



HAL
open science

Étude fonctionnelle d'un ARN régulateur exprimé par le Staphylocoque doré, impliqué dans la virulence et la phagocytose des bactéries par les macrophages humains

Simon Raynaud

► To cite this version:

Simon Raynaud. Étude fonctionnelle d'un ARN régulateur exprimé par le Staphylocoque doré, impliqué dans la virulence et la phagocytose des bactéries par les macrophages humains. Sciences du Vivant [q-bio]. 2016. dumas-02570681

HAL Id: dumas-02570681

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02570681>

Submitted on 7 May 2021

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.

THÈSE D'EXERCICE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

Thèse en vue du

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présenté par

Simon Raynaud

Né le 3 février 1992, à Saint-Nazaire

**Étude fonctionnelle
d'un ARN régulateur
exprimé par le
staphylocoque doré,
impliqué dans la
virulence et la
phagocytose des
bactéries par les
macrophages
humains.**

**Thèse soutenue à Rennes
le 5 Octobre 2016**

devant le jury composé de :

M. Le Docteur Pierre-Yves DONNIO

Professeur, Université Rennes 1
Président du jury

Mme Le Docteur Hélène LE PABIC

Maître de conférences, Université Rennes 1
Directeur de thèse

Mme Le Docteur Odile SERGENT

Professeur, Université Rennes 1
Rapporteur

M. Le Docteur Paul-Henri PERCHAIS

Docteur en pharmacie, Plélan-le-Grand
Membre du jury

Listes des enseignants-chercheurs de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

PROFESSEURS

		Pharmacien	HDR	Hospitalo-U
1	BOUSTIE	Joël	X	HDR
2	BURGOT	Gwenola	X	HDR
3	DONNIO	Pierre Yves	X	HDR
4	FAILI	Ahmad		HDR
5	FARDEL	Olivier	X	HDR
6	FELDEN	Brice	X	HDR
7	GAMBAROTA	Giulio		HDR
8	GOUGEON	Anne	X	HDR
9	LAGENTE	Vincent	X	HDR
10	LE CORRE	Pascal	X	HDR
11	LORANT (BOICHOT)	Elisabeth		HDR
12	MOREL	Isabelle	X	HDR
13	SERGENT	Odile	X	HDR
14	SPARFEL-BERLIVET	Lydie	X	HDR
15	TOMASI	Sophie	X	HDR
16	URIAC	Philippe	X	HDR
17	VAN DE WEGHE	Pierre		HDR
18	VERNHET	Laurent	X	HDR

PROFESSEURS ASSOCIES

		Pharmacien	HDR	Hospitalo-U
1	BUREAU	Loïc	X	
2	DAVOUST	Noëlle	X	HDR

PROFESSEURS EMERITES

		Pharmacien	HDR	Hospitalo-U
1	CILLARD	Josiane	X	HDR
2	GUILLOUZO	André		HDR

MAITRES DE CONFERENCES

			Pharmacien	HDR	Hospitalo-U
1	ABASQ-PAOFAI	Marie-Laurence			
2	ANINAT	Caroline	X	HDR	
3	AUGAGNEUR	Yoann			
4	BEGRICHE	Karima			
5	BOUSARGHIN	Latifa		HDR	
6	BRANDHONNEUR	Nolwenn			
7	BRUYERE	Arnaud	X		
8	BUNETEL	Laurence	X		
9	CHOLLET-KRUGLER	Marylène	X		
10	COLLIN	Xavier	X		
11	CORBEL	Jean-Charles	X	HDR	
12	DAVID	Michèle	X	HDR	
13	DELALANDE	Olivier			
14	DELMAIL	David			
15	DION	Sarah			
16	DOLLO	Gilles	X	HDR	X
17	GILOT	David		HDR	
18	GOUAULT	Nicolas		HDR	
19	HITTI	Eric			
20	JEAN	Mickaël			
21	LECUREUR	Valérie		HDR	
22	LE FERREC	Eric	X		
23	LE PABIC	Hélène			
24	LEGOUIN-GARGADENNEC	Béatrice			
25	LOHEZIC-LE DEVEHAT	Françoise	X		
26	MARTIN-CHOULY	Corinne		HDR	
27	MINET	Jacques	X	HDR	
28	MOURET-PLEIBER	Liza			
29	NOURY	Fanny			
30	PINEL-MARIE	Marie-Laure			
31	PODECHARD	Normand			
32	POTIN	Sophie	X		X
33	RENAULT	Jacques	X	HDR	
34	ROUILLON	Astrid			

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE (AHU)

			Pharmacien	HDR	Hospitalo-U
1	GICQUEL	Thomas	X		X

ATER

1	SMIDA	Imen		
2	PASCREAU	Gaëtan		
3	SAVARY	Camille		
4	ALHARETH	Khairallah		

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Brice Felden pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser mon stage de recherche au sein du laboratoire de biochimie pharmaceutique INSERM U835.

Je tiens ensuite à remercier particulièrement le Docteur Hélène Le Pabic pour m'avoir accepté en tant que stagiaire, pour avoir accepté d'être ma directrice de thèse et également pour m'avoir permis de participer à son sujet de recherche. Grâce à elle, ce stage a été plus qu'intéressant et enrichissant par les nombreuses compétences techniques que j'ai pu acquérir mais également par la confiance et l'autonomie qu'elle a su m'accorder et qui m'ont permises d'avoir réellement l'impression d'apporter quelque chose. Je la remercie également pour l'attention et les conseils qu'elle a su me donner ainsi que le temps qu'elle a accordé à la relecture et à la correction de mon mémoire de stage ainsi que de ma thèse d'exercice.

Je tiens également à remercier le Professeur Pierre Yves Donnio qui a accepté d'être le président de mon jury de thèse ainsi que le Professeur Odile Sergent pour avoir bien voulu faire partie du jury de thèse ainsi que pour son soutien tout au long de ce cursus recherche.

Je voudrais également remercier Marc Hallier, Mohammed Sassi et Yoann Augagneur. Marc pour son aide tout au long de ce stage dans la mise en place du protocole du Tag MS2 ainsi que pour l'ensemble des explications pertinentes qu'il a su me fournir afin de mieux comprendre les résultats obtenus. Mohammed et Yoann pour leur explication sur le RNAseq ainsi que sur le BioAnalyser et pour l'analyse des données de RNAseq qu'ils ont réalisé.

Je remercie aussi Tony et Lorraine pour les conseils techniques ainsi que les réponses aux nombreuses questions « bêtes » que j'ai pu leur poser, et Julie pour sa compagnie et sa bonne humeur à la paillasse.

Je remercie tous les autres chercheurs du laboratoire pour leur bonne humeur ainsi que tout le personnel sans qui le fonctionnement quotidien de ce laboratoire serait une autre paire de manche : Astrid, Marie-Laure, Gaétan, Sveta, Valérie, Noëlla, Régine, Camille, Annick, Nadège et Nathalie.

Une attention spéciale à Janus et Jurkat, mes deux compères de la filière recherche pour leur soutien, leur présence et leur bonne humeur, grâce à qui j'ai pu vivre d'excellents moments durant ces 5 années de pharmacie.

Je tiens enfin et surtout à remercier du fond du cœur M. Le Docteur Paul-Henri PERCHAI pour avoir accepté au pied levé de faire partie de mon jury de thèse. Il m'a ainsi permis d'avoir un jury valide à l'obtention de cette thèse d'exercice à seulement une semaine de ma soutenance.

Pour terminer, une pensée pour Anaïs qui m'a supporté durant cette dernière mais non moins difficile année, en espérant être aussi attentionné et patient qu'elle lorsque son tour viendra.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	4
TABLE DES MATIÈRES	6
LISTE DES FIGURES.....	9
LISTE DES TABLEAUX.....	11
LISTE DES ABREVIATIONS	12
INTRODUCTION.....	15
PARTIE I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	16
I] <i>Staphylococcus aureus</i>	17
A/ Généralités.....	17
B/ Habitats.....	18
C/ Infections à <i>Staphylococcus aureus</i>	18
II] Résistance aux antibiotiques.....	19
A/ Définition des antibiotiques et historique de leur découverte.....	19
B/ Résistance aux antibiotiques.....	20
1- Résistance naturelle.....	22
2- Résistance acquise.....	22
a) La résistance chromosomique.....	22
b) La résistance par acquisition de gènes.....	22
3- Mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	23
a) Par action directe sur l'antibiotique :	24
b) Par baisse de la concentration intracellulaire en antibiotique :	24
c) Par modification de la cible :	24
4- Causes et conséquences de l'émergence de résistances.....	24
C/ Problème majeur de santé public.....	27
1- Résistance à la pénicilline et à la méticilline.....	27
2- Résistance à la vancomycine.....	28
3- Résistance aux fluoroquinolones.....	29
4- <i>Staphylococcus aureus</i> et infections nosocomiales.....	30
III] Mécanisme d'infection.....	32
A/ Colonisation.....	32
1- MSCRAMM = Composants de la surface bactérienne reconnaissant les molécules adhésives de la matrice cellulaire.....	32
a) FnBP.....	33
b) Cna.....	34
c) Clf.....	34
d) SpA.....	34
e) Isd.....	35

2-	SERAM = Molécules Adhésives ayant un répertoire de Sécrétion Élargi.....	36
a)	Coagulase.....	36
b)	Protéine de liaison au facteur de von Willebrand.....	37
c)	Efb.....	37
d)	Emp.....	38
e)	Eap.....	38
B/	Diffusion au sein de l'hôte.....	39
1-	Toxines.....	39
a)	Hémolysines.....	40
b)	Leucocidines.....	41
c)	Entérotoxines.....	42
d)	Toxine du syndrome de choc toxique.....	43
e)	Modulines phénol-soluble.....	44
2-	Enzymes.....	44
a)	Staphylokinase.....	45
b)	Enzyme de Modification des Acides Gras (FAME).....	45
c)	Autres enzymes.....	45
C/	Internalisation.....	46
1-	Mécanisme impliquant les FnBP.....	47
2-	Mécanisme impliquant l'Autolysine.....	48
3-	Mécanisme mettant en jeu l'IsdB.....	49
4-	Mécanisme lié aux TLR.....	49
IV]	Phagocytose de <i>Staphylococcus aureus</i>	50
A/	Cellules Phagocytaires.....	50
1-	Polynucléaires neutrophiles.....	50
2-	Monocytes et macrophages.....	51
B/	Phagocytose.....	54
C/	Survie et échappement immunitaire des pathogènes bactériens.....	55
1-	SCV.....	56
2-	Échappement du phagosome.....	57
3-	Mort de la cellule.....	58
V]	Régulation des facteurs de virulence.....	59
A/	Quorum sensing.....	59
1-	Définition.....	59
2-	Système <i>agr</i> de <i>Staphylococcus aureus</i>	61
B/	ARN régulateurs.....	64
1-	sARN s'appariant aux ARNm.....	66
2-	sARN agissant sur les protéines.....	67
a)	L'ARN 6S.....	68
b)	Les sARN CsrB et CsrC.....	69
3-	Riboswitchs.....	70

4-	Avantage des ARN régulateurs bactériens.....	71
a)	Coût métabolique réduit.....	71
b)	Niveau supplémentaire de régulation.....	72
c)	Régulation plus rapide.....	73
5-	Rôles des ARN régulateurs bactériens.....	73
VI]	Objectifs.....	74
PARTIE II : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE.....		76
I]	Matériels et méthodes.....	77
A/	Souches bactériennes, plasmides et conditions de culture.....	77
B/	Protocole général d'isolement de partenaires protéiques et ARN de l'ARN SprC.....	78
C/	Construction du vecteur pRMC2-MS2-SprC.....	80
1-	Amplification de la séquence du gène <i>SprC</i>	80
2-	Insertion du fragment d'ADN dans le plasmide pRMC2-MS2 et transformation d' <i>E. coli</i> compétente.....	80
D/	Vérification de l'expression de l'ARN SprC-MS2 et de son accrochage sur la résine d'amylose.....	81
1-	Vérification de l'expression et de la fixation de SprC.....	81
a)	Transformation de <i>S. aureus</i> RN4220 avec le plasmide pRMC2-MS2-SprC....	81
b)	Accrochage, enrichissement et élution de SprC.....	81
c)	Analyse des ARN isolés.....	82
E/	Purification des partenaires protéiques et ARN de SprC.....	82
1-	Transduction du plasmide pRMC2-MS2-SprC dans la souche <i>S. aureus</i> Newman sauvage et <i>S. aureus</i> Newman $\Delta sprC$	82
2-	Purification de SprC-MS2 et de ses partenaires : protéines et ARN.....	83
3-	Élution et analyse des ARN.....	84
4-	Élution et analyse des protéines.....	85
II]	Résultats et discussion.....	86
A/	Résultats.....	86
1-	Vérification de l'expression de l'ARN SprC-MS2 et de son accrochage sur la résine d'amylose.....	86
2-	Analyse des partenaires protéiques de SprC dans les bactéries.....	87
3-	Analyse des partenaires ARN de SprC.....	91
a)	Validation de la méthode d'extraction des ARN en interaction directe avec SprC-MS2 dans les bactéries.....	91
b)	Analyse des données de captures d'ARN cibles de SprC par RNAseq.....	93
B/	Discussion.....	95
III]	Conclusion et prospectives.....	100
BIBLIOGRAPHIE.....		102

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : <i>Staphylococcus</i> en coloration de gram [4].....	17
Figure 2 : Colonies dorées de <i>Staphylococcus aureus</i> sur gélose Trypticase soja [5].....	17
Figure 3 : Découverte et introduction des différents antibiotiques depuis la découverte de la pénicilline en 1928 [15].....	19
Figure 4 : Différents modes d'action des antibiotiques au niveau de la bactérie [17].....	20
Figure 5 : Antibiogramme d'une souche multi-résistante de <i>S. aureus</i> [19].....	21
Figure 6 : Différents mécanismes de résistances aux antibiotiques [23].....	23
Figure 7 : Évolution du nombre d'antibiotiques validés par la FDA durant les 30 dernières années (adapté de [25]).....	26
Figure 8 : Différents antibiotiques pour lesquels il existe une résistance acquise chez <i>S. aureus</i> [33].....	29
Figure 9 : Organisation structurelle des MSCRAMM [44].....	33
Figure 10 : Organisation structurelle de la coagulase et de la protéine de liaison au facteur de von Willebrand (modifié de [151]).....	36
Figure 11 : Schéma représentant les différents facteurs de virulence de <i>S. aureus</i> et leur expression au cours de la croissance bactérienne (adapté de [12]).....	39
Figure 12 : Mécanisme d'action de la PVL [64].....	42
Figure 13 : Différents mécanismes et récepteurs impliqués dans l'internalisation de <i>S. aureus</i> par les cellules hôte [74].....	46
Figure 14 : Schéma représentant l'internalisation dépendante des FnBP [76].....	47
Figure 15 : A = Représentation de la protéine Autolysine ainsi que de ses différents domaines [79]. B = Représentations des séquences répétées de l'Autolysine [83].....	48
Figure 16 : Morphologies des cellules phagocytaires [88].....	50
Figure 17 : Représentations des différents TLR ainsi que de leur localisation [95].....	53
Figure 18 : Schéma représentant le mécanisme de phagocytose [97].....	54
Figure 19 : SCV autour d'une colonie de <i>S. aureus</i> [105].....	57
Figure 20: Système de quorum sensing des bactéries à Gram négatif [111].....	60

Figure 21 : Système de quorum sensing des bactéries à Gram positif [111].....	61
Figure 22 : Système de régulation agr [113].....	62
Figure 23 : Schéma représentant un sARN codés en <i>cis</i> [122].....	64
Figure 24 : Schéma représentant un sARN codés en <i>trans</i> [122].....	65
Figure 25 : Schéma décrivant les principaux mécanismes d'action des sARN agissant par appariement de bases [129].....	67
Figure 26 : Schéma représentant l'ARN 6S fixant l'ARN polymérase contenant le facteur $\sigma 70$ [129].....	68
Figure 27 : Mode d'action du système CsrA [129].....	69
Figure 28 : Schéma représentant le génome de <i>S. aureus</i> N315 avec les 3 ilots de pathogénie, la cassette SCC <i>mec</i> et les gènes des différents sARN [116].....	74
Figure 29 : Protocole général d'isolement de nouveaux partenaires ARN et protéiques de SprC (adapté de [148]).....	79
Figure 30 : Représentation du plasmide pRMC2 avec les sites de restrictions utilisés pour le clonage.....	80
Figure 31 : Schéma représentant la séquence et la structure de l'ARN SprC-MS2.....	86
Figure 32 : Analyse par Northern Blot permettant de vérifier l'induction de l'ARN SprC-MS2 et sa fixation sur la résine d'amylose chargée en MBP-MS2.....	87
Figure 33 : Analyse par gel SDS-PAGE 15% des partenaires protéiques fixés à l'ARN SprC étiqueté MS2 après 2H30 de croissance bactérienne.....	88
Figure 34 : Analyse par gel SDS-PAGE 13% des partenaires protéiques fixés à l'ARN SprC étiqueté MS2 après 2H30 et 4H30 de croissance bactérienne.....	89
Figure 35 : Analyse par PCRq de la présence de l'ARNm du facteur de transcription Rot, normalisé par rapport à l'ARNm de Gyrb.....	92

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Détermination du phénotype de la souche en fonction de la CMI et du diamètre d'inhibition [20].....	21
Tableau 2 : Groupement des entérotoxines et des entérotoxines- <i>like</i> en fonction de leur séquence en acides aminés [65].....	43
Tableau 3 : Séquence des amorces utilisées pour l'amplification par PCR.....	80
Tableau 4 : Souches et plasmides utilisés.....	83
Tableau 5 : Séquence des amorces utilisées pour l'analyse par PCRq.....	84
Tableau 6 : Liste des protéines identifiées par Spectrométrie de masse dans la bande d'intérêt, de poids apparent d'environ 30kDa.....	90
Tableau 7 : Cibles de l'ARNIII connues identifiées par le RNAseq et permettant de valider l'expérience.....	93
Tableau 8 : Liste des ARN enrichis grâce à leur fixation à l'ARN SprC-MS2 et identifiés par RNAseq.....	94

LISTE DES ABREVIATIONS

5'UTR :	Région 5' Non Traduite
ADAM :	Dinsintégrine α et Métalloprotéase
ADN :	Acide DesoxyriboNucléique
ADNc :	ADN complémentaire
Agr :	Régulateur de gènes accessoires
AHL :	Homosérine Lactone
AIP :	Peptide auto-inducteur
AM :	Domaine amidase de l'autolysine
Apaf-1 :	Facteur d'Activation de l'Apoptose 1
APS:	PerSulfate d'Ammonium
ARN :	Acide RiboNucléique
ARNm :	ARN messenger
ARNp :	Transcrit de l'ARN 6S
ARNr :	ARN ribosomal
ARNt :	ARN de transfert
ASC :	Protéine Speck-like associée à l'Apoptose contenant un domaine de recrutement associé aux caspases
Atl :	Autolysine
ATP :	Adénosine TriPhosphate
Bcl-2 :	Lymphome à cellule B de type 2
BET :	Bromure d'Éthidium
BHI :	Bouillon cœur-cervelle
CaCl₂ :	Dichlorure de Calcium
CD 36 :	Marqueur de Différentiation 36
Clf :	Facteur d'agglutination
CMH :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMI :	Concentration Minimale Inhibitrice
Cna :	Adhésine au collagène
CR :	Récepteur du Complément
CytC :	Cytochrome C
DNase :	DésoxyriboNucléase
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
Eap :	Protéine d'adhérence extracellulaire
EDTA :	Acide ÉthylèneDiamineTétraAcétique
Efb :	Protéine extracellulaire de liaison au fibrinogène
Emp :	Protéine de liaison à la matrix extracellulaire

ERO :	Espèces Réactives de l'Oxygène
FAK :	Kinase d'Adhésion Focale
FAME :	Enzyme de Modification des Acides Gras
FnBP :	Protéine liant la fibronectine
GFP :	Protéine Fluorescente Verte
GL :	Domaine glucosaminidase de l'autolysine
GTPase :	Guanine TriPhosphatase
HEK 293 :	Cellule embryonnaire rénales humaine 293
Hsc 70 :	Protéine apparentée aux protéines de choc thermique 70
Hsp 60 :	Protéine de choc thermique 60
IFN γ :	Interféron γ
IgG :	Immunoglobuline G
IL :	InterLeukine
Isd :	Déterminants de surface régulés par le Fer
LB :	Bouillon Lysogène
LPS :	LipoPolySaccharide
LRR :	Domaine de Reconnaissance extracellulaire Riche en Leucine
LTA :	Acide LipoTechoïque
M-CSF :	Facteur de Stimulation des Colonies de Macrophages
MAP :	Protéine analogue au CMH de classe II
MBP :	Protéine liant le Maltose
MEC :	Matrice ExtraCellulaire
MgCl₂ :	Dichlorure de Magnésium
MOI :	Multiplicité d'Infection
MR :	Récepteur aux Mannose
MSCRAMM :	Composants de la surface bactérienne reconnaissant les molécules adhésives de la matrice cellulaire
NaCl :	Chlorure de Sodium
NET :	Piège Extracellulaire de Neutrophiles
NLR :	NOD-Like Récepteur
NLRP3 :	Famille des récepteurs NOD-like contenant un domaine pyrine 3
NOD :	Nucleotide Oligomerization Domain receptors
NTP :	Nucléoside TriPhosphate
PAMP :	Motifs Moléculaires Associés à un Pathogène
PCR :	Réaction en Chaîne par Polymérase
PCRq :	PCR quantitative
PLP :	Protéines Liant la Pénicilline
PNN :	PolyNucléaire Neutrophile
PRR :	Récepteurs de Reconnaissance de Motifs

PSM :	Moduline Phénol-Soluble
PVL :	Leucocidine de Panton-Valentine
QS :	Quorum Sensing
RBS :	Site de Fixation du Ribosome
RNase :	RiboNucléase
RNAseq :	Séquençage d'ARN
<i>S. aureus</i> :	<i>Staphylococcus aureus</i>
SAM :	S-AdénosylMéthionine
SAPI :	Îlot de Pathogénie de <i>S. aureus</i>
SARM :	<i>S. aureus</i> Résistants à la Méricilline
sARN :	ARN régulateur
SARP :	<i>S. aureus</i> résistants à la Pénicilline
Scavenger :	Éboueur
SCCmec:	Cassette Chromosomique Staphylococcique <i>mec</i>
SCV :	Petites Colonies Variantes
SDS:	Sodium Dodécyl Sulfate
SDS-PAGE :	Électrophorèse sur Gel de PolyACrylamide
SE :	Entérotoxine Staphylococciques
<i>SeI</i> :	Entérotoxines Staphylococciques <i>like</i>
SERAM :	Molécules Adhésives ayant un Répertoire de Sécrétion Élargi
SpA :	« Surfactant protein A » = Protéine A
Spr :	Small Pathogenicity island RNA
SRD :	Staphylococcus regulatory RNA database
TBE :	Tris Borate EDTA
TCA :	Acide TriChloroacétique
TEMED:	Tétraméthyléthylènediamine
TIR :	Toll/IL-1 Récepteur
TLR :	Toll-like Récepteur
TNFα :	Facteur de Nécrose Tumorale α
TNFR1 :	Récepteur 1 du TNF α
TSB :	Bouillon Trypticase Soja
TSST-1 :	Toxine 1 du Syndrome de Choc Toxique
VISA :	<i>S. aureus</i> à Résistance Intermédiaire à la Vancomycine
VRE :	Entérocoques Résistant à la Vancomycine
VRSA :	<i>S. aureus</i> Résistant à la Vancomycine
vWbp :	Protéine de liaison au facteur de von Willebrand

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus est une bactérie ubiquitaire, considérée à la fois comme un commensal de l'homme et comme un pathogène pour de nombreux mammifères. Actuellement, on estime qu'environ 30% de la population saine est colonisée par *S. aureus*. Cependant, ce pathogène va profiter d'une brèche de la peau et surtout d'un affaiblissement immunitaire pour devenir virulent et entraîner une infection. Chez l'homme, il peut entraîner un grand nombre de maladies, allant des infections cutanées bénignes pouvant guérir spontanément, aux infections systémiques comme les endocardites ou encore les septicémies, pouvant être mortelles.

De plus, cette bactérie possède une caractéristique forte préjudiciable pour la santé humaine qui est sa capacité à développer rapidement de multiples résistances aux antibiotiques. Or, le traitement des bactéries se fait aujourd'hui essentiellement à l'aide d'antibiotiques, ce qui commence à poser problème. En effet, *S. aureus* est capable d'acquérir des résistances plus rapidement que nous ne sommes capable de produire de nouvelles molécules. Cela aboutit à une impasse thérapeutique caractérisée par de nombreux échecs thérapeutiques et nous pousse à chercher des méthodes alternatives pour traiter les infections à staphylocoques multi-résistants aux antibiotiques. Lors de l'initiation d'une infection par la bactérie, de nombreux facteurs sont impliqués, tout d'abord les facteurs liés à l'hôte comme son état physiopathologique ainsi que son immunocompétence. Ensuite, on peut parler des facteurs liés au pathogène comme sa phase de croissance, ses facteurs de virulence ainsi que leurs régulations. Enfin, les facteurs liés aux interactions hôte-pathogène entrent aussi en compte. Tous ces facteurs peuvent ainsi être la cible de nouvelles thérapeutiques afin de lutter contre les infections staphylococciques.

C'est dans ce but que sont menés les travaux de l'équipe « Fonction, structure et inactivation d'acides ribonucléiques bactériens » du laboratoire INSERM U835. En effet, les études sont menées sur des petits ARN régulateurs qui font partie du réseau de régulation des facteurs de virulence de *S. aureus*. La première partie de ce travail consiste en une étude bibliographique sur *Staphylococcus aureus*, en se concentrant tout d'abord sur ses résistances aux antibiotiques et à son mécanisme d'infection, puis, sur la phagocytose par les macrophages humain et son échappement immunitaire. Enfin cette partie se finira par l'étude de la régulation des facteurs de virulence de *S. aureus*. La deuxième partie de ce travail est une étude expérimentale visant à identifier de nouveaux partenaires d'un ARN régulateur de *S. aureus* avec tout d'abord un descriptif des méthodes utilisées, ensuite une présentation des résultats qui ont été obtenus et enfin une discussion de ces résultats.

PARTIE I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE.

I] *Staphylococcus aureus*.

A/ Généralités.

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) est l'un des premiers agents pathogènes bactériens à avoir été décrit il y a plus de 130 ans par Sir Alexander Ogston [1] après l'analyse microscopique d'une centaine de pus provenant d'abcès humains [2]. C'est une bactérie appartenant à la famille des Staphylococcaceae dont le genre le plus important est celui des *Staphylococcus*, regroupant plus de 45 espèces dont les 3 principales sont *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus saprofiticus*. Les staphylocoques sont des bactéries à Gram positif, c'est-à-dire qu'ils possèdent une paroi cellulaire composée de plusieurs couches de peptidoglycanes empilées sur la membrane plasmique, qui représente chez cette souche 50% en poids des constituants de cette paroi [3]. A l'échelle macroscopique, les colonies apparaissent lisses, rondes et opaques tandis qu'à l'échelle microscopique on observe une morphologie caractéristique en forme de cocci d'environ 0,5-1µm de diamètre regroupés en amas qualifiés de « grappe de raisins » (Figure 1) [4] comme l'indique leur nom (« staphyle » signifie grappe de raisin en Grec et « coccus » signifie grain ou baie) [2]. Les staphylocoques sont des bactéries aérobies-anaérobies facultatives, immobiles, non sporulées, positives à la catalase, négatives à l'oxydase et fermentant le glucose sans production de gaz. Ce sont des bactéries mésophiles (croissance optimale à 37°C), neutrophiles (pH 7 optimal) et halophiles (se développent à de fortes concentrations en NaCl). *S. aureus* pour sa part se distingue des staphylocoques à coagulase négative puisqu'il en possède une. De plus, il possède une pathogénicité élevée, ainsi qu'une pigmentation dorée caractéristique, d'où son nom (Figure 2) [5], alors que les autres ont une coloration blanche.

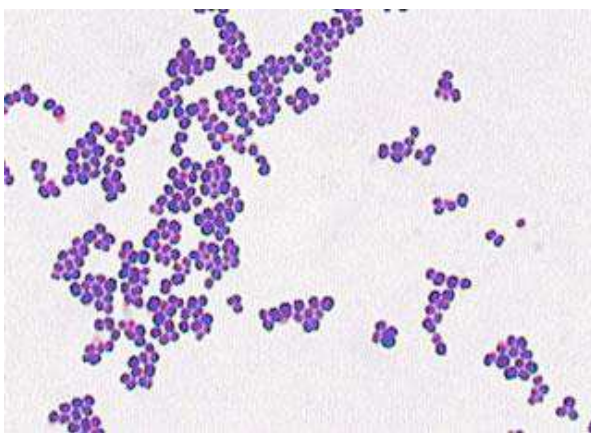


Figure 1 : *Staphylococcus* en coloration de gram [4].



Figure 2 : Colonies dorées de *Staphylococcus aureus* sur gélose Trypticase soja [5].

B/ Habitats.

S. aureus est une bactérie ubiquitaire, c'est-à-dire qu'on la retrouve dans l'air, l'eau, le sol, présentant des capacités importantes d'adaptation et de résistance au stress lui permettant ainsi de survivre dans de nombreux écosystèmes naturels. Nous sommes quotidiennement exposés à cette bactérie [6] qui est considérée comme un commensal de l'homme dont l'habitat principal est l'épithélium malpighien humide des narines [7]. Cependant, *S. aureus* peut aussi être retrouvé sur d'autres sites du corps comme les aisselles (8%), la poitrine / abdomen (15%), le périnée (22%), l'intestin (17-31%), et le vagin (5%) [6]. Actuellement, on estime qu'environ 30% de la population saine est colonisée par *S. aureus* et si on regarde plus particulièrement la colonisation des narines, 20% de la population présente un portage permanent, 60% sont des porteurs transitoires, tandis que les 20% restants ne portent jamais l'organisme [7], [8].

C/ Infections à *Staphylococcus aureus*.

Toutefois, malgré le fait que *S. aureus* puisse coloniser l'homme de manière asymptomatique, il se révèle également être un pathogène opportuniste à la fois chez l'homme et chez l'animal. En effet, il va profiter d'une brèche de la peau et surtout d'un affaiblissement du système immunitaire pour devenir virulent et entraîner une infection, pouvant se développer dans pratiquement tous les organes [9]. Chez les bovins, *S. aureus* est responsable de mammites avec des symptômes variables. Il provoque une augmentation modérée à forte du nombre de cellules somatiques dans le lait, ce qui altère sa qualité et entraîne des pertes économiques importantes, de l'ordre de 100 à 200\$ par vache atteinte [10] [11]. Chez l'homme, la transmission se fait principalement par contact avec une personne colonisée et *S. aureus* peut ensuite entraîner un grand nombre de maladies. Celles-ci, vont des infections cutanées bénignes pouvant guérir spontanément telles que des impétigos ou des dermatites [3], aux infections invasives graves comme les pneumonies, les endocardites, les ostéomyélites ou encore des chocs septiques, pouvant être mortelles [3] [12]. De plus, *S. aureus* est capable de produire des entérotoxines dans les aliments à l'origine d'intoxications alimentaires staphylococciques. Ces intoxications sont principalement dues à l'entérotoxine A puisqu'elle est thermorésistante et ne sera donc pas éliminée lors de la cuisson [13]. On comprend donc, au vu de tous ces éléments, l'importance de l'étude de ce pathogène, fortement impliqué dans le domaine de la santé humaine.

II] Résistance aux antibiotiques.

A/ Définition des antibiotiques et historique de leur découverte.

Tout d'abord, qu'est-ce qu'un antibiotique? Selon Jacques Berthet, d'après la définition tirée de son dictionnaire de la biologie, un antibiotique est « une substance ayant la capacité de tuer les bactéries (effet bactéricide) ou d'inhiber leur multiplication (effet bactériostatique) ». Mais un peu d'histoire pour commencer: la découverte du premier antibiotique, la pénicilline G, est l'œuvre tout à fait fortuite de Sir Alexander Flemming en 1928. Fleming, qui avait laissé des boîtes de pétri contenant des cultures de *S. aureus* à l'air libre a remarqué que celles-ci avaient été accidentellement contaminées par le champignon *Penicillium notatum* et que ce champignon inhibait la croissance de *S. aureus*. Cependant, il fallut attendre 1940 pour que Chain et Florey réussissent là où Duchesne et Fleming échouèrent, en validant d'abord son action antibiotique *in vivo*, puis en réalisant sa purification, conduisant à sa production industrielle en 1942 [14]. Cela marqua le début de la découverte de nombreux antibiotiques avec notamment la Streptomycine permettant le traitement de la tuberculose en 1943, les Tétracyclines en 1949 ou encore l'Erythromycine qui est le premier Macrolide en 1952 pour n'en citer que quelques-uns (Figure 3) [15].

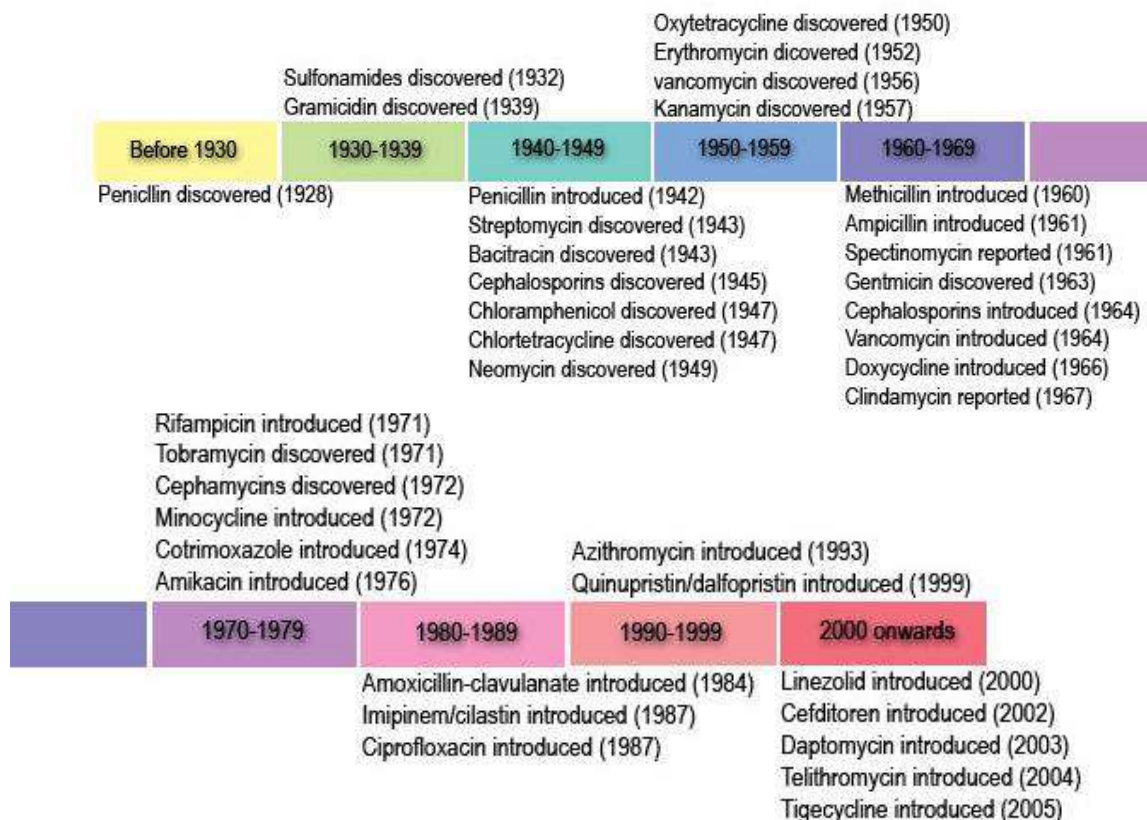


Figure 3 : Découverte et introduction des différents antibiotiques depuis la découverte de la pénicilline en 1928 [15].

Actuellement on compte une quinzaine de classes d'antibiotiques qui agissent sur des cibles spécifiques (Figure 4) [17]:

- les β -lactamines, la fosfomycine et les glycopeptides inhibent la synthèse de la paroi bactérienne.
- les quinolones, les sulfamides, la rifampicine et le triméthoprime inhibent la répllication/transcription de l'ADN.
- les aminosides, les tétracyclines, les macrolides et apparentés (lincosamides et streptogramines), les phénicolés (chloramphénicol), l'oxazolidinone, l'acide fusidique et la mupirocine inhibent la synthèse des protéines.
- les polymyxines et la daptomycine inhibent la respiration cellulaire [16].

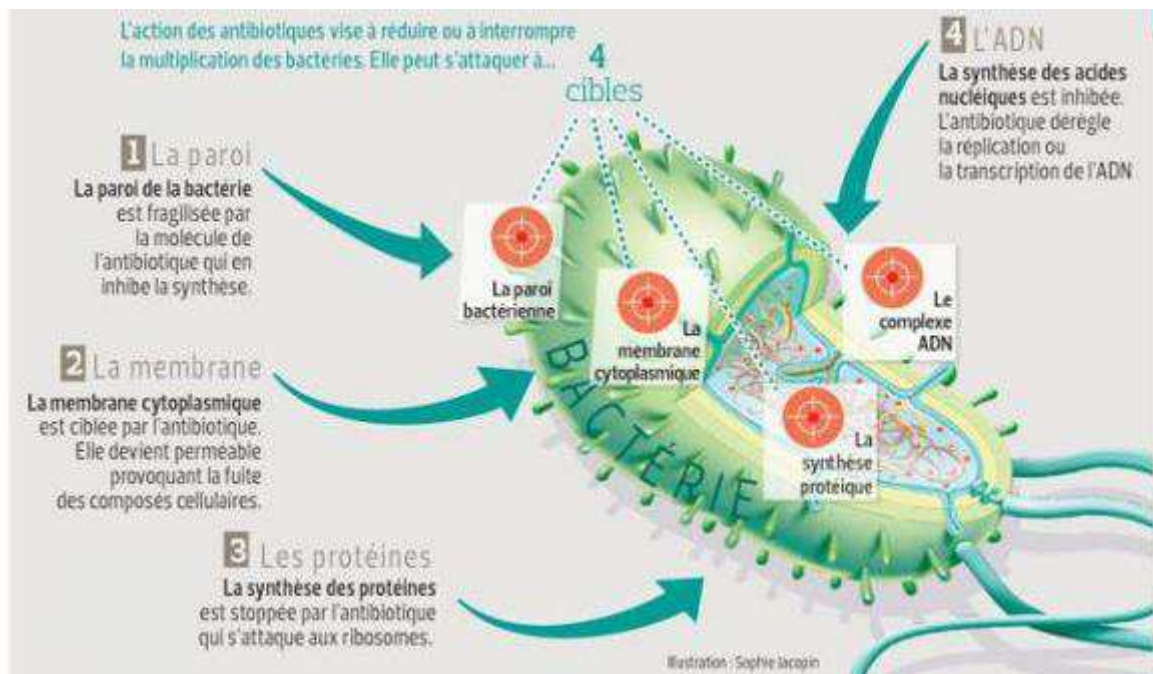


Figure 4 : Différents modes d'action des antibiotiques au niveau de la bactérie [17].

B/ Résistance aux antibiotiques.

On parle de résistance aux antibiotiques quand il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique au décours d'une antibiothérapie bien conduite, aux posologies validées. A l'inverse, on parle de sensibilité quand il existe de fortes probabilités de succès thérapeutique lors d'un traitement aux posologies validées. Il s'agit d'une définition clinique de la résistance aux antibiotiques. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, une bactérie est dite résistante, quand elle supporte des concentrations d'antibiotiques plus élevées que celle qu'il est possible d'atteindre *in vivo* après administration, ou que celle qui inhibe le développement de la majorité

des souches de la même espèce [18]. La méthode normalisée nous permettant de caractériser la résistance d'une souche bactérienne est l'antibiogramme (Figure 5) [19].

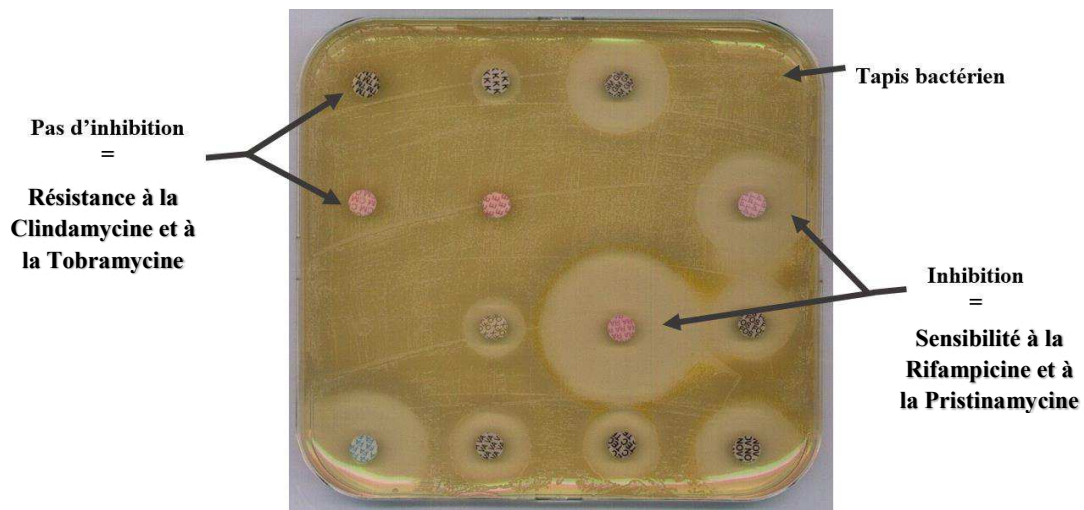


Figure 5 : Antibiogramme d'une souche multi-résistante de *S. aureus* [19]. On observe une sensibilité à la Rifampicine et à la Pristinamycine marquée par une inhibition de la croissance bactérienne, et une résistance à la Clindamycine et à la Tobramycine visible par une absence d'inhibition de la croissance.

Un antibiogramme consiste à ensemencer un inoculum particulier et normalisé d'une souche bactérienne sur un milieu défini et à placer différents disques contenant une concentration donnée en antibiotique. Ceci permet de déterminer le diamètre d'inhibition et la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour chaque antibiotique testé [20]. Si la CMI de la souche est supérieure à la CMI critique haute (C) de l'espèce (c'est-à-dire si le diamètre d'inhibition est inférieur au diamètre d'inhibition critique bas (d) de l'espèce), on considère que la souche est résistante à cet antibiotique (Tableau 1) [20]. Ainsi, il faudra une concentration plus importante en antibiotique pour inhiber la croissance de cette bactérie.

Tableau 1 : Détermination du phénotype de la souche en fonction de la CMI et du diamètre d'inhibition [20]. S = Sensible, R = Résistante, I = Intermédiaire, c = CMI critique basse, C = CMI critique haute, d = diamètre d'inhibition critique bas, D = diamètre d'inhibition critique haut.

	CMI (mg/L)	Diamètre d'inhibition Ø (mm)
S	$CMI \leq c$	$\text{Ø} \geq D$
R	$CMI > C$	$\text{Ø} < d$
I	$C < CMI \leq C$	$D \leq \text{Ø} < D$

1- Résistance naturelle.

On parle de résistance naturelle quand cette résistance est caractéristique d'une espèce bactérienne. Elle est portée par le chromosome ce qui lui permet d'être stable et transmissible à la descendance (= transfert verticale). Elle constitue également un caractère d'identification des bactéries et permet de définir le phénotype « sauvage » d'une bactérie [16]. Les Staphylocoques possèdent peu de résistances naturelles, elles concernent seulement le mécillinaam, l'aztréonam, les quinolones et la colistine [21]. En revanche, ils sont sensibles aux β -lactamines, aux aminosides, aux macrolides, aux synergistines, aux lincosamides, au fluoroquinolones, aux glycopeptides, à la rifampicine, à l'acide fusidique, à la fosfomycine et au cotrimoxazole. Enfin, comparé aux résistances naturelles, les résistances acquises sont beaucoup plus fréquentes.

2- Résistance acquise.

La résistance acquise, contrairement à la résistance naturelle, est seulement propre à certaines souches de l'espèce et a la particularité de se propager de façon importante. Elle peut être portée par le chromosome comme pour la résistance naturelle, mais également par les plasmides, ou des éléments génétiques mobiles (transmission verticale à la descendance, transmission horizontale entre bactéries, parfois d'espèces différentes). Elle détermine le phénotype de résistance acquise des bactéries et constitue un caractère épidémiologique. Elle s'acquiert soit par mutation sur un chromosome, soit par l'acquisition de gènes extra-chromosomiques ce qui est plus fréquent [16].

a) La résistance chromosomique.

Il s'agit de mutations qui ont lieu de façon spontanée lors de la réplication avec une fréquence de 10^{-9} . Ces mutations sont souvent présentes au préalable, et c'est l'utilisation de l'antibiotique qui va sélectionner la souche portant la mutation, au détriment des autres souches de l'espèce. Comme pour la résistance naturelle, elle est portée par le chromosome ce qui lui permet d'être stable et transmissible à la descendance [16].

b) La résistance par acquisition de gènes.

Comme son nom l'indique, il s'agit de l'acquisition par une bactérie d'un ou plusieurs mécanismes de résistance aux antibiotiques par l'intermédiaire de gènes d'origine :

- *extra-chromosomique* : le support de cette information est un élément génétique mobile qui peut être un plasmide ou un transposon, acquis par conjugaison ou plus rarement par transduction (par le biais d'un bactériophage) [16]. Un plasmide peut être présent naturellement chez une bactérie et est transmissible de manière horizontale ce qui permet une dissémination importante de la résistance. Les transposons eux, nécessitent une intégrase ou une transposase (pour lesquels ils codent eux même) afin d'être transmis, et permettent d'accentuer ce phénomène en disséminant la résistance entre des bactéries phylogénétiquement plus éloignées voir entre espèces différentes [22].

- *chromosomique* : il s'agit du phénomène de transformation du génome de la bactérie dans lequel s'est intégré le fragment de chromosome d'une autre bactérie préalablement lysée [16].

3- Mécanismes de résistance aux antibiotiques.

La résistance aux antibiotiques peut se faire par trois grands modes d'action (Figure 6) [23]:

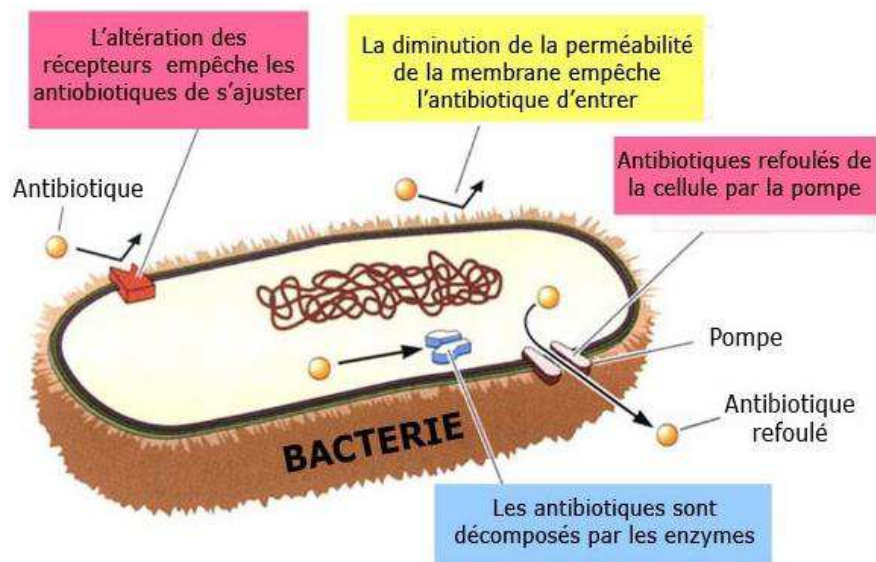


Figure 6 : Différents mécanismes de résistances aux antibiotiques [23].

a) Par action directe sur l'antibiotique :

La bactérie peut :

- produire une enzyme qui va inactiver l'antibiotique rendant la fixation à sa cible impossible (exemples des β -lactamases qui inactivent les β -lactamines) [16].
- produire une enzyme mutée qui ne pourra plus rendre actif l'antibiotique [16].

b) Par baisse de la concentration intracellulaire en antibiotique :

La bactérie peut :

- empêcher l'entrée de l'antibiotique par mutation au niveau des porines (exemple de OprD chez *Pseudomonas aeruginosa* qui lui confère une résistance à l'imipénème) ou par déficit d'un transport actif (exemple d'un déficit du transport du glycérol-3-phosphate et résistance à la phosphomycine) [16].
- forcer la sortie de l'antibiotique par surexpression de pompes à efflux qui vont l'expulser (exemple de la pompe à efflux NorA et la résistance de *S. aureus* aux fluoroquinolone) [16].
- séquestrer l'antibiotique qui ne pourra plus agir sur sa cible [16].

c) Par modification de la cible :

La bactérie peut :

- produire une enzyme modifiant cette cible qui perdra alors son affinité pour l'antibiotique (exemple des enzymes Van d'*Enterococcus* qui leur confère une résistance aux glycopeptides) [16].
- muter la cible ponctuellement ce qui aura pour conséquence de diminuer son affinité pour l'antibiotique (exemple de mutations affectant les gènes de structure de l'ARN 16S ou 23S et la résistance à l'oxazolidinone de *S. aureus*) [16].

4- Causes et conséquences de l'émergence de résistances.

Contrairement à ce que beaucoup pense, ce ne sont pas les antibiotiques qui créent des résistances, ils sélectionnent juste parmi une population les mutants possédant cette résistance et les favorisent au détriment des autres. De plus, c'est l'utilisation inadéquate de ces

antibiotiques qui est la cause première de l'émergence de ces résistances. En effet, le premier mésusage vient de la prescription puisque des médecins prescrivaient des antibiotiques pour traiter des infections virales ce qui était inutile puisque les antibiotiques n'agissent pas sur les virus. De plus, certains médecins prescrivaient trop souvent des antibiotiques à large spectre d'action au lieu de choisir des thérapeutiques ciblées. Les patients sont eux aussi responsables de cette émergence en ne respectant pas les posologies et / ou la durée de traitement, permettant ainsi à certaines bactéries de survivre et d'acquérir potentiellement une résistance. L'agriculture a également sa part de responsabilité par l'intermédiaire de l'élevage intensif dans lequel de faibles doses d'antibiotiques étaient ajoutées dans la nourriture animale pour leur faire prendre du poids. Cette surconsommation d'antibiotiques a entraîné la sélection de mutants multi-résistants dans les élevages capables, ensuite, de se propager à l'homme directement ou indirectement par le biais de l'alimentation. Cette pratique est interdite en Europe depuis 2006 et l'usage des antibiotiques est exclusivement réservé à l'usage prophylactique ou thérapeutique [24]. De plus, la présence d'antibiotiques intacts dans les eaux usées participe à la sélection environnementale d'organismes résistants. Le dernier problème vient des bactéries présentes à l'hôpital, puisqu'il s'agit d'un milieu où la présence d'antibiotiques est quasi-permanente. Cela permet l'émergence de mutants résistants qui peuvent ensuite utiliser le personnel soignant comme transporteur afin de disséminer à l'extérieur.

L'émergence de résistance entraîne de nombreuses conséquences en termes de santé publique. En effet, la pression de sélection favorise l'émergence de mutants qui prennent le dessus sur les souches sensibles ce qui rendra difficile la recolonisation des niches écologiques par ces dernières et provoquera ainsi leur élimination du milieu où il ne subsistera plus que des souches résistantes. Ainsi, les personnes s'infecteront principalement avec des bactéries multi-résistantes pouvant provoquer un retardement ou un échec du traitement classique (voir de tous les traitements disponibles) et ainsi entraîner une perte de chance de guérison avec de possibles complications voir décès. Cela va également augmenter le coût du traitement par l'utilisation de davantage de soins voir par l'usage d'autres antibiotiques plus cher et avec des effets secondaires potentiellement plus importants. Enfin, du fait de la difficulté à mettre au point de nouveaux antibiotiques et le faible nombre de ces derniers mis sur le marché ces dernières années (Figure 7) [25], on comprend d'autant plus l'importance de ce problème pour le traitement des infections bactériennes dans les prochaines années si l'on ne fait rien pour inverser cette tendance.

Évolution du nombre d'antibiotiques validés par la FDA durant les 30 dernières années.

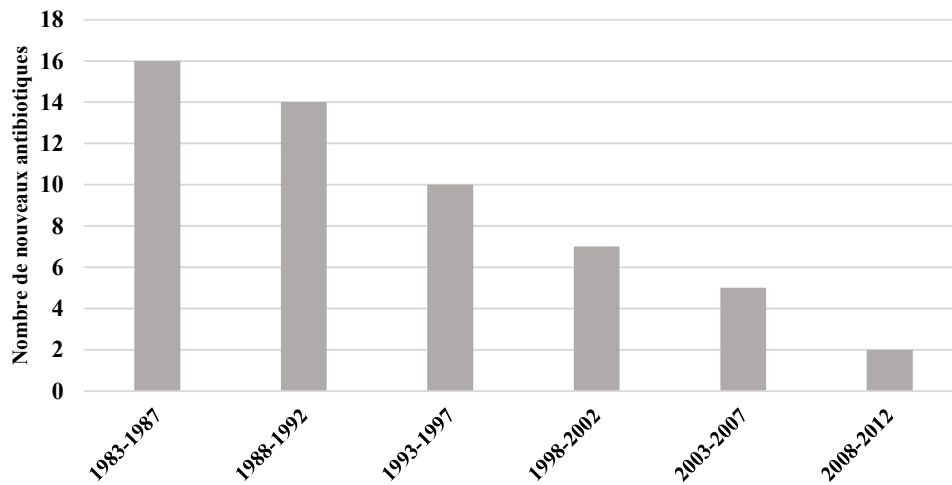


Figure 7 : Évolution du nombre d'antibiotiques validés par la FDA durant les 30 dernières années (adapté de [25]).

Pour lutter contre l'antibiorésistance, plusieurs actions sont possibles. Tout d'abord, éduquer les médecins afin de permettre une prescription raisonnée et ciblée des antibiotiques mais également des patients afin qu'ils suivent leur traitement jusqu'au bout (même s'ils se sentent mieux). Cela permettra de diminuer le risque d'apparition de souches résistantes par une baisse de la pression de sélection. De plus, il est important d'éduquer les gens sur les mesures d'hygiène nécessaires, comme se laver les mains régulièrement pour éviter la dissémination de souches de portage résistantes et notamment après avoir éternuer ou tousser. De même, la réalisation d'un suivi de la consommation d'antibiotique permettra de suivre l'évolution dans le temps des mesures de réduction de la consommation en antibiotiques. Ensuite, il est nécessaire de promouvoir l'usage de thérapies alternatives, notamment la phagothérapie qui consiste à utiliser des phages, qui sont des virus spécifiques de certaines bactéries, et qui permettent d'éliminer les bactéries pathogènes sans interférer avec la flore commensale. « Phagoburn », une étude clinique multicentrique utilisant la phagothérapie dans la lutte contre les infections cutanées chez les grands brûlés est actuellement en phase I/II [26]. Une autre méthode alternative est de retourner les facteurs de virulence de la bactérie contre elle, notamment les systèmes toxines-antitoxines, ou de les bloquer afin non plus de tuer la bactérie mais de bloquer sa virulence afin de la rendre inoffensive. Solecki et *al.* sont parvenus à modifier la structure d'une toxine de *S. aureus* pour la rendre plus bactéricide et moins hémolytique par exemple [27]. Il est également nécessaire de promouvoir le domaine de la

recherche afin d'approfondir les connaissances sur les mécanismes de résistance et trouver des armes de lutte efficace.

C/ Problème majeur de santé public.

S. aureus, comme il a été montré précédemment, est un agent bactérien fortement présent chez l'homme, tant en terme de commensal que de pathogène. Malheureusement, il pose un problème majeur pour la santé humaine dont la cause est sa capacité à développer ou acquérir rapidement de multiples résistances aux antibiotiques du fait de sa plasticité génomique élevée. Cette plasticité est basée principalement sur l'insertion de phages et d'autres éléments génétiques mobiles, et on observe également des plasmides supplémentaires dans certaines souches [9]. Cette capacité de *S. aureus* à acquérir ces résistances aux antibiotiques pose un problème majeur du fait de la difficulté à traiter les patients infectés ainsi qu'à éradiquer cette bactérie en milieu hospitalier.

1- Résistance à la pénicilline et à la méticilline.

Le développement de la pénicilline et son importante utilisation clinique dans les années 1940 a marqué le début de « l'ère des antibiotiques ». La pénicilline (Figure 8a, [33]) est une β -lactamine qui se fixe sur les protéines liant la pénicilline (PLP), bloquant ainsi leur activité et entraînant un arrêt de la croissance (= effet bactériostatique) par inhibition de la synthèse de peptidoglycane. Elle possède également une activité bactéricide par activation des muréine-hydrolases qui sont des enzymes auto-catalytiques de la bactérie provoquant une destruction de la paroi [28]. Cependant, dès 1942, il a été démontré que des souches de *S. aureus* étaient résistantes à la pénicilline et cela a marqué le début de la bataille contre la résistance aux antibiotiques de cette bactérie. Par la suite, la prévalence de ces *S. aureus* résistants à la pénicilline (SARP) a augmenté de façon spectaculaire conduisant à l'inefficacité de la pénicilline. En effet, 10 ans après son introduction, environ 80% des souches isolées étaient résistantes, nécessitant donc le développement rapide de traitements alternatifs [1], [29]. Cette résistance à la pénicilline est médiée par le gène *blaZ* codant pour une β -lactamase qui hydrolyse le cycle β -lactame des β -lactamines, les rendant ainsi inactives [29].

Pour lutter contre cette résistance à la pénicilline, la méticilline qui était la première pénicilline résistante aux pénicillinases, a été introduite en 1961 (Figure 8b, [33]). Mais de

même que pour la pénicilline, son introduction a été rapidement suivie par l'apparition de souches résistantes à la méticilline [29]. Depuis, ces *S. aureus* résistants à la méticilline (SARM) sont devenus endémiques dans les hôpitaux et les établissements de santé à travers le monde [1]. Cette résistance est médiée par le gène *mecA* codant pour une protéine de liaison à la pénicilline, la PLP2A qui est altérée et possède une faible affinité conférant une résistance contre toutes les β -lactamines [30], y compris les céphalosporines et les carbapénèmes [31]. Ce gène fait partie d'un élément génétique mobile retrouvé chez tous les SARM et porté par la cassette chromosomique staphylococcique *mec* (SCC*mec*) [29] [31].

2- Résistance à la vancomycine.

Avec l'apparition des SARM, il a fallu opter pour une alternative thérapeutique, la Vancomycine (Figure 8c, [33]) qui fait partie des glycopeptides [31]. Cette famille d'antibiotiques empêche le renouvellement du peptidoglycane en se liant au dimère D-alanyl-D-alanine en position terminale de la chaîne pentapeptidique du peptidoglycane [32]. Cependant, ici aussi des souches résistantes ont fait leur apparition avec deux cas de figure, les souches à résistance intermédiaire (VISA = *S. aureus* à Résistance Intermédiaire à la Vancomycine) ou les souches totalement résistante (VRSA = *S. aureus* Résistant à la Vancomycine) [31]. La particularité que l'on retrouve ici est qu'aucune des deux souches n'a dérivé de l'autre, elles possèdent chacune un mécanisme de résistance propre. Pour ce qui est des VISA, elles possèdent une paroi épaisse riche en peptidoglycane non réticulés, affichant leur dipeptide terminal D-alanyl-D-alanine. La vancomycine cible ce dipeptide au niveau du précurseur du peptidoglycane situé dans la membrane cellulaire (c'est-à-dire dans la couche interne de la paroi). Or dans cette paroi épaisse, le résidu D-alanyl-D-alanine joue le rôle d'un leurre et bloque la vancomycine au niveau des couches externes l'empêchant ainsi d'atteindre la couche interne où elle exerce normalement son activité inhibitrice. Les VRSA, quant à eux, possèdent un mécanisme de résistance issue des Entérocoques Résistants à la Vancomycine (VRE) codé par l'opéron *vanA* et lui conférant une résistance à la vancomycine et à la teicoplanine. Cet opéron code pour des gènes permettant la synthèse d'un précurseur modifié du peptidoglycane, avec un D-alanyl-D-lactate à la place du D-alanyl-D-alanine et ayant une faible affinité pour la vancomycine [31].

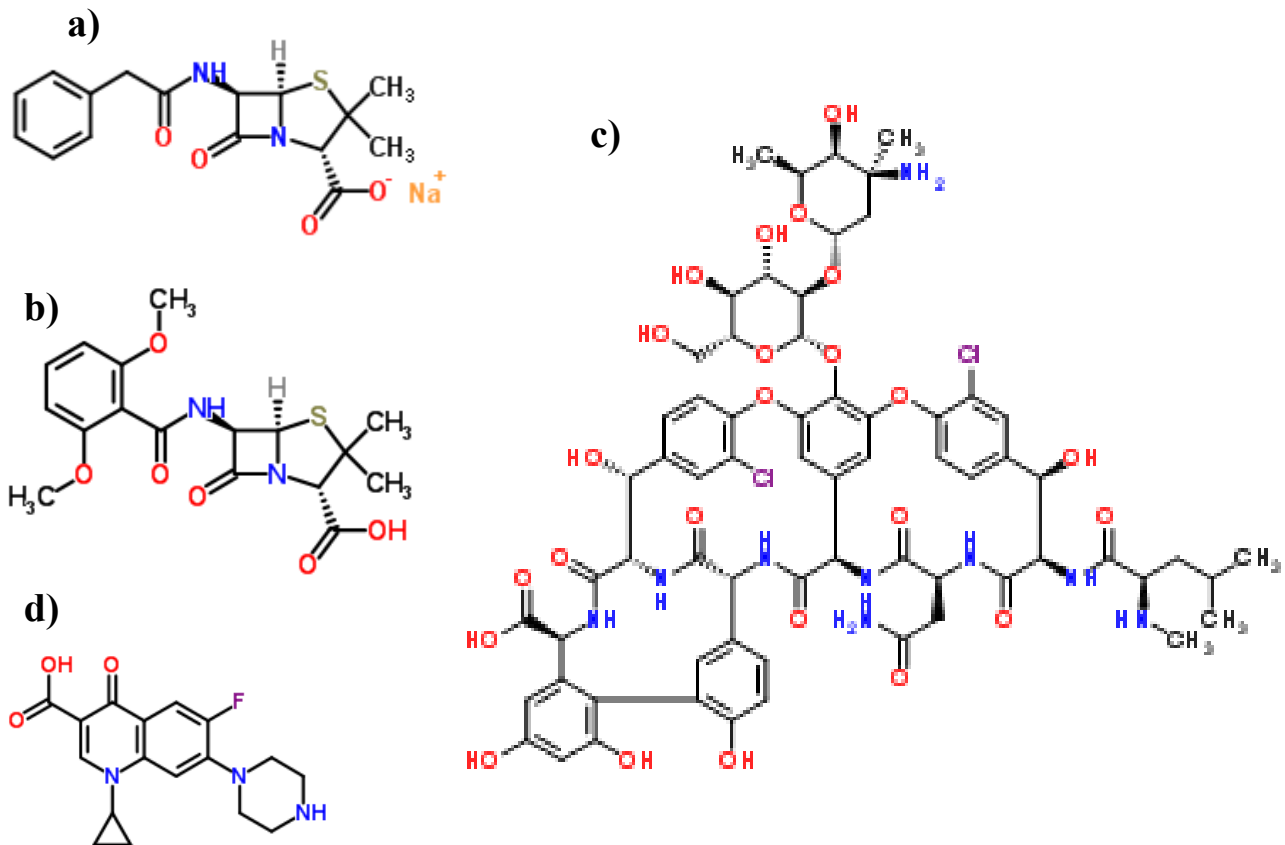


Figure 8 : Différents antibiotiques pour lesquels il existe une résistance acquise chez *S. aureus* [33].
a) Pénicilline b) Mécicilline c) Vancomycine d) Ciprofloxacine

3- Résistance aux fluoroquinolones.

Les fluoroquinolones sont des antibiotiques qui agissent sur la synthèse de l'ADN puisqu'ils interagissent avec le complexe ADN-topoisomérase (ou ADN-ADN gyrase) et inhibent son activité. Or il s'agit d'une enzyme indispensable pour la survie de la bactérie puisqu'elle permet le dépliement de l'ADN afin de libérer l'accès pour l'ADN polymérase lors de la réplication [34]. Des résistances sont apparues très rapidement chez les souches résistantes à la méticilline, après l'introduction de la ciprofloxacine (Figure 8d, [33]). Cette résistance est due à une mutation spontanée qui provoque un changement d'acide aminé dans la structure de la topoisomérase, lui conférant une grande résistance aux fluoroquinolones. La mutation principale a lieu au niveau de la sous-unité ParC de la topoisomérase IV et la seconde au niveau de la sous-unité GyrB de l'ADN gyrase. De plus, chez certaines souches on observe également une surexpression de la pompe à efflux NorA contribuant à ce phénotype de résistance [31].

Actuellement, les dernières molécules utilisées contre *S. aureus* sont la daptomycine et le linezolide, mais leur utilisation reste limitée et coûteuse et des souches résistantes ont déjà été reportées. Pour conclure, le choix de l'antibiothérapie doit être adapté à la souche en cause, sa localisation, la gravité de l'infection ainsi que l'état physiologique du patient (niveau d'immunocompétence, allergies éventuelles). De plus, une fois les résultats de l'antibiogramme obtenus, le choix de la ou des molécules est relativement plus aisé. A chaque fois que cela est possible, une association entre une β -lactamine ou la vancomycine associée à la gentamicine est conseillée, en fonction de la sensibilité à la méticilline de la souche.

4- *Staphylococcus aureus* et infections nosocomiales.

Une infection nosocomiale est une infection qui apparaît au cours ou à la suite d'une hospitalisation, à condition que celle-ci soit absente au moment de l'admission à l'hôpital. Dans la pratique, il faut considérer un délai de 48H ou un délai correspondant au temps d'incubation du pathogène si celui-ci possède un délai spécifique d'incubation (comme les virus par exemple). L'incidence des infections nosocomiales est d'environ 5% ce qui représente 750 000 cas/an en France dont environ 9000 décès directs ou indirects [35], c'est-à-dire, par comparaison, 2,5 fois plus que le nombre de tués sur les routes en 2015 (3464 morts en 2015, [36]) et dont on ne compte plus les campagnes de prévention. De plus, les souches acquises à l'hôpital ont de fortes chances d'être résistantes à un ou plusieurs antibiotiques du fait de la forte pression de sélection qui y règne, permettant ainsi une dissémination de ces souches hors du milieu hospitalier.

Lors d'une hospitalisation il existe de nombreux facteurs de risque pouvant aboutir à une infection nosocomiale. Tout d'abord les facteurs liés aux patients, il y a plus de risque chez les patients âgés et les jeunes enfants ainsi que chez les personnes immunodéprimées ou souffrant de maladies chroniques (diabète, obésité). Les personnes hospitalisées pour des pathologies graves et qui sont donc affaiblies par leur maladie sont également plus à risque. Enfin, les patients porteurs sains ont plus de risques d'être infectés par ces souches [12], notamment en cas d'effraction de la peau ou d'état d'immunosuppression. Les facteurs liés aux soins sont également en cause avec tout d'abord les actes de soins invasifs (chirurgie, intubation, cathéter, sonde urinaire) ainsi que les méthodes invasives de diagnostic (endoscopie, piqûre) puisque dans ces conditions, on observe une effraction de la peau ou bien la mise en

place dans un organe d'un dispositif externe pouvant favoriser la colonisation et la croissance de germes. Enfin une mauvaise hygiène et / ou aseptie du personnel soignant, mais également des locaux ou des instruments de soins vont aussi favoriser la prolifération de bactéries pathogènes et donc pouvoir être à l'origine d'infections nosocomiales.

Les principales infections sont les infections du tractus urinaire (30%) principalement dues aux sondes urinaires, les infections respiratoires basses comme les pneumonies (16,0%) liées aux intubations ainsi qu'aux sondes gastriques, les infections du site opératoire (13,5%) suite à une chirurgie et enfin les bactériémies / septicémies (10,1%) causées par tout dispositif intravasculaire [37]. Si l'on examine maintenant les souches retrouvées dans ces infections nosocomiales, on remarque que *Staphylococcus aureus* est isolé dans 16% de ces infections ce qui le place en 2^{ème} position juste derrière *Escherichia coli* (26%) et devant *Pseudomonas aeruginosa* (8%), responsables à elles trois de 50% de ces infections [37]. De plus, *S. aureus* possède également un large éventail de facteurs de virulence qui sont à la base de son pouvoir pathogène mais lui permettent aussi d'échapper aux défenses immunitaires de l'hôte afin de survivre et persister. Les différentes combinaisons de ces facteurs associés aux nombreuses résistances aux antibiotiques observées mais également les différents sites possibles d'infection, ainsi que la variabilité de la réponse immunitaire de l'hôte explique la vaste gamme de symptômes cliniques liés aux infections à *S. aureus* et on comprend pourquoi il représente actuellement un problème majeur de santé publique à travers le monde [11].

III] Mécanisme d'infection.

Staphylococcus aureus est un pathogène opportuniste qui agit en plusieurs étapes afin de provoquer une infection locale ou généralisée chez un hôte. En effet, il a tout d'abord besoin de coloniser l'hôte puis de traverser la barrière épithéliale afin de pénétrer dans l'organisme. Une fois à l'intérieur, il lui faudra échapper aux réponses de l'hôte puis se propager afin de l'envahir et de déclencher une infection [38]. Chacune de ces étapes fait intervenir différents facteurs de virulence, essentiels à la pathogénicité de *S. aureus*. Cela associe des composants de la surface bactérienne pour l'adhésion aux cellules et tissus de l'hôte, des toxines sécrétées, des enzymes qui contribuent à la détérioration des tissus et à la diffusion et, enfin, des molécules immunomodulatrices pour contourner le système immunitaire de l'hôte [39].

A/ Colonisation.

La colonisation de l'hôte, c'est-à-dire l'adhérence bactérienne aux éléments de la matrice extracellulaire (MEC) et / ou aux cellules de l'hôte (principalement les cellules épithéliales pour *S. aureus*) représente l'étape cruciale, essentielle au développement d'une infection. Cette colonisation se fait en dehors de toute lésion préalable mais est cependant favorisée par toute effraction de la barrière cutané-muqueuse, qui représente la première barrière de défense contre les pathogènes. Afin de promouvoir cette colonisation, *S. aureus* exprime divers facteurs, appelés adhésines, facilitant sa liaison à la surface de la peau ainsi que sa survie [40]. Au sein de ces adhésines, on retrouve deux groupes distincts, les « Composants de la surface bactérienne reconnaissant les molécules adhésives de la matrice cellulaire » (MSCRAMM) et les « Molécules adhésives ayant un répertoire de sécrétion élargi » (SERAM) [41].

1- MSCRAMM = Composants de la surface bactérienne reconnaissant les molécules adhésives de la matrice cellulaire.

Les MSCRAMM sont des protéines liées de manière covalente aux peptidoglycane de la paroi bactérienne de *S. aureus* comprenant principalement les « Protéines liant la fibronectine » A et B (FnBP), les « Facteurs d'agglutination » A et B (Clf), les « Adhésines au collagène » (Cna), la protéine A (SpA pour « Surfactant protein A ») et les « Déterminants de surface régulés par le Fer » A et B (Isd), permettant la liaison à des composants de surface tels que la fibronectine, le fibrinogène, le collagène et les cytokératines (dérivés des kératinocytes

de l'épiderme ou de l'épithélium nasal) [40], [42], [43]. Les MSCRAMM possèdent une structure proche avec des domaines conservés entre les différentes protéines (Figure 9, [44]). Tout d'abord, on retrouve une séquence signal « S » en N-terminal, nécessaire à la sécrétion des protéines par le système Sec-dépendant. Au niveau C-terminal on retrouve le domaine d'ancrage à la paroi bactérienne « W », riche en résidus proline et glycine ou composé d'une répétition du dipeptide Ser-Asp, et le domaine d'ancrage à la membrane bactérienne « M », riche en acides aminés chargés positivement, qui sont hydrophobes et séparés par une séquence consensus LPXTG (Leu-Pro-X-Thr-Gly) [44]. Ce motif est la cible d'une transpeptidase spécifique, appelée « sortase » qui permet l'ancrage de la protéine au niveau du peptidoglycane [45].

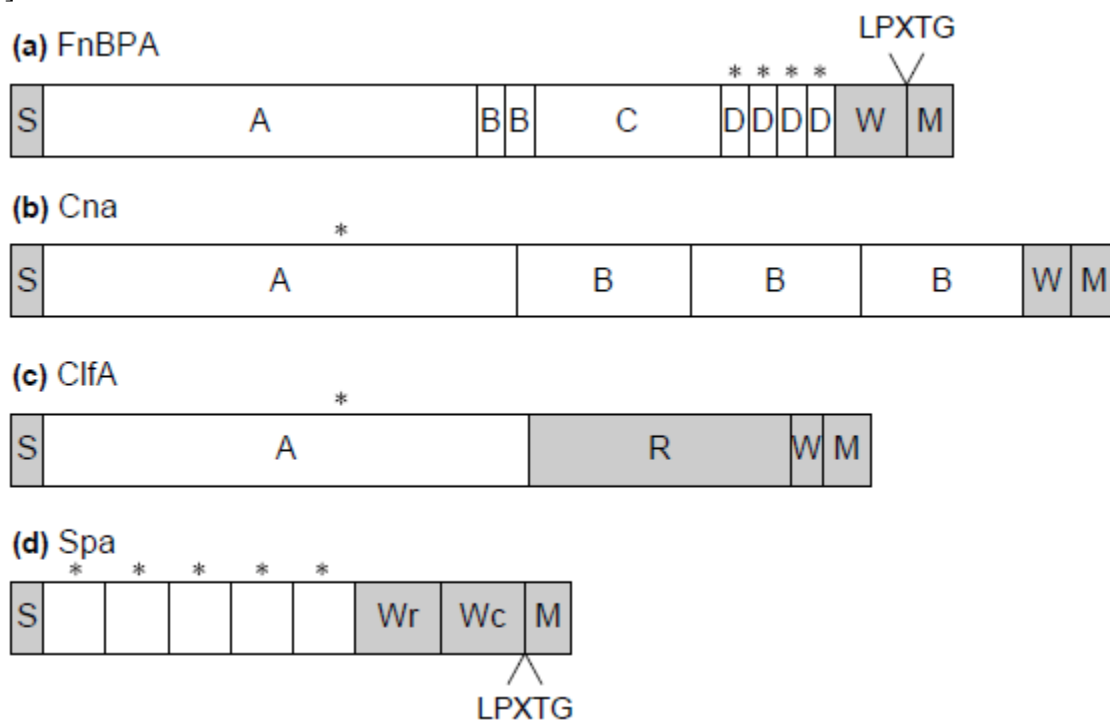


Figure 9 : Organisation structurale des MSCRAMM [44]. Les astérisques représentent les domaines de fixation au ligand. S = Séquence signal, W = Domaine d'ancrage à la paroi bactérienne, M = Domaine d'ancrage à la membrane bactérienne.

a) FnBP.

Il s'agit de la protéine de liaison à la fibronectine dont les plus connus sont les FnBPA et FnBPB qui sont des protéines apparentées. Elles possèdent un domaine de liaison « A » au fibrinogène et à l'élastine à l'extrémité N-terminale, impliqué dans la formation de biofilm [46], et un domaine de liaison « D » qui se compose d'une répétition de 3 à 5 motifs à l'extrémité C-terminale (Figure 9, [44]). La fibronectine est une glycoprotéine retrouvée sous deux formes, multimérique insoluble au niveau de la matrice extracellulaire et dimérique soluble dans les

fluides corporels [45] ce qui explique les deux fonctions principales des FnBP. En effet, les FnBP se lient au niveau de la MEC par l'intermédiaire de la fibronectine, mais elles se fixent également aux caillots de plasma [44]. De plus, les FnBP ont un rôle dans l'internalisation de *Staphylococcus aureus* par différentes cellules hôtes, sujet traité dans une des parties suivantes (*C/ Internalisation*).

b) Cna.

La protéine de liaison au collagène (Cna) possède un domaine de liaison « A » qui médie l'adhérence bactérienne au collagène et des domaines répétés « B » dont la fonction n'est pas encore claire (Figure 9) [44]. Cette protéine permet l'adhérence de *Staphylococcus aureus* au niveau des cartilages et elle serait également impliquée dans les infections osseuses et articulaires. De plus, elle semble jouer un rôle dans la virulence et est absente chez la majorité des souches de *S. aureus* contrairement aux autres MSCRAMM [44].

c) Clf.

Les facteurs d'agglutination A et B (Clf), aussi appelés « protéines de liaison au fibrinogène » permettent, comme leur nom l'indique, de se fixer aux fibrinogènes à l'extrémité C-terminale de leurs chaînes γ [44]. Le fibrinogène, comme la fibronectine, est une glycoprotéine présente sous forme soluble dans le plasma et insoluble au niveau de la matrice extracellulaire. Ces facteurs d'agglutination permettent l'adhésion aux caillots de plasma et, surtout, l'agrégation des bactéries entre elles, avec une affinité élevée en présence de plasma ce qui représente un facteur de virulence lors de l'infection des plaies [44] [47]. Ils possèdent un domaine particulier « R » composé d'une répétition du dipeptide Asp-Ser, liant le domaine de liaison au fibrinogène « A » et le domaine d'ancrage à la paroi bactérienne « W » (Figure 9) [44]. Ce domaine agit comme une tige et permet la présentation du domaine « A » au ligand afin que celui-ci puisse se fixer dessus [44].

d) SpA.

La protéine A (SpA) est une protéine de *S. aureus* ayant une masse moléculaire de 42kDa. Il s'agit d'une protéine conservée et multifonctionnelle. Elle a la particularité d'être à la fois ancrée à la surface de la bactérie via son motif LPXTG à l'extrémité C-terminale (Figure 9) [44], mais elle est également sécrétée dans le milieu. Elle contient 5 domaines homologues (E, D, A, B et C) au niveau N-terminal pouvant chacun se fixer à plusieurs ligands comme le

facteur de von Willebrand, la région Fc γ des immunoglobulines G (IgG). Cependant, seuls les domaines D peuvent se lier à la région Fab des chaînes lourdes des immunoglobulines M [48]. La protéine A possède des propriétés d'adhésine par sa fixation au facteur de von Willebrand qui lui, intervient dans l'adhésion des plaquettes au niveau de l'endothélium lésé [49]. De plus, la protéine A joue également un rôle dans l'immunomodulation. Tout d'abord par sa fixation à la région Fc γ des IgG qui va permettre à la bactérie d'en recouvrir sa surface, mais dans une mauvaise orientation entraînant ainsi une diminution de leur reconnaissance par les polynucléaires neutrophiles (PNN) et donc un échappement à la phagocytose. Ensuite, sa liaison à la région Fab des chaînes lourdes des immunoglobulines M (un récepteur des lymphocytes B), va provoquer une expansion clonale responsable de l'apoptose de ces lymphocytes. Cette immunomodulation va ainsi donner le temps nécessaire à la bactérie pour adhérer à la surface de la peau ou des muqueuses [48]. Enfin, il a également été montré que cette protéine pouvait activer le système du complément et se lier au récepteur du TNF α , le TNFR1, provoquant ainsi une inflammation délétère pour l'épithélium respiratoire par perturbation de ses fonctions [50]. On comprend donc l'importance de cette protéine comme facteur de virulence lors de l'infection de l'hôte par *S. aureus*.

e) Isd.

La restriction en fer est un signal environnemental indiquant souvent une interaction hôte-pathogène. Quand *Staphylococcus aureus* est présent au niveau de la muqueuse nasale, il exprime plusieurs protéines de déterminant de surface régulées par le fer, les Isd. Ces Isd sont régulées positivement en conditions de restriction en fer ce qui arrive en phase de croissance et peut contribuer à l'infection des hôtes mammifères [51]. Le système Isd comporte 9 protéines (IsdA-IsdI) qui contiennent un ou plusieurs motifs de transporteur de fer (NEAT) pouvant se lier à l'hémoglobine. De plus, 4 d'entre elles (IsdA, IsdB, IsdC et IsdH) sont ancrées dans la paroi bactérienne. Ces protéines sont impliquées dans l'acquisition de fer et dans la survie sur la peau et les muqueuses, mais seule l'IsdA et l'IsdB jouent un rôle dans l'adhésion en favorisant respectivement l'adhésion bactérienne aux cellules squameuse et aux plaquettes [52]. De plus, l'IsdB joue un rôle dans l'internalisation qui sera développé dans la partie internalisation (*C/ Internalisation*). En plus des MSCRAMM, *S. aureus* sécrète un certain nombre de protéines ayant des propriétés de liaison à la matrice extracellulaire assurant ainsi le tropisme tissulaire spécifique et la colonisation, les SERAM.

2- SERAM = Molécules Adhésives ayant un répertoire de Sécrétion Élargi.

Ces protéines ne sont pas apparentées structurellement mais elles ont des propriétés communes qui sont notamment la liaison à des facteurs de l'hôte et / ou la médiation de l'adhérence bactérienne aux molécules, cellules ou tissus de l'hôte. De plus, elles jouent également un rôle dans l'interaction avec des ligands de l'hôte et partagent ainsi diverses activités notamment en interagissant avec les mécanismes de défenses de l'hôte [41]. Parmi ces SERAM on peut citer la coagulase, la protéine de liaison au facteur de von Willebrand (vWbp), la protéine extracellulaire de liaison au fibrinogène (Efb), la protéine de liaison à la matrix extracellulaire (Emp) et la protéine d'adhérence extracellulaire (Eap) [41].

a) Coagulase.

C'est une protéine sécrétée contenant un domaine de liaison à la prothrombine et une région conservée avec de multiples domaines répétés. La liaison de la coagulase par son domaine D1-D2 en N-terminal (Figure 10, [151]), à l'extrémité C-terminale des chaînes β de la prothrombine, aboutit à un changement de conformation et on appelle le complexe formé la « staphylothrombine ». Ce complexe actif permet ensuite la polymérisation du fibrinogène en fibrine. De plus, elle possède des domaines répétés « R » de liaison au fibrinogène à son extrémité C-terminale (Figure 10, [151]). La liaison à la prothrombine et au fibrinogène conduit à une coagulation localisée entraînant l'immobilisation des bactéries dans un abcès fournissant à celles-ci une protection contre les cellules immunitaires de l'hôte afin de permettre leur multiplication [53].

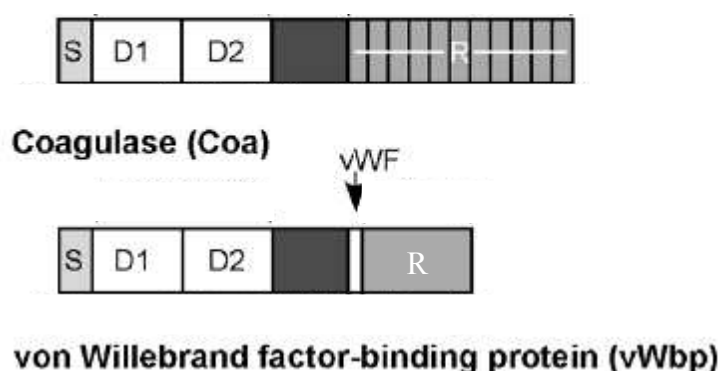


Figure 10 : Organisation structurale de la coagulase et de la protéine de liaison au facteur de von Willebrand (modifié de [151]).

S = Séquence signal,

D1-D2 = Domaine de liaison à la prothrombine,

R = Domaine de liaison au fibrinogène,

vWF = Domaine de liaison au facteur de von Willebrand.

b) Protéine de liaison au facteur de von Willebrand.

Cette protéine partage une homologie avec les domaines D1-D2 de la coagulase ce qui lui permet de lier la prothrombine (Figure 10, [151]), avec cependant une affinité inférieure, et donc de conduire également à une coagulation localisée permettant une agrégation des *S. aureus* et leur laissant ainsi le temps de se multiplier à l'abri du système immunitaire de l'hôte. De plus, la vWbp interagit avec le facteur de von-Willebrand grâce à une région de 26 acides aminés située à l'extrémité C-terminale (Figure 10, [151]) [41] [53]. De plus, chez *S. aureus*, la sécrétion de coagulase et de vWbp sont des stratégies de virulence clés qui favorisent la pathogénèse de la formation d'abcès et d'infections persistantes ainsi que de septicémies staphylococciques et d'endocardites. La formation d'abcès permet à *S. aureus* d'échapper à la clairance opsonophagocytaire et la formation d'événements thromboemboliques participent à la dissémination bactérienne dans tous les organes [53].

c) Efb.

La protéine extracellulaire de liaison au fibrinogène (Efb) interagit avec la chaîne A α du fibrinogène grâce à son extrémité N-terminale et inhibe ainsi l'agrégation plaquettaire. Il a également été montré qu'elle pouvait se lier aux plaquettes à la fois par un mécanisme dépendant du fibrinogène et par un mécanisme mettant en jeu les récepteurs plaquettaires GPIIb/IIIa (et donc indépendant de la liaison au fibrinogène), participant également à l'inhibition de l'agrégation plaquettaire [41]. De plus, par l'intermédiaire de son extrémité C-terminale pliée, cette protéine va assembler un bouclier protecteur de fibrinogènes autour de la bactérie et entraîner une altération de la clairance. Pour réussir cela, l'Efb lie le fragment C3b du complément à la surface de la bactérie via son domaine C-terminal et recrute le fibrinogène via son extrémité N-terminale [54]. Cette protéine joue également un rôle immunosuppresseur en interférant avec le système du complément et est essentielle à la survie prolongée de *Staphylococcus aureus* dans un modèle de cicatrisation de plaies chez le rat en provoquant notamment un délai dans la guérison [55].

d) Emp.

La protéine de liaison à la matrice extracellulaire (Emp) interagit avec plusieurs composants, à savoir la fibronectine, le fibrinogène, le collagène et la vitronectine. Cependant, aucun rôle de cette protéine n'a encore été mis en évidence au niveau du système endovasculaire bien qu'il ait été montré qu'elle possédait une forte affinité ($K_D = 120\text{pM}$) pour la vitronectine [9].

e) Eap.

La protéine d'adhérence extracellulaire (Eap), aussi appelée « Protéine analogue au CMH de classe II » (MAP) ou P70, possède un très large spectre de liaison avec les composants de l'hôte et est probablement la SERAM la plus étudiée. Elle est retrouvée chez 96% des souches cliniques de *S. aureus* et absente dans les autres espèces de Staphylocoques. Elle interagit avec de nombreuses protéines (vitronectine, fibronectine, fibrinogène, sialoprotéine osseuse, ostéopontine, prothrombine) et malgré leurs hétérogénéités, ces dernières fournissent une spécificité pour l'adhésion de *S. aureus* pendant le processus de cicatrisation [41]. De plus, les Eap peuvent se reconnecter à la paroi bactérienne, via la phosphatase neutre associée à la paroi, et ainsi promouvoir l'adhérence de *S. aureus* aux composants de l'hôte aussi bien qu'aux cellules (incluant les fibroblastes et les cellules épithéliales) [56]. Les Eap peuvent également se lier entre elles permettant ainsi une agrégation des bactéries entre elles et sont impliquées dans la colonisation et l'invasion de l'hôte. De plus, elles jouent un rôle dans l'altération de la guérison des plaies notamment observée dans les atteintes chroniques à *S. aureus* et constituent un puissant facteur de virulence au cours des infections staphylococciques [41]. En plus de ces fonctions d'adhésion, l'Eap possède des fonctions anti-inflammatoires et immunomodulatrices. En effet, l'Eap se fixe à l'ICAM-1 (Molécule d'Adhésion InterCellulaire 1), et abolie les systèmes d'adhésion leucocytaire fonctionnels empêchant ainsi l'extravasation des leucocytes et donc leur recrutement au niveau des plaies conduisant à un blocage de la réponse inflammatoire contre *S. aureus*. Pour le rôle immunomodulateur décrit, il semblerait que l'Eap induise indirectement une augmentation de la synthèse d'anticorps [41].

B/ Diffusion au sein de l'hôte.

Après la réussite de la colonisation de l'hôte par *Staphylococcus aureus*, celui-ci va pouvoir disséminer et envahir l'hôte. Pour cela, il va modifier l'expression de ses facteurs de virulence afin d'en produire de nouveaux, plus adaptés et permettant l'extension de l'infection. Il s'agit principalement de toxines sécrétées et d'enzymes qui vont contribuer à la détérioration des tissus et faciliter sa pénétration à l'intérieur de l'hôte (Figure 11, adapté de [12]).

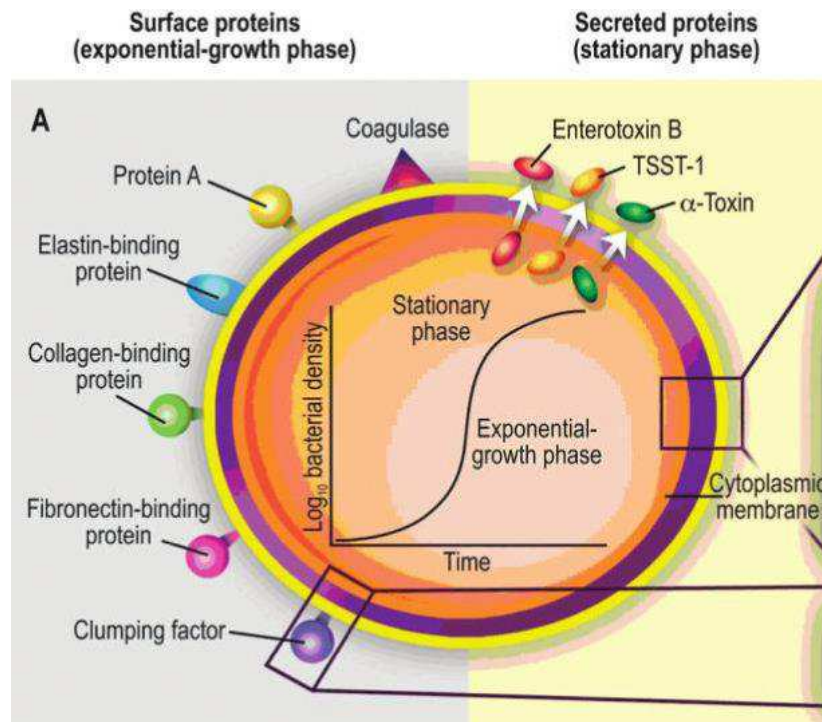


Figure 11 : Schéma représentant les différents facteurs de virulence de *S. aureus* et leur expression au cours de la croissance bactérienne (adapté de [12]).

1- Toxines.

Staphylococcus aureus produit de nombreuses toxines, définies par Bonventre comme des protéines de haut poids moléculaire, d'origine microbiologique, possédant des fonctions antigéniques et causant des perturbations dans les processus physiologiques normaux chez les animaux sensibles [57]. Parmi les toxines de *S. aureus*, on peut citer les principales qui sont les hémolysines, les leucocidines, les entérotoxines A et B (SEA et SEB), la toxine 1 du syndrome de choc toxique (TSST-1) et les modulines phénol-soluble (PSM) [59].

a) Hémolysines.

Il existe plusieurs hémolysines dont 4 principales (α , β , γ , et δ), possédant des propriétés hémolytiques, cytotoxiques et dermo-nécrotiques. Il s'agit d'une famille de toxines ayant un tropisme pour les membranes cellulaires et aboutissant à la formation de pores (sauf l'hémolysine β) responsable des effets toxiques [61].

Hémolysine α : Il s'agit d'une toxine de 33kDa présente chez une grande majorité de souches, codé par le gène *hla* et présent en simple copie dans le chromosome bactérien [58]. *Staphylococcus aureus* sécrète plusieurs monomères d'hémolysine α qui vont s'intégrer dans la membrane des cellules cibles, au niveau de leur récepteur la molécule ADAM10, où ils vont ensuite former un heptamère cylindrique qui va créer un pore de 1 à 2 nm. Ce pore va ensuite entraîner la sortie d'ions K^+ et l'entrée d'ions Na^+ et Ca^{2+} , provoquant un gonflement osmotique et aboutissant à la lyse de la cellule cible. La caractéristique de cette toxine est sa capacité à lyser les érythrocytes et en particulier les érythrocytes de lapins (1000 fois plus que les érythrocytes humains) [59], bien que de nombreux autres types cellulaires soient également sensibles chez l'animal (macrophage, cellules épithéliales, cellules rénales, fibroblastes, cellules musculaires lisses) [58]. Pour ce qui est de l'homme, 3 types cellulaires semblent particulièrement sensibles à l'hémolysine α , ce sont les plaquettes, les monocytes et les cellules endothéliales [58]. De plus, cette toxine induit également la production de cytokines comme l'IL-6, l'IL-1, l'IL-8 et le TNF α [60].

Hémolysine β : Certaines souches de *Staphylococcus aureus* peuvent également produire l'hémolysine β , qui, contrairement aux autres hémolysines, agit grâce à son activité sphingomyélinase et non par la formation de pores dans la membrane. Il s'agit d'une toxine de 35kDa codé par le gène *hlb*, qui va hydrolyser un lipide membranaire, la sphingomyéline. Cette hydrolyse aboutie à une mort de la cellule, résultant d'une modification de la fluidité membranaire de la cellule hôte et d'une déstabilisation de la bicouche lipidique [61]. Contrairement à l'hémolysine α , la toxine β est fortement hémolytique pour les érythrocytes de moutons mais pas pour ceux de lapins ce qui pourrait être dû aux différents types de sphingomyélines contenues dans ces érythrocytes [59]. De plus, cette toxine est plus efficace après une incubation à 10°C c'est pourquoi elle est appelée hémolysine « chaud-froid » [59] [60]. Chez l'homme, son importance dans les infections des poumons et de la cornée par *S. aureus* a été montrée, ainsi que son rôle dans l'inhibition de l'activité ciliaire des cellules épithéliales nasales [60].

Hémolysine δ : Il s'agit ici d'une toxine de seulement 3kDa, produite par 97% des *Staphylococcus aureus* et codé par le gène *hld*. Elle est capable de lyser les érythrocytes ainsi que différentes cellules de mammifère mais elle agit aussi sur des structures intracellulaires telles que les organelles liés à la membrane, les sphéroblastes et les protoplastes [60]. Il a été proposé que cette toxine puisse agir comme un surfactant qui perturberait les membranes cellulaires du fait de sa structure en hélice α amphiphile [59]. Cette toxine est également apparentée aux modulines phénol-soluble décrites un plus loin (*e*) *modulines phénol-soluble*).

Hémolysine γ : Cette hémolysine diffère des trois autres puisqu'il s'agit d'une toxine à deux composants (comme la leucocidine de Panton-Valentine traitée dans la partie suivante), dont chaque toxine est produite séparément comme une protéine sécrétée nommé S ou F (pour protéine éluée lentement = S ou rapidement = F). L'hémolysine γ est produite par toutes les souches de *S. aureus* et affecte les polynucléaires neutrophiles et les macrophages en plus de son activité lytique envers les érythrocytes. Elle est codée par 3 gènes: *hlgB* et *hlgC* qui sont transcrits en un simple ARNm et *hlgA* exprimé à part. Une fois traduits, on obtient des monomères de 32kDa pour HlgA, 32,5kDa pour HlgC et 34kDa pour HlgB [59]. Chaque monomère va ensuite pouvoir se fixer à la membrane. Enfin, l'association de 4 composants S (HlgA ou HlgC) et de 4 composants F (HlgB) va former un pore octamérique à travers la membrane responsable de la lyse de la cellule cible [61].

b) Leucocidines.

Les leucocidines sont des toxines synergohyménotropiques dont la plus connue et la plus étudiée est la leucocidine de Panton-Valentine (PVL). Il s'agit d'une toxine à deux composants, LukS-PV et LukF-PV, présente chez 2-3% des souches de *S. aureus*. Cette toxine a été décrite la première fois en 1984 par Van der Velde [62] qui l'avait appelée « substance leucocidine » du fait de sa capacité à lyser les leucocytes. Ce n'est qu'en 1932 que Panton et Valentine ont associé cette leucotoxine avec des infections de la peau et des tissus mous [63]. Les deux composants LukS-PV et LukF-PV sont sécrétés séparément et LukS-PV va initier la liaison à la membrane des PNN via les récepteurs du complément C5aR et C5L2 [64]. Ensuite, LukF-PV va se dimériser avec LukS-PV puis s'ensuit une oligomérisation en série avec une alternance des deux composés jusqu'à la formation d'un heptamère ou d'un octamère créant ainsi un pore dans la membrane [64]. A forte concentration, cette toxine induit la lyse des PNN,

alors qu'à faible concentration, elle induit un mécanisme d'apoptose des PNN passant par une liaison aux membranes mitochondriales [64]. La lyse des PNN va ensuite entraîner un relargage d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de médiateurs de l'inflammation aboutissant à une nécrose des tissus voisins (Figure 12) [64].

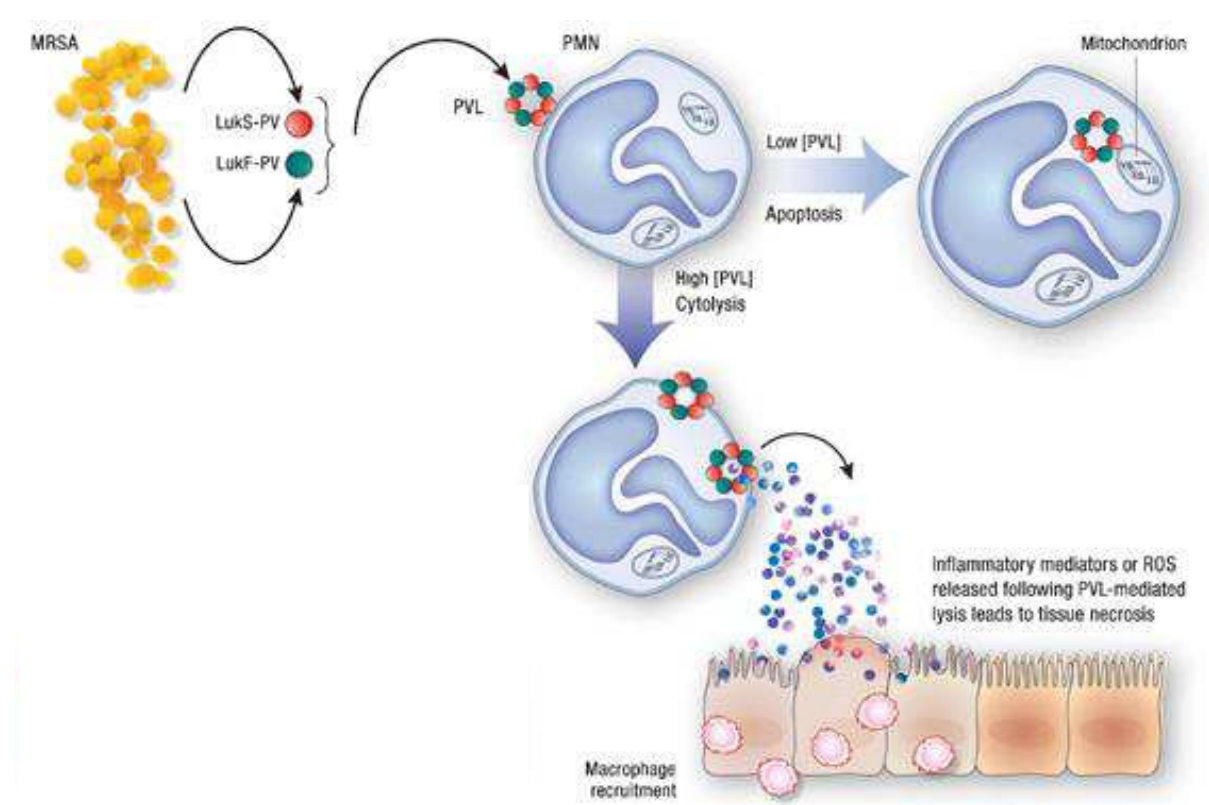


Figure 12 : Mécanisme d'action de la PVL [64]. Association de plusieurs monomères de LukS-PV et LukF-PV afin de former des pores et provoquer la lyse ou l'apoptose des PNN.

c) Entérotoxines.

Les entérotoxines sont des exotoxines gastro-intestinales puissantes de 22 à 28kDa, synthétisées par *S. aureus* et actives à des doses allant du nanogramme au microgramme. De plus, ces toxines sont résistantes à des conditions telles que la chaleur ou un faible pH, qui détruit la bactérie productrice, et résistantes aux enzymes protéolytiques ce qui leur permet de garder leur activité dans le tractus digestif après ingestion [65]. Il en existe 11 (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SER, SES, SET) et elles ont la particularité de causer des vomissements et des gastro-entérites dans un modèle de primate. De plus, elles ont des propriétés de super-antigènes et possèdent une structure tertiaire similaire avec notamment une liaison disulfure intramoléculaire [59] [65]. Parmi elles, les entérotoxines A, B, C et D sont

majoritairement impliquées dans les intoxications alimentaires avec notamment une forte prévalence des SEA (79% parmi 359 intoxications au Royaume-Unis, et 69,7% parmi 31 intoxications en France) [65]. On peut aussi ranger dans cette catégorie les entérotoxines-*like* (SE/J, SE/K, SE/L, SE/M, SE/N, SE/O, SE/P, SE/Q, SE/JU, SE/U2 et SE/V) qui ne possèdent pas l'activité émétique ou bien qui n'ont pas été testée pour cette activité et sont donc classées dans cette catégorie [65]. Ces 22 toxines (entérotoxines plus entérotoxines-*like*) peuvent être classées en 4 ou 5 groupes basés sur la comparaison de leur séquence en acides aminés (Tableau 2) [65]. Enfin ces entérotoxines sont responsable du syndrome de choc toxique qui sera développé dans la partie suivante.

Tableau 2 : Groupement des entérotoxines et des entérotoxines-*like* en fonction de leur séquence en acides aminés. SEH est placée dans le groupe 1 ou dans le groupe 5 en fonction des auteurs [65].

Groupe	SEs et SE/s
Groupe 1	SEA, SED, SEE, (SEH), SE/J, SE/N, SE/O, SE/P, SES
Groupe 2	SEB, SEC, SEG, SER, SE/U, SE/U2
Groupe 3	SEI, SE/K, SE/L, SE/M, SE/Q, SE/V
Groupe 4	SET
(Groupe 5)	(SEH)

d) Toxine du syndrome de choc toxique.

La toxine du syndrome de choc toxique (TSST-1) est codée par le gène *tst*, présent dans le chromosome bactérien au niveau de l'îlot de pathogénie 1. La prévalence des souches portant ce gène chez les porteurs sains est estimée entre 13 et 25%. La protéine est produite sous forme d'un précurseur qui est ensuite clivé pour donner une protéine mature de 22KDa. Cette protéine mature possède un fort pourcentage d'acides aminés hydrophobes ainsi qu'une résistance à la chaleur et à la protéolyse [59]. Cette toxine est la principale cause du syndrome de choc toxique caractérisé par une fièvre (\geq à 38,9°C), un rash, une desquamation, une hypotension et une défaillance multiviscérale pouvant aboutir à la mort [59] [66]. La TSST-1 provoque une activation excessive et non conventionnelle des lymphocytes T, aboutissant à une activation d'autres types cellulaires ainsi qu'à une libération de cytokines / chimiokines à l'origine du choc toxique [67].

e) Modulines phénol-soluble.

Les modulines phénol-soluble (PSM) sont de petites protéines amphiphiles qui contribuent à la pathogénicité et sont largement présentes chez *S. aureus*. Ces peptides sont codés à trois endroits différents sur le core génome (= génome cœur, comprenant les gènes communs à toutes les souches d'une même espèce) qui sont l'opéron *psma* codant les PSM α 1-PSM α 4, l'opéron *psm β* codant les PSM β 1 et PSM β 2 et la séquence codante de l'ARNIII codant pour la toxine δ [68] [69]. Les PSM sont regroupées en fonction de leur longueur, les peptides de type α (PSM α 1-PSM α 4 et la toxine δ) sont formés de 20 à 25 acides aminés de long tandis que les peptides de type β (PSM β 1 et PSM β 2) possèdent environ 44 acides aminés. En plus de ces 7 PSM, la cassette chromosomique staphylococcique *SCCmec*, qui porte le gène de résistance à la méticilline, code aussi une PSM appelée PSM-mec [68] [69]. La capacité des PSM à lyser les cellules eucaryotes est la contribution principale des PSM à la pathogénie de *S. aureus*. Le mécanisme de lyse étant indépendant d'un récepteur, elle peut théoriquement toucher tous les types cellulaires eucaryotes et les PSM se distinguent ainsi des autres toxines cytolytiques de *S. aureus* qui sont plus spécifiques d'un type cellulaire en particulier. Les PSM présentent une différence d'activité puisque les PSM α lysent fortement les leucocytes et les érythrocytes, la toxine δ est modérément cytolytique et les PSM β sont non lytiques [68]. De plus, il semblerait que les PSM α , à des concentrations de l'ordre du micromolaire, facilitent la mort des neutrophiles après la phagocytose de *S. aureus*. De plus à des concentrations encore plus faibles, de l'ordre du nanomolaire, ces PSM stimulent les leucocytes et contribuent à l'initiation d'une réponse pro-inflammatoire avec le recrutement et l'activation des neutrophiles aboutissant à une libération d'Interleukine 8. Les PSM sont également impliquées dans la structuration des biofilms et participent à la dissémination de ce biofilm [68] [69].

2- Enzymes.

En plus des toxines, *S. aureus* produit de nombreuses enzymes qui vont faciliter sa propagation locale à travers les tissus ainsi que son échappement vis-à-vis des défenses de l'hôte. Parmi ces enzymes on peut citer la staphylokinase, l'enzyme de modification des acides gras (FAME), la lipase, la protéase, la hyaluronidase et la collagénase.

a) Staphylokinase.

La staphylokinase est une enzyme produite par les souches lysogènes de *Staphylococcus aureus* mais également présente dans les autres souches de staphylocoques. Le gène *sak* codant pour cette enzyme est présent dans l'ADN de certains bactériophages et peut être transmis au génome de la bactérie. Le rôle de la staphylokinase comme facteur de virulence de *S. aureus* est due à son interaction avec le plasminogène et avec les défensines α [70]. La liaison au plasminogène forme un complexe capable de se lier à la fibrine et de la cliver, entraînant ainsi la dissolution des thrombus et la dissémination de *S. aureus* plus profondément au sein de l'hôte. La liaison aux défensines α , quant à elle, améliore la résistance à la phagocytose et protège la bactérie de l'activité bactéricide des défensines ce qui lui permet de survivre au sein de l'hôte [70].

b) Enzyme de Modification des Acides Gras (FAME).

Dans les abcès, les acides gras bactéricides sont la première ligne de défense de l'hôte contre les pathogènes. Pour lutter contre ces acides gras, *S. aureus* produit une enzyme, l'enzyme de modification des acides gras, qui est capable d'estérifier ces acides gras et ainsi d'inhiber leur activité bactéricide. Cette enzyme, exprimée dans 80% des souches de *S. aureus*, contribue ainsi à sa survie au sein de l'hôte et donc à sa pathogénicité [71].

c) Autres enzymes.

S. aureus sécrète aussi un groupe d'enzymes (lipase, protéase, hyaluronidase et collagénase) qui possèdent toutes une même fonction, celle de dégrader le tissu conjonctif de l'hôte afin de fournir les nutriments nécessaires à la survie et à la croissance de la bactérie. Du fait de leur rôle dans la dégradation des tissus, elles permettent une pénétration plus importante de *S. aureus* dans l'organisme. La lipase est également impliquée dans l'inhibition des acides gras bactéricides, en synergie avec la FAME. Les protéases, quant à elles, jouent aussi un rôle dans l'inhibition de l'activation et du chimiotactisme des neutrophiles, dans l'inhibition de leur activité et dans l'inactivation des peptides antimicrobiens ce qui en fait des enzymes très importantes pour la pathogénie de *S. aureus* [59] [72].

C/ Internalisation.

S. aureus a longtemps été décrit comme un pathogène extracellulaire, mais l'apparition de nouvelles souches invasives a révélé le rôle de l'internalisation dans les cellules hôtes pour la pathogénèse. Plusieurs études ont montré la capacité de *S. aureus* à pénétrer dans une vaste gamme de cellules hôtes comme les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les fibroblastes et ostéoblastes, mais également des cellules immunitaires comme les lymphocytes T, les macrophages et les neutrophiles [73] [74]. *S. aureus* a ainsi développé différents mécanismes moléculaire impliquant différents récepteurs afin de pénétrer dans ces cellules (Figure 13) [74].

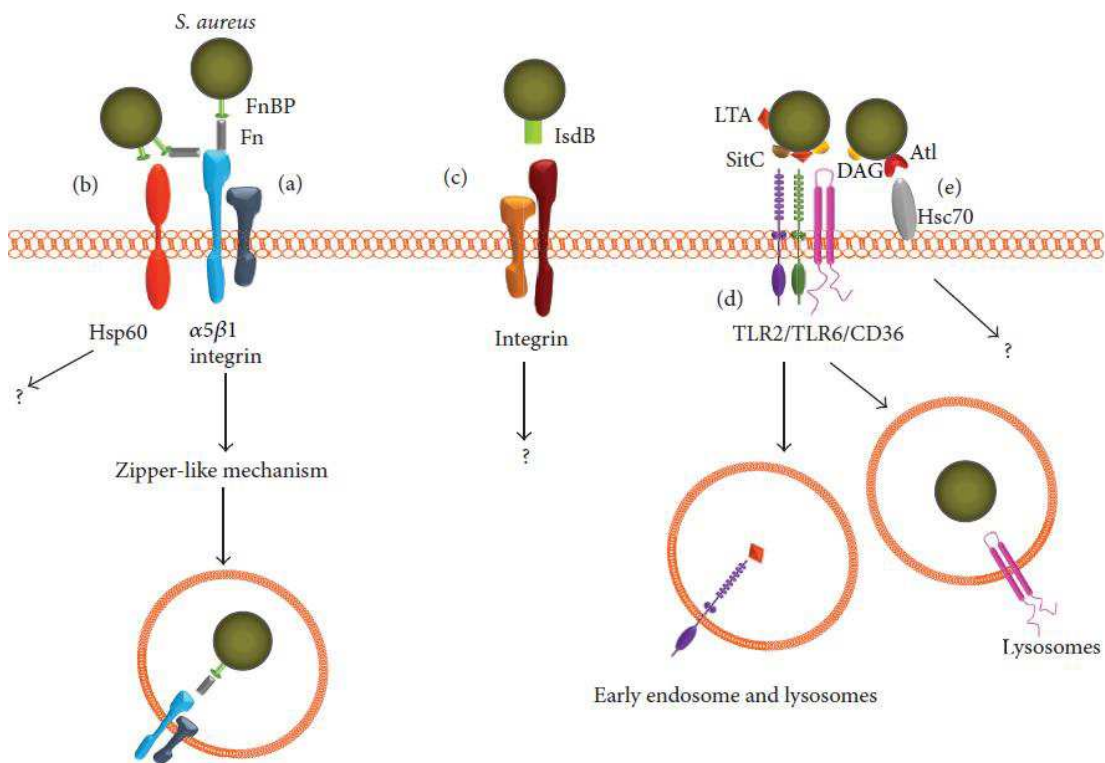


Figure 13 : Différents mécanismes et récepteurs impliqués dans l'internalisation de *S. aureus* par les cellules hôte. (a) Mécanisme impliquant l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ comme récepteur cellulaire et les FnBPs bactériennes via la fibronectine (Fn) en tant que molécule de liaison. **(b)** FnBPs interagissant directement avec le récepteur Hsp60 ou avec l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ comme récepteur avec la Fn comme intermédiaire et Hsp60 comme co-récepteur. **(c)** Le déterminant de surface régulé par le fer B (IsdB) permettant l'internalisation en interagissant avec les intégrines. **(d)** Mécanisme impliquant le complexe TLR2/CD36 et reconnaissant les diacylglycérides (DAG), ou les dimères TLR2/TLR6 qui eux reconnaissent différents PAMP, telles que l'acide lipoteichoïque (LTA) et la lipoprotéine sitC. **(e)** Mécanisme mettant en jeu l'autolysine par liaison directe à la protéine de choc thermique 70 (Hsc 70) afin de médier l'internalisation de *S. aureus* [74].

1- Mécanisme impliquant les FnBP.

Le premier mécanisme d'internalisation mis en évidence implique la fibronectine, qui va permettre la création d'un pont entre les FnBP à la surface de la bactérie et les intégrines $\alpha\beta$ 1 à la surface de la cellule hôte. Ce pont met en jeu le domaine N-terminal de la fibronectine, qui se lie au FnBP, et le motif RGD de son domaine C-terminal se liant aux intégrines [51]. L'activation des intégrines $\alpha\beta$ 1 va déclencher une internalisation par endocytose grâce à un mécanisme « zipper » modifié, proche de la phagocytose [73] [74]. Cette internalisation va mettre en jeu des voies de signalisation intracellulaires entraînant le recrutement de protéines (l'actinine, la paxilline, la zyxine, et la tensine) ainsi que des kinases (la kinase d'adhésion focale (FAK) et la Src kinase). L'étape cruciale dans ces événements de signalisation est la polymérisation de l'actine, promeut par l'association de la cortactine et du complexe Arp2/3, aboutissant à une réorganisation du cytosquelette d'actine [74]. Dans ce modèle, la protéine Eap joue un rôle important puisqu'elle permet une agglutination des bactéries et améliore ainsi leur internalisation [75]. Un deuxième mécanisme mettant en jeu les FnBP a été mis en évidence. Ce mécanisme implique, cette fois ci, une interaction directe entre les FnBP à la surface des bactéries et la protéine de choc thermique Hsp 60 [74] [76]. Cependant, il semblerait que ces deux mécanismes soient complémentaires, avec la protéine Hsp 60 qui agirait comme un co-récepteur afin de compenser la faible affinité existant entre la fibronectine et les intégrines (Figure 14) [76].

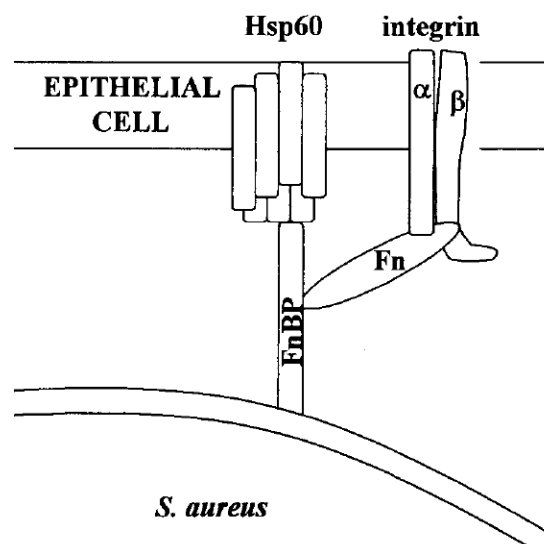


Figure 14 : Schéma représentant l'internalisation dépendante des FnBP [76]. Les FnBP interagissent avec les intégrines et les co-récepteurs Hsp60 par une liaison avec la Fn.

2- Mécanisme impliquant l'Autolysine.

Les deux premiers mécanismes mettant en jeu les FnBP bactériens ne fonctionnent pas pour toutes les souches de staphylocoques. En effet, la souche Newman possède les gènes de la FnBP, mais suite à une mutation ayant introduit un codon stop, elle produit une forme tronquée de FnBP A et de FnBP B, ne possédant pas la partie C-terminale [77]. Cette souche possède cependant une autre protéine pour faciliter son internalisation, la protéine Autolysine (Atl) dont le récepteur au niveau des cellules endothéliales, la protéine apparentée aux protéines de choc thermique 70 (Hsc70), a été récemment identifié [78]. L'Autolysine est une protéine bifonctionnelle de 138 kDa qui possède un domaine Amidase (AM) en position N-terminale et un domaine Glucosaminidase (GL) en position C-terminale. Cette protéine peut être clivée en deux peptidoglycanes hydrolases extracellulaires (51 kDa pour GL et 62 kDa pour AM) (Figure 15) [79]. Ces produits sont impliqués d'une part dans le renouvellement de la paroi cellulaire ainsi que dans la division cellulaire des bactéries. Ils vont ainsi permettre la séparation des deux parois bactériennes et donc la libération des deux cellules filles en venant cliver le peptidoglycane mais sans interférer avec la croissance bactérienne. D'autre part, ils jouent également un rôle dans la formation des biofilms et le domaine amidase possède une activité lytique [78] [80] [81] [82]. Enfin, l'autolysine est impliqué dans l'internalisation des bactéries par les cellules endothéliales [78] ainsi que dans la phagocytose par les macrophages [144]

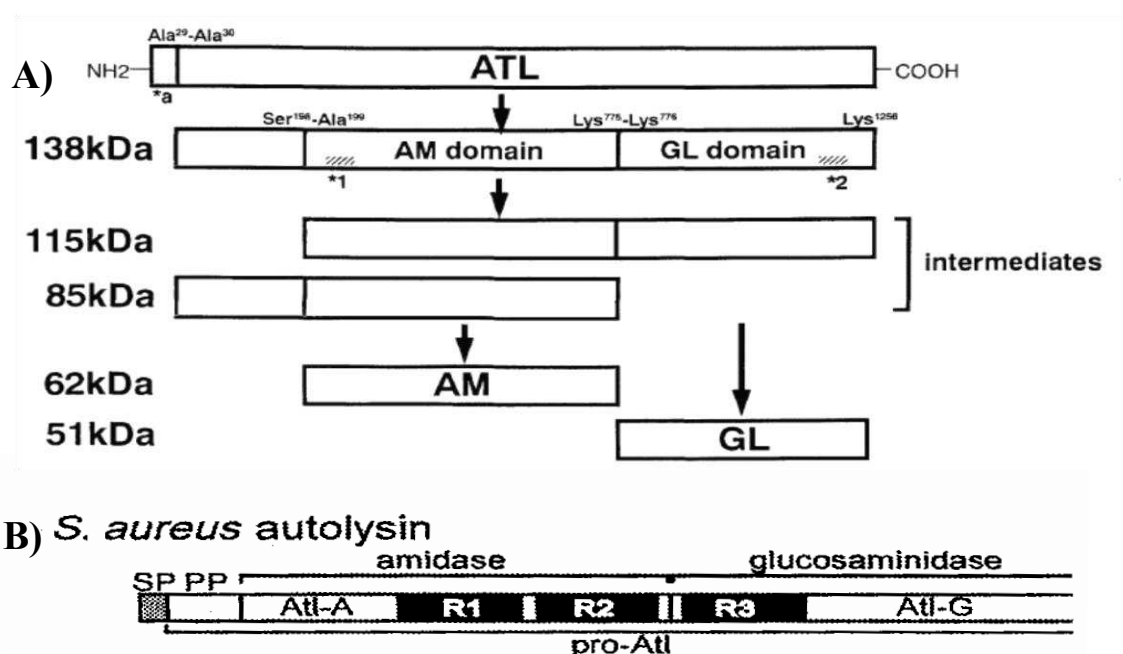


Figure 15 : A = Représentation de la protéine Autolysine ainsi que de ses différents domaines [79].

B = Représentations des séquences répétées de l'Autolysine [83].

AM = amidase

GL = glucosaminidase

3- Mécanisme mettant en jeu l'IsdB.

Les déterminants de surface régulés par le fer (Isd), qui appartiennent à la famille des MSCRAMM cité précédemment (*I-MSCRAMM e)Isd*), sont régulés positivement en conditions de restriction en fer. L'IsdB a été montré comme médiant l'adhésion de *S. aureus* aux plaquettes via les intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ [51] [74]. Cette interaction requiert une conformation spécifique de l'intégrine permettant une grande affinité. Or la liaison d'IsdB à cette intégrine mais également aux autres types d'intégrines est faible. Il est postulé que de l'IsdB soluble pourrait se fixer aux intégrines et les maintenir dans une conformation active qui améliorerait la fixation des intégrines à leur ligand et permettrait ainsi l'internalisation des bactéries. De plus, la coopération de plusieurs IsdB à la surface de la bactérie permettrait l'adhésion et l'invasion des cellules hôtes [51] [74]. Cependant cette internalisation est dépendante des conditions de croissance bactérienne et d'infection puisqu'en présence de fer, la souche sauvage de *S. aureus* SH100 et le mutant délété du gène *isdB* sont internalisés à des niveaux équivalents [51].

4- Mécanisme lié aux TLR.

Les Toll-Like Récepteur (= TLR) sont des récepteurs permettant la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP), et permettent l'induction de réponses spécifiques contre les micro-organismes. Durant les infections à *S. aureus*, le TLR-2 est le principal récepteur impliqué, et des études ont montré sa participation dans l'internalisation par des cellules phagocytaires non professionnelles [74]. En effet, certaines études ont montré que le blocage des TLR-2 avec des anticorps diminue le nombre de bactéries internalisées par les mastocytes dérivés du sang du cordon [84] ainsi que par des cellules épithéliales mammaires bovines [74]. Cependant, il reste à préciser si cette internalisation médiée par les TLR-2 est la conséquence de la signalisation de ce récepteur ou si la reconnaissance des PAMP bactériens est une étape clé de l'endocytose. De plus, il semblerait que lors de cette internalisation médiée par le TLR-2, le CD36 intervienne comme un facilitateur ou un co-récepteur. Ce CD36 aide pour la reconnaissance du diacylglycéride à travers le complexe TLR-2/TLR-6 médiant ainsi l'invasion bactérienne primaire des cellules phagocytaires [74]. De plus, une surexpression du CD36 dans des cellules HEK293 (cellules embryonnaires rénales humaines) permet à *S. aureus* de se fixer et d'être internalisé suggérant bien un rôle de ce CD36 dans l'internalisation [85].

IV] Phagocytose de *Staphylococcus aureus*.

A/ Cellules Phagocytaires.

Les cellules phagocytaires (ou phagocytes), appartiennent à l'immunité innée et représentent la première ligne de défense contre les agents pathogènes envahisseurs grâce notamment à un arsenal d'effecteurs antimicrobiens [86] [87]. Cette immunité innée permet à l'organisme de se défendre de manière instantanée et non spécifique puisqu'elle possède les mêmes mécanismes d'action pour tous les pathogènes rencontrés. Ces phagocytes ont pour rôles de phagocyter les micro-organismes, de les dégrader et d'alerter d'autres cellules immunitaires spécialisées (les lymphocytes), appartenant elles, à l'immunité acquise, et représentant la deuxième ligne de défense de l'organisme. La coopération de ces deux systèmes de défenses permet ainsi un meilleur contrôle de l'infection. Les cellules phagocytaires (Figure 16, [88]) comprennent les polynucléaires neutrophiles, les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques immatures.

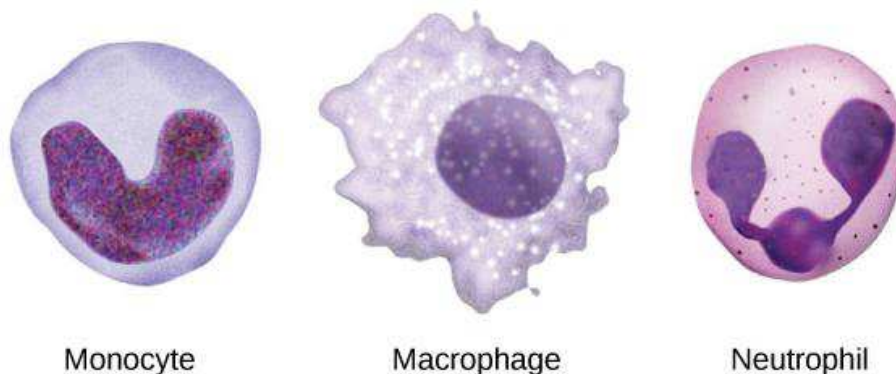


Figure 16 : Morphologies des cellules phagocytaires [88].

1- Polynucléaires neutrophiles.

Les polynucléaires neutrophiles sont des cellules phagocytaires très mobiles ayant un rôle primordial dans la défense innée contre les pathogènes envahissants. Ce sont les premières cellules à arriver sur le site de l'infection, attirées par les chimiokines libérées par les macrophages et les autres cellules présentes. Ce sont les cellules phagocytaires les plus importantes en nombre (70%) mais elles possèdent une courte durée de vie allant de 10 à 12H

dans la circulation sanguine à 2-3 jours dans les tissus. Ces cellules ont la capacité de tuer les bactéries phagocytées en engageant des cascades d'événements de signalisation intracellulaires complexes aboutissant à l'éradication du pathogène par des mécanismes oxydatifs ou non. Les neutrophiles sont physiquement caractérisés par la présence de granules dans leur cytoplasme. Ces granules contiennent des facteurs antimicrobiens, des protéases et des enzymes lui permettant de tuer les bactéries.

De plus, ces cellules peuvent également tuer les pathogènes non phagocytés à travers la formation de NET (= piège extracellulaire de neutrophiles), en réponse à des stimuli pro-inflammatoires [89]. Ces NET sont un enchevêtrement de filaments de chromatine et de protéines issus des granules, et libérés par rupture de la membrane cellulaire des neutrophiles activés [89] [90]. Ces structures vont piéger les bactéries et les tuer par exposition à une forte concentration en molécules antimicrobiennes. La formation de ces NET entraîne la mort des neutrophiles et on parle de NETosis, décrit comme un nouveau système de mort cellulaire. Cependant, il semble que certains neutrophiles soient capables de former des NET tout en maintenant l'intégrité de leur membrane, restant ainsi viables et capables de phagocytose [91]. La chromatine est ici condensée dans des vésicules au niveau de la membrane et les NET sont ensuite libérés sans rupture de la membrane. C'est pourquoi on distinguera la NETosis suicidaire entraînant la mort des neutrophiles, de la NETosis vitale [91].

2- Monocytes et macrophages.

Les monocytes sont des éléments immatures du sang circulant, représentant 4 à 10% des leucocytes sanguins, qui vont migrer vers les différents organes où ils se différencieront en macrophages résidents. Les monocytes et les macrophages appartiennent au système phagocytaire mononuclé originaire de la lignée myéloïde (Figure 15, [88]) [88]. Les étapes de différenciation du monocyte sont dépendantes du facteur de croissance M-CSF. Après leur maturation, ces monocytes vont passer de la moëlle osseuse à la circulation sanguine où ils se divisent en 2 sous populations : les monocytes circulants et les monocytes inflammatoires [92]. Les monocytes circulants vont ainsi être recrutés dans les tissus non inflammatoires où ils se différencieront en macrophages résidents alors que les monocytes inflammatoires seront recrutés au niveau des tissus inflammatoires pour répondre à l'invasion de pathogènes [92].

Les macrophages, issus des monocytes, sont des cellules ayant une taille plus importante et possédant des pseudopodes. Les macrophages jouent de nombreux rôles, tant dans la réponse immunitaire innée qu'adaptative, et sont donc ubiquitaires au sein de l'organisme. Ils sont ainsi présents dans tous les organes, où ils représentent 10 à 20% des cellules [93], et sont nommés différemment en fonction de leur localisation: cellules de Kupffer dans le foie, cellules microgliales dans le cerveau, macrophages alvéolaires dans les poumons ou encore ostéoclastes dans les os [93]. Les macrophages tissulaires résidents sont les premières cellules à rencontrer le pathogène. Ils jouent ainsi un rôle primordial dans le nettoyage de l'organisme en phagocytant les agents pathogènes mais également les corps apoptotiques et nécrotiques ainsi que les poussières. Ils jouent également un rôle dans le remodelage tissulaire, et, avec l'élimination des débris issus de ce remodelage, participent activement au maintien de l'homéostasie tissulaire. Ainsi leur premier rôle est d'être en quelques sortes des « éboueurs » qui éliminent tous les éléments étrangers ou lésés, potentiellement néfaste pour l'organisme.

Le second rôle important qu'ils jouent est celui de sentinelles par la reconnaissance des pathogènes envahissants. Cette reconnaissance passe par des récepteurs, les « récepteurs de reconnaissance de motifs » (PRR), qui reconnaissent des motifs moléculaires associés aux pathogènes, les PAMP [94]. Ces PAMP sont des produits essentiels de la physiologie microbienne partagés par un large groupe de micro-organismes. Parmi eux on peut citer le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries à Gram négatif, l'acide lipoteichoïque (LTA) des bactéries à Gram positif et le peptidoglycane [94]. Parmi les PRR on retrouve plusieurs récepteurs : les TLR (Toll Like Receptor), les récepteurs scavengers (= récepteurs éboueurs), les récepteurs de la famille des lectines et les récepteurs NLR (NOD-Like Récepteur) [94]. La famille la plus importante est celle des TLR, possédant 10 récepteurs chez l'homme (Figure 17) [95]. Ces récepteurs sont situés au niveau de la surface de la membrane plasmique, au niveau de la membrane des vésicules intracellulaires ou bien encore sécrétés dans le milieu. Ces PRR possèdent un domaine de reconnaissance extracellulaire riche en leucine (LRR) et un domaine intracytoplasmique TIR [94].

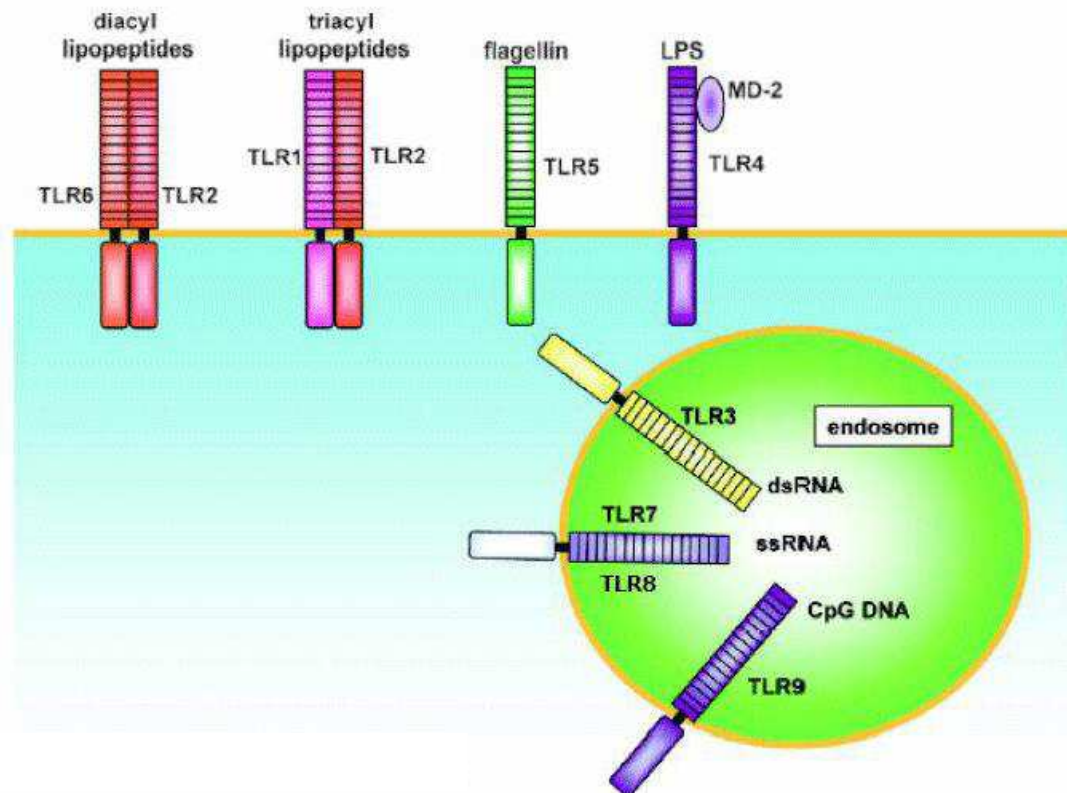
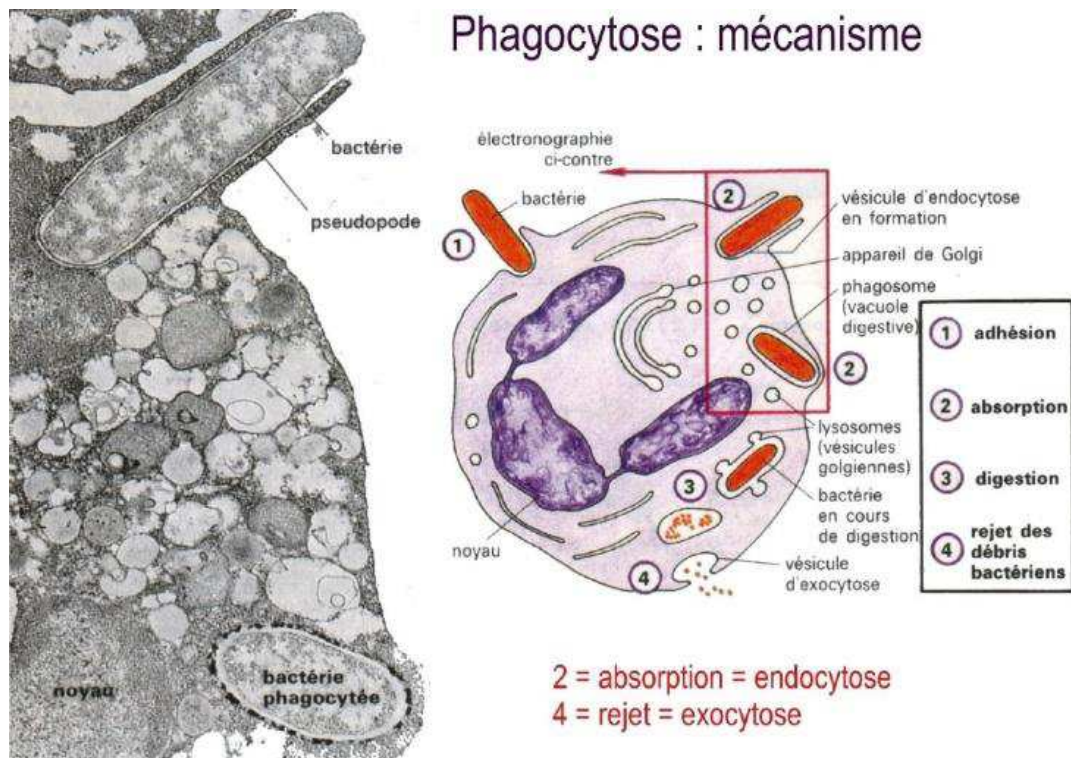


Figure 17 : Représentations des différents TLR ainsi que de leur localisation [95].

Les macrophages peuvent présenter plusieurs états fonctionnels déterminés par la présence de signaux (cytokines) dans le microenvironnement cellulaire. Cela a donné la notion de polarisation des macrophages en deux phénotypes, les macrophages microbicides M1 et les macrophages associés à des fonctions de remodelage et de réparation tissulaire M2. Le phénotype M1 est généralement induit dans des conditions pro-inflammatoires, telles que la fixation aux TLR, une infection bactérienne, et la stimulation par l'IFN- γ . Il se caractérise par des capacités microbicides et tumoricides, ainsi qu'une augmentation de l'activité de présentation de l'antigène [96]. Les macrophages M2 quant à eux, sont induits par les cytokines IL-4 et / ou IL-3, activatrices de STAT6, et remplissent des fonctions homéostatiques, telles que la cicatrisation des plaies, la clairance des cellules apoptotiques et des débris, et la suppression de l'inflammation [96]. Ces deux états sont difficiles à distinguer *in vivo*, et cela est sûrement dû au fait que, *in vivo*, les macrophages sont en constante évolutions vis-à-vis des signaux de l'environnement qu'ils reçoivent [86].

B/ Phagocytose.

La phagocytose (Figure 18, [97]), permet aux cellules d'éliminer des particules de grandes tailles (0,5-5 μ m) telles que les micro-organismes et les débris cellulaires. Une grande partie des cellules de l'organisme possèdent des activités de phagocytose mais certaines en ont fait leur spécialité et sont appelées cellules phagocytaires (neutrophiles, macrophages, cellules dendritiques immatures). Cette activité de dégradations est primordiale dans la défense de l'organisme contre les pathogènes.



Une des étapes fondamentales de la phagocytose est la reconnaissance par les récepteurs macrophagiques d'une particule extracellulaire destinée à être phagocytée. Différents récepteurs sont impliqués et ils sont liés à l'opsonisation ou non des particules à phagocyter. La phagocytose dépendante de l'opsonisation implique soit le récepteur Fc γ R ou les récepteurs du complément CR (CR1, CR3 et CR4), qui se lient respectivement à des particules possédant des IgG (Immunoglobulines G) ou le complément à leur surface [98]. La phagocytose indépendante de l'opsonisation, quant à elle, est déclenchée par l'engagement de plusieurs récepteurs capables de reconnaître et de lier des motifs moléculaires directement sur la surface du

pathogène. Ils incluent les récepteurs aux mannoses MR, les récepteurs scavengers de type A et les intégrines [98].

L'engagement des récepteurs phagocytaires dépendants de l'opsonisation déclenche des événements de signalisation intracellulaires dépendants de la phosphorylation de tyrosine causant des changements au sein de la cellule. Ces changements sont caractérisés par une polymérisation de l'actine dépendante de GTPases de la famille Rho et de phosphoinositides, ainsi que par la production de pseudopodes aboutissant à la formation d'une vacuole ou phagosome lié(e) à la membrane abritant les bactéries ingérées [86] [99]. La formation de ce phagosome n'est pas microbicide puisque la lumière de la vacuole naissante est le reflet de la phase liquide dans laquelle est présent le macrophage et la membrane du phagosome est obtenue directement à partir de la membrane cellulaire. Cependant, le phagosome va ensuite subir un important remodelage biochimique avec une succession rapide de fusions et de fissions de membranes avec d'autres compartiments intracellulaires (comme les endosomes et les lysosomes) [96]. Ce remodelage est révélé par l'élimination et l'acquisition d'autres protéines ainsi que par une baisse sensible du pH jusqu'à 5 ou moins, se terminant par la formation du phagolysosome, un organe de dégradation doué de propriétés microbicides efficaces [86]. Cette capacité de dégradation des micro-organismes est due à la libération d'espèces réactives de l'oxygène générées par la NADPH oxydase sur les membranes phagocytaires mais également aux enzymes protéolytiques (comme le lysozyme, la cathepsines, la lipase), libérées à partir de granules [100]. A terme, la dégradation du pathogène va permettre l'apprêtement de peptides à la surface des macrophages pour la présentation antigénique et donc l'activation des lymphocytes et l'induction d'une réponse inflammatoire. Cette réponse est caractérisée par la production de cytokines et de chimiokines dont le rôle est de recruter de nouvelles cellules au niveau du site de l'infection afin de tuer le micro-organisme et ainsi éviter la dissémination du pathogène au sein de l'organisme.

C/ Survie et échappement immunitaire des pathogènes bactériens.

Cependant, certains pathogènes, notamment *Listeria monocytogenes* et *Legionella pneumophila*, qui sont des pathogènes intracellulaires, ont développé des mécanismes pour éviter la destruction afin de survivre dans ces cellules phagocytaires [101]. Kubica et al. (2008) ont montré que c'est également le cas pour *S. aureus*. En effet, *S. aureus* peut survivre plusieurs jours dans des vacuoles macrophagiques avant de s'échapper dans le cytoplasme, lysant ensuite

les macrophages sans apoptose ni nécrose. Mais *S. aureus* peut aussi survivre à l'intérieur de ces macrophages, sans affecter leur viabilité, mais en l'utilisant comme une niche intracellulaire en modifiant seulement le profil d'expression de certains gènes anti-apoptotiques comme les gènes codant pour les protéines de la famille Bcl-2 [102]. La survie de *S. aureus* au sein des cellules hôtes est fortement dépendante de la multiplicité d'infection (MOI) ainsi que de la phase de croissance de la bactérie au moment de l'infection. De plus, la présence de la catalase chez *S. aureus* lui permet d'inactiver le peroxyde d'hydrogène et les radicaux libres produits dans les macrophages. Cela lui permet ensuite de s'en servir comme moyen de transport pour se propager dans l'organisme [101] [102]. Cette capacité de *S. aureus* à être internalisé par les cellules hôtes est considérée comme l'un des facteurs de pathogénicité les plus critiques dans la persistance et la récurrence de l'infection. Suite à plusieurs études, il est maintenant largement admis que *S. aureus* est aussi internalisé par une variété de phagocytes non-professionnels, comme les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les fibroblastes et les ostéoblastes [78] [103] [104]. Il a été postulé que les staphylocoques internalisés peuvent échapper au système immunitaire de l'hôte ainsi qu'aux différents traitements antibiotiques en se cachant dans les cellules hôtes, ce qui explique pourquoi certaines infections staphylococciques sont extrêmement difficiles à éradiquer [78].

1- SCV.

La persistance et la récurrence de *S. aureus* sont souvent attribuées à un phénotype particulier constitué de petites colonies, les SCV (Petites Colonies Variantes) (Figure 19, [105]). Ces SCV, contrairement au phénotype sauvage, forment des colonies de petites tailles, non pigmentées, non hémolytiques. Ces variants peuvent faire partie du cycle normal de croissance ou être induits en condition de stress. Ils possèdent un métabolisme ralenti et une perte de la capacité à disséminer ainsi qu'une paroi épaisse [106] [107]. On observe également une diminution de la virulence et une augmentation de leur temps de génération. Enfin elles présentent une forte résistance aux antibiotiques et une persistance des infections.

Ces SCV sont des auxotrophes réversibles des voies de biosynthèse de l'hème ou de la phosphorylation oxydative et possèdent un transcriptome et un protéome bien définis [107]. Les SCV sont caractérisées par des déficiences au niveau de la chaîne des électrons, responsable de la production d'adénosines triphosphates (ATP) [106]. L'ATP étant utilisée pour la plupart des réactions métaboliques, on comprend pourquoi ces SCV paraissent plus petites et moins virulentes que les souches sauvages [106]. De plus, ces SCV sont généralement mutantes dans

le locus du régulateur de gènes accessoires (*agr*), et ne produisent pas une variété de facteurs de virulence contrôlés par le système de quorum sensing [107]. Du fait de leur métabolisme ralenti, les SCV vont pousser plus lentement ce qui va leur permettre de résister à de nombreux antibiotiques. Enfin, les SCV montrent une régulation positive du facteur sigma alternatif σ_B , qui permet à *S. aureus* de faire face à de nombreux facteurs de stress environnementaux et ont la capacité de pouvoir récupérer un phénotype sauvage [107]. Les SCV pourraient donc être associées aux infections chroniques et récurrentes généralement réfractaires aux traitements antibiotiques. Leur faible activité métabolique et leur résistance accrue aux antibiotiques leurs permettraient de survivre à l'intérieur des cellules-hôtes et d'être éventuellement à la base de nouveaux cycles d'infection [106].

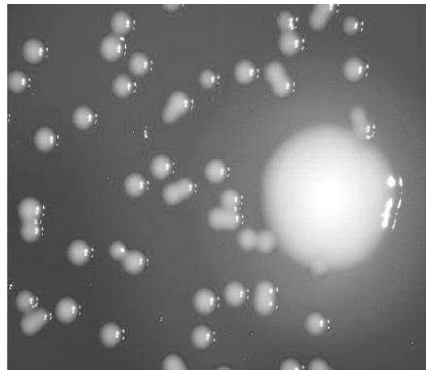


Figure 19 : SCV autour d'une colonie de *S. aureus* [105].

2- Échappement du phagosome.

Une fois internalisées par les macrophages, les bactéries pathogènes doivent échapper à la mort lysosomale en désintégrant la membrane de l'organelle dans le but de passer dans le cytoplasme de la cellule hôte. L'échappement du phagosome de *S. aureus* est dépendant du système *agr* et notamment de la capacité de l'hémolysine α à détruire les membranes. Cette dépendance vis-à-vis du système *agr* pour cet échappement a été reportée dans les cellules de fibrose kystique pulmonaire ainsi que dans les macrophages [107].

Un autre modèle d'échappement fait intervenir la synergie entre les toxines δ et β . La toxine β cliverait la sphingomyéline de la membrane phagosomale en céramides qui s'accumuleraient ainsi en micro-domaines au sein de la membrane. La nature hydrophobe de ces domaines riches en céramides pourrait ainsi constituer des régions d'assemblage des toxines δ et aboutir à une perméabilisation de la membrane. Cette toxine δ est codée par l'ARNIII, effecteur du système *agr*, et pourrait constituer une réponse immédiate à la limitation de l'espace rencontrée par l'engloutissement phagosomal [107].

La toxine δ appartient à la classe des PSM (*B/I-e* PSM) dont l'expression a également été montrée comme permettant l'échappement du phagosome. Les PSM sont également exprimées sous dépendance du système *agr* en conditions de confinement au sein du phagosome. De plus, il semble qu'une faible quantité de staphylocoques soit capable d'organiser une réponse via ces toxines pour échapper à la mort lysosomale. Ainsi, *S. aureus* possède de nombreuses façons d'échapper au phagosome afin de se répliquer dans le cytoplasme et survivre sans causer de mort cellulaire. Cela illustre bien le fait que l'échappement phagosomal et la cytotoxicité ne sont pas identiques et le lien entre les deux reste encore à élucider [107].

3- Mort de la cellule.

Les deux types de mort cellulaire classiquement définis, apoptose et nécrose, ont été remplacés par de nombreux mécanismes de mort cellulaire. Beaucoup de ces mécanismes sont définis par des facteurs permettant ainsi l'évaluation de l'activation de la mort cellulaire suite à une infection bactérienne. La majorité des mécanismes de mort cellulaire induits par *S. aureus* ont été identifiés comme apoptotiques. Il a été montré que la mort par apoptose des cellules fait intervenir la toxine α et la caspase 2. La caspase 2 agirait comme une caspase initiatrice de l'apoptose et serait induite par l'efflux de potassium dû à l'action de la toxine α . De plus, les facteurs de virulence nécessaires à l'apoptose induite par *S. aureus* dépendent du système *agr* et du facteur alternatif de réponse au stress sigma σ_B [107].

Une autre voie aboutissant à l'apoptose des PNN fait intervenir la PVL. La PVL induit une mort cellulaire rapide dépendante des caspases 9 et 3. Il a été montré que la PVL avait une localisation mitochondriale et permettrait la formation de pores dans la membrane mitochondriale externe. La formation de ces pores entraînera la libération de Cytochrome C (CytC) mitochondrial qui va activer le facteur d'activation de l'apoptose 1 (Apaf-1). L'oligomérisation de CytC et de Apaf-1 va activer la pro-caspase 9 en caspase 9, qui va activer ensuite de manière protéolytique les caspase effectrices. Ces caspases effectrices cliveront leur substrat respectif aboutissant au bourgeonnement de la membrane et à la fragmentation de l'ADN responsable de l'apoptose [107].

En dehors de l'apoptose, *S. aureus* est également capable d'induire la pyronécrose. Ici, la caspase 1 est activée dans le cadre d'un inflammasome qui consiste en protéines réceptrices NOD-like (NLRP3) et d'une protéine adaptatrice contenant un domaine de recrutement associé aux caspases (ASC). L'activation de cette voie semble être due à la perméabilisation ou à la

rupture de la membrane lysosomale par les toxines de *S. aureus* (toxines α , β et γ). L'action de ces toxines entraînerait la libération de cathepsine B, une protéase lysosomale, dans le cytoplasme conduisant à l'activation de NLRP3 [107].

V] Régulation des facteurs de virulence.

La virulence de *S. aureus* est multifactorielle et implique de nombreux éléments dont la régulation de l'expression joue un rôle central dans la pathogenèse. Pour réduire les dépenses métaboliques excessives, l'expression de ces facteurs de virulence est coordonnée. L'expression des MSCRAMM se produit généralement pendant la croissance exponentielle (réplication très active) et est réprimée en phase stationnaire. Au contraire, les protéines sécrétées, y compris les toxines, sont produites en fin de phase exponentielle et au cours de la phase stationnaire (Figure 11 page 39, [12]). Lors de l'infection, l'expression précoce des MSCRAMM facilite la colonisation et l'adhérence initiales, tandis que l'élaboration ultérieure de toxines facilite la propagation et le pouvoir invasif de *S. aureus* [101] [108].

A/ Quorum sensing.

Pour améliorer leur capacité à provoquer cet éventail de maladies humaines et animales, et leur capacité à occuper de nombreuses niches au sein de l'hôte, les staphylocoques ont développé des systèmes de quorum sensing qui permettent la communication de cellules à cellules et la régulation de nombreux facteurs de colonisation et de virulence.

1- Définition.

Le Quorum Sensing (QS) est un mode de signalisation bactérienne qui repose sur la production, la sécrétion et la détection de petites molécules médiatrices appelées auto-inducteurs et produites en phase exponentielle de croissance afin de réguler l'expression de gènes [109]. La régulation de l'expression de ces gènes est corrélée à la densité de bactéries présentes dans l'environnement et permet à un groupe de bactéries de coordonner l'expression de leur gène. Cette régulation coordonnée est importante pour la réalisation de comportements de groupe comme la production de bioluminescence, la formation de biofilm, l'échange génétique ou encore l'expression de facteurs de virulence [109]. Les espèces bactériennes dépendent du QS pour réguler des processus cellulaires importants, essentiels pour la surveillance, la survie et l'adaptation à leur environnement en constante évolution. Ce système

de QS a été identifié chez les bactéries Gram positif et Gram négatif. Après sa synthèse, l'auto-inducteur est exporté dans le milieu extracellulaire et sa concentration augmente proportionnellement à la densité de population. Lorsque la concentration de l'auto-inducteur est supérieure à un certain seuil, il est détecté par un récepteur QS qui déclenche une cascade de transduction du signal et active un programme d'expression génique à haute densité cellulaire [109].

Dans les bactéries à Gram négatif, les auto-inducteurs sont principalement des homosérines lactone (AHL). Ces AHL sont produites à partir de métabolites communs tels que les acides gras, l'antranilate et la S-adénosylméthionine (SAM), soit par l'action d'un auto-inducteur synthase ou par une série de réactions enzymatiques. Du fait de leur nature amphiphile, les AHL diffusent librement à travers la membrane plasmique bactérienne [110]. Les auto-inducteurs des bactéries à Gram positif, quant à eux, sont différents, il s'agit d'oligopeptides courts de 5 à 17 acides aminés [110]. Dans la majorité des cas, l'auto-inducteur est produit sous la forme d'un long peptide précurseur qui va ensuite être exporté et modifié lors de sa sécrétion par un transporteur spécialisé [109]. La détection de l'auto-inducteur et les changements qui en résultent dans l'expression des gènes est spécifique de chaque système de QS. A une concentration assez élevée, les AHL des Gram négatif se lient à des récepteurs cytoplasmiques et agissent comme des facteurs transcriptionnels (Figure 19, [111]) [111].

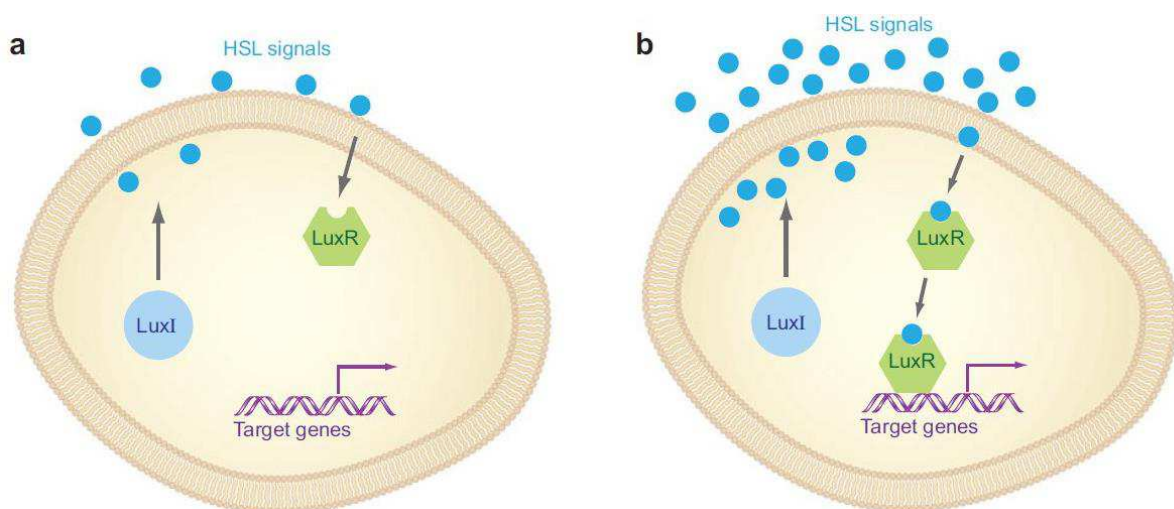


Figure 19: Système de quorum sensing des bactéries à Gram négatif [111].

(a) Densité de population faible, donc la concentration du signal est faible à l'intérieur et à l'extérieur de la bactérie et l'activation des gènes cibles est minimale.

(b) Densité cellulaire élevée, donc la concentration du signal est forte à l'intérieur et à l'extérieur de la bactérie et l'activation des gènes cibles est maximale.

De l'autre côté, les peptides auto-inducteurs (AIP) des Gram positif sont détectés par un système de transduction du signal à deux composants, composé d'une kinase senseur et d'un régulateur de réponse. Quand le seuil de concentration est dépassé, les AIP se lient à des domaines extracellulaires de récepteurs membranaires histidine kinase. Cette interaction déclenche l'activité kinase du récepteur qui s'autophosphoryle puis phosphoryle un régulateur de réponse cytoplasmique permettant l'expression de gènes (Figure 20, [110]) [110] [111].

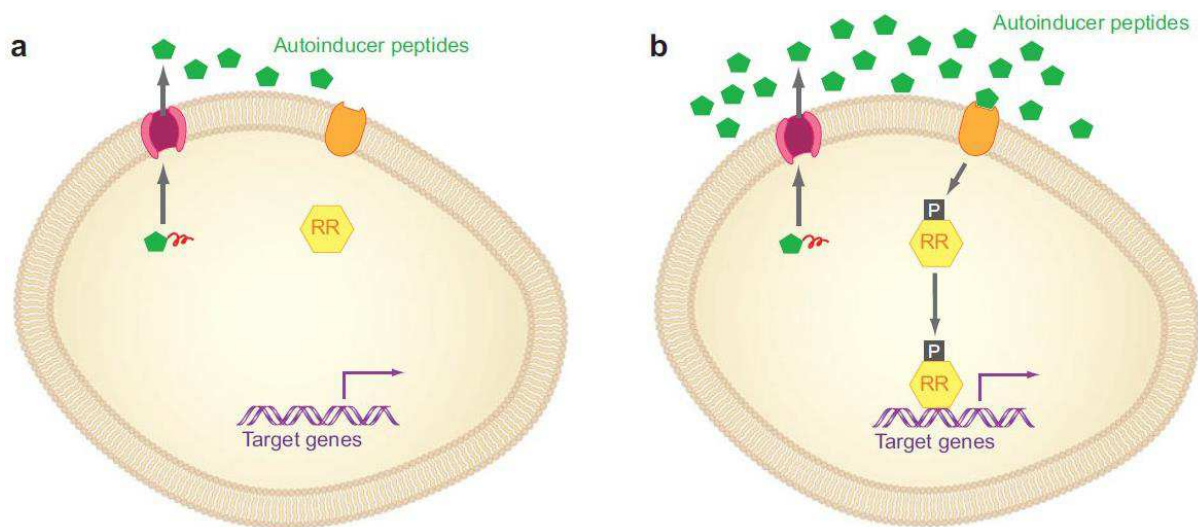


Figure 20: Système de quorum sensing des bactéries à Gram positif [111].

(a) Densité de population faible, donc la concentration du signal est faible à l'intérieur et à l'extérieur de la bactérie et l'activation des gènes cibles est minimale.

(b) Densité cellulaires élevée, donc la concentration du signal est forte à l'intérieur et à l'extérieur de la bactérie et l'activation des gènes cibles est maximale.

Chez *S. aureus*, le principal système de QS est le système *agr* et il est considéré comme le prototype de système régulateur QS chez les bactéries à Gram positif.

2- Système *agr* de *Staphylococcus aureus*.

Le régulateur de gènes accessoires (*agr*) staphylococcique est le principal quorum sensing de *S. aureus* et c'est un système d'auto-induction à deux composants. Le locus *agr* consiste en deux unités de transcription divergentes, l'ARNII et l'ARNIII, dont la transcription est conduite respectivement par les promoteurs P2 et P3 [109] [112]. Le locus ARNII contient 4 gènes, *agrB*, *agrD*, *agrC* et *agrA*. Le transcrit *agrD* code pour un peptide précurseur de 46-47 acides aminés qui est le signal extracellulaire du QS *agr*, c'est-à-dire le peptide auto-

inducteur (AIP). La forme mature de l'AIP, après clivage, possède 7 à 9 acides aminés de long et contient un anneau de thiolactone conservé, entre la cystéine centrale et l'extrémité C-terminale, nécessaire à son activité [109] [112]. Le produit du gène *agrB* est une endopeptidase transmembranaire responsable de la modification de la thiolactone, du clivage de l'extrémité C-terminale ainsi que de l'export de l'AIP dans le milieu extracellulaire [109] [112]. Enfin, les gènes *agrC* et *agrA* codent pour le signal à deux composants faisant intervenir l'histidine kinase senseur AgrC, une protéine transmembranaire qui est phosphorylée après la fixation de l'AIP et le régulateur de réponse cytoplasmique associé AgrA [109] [112]. Une fois activé par la phosphorylation dépendante de AgrC, AgrA se lie au promoteur P2 pour transcrire l'ARNII et au promoteur P3 pour transcrire l'ARNIII (Figure 22, [113]) [109].

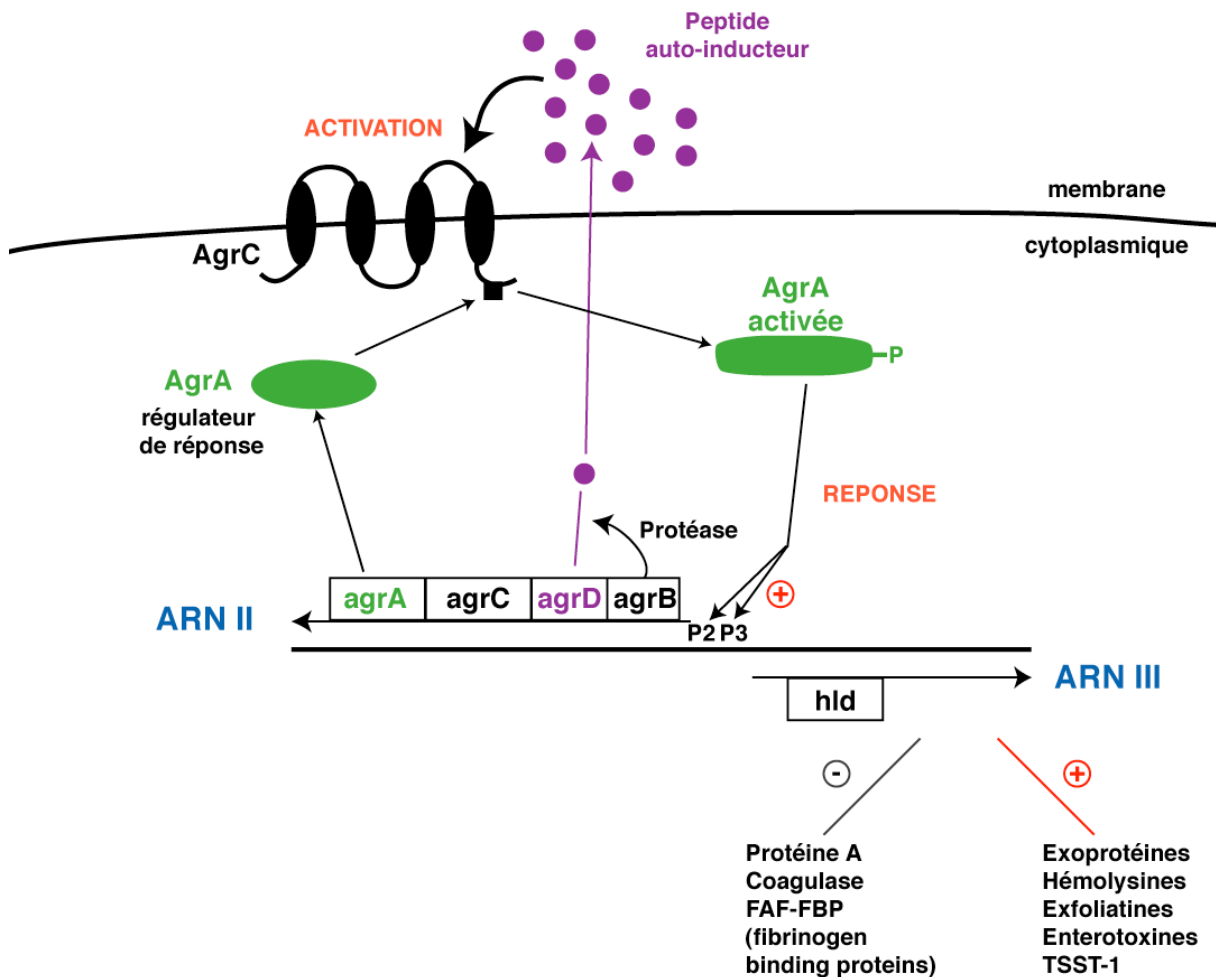


Figure 22 : Système de régulation agr [113]. Les protéines AgrB et AgrD vont mettre en place un système de « quorum-sensing », dans lequel AgrD est le peptide auto-inducteur. Durant la croissance cellulaire, ce peptide s'accumule dans le milieu extracellulaire et, à partir d'une certaine concentration, il se fixe au niveau du système à deux composants qui contient les protéines AgrA et AgrC. AgrC est le récepteur membranaire qui va reconnaître spécifiquement AgrD. La fixation de AgrD induit l'autophosphorylation d'AgrC. Le groupement phosphate est ensuite transféré à la protéine AgrA qui active l'expression de l'ARNII, ce qui amplifie le phénomène, et de l'ARNIII, qui sera l'effecteur intracellulaire principal de la réponse.

Bien que le système *agr* soit conservé chez les staphylocoques, il existe des variations dans les séquences de *agrB*, *agrC* et *agrD* menant à la production d'AIP avec des spécificités de signalisation variées, permettant l'activation de son propre système *agr* et l'inhibition croisée des systèmes *agr* étrangers. Ce phénomène pourrait ainsi être le reflet de pressions de sélection évolutives [109] [112]. L'ARNIII est la molécule effectrice intracellulaire du système *agr* responsable du contrôle des cibles d'*agr*. C'est un ARN fortement abondant possédant une structure secondaire complexe, bien conservée entre les différentes espèces de staphylocoques [114]. C'est également un ARN messager contenant le gène *hld* lui permettant de produire l'hémolysine δ [112]. L'ARNIII est un ARN régulateur qui va réguler l'expression de nombreux gènes par des mécanismes développés dans la partie suivante (*B/ ARN régulateur*).

Chez *S. aureus*, la régulation positive des facteurs de virulence par le système *agr* est nécessaire à la progression de la maladie dans plusieurs modèles animaux d'infection aigüe [115], comme l'endocardite infectieuse, les infections cutanées et des tissus mous, la pneumonie, l'ostéomyélite et l'arthrite septique [112]. La régulation par le système *agr* des PSM et des composants de la surface microbienne a été impliquée dans une meilleure formation de biofilm et dans la colonisation bactérienne des dispositifs médicaux implantés. De plus, le dysfonctionnement du système *agr* est corrélé avec la persistance de bactériémie à *S. aureus*. En général, la régulation positive des toxines et des exo-enzymes de dégradation ainsi que la répression des composants de surface, dépendante du système *agr*, est supposé refléter les différentes exigences temporelles de régulation des facteurs de virulence au cours d'une infection bactérienne. En effet, au début d'une infection, la densité cellulaire est faible et par conséquent une faible expression du système *agr* résulte en une augmentation accrue des composants de surface requis pour la colonisation initiale des tissus. Une fois que cette colonisation est effectuée, les bactéries vont se développer à des densités plus importantes, nécessitant des sources alimentaires supplémentaires ainsi qu'une protection accrue contre les défenses de l'hôte, ce qui est accompli par la régulation positive des toxines et des exo-enzymes de dégradation [112]. Mais la régulation des facteurs de virulence de *S. aureus* n'est pas uniquement basée sur des facteurs protéiques, elle implique également des Acides Ribonucléiques (ARN) régulateurs dont l'identification date d'une dizaine d'années [116] [117] [118] [119].

B/ ARN régulateurs.

Il existe trois principaux types d'ARN «classiques»: les ARN messagers (ARNm), les ARN de transfert (ARNt) et les ARN ribosomiaux (ARNr). Les ARNm sont traduits en protéines, alors que les ARNt et les ARNr ont des rôles lors de la traduction de l'ARNm. Les ARN régulateurs (sARN) quant à eux ne sont généralement pas traduits en protéines et ces petites séquences de nucléotides régulent divers processus biologiques, souvent en interférant avec la traduction de l'ARNm [120]. Ces sARN sont généralement de petites molécules d'ARN stables, non codants, de 50 à 300 nucléotides, même si certains peuvent atteindre 700 à 3500 nucléotides [121], très structurés et constitués de nombreuses tiges boucles. Les mécanismes par lesquels fonctionnent ces petits ARN régulateurs comprennent en grande majorité, la liaison à des cibles ARNm et la modification de leurs stabilités ou de leurs traductions. Cependant, ils peuvent également se lier à des cibles protéiques et ainsi modifier leurs fonctions. Il existe deux classes principales d'ARN régulateurs qui se distinguent à la fois par leurs structures et leurs modes d'action, les ARN *cis*- et *trans*-régulateurs.

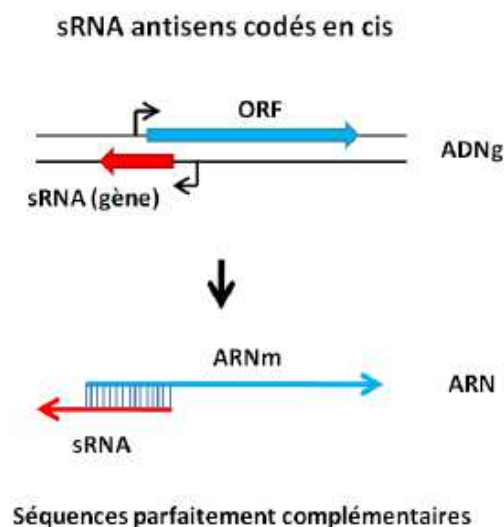


Figure 23 : Schéma représentant un sARN codés en *cis* [122].

Les premiers sont codés en *cis* sur le brin d'ADN, en face de l'ARNm cible et partagent une complémentarité complète avec leur cible (Figure 23) [122]. Les deux produits de transcription sont situés dans la même région de l'ADN et sont transcrits à partir des deux brins d'ADN opposés. Pour les quelques cas où cela a été examiné, l'interaction initiale entre le sARN et l'ARNm cible implique un appariement limité, bien que le duplex va être étendu

ultérieurement. Les exemples les plus étudiés de sARN codés en *cis* résident sur des plasmides ou sur d'autres éléments génétiques mobiles, mais des versions chromosomiques sont également actives [123] [124]. Ces sARN ont une incidence sur la traduction et / ou la stabilité de l'ARNm du gène qu'ils régulent.

Les autres sARN agissant par appariement de bases sont les sARN codés en *trans*, situés à des loci génétiques éloignés de leurs cibles et, contrairement à ceux codés en *cis*, ne partagent qu'une complémentarité limitée avec leurs ARNm cibles (Figure 24) [122]. De plus, il s'agit de contacts rapides et de hautes affinités, par quelques nucléotides exposés dans les régions tige-boucle du régulateur, de la cible, ou des deux [120]. Cependant, chez de nombreuses bactéries, l'association ARNrég/ARNm cible dépend de la protéine de liaison à l'ARN Hfq, une protéine chaperonne qui accroît la probabilité d'une interaction productive entre le sARN et sa cible [129]. Cette protéine a été identifiée chez *E. coli* et à ce jour, aucune protéine de ce genre n'a été identifiée chez *S. aureus*. Ces sARN régulent également la traduction et / ou la stabilité des ARNm cibles. Pour les sARN codés en *trans*, il existe peu ou pas de corrélations entre la localisation chromosomique du gène du sARN et le gène cible de l'ARNm. Chaque sARN codé en *trans* peut réaliser des appariements de bases avec de multiples ARNm cibles et cela résulte du fait que les sARN codé en *trans* nouent des contacts plus limités avec leurs ARNm cibles, en plaques discontinues, comme pour les microARN eucaryotes [120] [123] [124] [125] [126] [127].

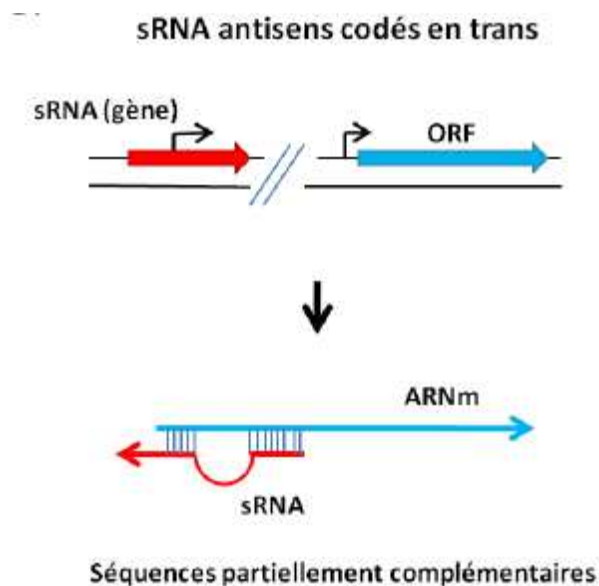


Figure 24 : Schéma représentant un sARN codés en *trans* [122].

1- sARN s'appariant aux ARNm.

Les sARN s'appariant aux ARNm sont les ARN régulateurs les plus caractérisés actuellement et sont divisés en deux sous-classes, les ARN *cis*- ou *trans*-régulateurs. La plupart des sARN décrits sont exprimés sous le contrôle du facteur sigma 70 et plus de 70% d'entre eux possèdent un promoteur avec une boîte -10 identifiable. Ils ne sont pas partagés entre les espèces et l'absence de conservation peut être un indice qui indique que leur action est espèce spécifique. L'interprétation alternative formulée est qu'une large proportion de ces sARN présents dans les génomes bactériens ne sont pas fonctionnels [128]. Les sARN agissant par appariement de bases peuvent avoir un effet positif ou négatif sur l'expression des gènes. En effet, la fixation du sARN sur ou à proximité du site de fixation du ribosome (RBS) de l'ARNm prévient la reconnaissance par le ribosome et donc la traduction ultérieure de cet ARNm (Figure 25a) [129]. Cependant, certains ARNm possèdent naturellement une région d'initiation de la traduction avec une structure secondaire séquestrant le RBS ce qui empêche le ribosome de se fixer et donc de traduire cet ARNm. Dans ce cas, la fixation du sARN, va permettre une modification de la structure secondaire de l'ARNm, libérant ainsi le RBS pour permettre l'initiation de la traduction (Figure 25b) [129]. Lorsqu'un ARNm est traduit activement, l'action successive des ribosomes protège l'ARN contre la dégradation et le recyclage dus à l'action des ribonucléases (RNase) comme la RNase E ou la RNase III (Figure 25c) [129]. Ainsi, la fixation du sARN, qui empêche la liaison des ribosomes, va mettre à nu l'ARN qui pourra être soumis à l'action de la RNase E et être dégradé. De plus, la fixation du sARN va créer une zone bicaténaire qui sera sensible à l'action de la RNase III, qui clive spécifiquement les ARN bicaténaires. Enfin, les sARN en se fixant, peuvent également prévenir la dégradation par les RNases et ainsi stabiliser l'ARNm (Figure 25d) [129].

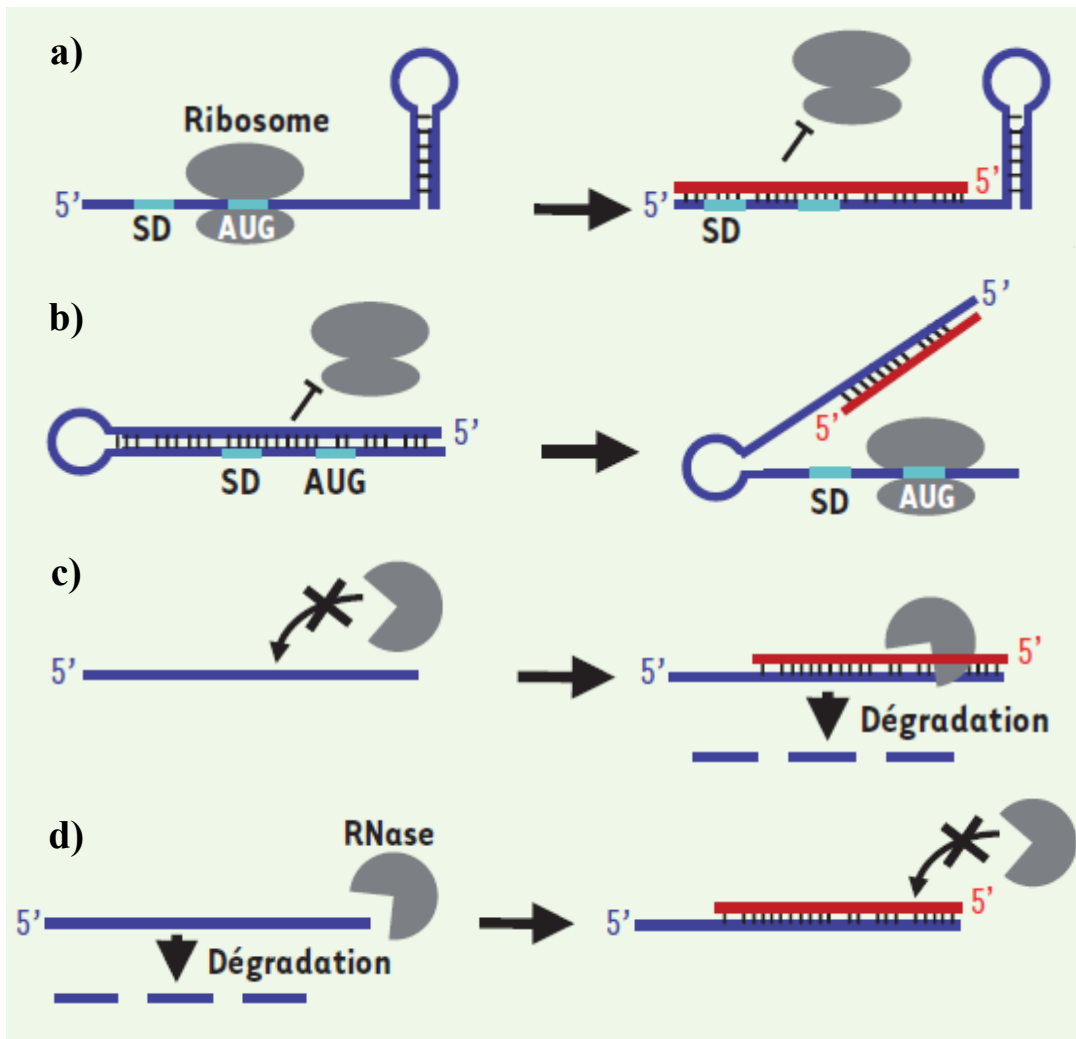


Figure 25 : Schéma décrivant les principaux mécanismes d'action des sARN agissant par appariement de bases [129].

- a) sARN inhibant la traduction par blocage de la fixation du ribosome.
 - b) sARN stimulant la traduction par libération du site d'initiation de la traduction.
 - c) sARN stimulant la dégradation des ARNm par l'action de RNases.
 - d) sARN prévenant la dégradation des ARNm par l'action de RNases.
- (Les ARNm sont en bleu, les sARN en rouge, les ribosomes et RNases en gris)

2- sARN agissant sur les protéines.

A côté de leur action par appariement de bases, certains sARN agissent sur des protéines et modifient leurs activités en imitant et ainsi en concurrençant des cibles ARN ou ADN naturelles de ces protéines. Chez les bactéries, deux familles d'ARN régulateurs agissant en imitant d'autres acides nucléiques ont été caractérisés plus largement. La première, illustrée par l'ARN 6S d'*E. coli*, imite un complexe ouvert du promoteur et interagit avec l'ARN polymérase. La seconde, les ARN régulateurs CsrB et CsrC, qui régulent la famille de protéines régulatrices de la traduction CsrA, en compétition avec des cibles ARNm.

a) L'ARN 6S.

Il a été montré que l'ARN 6S d'*E. coli* mimait structurellement un promoteur ouvert lors de l'initiation de la traduction afin de se lier étroitement à l'ARN polymérase contenant le facteur $\sigma 70$ et inhibant ainsi l'activité de cette ARN polymérase *in vitro* [113] [130] [131] [132]. *In vivo*, lorsque l'ARN 6S est abondant, c'est-à-dire en phase stationnaire de croissance où il passe de 1000 à 10000 copies, il peut se complexer avec l'ARN polymérase par liaison au $\sigma 70$, mais n'est pas capable de s'associer à l'ARN polymérase de la phase stationnaire par liaison au σS . Cette interaction entre l'ARN 6S et la $\sigma 70$ -holoenzyme inhibe la transcription de certains promoteurs $\sigma 70$ -dépendant (ceux qui ont de faibles régions -35) et augmente ainsi la transcription de certains promoteurs σS -dépendant, régulés en partie par la modification de la concurrence entre la liaison aux promoteurs de l'holoenzyme $\sigma 70$ ou σS dépendant [113] [130] [131] [132]. La structure de l'ARN 6S est une épingle à cheveux d'ARN double brin qui imite le complexe ouvert du promoteur lors de l'initiation de la traduction, permettant la liaison au site actif de l'ARN polymérase et inhibant son activité (Figure 26) [129].

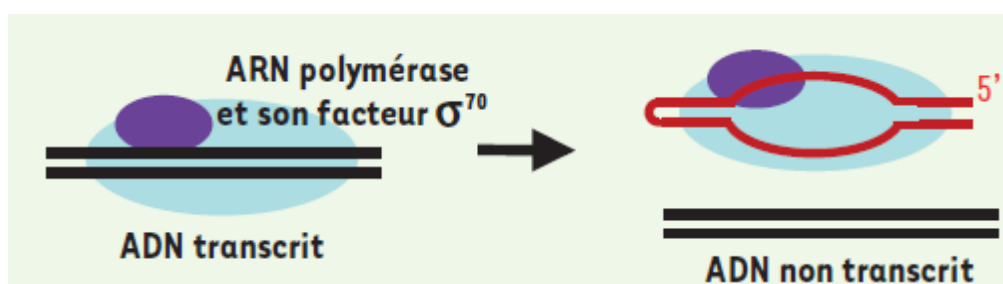


Figure 26 : Schéma représentant l'ARN 6S fixant l'ARN polymérase contenant le facteur $\sigma 70$ [129]. La fixation de l'ARN polymérase par l'ARN 6S inhibe la transcription du gène. (l'ARN 6S est en rouge, l'ARN polymérase en bleu, le facteur $\sigma 70$ en violet)

La preuve que cet ARN régulateur peut imiter l'ADN est fournie par la découverte selon laquelle, à la fois *in vitro* et *in vivo*, l'ARN polymérase est capable de synthétiser un court transcrit de 14 à 20 nucléotides (ARN_p) codé par l'ARN 6S. Il semblerait que la transcription de 6S lorsque la concentration en NTP augmente peut être un moyen de libérer l'ARN polymérase $\sigma 70$ -dépendant mais il n'y a aucune information sur une fonction propre de ces transcrits ARN_p [113] [130] [131] [132].

Enfin, l'ARN 6S lorsqu'il s'accumule en phase stationnaire va agir comme l'une des entrées multiples pour la régulation négative des gènes de ménage permettant ainsi l'expression préférentielle de gènes en phase stationnaire, transcrits par l'ARN polymérase contenant σS . Ce mécanisme va permettre une meilleure adaptation de la bactérie à la phase stationnaire de

croissance ainsi qu'aux différents stress environnementaux. Ce type de mécanisme de régulation par mimétisme moléculaire est fortement utilisé par les bactéries, où de nombreuses protéines qui fixent un ARN vont réguler leur propre synthèse en reconnaissant une région de leur ARNm qui mime leur substrat naturel [113] [130] [131] [132].

b) Les sARN CsrB et CsrC.

Les autres sARN interagissant avec des protéines sont les sARN CsrB et CsrC qui agissent en contrecarrant les activités de la petite protéine CsrA (Figure 27) [129]. Cette protéine se lie à l'ARN qui régule l'utilisation du carbone et la motilité bactérienne lors de l'entrée en phase stationnaire ou lors de carences en nutriments [123]. Chez *E. coli*, CsrA a été identifiée pour la première fois en tant que régulateur post-transcriptionnel négatif de l'accumulation de glycogène. La plupart des régulations par CsrA étudiées sont des régulations négatives, dans lesquelles la protéine sous forme dimérique, inhibe la traduction des ARNm, généralement par liaison à proximité ou au niveau du RBS des ARNm, bloquant ainsi la liaison du ribosome. Il a été montré que la protéine CsrA a une préférence pour la liaison GGA dans la boucle en épingle à cheveux de l'extrémité 5'UTR des ARNm cibles [123]. Bien que l'expression des protéines CsrA puisse être modifiée par les conditions environnementales, la majeure régulation semble être faite via l'inhibition par les sARN CsrB et CsrC. Ces deux sARN contiennent de nombreux motifs GGA (de 13 à 22), spécifiques à CsrA, et lorsque leurs niveaux augmentent, ces sARN séquestrent efficacement la protéine CsrA loin du leader de l'ARNm permettant ainsi le rétablissement de la fixation du ribosome et donc sa traduction en protéine [123].

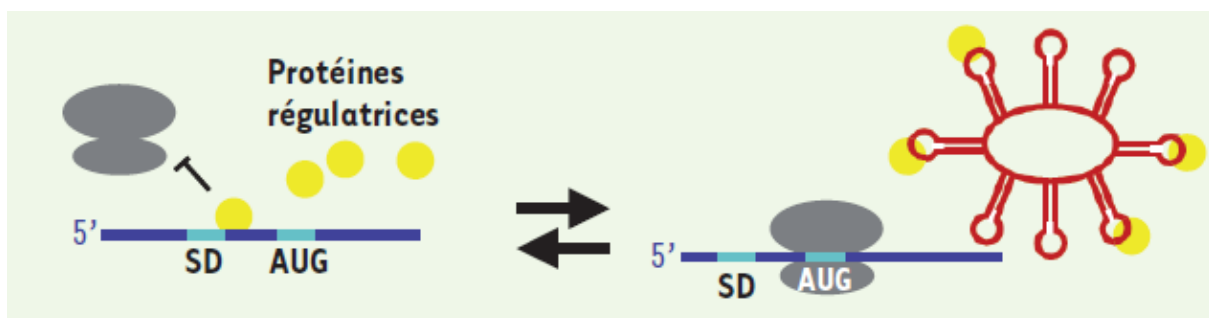


Figure 27 : Mode d'action du système CsrA [129].

Les sARN CsrB et CsrC (en rouge) séquestrent la protéine CsrA (en jaune) ce qui permet la fixation du ribosome (en gris) et donc la traduction de l'ARNm (en bleu).

3- Riboswitchs.

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

- un domaine de détection (aptamère) qui se lie à une molécule ligand provoquant une modification de la conformation d'une plate-forme d'expression adjacente.
- un domaine de régulation (plate-forme d'expression) qui convertit la liaison du ligand en un changement dans l'expression des gènes en adoptant une structure d'ARN alternatif [133].

La plate-forme d'expression de chaque riboswitch bactérien est généralement située en aval de l'aptamère, où il évalue l'état de liaison du ligand de l'ARN et régule en conséquence l'expression génique. L'alternance de structures pliantes est commune pour l'ARN, et les différences de pliages peuvent être exploitées pour influencer plusieurs processus différents qui contribuent à l'efficacité de l'expression des gènes. C'est pourquoi, les plates-formes d'expression ont tendance à être beaucoup moins conservées à travers l'évolution par rapport aux domaines aptamères [134]. Les riboswitchs ont été identifiés dans tous les domaines de la vie [135] [136], plus fréquemment dans les régions 5' non traduites des ARNm (5'UTR) où ils régulent généralement les gènes impliqués dans la biosynthèse de métabolites ou dans le transport [137]. Mais il y a également des exemples de riboswitchs contrôlant la dégradation de l'ARNm.

Les membres de toutes les classes de riboswitchs expérimentalement validés peuvent se lier à leur ligand cible sans nécessiter de facteurs protéiques. C'est-à-dire que l'ARN seul est suffisant pour effectuer la reconnaissance et le contrôle des actions moléculaires d'un gène, sans l'assistance obligatoire des facteurs protéiques [134]. L'un des mécanismes les plus communs utilisés par les riboswitchs bactériens implique la modulation de la terminaison de la transcription. La formation d'une tige forte suivie d'une série de résidus uridine constituent un terminateur de transcription intrinsèque, ce qui bloque l'ARN polymérase et donc la transcription et, permet éventuellement, la libération de la matrice d'ADN et des produits ARN naissants. La liaison du ligand à l'aptamère contrôle habituellement la formation de la tige de terminaison en régulant la formation d'une structure secondaire concurrente ou anti-terminaison. De même, les structures de base appariées mutuellement exclusives sont exploitées

par les riboswitchs pour contrôler l'accès des ribosomes au site de liaison du ribosome régulant ainsi l'initiation de traduction [134].

4- Avantage des ARN régulateurs bactériens.

L'identification de ces ARN régulateurs depuis quelques années pose la question de l'avantage que les bactéries tirent de cette régulation par des ARN non codant vis-à-vis des régulations basées sur les protéines qui était les seules connues avant. Les premiers avantages répertoriés sont une diminution du coût énergétique pour la cellule, des niveaux supplémentaires de régulation ainsi que des propriétés uniques de régulations à la fois en termes de réponse mais également de vitesse d'adaptation. [120] [138]. Ces ARN permettent de contrôler une fonction biologique donnée dans un temps très court, ce qui est crucial pour l'adaptation de la cellule à de nouvelles conditions de croissance, à des changements dans les conditions en nutriments, à différents stress ainsi qu'à l'invasion d'un hôte. Ainsi, il est possible de moduler l'activité d'un ARN en jouant sur sa stabilité, en contrôlant à la fois sa synthèse et sa dégradation. Une large gamme de stimuli environnementaux affecte l'expression des sARN, y compris la croissance anaérobie (Fnr active FNRS), le stress oxydatif (oxyR active Oxys), la disponibilité du glucose (CRP refoule Spot42), la disponibilité du fer (Fur refoule RyhB), et le déséquilibre osmotique (EnvZ -OmpR active MicF) [138]. Les niveaux de quelques sARN sont également réglementés par la concurrence avec d'autres ARN [138]. Dans le cas des ARN impliqués dans des réponses à des stress ou à la croissance cellulaire, l'ARN régulateur ne doit pas être limitant tant que l'adaptation de la bactérie n'a pas eu lieu. En revanche, les ARN contrôlant le taux de répllication d'un plasmide sont en général très instables et synthétisés constitutivement, mesurant à chaque instant la quantité de plasmides présents dans la cellule. Il a été montré que ces ARN régulateurs reconnaissent rapidement leur cible, et cette rapidité d'action est généralement basée sur la structure du sARN et / ou de sa cible.

a) Coût métabolique réduit.

Les deux avantages potentiels des sARN par rapport aux protéines sont inhérents à leur nom: les sARN sont petits et composés d'ARN. Chaque gène de sARN occupe seulement une petite partie du génome, ce qui permet un besoin limité en énergie pour transcrire ces sARN, et surtout, aucune dépense d'énergie n'est nécessaire pour les traduire en protéines [138]. En revanche, les régulateurs transcriptionnels sont codés dans de plus gros morceaux de l'ADN et doivent être traduits à partir d'un ARNm beaucoup plus long. La consommation d'énergie

réduite pour l'expression de petits ARN régulateurs par rapport à la transcription des protéines laisse une réserve d'énergie pour la croissance cellulaire, fournissant ainsi un avantage sélectif à la bactérie [138]. Ce coût métabolique réduit est l'un des arguments les plus répétés pour la prévalence des sARN. Cependant, en y réfléchissant mieux, d'autres facteurs supplémentaires au coût métabolique total doivent être considérés. Ces facteurs comprennent notamment la transcription du gène cible ainsi que les niveaux relatifs du sARN et de l'ARNm codant pour le régulateur de transcription. Sur la base des divers niveaux d'expression des gènes cibles, du sARN, et des facteurs de transcription, le coût métabolique relatif peut être spécifique du sARN, voire spécifique du gène cible [138].

b) Niveau supplémentaire de régulation.

Une autre explication pour la prévalence des sARN reflète les limites de la régulation de la transcription dans les réseaux génétiques à grande échelle. Généralement, les régulateurs transcriptionnels contrôlent les gènes cibles en se liant à une centaine de nucléotides des éléments -35 et -10 du promoteur. De plus, cette partie de la séquence ne permet une régulation que par quelques régulateurs de transcription. En ciblant une partie tout à fait distincte du gène, le sARN permet d'élargir le nombre de sites où la régulation peut être introduite, et permet ainsi des signaux biologiques supplémentaires pour contrôler l'expression individuelle des gènes. La régulation en couches est particulièrement importante pour les gènes qui doivent être étroitement contrôlés ou qui sont critiques dans les réponses cellulaires multiples. Par exemple, les facteurs sigma alternatifs σ^S sont modulés dans des conditions allant de la phase stationnaire au choc froid en passant par un déséquilibre osmotique ou encore un faible pH. En conséquence, les niveaux de σ^S sont réglementés au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel, et post-traductionnel [138].

En outre, la capacité à réguler une cible à deux niveaux, à la fois par un régulateur de la transcription et par un appariement de bases sARN a été montrée pour réduire les potentielles fuites du système de régulation, grâce à un contrôle plus fin, ainsi que de modifier la dynamique de l'expression du gène cible [120].

c) Régulation plus rapide

Une autre possibilité est que les sARN ont été sélectionnés vis-à-vis des régulateurs transcriptionnels en raison de la vitesse de régulation plus rapide qu'ils permettent. En effet, une régulation fondée sur les sARN agit au niveau post-transcriptionnel, et l'expression du gène est ainsi modulée à un point plus proche de la production de protéines par rapport à la régulation transcriptionnelle. Par conséquent, il faut moins de temps à un sARN pour impacter sur les taux de protéines cibles [138]. À l'appui de cet argument, une étude de calcul évaluant la dynamique des différents modes de régulation a constaté que les sARN ont une régulation plus rapide que les régulateurs transcriptionnels [137]. Cette amélioration de vitesse a été prédite lorsque l'expression du régulateur a été à la fois induite et réprimée.

Mais quelles sont les bénéfices pour une cellule d'accélérer une réponse régulatrice? Une régulation rapide peut être bénéfique dans un processus de régulation hautement coordonnée ou lorsque les cellules doivent répondre à un changement soudain dans les conditions environnementales comme un stress par exemple. Placer le sARN sous le contrôle des capteurs environnementaux ou des systèmes à deux composants faciliterait une réponse accélérée additionnant la modification post-traductionnelle d'un régulateur de réponse à l'induction ou la répression par un sARN [138].

5- Rôles des ARN régulateurs bactériens.

La caractérisation de nombreux sARN a montré qu'ils occupent un rôle majeur dans l'adaptation des bactéries aux conditions environnementales, et notamment les différents stress, qu'elles rencontrent au sein de leurs différentes niches écologiques. Ainsi, les études des sARN chez des bactéries pathogènes pour l'homme ont démontré un rôle crucial de ces régulateurs dans l'adaptation à la niche humaine, la défense contre le système immunitaire et le contrôle des gènes de virulence [122]. Les sARN sont également fortement impliqués dans la virulence et la pathogénie des bactéries, notamment dans la régulation des gènes de virulence, la formation de biofilms ainsi que la résistance aux antibiotiques. En outre, de plus en plus de sARN sont induits par le contact avec une cellule hôte, dont certains ayant un impact sur la survie chez l'hôte. Par exemple, l'absence d'ARN 6S affecte de manière significative la croissance de *Legionella pneumophila* dans une lignée cellulaire humaine [140].

VI] Objectifs.

Actuellement, 159 sARN ont été découverts chez *S. aureus*. Le laboratoire d'accueil (INSERM U835) a découvert 12 petits ARN régulateurs exprimés par des souches cliniques grâce à des analyses bioinformatiques couplées à des validations expérimentales [116]. Sept d'entre eux se trouvent dans les îlots de pathogénie de *S. aureus* (SAPI), qui sont des régions chromosomiques ayant des caractères particuliers associés à la pathogénicité. Les cinq autres sont situés dans la partie restante du génome (core). Les sept ARN situés dans les îlots de pathogénie sont appelés *sprA*, *B*, *C*, *D*, *F*, *G* et *X* (Small Pathogenicity island RNA) (Figure 28) [116]. Leur localisation dans les îlots de pathogénie suggère qu'ils jouent un potentiel rôle dans la virulence de *S. aureus* puisque ces îlots sont d'anciens éléments mobiles et ont la particularité de regrouper de nombreux gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques [141] [142].

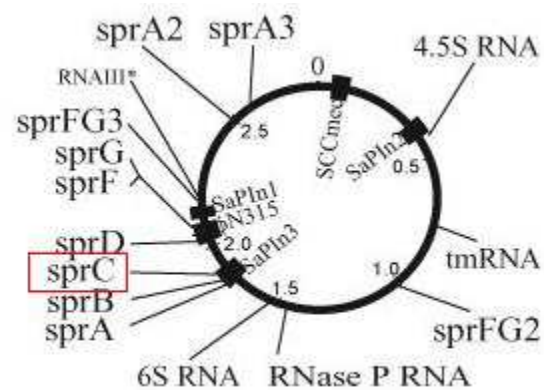


Figure 28 : Schéma représentant le génome de *S. aureus* N315 avec les 3 îlots de pathogénies, la cassette *SCCmec* et les gènes des différents sARN [116].

L'ARN régulateur *SprC* nouvellement nommé *srn_3610* dans la nomenclature SRD (Staphylococcus regulatory RNA database) [143] fait partie des ARN découverts en 2005 [116] et est localisé dans l'îlot de pathogénie n°3. Pichon *et al.*, ont mis en évidence les gènes encadrant *SprC*, d'un côté un gène codant une leukotoxine de Panton-Valentine (*lukE*) et de l'autre un gène hypothétique. Le Pabic H. *et al.* (2015) [144] ont récemment mis en évidence que *SprC*, lorsqu'il est surexprimé par une souche Newman de *S. aureus* isolée d'une infection humaine [145], diminue la virulence et la propagation bactérienne sur un modèle animal de septicémie. Une souche isogénique délétée de *SprC* devient plus virulente que la souche sauvage, et une complémentation génétique de cet ARN restaure le phénotype sauvage. La surexpression de *SprC* réduit également la phagocytose de *S. aureus* par les monocytes et les macrophages humains et diminue la résistance bactérienne à un stress oxydant. De plus, on

observe une forte expression en tout début d'internalisation suivie d'une diminution de son expression au cours du temps après l'internalisation par la cellule hôte [144]. Enfin, Le Pabic et al. ont montré que SprC interférait sur la phagocytose de *S. aureus* en partie par son contrôle de l'expression de l'autolysine, une protéine impliquée dans l'internalisation de *S. aureus* [144]. En effet, SprC régule négativement la production de l'autolysine en bloquant la traduction de son ARNm par inhibition directe. Cependant, cette interaction entre SprC et *atl* est faible ($K_d = 35\mu\text{M}$) impliquant l'intervention de partenaires supplémentaires inconnus dans cette interaction [144]. C'est pourquoi durant cette thèse, je vais essayer d'identifier de nouveaux partenaires (ARN ou protéines) de l'ARN SprC. Ces partenaires pourront ensuite nous éclairer sur le rôle que joue SprC dans les infections dues à *S. aureus*, par des études de phagocytose sur macrophages et monocytes humains ainsi que dans des modèles murins de septicémies.

PARTIE II : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE.

I] Matériels et méthodes.

A/ Souches bactériennes, plasmides et conditions de culture.

Cette étude a été réalisée en utilisant la souche clinique Newman de *S. aureus* [145], considérée comme un modèle satisfaisant pour l'étude des systèmes de régulation de la virulence, notamment du fait que son génome est entièrement séquencé. La souche RN4220 de *S. aureus* a également été utilisée car elle possède une mutation dans le gène *sauI hsdR*, la rendant déficiente aux restrictions et faisant d'elle un hôte intermédiaire de clonage idéal [146]. Cette souche a également la particularité de pouvoir recevoir de l'ADN issu d'*Escherichia coli* (*E. coli*), de le répliquer et de le modifier afin qu'il soit accepté par d'autres souches de *S. aureus*. La souche Newman délétée pour le gène *SprC* ($\Delta sprC$) construite au laboratoire par recombinaison homologue et sélectionnée grâce à sa résistance à l'érythromycine (10µg/mL) a également été utilisée. La culture de ces souches a été effectuée en milieu BHI (Oxoid®) additionné ou non de chloramphénicol (10µg/mL) ou d'érythromycine (10µg/mL) en conditions aérobies à 37°C pendant la nuit.

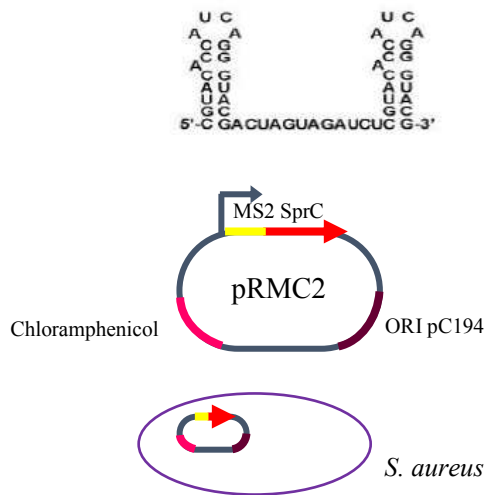
Enfin une souche d'*Escherichia coli* DH5 a été utilisée pour les étapes de transformation et de vérification du clonage de la séquence de *SprC*. Cette souche a la particularité d'avoir une mutation *recA1* qui élimine les recombinaisons homologues assurant une stabilité plus élevée de l'insert ainsi qu'une mutation *endA1* qui fait qu'elle ne possède pas d'endonucléase pouvant digérer le plasmide lors de la purification. Elle a été cultivée dans du milieu LB (MO BIO laboratories) additionné ou non d'ampicilline (50µg/mL), en conditions aérobies à 37°C pendant la nuit.

Pour les expériences de clonages, le plasmide pRMC2 [147], modifié par une doctorante du laboratoire (Yvain L.) afin de permettre l'ajout d'une étiquette MS2 sur un sARN a été nécessaire. Il s'agit d'un vecteur inductible par l'anhydrotétracycline qui permet de produire l'ARN *SprC* fusionné à une étiquette MS2. Ce plasmide possède 3 sites de restrictions, BamHI, SacI et EcoRI ainsi que 2 gènes de résistance : un gène de résistance à l'ampicilline permettant de sélectionner les *E. coli* recombinantes et un gène de résistance au chloramphénicol permettant la sélection des *S. aureus* recombinants.

B/ Protocole général d'isolement de partenaires protéiques et ARN de l'ARN SprC.

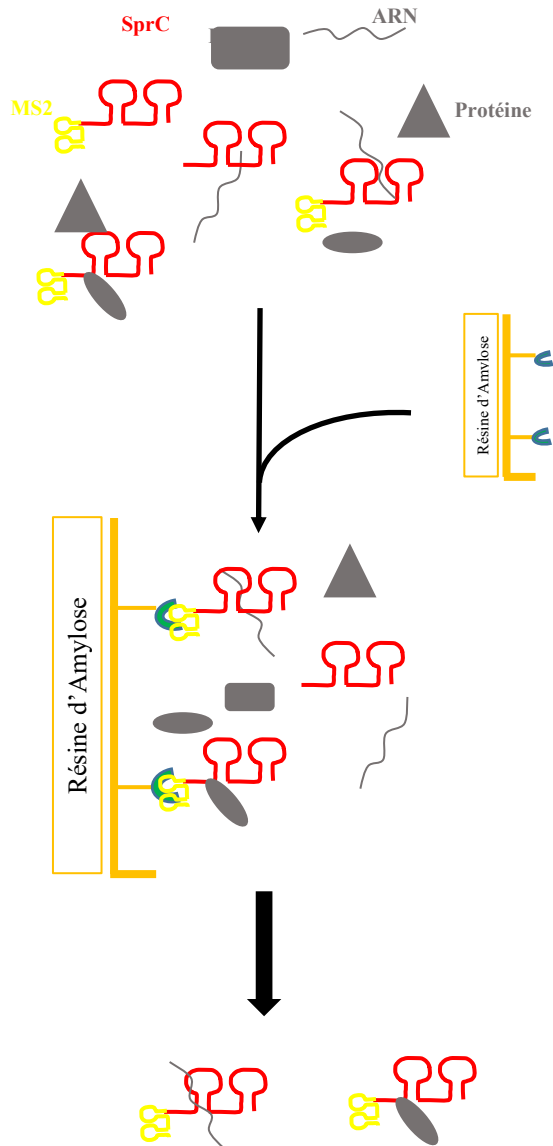
Afin d'isoler de nouveaux partenaires protéiques et ARN de SprC, une technique de chromatographie d'affinité dérivée de celle utilisée par l'équipe de Jörg Vogel [148] a été mise au point au laboratoire (Figure 29, [148]).

Dans un premier temps, il a fallu construire un vecteur permettant de surexprimer l'ARN régulateur SprC fusionné à un aptamère MS2 à l'aide d'anhydrotétracycline. Puis, dans un deuxième temps, il a été nécessaire de vérifier que notre ARN s'exprimait bien et surtout qu'il était capable de s'accrocher sur une résine d'amylose par l'intermédiaire d'une protéine MBP-MS2. Cette protéine possède un domaine MBP (Maltose Binding Protein) lui permettant de se fixer à l'amylose mais également un domaine MS2 permettant de fixer l'aptamère MS2 de l'ARN régulateur SprC. Enfin, une fois cette vérification faite, la technique a pu être réalisée afin d'identifier de nouveaux partenaires ARN et protéiques de SprC. Pour valider cette méthode, l'ARNIII qui est très étudié chez *S. aureus*, a été utilisé comme contrôle positif puisque sa fixation à l'ARNm du facteur de transcription Rot est bien connue [149]. De plus, il a été montré par Le Pabic *et al.* (2015) [144] que SprC se fixait à l'ARNm de l'Atl qui est donc une autre cible permettant de valider cette méthode par PCR quantitative (PCRq).



Structure et séquence de l'aptamère MS2.

Clonage du gène de *SprC* dans le vecteur pRMC2-MS2 puis transformation de *S. aureus*. Ce vecteur permet l'expression de l'ARN *SprC* fusionné à l'aptamère MS2.



Induction de l'expression de *SprC*-MS2 par l'anhydrotétracycline, lyse mécanique des bactéries et obtention de complexes « MS2-*SprC*-ARN/protéine ».

Chargement de la résine d'amylose avec les protéines MBP-MS2.

Passage du lysat bactérien contenant les complexes « MS2-*SprC*-ARN/protéine » sur la résine d'amylose et fixation de ceux-ci sur les protéines MBP-MS2.

Lavages des complexes fixés et élution avant analyse sur gel SDS-PAGE pour les protéines et par PCR quantitative pour les ARN.

Figure 29 : Protocole général d'isolement de nouveaux partenaires ARN et protéiques de *SprC* (adapté de [148]).

C/ Construction du vecteur pRMC2-MS2-SprC.

1- Amplification de la séquence du gène *SprC*.

La séquence du gène *SprC* a été amplifiée par PCR à l'aide de la platiniu Taq DNA (Invitrogen™) à partir de l'ADN génomique de *S. aureus* Newman en utilisant 2 amorces (Tableau 3). Les produits PCR ont ensuite été visualisés sur un gel d'agarose 1,5% avec du BET afin de vérifier que les échantillons amplifiés avaient la taille attendue.

Tableau 3 : Séquence des amorces utilisées pour l'amplification par PCR. Sites de restriction *SacI* et *EcoRI* respectivement en vert et en rouge. Une partie de la séquence de l'étiquette MS en jaune.

Amorces	Séquences
SpRMC2MS2sprC (5'-3')	GACACCATCAGGGTCTG GAGCTC AAGTCAACGACCATG
ASpRMC2MS2sprC (3'-5')	TAAAACGACGGCCAGT GAATTC ATGATTACTTCGTATACTGTT

2- Insertion du fragment d'ADN dans le plasmide pRMC2-MS2 et transformation d'*E. coli* compétente.

Après visualisation sur gel d'agarose, la bande d'intérêt a pu être excisée et purifiée à l'aide du QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen). Puis ce fragment a été inséré dans le plasmide pRMC2-MS2 pré-digéré avec les enzymes de restriction *SacI* et *EcoRI* en utilisant le mix Gibson Assembly® (Figure 30). Pour cela, les plasmides et nos fragments d'ADN *SprC* ont été mis en contact avec le mix à 50°C pendant 1H. Ce mix réactionnel contient une 5'-3' exonucléase, une polymérase et une ligase. L'exonucléase digère les régions homologues en 5' du vecteur et de l'insert et permet l'hybridation des parties simples brins homologues. Puis la polymérase complète les séquences manquantes en 3' et la ligase lie l'insert dans le vecteur.

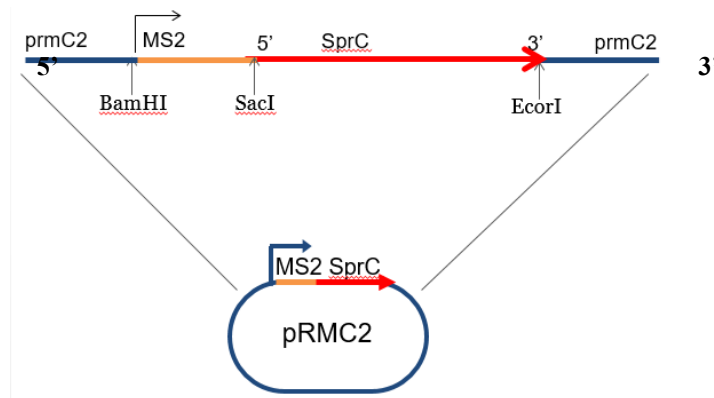


Figure 30 : Représentation du plasmide pRMC2 avec les sites de restrictions utilisés pour le clonage.

Le vecteur recombiné a ensuite été transformé dans la souche compétente d'*E. coli* DH5 par choc thermique puis les clones ayant reçu le plasmide ont été sélectionnés par de l'ampicilline (50µg/mL). Enfin, une PCR a été réalisée à partir des clones ayant poussé pour vérifier qu'ils avaient bien intégré l'insert avant d'extraire l'ADN plasmidique à l'aide du QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) pour séquencer l'insert à l'aide du « BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit » (Applied Biosystems).

D/ Vérification de l'expression de l'ARN SprC-MS2 et de son accrochage sur la résine d'amylose.

1- Vérification de l'expression et de la fixation de SprC.

a) Transformation de *S. aureus* RN4220 avec le plasmide pRMC2-MS2-SprC.

Le plasmide pRMC2-MS2-SprC a été transformé dans la souche de *S. aureus* RN4220 par électroporation. Pour cela, des souches de *S. aureus* RN4220 électro-compétentes ont été incubées avec le plasmide pRMC2-MS2-SprC sur glace pendant 15 minutes avant de réaliser l'électroporation. Enfin, les clones de *S. aureus* RN4220 ayant reçu le plasmide ont été sélectionnés par du chloramphénicol (10µg/mL).

b) Accrochage, enrichissement et élution de SprC.

Des pré-cultures de *S. aureus* RN4220 possédant le plasmide pRMC2-MS2-SprC et de *S. aureus* RN4220 possédant le plasmide pRMC2-MS2 ont été diluées dans du BHI additionné de chloramphénicol (10µg/mL) à une DO₆₀₀=0,1 puis incubées 4H30 à 37°C. L'induction de MS2 et de SprC-MS2 a été réalisée par 1µM d'anhydrotétracycline pendant 10 min à 37°C. Puis après avoir centrifugé le milieu, le culot a été repris dans 1mL de Tampon de Lyse (20mM d'Hepes pH7.5, 200mM de NaCl, 1 mM de MgCl₂, 1 mM de β-mercaptoéthanol, 5% de glycérol et des anti-protéases), et les bactéries ont été lysées avec des billes de verre (≤ 106µm, Sigma) au Fastprep. A cette étape 100µL du lysat brut est prélevé pour l'analyse de l'expression de SprC.

L'extrait brut obtenu après la lyse est déposé sur la résine d'amylose chargée au préalable avec les protéines MBP-MS2, puis incubé 15 minutes à 4°C en rotation. Ensuite, après une centrifugation, 100µL du surnageant (= « Flow Through ») est prélevé et le reste est éliminé

avant la réalisation de 5 cycles de lavage avec un Tampon Wash (= Tampon de lyse sans les anti-protéases).

Enfin, les ARN fixés sur la résine sont élués par une extraction au phénol pH4 avant d'être précipités avec un mélange acétate de sodium / éthanol à -20°C sur la nuit. On réalise également une extraction au phénol pH4 des ARN présents dans l'extrait brut et dans le « Flow Through » puis une précipitation est réalisée dans les mêmes conditions que les ARN élués.

c) Analyse des ARN isolés.

L'analyse de l'expression et de la fixation des ARN a été effectuée par la technique du Northern Blot. Pour cela, les ARN précipités ont été lavés à l'éthanol 70% puis un volume identique de chaque extrait est séparé sur un gel de polyacrylamide urée (8% acrylamide, 7M urée). Après une migration dans du tampon TBE 1X (89mM de Tris, 89mM d'acide borique et 2mM d'EDTA) à 150V, les ARN ont été électrotransférés sur une membrane de nylon ZetaProbes GT Genomics (BioRad®) dans du tampon TBE 0,5X pendant 2H30 à 25V. Les ARN ont ensuite été fixés aux UV (0,12J/cm²) et détectés par une hybridation avec une sonde oligonucléotidique complémentaire de l'étiquette MS2 marqué radioactivement au P³².

E/ Purification des partenaires protéiques et ARN de SprC.

1- Transduction du plasmide pRMC2-MS2-SprC dans la souche *S. aureus* Newman sauvage et *S. aureus* Newman $\Delta sprC$.

Après avoir vérifié que SprC-MS2 était exprimé et s'accrochait à la résine d'amylose chargée en protéines MBP-MS2, le plasmide pRMC2-MS2-SprC a été transduit de la souche RN4220 dans la souche étudiée qui est la souche *S. aureus* Newman. Pour cela, deux transductions phagiques ont été effectuées à l'aide du phage $\phi 80$ afin de transférer le plasmide pRMC2-MS2-SprC directement de la souche RN4220 à la souche Newman sauvage (WT) ou à la souche Newman délétée du gène *SprC* ($\Delta sprC$). Pour cela les phages $\phi 80$ ont été incubés avec la souche RN4220 dans du milieu TSB (Tryptic Soy Broth) + CaCl₂ (10mM) à 30°C sous agitation afin de favoriser la lyse des bactéries par les phages. Puis le milieu a été filtré (0,45 μ m) pour éliminer les bactéries et ne récupérer que les phages. Ensuite, les phages contenant le plasmide pRMC2-MS2-SprC ont été mis en contact avec la souche Newman (WT ou $\Delta sprC$) dans du milieu BHI + CaCl₂ (10mM) pendant 15 minutes à température ambiante puis à 37°C

après addition de milieu BHI + Citrate de sodium (100mM). Pour finir, les clones ayant reçu le plasmide pRMC2-MS2-SprC ont été sélectionnés par du Chloramphénicol (10µg/mL) à 37°C.

2- Purification de SprC-MS2 et de ses partenaires : protéines et ARN.

Pour la purification des partenaires protéiques et ARN de SprC-MS2, 4 souches ont été utilisées (Tableau 2). Tout d’abord la souche sauvage (WT) de *S. aureus* Newman et la souche délétée du gène codant pour l’ARN SprC ($\Delta sprC$), contenant toutes les deux le plasmide pRMC2-MS2-SprC mais également deux contrôles, un contrôle négatif qui est la souche sauvage de *S. aureus* Newman possédant le plasmide pRMC2-MS2 et un contrôle interne de l’expérience, la souche sauvage de *S. aureus* Newman possédant le plasmide pRMC2-MS2-ARNIII. Des pré-cultures de ces 4 souches ont été diluées dans du BHI additionné de chloramphénicol (10µg/mL) à une $DO_{600}=0,1$ puis incubées 4H30 (ou 2H30) à 37°C. L’induction des ARN étiquetés MS2 a été réalisée par 1µM d’anhydrotétracycline pendant 10 min à 37°C. Puis après avoir centrifugé le milieu, le culot a été repris dans du Tampon de Lyse (20mM d’Hepes pH7.5, 200mM de NaCl, 1 mM de $MgCl_2$, 1 mM de β -mercaptoéthanol, 5% de glycérol et des anti-protéases), et les bactéries ont été lysées avec des billes de verres ($\leq 106\mu m$, Sigma) au Fastprep.

Tableau 4 : Souches et plasmides utilisés.

Souches	Plasmides	Souches transformées
<i>S. aureus</i> Newman sauvage (WT)	pRMC-MS2	<i>S. aureus</i> Newman WT pRMC-MS2
<i>S. aureus</i> Newman sauvage (WT)	pRMC-MS2-SprC	<i>S. aureus</i> Newman WT pRMC-MS2-SprC
<i>S. aureus</i> Newman $\Delta sprC$ (délétée du gène de <i>SprC</i>)	pRMC-MS2-SprC	<i>S. aureus</i> Newman $\Delta sprC$ pRMC-MS2-SprC
<i>S. aureus</i> Newman sauvage (WT)	pRMC-MS2-ARNIII	<i>S. aureus</i> Newman WT pRMC-MS2-ARNIII

Ensuite, contrairement à l’expérience précédente (vérification de l’expression et de l’accrochage), deux étapes de « pré-clear » successives des échantillons ont été réalisées avec de la résine d’amylose non chargée en MBP-MS2 pendant 10 minutes à 4°C en rotation. Cette étape est nécessaire afin d’éliminer les ARN et protéines interagissant de manière aspécifique avec l’amylose et pouvant ainsi perturber le signal final lors de l’élution. Puis l’étape de fixation des échantillons « pré-cleared » a été effectuée sur de la résine d’amylose chargée avec les

protéines MBP-MS2 pendant 15 minutes à 4°C en rotation. Enfin, après une centrifugation, le surnageant est éliminé avant la réalisation de 7 cycles de lavage avec un Tampon Wash (= Tampon de lyse sans les anti-protéases). A cette étape on conserve le surnageant du dernier lavage pour l'analyse protéique des partenaires de SprC.

3- Éluion et analyse des ARN.

Pour l'éluion des ARN fixés à la résine d'amylose, une extraction au phénol pH4 a été effectuée puis les ARN ont été précipités avec un mélange glycogène / acétate de sodium / éthanol, à -20°C, sur la nuit. Ensuite, les ARN précipités ont été centrifugés, lavés à l'éthanol 70% et repris dans de l'eau.

Pour l'analyse, un traitement à la DNase I (Amplification grade, Invitrogen) des ARN élués a été effectué puis les ADNc ont été obtenus avec le kit "high capacity cDNA reverse transcription" (Applied Biosystems). Enfin, une PCR quantitative a ensuite été réalisée sur les ADNc avec le kit RealMaster SYBR Green (5 prime®) en utilisant les amorces de 3 cibles, *atl*, *rot* et *gyrb* (Tableau 3) afin de vérifier que l'expérience a fonctionnée correctement. L'analyse des données de PCRq a été réalisée selon la méthode de quantification « delta-delta Ct », qui permet ici de calculer l'enrichissement d'un des ARNm cibles normalisé par rapport à l'ARNm de *Gyrb*, utilisé comme indicateur du bruit de fond de l'expérience.

Tableau 5 : Séquence des amorces utilisées pour l'analyse par PCRq.

Atl = Contrôle positif de SprC	Amorce sens (5'-3')	CCATGGGGTACGCAATCTAC
	Amorce anti-sens (5'-3')	CACCATTTTTGCAGCAACT
Rot = Contrôle positif de l'ARNIII	Amorce sens (5'-3')	GTTTTGGGATTGTTGGGATG
	Amorce anti-sens (5'-3')	GCAAATCCCAAATACAGTGTCG
GYRb = Contrôle du bruit de fond	Amorce sens (5'-3')	CCAGGTAAATTAGCCGATTGC
	Amorce anti-sens (5'-3')	AAATCGCCTGCGTTCTAGAG

Une fois cette première analyse réalisée, un séquençage ARN haut-débit (RNAseq) a été effectué sur les ARN isolés pour les trois souches étudiées, c'est-à-dire celle permettant l'induction de l'ARN SprC-MS2, celle permettant l'induction de l'étiquette MS2 (= contrôle négatif) et celle qui permet d'induire l'ARNIII-MS2. Pour cela, les ARN sont traités à la DNase I (Amplification grade, Invitrogen) puis la qualité des ARN vérifiée sur puce à ARN par

Bioanalyser® avant la préparation de bibliothèques d'ADNc à l'aide du kit « Ultra™ Directional RNA Library Prep Kit for Illumina » (New England Biolabs). Pour cela, les ARN ont été préalablement fragmentés en segments de 200 à 300 nucléotides avant la synthèse directionnelle d'ADN complémentaire bicaténaire. Ensuite, des adaptateurs sont ajoutés à chaque extrémité de ces doubles brins d'ADN et ces ADNc possédant l'adaptateur enrichis par PCR. Enfin la qualité des bibliothèques est vérifiée sur puce à ADN par Bioanalyser® avant d'être séquencées à la Plateforme Génomique Santé (Biosit Rennes) sur un séquenceur MiSeq (Illumina) en mode paired-end (2*75 nucléotides). Les données de séquençage générées ont ensuite été alignées sur le génome de la souche Newman et le niveau d'enrichissement des ARN isolés calculé avec le package DESeq [150] au moyen d'un fichier d'annotation contenant tous les gènes et ARN régulateurs connus.

4- Éluion et analyse des protéines.

Pour éluer les protéines, un traitement à la RNase I (Invitrogen™ Ambion™) pendant 30 minutes à 37°C a été réalisé. Ces protéines ainsi que les protéines présentes dans le dernier lavage ont ensuite été précipitées avec 10% final de TCA (Acide TriChloroacétique) pendant 2H sur glace, lavées à l'acétone et repris dans du tampon Laemmli (100mM Tris pH6,8 ; 0,1% SDS ; 20% glycérol ; bleu de bromophénol ; 100mM de β-mercaptoéthanol).

Les protéines ont ensuite été analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) 8%, 13% ou 15% (acrylamide/bisacrylamide (37.5:1), Tris 1,5M (pH8,8), 1% SDS, TEMED et 1% d'APS) additionné d'un gel de concentration à 4% (acrylamide/bisacrylamide (37.5:1), Tris 1,5M (pH6,8), 1% de SDS, TEMED et 1% d'APS). La migration est réalisée pendant 90 minutes à 15mA dans un tampon de migration contenant 25mM de Tris, 200mM de glycine et 0,1% de SDS puis et le gel a été coloré au Sypro Ruby (Biorad) selon les recommandations du fabricant.

II] Résultats et discussion.

A/ Résultats.

1- Vérification de l'expression de l'ARN SprC-MS2 et de son accrochage sur la résine d'amylose.

Pour vérifier l'expression et l'accrochage de SprC-MS2 (Figure 31) sur la résine d'amylose, une induction de l'expression de SprC-MS2 a été réalisée avec $1\mu\text{M}$ d'anhydrotétracycline pendant 10 min à 37°C . Après avoir lysé les bactéries, le lysat cellulaire a été déposé sur la résine d'amylose préchargée en protéines MBP-MS2, sur lesquelles les ARN étiquetés MS2 doivent normalement se fixer. Après lavage de la résine afin d'éliminer ce qui ne s'est pas fixé sur les MBP-MS2, les ARN ont été élués.

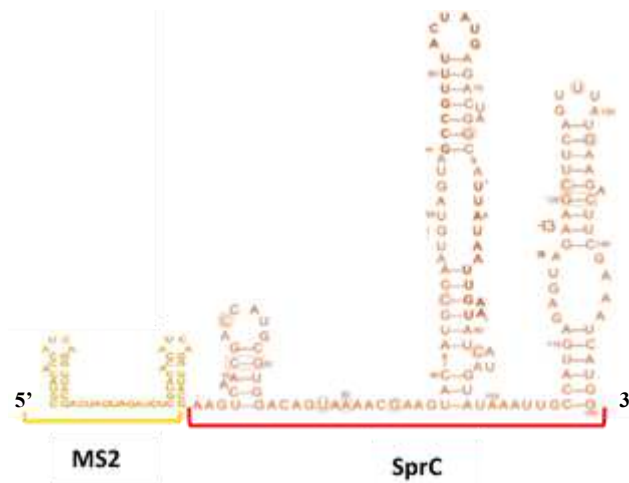


Figure 31 : Schéma représentant la séquence et la structure de l'ARN SprC-MS2. L'étiquette MS2 est représentée en jaune et l'ARN SprC en rouge.

A l'issue de cette expérience, 3 extraits ont été récupérés: l'extrait brut (avant passage sur la résine) qui nous montrera si SprC-MS2 est bien induit (dépôt n°2), l'éluat qui nous montrera la fixation sur la résine (dépôt n°4) ainsi que le Flow Through (dépôt n°3) qui correspond à ce qui ne s'est pas fixé sur la résine (Figure 32). Un contrôle sans induction a également été utilisé dont seul l'extrait brut a été prélevé (dépôt n°1). Les 4 extraits ont été analysés, en déposant un volume identique de chaque extrait, par Northern Blot à l'aide d'une sonde oligonucléotidique complémentaire de l'étiquette MS2 marquée radioactivement au P^{32} .

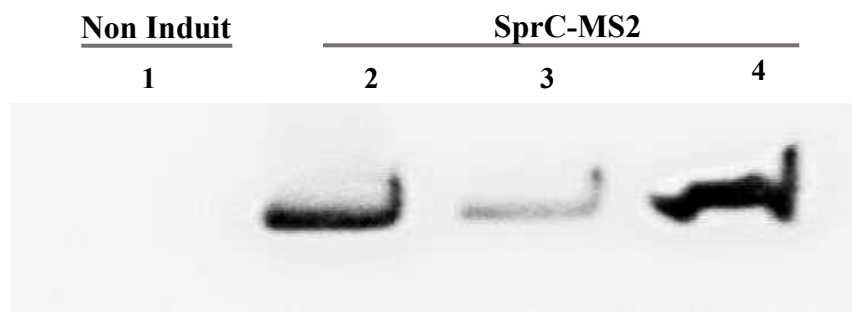


Figure 32 : Analyse par Northern Blot permettant de vérifier l'induction de l'ARN SprC-MS2 et sa fixation sur la résine d'amylose chargée en MBP-MS2. Un volume identique de chaque échantillon est déposé pour l'analyse.

1 = Contrôle négatif sans induction / **2**= Extrait brut / **3** = Flow Through / **4** = Éluat

Sur la figure 32, on peut voir que l'ARN SprC étiqueté MS2 est bien induit à l'anhydrotétracycline (dépôt **2**) par rapport au dépôt sans induction (dépôt **1**) mais surtout qu'il s'est bien accroché à la résine, comme on peut le voir sur le dépôt **4**. De plus, on observe que l'échantillon final (dépôt **4**) a été enrichi par rapport à l'extrait brut (dépôt **2**) alors que l'on a déposé les mêmes volumes d'extraits. Maintenant que l'on a la confirmation que l'expression de l'ARN SprC-MS2 est bien induite par l'anhydrotétracycline et qu'il s'accroche à la résine, le plasmide pRMC2-MS2-SprC a été introduit dans la souche Newman de *S. aureus* afin de réaliser les expériences de purification des partenaires de SprC-MS2 dans les bactéries.

2- Analyse des partenaires protéiques de SprC dans les bactéries.

Pour cette expérience, 4 souches de *S. aureus* Newman ont été utilisées (Tableau 4). La souche de *S. aureus* Newman (WT) et la souche isogénique délétée du gène exprimant l'ARN SprC ($\Delta sprC$), contenant toutes les deux le plasmide pRMC2-MS2-SprC. Deux contrôles ont également été réalisés, tout d'abord un contrôle négatif qui est la souche de *S. aureus* Newman possédant le plasmide pRMC2-MS2 mais également un contrôle positif, la souche de *S. aureus* Newman possédant le plasmide pRMC2-MS2-ARNIII. Les deux dernières souches ont été fournies par un ingénieur de recherche du laboratoire (Dr Hallier M.) qui a mis au point l'expérience et l'a testé sur l'ARNIII. Après avoir induit leur expression à l'anhydrotétracycline (1 μ M final), les extraits bruts d'ARN ont été déposés sur une résine d'amylose afin d'éliminer les interactions aspécifiques, puis sur une résine d'amylose chargée en protéines MBP-MS2 sur

lesquelles les ARN étiquetés MS2 se sont accrochés. Après plusieurs étapes de lavage, les protéines ont été éluées et analysées par gel SDS-PAGE. Deux temps de croissance bactérienne ont été choisis pour réaliser l'expérience, 2H30 et 4H30.

Le premier temps qui a été choisi est 4H30 de croissance et correspond à la fin de la phase exponentielle de croissance. Lors de l'analyse sur gel SDS-PAGE, aucune protéine ne semblait s'être fixée de manière plus importante sur les deux souches exprimant l'ARN SprC-MS2. Ce temps de croissance n'ayant pas été concluant pour l'ARN SprC au niveau des partenaires protéiques, il a été décidé de choisir un autre temps de croissance, 2H30. Dans cette condition, deux gels ont également été effectués, un gel à 8% et un autre à 15% (Figure 33). Sur les deux gels, on a pu observer au niveau du contrôle interne de l'expérience, dépôt « ARNIII-MS2 », deux bandes ayant migré vers 130-150kDa (bandes A), correspondant aux sous-unités de l'ARN polymérase. Ces deux bandes ont déjà été identifiées par le Dr Hallier M. au laboratoire dans une autre souche de *S. aureus* et permettent ainsi de valider le bon fonctionnement de l'expérience. On peut également observer une protéine ayant migré vers 30kDa (bande B) qui s'est fixée plus fortement sur l'ARN SprC-MS2 (souche WT) que sur l'ARN MS2 du contrôle négatif. De plus, il est intéressant de remarquer que cette bande est plus intense dans la souche délétée du gène *SprC* ($\Delta sprC$).

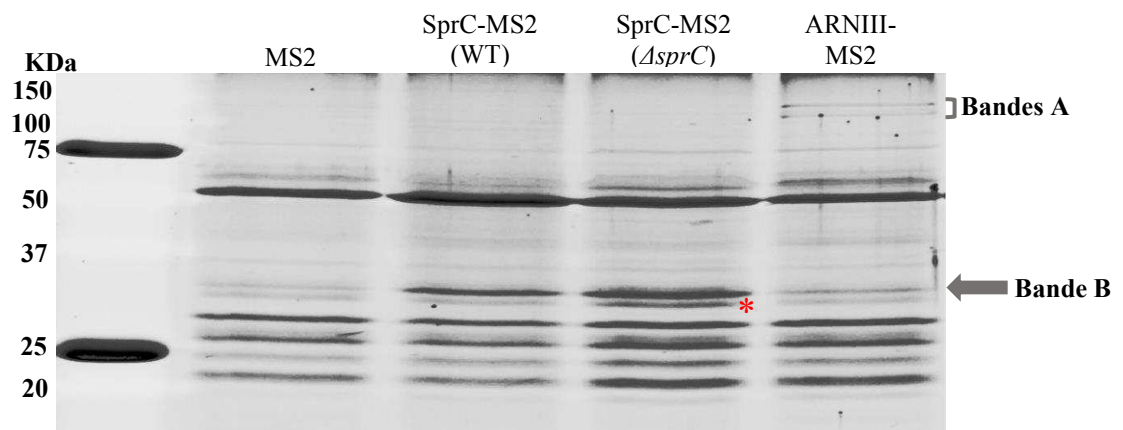


Figure 33 : Analyse par gel SDS-PAGE 15% des partenaires protéiques fixés à l'ARN SprC étiqueté MS2 après 2H30 de croissance bactérienne.

Bandes A = Sous unités de l'ARN polymérase s'étant fixées au contrôle interne de l'expérience, l'ARNIII-MS2.

Bande B = Protéine(s) inconnue(s) d'environ 30kDa se fixant plus fortement sur l'ARN SprC-MS2 que sur MS2 ou sur l'ARNIII-MS2.

* = bande non enrichie de manière reproductible au cours des triplicats biologiques.

Afin de vérifier s'il n'y avait pas plusieurs bandes regroupées au niveau de la bande B et ainsi en faire ressortir une qui serait spécifique de SprC, un gel SDS-PAGE à 13% a été effectué afin de séparer la zone entre 25 et 50kDa, où se situe la bande d'intérêt. Les protéines s'étant fixées sur les ARN étiquetés MS2 après 2H30 et 4H30 de croissance ont été déposées en parallèle afin de comparer les deux temps de croissance l'un par rapport à l'autre (Figure 34). Il semblerait qu'il n'y ait qu'une seule bande au niveau de « B », correspondant à une ou des protéine(s) inconnue(s) qui semble(nt) s'être fixée(s) aux trois ARN étiquetés MS2 induits après 2H30 de croissance. Cette protéine se fixe mieux sur l'ARN SprC (souche WT et $\Delta sprC$) que sur les ARN MS2 et l'ARNIII-MS2. Si l'on compare les deux souches exprimant SprC-MS2, la fixation est meilleure dans la souche isogénique délétée du gène de SprC ($\Delta sprC$) qui n'exprime donc plus de SprC endogène. De plus en comparant les protéines fixées sur les ARN induits à 2H30 et à 4H30, on remarque que cette protéine se fixe également sur les ARN induits après 4H30 de croissance, mais de manière beaucoup plus faible (Figure 34). Il a ainsi été décidé de privilégier un temps de 2H30 de croissance avant d'induire les ARN étiquetés MS2 afin de confirmer ce résultat.

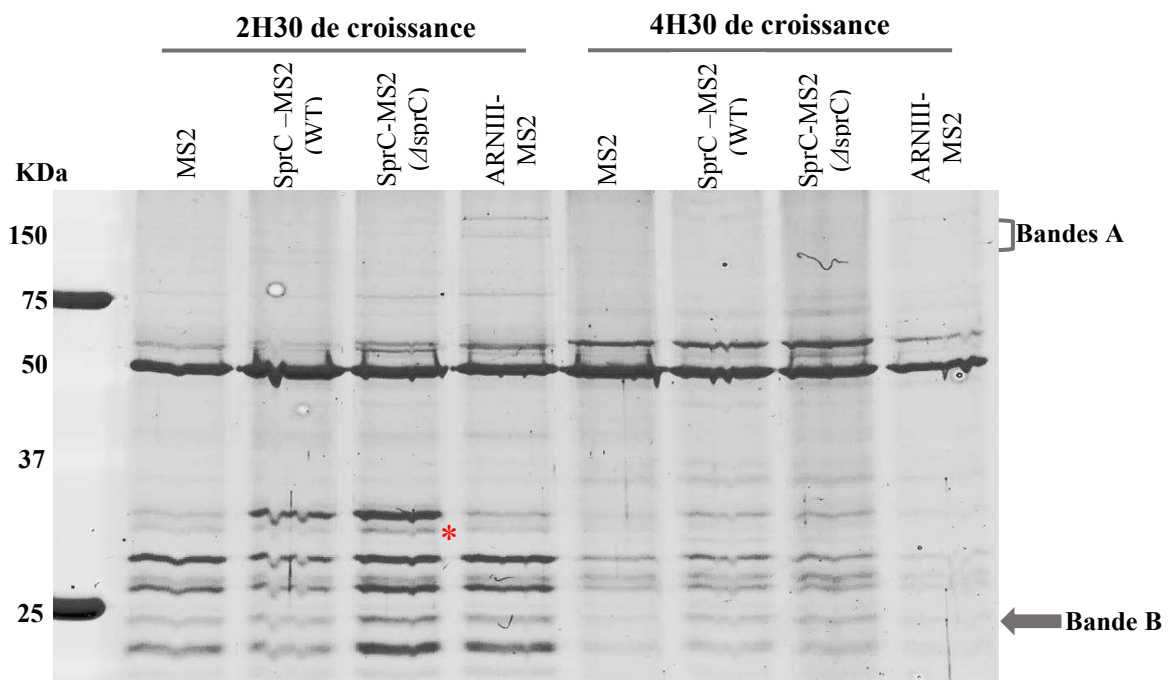


Figure 34 : Analyse par gel SDS-PAGE 13% des partenaires protéiques fixés à l'ARN SprC étiqueté MS2 après 2H30 et 4H30 de croissance bactérienne.

Bandes A = Sous unités de l'ARN polymérase s'étant fixées au contrôle interne de l'expérience ARNIII-MS2.

Bande B = Protéine(s) inconnue(s) d'environ 30kDa se fixant plus fortement sur l'ARN SprC-MS2 que sur MS2 ou sur l'ARNIII-MS2.

* = bande non enrichie de manière reproductible au cours des triplicats biologiques.

Après validation de ce résultat par 3 expériences indépendantes, cette bande protéique inconnue a été découpée du gel et analysée par Spectrométrie de masse (Plateforme protéomique, Université Paris Descartes, Institut Cochin, Paris). La bande correspondante à la protéine s'étant fixée sur le contrôle négatif MS2 et possédant la même taille apparente a également été envoyée à analyser, afin de pouvoir définir quelle protéine est spécifique de l'ARN SprC puisqu'il semblerait que des protéines aspécifiques soient aussi présentes au niveau de cette bande.

L'analyse par Spectrométrie de masse nous a fourni une liste de protéines (Tableau 6) identifiées à partir de la bande protéique d'un poids apparent de 30kDa isolée par gel SDS-PAGE. La plupart de ces protéines ont été identifiées à la fois pour la bande prélevée au niveau du dépôt de SprC-MS2, mais également au niveau de la bande prélevée au niveau du dépôt du témoin négatif MS2. Le candidat le plus sûr pour la protéine se fixant fortement à SprC est la protéine ribosomale S2 (sous-unité 30S) puisqu'elle représente environ 65% des protéines identifiées au sein de la bande analysée. De plus, elle possède le plus de peptides identifiés et sa masse moléculaire théorique est de 29kDa, ce qui est en accord avec la masse moléculaire apparente observée sur le gel SDS-PAGE, et permet de confirmer qu'il s'agit d'un candidat sérieux. Cependant, nous ne pouvons pas exclure la protéine ribosomale L2 (sous unité 50S) comme candidat étant donné qu'elle représente presque 20% des protéines identifiées dans la bande analysée avec 9 peptides identifiés. De plus, sa masse moléculaire, de 30kDa, correspond à ce qui était observé sur le gel SDS-PAGE.

Tableau 6 : Liste des protéines identifiées par Spectrométrie de masse dans la bande d'intérêt, de poids apparent d'environ 30kDa.

Le Score Total d'Ions correspond à la somme des scores d'ions des peptides identifiés pour une protéine.

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

3- Analyse des partenaires ARN de SprC.

La purification des partenaires ARN de SprC se déroule de la même manière que pour les partenaires protéiques, sauf pour l'éluion où une extraction au phénol pH4 est réalisée. Ensuite, les ARN extraits sont rétro-transcrits en ADNc avant d'être analysés par PCRq pour suivre l'enrichissement de cibles ARNm connues (cf paragraphe suivant). Pour cela, les mêmes souches de *S. aureus* Newman ont été utilisées (Tableau 4), c'est-à-dire la souche sauvage (WT) et la souche isogénique délétée du gène exprimant l'ARN SprC ($\Delta sprC$), permettant l'induction de l'ARN SprC-MS2, mais également les deux contrôles : le contrôle négatif qui permet uniquement l'induction de l'étiquette MS2 et le contrôle positif qui permet d'induire l'ARNIII-MS2.

a) Validation de la méthode d'extraction des ARN en interaction directe avec SprC-MS2 dans les bactéries.

La validation de la méthode a été effectuée par PCRq en utilisant deux cibles : l'ARNm du facteur de transcription Rot connu pour se fixer à l'ARNIII [149], qui va servir de contrôle positif interne de la purification, et l'ARNm de l'Atl qui est fixé par l'ARN SprC afin de réguler sa traduction [144] et va également servir de contrôle positif. Les résultats ont été normalisés par rapport à l'ARNm de Gyrb qui sert d'indicateur de bruit de fond de l'expérience. Le facteur d'enrichissement de l'ARNm de Rot (Figure 34) et de l'Atl a ainsi pu être calculé dans les lysats finaux obtenus pour les 4 souches utilisées (Tableau 4).

Si l'on compare les ARNm isolés dans les différents lysats, on voit que l'ARNm de Rot a été enrichi d'un facteur 8 grâce à sa fixation sur l'ARNIII-MS2, comparé aux deux autres ARN étiquetés MS2 ainsi qu'au contrôle « MS2 » seul (Figure 35). L'ARNm de Rot étant un partenaire connu de l'ARNIII [149], cela nous permet de valider la méthode et l'on peut ainsi affirmer que si d'autres partenaires ARNm de l'ARNIII ou de SprC existent, ceux-ci se seront fixés, auront été enrichis dans l'éluat final et pourront ainsi être identifiés.

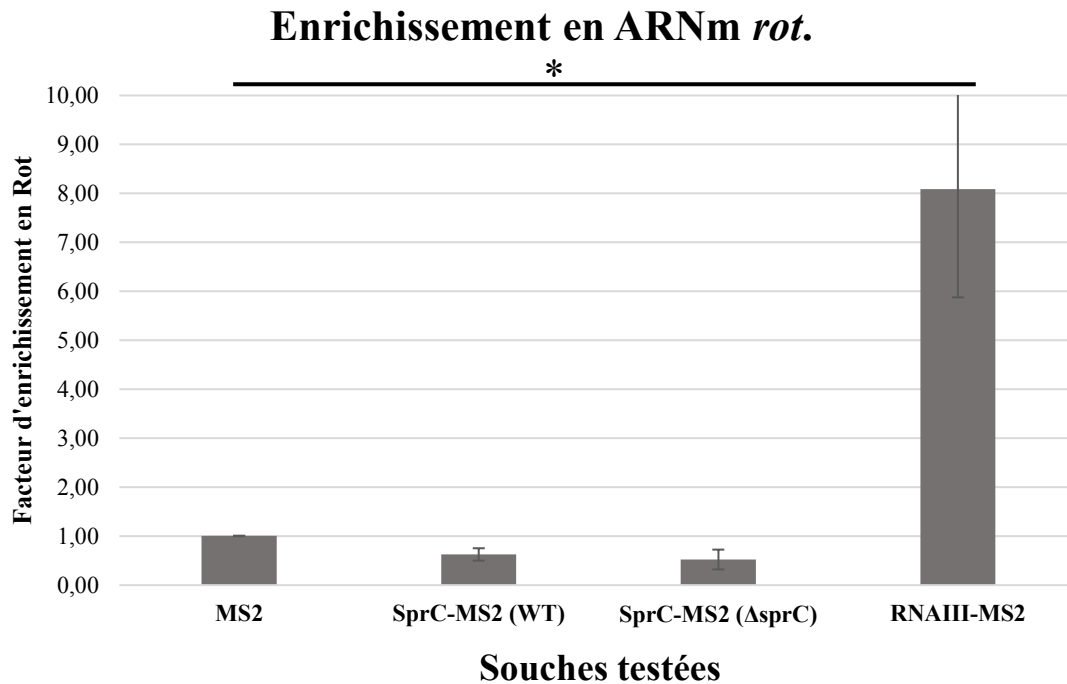


Figure 35 : Analyse par PCRq de la présence de l'ARNm du facteur de transcription Rot, normalisé par rapport à l'ARNm de Gyrb. L'analyse des données a été réalisée selon la méthode de quantification « delta-delta Ct », qui permet de calculer l'enrichissement d'un des ARNm cibles normalisé par rapport à l'ARNm Gyrb, utilisé comme indicateur du « bruit de fond » de l'expérience. La différence est statistiquement significative avec une p-value < 0.01 (*) sur 3 expériences indépendantes (Test de Student).

Il a été montré que l'ARN SprC se fixait à l'ARNm de l'Atl afin de réguler sa traduction et moduler son effet à la fois sur la virulence de *S. aureus* mais également sur sa phagocytose par les macrophages humains [144]. Cela nous permet donc d'avoir également un contrôle positif de la méthode pour l'ARN SprC. C'est pourquoi le facteur d'enrichissement de l'ARNm de l'Atl a également été calculé pour les 4 lysats finaux. Cependant, contrairement à l'ARNm de Rot, on n'observe pas d'enrichissement de l'ARNm de l'Atl dans les souches exprimant SprC-MS2. Plusieurs explications, détaillées dans la discussion, peuvent être avancées pour tenter d'expliquer ce résultat.

b) Analyse des données de captures d'ARN cibles de SprC par RNAseq.

La technique du RNAseq a été effectuée à partir des éluats obtenus avec les 3 souches utilisées, c'est-à-dire celle permettant l'induction de l'ARN SprC-MS2, celle permettant l'induction de l'étiquette MS2 (contrôle négatif) et celle qui permet d'induire l'ARNIII-MS2. La souche isogénique délétée du gène de SprC ($\Delta sprC$) a été éliminée afin de privilégier les souches les plus proches possible du point de vue génétique, pour l'analyse. Des bibliothèques d'ADNc ont ensuite été préparées à partir des différents éluats contenant les ARN isolés au cours de 3 expériences indépendantes pour les trois souches sélectionnées. Ces bibliothèques ont été séquencées à la Plateforme Génomique Santé (Biosit Rennes) et les données de séquençage générées ont été alignées sur un génome de référence de *S. aureus* Newman. A partir de cet alignement, les ARN ayant été enrichis ont ainsi pu être identifiés. A partir des données obtenues, nous avons tout d'abord validé la méthode grâce à l'analyse des ARN enrichis par leur fixation sur l'ARNIII-MS2 qui sert de contrôle interne à l'expérience. En effet, plusieurs cibles connues de l'ARNIII ont pu être identifiées par RNAseq (Tableau 7).

Tableau 7 : Cibles de l'ARNIII connues identifiées par le RNAseq et permettant de valider l'expérience.

Gène	Nombre de « reads » (MS2)	Nombre de « reads » (ARNIII)	Facteurs d'enrichissement (>2)
Srn_3910 = ARNIII	129	12007	93
NWMN_1073 = <i>hla</i> (alpha-hémolysine)	0,25	6,2	24
NWMN_1655 = Facteur de transcription Rot	4,5	21,6	5
NWMN_0655 = MgrA (protéine régulatrice de la famille MarR)	23,8	89,3	3,8

Parmi les ARN identifiés ayant été enrichis par leur fixation sur l'ARNIII-MS2, nous retrouvons le facteur de transcription Rot nous ayant servi à valider la méthode par PCRq avant la réalisation du RNAseq. De plus, nous retrouvons deux autres cibles connues qui sont l'ARNm codant l'hémolysine alpha, dont la traduction est favorisée par la fixation de l'ARNIII, ainsi que l'ARNm codant MgrA, une protéine de régulation, qui est stabilisée par la fixation de

l'ARNIII. Ces cibles nous donnent également un ordre d'idée du facteur d'enrichissement que l'on peut attendre pour considérer une cible comme biologiquement relevante.

La méthode ayant permis de retrouver des cibles connues de l'ARNIII, nous avons pu analyser les données provenant du RNAseq des extraits issus de SprC-MS2. Nous avons ainsi identifié plusieurs ARNm (Tableau 8). Tout d'abord, l'ARNm de la purine nucléoside phosphorylase, une enzyme impliquée dans la voie de dégradation des nucléosides puriques, qui a été enrichi d'un facteur 36. On retrouve également l'ARNm de la protéine MgrA avec un facteur de 6. Enfin, nous retrouvons deux transcrits du système *agr*, *agrB* et *agrC* situés dans le même opéron avec un facteur d'enrichissement respectif de 4 et 2,5.

Tableau 8 : Liste des ARN enrichis grâce à leur fixation à l'ARN SprC-MS2 et identifiés par RNAseq.

Gène	Nombre de reads (MS2)	Nombre de reads (SprC)	Facteur d'enrichissement (>2)
SprC (srn_3610)	0,91	29285	32277
NWMN_2042 = Purine nucléoside phosphorylase (<i>deoD</i>)	3,7	132,7	36
NWMN_0655 = MgrA (protéine régulatrice de la famille MarR)	23	142,4	6
NWMN_1943 = <i>agrB</i> (système <i>agr</i>)	31,3	128,3	4
NWMN_1945 = <i>agrC</i> (système <i>agr</i>)	48,1	120	2,5

B/ Discussion.

Au cours de ce stage j'ai étudié un ARN régulateur, SprC, impliqué dans la virulence des bactéries sur un modèle murin et dans la phagocytose des bactéries par les macrophages humains [144]. SprC intervient dans le mécanisme de phagocytose, en partie, par son contrôle de l'expression d'une protéine, l'Autolysine (Atl). SprC agit par régulation négative de la production de l'Atl en bloquant, par inhibition directe, la traduction de son ARNm [144]. Cependant, les auteurs ont montré que l'interaction entre les deux partenaires était faible ($K_d = 35\mu\text{M}$), suggérant l'implication d'acteurs supplémentaires dans cette interaction. L'objectif de mon stage a eu pour but d'utiliser une technique de chromatographie d'affinité mettant en jeu une étiquette MS2 afin d'identifier de nouveaux partenaires protéiques et ARN de l'ARN SprC. Cette méthode présente une première limite puisque l'ajout de l'étiquette MS2 sur l'ARN SprC peut entraîner une modification de conformation de l'ARN. Pour pallier à ce biais, la méthode comporte un contrôle interne, l'ARNIII dont plusieurs cibles ARNm sont connues ainsi que des cibles protéiques identifiées au sein du laboratoire dans une autre souche de *S. aureus* (données non publiées).

Nous avons utilisé cette technique afin d'isoler les partenaires protéiques de SprC-MS2. Nous avons validé la méthode sur gel SDS-PAGE en isolant deux protéines correspondant aux sous unités de l'ARN polymérase par leur fixation sur l'ARNIII (Figure 32). Ensuite, nous avons analysé les protéines se fixant à SprC et ainsi identifié plusieurs protéines dont le candidat le plus sérieux est la protéine ribosomale S2, de par son pourcentage d'abondance dans la bande mais également par le nombre de peptides identifiés ainsi que par sa masse moléculaire théorique. De plus, cette protéine semble se fixer de manière plus importante à SprC dans la souche isogénique délétée de SprC (*ΔsprC*). Cela peut s'expliquer car l'ARN SprC endogène n'étant plus présent, il ne va plus interférer avec le pool disponible en partenaires protéiques permettant à ceux-ci de se fixer uniquement à l'ARN SprC-MS2 dont l'expression est induite par l'anhydrotétracycline. La protéine S2 fait partie de la sous unité 30S du ribosome et est située aux abords du site de fixation du facteur d'initiation IF-2 au niveau du ribosome et est impliquée dans la formation du complexe d'initiation de la traduction, notamment par le recrutement de la protéine S1. Elle est également impliquée dans la formation du ribosome 100S, un ribosome inactif qui se forme en condition de stress, en permettant la liaison des deux sous-unités 30S. Enfin, la protéine S2 est une protéine liant l'ARN puisqu'elle se lie à l'ARN ribosomal 16S au niveau de l'hélice H26 dans le corps de la sous unité 30S et au niveau des

hélices H35-H37 au niveau de la tête de la sous unité. Sa capacité à lier les ARN ribosomiques peut expliquer qu'elle se soit fixée sur les 3 ARN étiquetés MS2 (MS2, ARNIII et SprC-MS2). Cependant, elle a été enrichie par sa fixation sur l'ARN SprC par rapport à sa fixation sur le contrôle négatif MS2 et par rapport à l'ARNIII. Cette plus forte fixation sur SprC peut indiquer un mécanisme d'action lié aux ARN régulateurs car elle a déjà été identifiée comme se fixant à un autre ARN régulateur de la famille des Spr, l'ARN SprD (données non publiées). Cependant, la protéine ribosomale L2 ne doit pas être exclue des candidats si l'on tient compte des mêmes éléments que pour la protéine S2, à savoir le pourcentage d'abondance dans la bande analysée, le nombre de peptides identifiés ainsi que la masse moléculaire théorique. La protéine L2 fait partie de la sous unité 50S du ribosome, où elle se lie à l'ARN 23S, et est la protéine la plus conservée de ce complexe. Elle est située à proximité de la base de la tige de la protéine L1 et représente la protéine la plus importante du centre peptidyl-transférase. De plus elle possède la capacité de lier l'ARN de transfert et est impliquée dans la formation de la liaison peptidique ce qui montre l'importance qu'elle joue dans l'activité peptidyl-transférase. Enfin, elle est requise pour l'association des sous unités 30S et 50S lors de la formation du ribosome 70S.

Ensuite, nous avons réalisé l'expérience pour isoler les partenaires ARN de SprC. Pour cela nous avons initialement validé la méthode en utilisant l'ARNIII-MS2 en tant que contrôle interne en vérifiant que nous enrichissions bien l'ARNm du facteur de transcription Rot dans les extraits provenant de l'ARNIII-MS2 comme attendu [149]. Nous avons également utilisé un contrôle positif, l'ARNm de l'Atl qui se fixe à SprC [144]. L'ARNm de Rot a été enrichi d'un facteur 8 dans l'extrait issu de l'ARNIII-MS2 ce qui nous permet de valider notre méthode (Figure 34). En revanche, l'ARNm de l'Atl n'a pas été enrichi que ce soit dans la souche sauvage (WT) ou dans la souche isogénique délétée du gène de *SprC* ($\Delta sprC$), ce qui peut être expliqué par plusieurs hypothèses. Tout d'abord, il a été prouvé que l'interaction entre SprC et l'ARNm de l'Atl est faible ($K_d = 35 \mu M$) [144], et elle n'est peut-être pas suffisante pour permettre de l'isoler convenablement. De plus, lors des étapes de purification, de nombreux lavages sont réalisés afin d'éliminer le plus d'ARN fixés de manière aspécifique et ainsi réduire au maximum le bruit de fond. Or, il faut trouver le juste équilibre au niveau des lavages, avec assez de lavages pour diminuer le bruit de fond et ainsi faire ressortir un ARNm majoritaire, mais pas trop au risque de ne pas pouvoir détecter cet ARNm majoritaire. A ces deux hypothèses, on peut également en ajouter une troisième qui est que l'addition de l'étiquette MS2 peut modifier la conformation de SprC et ainsi empêcher l'ARNm de l'Atl de se fixer. Enfin, au temps de croissance choisi pour effectuer l'expérience, l'ARNm de l'Atl est peu

exprimé [144], ainsi son pool disponible est faible et donc il est possible que l'on n'isole pas assez d'ARNm pour pouvoir observer un enrichissement.

La méthode étant validée par l'enrichissement en ARNm de Rot, un « RNAseq » a alors été réalisé afin d'identifier les ARN isolés dans nos éluats. Nous avons validé l'ensemble de l'expérience par l'identification de 3 cibles connues de l'ARNIII, l'ARNm du facteur de transcription Rot, l'ARNm de l'hémolysine alpha ainsi que l'ARNm de MgrA. On observe également un enrichissement (facteur 93) de l'ARNIII ce qui était attendu du fait qu'il a été surexprimé durant l'expérience. Grâce à ce contrôle, on montre que l'ajout d'une étiquette MS2 sur un ARN n'empêche pas la fixation des partenaires d'un ARN étiqueté MS2. Ensuite, nous avons analysé les données issues de « SprC-MS2 » et comme pour l'ARNIII on observe un enrichissement de l'ARN SprC (facteur 33277) qui a été surexprimé comme attendu. De plus, nous avons identifié l'ARNm de 4 gènes enrichis par leur fixation à SprC-MS2. En revanche, comme lors de la validation par PCRq, on ne retrouve pas l'ARNm de l'Atl dans les ARNm enrichis par leur fixation à SprC. Cela était prévisible du fait de l'absence d'enrichissement observé par PCRq mais également au vue des quatre hypothèses discutées précédemment.

L'ARNm possédant le facteur d'enrichissement le plus important est celui de la purine nucléoside phosphorylase (PNP) (facteur 36) ce qui est supérieur au facteur d'enrichissement des cibles de l'ARNIII. De plus, en utilisant le logiciel IntaRNA, une prédiction d'interaction impliquant une dizaine de nucléotides a pu être mise en évidence au niveau de la région interne codante l'ARNm de la PNP. Cette interaction aboutira à la formation d'une zone double brin pouvant être dégradée par l'endoribonucléase III et qui permet d'envisager une régulation négative de SprC par dégradation de l'ARNm de la PNP. La PNP est une enzyme clé de la voie de récupération des purines, qui catalyse le clivage réversible de la liaison N-glycosidique des nucléosides puriques pour générer des bases puriques libres et de l' α -ribose-1-phosphate. Cette voie de récupération permet aux organismes de synthétiser de nouveaux nucléotides en utilisant des bases et des α -ribose-1-phosphate à partir de ribonucléosides et de désoxyribonucléosides métabolisés, ce qui constitue une économie d'énergie par rapport à la synthèse *de novo*. L'absence d'ARN SprC augmente la virulence et la propagation de *S. aureus* dans un modèle murin [144]. L'augmentation de la quantité de PNP pourrait expliquer cette augmentation de virulence par le fait que *S. aureus* pourrait plus facilement utiliser la voie de récupération des purines puisque le métabolisme des purines serait alors augmenté. De plus, ils ont également montré que le niveau d'expression de SprC diminuait au cours du temps une fois les bactéries

internalisées. Cela se traduirait par une diminution de l'inhibition de la PNP qui serait alors disponible en plus grand nombre permettant une économie dans la production des nucléotides nécessaires à la synthèse d'ADN et d'ARN au sein des cellules hôtes et donc favoriser la réplication.

On retrouve également un ARNm enrichi d'un facteur 6 ce qui est supérieur au contrôle Rot utilisé lors de l'ensemble de l'expérience (facteur 5). Cet ARNm code pour la protéine MgrA, un homologue de la protéine SarA, appartenant aux protéines régulatrices de la sous-famille MarR. MgrA modifie la transcription d'au moins 350 gènes et est notamment impliquée dans l'activité d'autolyse, dans la résistance aux médicaments et dans la virulence. L'ARN SprC, lui, est impliqué dans la phagocytose des bactéries par les macrophages humains, en partie par son contrôle de l'expression de l'Atl, une peptidoglycane hydrolase [144]. De plus, il a été montré que MgrA réprimait l'expression de l'Atl par inhibition du régulateur transcriptionnel SarV. Avec le logiciel IntaRNA, une prédiction d'interaction directe a pu être mise en évidence au niveau de la région codante de l'ARNm de MgrA, ce qui permet d'envisager une stabilisation de cet ARNm par SprC. Ainsi SprC agirait sur l'expression de l'Atl par deux mécanismes : tout d'abord en bloquant la traduction de l'Atl par fixation sur son ARNm, ce qui diminuerait la quantité d'Atl. De plus, en stabilisant l'ARNm de MgrA il entraînerait une augmentation de la protéine MgrA qui pourrait alors inhiber l'expression de l'ARNm de l'Atl par l'intermédiaire de l'inhibition du facteur de transcription SarV.

Enfin, on retrouve également l'ARNm de deux éléments de l'opéron *agr*, AgrB et AgrC. Ces deux éléments présentent des facteurs d'enrichissement plus faibles, respectivement 4 et 2,5. Chacun de ces deux ARNm codent une protéine transmembranaire du système *agr*, AgrB qui est une protéine de transport et de protéolyse qui va permettre la sécrétion et le clivage du pro-AIP en AIP (Peptide Auto-Inducteur) et AgrC qui est le senseur du système à deux composants AgrC/AgrA. Le système *agr* est impliqué dans la régulation de nombreux gènes de virulence et facilite ainsi le passage de l'étape de colonisation à l'étape d'infection. La prédiction d'interaction grâce au logiciel IntaRNA a révélé un motif d'interaction de SprC avec la région codante de l'ARNm d'AgrB et d'AgrC ce qui pourrait entraîner, comme pour l'ARNm de la PNP, une dégradation de ces ARNm et donc une diminution de l'efficacité du système *agr*. Le système *agr* joue un rôle important dans la virulence, ainsi une diminution de ces deux composants pourrait entraîner une diminution de virulence qui serait compatible avec le phénotype de virulence atténuée provoqué par SprC.

Pour finir, au début de la discussion, une des limites de la méthode de l'étiquette MS2 était discutée, à savoir le fait d'ajouter cette étiquette MS2 sur un ARN pouvait entraîner un changement de conformation, qui empêcherait alors des partenaires de se fixer. Cependant, ce biais doit également être pris en compte dans le sens inverse, c'est-à-dire que l'on ne peut pas affirmer que l'ajout d'une étiquette MS2 ne pourrait pas permettre l'interaction de partenaires qui n'interagiraient pas en temps normal *in vivo* dans la bactérie. C'est pourquoi toutes les interactions mises en évidence nécessiteront une confirmation par des méthodes *in vitro*.

III] Conclusion et perspectives.

L'objectif de mon stage était d'utiliser une technique de chromatographie d'affinité mettant en jeu un ARN régulateur, SprC, fusionné à une étiquette MS2 afin d'identifier de nouveaux partenaires protéiques et ARN de cet ARN régulateur. Pour cela, la construction d'un plasmide exprimant l'ARN SprC-MS2 a été réalisée et la vérification de l'expression de cet ARN ainsi que de sa fixation à la résine d'amylose utilisée pour la chromatographie d'affinité a été effectuée. Nous avons ensuite validé cette méthode au niveau protéique mais également au niveau ARN par l'identification de cibles connues de l'ARNIII, qui nous servait de contrôle positif interne de l'expérience. Nous avons tout d'abord identifié au niveau protéique deux bandes correspondant aux sous unités de l'ARN polymérase (montré par le Dr Hallier M. dans une autre souche de *S. aureus*), puis au niveau ARN, l'enrichissement d'un ARNm cible connu, *rot*, a été contrôlé par PCRq.

Une fois cette vérification effectuée, la méthode a été réalisée pour identifier de nouveaux partenaires de SprC. Au niveau protéique, la protéine ribosomale S2 a ainsi pu être mise en évidence par gel SDS-PAGE et identifiée par Spectrométrie de masse (Plateforme protéomique, Université Paris Descartes, Institut Cochin, Paris). Au niveau des partenaires ARN, un RNAseq a permis l'identification de 4 ARNm candidats se fixant à SprC-MS2 qui sont *deoD* (gène de la purine nucléoside phosphorylase), *mgrA* (gène d'une protéine régulatrice de la famille MarR) ainsi que *agrB* et *agrC*, deux composants du système *agr*.

La suite de ce travail consistera en la validation biologique de ces 5 candidats cibles. Pour cela, il faudra tout d'abord vérifier que les candidats sont retrouvés dans les éluats issus de la purification. Pour la protéine candidate, un Western Blot avec des anticorps anti-protéine S2 devra être réalisé pour confirmer que cette protéine est bien présente dans les éluats. Pour les 4 candidats ARNm, le calcul de leur facteur d'enrichissement par PCRq devra être effectué afin de vérifier qu'ils sont bien enrichis dans les éluats issus des souches exprimant l'ARN SprC-MS2 (souches WT et *ΔsprC*). Ensuite, une validation *in vitro* de l'interaction entre chacun des 5 candidats et l'ARN SprC devra être effectuée par la méthode du gel retard. Une analyse *in vitro* par PCRq des niveaux d'expression des ARNm cibles lorsque l'on surexprime SprC dans les bactéries pourra confirmer ces interactions. Pour toutes les expériences de validation d'interaction, que ce soit pour les candidats ARNm et protéiques, il sera nécessaire d'utiliser l'ARN SprC endogène mais également l'ARN SprC-MS2 afin de vérifier que les interactions

ne sont pas dues à la présence de l'étiquette MS2. Une fois que ces interactions auront été validées, il sera nécessaire d'identifier les zones d'interaction *in silico* puis de les valider par gel retard. Ensuite des études de la régulation traductionnelle des ARNm en présence et en absence de SprC pourront être réalisées à l'aide de Toeprint ou d'expérience de traduction *in vitro*.

Après ces études *in vitro*, il faudra également étudier la régulation traductionnelle des ARNm en présence et en absence de SprC *in vivo* (expériences de fusion traductionnelle avec GFP) ainsi que leur stabilité en fonction de l'expression de SprC par RT-qPCR. Enfin, pour la protéine S2, la validation de l'interaction avec SprC devra être effectuée *in vivo* par immunoprécipitation de l'ARN.

Pour finir, des études phénotypiques utilisant des mutants délétés des gènes candidats versus la souche sauvage de *S. aureus* Newman pourront être envisagées afin d'étudier le rôle de ces différents candidats dans la virulence de *S. aureus* sur modèles murins d'infections staphylococciques et dans la phagocytose des bactéries par les macrophages humains. A terme, le but est d'essayer de développer de nouveaux outils pour lutter contre les infections à *S. aureus*, que ce soit des outils de diagnostics précoces mais également de nouvelles molécules antibactériennes aboutissant à de nouvelles thérapies anti-staphylococciques.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] **Rigby K.M. and Deleo F.R.**, « Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections », *Semin. Immunopathol*, 2012, **34**: 237-259.
- [2] **Krakaeur T., Pradhan K. and Stiles B.G.**, « Staphylococcal Superantigens Spark Host-Mediated Danger Signals », *Front Immunol*, 2016, **7**: 23.
- [3] **Li Z., Peres A.G., Damian A.C. and Madrenas J.**, « Immunomodulation and Disease Tolerance to *Staphylococcus aureus* », *Pathogens*, 2015, **4**: 793-815.
- [4] **Smith A.C.**, « *Staphylococcus sp.* (Enlarged view) » [en ligne], *American Society for Microbiology*, 2005:
<http://lib.jiangnan.edu.cn/asm/116-introduce.htm> (consulté en mars 2016).
- [5] **Hans N.**, « *Staphylococcus aureus* on Tryptic Soy Agar. Cultivation 24 hours, 37°C » [en ligne], *Wikipedia*, 2012 :
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Staphylococcus_aureus_on_TSA.jpg (consulté en mars 2016).
- [6] **Sollid J.U.E., Furberg A.S., Hanssen A.M. and Johannessen M.**, « *Staphylococcus aureus*: Determinants of human carriage », *Infect Genet Evol*, 2014, **21**: 531-541.
- [7] **Foster T.J.**, « The *Staphylococcus aureus* “superbug” », *J Clin Invest*, 2004, **114**: 1693-1696.
- [8] **Nair N., Biswas R., Götz F. and Biswas L.**, « Impact of *Staphylococcus aureus* on Pathogenesis in Polymicrobial Infections », 2014, *Infect Immun*, **82**: 2162-2169.
- [9] **Sinha B. and Herrmann M.**, « Mechanism and consequences of invasion of epithelial cells by *Staphylococcus aureus* », *Thromb Haemost*, 2005, **94**: 266-277.

[10] **Kant R., Taponen S., Koort J., Paulin L., Åvall-Jääskeläinen S. and Palva A.**, « Genome Sequences of Four *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Bovine Mastitis », *Genome Announc*, 2015, **3**(2): e00334-15.

[11] **Zecconi A. and Scali F.**, « *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases », *Immunol Lett*, 2013, **150**: 12-22.

[12] **Lowy F.D.**, « *Staphylococcus aureus* infections », *N Engl J Med*, 1998, **339**: 520-532.

[13] **Hennekinne J.A., De Buyser M.A. and Dragacci S.**, « *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterisation and outbreak investigation », *FEMS Microbiol Rev*, 2011, **36**: 815-836.

[14] **Ligon B.L.**, « Penicillin: Its Discovery and Early Development », *Semin Pediatr Infect Dis*, 2004, **15**: 52-57.

[15] **Michigan State University**, « The Golden Age of Antibacterials » [en ligne], *Antimicrobial Resistance Learning Site*, 2011:
<http://amrls.cvm.msu.edu/pharmacology/historical-perspectives/the-golden-age-of-antibacterials> (consulté en mars 2016).

[16] **Gougeon A.**, Cours de 3^{ème} année de pharmacie « Mode de résistance aux antibiotiques », *Université de Pharmacie de Rennes 1*, 2013.

[17] **Jacopin S.**, « Mécanisme de la résistance des bactéries aux antibiotiques » [en ligne], *Cowblog*, 2014 :
<http://lancien.cowblog.fr/mecanisme-de-la-resistance-des-bacteries-aux-antibiotiques-3264400.html> (consulté en mars 2016).

[18] **OMS**, « Standardisation de la Méthodologie des Tests de Sensibilité Bactérienne », Organisation Mondiale de la Santé, Genève, 1961.

[19] **CHU Jean Minjoz et Faculté de Médecine-Pharmacie de Besançon**, « *Staphylococcus aureus* multirésistant » [en ligne], *Bacterio-Web*, 2007 :
<http://bacterioweb.univ-fcomte.fr/fphoto.html> (consulté en mars 2016).

[20] SFM, « Recommandation 2011 du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie », *Société Française de Microbiologie*, 2011.

[21] SFM, « Recommandation 2016 du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie », *Société Française de Microbiologie*, 2016.

[22] UPMC, Cours du module génétique « Transposons » [en ligne], *Université Pierre & Marie Curie* :

http://www.edu.upmc.fr/sdv/masselot_05001/general/toc.html (consulté en mars 2016).

[23] ULG, « Antibiotiques contre bactéries » [en ligne], *Réflexion - Site de vulgarisation scientifique de l'Université de Liège*, 2007 :

http://reflexions.ulg.ac.be/cms/c_12956/antibiotiques-contre-bacteries?part=3 (consulté en mars 2016).

[24] Minet J., Cours du Master 1 Biologie-Agronomie-Santé « Sélection et dissémination des résistances bactériennes aux antibiotiques », *Université de Pharmacie de Rennes 1*, 2015.

[25] ISDA, « Combating Antimicrobial Resistance: Policy Recommendation to Save Lives », *CID*, 2011, **52**: 397-428.

[26] Le Floch R., Naux E. and Arnould G.F., « Bacterial Infection in Burn Patients », *Ann Burns Fire Disasters*, 2015, **28**: 94-104.

[27] Solecki O., Amor M., Baudy Floc'H M. and Felden B., « Converting a Staphylococcus aureus Toxin into Effective Cyclic Pseudopeptide Antibiotics », *Chem Biol*, 2015, **22**: 1-7.

[28] David M., Cours de 3^{ème} année de pharmacie « Antibiotiques à structure β -lactame (pénicillines et céphalosporines) », *Université de Pharmacie de Rennes 1*, 2013.

[29] Lowy F.D., « Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus* », *J Clin Invest*, 2003, **111**: 1265-1273.

[30] **Tong S.Y.C., Chen L.F. and Fowler V.G. Jr**, « Colonization, Pathogenicity, Host Susceptibility and Therapeutics for *Staphylococcus aureus*: What is the Clinical Relevance? » *Semin Immunopathol*, 2012, **34(2)**: 185-200.

[31] **Pantosti A., Sanchini A. and Monaco M.**, « Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* », *Future Microbiol*, 2007, **2**: 323-334.

[32] **Tomasi S.**, Cours de 3^{ème} année de pharmacie « Antibiotiques Polypeptidiques », *Université de Pharmacie de Rennes 1*, 2013.

[33] **RSC**, « Chemspider, the free chemical database » [en ligne], *Royal Society of Chemistry*, 2015:
<http://www.chemspider.com/Default.aspx> (consulté en mars 2016).

[34] **David M.**, Cours de 3^{ème} année de pharmacie « Quinolones », *Université de Pharmacie de Rennes 1*, 2013.

[35] **Donnio P.Y.**, Cours de de 3^{ème} année de pharmacie « Les infections nosocomiales et les infections associées aux soins », *Université de Pharmacie de Rennes 1*, 2013.

[36] **Association Prévention Routière**, « Statistiques d'accidents » [en ligne], 2016 :
<http://www.preventionroutiere.asso.fr/Nos-publications/Statistiques-d-accidents> (consulté en mars 2016).

[37] **Inserm**, « Infections nosocomiales » [en ligne], (2015) :
<http://www.inserm.fr/thematiques/immunologie-inflammation-infectiologie-et-microbiologie/dossiers-d-information/infections-nosocomiales> (consulté en mars 2016)

[38] **Bhat J.A. and Tenguria R.**, « Significance of MRSA in nosocomial Infections », *IJAS*, 2004, **1**: 027-036.

[39] **Arvidson S. and Tegmark K.**, « Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus* » *Int J Med Microbiol*, 2001, **291(12)**: 159-70.

[40] **Ryu S., Song P.I., Seo C.H., Cheong H. and Park Y.**, « Colonization and Infections of Skin by *S. aureus*: Immune System Evasion and the Response to Cationic Antimicrobial Peptides », *Int J Mol Sci*, 2004, **15**: 8753-8772.

[41] **Chavakis T., Wiechmann K., Pressner K.T. and Herrmann M.**, « *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: The role of bacterial “Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules” (SERAM) in disturbing host defense systems », *Thromb Haemost*, 2005, **94**: 278-85.

[42] **Bonar E., Wójcik I. and Wladyka B.G.**, « Proteomic in studies of *Staphylococcus aureus* virulence » *Acta Biochim Pol*, 2015, **62**: 367-81.

[43] **Krishna S. and Miller L.S.**, « Host-pathogen interactions between the skin and *Staphylococcus aureus* », *Curr Opin Microbiol*, 2012, **15**: 28-35.

[44] **Foster T.J. and Höök M.**, « Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus* », *Trends Microbiol*, 1998, **6**: 484-488.

[45] **Fowler T., Wann E.R., Joh D., Johansson S., Foster T.J. and Höök M.**, « Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell β 1 integrins », *Eur J Cell Biol*, 2000, **79**: 672-679.

[46] **Edwards A.M., Potter U., Meenan N.A.G., Potts J.R. and Massey R.C.**, « *Staphylococcus aureus* Keratinocyte Invasion Is Dependent upon Multiple High-Affinity Fibronectin-Binding Repeats with FnBPA », *PLoS ONE*, 2011, **6**(4): e18899.

[47] **McDevitt D., Francois P., Vaudaux P. and Foster T.J.**, « Molecular characterisation of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus* », *Mol Microbiol*, 1994, **11**: 237-248.

[48] **Lacey K.A., Geoghegan J.A., and McLoughlin R.M.**, « The Role of *Staphylococcus aureus* Virulence Factors in Skin Infection and Their Potential as Vaccine Antigens », *Pathogens*, 2016, **5**(1): 22.

[49] **Hartleib J, Köhler N., Dickinson R.B., Chhatwal G.S., Sixma J.J., Hartford O.M., Foster T.J., Peters G., Kehrel B.E. and Herrmann M.**, « Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus* », *Blood*, 2000, **96**: 2149-2156.

[50] **Le Loir Y. et Gautier M.**, « *Staphylococcus aureus* », collection : Monographies de microbiologie, Éditions Tec&Doc Lavoisier, 2016.

[51] **Zapatoczna M., Jevnikar Z., Miajlovic H., Kos J. and Foster T.J.**, « Iron-regulated surface determinant B (IsdB) promotes *Staphylococcus aureus* adherence to and internalization by non-phagocytic human cells », *Cell Microbiol*, 2013, **15**: 1026-1041.

[52] **Zapotoczna M., Heilbronner S., Speziale P. and Foster TJ.**, « Iron-Regulated Surface Determinant (Isd) Proteins of *Staphylococcus lugdunensis* », *J Bacteriol*, 2012; **194**(23): 6453-6467.

[53] **McAdow M., Missiakas D.M. and Schneewind O.**, « *Staphylococcus aureus* Secretes Coagulase and von Willebrand Factor Binding Protein to Modify the Coagulation Cascade and Establish Host Infections », *J Innate Immun*, 2012, **4**(2): 141-148.

[54] **Ko Y.-P., Kang M., Ganesh V.K., Ravirajan D., Li B. and Höök M.**, « Coagulase and Efb of *Staphylococcus aureus* have a common fibrinogen binding motif », *mBio*, 7(1): e01885-15.

[55] **Garcia B.L., Ramyar K.X., Ricklin D., Lambris J.D. and Geisbrecht B.V.**, « Advances in Understanding the Structure, Function, and Mechanism of the SCIN and Efb Families of Staphylococcal Immune Evasion Proteins », *Adv Exp Med Biol*, 2012, **946**: 113-133.

[56] **Thompson K.M., Abraham N. and Jefferson K.K.**, « *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein contributes to biofilm formation in the presence of serum », *FEMS Microbiol Lett*, 2010, **305**(2): 143-147.

[57] **Bonventre P.F., Lincoln R.E. and Lamanna C.**, « Status of bacterial toxins and their nomenclature: need for discipline and clarity of expression », *Bacteriol Rev*, 1967, **31**(2): 95-109.

[58] **Bhakdi S. and Trantum-Jensen J.**, « Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus* », *Microbiol Rev*, 1991, **55**(4): 733-751.

[59] **Dinges M.M., Orwin P.M. and Schlievert P.M.**, « Exotoxins of *Staphylococcus aureus* », *Clin Microbiol Rev*, 2000, **13**(1): 16-34.

[60] **Burnside K., Lembo A., de los Reyes M., Iluik A., BinhTran N.-T., Connelly J.E., Lin W.-J., Schmidt B.Z., Richardson A.R., Fang F.C., Tao W.A. and Rajagopal L.**, « Regulation of Hemolysin Expression and Virulence of *Staphylococcus aureus* by a Serine/Threonine Kinase and Phosphatase », *PLoS ONE*, 2010, **5**(6): e11071.

[61] **Vandenesch F., Lina G. and Henry T.**, « *Staphylococcus aureus* Hemolysins, bi-component Leukocidins, and Cytolytic Peptides: A Redundant Arsenal of Membrane-Damaging Virulence Factors? », *Front Cell Infect Microbiol*, 2012, **2**:12.

[62] **Van der Velde H.**, « Étude sur le mécanisme de virulence du staphylocoque pyogène », *La Cellule*, 1984, **10**: 401-460.

[63] **Panton P.N. and Valentine F.C.O.**, « Staphylococcal toxin », *Lancet*, 1932, **1**: 506–8.

[64] **Boyle-Vavra S. and Daum R.S.**, « Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Pantone-Valentine leukocidin », *Lab Invest*, 2007, **87**: 3-9.

[65] **Argudín M.Á., Mendoza M.C. and Rodicio M.R.**, « Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins », *Toxins*, 2010, **2**(7): 1751-1773.

[66] **Andrey D.O., Jouselin A., Villanueva M., Renzoni A., Monod A., Barras C., Rodriguez N. and Kelley W.L.**, « Impact of the Regulators *SigB*, *Rot*, *SarA* and *sarS* on the Toxic Shock *Tst* Promoter and TSST-1 Expression in *Staphylococcus aureus* », *PLoS ONE*, 2015, **10**(8): e0135579.

[67] **Lappin E. and Ferguson A.J.**, « Gram-positive toxic shock syndromes », *Lancet Infect Dis*, 2009, **9**(5): 281-90.

[68] **Peschel A. and Otto M.**, « Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection », *Nat Rev Microbiol*, 2013, **11**(10): 667-673.

[69] **Otto M.**, « Phenol-soluble modulins », *International journal of medical microbiology : IJMM*, 2014, **304**(2): 164-169.

[70] **Bokarewa M.I., Jin T. and Tarkowski A.**, « *Staphylococcus aureus*: staphylokinase », *Int. J. Biochem. Cell Biol*, 2006, **38**(4): 504-509.

[71] **Mortensen J.E., Shryock T.R. and Kapral F.A.**, « Modification of bactericidal fatty acids by an enzyme of *Staphylococcus aureus* », *J Med Microbiol*, 1992, **36**: 293-298.

[72] **Costa A.R., Batistão D.W.F., Ribas R.M., Sousa A.M., Pereira M.O. and Botelho C.M.**, « *Staphylococcus aureus* virulence factors and disease », *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education*, 2013, 1: 702-710.

[73] **Hamza T. and Li B.**, « Differential responses of osteoblasts and macrophages upon *Staphylococcus aureus* infection », *BMC Microbiol*, 2014, **14**: 207.

[74] **Alva-Murillo N., López-Meza J.E. and Ochoa-Zarzosa A.**, « Nonprofessional Phagocytic Cell Receptors Involved in *Staphylococcus aureus* Internalization », *BioMed Res Int*, 2014, **2014**: 538546.

[75] **Haggar A., Hussain M., Lönnies H., Herrmann M., Norrby-Teglund A. and Flock J.I.** « Extracellular Adherence Protein from *Staphylococcus aureus* Enhances Internalization into Eukaryotic Cells », *Infect Immun*, 2003, **71**(5): 2310–2317.

[76] **Dziewanowska K., Carson A.R., Patti J.M., Deobald C.F., Bayles K.W. and Bohach G.A.**, « Staphylococcal Fibronectin Binding Protein Interacts with Heat Shock Protein 60 and Integrins: Role in Internalization by Epithelial Cells », *Infect Immun*, 2000, **68**(11): 6321-6328.

[77] **Grundmeier M., Hussain M., Becker P., Heilmann C., Peters G. and Sinha B.**, « Truncation of Fibronectin-Binding Proteins in *Staphylococcus aureus* Strain Newman Leads to Deficient Adherence and Host Cell Invasion Due to Loss of the Cell Wall Anchor Function », *Infect Immun*, 2004, **72**(12): 7155-7163.

[78] **Hirschhausen N., Schlesier T., Schmidt M.A., Gotz F., Peters G. and Heilmann C.**, « A novel staphylococcal internalization mechanism involves the major autolysin Atl and heat shock cognate protein Hsc70 as host cell receptor », *Cell Microbiol*, 2010, **12**: 1746-1764.

[79] **Komatsuzama H., Sugai M., Nakashima S., Yamada S., Matsumoto A., Oshida T. and Suginaka H.**, « Subcellular Localisation of the Major Autolysin, ATL and Its Processed Proteins in *Staphylococcus aureus* », *Microbiol Immunol*, 1997, **41**(6): 469-479.

[80] **Biswas R., Voggu L., Simon U.K., Hentschel P., Thumm G. and Götz F.**, « Activity of the major staphylococcal autolysin Atl », *FEMS Microbiol Lett*, 2006, **259**(2): 260-8.

[81] **Houston P., Rowe S.E., Pozzi C., Waters E.M. and O’Gara J.P.**, « Essential Role for the Major Autolysin in the Fibronectin-Binding Protein-Mediated *Staphylococcus aureus* Biofilm Phenotype », *Infect Immun*, 2011, **79**(3): 1153-1165.

[82] **Bose J.L., Lehman M.K., Fey P.D. and Bayles K.W.**, « Contribution of the *Staphylococcus aureus* Atl AM and GL Murein Hydrolase Activities in Cell Division, Autolysis, and Biofilm Formation », *PLoS ONE*, 2012, **7**(7): e42244.

[83] **Navarre W.W. and Scheewind O.**, « Surface Proteins of Gram-Positive Bacteria and Mechanisms of Their Targeting to the Cell Wall Envelope », *Microbiol MolBiol REV*, 1999, **63**(1): 174-229.

[84] **Rocha-de-Souza C.M., Berent-Maoz B., Mankuta D., Moses A.E. and Levi-Schaffer F.**, « Human Mast Cell Activation by *Staphylococcus aureus*: Interleukin-8 and Tumor Necrosis Factor Alpha Release and the Role of Toll-Like Receptor 2 and CD48 Molecules », *Infect Immun*, 2008, **76**(10): 4489-4497.

[85] **Stuart L.M., Deng J., Silver J.M., Takahashi K., Tseng A.A., Hennessy E.J., Ezekowitz R.A.B. and Moore K.J.**, « Response to *Staphylococcus aureus* requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain », *J Cell Biol*, 2005, **170**(3): 477-485.

[86] **Flannagan R.S., Heit B. and Heinrichs D.E.**, « Antimicrobial Mechanisms of Macrophages and the Immune Evasion Strategies of *Staphylococcus aureus* », *Pathogens*, 2015, **4**: 826-868.

[87] **Flannagan R.S., Heit B. and Heinrichs D.E.**, « Intracellular replication of *Staphylococcus aureus* in mature phagolysosomes in macrophages precedes host cell death, and bacterial escape and dissemination », *Cell Microbiol*, 2015, **18**(4): 514-35.

[88] **Keyword-suggestions.com**, « Macrophages under microscope » [en ligne]: http://images.google.fr/imgres?imgurl=http%3A%2F%2Fcourses.lumenlearning.net%2Fbiology%2Fwp-content%2Fuploads%2Fsites%2F5%2F2014%2F02%2FFigure_17_02_04.jpg&imgrefurl=http%3A%2F%2Fwww.keyword-suggestions.com%2FbmV1dHJvcGhpbHMgdW5kZXIgbWljcm9zY29wZQ%2F&h=234&w=987&tbnid=i_borCW3IfNmHM%3A&docid=MoZug064LO0_UM&ei=oxOiv8mUFMPXa6WMTlgL&tbn=isch&iact=rc&uact=3&dur=262&page=2&start=18&ndsp=24&ved=0ahUKEwiJ8pvBzaXOAhXD6xoKHSUGDbEQMwhwKCgwKA&bih=599&biw=1366 (consulté en août 2016).

[89] **Leliefeld P.H.C., Wessels C.M., Leenen L.P.H., Koenderman L. and Pillay J.**, « The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation », *Crit Care*, 2016, **20**: 73.

[90] **Anwar S., Prince L.R., Foster S.J., Whyte M.K.B. and Sabroe I.**, « The rise and rise of *Staphylococcus aureus*: laughing in the face of granulocytes », *Clin Exp Immunol*, 2009, **157**(2): 216-224.

[91] **de Buhr N. and von Köckritz-Blickwede M.**, « How Neutrophil Extracellular Traps Become Visible », *J Immunol Res*, 2016, **2016**: 4604713.

[92] **Geissmann F., Jung S. and Littman D.R.**, « Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties », *Immunity*, 2003, **19**: 71-82.

[93] **Pollard J.W.**, « Trophic macrophages in development and disease », *Nat Rev Immunol*, 2009, **9**(4): 259-270.

[94] **Faili A.**, Cours de 2^{ème} année de pharmacie « Immunologie générale », *Université de Pharmacie de Rennes 1*, 2011.

[95] **Takeda K. and Akira S.**, « Toll-like receptors in innate immunity », *Int Immunol*, 2005, **17**(1): 1-14.

[96] **Canton J.**, « Phagosome maturation in polarized macrophages », *J Leukoc Biol*, 2014, **96**(5): 729-738.

[97] **Immuno**, « macrophage-phagocytose » [en ligne] :
<http://imagesbiogeolfxm.free.fr/immuno/original/macrophage-phagocytose.html> (consulté en août 2016).

[98] **Celli J. and Finlay B.B.**, « Bacterial avoidance of phagocytosis », *Trends Microbiol*, 2002, **10**(5): 232-237.

[99] **Flannagan R.S., Harrison R.E., Yip C.M., Jaqaman K. and Grinstein S.**, « Dynamic macrophage “probing” is required for the efficient capture of phagocytic targets », *J Cell Biol*, 2010, **191**(6): 1205-1218.

[100] **Linehan E, Fitzgerald DC.**, « Ageing and the immune system: focus on macrophages », *Eup J Microbiol Immunol*, 2015, **5**(1): 14-24.

[101] **Kubica M., Guzik K., Koziel J., Zarebski M., Richter W., Gajkowska B., Golda A., Maciag-Gudowska A., Brix K., Shaw L., Foster T. and Potempa J.**, « A Potential New Pathway for *Staphylococcus aureus* Dissemination: The Silent Survival of *S. aureus* Phagocytosed by Human Monocyte-Derived Macrophages », *PLoS One*, 2008, **3**(1): e1409.

[102] **Koziel J., Maciag-Gudowska A., Mikolajczyk T., Bzowska M., Sturdevant D.E., Whitney A.R., Shaw L.N. and DeLeo F.R.**, « Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by Macrophages Exerts Cytoprotective Effects Manifested by the Upregulation of Antiapoptotic Factors », *PLoS One*, 2009, **4**(4): e5210.

[103] **Garzoni C., Francois P., Huyghe A., Couzinet S., Tapparel C., Charbonnier Y., Renzoni A., Lucchini S., Lew D.P., Vaudaux P., Kelley W.L. and Schrenzel J.**, « A global view of *Staphylococcus aureus* whole genome expression upon internalization in human epithelial cells », *BMC Genomics*, 2007, **8**: 171.

[104] **Garzoni C. and Kelley W.L.**, (2009). « *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence », *Trends Microbiol*, **17**(2): 59-65.

[105] **Bayston R., Ashraf W and Smith T.** « Triclosan resistance on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* expressed as small colony variant : a novel mode of evasion of susceptibility to antiseptics », *J Antimicrobiol Chemother*, 2007, **59**(5): 848-53.

[106] **Boulanger D., Bureau F. et Lekeux P.**, « Invasion intracellulaire des cellules non phagocytaires par *Staphylococcus aureus* », *Ann Méd Vét*, 2005, **150** : 27-42.

[107] **Fraunholz M. and Sinha B.**, « Intracellular staphylococcus aureus: Live-in and let die », *Front Cell Infect Microbiol*, 2012, **2**: 43.

[108] **Gordon R.J. and Lowy F.D.**, « Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection », *Clin Infect Dis*, 2008, **46**(5): 350-359.

[109] **Hawver L.A., Jung S.A. and Ng W.-L.**, « Specificity and complexity in bacterial quorum-sensing systems », *FEMS Microbiol Rev*, 2016, DOI: <http://femsre.oxfordjournals.org/content/early/2016/06/26/femsre.fuw014>

[110] **Lixa C., Mujo M., Anobom C.D. and Pinheiro A.S.**, « A structural perspective on the mechanisms of *quorum sensing* activation in bacteria », *An Acad Bras Cienc*, 2015, **87**(2): 2189-2203.

[111] **Jayaraman A. and Wood T.K.**, « Bacterial Quorum Sensing : Signals, Circuits, and Implications for Biofilms and Disease », *Annu Rev Biomed Eng*, 2008, **10**: 145-67.

[112] **Le K.Y. and Otto M.**, « Quorum-sensing regulation in staphylococci—an overview », *Front Microbiol*, 2015, **6**: 1174.

[113] **Huntzinger E.**, « ARN régulateurs procaryotiques et virulence », *Universite Louis Pasteur – Strasbourg*, 2005.

[114] **Novick R.P.**, « Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence », *Mol Microbiol*, 2003, **48**(6): 1429-1449.

[115] **Yarwood J.M. and Schlievert P.M.**, « Quorum sensing in *Staphylococcus* infections », *J Clin Invest*, 2003, **112**: 1620-1625.

[116] **Pichon C. and Felden B.**, « Small RNA genes expressed from *Staphylococcus aureus* genomic and pathogenicity islands with specific expression among pathogenic strains », *PNAS*, 2005, **102**(40): 14249-14254.

[117] **Abu-Qatousch L.F., Chinni S.V., Seggewiss J., Proctor R.A., Brosius J., Rozhdestvensky T.S., Peter G., von Eiff C. and Becker K.**, « Identification of differentially expressed small non-protein-coding RNAs in *Staphylococcus aureus* displaying both the normal and the small-colony variant phenotype », *J Mol Med*, 2010, **88**: 565-575.

[118] **Beaume M., Hernandez D., Farinelli L., Deluen C., Linder P., Gaspin C., Romby P., Schrenzel J. and François P.**, « Cartography of methicillin-resistant *S. aureus* transcripts: detection, orientation and temporal expression during growth phase and stress conditions », *PLoS One*, 2010, **5**: e10725.

[119] **Bohn C., Rigoulay C., Chabelskaya S., Sharma C.M., Marchais A., Skorski P., Borezée-Durant E., Barbet R., Jacquet E., Jacq A., Gauthered D., Felden B., Vogel J. and Bouloc P.**, « Experimental discovery of small RNAs in *Staphylococcus aureus* reveals a riboregulatory of central metabolism », *NAR*, 2010, **38**: 6620-6636.

[120] **Storz G., Vogel J. and Wassarman K.M.**, « Regulation by Small RNAs in bacteria: Expanding Frontiers », *Mol Cell*, 2011, **43**(6): 880-891.

[121] **Georg J. and Hess W.R.**, « *Cis*-antisense RNA, Another level of gene regulation in bacteria », *Microbiol Mol Biol Rev*, 2011, **75**: 286-300.

[122] **Reignier J.**, « Étude de petits ARN régulateurs chez *Helicobacter pylori* », *Université Bordeaux II – Victor Segalen*, 2010.

[123] **Waters L.S and Storz G.**, « Regulatory RNAs in Bacteria », *Cell*, 2009, **136**(4): 615-628.

[124] **Thomason M.K. and Storz G.**, « Bacterial antisense RNAs : How many are there and what are they doing? », *Annu Rev Genet*, 2010, **44**: 167-188.

[125] **Guillet J., Hallier M. and Felden B.**, « Emerging Function for *Staphylococcus aureus* RNome », *PLoS Pathog*, 2013, **9**(12): e1003767.

[126] **Shabalina S.A., Koonin E.V.**, « Origins and evolution of eukaryotic RNA interference », *Trends Ecol Evol*, 2008, **23**(10): 578-587.

[127] **Krol J., Loedige I. and Filipowicz W.**, « The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay », *Nat Rev Genet*, 2010, **11**(9): 597-610.

[128] **Raghavan R., Sloan D.B., and Ochman H.**, « Antisense Transcription Is Pervasive but Rarely Conserved in Enteric Bacteria », *mBio*, 2012, **3**(4): e00156-12.

[129] **Bouloc P. and Felden B.**, « Ribonucleic acids regulators of *Staphylococcus aureus* and their roles in virulence », *Med Sci*, 2011, **27**(3): 238-241.

[130] **Romilly C.**, « Fonction de nouveaux ARN non codant dans la régulation de l'expression des gènes de *Staphylococcus aureus* : Adaptation à l'environnement et virulence », *Université de Strasbourg*, 2012.

[131] **Barrick J.E., Sudarsan N., Weinberg Z., Ruzzo W.L. and Breaker R.R.**, « 6S RNA is a widespread regulator of eubacterial RNA polymerase that resembles an open promoter », *RNA*, 2005, **11**(5): 774-784.

[132] **Wassarman K.M. and Saecker R.M.**, « Synthesis-Mediated Release of a Small RNA Inhibitor of RNA Polymerase », *Science*, 2006, **314**(5805): 1601-3.

[133] **Tucker B.J. and Breaker R.R.**, « Riboswitches as a versatile gene control elements », *Curr Opin Struct Biol*, 2005, **15**(3): 342-8.

[134] **Breaker R.R.**, « Riboswitches and the RNA World », *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011, **4**(2): a003566.

[135] **Vitreschak A.G., Rodionov D.A., Mironov A.A. and Gelfand M.S.**, « Riboswitches: the oldest mechanism for the regulation of gene expression? », *Trends Genet*, 2004, **20**(1): 44-50.

[136] **Sudarsan N., Barrick J.E. and Breaker R.R.**, « Metabolite-binding RNA domains are present in the genes of eukaryotes », *RNA*, 2003, **9**(6): 644-647.

[137] **Barrick J.E. and Breaker R.R.**, « The distributions, mechanisms, and structures of metabolite-binding riboswitches », *Genome Biol*, 2007, **8**(11): 239.

[138] **Beisel C.L. and Storz G.**, « Base pairing small RNAs and their roles in global regulatory networks », *FEMS Microbiol Rev*, 2010, **34**(5): 866-882.

[139] **Shimoni Y., Friedlander G., Hetzroni G., Niv G., Altuvia S., Biham O. and Margalit H.**, « Regulation of gene expression by small non-coding RNAs: a quantitative view », *Mol Syst Biol*, 2007, **3**:138.

[140] **Faucher S.P. and Shuman H.A.** (2011). « Small regulatory RNA and *Legionella pneumophila* » *Front Microbiol* **2**: 98.

[141] **Eyraud A., Tattevin P., Chabelskaya S. and Felden B.**, « A small RNA controls a protein regulator involved in antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* » *NAR*, 2014, **42**(8): 4892-4905.

[142] **Chabelskaya S., Bordeau V. and Felden B.**, « Dual RNA regulatory control of a *Staphylococcus aureus* virulence factor », *NAR*, 2014, **42**(8): 4847-58.

[143] **Sassi M, Augagneur Y, Mauro T., Ivain L., Chabelskaya S., Hallier M., Sallou O. and Felden B.**, « SRD : a *Staphylococcus* regulatory RNA database », *RNA*, 2015, **21**: 1005-1017.

[144] **Le Pabic H., Germain-Amiot N., Bordeau V. and Felden B.**, « A bacterial regulatory RNA attenuates virulence, spread and human host cell phagocytosis », *NAR*, 2015, **43**(19): 9232-48.

[145] **Duthie E.S. and Lorenz L.L.**, « Staphylococcal coagulase: mode of action and antigenicity », *J. Gen. Microbiol.*, 1952, **6**(1-2): 95-107.

[146] **Nair D., Memmi G., Hernandez D., Bard J., Beaume M., Gill S., Francois P. and Cheung A.L.**, « Whole-Genome Sequencing of *Staphylococcus aureus* Strain RN4220, a Key Laboratory Strain Used in Virulence Research, Identifies Mutations That Affect Not Only Virulence Factors but Also the Fitness of the Strain », *J Bacteriol*, 2011, **193**(9):2332-2335.

[147] **Corrigan R.M. and Foster T.J.**, « An improved tetracyclin-inducible expression vector for *Staphylococcus aureus* », *Plasmid*, 2009, **61**(2): 126-9.

[148] **Said N., Rieder R., Hurwitz R., Deckert J., Urlaub H. and Vogel J.**, « *In vivo* expression and purification of aptamer-tagged small RNA regulators », *NAR*, 2009, **37**: e133.

[149] **Boisset S., Geissman T., Huntzinger E., Fechter P., Bendridi N., Poossedko M., Chevalier C., Helfer A.C., Benito Y., Jacquier A., Gaspin C., Vandenesch F. and Romby P.**, « *Staphylococcus aureus* RNAIII coordinately repress the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism », *Genes Dev*, 2007, **21**(11): 1353-66.

[150] **Anders S. and Huber W.**, « Differential expression analysis for sequence count data », *Genome Biology*, 2010, **11**: R106.

[151] **Chen A.G, McAdow M., Kim H.K., Bae T., Missiakas D.M. and Schneewind O.**, « Contribution of Coagulase towards *Staphylococcus aureus* Disease and Protective Immunity », *PLoS Pathog*, 2010, **6**(8): e1001036.

RAYNAUD, Simon,- Titre de la thèse : Étude fonctionnelle d'un ARN régulateur exprimé par le staphylocoque doré, impliqué dans la virulence et la phagocytose des bactéries par les macrophages humains.

f.117, ill.35, tabl.8, 30 cm.- Thèse : Microbiologie ; Rennes 1; 2016 ; N° .

Résumé français

Staphylococcus aureus est une bactérie commensale de la peau capable de rapidement développer ou acquérir de multiples résistances aux antibiotiques. Elle est responsable de 16% des infections nosocomiales ce qui en fait un problème majeur de santé publique dans le monde. Sa virulence est multifactorielle et fait intervenir des protéines et des ARN régulateurs. L'un d'entre eux, l'ARN SprC, diminue la virulence et l'internalisation de *S. aureus* par les monocytes et les macrophages humains (Le Pabic et al., 2015). Le Pabic et al. ont montré que SprC interférait avec la phagocytose de *S. aureus* en partie par son contrôle de l'expression de l'Autolysine (Atl), une protéine impliquée dans l'internalisation de *S. aureus*. En effet, SprC régule négativement la production de l'Atl en bloquant la traduction de son ARNm par inhibition directe. Cependant, cette interaction entre SprC et l'ARNm de l'atl est faible ($K_d = 35\mu\text{M}$) suggérant l'intervention de partenaires supplémentaires dans cette interaction. Afin d'identifier de nouveaux partenaires protéiques et ARN de SprC, une technique de chromatographie d'affinité a été mise au point. Elle met en jeu l'ARN SprC fusionné à un tag MS2 lui permettant de se fixer à une résine d'amylose par l'intermédiaire de protéines MPB-MS2. La méthode a été validée par qPCR en utilisant un contrôle interne, l'ARNm rot connu pour se fixer à l'ARNIII. Enfin, après l'isolement des ARN se fixant à SprC, ces derniers ont été séquencés par RNAseq et les reads ont été alignés sur un génome de référence. L'analyse des niveaux d'expression du RNAseq a permis d'identifier 4 ARN candidats se fixant à SprC. L'analyse protéomique des partenaires de SprC a également permis l'identification la protéine ribosomale S2 se fixant fortement à SprC, et dont la validation de l'interaction est en cours. Le rôle de ces partenaires dans la virulence de *S. aureus* sera étudié dans le but de développer de nouvelles thérapies anti-staphylococciques.

Résumé anglais

Staphylococcus aureus is a commensal bacterium of the skin able to quickly develop or acquire multiple resistances to antibiotics. It is responsible for 16% of nosocomial infections that make it a major public health issue worldwide. Its virulence is multifactorial and involves proteins and regulatory RNAs. One of them, the SprC RNA, decreases virulence and *S. aureus* internalisation by human monocytes and macrophages (Le Pabic et al., 2015). Le Pabic and al., showed that SprC interferes with *S. aureus* phagocytosis in part by monitoring expression of the Autolysin (Atl), a protein involved in *S. aureus* internalisation. The author demonstrated that SprC negatively regulates Atl production by blocking translation of its mRNA through direct inhibition. However, interaction between SprC and the atl mRNA is weak ($K_d = 35\mu\text{m}$), which suggested the involvement of additional partners. In order to identify new proteins and RNA partners of SprC, an affinity chromatography technique has been developed. It involves the SprC RNA combined to a MS2 tag allowing it to bind to an amylose resin through a MBP-MS2 protein. The method has been validated by qPCR using an internal control, rot mRNA that is known to bind RNAIII. Then, following the isolation of RNA bound to SprC, the latter were sequenced by RNAseq and reads aligned on to a reference genome. Analysis of RNAseq expression level led to the identification of 4 RNA candidates bound to SprC. Proteomic analyses of SprC partners also allowed the identification of ribosomal protein S2 which strongly which strongly bind to SprC, and whose interaction validation is in progress. The functions of these partners in *S. aureus* virulence will be subsequently study in order to develop new anti-staphylococcal therapies.

Rubrique de classement : Microbiologie

Mots-clés : *S. aureus*, SprC, partenaires protéiques et ARN, chromatographie d'affinité, virulence.

Mots-clés anglais MeSH : *S. aureus*, SprC, proteic and RNA partners, affinity chromatography, virulence.

Président : Monsieur DONNIO Pierre Yves

JURY : Assesseurs :
Mme Hélène LE PABIC
M. Le Professeur Pierre-Yves DONNIO
Mme Le Professeur Odile SERGENT
M. Le Docteur Paul-Henri PERCHAI