L'ARN non codant RsaA favorise la persistance et atténue la virulence de *Staphylococcus aureus*

Claire Lays¹⁻⁵, Cédric Romilly⁶, Arnaud Tomasini⁶, Isabelle Caldeleri⁶, Yvonne Benito^{1-5,7}, Philippe Hamman⁸, Thomas Geissmann¹⁻⁵, Sandrine Boisset^{1-5,7}, Pascale Romby⁶, François Vandenesch^{1-5,7}

¹ CIRI, centre international de recherche en infectiologie, université de Lyon, Faculté de médecine-site Laennec, 7, rue Guillaume Paradin, 69372 Lyon, France ;

² Inserm U1111, Lyon, France ;

³ École normale supérieure de Lyon, France ;

⁴ Université Lyon 1, Lyon, France ;

⁵ CNRS UMR5308, Lyon, France ;

⁶ architecture et réactivité de l'ARN, université de Strasbourg, CNRS, IBMC, Strasbourg, France ;

⁷ Hospices civils de Lyon, Lyon, France ;

⁸ plate-forme de protéomique, IBMC, Strasbourg, France.

claire.lays@inserm.fr

► Commensale de la peau et des muqueuses, *Staphylococcus aureus* est surtout connue pour être une bactérie pathogène opportuniste de l'homme. Elle est responsable de nombreuses infections, qu'il s'agisse d'atteintes cutanées bénignes ou d'infections plus profondes mettant en jeu le pronostic vital. Le « succès » du développement d'une infection dépend essentiellement de l'expression coordonnée et séquentielle d'une multitude de facteurs de virulence et de gènes accessoires. Cette coordination est assurée par un réseau de régulation extrêmement complexe composé de facteurs protéiques mais également d'ARN régulateurs. Au cours de la dernière décennie et grâce à l'essor de la génomique, les ARN régulateurs ont pris une place prépondérante au sein des réseaux de régulation, aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes. Chez les bactéries, ces ARN régulateurs sont divisés en plusieurs classes : les ARNm agissant en *cis* (*riboswitches*), les ARN antisens codés sur le même locus génétique que leur ARN cible (ARNas), et les ARN issus de régions intergéniques (ARNs) [1]. Chez *S. aureus*, plusieurs études ont identifié un grand nombre d'ARN régulateurs codés sur le *core* génome et sur les éléments mobiles [2]. Malgré la progression de nos connaissances concernant ces ARN et la caractérisation du rôle de certains d'entre eux dans la régulation du métabolisme et de la virulence, l'élucidation de leurs

fonctions reste toujours un défi. En utilisant une combinaison d'approches *in vitro* et *in vivo*, nous avons élucidé le mécanisme d'action et la fonction de l'un de ces ARNs, appelé RsaA [3]. Nous avons montré que RsaA réprime la traduction de l'ARNm *mgrA* qui code pour un régulateur transcriptionnel global. Ce dernier induit des phénotypes qui ont un rôle clef lors du processus infectieux.

RsaA contrôle *mgrA*, un régulateur majeur chez *S. aureus*

Le gène *rsaA* est situé au niveau d'une région intergénique [4]. RsaA est un ARN de 138 nucléotides très stable composé de 3 tiges-boucles et qui contient un motif conservé UCCC en simple brin. Cette séquence a été décrite précédemment dans divers ARN régulateurs comme étant appropriée pour engager l'interaction avec la séquence Shine et Dalgarno des ARNm cibles. RsaA est exprimé lors de la phase post exponentielle de croissance de la bactérie et s'accumule en phase stationnaire, sous le contrôle du facteur alternatif de transcription σ^B . Grâce à une analyse différentielle du protéome couplée à la recherche des interactions ARNm-RsaA, nous avons caractérisé une des principales cibles de RsaA, l'ARNm *mgrA*. La protéine correspondante est un régulateur pléiotrope majeur chez *S. aureus*, responsable de la régulation positive ou négative de plus de 100 gènes [5]. RsaA agit comme un ARN antisens en interagissant avec deux

régions de l'ARNm qui sont essentielles à la régulation : une interaction boucle-boucle implique les boucles apicales des motifs en tige-boucle H1 de RsaA et IV de l'ARNm *mgrA* localisé dans la région codante ; la seconde interaction fait intervenir la séquence riche en C de RsaA avec la séquence Shine et Dalgarno de l'ARNm *mgrA* (Figure 1A). Cette seconde interaction empêche la fixation du ribosome pour inhiber la traduction de l'ARNm *mgrA*. Ce duplex est ensuite dégradé par la ribonucléase III (RNase III). Ce mécanisme d'action n'est pas sans rappeler celui de la régulation de l'ARNm *coa* par l'ARNIII, l'effecteur intracellulaire du système de densité cellulaire *agr* [6]. Par ailleurs, il est fort probable que RsaA prenne place dans le réseau de régulation qui répond à l'ARNIII (Figure 1B). En effet, le système *agr* est soumis à de nombreux signaux externes et intracellulaires. Par exemple, le facteur σ^B et MgrA auraient une action différente sur le système *agr*, permettant de relier la réponse au stress et à la virulence.

RsaA atténue la virulence aiguë, mais facilite la formation d'un biofilm

Régulateur pléiotrope de nombreux gènes, MgrA est connu entre autres comme activateur de la synthèse de la capsule (structure facultative externe permettant à la bactérie de se protéger contre les attaques du système immunitaire) et comme répresseur de

Figure 1. RsaA et ses réseaux de régulation. **A.** Schéma résumant le mécanisme de régulation par RsaA. RsaA se fixe à l'ARNm *mgrA* et inhibe sa traduction en empêchant la fixation de la petite sous-unité 30S du ribosome, et recrute la RNase III pour induire la dégradation du duplex. **B.** RsaA est activé par σ^B et, en retour, réprime la traduction de MgrA. RsaA est ainsi indirectement relié au réseau de régulation de l'ARNIII, puisque MgrA active l'expression de l'opéron *agrACDB* alors que σ^B le réprime. Les flèches indiquent une activation et les barres une répression. En bleu sont indiqués les régulateurs protéiques, en rouge les ARN régulateurs et en gris les facteurs de virulence. Les lignes rouges correspondent aux régulations post-transcriptionnelles et les lignes noires aux régulations transcriptionnelles. Les événements de régulation potentiellement indirects sont montrés par les lignes en pointillés. Les structures secondaires de RsaA et de l'ARNIII sont présentées avec leur motifs riches en C qui ciblent les ARNm.

la formation de biofilm (structure tridimensionnelle multicellulaire assurant le maintien local de l'infection et participant à la lutte contre le système immunitaire et les conditions environnementales défavorables [7]). Grâce à l'utilisation de mutants pour RsaA et MgrA, nous avons démontré par différentes expériences *in vitro* que l'inactivation de *rsaA* réprime la formation du biofilm tout en activant la production de capsule *via* la régulation de la traduction de MgrA. Ces deux phénotypes sont étroitement liés au processus infectieux chez l'homme. En effet, le biofilm est fortement impliqué dans le maintien des infections chroniques (infection sur cathéter et sur biomatériaux implantés [8]) alors que la capsule est associée aux infections

aiguës (abcès, bactériémie). Comme l'expression de RsaA influence de manière opposée la synthèse de capsule et la formation de biofilm, nous avons testé l'impact de cet ARN sur les deux types d'infections (Figure 2). Pour cela, nous avons développé deux modèles d'infections chez la souris, le modèle d'infection sur cathéter (révélant le rôle du biofilm) et le modèle de bactériémie par injection intrapéritonéale (mettant en évidence le rôle de la capsule). Dans le premier modèle, un cathéter sous-cutané est infecté chez la souris par une souche exprimant ou non RsaA (Figure 2A). Nous avons suivi le développement de l'infection dans le cathéter (Figure 2A) et au niveau des tissus environnants (Figure 2B). Seules les bactéries exprimant RsaA se

sont développées au site d'infection ainsi que dans les tissus environnants, démontrant que RsaA est impliqué dans le développement et le maintien de l'infection chronique. Lors de la bactériémie expérimentale par injection intrapéritonéale, nous avons mis en évidence que l'expression de RsaA réduisait la persistance de la souche au site infectieux (Figure 2C) ainsi que sa dissémination sanguine (Figure 2D). Ainsi, il apparaît que RsaA influence la virulence de la bactérie en faveur d'une infection chronique tout en limitant la sévérité de l'infection aiguë. La forte conservation de cet ARN chez l'ensemble des espèces du genre *Staphylococcus* [9] nous incite à proposer que le gène codant pour RsaA pourrait avoir été positivement sélectionné au

Figure 2. Impact de RsaA sur la virulence in vivo chez la souris. Deux modèles d'infection in vivo ont été développés : un modèle d'infection sur cathéter (pour mimer une infection chronique) et un modèle de bactériémie (pour mimer une infection aiguë). La quantification des bactéries vivantes dans le cathéter (A) et dans les tissus environnants (B) 3, 6 et 10 jours post-infection a été réalisée par numération sur boîtes gélosées. Les résultats sont exprimés en nombre de CFU/ml (A) ou par mg de tissu (B). Chaque point désigne le nombre de bactéries par souris et la ligne noire représente la moyenne pour chaque condition testée. Le second modèle a été réalisé par injection intrapéritonéale de 1×10^6 bactéries. Après 3 h d'infection, les bactéries viables dans la cavité péritonéale (C) ou dans le sang (D) ont été dénombrées. Les résultats sont exprimés en nombre de CFU/ml. Les différences statistiques * ($p < 0,05$) et ** ($p < 0,005$) entre 2 groupes ont été obtenues par un test de Mann-Whitney. NS : non significatif.

cours de l'évolution, car il limiterait la mortalité de son réservoir et hôte naturel, l'homme. Il s'agit là du premier exemple d'ARN régulateur atténuateur de virulence aiguë identifié chez *S. aureus*. ♦

RsaA non-coding RNA promotes bacterial persistence and attenuates virulence in *Staphylococcus aureus*

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Papenfort K, Vogel J. Regulatory RNA in bacterial pathogens. *Cell Host Microbe* 2010 ; 8 : 116–27.
2. Romilly C, Caldelari I, Parmentier D, et al. Current knowledge on regulatory RNAs and their machineries in *Staphylococcus aureus*. *RNA Biol* 2012 ; 9 : 402–13.
3. Romilly C, Lays C, Tomasini A, et al. A non-coding RNA promotes bacterial persistence and decreases virulence by regulating a regulator in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog* 2014 ; 10 : e1003979.
4. Geissmann T, Chevalier C, Cros MJ, et al. A search for small noncoding RNAs in *Staphylococcus aureus* reveals a conserved sequence motif for regulation. *Nucleic Acids Res* 2009 ; 37 : 7239–57.
5. Luong TT, Dunman PM, Murphy E, et al. Transcription profiling of the *mgrA* regulon in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2006 ; 188 : 1899–910.
6. Chevalier C, Boisset S, Romilly C, et al. *Staphylococcus aureus* RNAIII binds to two distant regions of *coa* mRNA to arrest translation and promote mRNA degradation. *PLoS Pathog* 2010 ; 6 : e1000809.
7. Lebeaux D, Ghigo JM. Infections associées aux biofilms: quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale ? *Med Sci (Paris)* 2012 ; 28 : 727–39.
8. Cateau E, Rodier MH, Imbert C. Candidoses associées aux cathéters : quelle place pour les verrous antifongiques ? *Med Sci (Paris)* 2012 ; 28 : 740–5.
9. Geissmann T, Marzi S, Romby P. The role of mRNA structure in translational control in bacteria. *RNA Biol* 2009 ; 6 : 153–60.

Bon de commande

À retourner à EDK, 109, avenue Aristide Briand - 92541 Montrouge Cedex
Tél. : 01 41 17 74 05 - Fax : 01 55 64 13 94 - E-mail : edk@edk.fr

NOM : Prénom :

Adresse :

Code postal : Ville :

Pays :

Fonction :

Je souhaite recevoir l'ouvrage **Hépatite B** : 54 € + 3 € de port = **57 € TTC** offre exceptionnelle réservée aux abonnés à m/s jusqu'au 31 décembre 2014

en exemplaire, soit un total de €

☐ Par chèque, à l'ordre de EDK

☐ Par carte bancaire : ☐ Visa ☐ Eurocard/Mastercard

Carte n° |

Date d'expiration : | | | | | |

N° de contrôle au dos de la carte : | | | | | |

Signature :

Hépatite B

Jean-Michel Pawlotsky
Daniel Dhumeaux

ISBN : 978-2-8425-4131-6 576 pages