

RsaI, un ARN régulateur aux multiples facettes, module le métabolisme du pathogène opportuniste *Staphylococcus aureus*

Emma Desgranges¹, Delphine Bronesky^{1*}, Anna Corvaglia², Patrice François², Carlos Caballero³, Laura Prado³, Alejandro Toledo-Arana³, Inigo Lasa⁴, Karen Moreau⁵, François Vandenesch⁵, Stefano Marzi¹, Pascale Romby¹, Isabelle Caldelari¹

¹Université de Strasbourg, CNRS, Architecture et réactivité de l'ARN, UPR9002, F-67000 Strasbourg, France.

²Laboratoire de recherche en génomique, département de spécialités médicales, Genève hôpitaux universitaires, université de Genève, Genève, Suisse.

³Instituto de agrobiotecnología. CSIC-UPNA-GN, 31192-Mutilva, Navarra, Espagne.

⁴Navarrabiomed, universidad pública de Navarra, departamento de salud, IDISNA, Pamplona, Espagne.

⁵CIRI, centre international de recherche en infectiologie, Inserm U1111, université Lyon1, école normale supérieure de Lyon, CNRS UMR5308, F-69008 Lyon, France.

*Adresse actuelle : ARNA, U1212, UMR 5320, université de Bordeaux, 146 rue Leo Saignat, Carreire zone nord Bat 3A 1^{er}, BP12, 33076 Bordeaux, France.

i.caldelari@unistra.fr



► *Staphylococcus aureus* est une bactérie commensale retrouvée chez environ 30 % des individus sains dont elle colonise la peau et la muqueuse nasale. Cependant, c'est également une bactérie pathogène opportuniste responsable d'infections diverses telles que orgelet, ostéomyélite, endocardite, ou encore septicémie en envahissant un grand nombre de tissus et d'organes. Cette bactérie est capable de s'adapter à des conditions hostiles et variées, telles que carence nutritive et stress osmotique, oxydant, ou thermique, ainsi qu'à la réponse immunitaire de l'hôte, car elle produit une grande diversité de facteurs de virulence. La synthèse de ces facteurs est finement régulée par des protéines et des ARN régulateurs majoritairement non codants, souvent désignés par l'abréviation sARN (dérivée de l'anglais, *small RNA*). Les facteurs de transcription et les systèmes à deux composants contrôlent l'expression des gènes impliqués non seulement dans le métabolisme, mais aussi dans la réponse au stress et la virulence [1]. Par exemple, la protéine du contrôle catabolique (*carbon catabolite control protein A*, CcpA) a un rôle essentiel dans le choix de la source carbonée en régulant le métabolisme central de la bactérie ainsi que la virulence [2, 3]. CcpA se fixe à une séquence promotrice spécifique appelée *cre* (*catabolite-responsive element*),

qui est très conservée chez les bactéries à Gram positif [2]. Quant aux sARN, ils interagissent principalement avec leurs ARN messagers (ARNm) cibles. L'hybridation peut conduire à la stabilisation/déstabilisation de l'ARNm ou à l'activation/répression de sa traduction [4]. Nous avons montré que la transcription du sARN RsaI (*RNA Staphylococcus aureus I*) est réprimée par CcpA en présence de glucose [5]. L'induction de la synthèse de RsaI signale que la concentration en glucose diminue dans le milieu extracellulaire et que la croissance des bactéries est ralentie. En interagissant avec ses ARNm cibles ou d'autres sARN, il permet à la population bactérienne de modifier son métabolisme lorsque la source carbonée primaire est consommée.

RsaI est inhibé par CcpA en présence de glucose

RsaI est un sARN de 144 nucléotides, très conservé chez les *staphylococcaceae*, et qui comporte deux motifs riches en guanosine ainsi qu'une longue région simple brin riche en pyrimidines. Un motif *cre* de liaison à CcpA a été détecté dans la région promotrice du gène codant RsaI. Ce sARN est exprimé dès l'entrée en phase stationnaire de croissance des bactéries dans un milieu riche contenant 2 % de glucose [6]. Néanmoins, dans un

milieu sans glucose ou dans une souche délétée du gène *ccpA*, RsaI est exprimé de manière constitutive, suggérant que CcpA est le principal répresseur de RsaI en présence de glucose et que cette répression est levée après consommation du glucose (en début de phase stationnaire).

L'identification des cibles de RsaI révèle ses fonctions

La technique MAPS (*MS2-affinity purification coupled with RNA sequencing*) a été utilisée afin d'identifier l'ensemble des cibles ARN directes de RsaI (Figure 1) [7]. Cette technique permet d'isoler les complexes formés entre RsaI et ses ARN associés *in vivo*. RsaI a été au préalable fusionné à une étiquette MS2 placée en 5' du sARN. Cette étiquette est spécifiquement reconnue par la protéine de capside du phage MS2 (MS2-CP), qui est elle-même fixée sur une résine d'amylose pour retenir spécifiquement les complexes contenant RsaI-MS2. En couplant à cette chromatographie d'affinité une technique de séquençage à haut débit (Miseq, Illumina), les ARN liés à RsaI-MS2 sont caractérisés. L'interaction directe entre RsaI et ses cibles potentielles, ainsi que les conséquences de son action sur la régulation du métabolisme de la bactérie ont été ensuite validées par une combinaison d'approches *in*

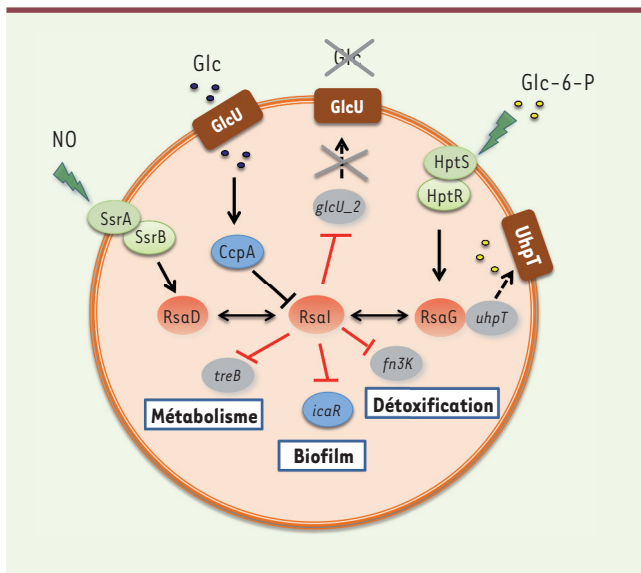


Figure 1. Représentation schématique des réseaux de régulation centrés sur l'ARN régulateur RsaI. Les sARN sont colorés en rouge, les facteurs de transcription en bleu, les systèmes à deux composants en vert, les ARNm en gris, et les transporteurs en marron. Les connecteurs noirs ou rouges indiquent respectivement un contrôle transcriptionnel ou post-transcriptionnel. Les flèches symbolisent une activation, tandis que les barres transversales indiquent une inhibition. sARN : *small RNA* ; RsaI : *RNA Staphylococcus aureus I*.

vivo et *in vitro*. Ainsi, nous avons révélé l'existence de deux classes de cibles pour RsaI : des ARNm impliqués dans l'importation du glucose (*glcU_2*), le métabolisme des sucres (*treB*), la détoxification des protéines (*fn3K*), et la formation des biofilms (*icaR*), et des sARN possédant des séquences riches en cytosine, complémentaires de la séquence du site de fixation du ribosome sur leurs ARNm cibles (séquence de Shine-Dalgarno). Par ailleurs, le transcriptome différentiel indique que RsaI inhiberait la voie des pentoses phosphate et, à l'inverse, activerait des enzymes des voies de fermentation ainsi que d'autres protéines requises pour résister au monoxyde d'azote (NO), un métabolite libéré par les cellules endothéliales, les polynucléaires neutrophiles, et les macrophages de l'hôte.

RsaI contient deux domaines fonctionnels distincts

La mutagenèse dirigée a permis de distinguer deux motifs fonctionnels de RsaI. Sa région en simple brin riche en adénine et uridine interagit avec les séquences de Shine-Dalgarno de ses ARNm cibles, inhibant ainsi leur traduction. C'est le cas pour les transcrits codant le transporteur du glucose *GlcU_2*, le transporteur du tréhalose *TreB*, et la fructosamine kinase *Fn3K* impliquée dans

interagissent quant à eux avec les motifs riches en cytosine des sRNA *RsaG* et *RsaD*. *RsaG* est induit par la présence de glucose-6-phosphate (G6P) dans le milieu extracellulaire sous le contrôle du système à deux composants *HptRS* (*hexose phosphate transport RS*, *R* désignant le régulateur et *S* le senseur), alors que *RsaD* répond au NO sous la dépendance du système *SsrAB* (*staphylococcal respiratory response AB*) (Figure 1). Étonnamment, *RsaG* serait co-transcrit avec l'ARNm de *uhpT* (*uptake of hexose phosphate transporter*) codant le transporteur du G6P (Figure 1). Nous avons montré que la fixation de *RsaG* n'affecte pas les fonctions régulatrices de RsaI, telles que la répression traductionnelle de *glcU_2* (Figures 1 et 2B). Il reste à déterminer si RsaI peut agir comme une « éponge à sARN » afin d'empêcher leur action.

RsaI module la synthèse de PIA-PNAG, un composant de la matrice des biofilms

S. aureus est la cause principale des infections nosocomiales chez les patients opérés pour la pose d'une prothèse, où se développent facilement des biofilms bactériens résistants au traitement antibiotique. L'opéron *icaADBC* code les enzymes responsables de la synthèse de l'exopolysaccharide PIA-PNAG (*polysac-*

charide intercellular adhesin-poly-N-acetylglucosamine), composant majeur de la matrice des biofilms. Ces gènes sont réprimés par le facteur de transcription *IcaR*. L'ARNm *icaR* a la particularité d'inhiber sa propre traduction en induisant sa circularisation. En effet, une séquence riche en cytosine (anti-SD) située dans la région 3' non-traduite (3'UTR pour 3' *untranslated region*) s'hybride à la séquence SD pour empêcher la fixation du ribosome et induire la dégradation de l'ARNm *icaR* par l'endoribonucléase III (Figure 2C) [8]. L'ARNm *icaR* a été identifié comme une cible de RsaI par la technique MAPS. Nous avons montré que RsaI interagit avec la 3'UTR de l'ARNm *icaR* en aval de la séquence anti-SD (Figure 2C). Des expériences permettant d'évaluer la production de PIA-PNAG indiquent que RsaI et la région 3'UTR de l'ARNm *icaR* sont nécessaires pour inhiber le répresseur *IcaR* et activer la synthèse de PIA-PNAG (Figure 2C).

Conclusion

Ces résultats illustrent le lien étroit entre la régulation du métabolisme, l'adaptation au stress, et la formation de biofilms bactériens chez *S. aureus*, impliquant le facteur de transcription *CcpA* et le sARN *RsaI*, et l'utilisation des sources carbonées. Cet ARN non-codant aux multiples facettes pourrait être principalement produit au niveau des sites d'inflammation où la concentration en glucose est faible (e.g., poumons, reins), et intervenir dans la persistance des bactéries lorsque les conditions sont défavorables à leur multiplication. Il reste encore beaucoup à apprendre sur le rôle des sARN et sur leurs réseaux

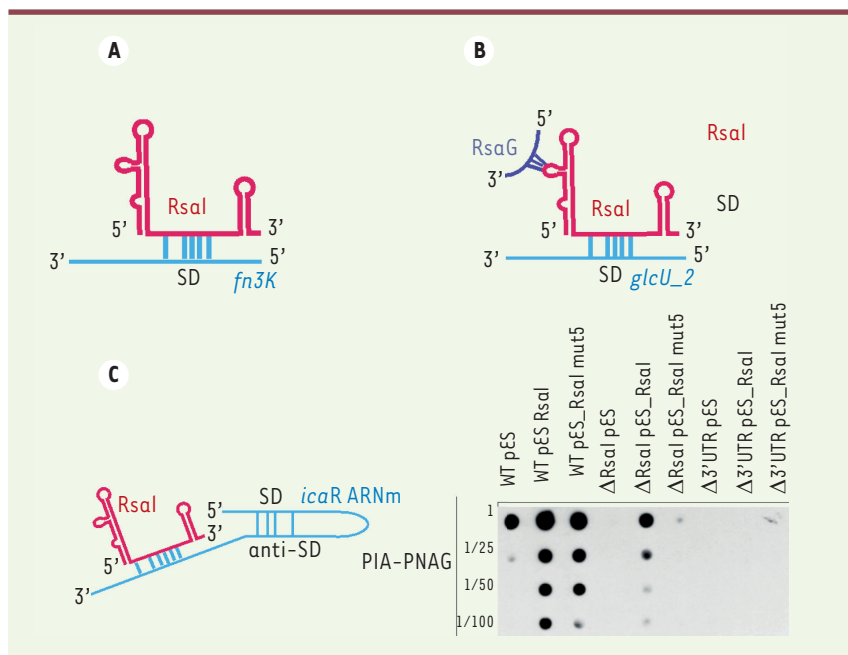


Figure 2. Divers mécanismes de régulation impliquant RsaI. **A.** Schéma du complexe formé entre RsaI et l'ARNm de *fn3K*. RsaI inhibe la traduction de cet ARNm en se fixant à sa séquence de Shine-Dalgarno (SD). **B.** Schéma du complexe formé entre RsaI, l'ARNm de *glcU_2*, et RsaG. La liaison de RsaG n'empêche pas RsaI de se fixer à son ARNm cible et d'y exercer son contrôle. **C.** Effet de RsaI sur la synthèse des exopolysaccharides PIA-PNAG *in vivo*. À gauche, schéma représentant RsaI se liant à la région 3' de l'ARNm *icaR*. L'interaction entre les séquences complémentaires SD et anti-SD est également indiquée. À droite, la biosynthèse de PIA-PNAG a été quantifiée par la technique de dot blot. Des échantillons ayant subi une série de dilutions (jusqu'à 1:100) ont été déposés sur une membrane de nitrocellulose, et la production de PIA-PNAG a été détectée avec des anticorps

spécifiques de cet exopolysaccharide dans la souche 132 de *S. aureus* (WT, pour *wild-type*), la souche délétée pour le gène *rsaI* (Δ *rsaI*), et la souche portant une délétion de la région *icaR* 3'UTR (Δ 3'UTR). Ces trois souches ont été transformées soit avec un plasmide pES (pES), soit avec le plasmide recombinant exprimant *rsaI* (pES_*RsaI*) ou sa forme mutée *rsaI* mut5 (pES_*RsaI* mut5), dont la séquence d'interaction avec l'ARNm *icaR* a été inactivée par substitution (d'après [5]).

d'interactions dans le contrôle des voies métaboliques essentielles à l'invasion, la survie, et la dormance de *S. aureus*. Elucider ces mécanismes complexes de régulation permettra de mieux comprendre la pathogénicité de *S. aureus*, et de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques contre les infections redoutables dont elle est parfois responsable. \diamond

RsaI, a multifaceted regulatory RNA, modulates the metabolism of the opportunistic pathogen *Staphylococcus aureus*


LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

- Richardson AR, Somerville GA, Sonenshein AL. Regulating the intersection of metabolism and pathogenesis in Gram-positive bacteria. *Microbiol Spectr* 2015 ; 3 : 1-27.
- Seidl K, Stucki M, Ruegg M, et al. *Staphylococcus aureus* CcpA affects virulence determinant production and antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2006 ; 50 : 1183-94.
- Li C, Sun F, Cho H, et al. CcpA mediates proline auxotrophy and is required for *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *J Bacteriol* 2010 ; 192 : 3883-92.
- Wagner EGH, Romby P. Small RNAs in bacteria and archaea: who they are, what they do, and how they do it. *Adv Genet* 2015 ; 90 : 133-208.

- Bronesky D, Desgranges E, Corvaglia A, et al. A multifaceted small RNA modulates gene expression upon glucose limitation in *Staphylococcus aureus*. *EMBO J* 2019 ; 38 : e99363.
- Geissmann T, Chevalier C, Cros M-J, 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.
- Lalaouna D, Desgranges E, Caldelari I, et al. MS2-affinity purification coupled with RNA sequencing approach in the human pathogen *Staphylococcus aureus*. *Meth Enzymol* 2018 ; 612 : 393-411.
- Ruiz de los Mozos I, Vergara-Irigaray M, Segura V, et al. Base pairing interaction between 5'- and 3'-UTRs controls *icaR* mRNA translation in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Genet* 2013 ; 9 : e1004001.



Tarifs d'abonnement m/s - 2019

Abonnez-vous

à médecine/sciences

> Grâce à m/s, vivez en direct les progrès des sciences biologiques et médicales

Bulletin d'abonnement

page 1230 dans ce numéro de m/s

