., Dean, V., Warnes, K., Reyes, A., Rahman, S., Tsang, L., Williams, Joanne, Morris-Jones, S., Hopkins, S., Witness, E., Brady, O., Woodford, E., Pettifer, T., McCadden, A., Marks, B., Collier, S., Mack, D., Warren, S., Brown, C., Lyons, A., Taiyari, S., Mephram, S., Sweeney, A., Brown, L.-A., Auckland, C., Potter, Alison, Mandiza, J., Hough, M., Williams, S., Renton, C., Walters, F., Nadolski, M., Evans, A., Tarrant, P., Curley, K., Whiteley, S., Halpin, J., Hutchings, M., Todd, S., Lohan, C., Chapter, T., Folland, E., Colville, A., Marden, K., Morgan, M., Fok, R., Porter, Rob, Baxter, M., Minton, J., Rippon, S., Cevik, M., Chapman, J., Kemp, T., Vincent, R., Osborne, D., Platt, T., Calderwood, J., Cook, B., Bedford, C., Galloway-Browne, L., Abberley, N., Attack, K., Allen, J., Lal, P., Harrison, M., Stevenson, S., Brooks, C., Harlow, P., Ewing, J., Cooper, S., Balancio-Tolentino, R., O'Neil, L., Tagney, R., Shackcloth, D., Planche, T., Fellows, J., Millett, R., Studham, J., de Souza, C., Howell, G., Greaves, H., Foncel, E., Kurup, R., Briggs, J., Smith, M., Suarez, C., Sorrentino, G., Scobie, A., Houston, A., Ahmad, F., Breathnach, A., Chahuan, R., Wilkins, K., Guleri, A., Waddington, N., Sharma, R., Flegg, P., Kollipara, V., Alam, M., Potter, Andrew, Donaldson, S., Armer, C., Frudd, J., Jeyaratnam, D., Joy, M., Mathews, A., Glass, S.K., Ajayi, A., Fife, A., Qaiser, S., Sheehan, S., Muñoz-Villaverde, S., Yogo, N., De Abreu, I., Notcheva, G., Flanagan, J., Watson, C., Sais, E., Adedayo, A., Chu, V., Shaw, G., Graver, M.A., Palmer, R., Palmer, D., Haile, S., Gordon, J., Tam, C.K., Mandar, K., Szypura, W., Jenkins, N., Marange, J., Shabangu, V., Moore, K., Lyons, J., Munang, M., Sangombe, M., Moran, E., Hussain, A., Wiselka, M., Lewszuk, A., Batham, S., Ellis, K., Bahadur, L., White, H., Pareek, M., Sahota, A., Coleman, S., Pateman, H., Kotecha, A., Sim, C., Rosser, A., Deane, J., Nendick, R., Aldridge, C., Clarke, A., Wood, M., Marshall, A., Stephenson, L., Matheson-Smith, T., Sloss, J., Potts, K., Malkin, J., Ftika, L., Raviprakash, V., Sutton, J., Malachira, A., Kean, M., Criste, K., Gladas, K., Andrews, C., Hutchison, C., Adams, E., Andrews, J., Romans, B., Ridley, N., Ekani, M., Mitchell, J., Smith, N., Clark, T., Glover, S., Reed, R., Yam, T., Burton, H., Said, R., Harvey, D., Janvier, A., Jacob, R., Smalley, C., Fair, A., Lord, S., Ripalda, K., Wooldridge, H., Cotter, L., Cardoso, G., Strachan, E., Kaler, G., Mohamoodally, A., Lawrence, E., Prime, Z., Abrahams, R., Price, David Ashley, Rigden, L., Shewan, L., Cullen, K., Emmerson, I., Martin, K., Wilson, Hesther, Higham, C., Taylor, K.L., Ong, E., Patel, B., Bond, H., Gradwell, J., Widdrington, J., Graham, C., Thornthwaite, S., Prentice, S., Poultney, U., Crowther, H., Fairlamb, H., Hetherington, E., Brewer, C., Banerjee, S., Hamson, C., McSkeane, A.,

- McWhinney, P., Sharratt, P., Thorpe, J., Kimachia, S., Wilson, Helen, Jeffs, B., Masters, Leslie, Wilson, J., Platt, J., Burgess, L., Chadwick, P., Jeans, A., Keatley, C., Moran, A., Swann, Z., Pagett, K., Peel, A., Howard, J., Meisner, S., Maloney, K., Masdin, A., Wright, L., Barlow, G., Crossman, S., Lowthorpe, V., Moore, E., Moss, P., Parkin, A., Wolstencroft, A., Warner, B., Tarbotton, C., Eyre, A., Anderson, A., Burdett, T., Driffill, A., Walker, Ann Sarah, Hudson, F., Szubert, Alex, Cairns, J., Ward, D., Webb, H., Russell, C., Jackson, B., Otiko, D., Borg, C., Masters, Lindsey, Islam, Z., Díaz-Montaña, C., Johnson, D., 2018. Adjunctive rifampicin for *Staphylococcus aureus* bacteraemia (ARREST): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet* 391, 668–678. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32456-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32456-X)
- Toh, S.-M., Xiong, L., Arias, C.A., Villegas, M.V., Lolans, K., Quinn, J., Mankin, A.S., 2007. Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid. *Mol. Microbiol.* 64, 1506–1514. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05744.x>
- Tong, S.Y.C., Davis, J.S., Eichenberger, E., Holland, T.L., Fowler, V.G., 2015. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 603–661. <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>
- Trotochaud, A.E., Wassarman, K.M., 2006. 6S RNA Regulation of *pspF* Transcription Leads to Altered Cell Survival at High pH. *J. Bacteriol.* 188, 3936–3943. <https://doi.org/10.1128/JB.00079-06>
- Trotochaud, A.E., Wassarman, K.M., 2005. A highly conserved 6S RNA structure is required for regulation of transcription. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 313–319. <https://doi.org/10.1038/nsmb917>
- Trotochaud, A.E., Wassarman, K.M., 2004. 6S RNA Function Enhances Long-Term Cell Survival. *J. Bacteriol.* 186, 4978–4985. <https://doi.org/10.1128/JB.186.15.4978-4985.2004>
- Tuchscher, L., Bischoff, M., Lattar, S.M., Noto Llana, M., Pförtner, 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>
- Tupin, A., Gualtieri, M., Leonetti, J.-P., Brodolin, K., 2010. The transcription inhibitor lipiarmycin blocks DNA fitting into the RNA polymerase catalytic site. *EMBO J.* 29, 2527–2537. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.135>
- Udo, E., 1993. Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. *J. Hosp. Infect.* 25, 97–108. [https://doi.org/10.1016/0195-6701\(93\)90100-E](https://doi.org/10.1016/0195-6701(93)90100-E)
- Umezawa, H., Maeda, K., Kosaka, H., 1948. ISOLATION OF A NEW ANTIBIOTIC SUBSTANCE, AUREOTHRICIN FROM A STRAIN OF STREPOMYCES. *Jpn. Med. J.* 1, 512–517. <https://doi.org/10.7883/yoken1948.1.512>
- Valle, J., Echeverez, M., Lasa, I., 2019. σ^B Inhibits Poly- *N* -Acetylglucosamine Exopolysaccharide Synthesis and Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 201. <https://doi.org/10.1128/JB.00098-19>
- van der Meulen, S.B., de Jong, A., Kok, J., 2016. Transcriptome landscape of *Lactococcus lactis* reveals many novel RNAs including a small regulatory RNA involved in carbon uptake and metabolism. *RNA Biol.* 13, 353–366. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1146855>
- van Schaik, W., Abee, T., 2005. The role of σ^B in the stress response of Gram-positive bacteria – targets for food preservation and safety. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 218–224. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.01.008>
- Vassilyev, D.G., Vassilyeva, M.N., Perederina, A., Tahirov, T.H., Artsimovitch, I., 2007a. Structural basis for transcription elongation by bacterial RNA polymerase. *Nature* 448, 157–162. <https://doi.org/10.1038/nature05932>
- Vassilyev, D.G., Vassilyeva, M.N., Zhang, J., Palangat, M., Artsimovitch, I., Landick, R., 2007b. Structural basis for substrate loading in bacterial RNA polymerase. *Nature* 448, 163–168. <https://doi.org/10.1038/nature05931>

- Vestergaard, M., Frees, D., Ingmer, H., 2019. Antibiotic Resistance and the MRSA Problem. *Microbiol. Spectr.* 7. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0057-2018>
- Vogel, J., Luisi, B.F., 2011. Hfq and its constellation of RNA. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 578–589. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2615>
- Wadler, C.S., Vanderpool, C.K., 2007. A dual function for a bacterial small RNA: SgrS performs base pairing-dependent regulation and encodes a functional polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 20454–20459. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708102104>
- Wassarman, K.M., 2018. 6S RNA, a Global Regulator of Transcription. *Microbiol. Spectr.* 6. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.RWR-0019-2018>
- Wassarman, K.M., Saecker, R.M., 2006. Synthesis-Mediated Release of a Small RNA Inhibitor of RNA Polymerase. *Science* 314, 1601–1603. <https://doi.org/10.1126/science.1134830>
- Wassarman, K.M., Storz, G., 2000. 6S RNA Regulates E. coli RNA Polymerase Activity. *Cell* 101, 613–623. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80873-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80873-9)
- Waters, L.S., Storz, G., 2009. Regulatory RNAs in Bacteria. *Cell* 136, 615–628. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.043>
- Wehner, S., Damm, K., Hartmann, R.K., Marz, M., 2014. Dissemination of 6S RNA among Bacteria. *RNA Biol.* 11, 1467–1478. <https://doi.org/10.4161/rna.29894>
- Weiss, A., Ibarra, J.A., Paoletti, J., Carroll, R.K., Shaw, L.N., 2014. The δ subunit of RNA polymerase guides promoter selectivity and virulence in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 82, 1424–1435. <https://doi.org/10.1128/IAI.01508-14>
- Weiss, A., Moore, B.D., Tremblay, M.H.J., Chaput, D., Kremer, A., Shaw, L.N., 2017. The ω Subunit Governs RNA Polymerase Stability and Transcriptional Specificity in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 199. <https://doi.org/10.1128/JB.00459-16>
- Weiss, A., Shaw, L.N., 2015. Small things considered: the small accessory subunits of RNA polymerase in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 39, 541–554. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv005>
- 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>
- Werner, F., Grohmann, D., 2011. Evolution of multisubunit RNA polymerases in the three domains of life. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 85–98. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2507>
- World Health Organization (Ed.), 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- World Health Organization, 2011. Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide. World Health Organization, Geneva.
- Wu, S., de Lencastre, H., Tomasz, A., 1996. Sigma-B, a putative operon encoding alternate sigma factor of *Staphylococcus aureus* RNA polymerase: molecular cloning and DNA sequencing. *J. Bacteriol.* 178, 6036–6042. <https://doi.org/10.1128/jb.178.20.6036-6042.1996>
- Wurm, R., Neußer, T., Wagner, R., 2010. 6S RNA-dependent inhibition of RNA polymerase is released by RNA-dependent synthesis of small *de novo* products. *Biol. Chem.* 391, 187–196. <https://doi.org/10.1515/bc.2010.018>
- Yanofsky, C., 1981. Attenuation in the control of expression of bacterial operons. *Nature* 289, 751–758. <https://doi.org/10.1038/289751a0>
- Zhang, G., 1998. Structure of the Escherichia coli RNA Polymerase & Subunit Amino-Terminal Domain. *Science* 281, 262–266. <https://doi.org/10.1126/science.281.5374.262>
- Zhang, G., Campbell, E.A., Minakhin, L., Richter, C., Severinov, K., Darst, S.A., 1999. Crystal Structure of *Thermus aquaticus* Core RNA Polymerase at 3.3 Å Resolution. *Cell* 98, 811–824. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81515-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81515-9)

Title : Regulatory RNAs and adaptation to antibiotics in *Staphylococcus aureus*: example of 6S RNA and rifampicin susceptibility

Keywords : 6S RNA, rifampicin, *Staphylococcus aureus*, antimicrobial resistance, RNA polymerase

Abstract : Small RNAs (sRNAs) are tools allowing efficient and quick bacterial adaptation to changing environments. They fine-tune gene regulation in addition to Sigma factors (σ) and transcriptional factors. These regulatory RNAs are involved in many cell processes such as metabolism, virulence and antibiotic resistance. *Staphylococcus aureus* is an opportunistic pathogen with a flexible genome facilitating the emergence of antimicrobial resistance. These adaptive capacities make *S. aureus* one of the World Health Organization (WHO) priorities. Among anti-staphylococcal treatment regimen, rifampicin, an RNA polymerase (RNAP) inhibitor, is used in combination against prosthetic device-associated infections. To explore the relationships between sRNAs and antibiotic susceptibility in *S. aureus*, fitness experiments performed with independent libraries of sRNAs mutants were implemented in the laboratory.

In the presence of low level of rifampicin in the growth medium, one mutant, $\Delta ssrS^{Sa}$, disappeared faster than the others did within the libraries. This mutant carries an *ssrS*^{Sa} gene deletion affecting 6S RNA expression. Interestingly, 6S RNA and rifampicin have the same target, RNAP. 6S RNA was well-studied in *Escherichia coli* but few *ssrS*-related phenotypes were described. We have shown that the hypersusceptibility phenotype associated to $\Delta ssrS^{Sa}$ mutant is true for other RNAP inhibitors and extends to other bacteria. We characterized 6S RNA in *S. aureus* and our results suggest a limited control of σ^B -dependent transcription in late stationary phase. Moreover, biochemical analyses highlighted a role of 6S RNA in the content of its partner, RNAP- σ^A . Finally, the $\Delta ssrS^{Sa}$ mutant is more susceptible to cell wall stress compared to its parental strain suggesting an implication of 6S RNA in *S. aureus* cell wall regulations.

Titre : ARN régulateurs et adaptation aux antibiotiques chez *Staphylococcus aureus* : exemple de l'ARN 6S et de la sensibilité à la rifampicine

Mots clés : ARN 6S, rifampicine, *Staphylococcus aureus*, résistance aux antibiotiques, ARN polymérase

Résumé : Les ARN régulateurs (ARNrég) sont des outils de précisions utilisés par les bactéries pour s'adapter rapidement à des changements environnementaux. Ils sont responsables d'une régulation génique fine et complètent l'action des facteurs Sigma (σ) et des facteurs de transcription. Les ARNrég interviennent dans de multiples processus : le métabolisme, la virulence ou encore la résistance aux antibiotiques. *Staphylococcus aureus* est un pathogène opportuniste dont la plasticité génomique est idéale pour faciliter l'émergence de résistances aux antimicrobiens, ce qui en fait une des priorités de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Parmi l'arsenal thérapeutique anti-staphylococcique, on retrouve la rifampicine, un inhibiteur de l'ARN polymérase (ARNpol) utilisé en association dans le traitement des infections sur matériel implantable. Afin d'explorer le lien entre ARNrég et sensibilité aux antibiotiques chez *S. aureus*, des expériences de compétition entre mutants d'ARNrég ont été développées au laboratoire.

En présence d'une faible concentration de rifampicine, un mutant, $\Delta ssrS^{Sa}$, disparaît plus rapidement que les autres. Ce mutant porte une délétion affectant l'expression de l'ARN 6S, un ARNrég interagissant avec l'ARNpol, la cible de la rifampicine. L'ARN 6S a été très étudié chez *Escherichia coli* mais peu de phénotypes lui sont associés. Nous avons montré que le phénotype d'hypersensibilité à la rifampicine lié à la délétion du gène *ssrS^{Sa}* s'élargissait à d'autres inhibiteurs de l'ARNpol et à d'autres genres bactériens. Nous avons caractérisé l'ARN 6S chez *S. aureus* et nos résultats suggèrent un contrôle partiel de la transcription dépendante de σ^B plutôt en phase stationnaire tardive. Des analyses biochimiques révèlent également que l'intégrité de l'holoenzyme ARNpol- σ^A dépend de son partenaire, l'ARN 6S. Enfin, le mutant $\Delta ssrS^{Sa}$ est plus sensible au stress pariétal par rapport à sa souche parentale, laissant supposer que l'ARN 6S pourrait prendre part aux régulations du métabolisme de la paroi de *S. aureus*.