

**UNIVERSITE LOUIS PASTEUR
STRASBOURG I**

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

THESE

Présentée
Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR
Discipline : Sciences du vivant
Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

par

Eric HUNTZINGER

ARN REGULATEURS PROCARYOTIQUES ET VIRULENCE

Soutenue le 17 novembre 2005 devant la Commission d'examen

Docteur Ciaran Condon

Rapporteur externe

Professeur Pascale Cossart

Rapporteur externe

Professeur Bernard Ehresmann

Examineur

Professeur Jean-Marc Reichhart

Rapporteur interne

Docteur Pascale Romby

Directeur de thèse

UPR 9002 du CNRS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'UPR 9002 du CNRS, appelée tout d'abord « Structure des Macromolécules Biologiques et Mécanismes de Reconnaissance » du CNRS et dirigée par le Professeur Bernard Ehresmann, puis appelée « Architecture et Réactivité de l'ARN » et dirigée par le Professeur Eric Westhof, à l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire de Strasbourg. Ce travail a bénéficié du soutien du Ministère de la Recherche et des Technologies, de l'Université Louis Pasteur, de la Ligue contre le Cancer, d'une ACI « Microbiologie et Pathologies Infectieuses » et du programme européen FOSRAK.

Je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements au Professeur Bernard Ehresmann et au Docteur Chantal Ehresmann pour m'avoir accueilli dans leur équipe. Merci pour votre grand savoir scientifique, votre disponibilité et pour l'ambiance chaleureuse qui règne dans l'équipe.

Je voudrai adresser mes plus profonds remerciements au Docteur Pascale Romby, ma directrice de thèse. Merci pour tout ce que tu m'as apporté durant toutes ces années, ton enthousiasme, tes idées, tout ton savoir... Merci également pour toute la confiance que tu m'as accordé... Je dois dire que travailler à tes côtés a été un véritable plaisir. J'espère que maintenant tu vas pouvoir déstresser un peu...

J'adresse mes sincères remerciements au Professeur Pascale Cossart, au Professeur Jean-Marc Reichhart et au Docteur Ciaran Condon pour l'honneur qu'ils m'ont fait de juger ce travail.

Ce travail résulte d'une étroite collaboration avec l'équipe du Professeur François Vandenesch à Lyon. Merci pour toutes les discussions enrichissantes que nous avons eues. Merci plus particulièrement à Sandrine Boisset et Yvonne Benito pour toutes les constructions, inactivations qu'elles ont réalisé. Merci également à l'équipe du Docteur Alain Jacquier, de Paris, et à Christine Gaspin, de Toulouse.

La cristallisation du complexe CopA-CopT a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Docteur Philippe Dumas. Je le remercie pour son aide et pour les discussions que l'on a eu, ainsi que Eric Ennifar et Guillaume Bec, et bonne chance à Dominique Burnouf pour la suite...

Pendant ma thèse, j'ai eu l'opportunité d'enseigner à l'Université Louis Pasteur. Je tiens à remercier toutes les personnes que j'ai côtoyées au cours des enseignements. Notamment Joern Pütz pour les TP/TD de biochimie de deuxième année de DEUG et Vassili Sarantoglou, Guy Houlné et François Paulus pour les TP de maîtrise de Biochimie.

Merci à tous les membres de l'UPR 9002, passés ou présents, et plus particulièrement à ceux de l'équipe Ehresmann pour m'avoir permis de réaliser ce travail ou pour avoir maintenu une ambiance formidable. Merci à JC (le GO du labo...) et Guigui pour m'avoir fait garder la ligne au cours de séances de squash, de badminton et de natation, et pour tous les bons moments de rigolade passés ensemble... Merci à Céline S, Valérie G et Mélanie pour tous les bons moments passés ensemble... Merci à Fabrice Kolb, mon « petit-chef » du DEA, et bonne chance pour la suite... Merci à Flore et Delphine pour tous nos bavardages... Merci à Tom (the beer-killer), Pierre, Anne-Catherine et Maria, membres de la Dream Team de Pascale, et bonne chance pour la suite... Merci et bonne chance aussi à Hervé, Marie-Sex et Xia dans leur nouveau monde... Merci à Cerena et Galle pour la préparation du thé de 5 heure... Merci à Bénédicte et Caroline pour leur soutien pendant l'année de DEA... Merci à Stefano et Angelita pour leur bonne humeur... Merci à tous ceux du badminton, du squash et à tous les « gamers » du labo : Bobopopo, Born to purify, Tomcat, Bactrim et tous les autres, et à bientôt sur le net...

Merci à tous les autres membres du labo, Roland, Philippe W, Christine B, Christine L, Catherine I, Valérie BV, Joseph, Monique, Vincent, Simon, Joël, Mathieu, Inès, Yazan, tous les Mickaël, Magali... Et désolé si j'en oublie... Tous je vous remercie pour l'ambiance qui a régné au labo, votre disponibilité et pour tous ces pots inoubliables...

Merci également à ceux présents en dehors du labo. En particulier à Philippe avec qui j'ai partagé toutes ces années d'étude à la fac... Merci à Sang Hoon et Saung Yoon pour toutes ces bonnes soirées... Merci à ma mère qui m'a toujours supporté et encouragé pendant ces longues années... Merci à Rémy et sa famille qui m'ont aussi toujours soutenu...

Merci à Heekyung pour sa présence à mes côtés et sa patience... Merci également à sa famille qui m'a accueilli si chaleureusement...

Sommaire

Sommaire	1
Abréviations	5
Introduction	7
<i>I. Introduction générale: le monde de l'ARN</i>	9
<i>II. Les ARN régulateurs procaryotiques</i>	14
A. Les ARN de type antisens	16
A.1. ARN antisens strictement complémentaires à leur cible : systèmes plasmidiques	16
<i>A.1.1. Contrôle de la répllication du plasmide R1</i>	17
<i>A.1.2. Contrôle de la répllication du plasmide ColE1</i>	19
A.2. Les ARN antisens codés par le chromosome bactérien	21
<i>A.2.1. Contrôle de la traduction du gène rpoS par plusieurs ARN régulateurs</i>	22
<i>A.2.2. La protéine Hfq, co-facteur des ARN régulateurs</i>	24
<i>A.2.3. SgrS, un ARN régulateur localisé à la membrane plasmique</i>	27
<i>A.2.4. IstR, un ARN régulateur impliqué dans la réponse SOS</i>	29
<i>A.2.4. GadY, un ARN régulateur chromosomique strictement complémentaire à sa cible</i>	30
B. ARNnc piégant une protéine	33
C. « Riboswitch » et ARNm senseur	35
<i>III. ARN régulateurs et virulence</i>	39
<i>IV. Régulation de l'expression des gènes de virulence chez S. aureus</i>	77
A. La virulence des Staphylocoques	77
B. Les systèmes de régulation	81
B.1. Les systèmes à deux composants	82
<i>B.1.1. Le système agr « accessory gene regulator »</i>	82

<i>B.1.2. Les autres systèmes à deux composants</i>	85
B.2. Les facteurs de transcription	85
<i>B.2.1. L'opéron sar « Staphylococcal Accessory gene Regulator »</i>	85
<i>B.2.2 Les facteurs homologues à sar</i>	86
<i>B.2.3. Les autres facteurs de régulation</i>	87
C. Les facteurs de virulence	88
C.1. Les facteurs d'adhésion	88
<i>C.1.1. Les protéines fixant la fibronectine ou le fibrinogène</i>	88
<i>C.1.2. La protéine A</i>	91
C.2. Les toxines produites par <i>S. aureus</i>	93
C.3. Les exoprotéines de type protéases	94
Objectifs de la thèse	95
<i>I. L'ARNIII de <i>S. aureus</i> et ses multiples fonctions</i>	95
<i>II. Un ARN antisens dans la régulation de la réplication plasmidique</i>	98
Résultats et discussion	101
<i>I. Rôle de l'ARNIII dans la virulence de <i>S. aureus</i></i>	103
A. Régulation post-transcriptionnelle de l'expression de la protéine A par l'ARNIII (Article 1)	103
A.1. Objectifs	103
A.2. Stratégie expérimentale	103
A.3. Résultats	104
A.4. Conclusion	106
B. Identification de nouvelles cibles pour le domaine 3'	130
B.1. Régulation de l'expression de la protéine SA1000	130

<i>B.1.1. Expression du gène sa1000 chez S. aureus et détermination du site de démarrage de la transcription</i>	130
<i>B.1.2. Caractérisation in vitro de l'interaction entre l'ARNIII et l'ARNm sa1000</i>	132
<i>B.1.3. Le complexe formé entre les deux ARN recouvre le site d'initiation de la traduction de l'ARNm sa1000</i>	133
<i>B.1.4. La formation du complexe ARNIII-ARNm sa1000 bloque la formation du complexe d'initiation de la traduction</i>	135
<i>B.1.5. L'ARNIII régule l'expression de SA1000 au niveau post-transcriptionnel</i>	136
<i>B.1.6. Hydrolyse in vitro du complexe ARNIII-ARNm sa1000</i>	137
B.2. Conclusion	139
C. Le domaine 3', un domaine multifonctionnel	140
C.1. Recherche de nouvelles cibles du domaine 3' par étude du protéome	140
C.2. Recherche de nouvelles cibles du domaine 3' par bioinformatique	141
C.3. Discussion	143
D. La protéine Hfq, co-facteur de l'ARNIII	146
D.1. Caractérisation de l'interaction entre l'ARNIII et Hfq	146
<i>D.1.1. Etude de la fixation de Hfq à l'ARNIII</i>	146
<i>D.1.2. Empreinte de la protéine sur l'ARNIII</i>	147
D.2. Rôle de Hfq sur les interactions entre l'ARNIII et ses cibles directes	148
D.3. Rôle de Hfq dans la virulence	151
E. Discussion et perspectives	153
E.1. Vers l'identification de réseaux de régulation dépendants de l'ARNIII	153
<i>E.1.1. Le domaine 3' et ses ARNm cibles</i>	153
<i>E.1.2. Autres domaines régulateurs de l'ARNIII</i>	155
<i>E.1.3. L'ARNIII et le contrôle transcriptionnel</i>	156
E.2. Régulation par des ARN antisens et lien entre traduction et dégradation des ARNm	158
E.3. L'ARNIII et la virulence de <i>S. aureus</i>	161
II. ARN antisens-ARNm et régulation de la réplication du plasmide R1	163
A. Le contrôle de la réplication du plasmide R1:état des lieux	163
A.1. Contrôle transcriptionnel de l'expression de <i>repA</i>	163

A.2. Contrôle post-transcriptionnel de l'expression de <i>repA</i>	163
A.3. Mécanisme de reconnaissance de l'ARN antisens CopA à sa cible, CopT	165
B. Influence de la structure des deux ARN sur le devenir du complexe	167
C. Reconnaissance et clivage du complexe par la RNase III	171
C.1. Clivage de l'hélice intermoléculaire C par la RNase III	172
C.2. Fixation de la RNase III sur les différents complexes CopA-CopT	175
C.3. Conclusion	176
D. Cristallogénèse du complexe CopA-CopT	177
D.1. Choix des séquences de CopA et de CopT	177
D.2. Préparation des ARN et formation du complexe	177
D.3. Essais de cristallisation du complexe CopA ₆₁ - CopT ₆₁	178
Conclusion générale	181
Bibliographie	183
Annexe 1 : La protéine Hfq et la polyadénylation (Article 2)	209
Annexe 2 : Techniques de cartographie en solution des ARN	221

Abréviations

A	: adénine
ADN	: acide désoxyribonucléique
ADNc	: acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	: acide ribonucléique
ATP	: adénosine triphosphate
BLAST	: « Basic Local Aligement Search Tool »
C	: cytosine
°C	: degré Celsius
Cl	: chlorure
fmet	: formylmethionine
G	: guanine
h	: heure
<i>kapp</i>	: contante de vitesse apparente
LiSO ₄	: sulfate de lithium
Mb	: megabase
kDa	: kilodalton
M	: molaire
Mg	: magnésium
O	: oxygène
µg	: microgramme
min	: minute
µl	: microlitre
µm	: micromètre
MPD	: 2-methyl 2,4-pentanediol
Na	: sodium
nm	: nanomètre
nt	: nucléotide
pb	: paire de bases
PEG	: polyéthylène glycol
RNase	: ribonucléase
s	: seconde
S :	: svedberg
SD	: Shine et Dalgarno
T	: thymidine
U	: uracile

Code des acides aminés :	A	alanine
	C	cystéine
	D	acide aspartique
	E	acide glutamique
	F	phénylalanine
	G	glycine
	H	histidine
	I	isoleucine
	K	lysine

L	leucine
M	méthionine
N	asparagine
P	proline
Q	glutamine
R	arginine
S	sérine
T	thréonine
V	valine
W	tryptophane
Y	tyrosine

Introduction

I. Introduction générale: le monde de l'ARN

Pendant de nombreuses années, les acides ribonucléiques (ARN) ont été considérés comme les intermédiaires essentiels entre les gènes et les protéines. Ainsi, dans le dogme central de la biologie, l'information contenue au sein de la séquence d'ADN génomique est transcrite en ARN messager (ARNm), puis décodée au sein du ribosome (Jacob et Monod, 1961). Dans ce processus, les ARN de transfert (ARNt) interviennent comme adaptateurs, créant le lien entre le code génétique et le code protéique. Les protéines, acteurs essentiels de la cellule, possèdent les fonctions structurales et enzymatiques. Par la suite, ce dogme a été complexifié avec la découverte de nouvelles molécules d'ARN douées d'une activité enzymatique, comme l'ARN de la RNase P requis pour la maturation des ARNt (Guerrier-Takada et al., 1983), les introns catalytiques de groupe I et II ou les ribozymes présents à l'extrémité 3' de certains virus de plantes (Cech, 2002). Plus récemment, les structures cristallographiques de la sous-unité ribosomique 50S et du ribosome de *Thermus thermophilus* ont révélé que le centre de l'activité peptidyl-transférase est constitué exclusivement d'ARN suggérant que l'activité enzymatique est portée par l'ARN ribosomique (ARNr, Ban et al., 2000; Noller et al., 2001; Yusupov et al., 2001).

Tous ces ARN sont dits non codants puisqu'ils ne renferment pas l'information nécessaire pour la synthèse d'une protéine. Dorénavant, de multiples fonctions sont attribuées à ces ARN, et deux classes principales existent (Eddy, 2001; Mattick, 2004; Mattick et Makunin, 2005). Les ARN dits « housekeeping » interviennent dans des fonctions essentielles de la cellule comme la maturation des ARNm, des ARNt et des ARNr, ou bien encore l'export des protéines (tableau 1). En général, ces ARN sont exprimés de manière constitutive et font partie intégrante de complexes ribonucléoprotéiques (RNP). Ainsi, l'épissage des ARNm chez les eucaryotes se fait au sein des « *small nuclear RNP* » (snRNP, Sharp, 2005). Dans ces particules, les snARN permettent la reconnaissance des sites d'épissage par des appariements de paires de bases avec le pré-ARNm. Les « *small nucleolar* » ARN (snoARN) induisent des modifications post-transcriptionnelles sur leur ARN cible, qui sont principalement les ARNr, les ARNt et les snARN. Leur taille varie de 70 à 250 nucléotides et ils sont principalement localisés dans le nucléole. Deux catégories de snoARN ont été définies, basées sur des similarités de séquence et de structure : les snoARN à boîtes C/D et

les snoARN à boîtes H/ACA. Ces deux familles induisent respectivement sur leurs ARN cibles une méthylation en 2'-O sur le ribose ou une pseudouridylation. Dans les deux cas, l'activité catalytique est apportée par une enzyme qui s'associe de manière spécifique au snoARN. L'ARN apporte quant à lui la spécificité en s'appariant à la cible par un mécanisme de type antisens (Bachelierie et al., 2002).

ARN	Fonction cellulaire	Facteurs associés	Mode d'action	Références
Procaryotiques				
4,5S	sécrétion protéique	Ffh	facilite l'interaction entre la SRP et le récepteur membranaire	(Peluso et al., 2000)
tmARN	dégradation ARNm tronqués	SmpB/S1/Ribosome	code pour une séquence peptidique signal de dégradation	(Karzai et al., 2000)
6S	inhibition activité de l'ARN polymérase	$\sigma 70$ et sous-unités β et β' de l'ARN polymérase	mimétisme moléculaire	(Wassarman et Storz, 2000)
dsrA	activation de la traduction de <i>rpoS</i> et inhibition de la traduction de <i>hns</i>	Hfq	antisens	(Majdalani et al., 1998)
oxyS	inhibition de la traduction de <i>rpoS</i> et de <i>fhfA</i>	Hfq	antisens	(Zhang et al., 1998)
Eucaryotiques				
7SL	sécrétion protéique	Srp54p/Srp19/Srp72,68/Srp9,14	noyau de la SRP	(Quentin, 1994)
U1,U2,U4, U5,U6,U11, U15	épissage des pré-ARNm	Protéines du spliceosome et autres	interactions ARN-ARN et ARN-protéine	(Will et Luhrmann, 2001)
snoARN Box C/D	méthylation des pré-ARNr et des pré-ARNm	Nop56p/Nop58p/Nop1p	appariement avec séquence cible	(Bachelierie et al., 2002)
snoARN Box H/ACA	pseudouridylation des pré-ARNr	Cbf5p/Gar1p/Nhp2p/Nop10p	appariement avec séquence cible	(Bachelierie et al., 2002)
miARN	inhibition de la traduction des gènes cibles, dégradation ?	complexe RISC	appariement avec séquence cible	(Kim, 2005)
TER	synthèse des télomères	TERT	amorce pour la synthèse d'ADN des télomères	(Blackburn, 2005)
ARNg	édition des ARNm	gBP21	appariement avec séquence cible	(Stuart et al., 2005)
BC1	inhibition de la traduction de gènes cibles	FMRP	appariement avec séquence cible	(Zalfa et al., 2003)
B2	réponse stress	ARN polymérase II	bloque la formation des complexes d'initiation	(Allen et al., 2004; Espinoza et al., 2004)
SRA	réponse à l'hormone stéroïde	récepteur à l'hormone stéroïde	ND	(Lanz et al., 1999)
NRSE	différenciation neuronale	NRSF/REST	inhibition de l'activité des protéines NRSF/REST	(Kuwabara et al., 2004)
Xist	inactivation du chromosome X	ND	hypoacétylation de la chromatine	(Heard, 2004)
Air	empreinte parentale	ND	ND	(Sleutels et al., 2002)

Tableau 1 : Exemples d'ARN non codants. SRP : « Signal Recognition Particle », RISC : « RNA Inducing Silencing Complex », FMRP : « Fragile X Mental Retardation Protein », TERT : « Telomere Reverse Transcriptase », SRA : « Steroid Receptor RNA Activator », NRSF/REST : « Neuronal Restricted Silencing Factor/RE-1 Silencing Transcription Factor », ND : non déterminé.

D'autres complexes ribonucléiques existent, comme la « *Signal Recognition Particle* » (SRP) qui permet l'adressage de protéines en cours de synthèse à la membrane plasmique de la cellule. Ce mécanisme est conservé des procaryotes aux eucaryotes et l'un des composants principaux est un ARN (Halic et Beckmann, 2005).

La deuxième classe d'ARNnc est constituée d'ARN qui régulent l'expression de gènes cibles. Ainsi, de nombreuses évidences montrent que des ARN non codants (ARNnc) peuvent induire un effet épigénétique en contrôlant l'état de la chromatine (Bayne et Allshire, 2005; Lippman et Martienssen, 2004). Un exemple bien connu est l'ARN Xist qui, chez les eucaryotes, est responsable de l'inactivation d'un chromosome X chez les femelles (Heard, 2004). Des études récentes ont par ailleurs montré l'existence d'un très grand nombre de transcrits non codants dans les cellules eucaryotes (Lehner et al., 2002; Morey et Avner, 2004). Ainsi, les chromosomes humains 21 et 22 contiennent autant de gènes codants pour des protéines que de gènes non codants, dont 20% sont localisés en orientation inverse par rapport à un gène codant pour une protéine (Cawley et al., 2004; Kampa et al., 2004). Les fonctions de tous ces transcrits ne sont pas encore bien connues, mais ils semblent être impliqués dans des mécanismes d'empreinte parentale, qui permettent l'expression de l'allèle paternel ou maternel pour un gène donné (Wilkins, 2005).

Espèce	Taille du génome (Mb)	Nombre de gènes	Fraction codante
<i>Pyrococcus abyssi</i>	1,76	2 065	91%
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	1,73	2 064	91%
<i>Bacillus subtilis</i>	4,2	4 100	97%
<i>Escherichia coli</i>	4,6	4 289	88%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13	6 400	68%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	125	25 500	29%
<i>Caenorhabditis elegans</i>	100	18 000	27%
<i>Drosophila melanogaster</i>	180	13 600	13%
<i>Homo sapiens</i>	3 000	24 500	1,40%

Tableau 2 : Fraction codante du génome pour quelques espèces.

Avec les programmes de séquençages systématiques des génomes de plusieurs organismes procaryotiques et eucaryotiques, l'ère de la « post-génomique » s'est ouverte. Cette dernière a pour but principal l'identification de toutes les phases ouvertes de lecture contenues dans un génome donné, et d'étudier la structure et la fonction des protéines synthétisées. L'un des résultats surprenant de ces études est que plus un organisme est complexe, plus la part de la fraction non codante est importante (tableau 2). De plus, le faible

nombre de gènes chez les eucaryotes ne permet pas d'expliquer leur complexité. Cette dernière est obtenue par différents processus qui ont lieu principalement au niveau post-transcriptionnel comme l'épissage alternatif, l'utilisation différentielle de codons d'initiation, ou le redécodage (Namy et al., 2004; Stetefeld et Ruegg, 2005). L'utilisation de nombreux ARNnc ayant des fonctions clés dans la régulation de l'expression des gènes permet d'accroître cette complexité (Mattick, 2004; Mattick et Makunin, 2005). Ces ARN régulateurs sont retrouvés dans les régions intergéniques, longtemps considérées comme de l'ADN n'ayant pas de fonctions (« junk DNA »).

Les premiers ARN régulateurs ont été découverts chez les bactéries, mais récemment leur existence a également été démontrée chez les organismes eucaryotiques. Dans tous les cas, ils apportent une nouvelle dimension aux réseaux de régulation de l'expression des gènes dans la cellule. Jusqu'à présent, leurs mises en évidence étaient fortuites et résultaient de l'étude détaillée d'un processus cellulaire. Depuis 2000, des approches systématiques regroupées sous le terme « RNomics » ont révélé l'identification de plus de 60 nouveaux ARNnc bactériens (Rivas et al., 2001 ; Vogel et al., 2003; Wassarman et al., 2001). L'étude de leur fonction indique que ces ARNnc interviennent dans de nombreux processus qui adaptent rapidement la croissance bactérienne à l'environnement extérieur (conditions environnementales, stress, relation hôte-pathogène). Chez les eucaryotes, depuis 2001, de nouveaux snoARN ont été caractérisés chez les mammifères et les archaebactéries (Cavaille et al., 2000; Cavaille et al., 2001; Huttenhofer et al., 2001; Marker et al., 2002). Outre leur implication dans la modification des ARNr, certains exercent également de nouvelles fonctions comme la modification spécifique d'un ARNm (Bachellet et al., 2002). Une des découvertes majeures de ces dernières années est cependant l'existence d'une nouvelle classe d'ARNnc chez les eucaryotes, les microARN (miARN). Ces derniers contrôlent au niveau post-transcriptionnel l'expression des gènes en bloquant la traduction d'un ARNm, et de très nombreuses fonctions leurs sont associées (Ambros, 2004). Par exemple, chez *Caenorhabditis elegans* et *Drosophila melanogaster*, certains d'entre eux contrôlent des fonctions essentielles comme le développement, la différenciation cellulaire et l'apoptose (Ambros, 2004; Pasquinelli et al., 2005). Chez les plantes, la régulation des phénomènes de floraison et les mécanismes de défense contre les virus utilisent aussi des miRNA (Baulcombe, 2005; Kidner et Martienssen, 2005; Voinnet, 2002). L'impact de ces nouveaux ARN régulateurs a été renforcé avec la découverte de pathologies humaines impliquant des miARN, comme des cancers par exemple (Gong et al., 2005; Gregory et Shiekhattar, 2005). Ces microARN

s'apparient directement sur le(s) ARN messenger cible(s) et modulent leur expression au niveau de la traduction et/ou de la stabilité.

De manière remarquable, il existe de nombreux points communs entre les modes d'action utilisés par les ARN régulateurs procaryotiques et eucaryotiques. Les mécanismes sont extrêmement diversifiés et ont lieu au niveau de la transcription, de la traduction et de la stabilité de l'ARNm (figure 1).

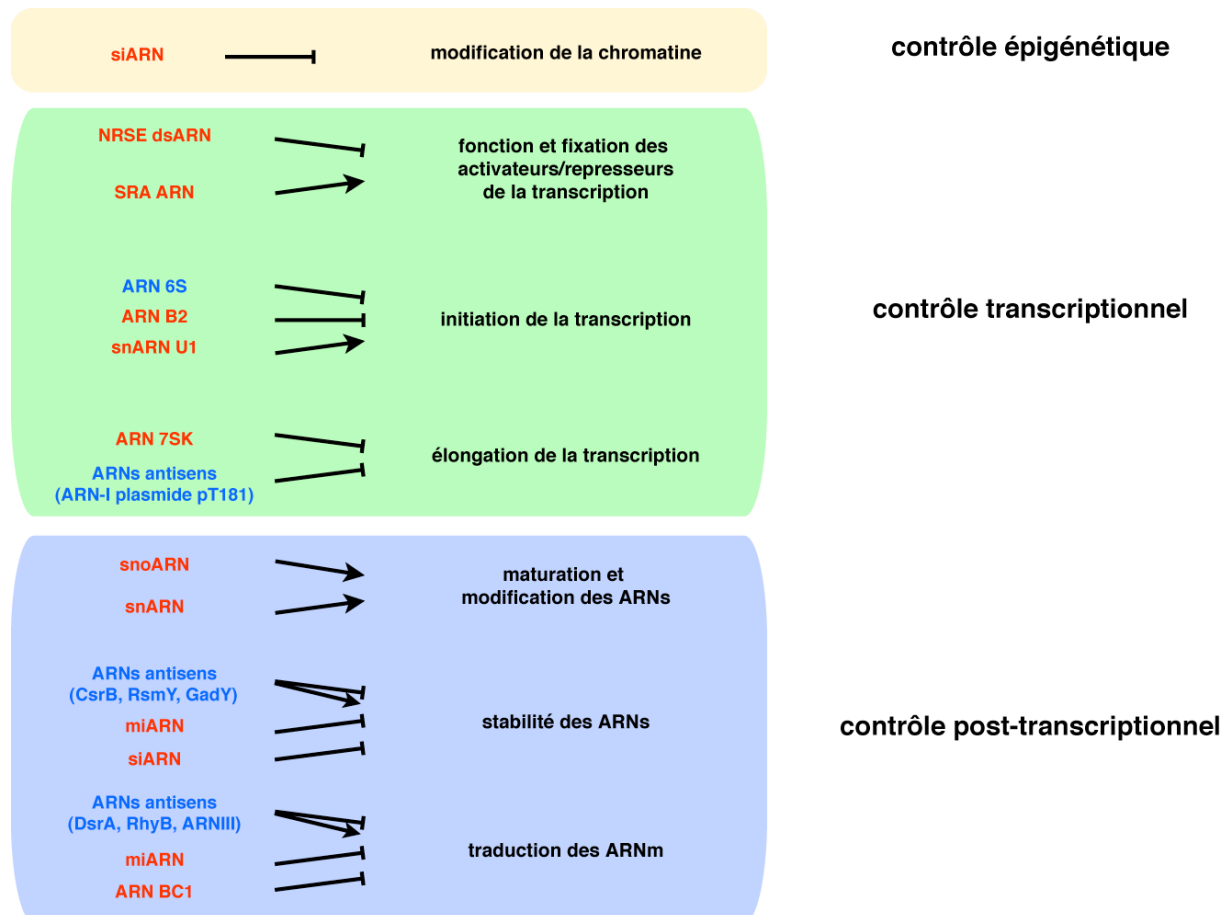


Figure 1 : *Etapes dans l'expression d'un gène qui peuvent être soumises à une régulation par un ARN.* Les ARN régulateurs bactériens (bleu) et eucaryotiques (rouge) peuvent avoir des effets positifs (flèche) ou négatifs (trait) à chaque étape conduisant à l'expression d'un gène.

Dans la suite de ce manuscrit, je me focaliserai sur les ARN régulateurs procaryotiques, afin d'en dégager des règles générales sur leurs mécanismes d'action, leurs modes de reconnaissance, et les co-facteurs protéiques impliqués.

II. Les ARN régulateurs procaryotiques

Les ARN régulateurs ont été découverts chez les bactéries il y a plus de trente ans. Ils ont été caractérisés dans les plasmides et les éléments génétiques accessoires comme les phages et les transposons (Wagner et al., 2002). Seuls quelques ARNnc codés par le chromosome étaient connus (Gottesman et al., 2001; Wassarman et al., 1999). Tous ces ARN présentent des caractéristiques communes : ils sont de petite taille (100-200 nts) et présentent des motifs de structure en tige-boucle. L'identification d'un plus grand nombre de ces ARN est difficile en raison de leurs tailles réduites et de leur insensibilité aux mutations de décalage du cadre de lecture ou aux mutations non-sens.

Néanmoins, une analyse informatique de la séquence de plusieurs génomes de bactéries a permis de prédire l'existence de nombreux ARNnc. Une première méthode, réalisée sur *E. coli*, a identifié les régions intergéniques conservées entre bactéries proches dans l'évolution. Les régions sélectionnées ont des tailles variant entre 50 et 200 nucléotides et présentent des motifs conservés en tige-boucle (Rivas et al., 2001). Une autre méthode a identifié les promoteurs et terminateurs de transcription Rho indépendant dans les régions intergéniques conservées (Argaman et al., 2001). Le nombre total d'ARNnc qui existent dans le génome d'une bactérie n'est pas connu, et certaines études en prédisent plus de 1000 chez *E. coli* (Livny et al., 2005), mais ces prédictions nous semblent néanmoins être surestimées. Parallèlement à ces approches prédictives, une banque d'ADNc a été réalisée à partir d'ARN d'une taille de 50 à 300 nucléotides provenant d'extraits bruts d'*E. coli* (Vogel et al., 2003). D'autres ARNnc ont également été identifiés grâce à leur association avec des protéines liant l'ARN après des expériences de co-immunoprécipitation (Wassarman et al., 2001). Dernièrement, de nouveaux ARNnc ont été trouvés chez *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio harveyi* et *Aquifex aeolicus* (Lenz et al., 2004; Wilderman et al., 2004; Willkomm et al., 2005).

L'existence de 60 d'entre eux a été confirmée expérimentalement. La plupart de ces ARNnc sont exprimés principalement en phase stationnaire ou sont induits dans des conditions de stress ou en réponse à des variations de l'environnement, ce qui permet une adaptation rapide de la croissance bactérienne. Cette caractéristique rend leur détection compliquée puisqu'il faut trouver les conditions dans lesquelles ils sont induits.

L'identification de leurs fonctions au sein de la cellule est aussi une étape difficile, car l'inactivation de ces ARNnc n'induit pas toujours un phénotype facilement caractérisable. Pour trouver une fonction à ces ARN, l'utilisation d'approches globales, comme la protéomique ou les puces à ADN permet souvent d'identifier les gènes dont l'expression varie en fonction de la présence ou de l'absence de l'ARN. La bioinformatique est également très utile pour prédire les séquences cibles de ces ARNnc dans les ARNm.

Trois classes majeures d'ARN régulateurs se dégagent : les ARN de type antisens interagissent directement avec des ARNm cibles par des interactions strictement complémentaires si l'ARN est codé en orientation inverse du gène cible, ou partielles si l'ARN est codé sur un locus distinct. La deuxième classe regroupe les ARN qui vont fixer de manière spécifique un facteur protéique et en moduler l'activité. Enfin, la troisième classe regroupe les ARNm senseurs et les « riboswitch ». Ces ARNm contiennent des régions régulatrices capables de sentir directement le signal extérieur ou de petits métabolites.

Quels peuvent être les avantages pour une cellule d'utiliser des ARNnc comme effecteurs dans des voies de régulation ? Il est plus rapide et moins coûteux énergétiquement de synthétiser une molécule d'ARN qu'une protéine. 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. 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. 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 antisens reconnaissent rapidement leur cible, et cette rapidité d'action est généralement basée sur la structure de l'ARN antisens et/ou de sa cible.

Quelques exemples représentatifs de chaque classe seront décrits dans la suite du manuscrit.

A. Les ARN de type antisens

A.1. ARN antisens strictement complémentaires à leur cible : systèmes plasmidiques

Les plasmides bactériens sont des éléments génétiques extra-chromosomiques qui confèrent de nouvelles propriétés à la cellule hôte (Grohmann et al., 2003; Thomas, 2000). Parmi ces propriétés, les phénotypes de résistance aux antibiotiques sont les plus répandus et constituent un problème majeur de santé publique (Carattoli, 2003). Ces éléments peuvent s'échanger entre bactéries d'espèces différentes et contribuent à la prolifération de résistances des bactéries aux antibiotiques (Martinez et Baquero, 2002). Néanmoins, des fluctuations importantes du nombre de copies plasmidiques dans les cellules peuvent causer des dommages : une augmentation non contrôlée du nombre de copies peut conduire à la mort cellulaire ; à l'inverse, un nombre trop faible de copies peut entraîner la perte du plasmide (Gerhart et al., 1998). Ainsi, pour maintenir un nombre constant de copies, de nombreux plasmides utilisent des ARN antisens comme effecteurs principaux du contrôle de la fréquence de réplication, de la conjugaison ou de la ségrégation des plasmides. Ces ARN sont constitutivement synthétisés mais rapidement dégradés si bien que leur concentration intracellulaire est représentative de celle du plasmide à tout moment du cycle cellulaire. Ils sont de petite taille (<100 nts), non codants, et sont strictement complémentaires à leur ARNm cible car transcrits en orientation inverse. Le mécanisme de reconnaissance entre l'ARN antisens et l'ARNm n'est pas une simple hybridation, mais est un processus complexe composé de plusieurs étapes qui ont lieu dans un ordre hiérarchique.

Ces ARN sont en général extrêmement puissants. L'efficacité du contrôle est directement corrélée à la vitesse d'association de l'ARN antisens à l'ARNm cible. Cette association rapide et le mécanisme de reconnaissance sont dictés par les structures des deux ARN. Ceux-ci sont composés de structures en tiges-boucles, avec des boucles apicales de 6 à 7 nucléotides contenant en général un motif de type « U-turn », qui favorisent les interactions initiales (Franch et Gerdes, 2000). Ces interactions impliquent une reconnaissance de type boucle-boucle ou boucle-région simple brin, qui sont ensuite rapidement converties en complexes plus stables (Brunel et al., 2002; Gerhart et al., 1998). Leurs mécanismes d'action

sont diversifiés, puisqu'ils peuvent agir au niveau de la transcription, de la traduction et de la dégradation des ARNm cibles (tableau 3).

Plasmide	ARN antisens	ARN cible	Taille de l'antisens (nts)	Fonction contrôlée	Mode d'action	Référence
R1 (IncFII)	CopA	ARNm <i>repA</i>	91	réplication plasmidique	inhibition de la traduction/dégradation	(Stougaard et al., 1981)
Col1b-P9 (IncI α) et dérivés	Inc	ARNm <i>repZ</i>	67	réplication plasmidique	inhibition de la traduction et de la formation d'une structure activatrice	(Shiba et Mizobuchi, 1990)
ColE1 et dérivés	ARN-I	ARN-II	108	réplication plasmidique	inhibition de la maturation de l'amorce	(Tomizawa et al., 1981)
pT181/pIP501/pA M β 1	ARN-I	ARNm <i>repC</i>	83	réplication plasmidique	atténuation transcriptionnelle	(Brantl et al., 1993; Le Chatelier et al., 1996; Novick et al., 1989)
ColE2	ARN-I	ARNm <i>rep</i>	115	réplication plasmidique	inhibition de la traduction	(Sugiyama et Itoh, 1993)
pLS1 et dérivés	ARN-II	ARNm <i>cop-rep</i>	50	réplication plasmidique	inhibition de la traduction	(del Solar et Espinosa, 1992)
R1162	Ct	ARNm <i>repI</i>	75	réplication plasmidique	inhibition de la traduction	(Kim et Meyer, 1986)
R1 (IncFII)	Sok	ARNm <i>mok/hok</i>	64	lyse cellulaire	inhibition de la traduction/dégradation	(Gerdes et al., 1997)
R1 (IncFII) et groupe IncFI	FinP	ARNm <i>traJ</i>	79	conjugaison	inhibition de la traduction/dégradation	(Koraimann et al., 1991)

Tableau 3 : ARN antisens plasmidiques bactériens. Seuls les systèmes les mieux étudiés sont indiqués. Les groupes d'incompatibilité (si connus) sont indiqués entre parenthèses.

A.1.1. Contrôle de la réplication du plasmide R1

Un des systèmes les mieux étudiés est le mécanisme de contrôle de la réplication du plasmide R1. Ce dernier a été caractérisé chez *Salmonella typhimurium* et peut être maintenu de manière stable chez *E. coli* (Meynell et Datta, 1967). Il est présent à un faible nombre de copies par cellules (1 ou 2) et porte plusieurs gènes de résistance à des antibiotiques ainsi que tous les gènes nécessaires à sa réplication, à son transfert conjugatif et à son maintien lors des divisions cellulaires (figure 2). Ces trois fonctions sont régulées par des ARN antisens. La réplication débute à l'origine *oriR1* et nécessite la synthèse *de novo* de la protéine RepA. Cette étape est limitante dans la réplication plasmidique. Le contrôle de la réplication plasmidique s'exerce en modulant l'expression de *repA*. Dans les conditions normales, le facteur CopB inhibe la transcription à partir du promoteur de *repA*. Cependant, l'expression de ce gène est principalement régulée au niveau de la traduction par l'ARN antisens CopA (91 nts), transcrit à partir du même locus que l'ARNm *repA* mais dans une orientation inverse. CopA est donc strictement complémentaire à sa séquence cible, CopT, qui est située dans la région 5' non traduite de l'ARNm, 80 nucléotides en amont du site d'initiation de la traduction de *repA* (figure 2). La synthèse de la protéine RepA nécessite la traduction d'une phase

ouverte de lecture (*tap*) codant pour un peptide de 24 acides aminés, localisé entre CopT et *repA* (Blomberg et al., 1992).

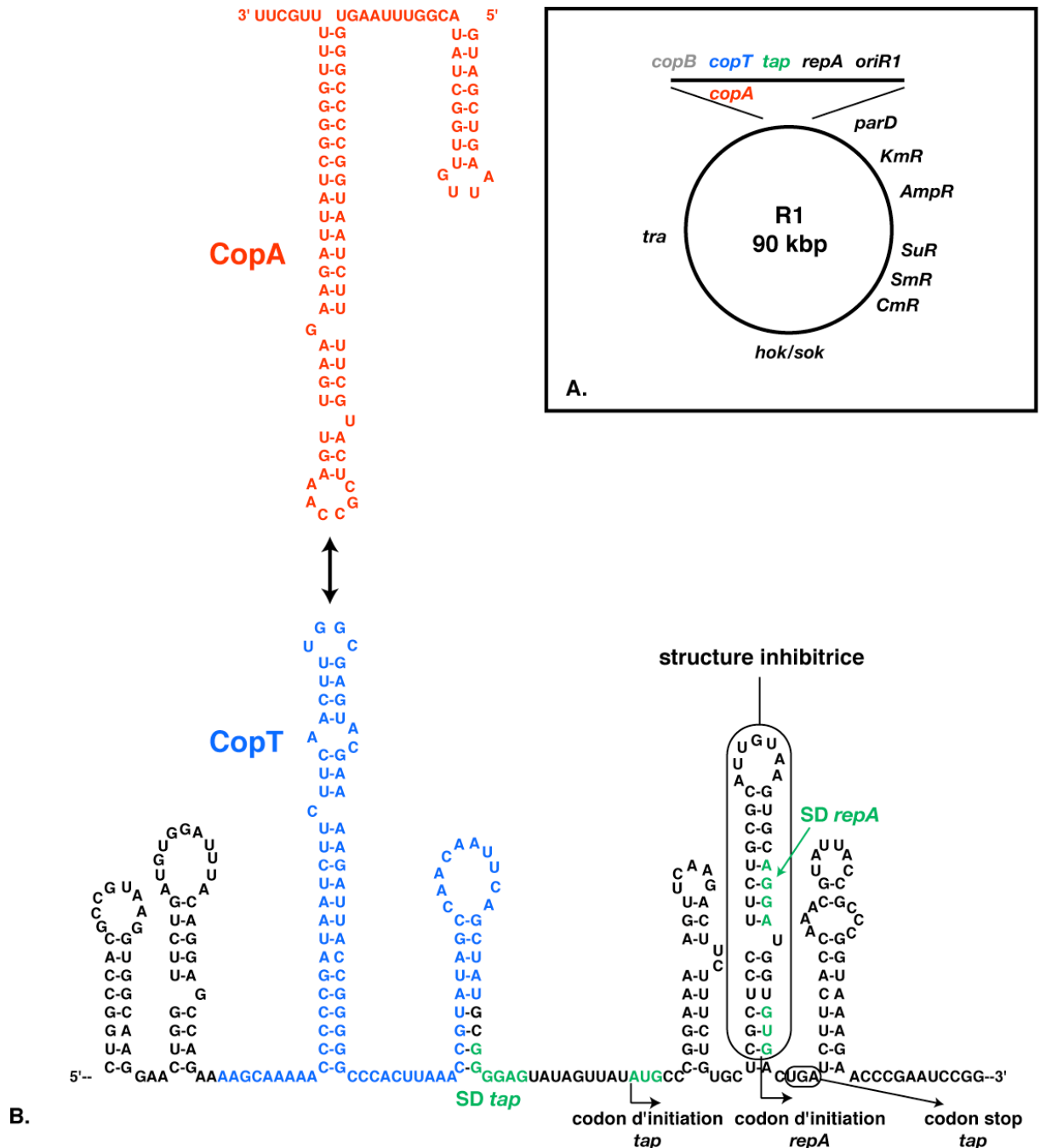


Figure 2 : Représentation simplifiée du plasmide R1 (A) et structures secondaires de la région 5' non traduite de l'ARNm *repA* et de l'ARN antisens CopA (B). (A) Les gènes de résistance aux antibiotiques portés par le plasmide sont indiqués. Les loci *hok/sok* et *tra*, impliqués respectivement dans le contrôle de la ségrégation et de la conjugaison sont aussi indiqués. (B) La séquence de CopT complémentaire à CopA est représentée en bleu. Les séquences Shine et Dalgarno (SD) et les codons d'initiation de la traduction de *tap* et de *repA* sont en vert. Le codon de terminaison de la traduction de *tap*, ainsi que la structure inhibitrice de la traduction de *repA* sont encadrés.

En effet, le site de fixation du ribosome à *repA* est séquestré dans une structure secondaire stable. La traduction de *tap* permet une ouverture de cette structure inhibitrice et la réinitiation au site d'initiation de la traduction de *repA* (Blomberg et al., 1994). L'interaction entre CopA

et sa cible CopT inhibe la traduction de *repA* de façon indirecte en empêchant le ribosome de se fixer à son site d'initiation à *tap*. En raison du couplage traductionnel entre *tap* et *repA*, la synthèse de RepA est alors inhibée (Malmgren et al., 1996).

A.1.2. Contrôle de la réplication du plasmide ColE1

Le plasmide ColE1 utilise une amorce ARN pour sa réplication. La transcription de cette amorce démarre en amont de l'origine de réplication (figure 3, étape 1). Durant la transcription, l'ARN amorce (ARN-II) subit un changement de conformation qui lui permet de former un hybride persistant et étendu avec l'ADN lorsque le complexe de transcription arrive au niveau de l'origine de réplication (étape 2). Ce complexe est la cible de la RNase H qui va générer une extrémité 3' libre sur l'ARN qui servira d'amorce à la synthèse d'ADN (étapes 3 et 4). Un ARN antisens (ARN-I) a été identifié dans ce système, transcrit en orientation inverse par rapport à l'ARN-II. Durant la transcription, l'ARN-II passe par différents intermédiaires conformationnels (Gulyaev et al., 1995), dont chaque domaine est important pour la formation de l'hybride stable final. L'interaction entre l'ARN-II et l'ARN-I bloque la formation de l'un des intermédiaires conformationnels, ce qui ne permet plus de former l'hybride stable (étape 5). La réplication du plasmide est alors inhibée. L'ARN-I est synthétisé de manière constitutive et est rapidement dégradé (Kaberdin et al., 1996; Lin-Chao et Cohen, 1991). De plus, il ne peut agir qu'avant que la transcription de l'ARN-II n'arrive à l'origine de réplication.

L'efficacité du contrôle repose sur les structures des deux ARN, qui sont composées de plusieurs tiges-boucles. Deux interactions initiales de type boucle-boucle sont cruciales pour une reconnaissance optimale entre les deux ARN (Eguchi et Tomizawa, 1990; Kidner et Martienssen, 2005; Tomizawa, 1990), mais cependant ce complexe instable doit être rapidement stabilisé par des interactions additionnelles. De manière intéressante, le contrôle par l'ARN-I nécessite l'intervention d'une protéine, Rom. Cette dernière reconnaît, sous forme dimérique, l'interaction boucle-boucle initiale et va induire sa stabilisation (étape 6). Comme cette étape est la seule à être réversible, l'intervention de Rom permet de favoriser la conversion de l'interaction initiale vers la formation du complexe stable (Eguchi et Tomizawa, 1990; Tomizawa, 1990).

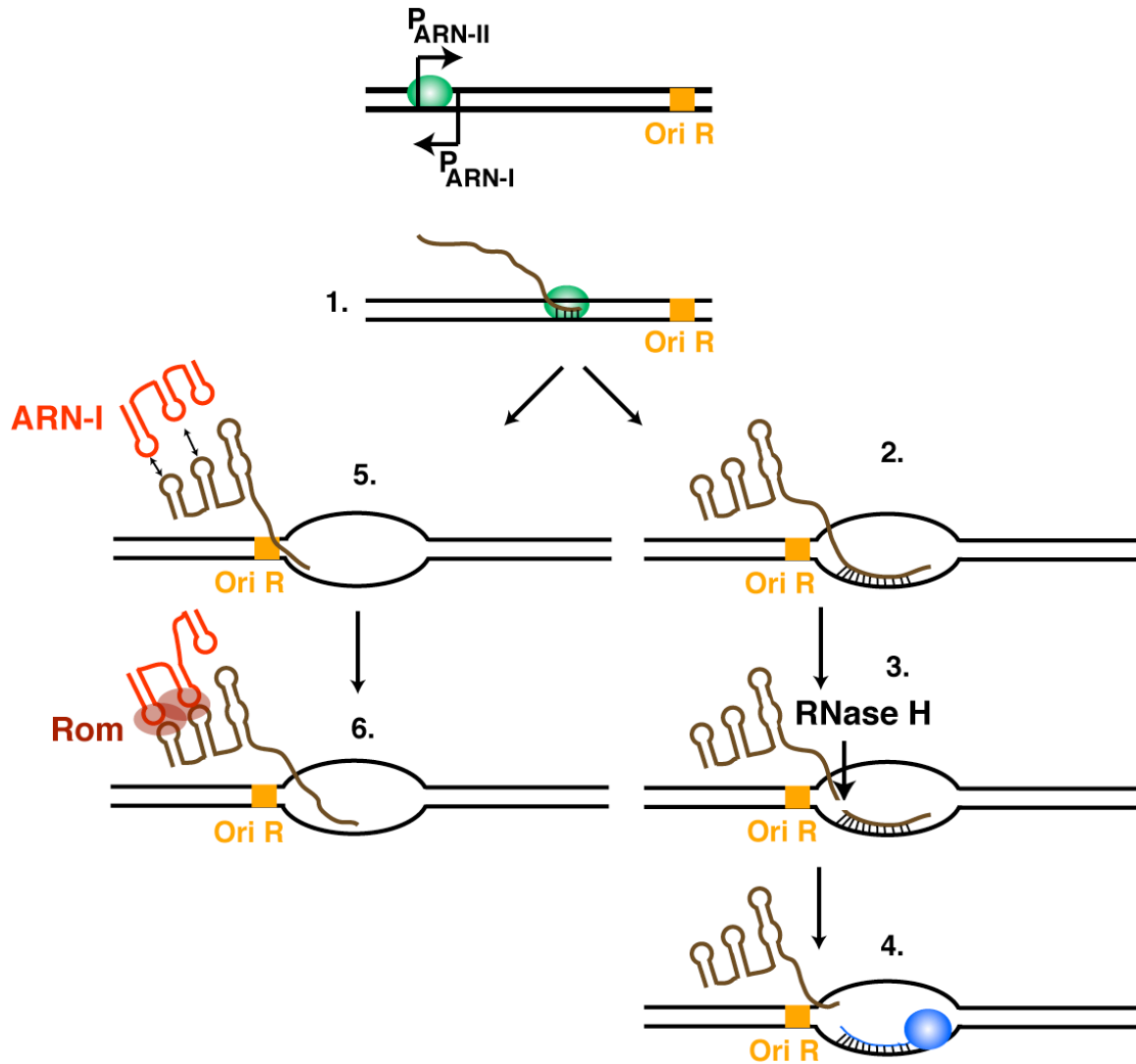


Figure 3 : Mécanisme d'initiation de la réplication chez les plasmides de type ColE1. L'origine de réplication est représentée en orange. L'ARN polymérase est représentée par un rond vert et l'ARN naissant par une ligne brune. Le site d'action de la RNase H est indiqué. L'ADN polymérase est représentée par un rond bleu, et la molécule d'ADN naissante par une ligne bleue. Les différentes étapes sont décrites dans le texte.

A.2. Les ARN antisens codés par le chromosome bactérien

Le tableau 4 regroupe différents ARN antisens codés par le chromosome, pour lesquels une ou plusieurs cibles sont connues. Ces ARN agissent principalement en ciblant spécifiquement un ARNm pour inhiber ou activer sa traduction. L'inhibition de la traduction est suivie d'une dégradation de l'ARNm par la RNase E ou la RNase III. Pour activer la traduction d'un ARNm, l'ARN antisens interagit avec une séquence de l'ARNm qui séquestre le site d'initiation de la traduction. L'interaction entre les deux ARN libère ce site et permet la fixation du ribosome. Contrairement aux ARN antisens plasmidiques, ces ARN ne sont généralement pas strictement complémentaires à leurs cibles, et certains en possèdent plusieurs. Néanmoins, ils sont structurés et les mécanismes d'interaction avec leurs cibles semblent être proche des mécanismes utilisés par les ARN antisens plasmidiques. La plupart de ces ARN nécessitent l'intervention d'un facteur protéique, Hfq, pour exercer un contrôle efficace. De plus, ces ARN sont en général stables dans la cellule, et ils ne sont dégradés que lorsqu'ils interagissent avec leur cible.

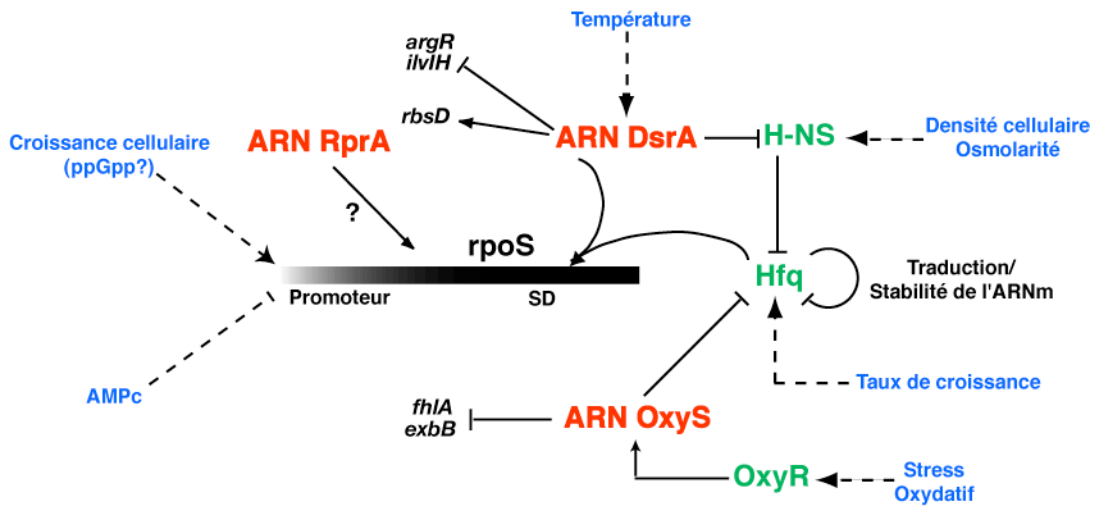
ARN régulateur	Cible(s)	Protéine contrôlée	Mode de contrôle	Références
MicF	ARNm <i>ompF</i>	porine	séquestration Shine et Dalgarno/dégradation de l'ARNm	(Delihias et Forst, 2001)
MicC	ARNm <i>ompC</i>	porine	séquestration Shine et Dalgarno /dégradation de l'ARNm	(Chen et al., 2004)
MicA	ARNm <i>ompA</i>	porine	séquestration Shine et Dalgarno /dégradation de l'ARNm	(Udekwo et al., 2005)
DsrA	ARNm <i>hns</i> et <i>rpoS</i>	régulateurs transcriptionnels	séquestration Shine et Dalgarno /libération du Shine et Dalgarno	(Lease et al., 1998)
RprA	ARNm <i>rpoS</i>	régulateurs transcriptionnels	libération du Shine et Dalgarno	(Majdalani et al., 2001)
OxyS	ARNm <i>rpoS</i> et <i>fhla</i>	régulateurs transcriptionnels	séquestration Shine et Dalgarno /libération du Shine et Dalgarno	(Altuvia et al., 1998; Zhang et al., 1998)
RyhB	ARNm <i>sodB</i>	protéine de stockage du fer	séquestration Shine et Dalgarno /dégradation de l'ARNm	(Masse et Gottesman, 2002)
IstR	ARNm <i>tisAB</i>	toxine	séquestration Shine et Dalgarno /dégradation de l'ARNm	(Vogel et al., 2004)
RdlD	ARNm <i>ldrD</i>	toxine	séquestration Shine et Dalgarno /dégradation de l'ARNm	(Kawano et al., 2002)
GadY	ARNm <i>gadX</i>	régulateur transcriptionnel	stabilisation du messenger	(Opdyke et al., 2004)
DicF	ARNm <i>ftsZ</i>	division cellulaire	séquestration Shine et Dalgarno /dégradation de l'ARNm	(Delihias, 1995)
GcvB	ARNm <i>oppA</i> et <i>dppA</i>	protéines du périplasme	séquestration Shine et Dalgarno /dégradation de l'ARNm	(Urbanowski et al., 2000)
Spot42	ARNm <i>galK</i>	métabolisme du galactose	séquestration Shine et Dalgarno /dégradation de l'ARNm	(Moller et al., 2002b)

Tableau 4 : ARN régulateurs codés par des loci chromosomiques bactériens.

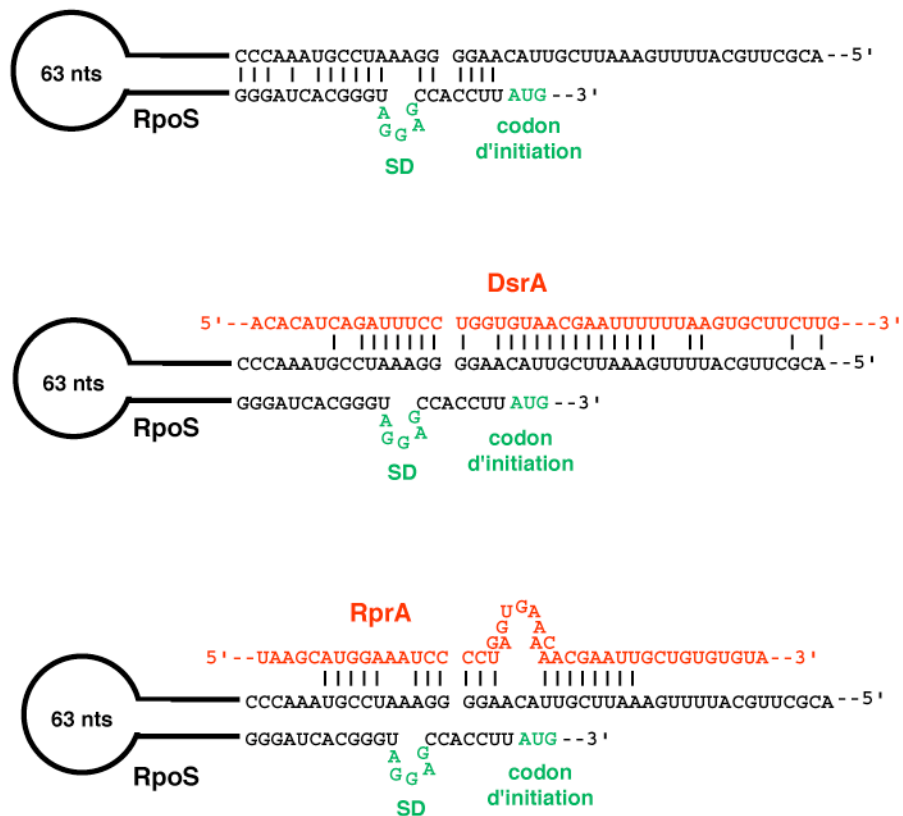
A.2.1. Contrôle de la traduction du gène *rpoS* par plusieurs ARN régulateurs

Le facteur de transcription alternatif RpoS régule l'expression de plusieurs dizaines de gènes impliqués dans la transition de la phase exponentielle à la phase stationnaire de croissance, dans la résistance au choc acide, au stress oxydatif, à basse osmolarité et aux basses températures (Hengge-Aronis, 2002). L'expression de RpoS est modulée aux niveaux transcriptionnel, traductionnel, ainsi qu'au niveau de la protéolyse de la protéine RpoS (figure 4). Deux protéines, Hfq et HN-S, influencent également la synthèse de RpoS. La protéine HN-S inhibe la synthèse de RpoS par un mécanisme qui n'est pas encore totalement élucidé. Le contrôle traductionnel s'effectue au niveau de la région de fixation du ribosome. En conditions normales, cette région est séquestrée dans une structure secondaire stable, qui empêche l'initiation de la traduction (Brown et Elliott, 1997). En conditions de stress, cette structure est détruite par l'intervention de petits ARNnc (DsrA, RprA et OxyS) et de la protéine Hfq, ce qui permet la synthèse de la protéine. L'expression des ARNnc est induite par diverses conditions de stress.

DsrA et RprA agissent tous deux comme ARN antisens et, en s'appariant à l'ARNm *rpoS*, libèrent le site de fixation du ribosome et ainsi activent la traduction. DsrA est activée à basse température (Repoila et Gottesman, 2001; Repoila et al., 2003), et l'activation de *rpoS* à ces températures va permettre l'expression de gènes qui régulent la synthèse du tréhalose, un osmoprotectant qui protège la cellule à basse température (Kandror et al., 2002). Par ailleurs, DsrA contrôle aussi l'expression de *hns*, un régulateur global de la transcription, principalement en cas de stress osmotique (Lease et al., 1998; Sledjeski et Gottesman, 1995). Dans ce cas, DsrA agit comme ARN antisens et inhibe l'initiation de la traduction en interagissant avec le site de fixation du ribosome de l'ARNm *hns*. Finalement, par recherche de complémentarités de séquences, il a été suggéré que DsrA inhiberait la traduction des ARNm *argR* et *ilvIH*, qui codent pour des facteurs de transcription (Lease et Belfort, 2000b). Les signaux qui induisent la transcription de RprA sont encore peu connus, mais il pourrait être induit en réponse à un choc osmotique ou en conditions de milieu minimal. Un système de transduction de signal, qui contrôle la formation de biofilms, pourrait être impliqué (Ferrieres et Clarke, 2003; Majdalani et al., 2001; Majdalani et al., 2002).



A.



B.

Figure 4 : Modèle de régulation de rpoS. (A) Réseau et signaux de régulation permettant la synthèse de la protéine RpoS. Les ARN régulateurs sont en rouge, les signaux effecteurs sont en bleu et les protéines associées sont en vert. Les traits plein représentent un effet au niveau de la traduction tandis que les traits en pointillés représentent un effet au niveau transcriptionnel. Les flèches symbolisent une activation et les traits une inhibition, respectivement. (B) Structure secondaire de l'ARNm rpoS et interaction avec les ARN DsrA et RprA. SD : Shine et Dalgarno.

L'ARN OxyS est induit lors d'un stress oxydatif et protège la cellule contre les dommages causés au niveau de l'ADN (Altuvia et al., 1997). OxyS réprime l'expression de deux gènes cibles, *rpoS* et *fhlA*. Ce dernier code pour un facteur de transcription, FhlA, et OxyS régule donc de manière indirecte l'expression de plus de 40 gènes. L'inhibition de la traduction de FhlA est directe, *via* une interaction entre OxyS et le site de fixation du ribosome (Altuvia et al., 1998; Argaman et Altuvia, 2000). En revanche, le contrôle de la traduction de l'ARNm *rpoS* est indirect. Un mécanisme a été proposé dans lequel OxyS séquestrerait la protéine Hfq, inhibant ainsi la traduction de *rpoS* (Zhang et al., 1998).

Ainsi, un gène peut être la cible de plusieurs ARN régulateurs, et inversement un ARNnc peut cibler plusieurs ARNm. L'intégration par la cellule des différents signaux extérieurs permet à la bactérie d'exprimer les gènes dont elle a besoin (figure 4). Enfin, DsrA et OxyS nécessitent la présence d'un co-facteur, la protéine Hfq, pour un contrôle optimal (Sledjeski et al., 2001; Zhang et al., 2002a).

A.2.2. La protéine Hfq, co-facteur des ARN régulateurs

La protéine Hfq a tout d'abord été identifiée pour sa participation dans la réplication du bactériophage Q β (DuBow et al., 1977). Cette étape nécessite la présence d'une extrémité 3' libre dans l'ARN génomique, qui sera reconnue par la réplicase phagique. Hfq rend cette extrémité accessible en modifiant la structure secondaire et tertiaire de l'ARN Q β (Miranda et al., 1997). Chez *E. coli*, cette protéine abondante (Kajitani et al., 1994) est présente sous la forme d'un hexamère qui se fixe à l'ARN au niveau de régions simples brins riches en AU. Les structures cristallographiques des protéines Hfq de *S. aureus*, de *E. coli* et de *P. aeruginosa* ont été déterminées (Nikulin et al., 2005; Sauter et al., 2003; Schumacher et al., 2002). Chaque monomère est principalement composé d'un feuillet β , caractéristique du motif Sm que l'on retrouve dans de nombreuses protéines liant l'ARN chez les eucaryotes ou les archéobactéries. Une recherche par BLAST a permis d'identifier des homologues à Hfq dans la moitié des génomes séquencés (tableau 5, Sun et al., 2002). Ce chiffre est sans doute sous-estimé puisque par la suite des homologues de Hfq ont été retrouvés dans des cyanobactéries comme *Prochlorococcus marinus* ou *Synechococcus WH8102* (Axmann et al., 2005). Des homologues de Hfq ont aussi été trouvés dans des archéobactéries. Ces observations sont sans doute dues à la grande variété de séquences pouvant former le motif Sm. Il est intéressant de noter que cette protéine est également conservée dans de nombreux organismes pathogènes,

Phyla	espèces avec Hfq	espèces sans Hfq
Thermotogales-Aquificales	<i>Aquifex aeolicus</i> <i>Thermotoga maritima</i>	
Chlamydia-Spirochetes		<i>Chlamydia muridarum</i> <i>Chlamydia trachomatis</i> <i>Chlamydomphlia pneumonia</i> <i>Borrelia burgdorferi</i> <i>Treponema pallidum</i>
Cytophagales		<i>Cytophaga hutchinsonii</i>
Actinomycetes-Deinococcales		<i>Deinococcus radiodurans</i>
Cyanobacteria	<i>Prochlorococcus marinus</i> <i>Synechococcus sp.</i>	<i>Mycobacterium leprae</i> <i>Thermobifida fusca</i> <i>Streptomyces coelicolor</i> <i>Nostoc sp.</i> <i>Nostoc punctiforme</i> <i>Synechocystis sp.</i>
Gram-positives, bas G-C	<i>Bacillus halodurans</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Clostridium acetobutylicum</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Listeria innocua</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus anthracis</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Mycoplasma pulmonis</i> <i>Ureaplasma urealyticum</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Enterococcus faecium</i>
ε-protobacteria		<i>Helicobacter pylori</i> <i>Campylobacter jejuni</i>
α-protobacteria	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Caulobacter crescentus</i> <i>Mesorhizobium loti</i> <i>Sinorhizobium meliloti</i> <i>Magnetococcus sp.</i> <i>Rhodopseudomonas palustris</i> <i>Rhodobacter sphaeroides</i> <i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> <i>Novosphingobium aromaticivorans</i>	<i>Brucella melitensis</i> <i>Rickettsia conorii</i> <i>Rickettsia prowazekii</i>
β/γ-protobacteria	<i>Neisseria meningitidis</i> <i>Ralstonia solanocearum</i> <i>Burkholderia fungorum</i> <i>Burkholderia mallei</i> <i>Burkholderia pseudomallei</i> <i>Haemophilus influenza</i> <i>Pasteurella multocida</i> <i>Xylella fastidiosa</i> <i>Nitrosomonas europea</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Yersinia pestis</i> <i>Salmonella enterica</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Shewanella putrefaciens</i>	<i>Buchnera sp.</i>

Tableau 5: Présence ou absence de la protéine Hfq dans différents génomes bactériens. (D'après Sun et al., 2002).

comme *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Brucella abortus*, *Listeria monocytogenes* ou *Staphylococcus aureus*.

Chez *E. coli*, le gène *hfq* fait partie d'un opéron complexe qui comprend les gènes *amiB* et *miaA*, également impliqués dans le métabolisme des ARN (Tsui et al., 1996). L'inactivation du gène *hfq* conduit à l'apparition de phénotypes très variés chez *E. coli* (Tsui et al., 1994), principalement à cause de son rôle dans la régulation du gène *rpoS*. Cette protéine est essentielle pour de nombreux mécanismes de régulation impliquant des ARNnc, avec un contrôle abolit en absence de la protéine (Valentin-Hansen et al., 2004). Plusieurs fonctions ont été attribuées à Hfq. *In vitro*, Hfq stabilise les interactions ARNnc-ARNm dans différents systèmes (Moller et al., 2002a; Zhang et al., 2002a; Zhang et al., 2003), et plusieurs modèles ont été proposés (figure 5). Dans le premier, Hfq exerce un rôle de protéine chaperone. La fixation de la protéine à l'un des ARN induirait des changements de conformations afin de rendre accessible les régions interagissant avec l'ARN complémentaire. Dans un autre modèle, un seul hexamère d'Hfq fixerait l'ARN antisens et sa cible, ce qui aurait pour effet d'augmenter leur concentration locale et donc d'augmenter les chances d'appariement. Un autre modèle propose que deux hexamères d'Hfq sont nécessaires, l'un fixant l'ARN régulateur et l'autre fixant l'ARNm cible. La formation d'un dimère d'hexamère permettrait le rapprochement des deux ARN et favoriserait leur interaction. Ces dimères d'hexamères ont été observés dans des expériences d'ultracentrifugation analytique et constituent l'unité asymétrique des cristaux ayant servis à résoudre la structure de la protéine (Arluisson et al., 2002; Schumacher et al., 2002). Ce modèle n'explique cependant pas comment un ARN régulateur arriverait à trouver spécifiquement l'hexamère d'Hfq portant sa cible. Cependant, la fonction principale démontrée pour Hfq est de protéger les ARNnc contre l'action des RNases (Masse et al., 2003). Ainsi, il a été proposé que Hfq masque des sites pouvant être reconnu par la RNase E, puisque les deux protéines possèdent en effet des sites de reconnaissance similaires, qui sont des régions riches en uridines (Moll et al., 2003). Récemment, Morita et coll. (2005) ont montré que ces deux protéines interagissent. Hfq associée aux ARNnc recruterait la RNase E pour initier la dégradation de l'ARNm cible. Ceci permettrait de concentrer tous les différents acteurs au même endroit, ce qui accélérerait le contrôle.

D'autres protéines sont associées à Hfq, comme la protéine ribosomique S1 ou bien l'ARN polymérase de *E. coli*. Une activité d'hydrolyse de l'ATP a été montrée pour Hfq mais son rôle est encore inconnu (Sukhodolets et Gardes, 2003). Elle pourrait par exemple servir à

relarguer Hfq de l'ARNnc lorsque l'interaction avec l'ARNm cible est finie. Finalement, Hfq est impliquée dans la formation de la queue polyA des ARNm (Folichon et al., 2003; Hajnsdorf et Regnier, 2000; Le Derout et al., 2003).

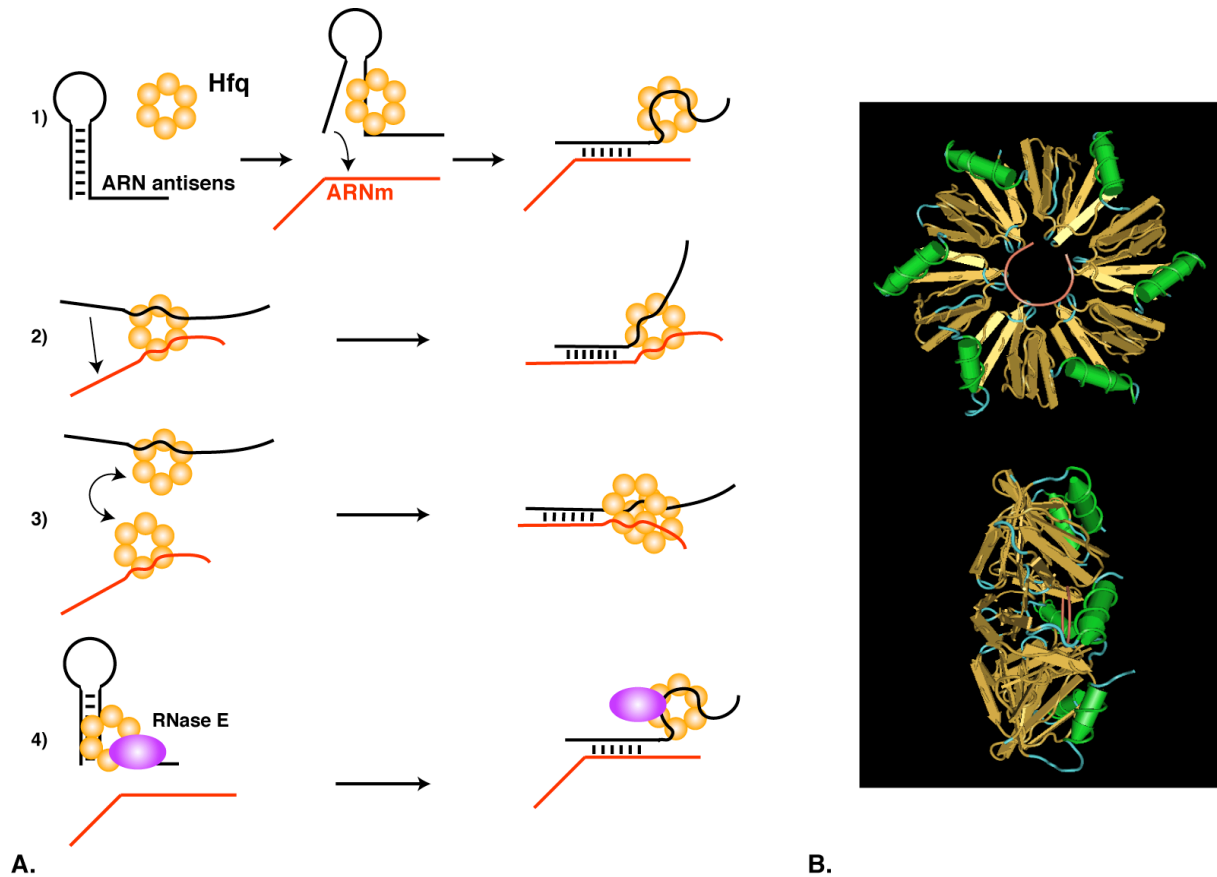


Figure 5 : Modèles d'action de la protéine Hfq. (A) Présentation des différents modes d'action proposés pour la protéine Hfq. La protéine peut agir en modifiant la structure de l'ARN antisens (1), rapprocher les deux ARN sur un hexamère (2) ou sur deux hexamères (3). Un autre modèle propose que Hfq recrute la RNase E pour former un complexe ARNnc-Hfq-RNase E. (B) Structure tridimensionnelle de la protéine Hfq de *S. aureus*. (D'après Schumacher et al., 2002).

A.2.3. SgrS, un ARN régulateur localisé à la membrane plasmique

Chez *E. coli*, le gène *ptsG* code pour une protéine transmembranaire qui transporte le glucose dans la bactérie et qui le transforme en glucose-phosphate. Son expression est régulée à la fois au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. La régulation au niveau post-transcriptionnel est sous la dépendance d'un ARNnc, SgrS. Cet ARN est induit suite à l'accumulation dans la cellule de glucose phosphate. Un moyen de palier à ce stress métabolique est d'arrêter l'importation de glucose jusqu'à épuisement du glucose phosphate

présent dans la bactérie. SgrS s'associe avec l'ARNm *ptsG* au niveau du site de fixation du ribosome. Cette interaction bloque l'accès du ribosome et induit la dégradation de l'ARNm par la RNase E. La protéine Hfq joue un rôle dans ce mécanisme puisqu'elle reconnaît à la fois SgrS et la RNase E (Morita et al., 2005; Vanderpool et Gottesman, 2004). Ces interactions permettent de recruter directement la RNase E sur l'ARNm et l'ARNnc pour initier leur dégradation.

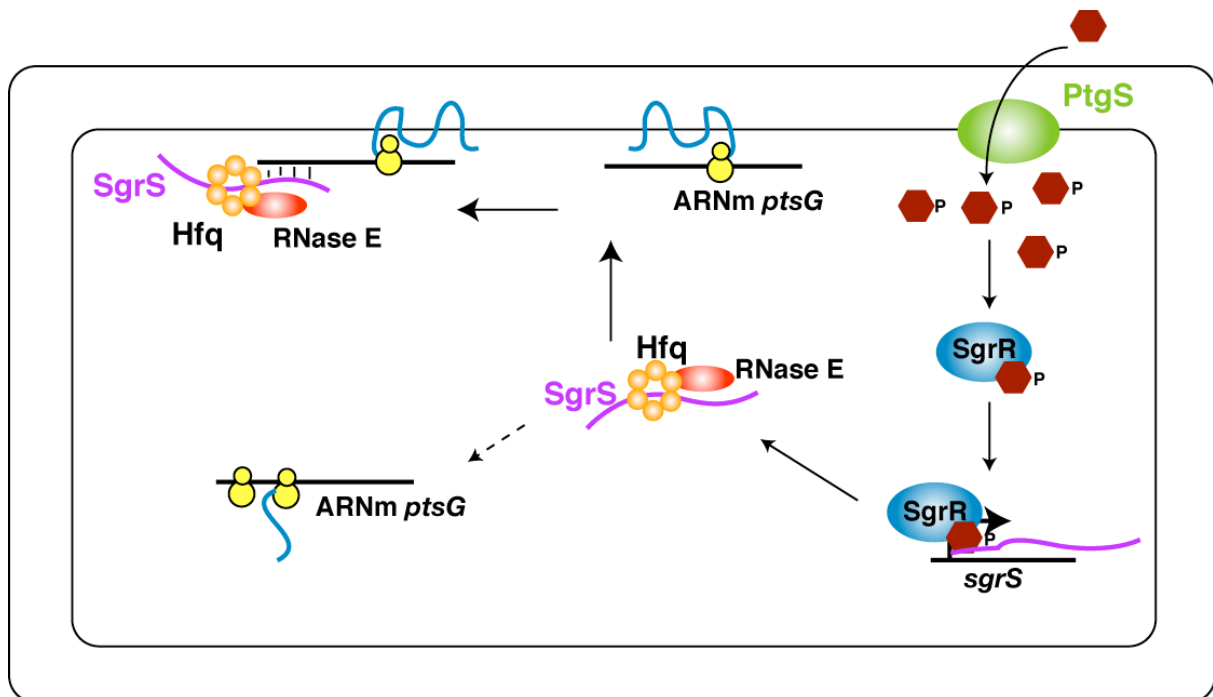


Figure 6 : Mode d'action de l'ARN SgrS. L'accumulation de glucose-phosphate dans la cellule crée un stress métabolique. En réponse à ce stress, la protéine SgrR est activée et induit la synthèse de SgrS. SgrS va interagir avec l'ARNm *ptsG* et va promouvoir sa dégradation par la RNase E. Le glucose n'est alors plus importé dans la cellule. SgrS a besoin que l'ARNm *ptsG* soit au niveau de la membrane plasmique pour agir (flèches pleines). Dans le cytoplasme, l'interaction entre les deux ARN se fait mal (flèche en pointillés).

La particularité de ce système est que la région de l'ARNm impliquée dans le contrôle contient non seulement le site de fixation de SgrS mais aussi une partie de la région codant pour le domaine transmembranaire de la protéine PtsG (Kawamoto et al., 2005). Ainsi, il semblerait que pour qu'il y ait un contrôle efficace, l'ARNm doit être traduit au moins une fois et soit localisé au niveau de la membrane plasmique. L'ARN SgrS est en compétition avec le ribosome pour se fixer à l'ARNm, et dans le cytoplasme, la compétition est en faveur du ribosome. SgrS exerce alors un contrôle faible sur sa cible. Au niveau de la membrane plasmique, SgrS est capable d'inhiber la traduction de sa cible de manière plus efficace, puisque dans ce cas, la fixation d'un autre ribosome sur l'ARNm est ralentie en raison de la localisation du complexe (Vanderpool et Gottesman, 2005). Ceci a été démontré de manière

remarquable en utilisant un ARNm portant un site de fixation du ribosome faible. Dans ce cas, la régulation par SgrS peut s'effectuer de manière efficace dans le cytoplasme et ne nécessite pas de localisation particulière (Kawamoto et al., 2005). Un aspect crucial soulevé par ce système est la compétition avec d'autres facteurs cellulaires, notamment le ribosome, pour la fixation des ARNnc à leur cible et donc leur cinétique d'action.

A.2.4. IstR, un ARN régulateur impliqué dans la réponse SOS

L'ARN IstR-1 est codé chez *E. coli* par l'opéron *tisAB* qui est sous le contrôle de la réponse SOS. L'ARNm *tisAB* produit une toxine qui inhibe la croissance cellulaire. En conditions normales de croissance, l'expression de la toxine est inhibée au niveau transcriptionnel par la protéine LexA. La faible quantité d'ARNm qui subsiste est la cible de l'ARN IstR-1, qui est exprimée de manière constitutive dans les conditions normales de croissance. L'ARN IstR-1 est donc une anti-toxine.

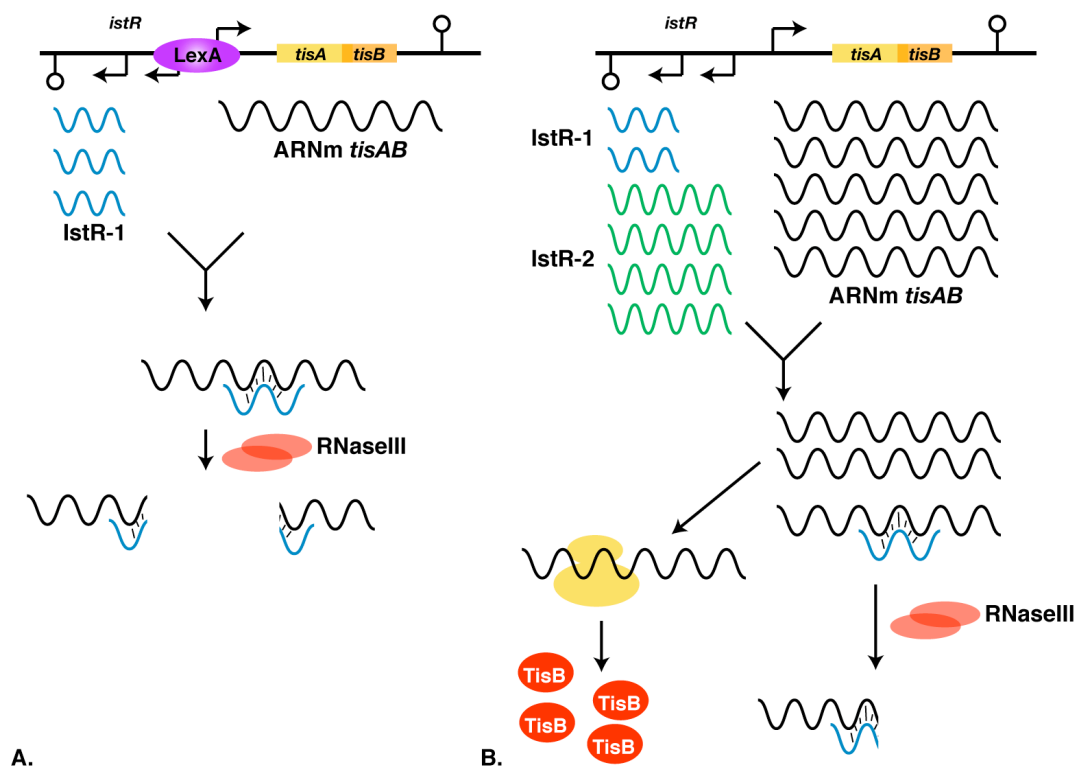


Figure 7 : Mode d'action de l'ARN IstR-1. En conditions normales de croissance, l'expression des gènes *tisAB* est réprimée par la protéine LexA au niveau transcriptionnel. Le peu d'ARNm produit est de plus la cible de l'ARN IstR-1. En cas de réponse SOS, la répression est levée et il y a une synthèse importante de l'ARNm *tisAB*. L'ARN IstR-1 n'est plus en quantité suffisante pour permettre le contrôle et il y a synthèse de la toxine TisA, qui induit la lyse cellulaire. Le rôle de l'ARN IstR-2 est inconnu. (D'après Vogel et al., 2004).

L'hybride formé IstR-1-ARNm *tisAB* est ensuite reconnu et coupé par la RNase III. En cas de réponse SOS, suite à des dommages au niveau de l'ADN, la répression médiée par LexA est levée ce qui entraîne une synthèse importante de l'ARNm *tisAB*. Une partie des ARNm *tisAB* échappe à l'ARN IstR-1, induisant la synthèse des toxines TisA et TisB. Ces dernières vont bloquer la croissance cellulaire et ainsi permettre à la bactérie de réparer les dommages subis au niveau de l'ADN. Un autre ARN régulateur a été identifié dans ce locus, mais son rôle reste encore peu défini (Vogel et al., 2004).

Récemment, un autre ARN impliqué dans un mécanisme de type toxine-antitoxine a été identifié chez *B. subtilis*. De manière intéressante, il va cibler la région 3' non traduite de l'ARNm pour induire sa dégradation (Silvaggi et al., 2005).

A.2.5. *GadY*, un ARN régulateur chromosomique strictement complémentaire à sa cible

L'ARN *GadY* a été identifié au cours d'une recherche par bioinformatique de nouveaux ARN régulateurs chez *E. coli* (Chen et al., 2002). Le gène codant pour cet ARN est localisé en orientation inverse entre les gènes *gadX* et *gadW*, qui permettent la synthèse de facteurs de transcription impliqués dans la réponse au stress acide (Ma et al., 2002).

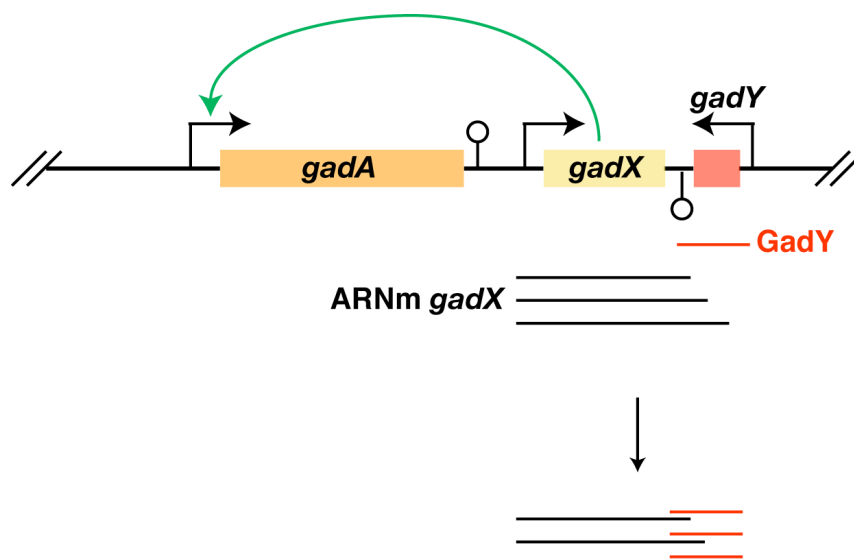


Figure 8 : Mode d'action de l'ARN *GadY*. L'ARN *GadY*, dont une seule forme est représentée sur ce schéma, va induire une stabilisation de l'ARNm *gadX* en interagissant avec son extrémité 3' non traduite. Le duplex formé varie de 30 à 67 paires de bases. Le gène *gadX* est nécessaire pour induire l'expression de la protéine *GadA*, qui est impliquée dans les mécanismes de réponse au stress acide.

L'expression de GadY est induite durant la phase stationnaire de croissance et permet la synthèse d'un transcrit qui sera par la suite mûri pour générer trois transcrits ayant des extrémités 5' différentes. Une surexpression des trois formes de GadY induit une augmentation de la quantité d'ARNm correspondant au gène *gadX*. En revanche, une inhibition de l'expression de GadY entraîne une réduction de la quantité d'ARNm *gadX*. GadY est donc requis pour la stabilisation de l'ARNm *gadX*.

La caractérisation de l'ARNm *gadX* montre que ce dernier ne possède pas de réel terminateur de la transcription, il possède donc des extrémités 3' hétérogènes. Comme les ARN *gadX* et GadY sont transcrits en orientation inverse, il est possible d'avoir une région de complémentarité entre les deux ARN. Il a pu être montré que cette complémentarité existe et qu'elle est comprise entre 30 et 67 nucléotides. De plus, elle est nécessaire pour l'activité de GadY. Durant la phase stationnaire de croissance, les deux ARN pourraient s'apparier, ce qui entraînerait la stabilisation de l'ARNm *gadX*. Cette stabilisation permettrait ensuite l'activation de la synthèse des protéines impliquées dans la réponse au stress acide. Finalement, la protéine Hfq est nécessaire pour l'activité de GadY, en le protégeant contre l'action des RNases (Opdyke et al., 2004).

Cet exemple est particulièrement intéressant car c'est le premier cas où un ARN antisens va cibler la région 3' d'un ARNm pour induire sa stabilisation. Les auteurs de cette étude proposent que le duplex formé entre les deux ARN protège l'ARNm contre l'action des ribonucléases, ce qui expliquerait l'effet stabilisateur de GadY. La formation d'un tel duplex pourrait effectivement protéger l'ARNm de l'action de RNases comme la RNase II ou la PNPase, qui ont besoin d'une extrémité 3' libre pour agir. Il faut cependant noter la présence de la RNase III chez *E. coli*, qui est spécifique des régions double-brins dans les ARN. Le duplex formé entre les deux ARN serait une cible de choix pour cette enzyme. Pour expliquer la stabilisation de l'ARNm, on peut envisager différentes hypothèses. (1) Le duplex formé est résistant à l'action de la RNase III à cause de la formation d'une structure particulière entre les deux ARN, comme cela a été décrit pour les ARN antisens plasmidiques, ou la parfaite complémentarité de séquence entre l'ARN antisens et sa cible n'entraîne pas la formation d'un duplex étendu mais plutôt la formation de structures complexes. (2) Le duplex formé est une cible pour la RNase III, et la coupure qui est générée induit la stabilisation de l'ARNm. Pour déterminer le mode d'action de GadY, il sera donc intéressant de déterminer la nature du complexe formé entre GadY et sa cible, et de déterminer le rôle joué par une enzyme telle que la RNase III.

D'autres ARNnc ciblant la région 3' non traduite des ARNm ont été identifiés, notamment chez *B. subtilis* (Silvaggi et al., 2005) et *S. aureus* (Pichon et Felden, 2005) et, dans ces cas, l'interaction entre les deux ARN conduit à la dégradation de l'ARNm. Les mécanismes mis en jeu sont encore inconnus.

B. ARNnc piégeant une protéine

Plusieurs ARNnc fixant une protéine pour en moduler son activité sont connus, et ils sont regroupés dans le tableau 6. L'exemple du système CsrA/CsrB sera détaillé dans la suite du manuscrit (introduction, chapitre III).

ARN régulateur	Cible	Fonction contrôlée	Mode de contrôle	Référence
ARN 6S	ARN polymérase	transcription	mimétisme d'un promoteur/inhibition transcription	(Wassarman et Storz, 2000)
CsrB/CsrC	protéine CsrA	stabilité d'ARNm	séquestration de la protéine	(Liu et al., 1997; Weilbacher et al., 2003)
RsmB/RsmY/RsmZ	protéine RsmA	stabilité d'ARNm	séquestration de la protéine	(Burrowes et al., 2005; Heeb et al., 2002; Valverde et al., 2003)

Tableau 6 : *ARN régulateurs séquestrant un facteur protéique.*

L'ARN 6S a été identifié il y a plus de trente ans chez *E. coli* (Brownlee, 1971), mais sa fonction n'a été découverte que récemment. C'est un ARN induit en phase stationnaire de croissance qui régule de manière globale l'expression de nombreux gènes. De plus, il est impliqué dans la survie des bactéries lors de la phase stationnaire (Trotochaud et Wassarman, 2004). L'ARN 6S est capable de se fixer au facteur σ^{70} (Wassarman et Storz, 2000), ce qui entraîne une spécialisation de la transcription, en inhibant l'expression des gènes dépendants du facteur σ^{70} , ce qui est le cas de la majorité des gènes exprimés en phase exponentielle de croissance. Cette fixation favorise indirectement la transcription des gènes dépendants du facteur σ^{32} . La séquence et la structure de l'ARN 6S sont très conservées chez les bactéries (Barrick et al., 2005; Trotochaud et Wassarman, 2005). Cette structure présente la particularité de ressembler à un promoteur ouvert lors de l'initiation de la transcription (figure 9). Ainsi, l'ARN 6S piégerait l'ARN polymérase associée au facteur σ^{70} en mimant structurellement un promoteur. Ce type de mécanisme de régulation par mimétisme moléculaire est fortement utilisé par les bactéries, ou de nombreuses protéines qui fixent un ARN vont réguler leur propre synthèse en reconnaissant une région de leur ARNm qui mime leur substrat naturel (Romby et Springer, 2003).

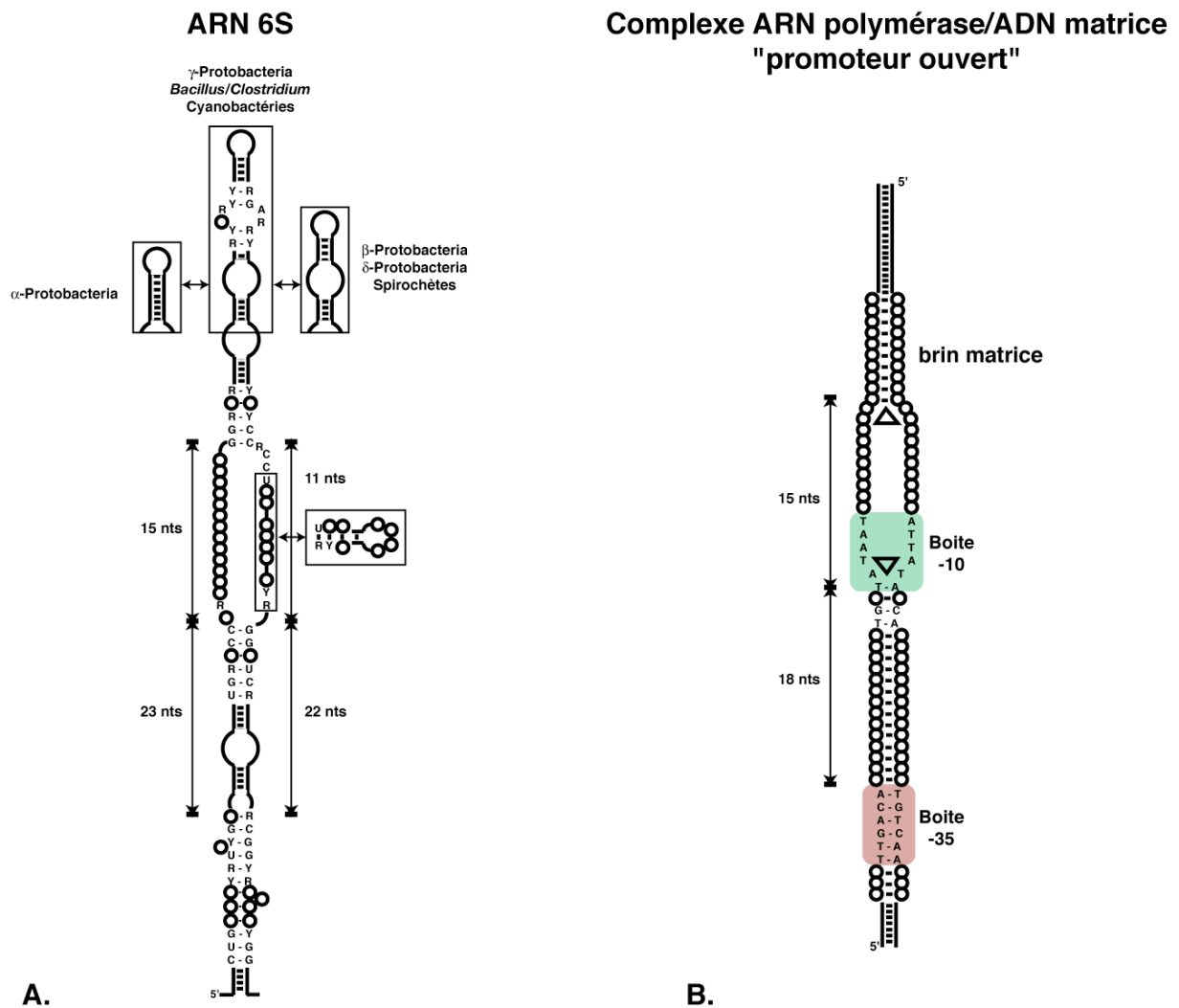


Figure 9 : Structure secondaire de l'ARN 6S et d'un promoteur « ouvert » en cours de transcription. Le modèle de structure secondaire de l'ARN 6S (A) est comparé à la structure secondaire d'un promoteur ouvert au démarrage de la transcription proposée dans la littérature (Murakami et al., 2002) (B). Les motifs de structure secondaire représentent les différences qui existent entre différentes lignées de bactéries. Les cercles représentent les nucléotides dont l'identité est conservée à plus de 60%. R : purine ; Y : pyrimidine. (D'après Barrick et al., 2005).

C. « Riboswitch » et ARNm senseur

Les « riboswitch » sont des éléments structuraux présents dans les régions 5' non traduites des ARNm qui régulent l'expression des gènes qui les portent (Mandal et Breaker, 2004b; Nudler et Mironov, 2004; Tucker et Breaker, 2005; Vitreschak et al., 2004). Ces régions régulatrices sont reconnues par de petits métabolites et ne nécessitent pas l'intervention de co-facteurs protéiques ou d'ARNnc. Ces « riboswitch » comportent deux parties : un domaine aptamère qui est le site de reconnaissance spécifique du métabolite, et un domaine régulateur qui subit le changement de conformation lors de la fixation du métabolite. Ces éléments ont été retrouvés principalement chez les bactéries, dans lesquelles les métabolites impliqués, comme la guanine, l'adénine, la flavine mononucléotide, la lysine, ou la S-adénosyl-méthionine régulent l'expression d'enzymes du métabolisme cellulaire impliquées dans leur biosynthèse (tableau 7).

Métabolite	ARN senseur	Mode d'action	Gène cible	organismes	Références
FMN	<i>rfn</i> -box	terminaison de la transcription/initiation de la traduction	synthèse et transport vitamine B2	bactéries Gram(+)/Gram(-)	(Mironov et al., 2002; Vitreschak et al., 2002; Winkler et al., 2002a)
TPP	<i>thi</i> -box	terminaison de la transcription/initiation de la traduction	synthèse et transport vitamine B1	bactéries Gram(+)/Gram(-), archae, champignons et plantes	(Miranda-Rios et al., 2001; Mironov et al., 2002; Rodionov et al., 2002; Winkler et al., 2002b)
Ado-Cbl	B12-box	terminaison de la transcription/initiation de la traduction	synthèse et transport vitamine B12	bactéries Gram(+)/Gram(-)	(Nahvi et al., 2004; Nou et Kadner, 2000)
SAM	S-box	terminaison de la transcription	métabolisme du soufre	bactéries Gram(+)	(Epshtein et al., 2003; McDaniel et al., 2003; Winkler et al., 2003)
Lysine	L-box	terminaison de la transcription	<i>lysC</i>	bactéries Gram(+)/Gram(-)	(Kochhar et Paulus, 1996; Mandal et al., 2003; Patte et al., 1998)
Guanine, HX	G-box	terminaison de la transcription	métabolisme et transport des purines	bactéries Gram(+)	(Mandal et al., 2003)
Adénine	<i>ydhL</i>	anti-terminaison de la transcription	métabolisme et transport des purines	bactéries Gram(+)	(Johansen et al., 2003; Mandal et Breaker, 2004a)
Glycine	<i>gvcT</i>	anti-terminaison de la transcription	métabolisme de la glycine	bactéries Gram(+)	(Mandal et Breaker, 2004b)
GlcN6P	<i>glmS</i>	ribozyme	synthèse de la glucosamine-6-phosphate	bactéries Gram(+)	(Barrick et al., 2004; Winkler et al., 2004)

Tableau 7 : Liste non exhaustive de « riboswitch » identifiés. FMN : flavine mononucléotide ; TPP : thiamine pyrophosphatase ; Ado-Cbl : adénosyl cobalamine ; SAM : S-adénosyl méthionine ; HX : hypoxanthine ; GlcN6P : glucosamine 6 phosphate.

Ces autorégulations induisent une modulation rapide d'une voie métabolique spécifique en fonction des besoins de la cellule. Des « riboswitch » ont également été identifiés chez les eucaryotes. Ainsi, chez les plantes, certains de ces éléments sont placés au niveau des introns et joueraient un rôle dans l'épissage du pré-ARNm (Kubodera et al., 2003; Sudarsan et al., 2003).

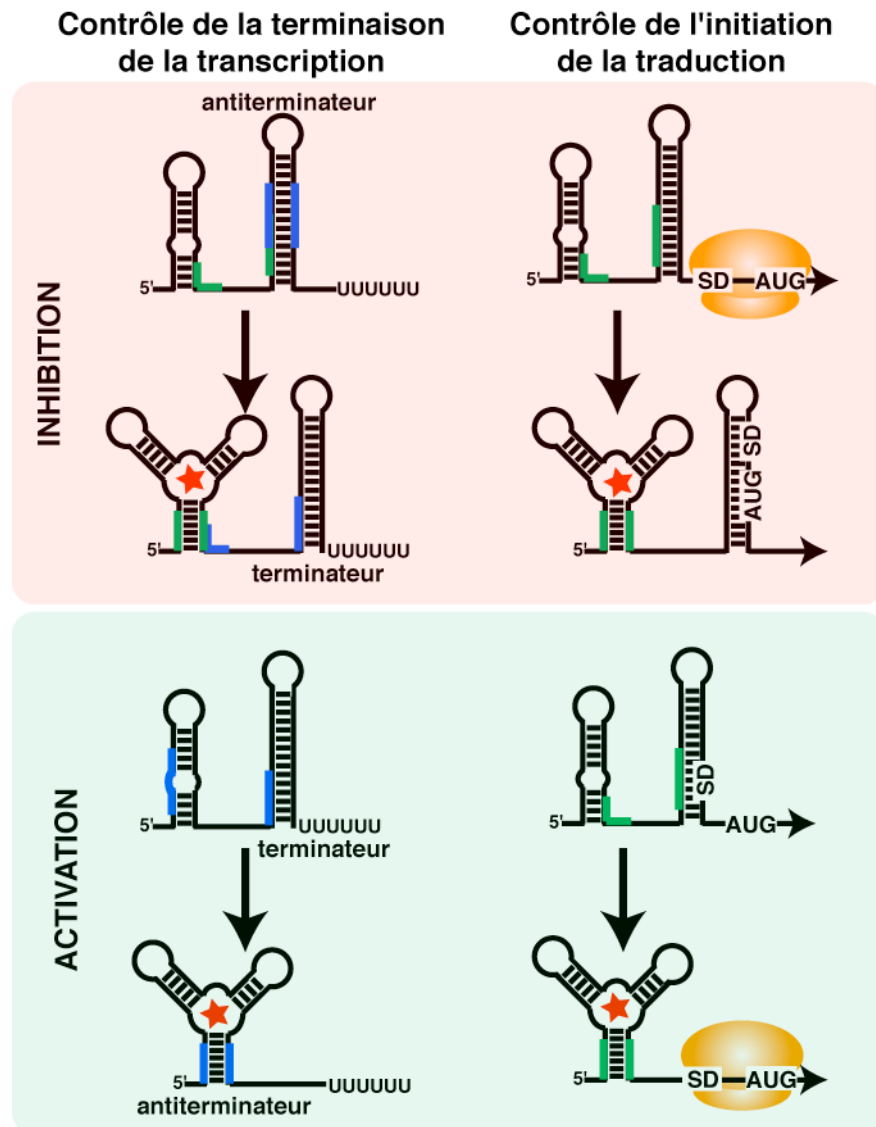


Figure 10 : Contrôle de l'expression des gènes par les « riboswitch ». Le métabolite est représenté par une étoile rouge. Sa fixation va stabiliser la structure du « riboswitch », ce qui va activer ou inhiber l'expression du gène cible. Ce contrôle peut s'exercer au niveau transcriptionnel, en modulant la formation de structures terminatrices, ou au niveau traductionnel, en séquestrant ou en libérant le site d'initiation de la traduction.

La plupart des ARNm contenant ces éléments de régulation adoptent des structures alternatives. La fixation du métabolite au niveau du « riboswitch » déplace l'équilibre pour stabiliser une des deux conformations de l'ARNm. Ce changement induit soit une activation, soit une inhibition de la transcription ou de la traduction (figure 10). Notons que généralement

les « riboswitch » dans les bactéries Gram négatives agissent au niveau de la traduction alors qu'ils agissent au niveau transcriptionnel dans les bactéries Gram positives. Récemment, un « riboswitch » ayant une activité de ribozyme a été identifié dans lequel la fixation du ligand entraîne une coupure autocatalytique de l'ARNm en amont du site de fixation du ligand. Cette coupure entraîne une inhibition de l'expression du gène par un mécanisme encore inconnu (Winkler et al., 2004).

La structure des « riboswitch » liant l'adénine ou la guanine ont été récemment résolues par cristallographie (Batey et al., 2004; Serganov et al., 2004) et par RMN (Noeske et al., 2005). Les bases conservées de la région de fixation du nucléotide établissent des appariements canoniques qui forment des bases triples, ce qui génère une poche de fixation pour le ligand. La reconnaissance spécifique de l'adénine ou de la guanine est achevée par une interaction de type Watson-Crick impliquant une uridine ou une cytosine, respectivement (figure 11, E-G). Les constantes d'affinités du métabolite pour son site ne peuvent cependant pas expliquer comment la fixation du métabolite est suffisante par elle-même pour le contrôle, et la cinétique de formation du riboswitch doit être l'étape limitante du contrôle (Wickiser et al., 2005a). Ainsi, il a été montré que la transcription de l'ARNm doit être ralentie pour permettre l'action du métabolite sur la cinétique du repliement de la région régulatrice. Alors que les protéines ne participent pas directement à la fixation du métabolite à sa cible, le facteur de transcription NusA pourrait intervenir lors de la transcription en ralentissant l'ARN polymérase (Wickiser et al., 2005b).

Certains ARNm sont capables de ressentir directement un signal extérieur. Ainsi l'ARNm *rpoH* d'*E. coli* est caractérisé par une structure secondaire qui séquestre le site de reconnaissance du ribosome. Lors d'une augmentation de la température, cette structure est déstabilisée et induit l'initiation de la traduction (Morita et al., 1999a; Morita et al., 1999b). La protéine RpoH, qui est en fait le facteur σ^{32} , permettra l'expression des gènes impliqués dans la réponse au stress induit par la chaleur. Un autre ARN thermosenseur a été identifié chez *L. monocytogenes*, ou il va réguler l'expression des gènes de virulence chez cette bactérie (Johansson et al., 2002). Ce mécanisme est détaillé dans la suite du manuscrit (introduction, chapitre III).

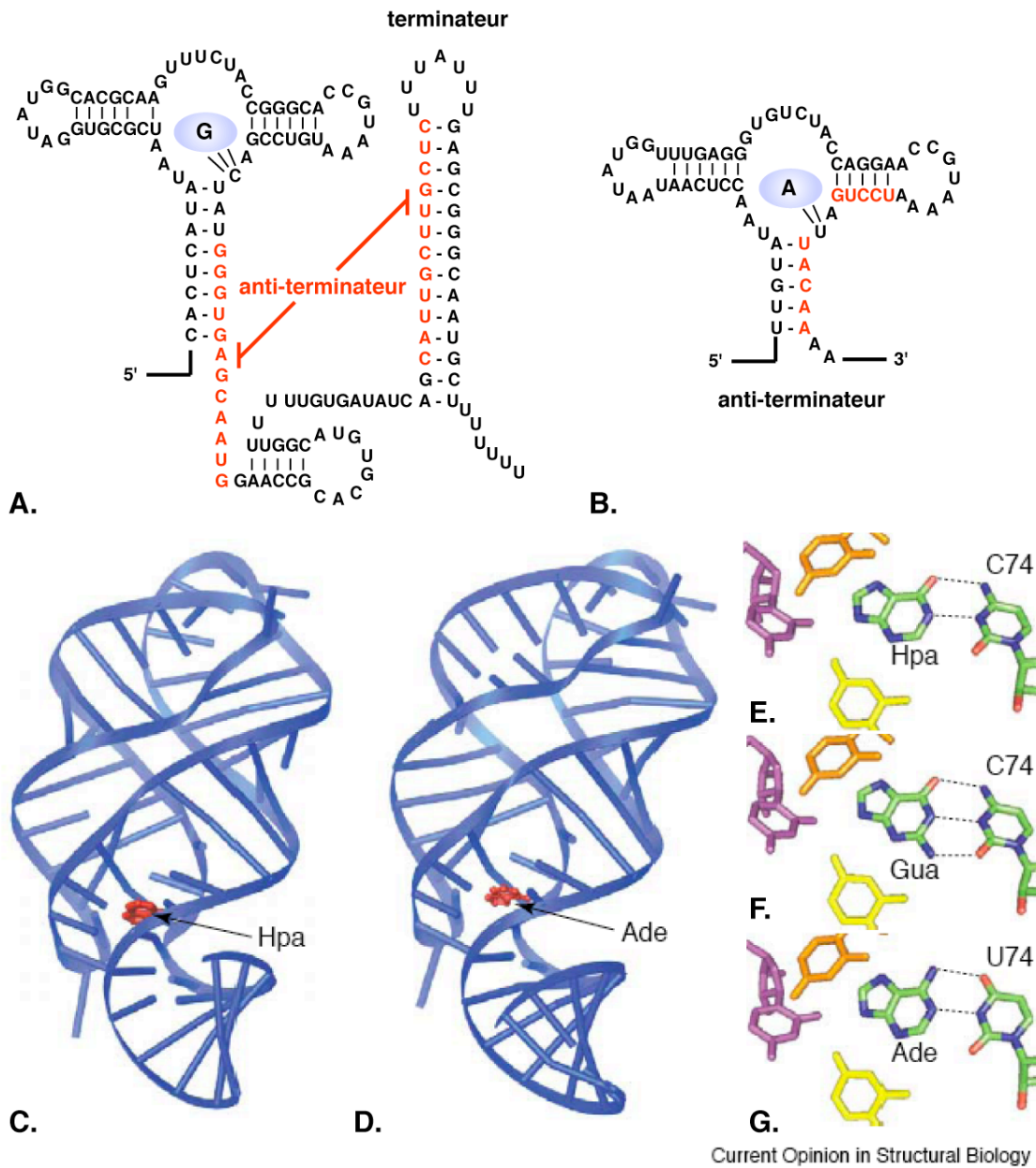


Figure 11 : Structures secondaires et cristallographiques des « riboswitch » à purines. Structures secondaires des « riboswitch » fixant la guanine (A) et l'adénine (B). Malgré une forte ressemblance dans leur structure secondaire et leurs séquences, ces deux « riboswitch » vont avoir des effets très différents sur l'expression de leur gène cible. La fixation de la guanine, ou de l'hypoxanthine, va permettre la formation d'un terminateur de la transcription. En absence de guanine, il y a formation d'une structure anti-terminatrice entre les nucléotides représentés en rouge (A). En revanche, la fixation de l'adénine va permettre la formation d'une structure anti-terminatrice, ce qui va activer l'expression du gène cible. En absence d'adénine, il y a formation d'une structure terminatrice qui comprend les nucléotides représentés en rouge (B). Les structures cristallographiques de ces deux « riboswitch » ont été obtenues en présence de leurs ligands et leur topologie générale est très similaire (C, D). Dans les deux cas, le ligand va se fixer dans une poche adaptée et la spécificité de liaison provient de l'établissement de contacts Watson-Crick entre le ligand et le nucléotide en position 74 du « riboswitch ». (E, F et G). (D'après Mandal et al., 2004).

III. ARN régulateurs et virulence (revue n°1)

Parmi les différents ARN régulateurs, un certain nombre sont les effecteurs principaux de la régulation de l'expression des gènes de virulence chez des bactéries pathogènes, comme *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium perfringens* ou *Listeria monocytogenes*. Les mécanismes mis en jeu sont très variés et recouvrent tous les aspects précédemment décrits. L'expression du pouvoir pathogène est un des moyens de la bactérie de s'adapter à ses environnements diversifiés, de combattre les défenses de l'hôte et d'acquérir des nutriments. La synthèse de ces ARN régulateurs est souvent couplée à des mécanismes de transduction de signaux impliquant des systèmes à deux composants. L'objet de la revue illustre la diversité des mécanismes de régulation dépendant de l'ARN dans diverses bactéries pathogènes.

HEP (2006) 173:9–43
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2006

Regulatory RNAs as Mediators of Virulence Gene Expression in Bacteria

T. Geissmann · M. Possedko · E. Huntzinger · P. Fechter · C. Ehresmann (✉) · P. Romby (✉)

UPR 9002 CNRS, Université Louis Pasteur, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire,
15 rue R. Descartes, 67084 Strasbourg cedex, France
Chantal.Ehresmann@ibmc.u-strasbg.fr
p.romby@ibmc.u-strasbg.fr

1	Introduction	10
2	<i>cis</i> -mRNA Elements as Mediators of Virulence	11
3	<i>trans</i> -Acting RNAs as Mediators of Virulence	14
3.1	Regulatory Antisense RNAs	15
3.1.1	sRNAs and Iron Metabolism	15
3.1.2	sRNAs and Virulence in <i>V. cholerae</i>	21
3.2	Modulation of Protein Activity by Regulatory RNAs	22
3.2.1	The <i>E. coli</i> CsrA/CsrB System	22
3.2.2	Homologous Systems in Bacterial Pathogens	23
3.3	Multifunctional RNAs	23
3.3.1	The Case of <i>S. aureus</i> RNAIII	23
3.3.2	Other Regulatory RNAs	26
3.4	Other Types of RNAs Influencing Pathogenicity	26
3.4.1	The Case of tRNA Modifications	26
3.4.2	The Case of tmRNA	27
3.4.3	Location of Pathogenicity Islands	27
4	A Link Between Regulatory RNAs and Signal Transduction	28
4.1	RNAs as Effectors of Quorum-Sensing Systems	28
4.2	Other Systems	30
5	Concluding Remarks	31
5.1	RNAs Regulate Directly or Indirectly Multiple Genes	31
5.2	A Direct Coupling Between the Structure and the Regulatory Activity?	32
5.3	Stable or Unstable RNAs in Cells?	33
5.4	Some Regulatory RNAs Required <i>trans</i> -Acting Proteins	34
5.5	Functional Redundancies and How to Find Them?	35
	References	35

Abstract Bacteria exploit functional diversity of RNAs in a wide range of regulatory mechanisms to control gene expression. In last few years, small RNA molecules have been discovered at a staggering rate in bacteria, mainly in *Escherichia coli*. While functions of

many of these RNA molecules are still not known, several of them behave as key effectors of adaptive responses, such as environmental cue recognition, stress response, and virulence control. Most fascinating, perhaps, is the discovery that mRNAs behave as direct sensors of small molecules or of environmental cues. The astonishing diversity of RNA-dependent regulatory mechanisms is linked to the dynamic properties and versatility of the RNA structure. In this review, we relate several recent studies in different bacterial pathogens that illustrate the diverse roles of RNA to control virulence gene expression.

Keywords Prokaryotes · Virulence · Regulation · Regulatory RNAs · Riboswitch

1

Introduction

Bacteria inhabit a variety of ecological niches and meet continuous environmental challenges. As highly adaptable organisms, they have evolved a plethora of sensory systems in order to express the appropriate genes in response to a given environment and to preserve energy. This is in particular the case with many bacterial pathogens, which turn on virulence genes in response to the host signals and to evade the host defense system. These accessory factors are usually subject to tight and coordinated regulation. A diverse array of extracellular signals that modulate virulence gene expression has been identified in vitro. Many of these signals are ubiquitous and involve physical or chemical cues. In other cases, bacteria have evolved to recognize specific metabolic products generated by their respective hosts. Furthermore, diffusible signals can also be produced by the bacteria through the ability to measure cell density.

Recent advances in molecular microbiology have also enabled comprehensive genetic screening for gene products required for full virulence (Mecsas 2002). As an example, *Staphylococcus aureus* virulence is determined by cell wall-associated proteins and secreted toxins (Novick 2003). More recent studies have identified a broad range of additional genes that are essential to maintain bacterial survival within the host (Benton et al. 2004). These factors include signal transduction systems, as well as enzymes involved in the biosynthesis of metabolites, and *trans*-membrane transporters. Thus, virulence expression is directly coupled to an adaptation of the bacteria to their different niches and environmental stimuli. In many cases, this is directed by signaling using regulatory mechanisms similar to those of the control genes that are not specific to pathogenesis. One of the most encountered families of virulence regulatory proteins is the two-component system of signal transducers. These complexes respond to the signals through usually regulated phosphotransfer reactions. Although there are many variations on bacterial two-component regulatory systems, they constantly sense an external environment and transmit this information to a bacterial interior.

Recently, it has been shown that RNAs are key players in stress-response and pathogenesis processes, which brings an additional level of complexity to the

cell physiology. In these last few years, more than 50 small non-coding RNAs have been experimentally discovered in *Escherichia coli*, representing 1%–2% of the number of protein-coding genes (Wagner and Vogel 2003; Gottesman 2004; Storz et al. 2004). Even though the assigned functions of many of these RNAs remain to be identified, some of them are involved in regulatory networks, which are required for appropriate response to environmental and stress condition changes (Wagner and Vogel 2003). The most prevalent class involves small RNAs (or sRNAs), which target specific mRNA through base pairings. Regulatory activity of these sRNAs requires the RNA chaperone protein Hfq (Brescia and Sledjeski 2003). Recent observations point to the role of RNAs in the establishment of virulence in several bacterial pathogens, such as *Erwinia carotovora*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, and *Streptococcus pyogenes* (Johansson and Cossart 2003). Most of these regulatory RNAs are *trans*-acting RNAs. Others are messenger (mRNAs) that carry *cis*-acting regulatory elements (“riboswitches”), which respond to environmental cues or to metabolite concentration. These RNAs activate or inhibit virulence gene expression at the transcriptional or post-transcriptional levels using a diversity of mechanisms (i.e., antisense RNA, sequestration of regulatory proteins, riboswitches, Fig. 1). Precise knowledge of these regulatory mechanisms and how they control virulence factor expression would open up new perspectives for antimicrobial chemotherapy.

This review focuses on new features that emerged recently on the pathogenesis-related RNAs. A particular emphasis is given to the links existing between the structure and the functional activity of these regulatory RNAs, and the regulatory networks in which they are involved. A number of recent reviews have also covered various aspects of the regulatory RNAs, mainly in non-pathogenic bacteria (Wagner and Vogel 2003; Gottesman 2004; Storz et al. 2004).

2 *cis*-mRNA Elements as Mediators of Virulence

The increase of temperature is one of the problems pathogens have to face when infecting warm-blooded hosts. Temperature sensing is often acquired by proteins or DNA (Hurme and Rhen 1998). However, there are now accumulating data suggesting that an mRNA secondary structure can also act as a thermosensor (Table 1; Narberhaus 2002). The first evidence for temperature-mediated gene regulation via alternative mRNA structures was first provided by Altuvia et al. (1989) in the lytic pathway of phage λ . Since then, the cellular level of several chaperones and heat-shock or cold-shock proteins, which is tightly controlled at both transcriptional and post-transcriptional levels, was shown to be also regulated by self-induced conformational changes in their mRNAs (Table 1; Narberhaus 2002). A good example of translational thermoregulation

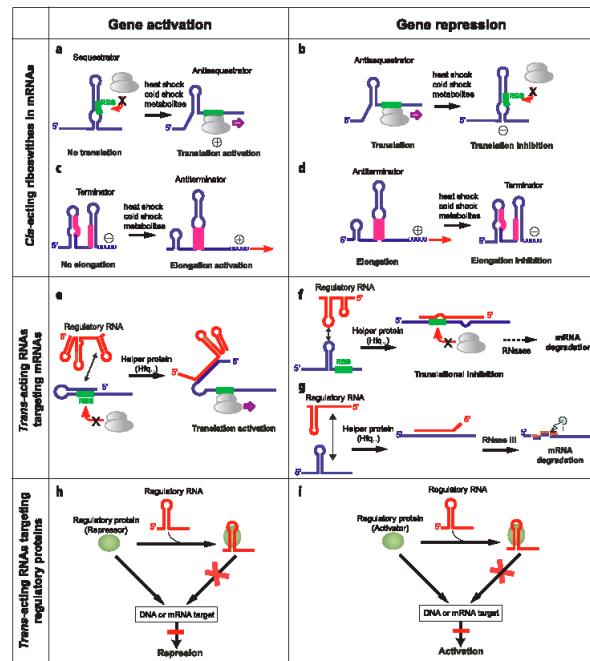


Fig. 1a-i Different RNA-mediated mechanisms used in virulence gene regulation. *Trans*-acting regulatory RNAs are shown by *red lines* and mRNAs by *blue lines*, with their polarity indicated. Hypothetical secondary structures are schematized by *stem-loops*. Complementary sequences forming alternative pairing in mRNAs are shown in *magenta*. The ribosome-binding site (RBS) is in *green*, the ribosome in *pale gray*, and regulatory proteins in *pale green*. The regulation mechanisms can be ranged into three classes, depending of the nature of the regulatory RNAs. (1) *cis*-Acting elements in mRNAs building riboswitches. The riboswitch can adopt alternative structures, depending on changes in temperature or metabolite concentration. These conformational switches can modulate the accessibility of the RBS (a, b) or formation of a transcriptional terminator or antiterminator (c, d), thus regulating translational initiation or transcription termination, respectively. (2) *trans*-Acting RNAs directly targeting mRNAs. These RNAs have variable lengths and display more or less extended regions of complementarity with their mRNA targets. Annealing with the complementary mRNA sequence can unmask the RBS, thus activating translational initiation (e). Annealing can also occlude the RBS, thus inhibiting translation (f), resulting in the degradation of the untranslated mRNA. The interaction with the antisense RNA can also unmask or induce a site for RNase III, generally leading to the degradation of both mRNA and regulatory RNA (g). The interaction between antisense RNAs and their mRNA targets are most often facilitated by helper proteins, such as Hfq. (3) *trans*-Acting RNAs targeting regulatory proteins. These RNAs trap a regulatory protein, the binding of which to DNA or mRNA represses or activates transcription or translation. The regulatory RNA indirectly acts as an activator or repressor of gene expression, by sequestering the regulatory protein (e, f)

Table 1 Examples of *cis*-mRNA elements acting as thermosensors. Temperature shift induces conformational changes of mRNA leader regions, which affect initiation of translation

Signal	Bacterial species	Regulated gene(s)	Function	Reference(s)
Heat	<i>Escherichia coli</i>	<i>λCIII</i>	Regulation of lysogeny	Altuvia et al. 1989
	<i>Escherichia coli</i>	<i>rpoH</i>	σ-Factor	Morita et al. 1999a,b
	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	α-Heat shock genes	Chaperone	Nocker et al. 2001
	<i>Caulobacter crescentus</i>	<i>dnaK</i>	Chaperone	Avedissian et al. 1995
	<i>Haemophilus ducreyi</i>	<i>dnaJ</i>	Chaperone	Parsons et al. 1999
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>prfA</i>	Virulence gene activator	Johansson et al. 2002
	<i>Streptomyces albus</i>	<i>hsp18</i>	Chaperone	Servant and Mazodier 2001
	<i>Yersinia pestis</i>	<i>lcrF</i>	Virulence gene activator	Hoe and Goguen 1993
Cold	<i>Escherichia coli</i>	<i>cspA</i>	RNA chaperone	Yamanaka et al. 1999

is illustrated by the *E. coli* heat shock σ-factor RpoH. At low temperature, the *rpoH* mRNA is translationally inactive and not abundant. Induction of the heat shock response also includes its translational activation. Thermoregulation relies on two *cis*-acting mRNA segments that can form alternative structures depending on temperature (Kamath-Loeb and Gross 1991; Nagai et al. 1991). There is a clear correlation between the stability of the mRNA structure and *rpoH* expression, indicating that the binding of 30S subunits can only occur at high temperature, when the structure is destabilized (Morita et al. 1999a,b).

Remarkably, pathogens can exploit mRNA thermosensors to detect that they entered the body of warm-blooded host, thus allowing transmission of a signal to turn on virulence functions (Hurme and Rhen 1998). Such a mechanism was first suggested in *Yersinia pestis*, in which *lcrF*, encoding the transcriptional activator involved in virulence gene regulation, is transcribed at equal rates at 26 °C and 37 °C, while the synthesis of LcrF is thermally controlled (Hoe et al. 1992). A thermally sensitive post-transcriptional mechanism is directly exerted on mRNA (Hoe and Goguen 1993). A model was proposed in which an mRNA secondary structure element sequestering the Shine-Dalgarno sequence (SD) is melted at high temperature, allowing translation to proceed (Fig. 1a).

That model was recently strongly supported by the thermoregulated expression of the pleiotropic transcriptional regulator PrfA in *L. monocytogenes*, which activates the synthesis of several virulence proteins. At temperature below 30°C, the low expression of virulence genes coincides with the absence of

PrfA protein, although the PrfA gene is still transcribed (Renzoni et al. 1997). It was shown that the stability of PrfA was unaffected by low and high temperature, while its expression was thermoregulated at the translational level in *L. monocytogenes* (Johansson et al. 2002). The proposed mechanism involves a self-induced structural switch at the 5' leader region of the *prfA* mRNA, promoted by temperature changes. At low temperature, the ribosome binding site is sequestered into a secondary structure that hinders ribosome binding. An absence of translation might in turn favor degradation of *prfA* mRNA. Upon increasing temperature (i.e., in a host organism), the structure is destabilized, rendering accessible the ribosome loading site, thus triggering translation initiation (Fig. 1a). This mechanism is sustained by chemical base probing data and mutational analyses (Johansson et al. 2002). Indeed, base substitutions expected to weaken the stability of the putative RNA structure lead to constitutive expression of PrfA, even at a low temperature. Conversely, mutations designed to reinforce base-pairing of the SD sequence lower PrfA synthesis. Moreover, the *prfA* regulatory region can control the expression of the green fluorescence protein when fused upstream of the *gfp* mRNA in *E. coli* (Johansson et al. 2002). Taken together, those experiments indicate that the *prfA*-5' untranslated region (UTR) acts as a thermosensor to regulate translation efficiency. Although regulation appears to rely on the intrinsic property of the mRNA to adopt dynamic alternative conformations, a possible involvement of any general *trans*-acting factors (such as Hfq protein) remains an open question.

Remarkably, there is increasing evidence that mRNAs can also sense physiological signals other than temperature. The unique feature of these systems, also called "riboswitches," is that they can sense directly small metabolites, such as vitamins, amino-acids, or purine precursors (Narberhaus 2002; Barrick et al. 2004; Vitreschak et al. 2004). Riboswitches are generally found in the leader part of bacterial operons to control either transcription or translation by forming alternative structures, which can induce or prevent the formation of intrinsic terminators or ribosome binding sites (Fig. 1a–d). They exploit an astonishing dynamic property of RNA structure and provide economical as well as fast-reacting solutions, allowing adaptation to environmental cues. Their utilization most likely extends much beyond the currently known examples. This is a reasonable assumption, since these metabolic functions were recently shown to be required for full virulence of *S. aureus*. Also, they are important in permitting the bacteria to survive and replicate in distinct *in vivo* environments (Benton et al. 2004).

3 *trans*-Acting RNAs as Mediators of Virulence

A subset of *trans*-acting RNAs has been characterized as mediator of virulence gene expression (Johansson and Cossart 2003). Due to the nature of RNA,

a prevalent group includes the regulatory RNAs, which act by base-pairings with target mRNAs. Several of them target multiple mRNAs, or regulate the expression of mRNA encoding global transcriptional regulatory proteins that in turn control many genes. (This paper does not tackle antisense RNAs that control essential functions in plasmids, phages, and transposons, see reviews Wagner and Simons 1994; Wagner et al. 2002.)

Another class of regulatory RNAs is capable to mimic structure elements of mRNA. This is the case of *E. carotovora* RsmB (repressor of secondary metabolite B), which carries multiple purine-rich repeats similar to the RsmA protein-binding sequence found in several mRNAs. As a consequence, the RNA traps the global post-transcriptional regulatory protein.

These RNAs are usually at the central point of regulatory networks and may indirectly induce pleiotropic effects by targeting regulatory proteins or mRNA encoding regulatory proteins (Fig. 1). The *trans*-acting pathogenesis-related RNAs are listed in Table 2, and some of the most striking examples are described below. It is worth noting that different RNA names have been used such as: ncRNA (non-coding RNA), sRNA (small RNA), snmRNA (small non-messenger RNA), eRNA (effector RNA), or regulatory RNAs. Since the pathogenesis-related RNAs are rather heterogenous (Tables 1–2), we will mainly refer to them as regulatory RNAs, and sRNAs for the small non-coding RNAs.

3.1

Regulatory Antisense RNAs

3.1.1

sRNAs and Iron Metabolism

The iron acquisition process is one of the major determinants as to whether a microorganism can colonize an organism and is able to maintain itself therein, as well as to escape direct attack from the host defense mechanisms. The pathogen can acquire rather easily many of the nutrients from the host tissue except for iron, which is poorly soluble in its oxidized form. Thus, bacteria use specific mechanisms for the iron sequestration from their host, e.g., the siderophores (Ratledge and Dover 2000; Schaible and Kaufmann 2004). While iron is required for bacteria survival, the iron-catalyzed production of reactive oxygen species (ROS) could lead to severe cellular damages (Halliwell and Gutteridge 1984; Keyer and Imlay 1996). Consequently, bacteria have evolved tightly regulated systems for both uptake and sequestration of this essential element. In *E. coli* and in many other bacteria, the global regulatory protein Fur (Ferric uptake regulator) maintains this equilibrium. Fur senses iron concentration and represses the transcription of all genes involved in iron acquisition (Bagg and Neilands 1987). If iron is abundant, Fur binds to a specific sequence overlapping the RNA polymerase binding sites in a Fe²⁺-dependent manner, inhibiting the initiation of transcription (Escobar et al. 1999).

16

T. Geissmann et al.

Table 2 Occurrence, mechanisms, and properties of prokaryotic *trans*-acting RNAs as mediators of virulence. The target mRNAs encode the following proteins: acnase A (*acnA*), iron superoxide dismutase (*sodB*), succinate dehydrogenase (*sdhD*), fumase A (*fumA*), bacterioferritin (*bfr*), ferritin (*fin*), bacterial iron transport gene (*fatB*), hemolysin α (*hla*), protein A (*spa*), and two transcriptional regulators (*hapR*, *luxR*). Non-coding RNAs with a similar function to CsrB/RsmB were also predicted in genomes of other pathogenic bacteria such as *Y. pestis*, *Shigella flexneri*, and *V. cholerae* (Griffiths-Jones et al. 2003)

Regulatory RNA (nts)	Bacteria species	Known targets	Function	Regulatory mechanism	References
RyhB (90)	<i>Escherichia coli</i>	<i>acnA</i> mRNA <i>sodB</i> mRNA <i>sdhD</i> mRNA <i>fumA</i> mRNA <i>bfr</i> mRNA <i>fin</i> mRNA	Iron metabolism	Inhibition of translation and rapid mRNA degradation	Massé and Gottesman 2002; Massé et al. 2003
PrfI/PrrF2 (110)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>sodB</i> mRNA <i>sdhD</i> mRNA <i>bfr</i> mRNA	Iron metabolism	Inhibition of translation and rapid mRNA degradation	Wilderman et al. 2004
RNAa (650)	<i>Vibrio anguillarum</i>	<i>fatB</i> mRNA	Iron metabolism	mRNA degradation	Salinas et al. 1993; Waldbeser et al. 1995
Qrr (1-4) sRNA (96 to 108)	<i>Vibrio cholerae</i> <i>Vibrio harveyi</i>	<i>hapR</i> mRNA <i>luxR</i> mRNA	Virulence Bioluminescence	Inhibition of translation and rapid mRNA degradation	Lenz et al. 2004
RNAIII (514)	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>hla</i> mRNA <i>spa</i> mRNA Others?	Hemolysin synthesis Host-pathogen interaction	Activation of translation Inhibition of translation and rapid mRNA degradation	Novick et al. 1993; Morfeldt et al. 1995; Huntzinger et al. 2005
FasX (250)	<i>Streptococcus pyogenes</i>	?	Exoenzymes, proteases Virulence (secreted factors)	? ?	Kreikemeyer et al. 2001

Regulatory RNAs as Mediators of Virulence Gene Expression in Bacteria

17

Table 2 (continued)

Regulatory RNA (nts)	Bacteria species	Known targets	Function	Regulatory mechanism	References
Pel (459)	<i>Streptococcus pyogenes</i>	?	Virulence (protease, M protein, streptokinase ...)	?	Li et al. 1999; Mangold et al. 2004
VR RNA (386)	<i>Clostridium perfringens</i>	?	Virulence (secreted toxins)	?	Shimizu et al. 2002
VirX (400)	<i>Clostridium perfringens</i>	?	Virulence (secreted toxins)	?	Ohtani et al. 2002
CsrB/CsrC (366/245)	<i>Escherichia coli</i>	CsrA protein	Glycogen biosynthesis, biofilm formation, host-bacteria interaction	Protein sequestration	Liu et al. 1997; Weilbacher et al. 2003
RsmB (479)	<i>Erwinia carotovora</i>	RsmA protein	Cell-wall degrading enzymes	Protein sequestration	Liu et al. 1998
CsrB (350)	<i>Salmonella typhimurium</i>	CsrA protein	Virulence	Protein sequestration	Altier et al. 2000
RsmZ (PrrB)/RsmY (130/118)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	RsmA homolog	Exoenzymes, secondary metabolites	Protein sequestration	Aarons et al. 2000; Valverde et al. 2003
RsmZ/RsmB (120/240)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RsmA homolog	Elastase, pyocyanin, secondary metabolites	Protein sequestration	Heudlier et al. 2004; Burrows et al. 2005
tRNA _{5^{Leu}} (75)	<i>Escherichia coli</i>	-	Virulence (hemolysins ...)	Decoding properties	Ritter et al. 1995; Dobrindt and Hacker 2001
tmRNA (363)	<i>Salmonella typhimurium</i>	?	Virulence <i>ivi</i> gene expression	Protein degradation?	Julio et al. 2000

?, unknown target or regulatory mechanism; nts, nucleotides

In addition, Fur couples the production of superoxide dismutases (SODs) with iron metabolism (Niederhoffer et al. 1990; Tardat and Touati 1991). The production of SOD is modulated and adapted to the environmental threat of oxidative stress, keeping superoxide low enough to prevent damage (Compan and Touati 1993). SODs are key enzymes of the multiple defense system that protects organisms against the deleterious effects of naturally produced oxygen radicals (Touati 1997). Two cytoplasmic SODs from *E. coli*, require different metals for activity, Mn and Fe. Iron starvation induces production of MnSOD (*sodA*), but decreases production of FeSOD (*sodB*), suggesting this antagonistic regulation permits the cell to maintain sufficient SOD levels, regardless of the iron availability. While Fur-dependent transcriptional repression of MnSOD production is well characterized, the mechanism by which Fur induced *sodB* expression remained elusive until recently (Dubrac and Touati 2000, 2002). The clue came from the work of Massé and Gottesman (2002), who identified a small regulatory RNA, RyhB (Figs. 2, 3a). It displays a Fur-dependent regulation and acts on the *sodB* mRNA as an antisense RNA (Massé et al. 2003; Geissmann and Touati 2004). Since complementarity between RyhB and the ribosome binding site of *sodB* mRNA is restricted, the global regulatory protein Hfq is required to facilitate their interaction (Geissmann and Touati 2004). As a consequence, RyhB blocks the translation initiation site of *sodB* and triggers the rapid and concomitant degradation of RyhB and *sodB* mRNA via RNase E (Massé et al. 2003).

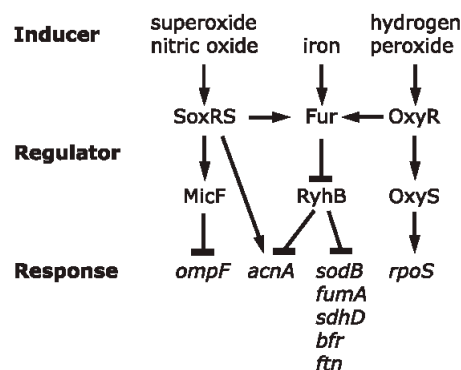


Fig. 2 Connections between global regulators involved in iron metabolism and in protection mechanisms against oxidative damages in *E. coli*. SoxRS, Fur and OxyR are global transcriptional regulatory proteins that directly sense signals, and that regulate directly the transcription of many target genes (not shown). They also regulate synthesis of the small non-coding RNAs MicF, RyhB, and OxyS, respectively, and as a consequence control indirectly many downstream genes at the post-transcriptional level. *RpoS* encoded the stationary phase σ -factor and is also regulated by different sRNAs (Gottesman 2004). Activation is denoted by *arrows* and repression by *lines*

the environment. Many other genes that encode proteins involved in iron-rich complexes have been identified to be regulated by Fur (McHugh et al. 2003; Fig. 2). Whether these genes are also under RyhB control remains to be tested.

The promoter region and the 90-nucleotide (nt) sequence of *ryhB* are well conserved in *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Klebsiella pneumoniae*, whereas a core sequence of 27 nts within RyhB is conserved in *Y. pestis* and *V. cholerae*. A RyhB homolog was further identified in *S. typhimurium* and *Y. pestis* (Massé and Gottesman 2002). Although no RyhB sequence homologs were found in *Pseudomonas aeruginosa*, two other sRNAs (PrrF1 and PrrF2) involved in iron metabolism were recently evidenced (Wilderman et al. 2004). As for RyhB, their synthesis is negatively controlled by Fur when iron is present in excess. The induction of the PrrF sRNAs leads to the rapid degradation of mRNAs *sodB*, *sdh* (succinate dehydrogenase), and a gene encoding a bacterioferritin. These data suggest that sRNAs are largely involved in controlling bacterial iron homeostasis and defense against oxidative stress (Fig. 2). One may expect that genome-wide screens for sRNAs in other bacteria will reveal more Fur-dependent regulated RNAs.

Another interesting example of iron metabolism regulation came from the highly virulent strain of the fish pathogen *V. anguillarum*, which possesses a very efficient plasmid-mediated high-affinity iron uptake system. In the operon *fatDCBA*, two of the genes, which encode the transport proteins *fatA* and *fatB*, are downregulated at the transcriptional level by Fur protein and at the post-transcriptional level by the plasmid-encoded antisense RNA α (Salinas et al. 1993). This 650-nt RNA is transcribed in the opposite direction of the *fatB* coding region, and is preferentially expressed under iron-rich conditions. The interaction of RNA α and *fatB* mRNA is thought to enhance degradation of *fatB* mRNA and to decrease the expression of *fatA* (Waldbeser et al. 1993; 1995), possibly by inducing a conformational switch of *fatB* mRNA, rendering the mRNA accessible to ribonucleases. The endogenous-encoded Fur protein is also required for RNA α synthesis at the transcription initiation level, but independently of the iron status of the cell (Chen and Croso 1996). Unexpectedly, iron regulates RNA α synthesis post-transcriptionally by stabilizing RNA α rather than enhancing transcription initiation. One intriguing feature is the absence of a "Fur box" in the RNA α promoter region, indicating either the existence of a unique regulation mechanism or that Fur exerts an indirect effect on the transcription initiation of the regulatory RNA. Interestingly, *Acinetobacter baumannii*, which causes serious human bloodstream infections, displays both siderophore-mediated iron-acquisition, and *fat* operon systems, very similar to those found in *V. anguillarum* (Dorsey et al. 2004). However, the presence of a regulatory antisense RNA has not been evidenced yet.

3.1.2 sRNAs and Virulence in *V. cholerae*

V. cholerae uses quorum sensing to regulate virulence gene expression in response to changes in cell density. HapR protein appears to be the main regulator of the quorum-sensing regulon in *V. cholerae* that allows the expression of several virulence genes at low cell density (Zhu et al. 2002). It was recently shown that synthesis of HapR protein is regulated at the post-transcriptional level and depends concomitantly of the Hfq protein and of four small non-coding RNAs, named Qrr (Lenz et al. 2004). Phylogenetic analysis indicated that these four sRNAs present extensive similarities, suggesting that they derived from duplication of a single sRNA gene from the ancestral organism (Lenz et al. 2004). In addition, they all carry partial complementarities with the SD region of the target *hapR* mRNA (Fig. 3b). Moreover, the regulatory protein Hfq is required for virulence-factor expression and the action of the four Qrr RNAs; it also promotes rapid degradation of *hapR* mRNA, which is Hfq-dependent (Lenz et al. 2004).

Computer analysis revealed that five homologous Qrr RNAs are also present in *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, and *V. harveyi* (Lenz et al. 2004). Conservation of genes across species is in general a good indication of similar functions (Michel et al. 2000), suggesting that these sRNAs may also be involved in analogous quorum-sensing circuits. Indeed in *V. harveyi*, Qrr RNAs, and Hfq were shown to control in a coordinated way the density-dependant light production by inducing the rapid degradation of *luxR* mRNA at low cell density (Lenz et al. 2004). Strikingly, while the four Qrr RNAs are required for quorum-sensing control in *V. cholerae*, the overexpression of a single sRNA is capable to ensure virulence factor expression (Lenz et al. 2004). Such a redundancy may be required for a fine-tuning transition between the low- and high-density cell levels. Alternatively, each Qrr sRNA may act at different regulatory circuits, i.e., metabolism or nutrient utilization, by targeting different mRNAs. Differences in sequences may also lead to pairing and degradation of mRNAs with different efficiencies.

While the mechanism of action of Qrr RNAs resembles that of the *E. coli* RyhB sRNA (Massé and Gottesman 2002; Geissmann and Touati 2004; Fig. 1f), several questions still remain open about the effect of Qrr RNAs on ribosome binding to *hapR* mRNA, on the RNases involved in the degradation pathway, and on the exact function of the Hfq protein in regulatory processes. Indeed, *hapR* mRNA is rapidly degraded when the synthesis of Qrr RNAs is induced. Conversely, the steady-state levels of Qrr RNAs increase in the absence of the target gene, which has been interpreted as a mutual degradation of sRNA and target (Lenz et al. 2004). Thus, sRNAs can be rapidly synthesized under appropriate conditions, but can also be turned off quickly once they have served.

The use of sRNAs instead of regulatory proteins provides an ultrasensitive and rapid response, which is particularly well appropriate for adaptive processes such as quorum sensing.

3.2

Modulation of Protein Activity by Regulatory RNAs

3.2.1

The *E. coli* CsrA/CsrB System

Another class of regulatory RNAs includes those that indirectly regulate gene expression by targeting regulatory proteins and modulating their functions (Fig. 1h,i; Gottesman 2004). One of the most characteristic examples is *E. coli* CsrA, the carbon storage regulatory protein (Romeo et al. 1993). When reaching the stationary phase, non-sporulating bacteria readjust the gene-expression pattern, improving stress resistance and enhancing the ability to scavenge substrate from the medium. The activation of glycogen biosynthesis is one of the essential routes used to redirect carbon utilization. The RNA-binding protein CsrA, which is constantly expressed during growth, acts both as a translational repressor of glycogen biosynthesis and as an activator of glycolysis in *E. coli*. The phenotypes of *E. coli* *csrA* mutants led to the prediction that the protein affects the interactions of enteric bacteria species with mammalian hosts, and motility (Romeo 1998). Thus, CsrA can be considered as a global regulator. Strikingly, the regulatory activity of CsrA is antagonized by two non-coding RNAs, CsrB and CsrC (Liu et al. 1997; Weibacher et al. 2003). Whereas their sizes vary, they carry several purine-rich repeats (5'-CAGGA(U/A/C)G-3') which are located either in single-stranded regions or in hairpin loops (Fig. 3c, Table 2). These repeats are suggested to mimic the binding sites of CsrA present in the 5' UTR of target mRNAs. These sites are bipartite, and comprise the SD sequence and a short upstream hairpin (Baker et al. 2002), but their nucleotide determinants remain to be defined. *E. coli* CsrB contains 18 repeats (while CsrC contains 9), and binds 18 CsrA molecules in a cooperative way, thus facilitating the sequestration of the protein within a compact ribonucleoprotein complex (Liu et al. 1997). The expression of CsrB is growth-phase dependent, and the RNA accumulates as the culture enters the stationary phase of growth (Gudapaty et al. 2001). A model has been suggested in which the activity of CsrA would be controlled by an equilibrium between the free protein and the CsrA-CsrB ribonucleoprotein complex. Thus, these regulatory RNAs would compete with mRNA for binding to CsrA, and would induce the release of the regulatory protein from the target mRNAs, thereby allowing their translation (Romeo 1998).

3.2.2 Homologous Systems in Bacterial Pathogens

The role of CsrA homologs in bacterial virulence was first established in the plant pathogenic *Erwinia* species. In *E. carotovora*, the CsrA homolog RsmA represses the expression of several virulence factors such as pectate lyase, cellulases, and proteases (Chatterjee et al. 1995; Cui et al. 1995). These enzymes degrade the cell wall of plant, allowing the dissemination of the bacteria within the host tissue. As in the case of *E. coli*, a regulatory activity of RsmA is counteracted by a non-coding RNA, RsmB (Liu et al. 1998). More recently, homologs of CsrA were also found in human pathogens. In *P. aeruginosa*, RsmA inhibits the translation of mRNAs encoding virulence factors including proteases and elastase (Pessi et al. 2001), and two corresponding regulatory RNAs were recently identified (Heurlier et al. 2004; Burrows et al. 2005). In *S. enterica* an homologous CsrA/CsrB system was shown to control SPI1 genes (Altier et al. 2000). Finally, CsrA exerts a broad role in regulating the physiology of *Helicobacter pylori* in response to environmental stimuli, and facilitates the adaptation of the pathogen to the different environments encountered during colonization of the gastric mucosa (Barnard et al. 2004). However, a homolog to CsrB has not yet been identified.

Whereas the protein components can be easily identified by homology searches in many gram-negative bacteria, the riboregulators are not strictly homologous. Their sizes, sequences, and predicted secondary structures diverge despite the fact that all these riboregulators perform essentially the same function, i.e., sequestration of the regulatory proteins. As an example, in different *Pseudomonas* species, the regulatory RNAs are smaller than those from *E. coli* and the consensus sequence of the repeats are shorter (Valverde et al. 2004; Table 2). It is quite probable that these RNAs have evolved independently.

3.3 Multifunctional RNAs

3.3.1 The Case of *S. aureus* RNAIII

In *S. aureus*, the expression of virulence factors is tightly regulated in response to cell density (quorum sensing), energy availability, and various environmental signals (Novick 2003). Signal receptors are the primary regulatory mediators for the expression of the virulon in *S. aureus*. Among these receptors, the *agr* system, composed of two divergent transcription units, functions as a sensor of the population density. The involvement of *agr* operon in pathogenesis has been demonstrated in several infection models (Bunce et al. 1992; Abdelnour et al. 1993; Cheung et al. 1994; Wesson et al. 1998; Vuong et al. 2000; Novick 2003). Transcriptome analysis has also revealed that the *agr* operon regulates not only virulence-related factors, but also several proteins involved in basic

metabolism (lipid, amino acid, nucleotides) and transport processes (Dunman et al. 2001). Some of these proteins were shown to be essential to maintain bacterial survival within the host (Benton et al. 2004). Thus, virulence and adaptation to stress or environmental signals are linked processes.

The *agr* system encodes a regulatory RNA (RNAIII) that plays a key role in the quorum sensing-dependent regulatory circuit and coordinately regulates several virulence-associated genes (Novick 2003). The expression of RNAIII is maximal in the late-logarithmic and stationary phase cultures, and thus participates in the switch of gene expression occurring when *S. aureus* reaches the stationary phase. This rather long RNA (514 nts) has the property of acting as a messenger RNA-encoding *hld* (δ -hemolysin), and having a variety of regulatory functions: repression of the expression of surface proteins such as protein A during the exponential phase, and activation of the expression of extracellular toxins and enzymes during the post-exponential phase (Janzon and Arvidson 1990; Kornblum et al. 1990; Novick 2003). Thus, RNAIII participates in the switch between the expression of surface proteins and excreted toxins, which may reflect a dichotomy between colonization and disease (Novick 2003).

The secondary structure of RNAIII is characterized by several stem-loop structures (Fig. 4a), which represents potential binding sites for *trans*-acting factors such as mRNAs or proteins (Benito et al. 2000). RNAIII regulates virulence gene expression at both the transcriptional and post-transcriptional levels. The mechanism by which RNAIII controls transcription is still unknown. Regulation of transcription of virulence genes involves a complex interplay between positive and negative regulatory proteins (Novick 2003). Thus, one possible role of RNAIII would be to modulate the activity of transcriptional activators or inhibitors (Said-Salim et al. 2003). Alternatively, RNAIII could indirectly affect transcription through inhibition of mRNAs that encode transcriptional regulatory factors.

The mechanism of regulation at the post-transcriptional level has been elucidated for two targets, the *hla* mRNA (encoding α -hemolysin) and *spa* mRNA (encoding protein A) (Morfeldt et al. 1995; Benito et al. 2000; Novick 2003; Huntzinger et al. 2005). Two distinct domains of RNAIII act as antisense to activate translation of *hla* mRNA and to inhibit translation of *spa* mRNA (Fig. 4). Binding of the 5' end of RNAIII with a segment of *hla* mRNA prevents the formation of an intramolecular RNA secondary structure that sequesters the *hla* ribosomal binding site (Morfeldt et al. 1995; Novick 2003). The 3' domain of RNAIII, partially complementary to the ribosome binding site of *spa* mRNA, efficiently anneals to *spa* mRNA. Although RNAIII binding is sufficient to inhibit *in vitro* the formation of the translation initiation complex, the coordinated action of the double-stranded RNase III is essential *in vivo* to degrade *spa* mRNA and irreversibly arrest translation (Huntzinger et al. 2005). The RNase III cleaves the formed duplex and is also involved in the degradation pathway of *spa* mRNA. In *E. coli*, most of the small non-coding RNAs, which

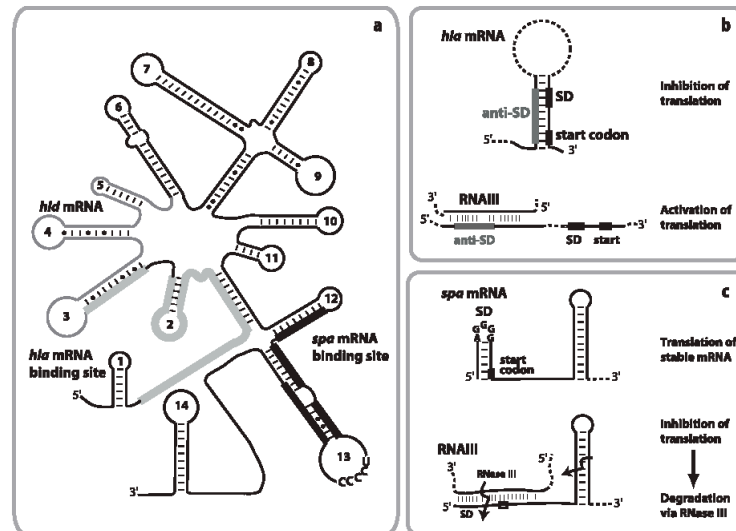


Fig. 4a-c *S. aureus* RNAIII and regulatory mechanisms on two target mRNAs. **a** Experimentally determined secondary structure of RNAIII (Benito et al. 2000). The 5' region of RNAIII complementary to *hla* mRNA (encoding hemolysin α) is shown in gray lines and regions complementary to the ribosome binding site of *spa* mRNA (encoding protein A) in the 3' domain are shown in black lines. The open reading frame encoding *hld* mRNA (hemolysin δ) comprises the hairpins 3 to 5. **b** The 5' region of RNAIII binds to a 5' segment of *hla* mRNA, and sequesters the anti-Shine and Dalgarno sequence, activating *hla* translation (Morfeldt et al. 1995). **c** The 3' domain of RNAIII binds to the ribosome binding site of *spa* mRNA, inhibits translation, and induces rapid degradation via the double-stranded endoribonuclease III (Huntzinger et al. 2005). The initial contacts probably involved a loop-loop interaction (the sequences are shown in a and c)

target specific mRNAs, require Hfq protein (Storz et al. 2004). *S. aureus* RNAIII was also found to be a putative target of Hfq protein, but the function of this interaction remains to be clarified (Huntzinger et al. 2005).

RNAIII homologs were found in other pathogenic *Staphylococcus* species, including *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. warneri* (Tegmark et al. 1998), and *S. lugdunensis* (Vandenesch et al. 1993). Except for *S. lugdunensis* RNAIII, all these RNAs encode one or two toxins. These RNAs are able to restore, at least partially, the expression of virulence factors in *agr* (-) mutant of *S. aureus*. Sequence alignment has revealed a high conservation of the 3' end domain (Benito et al. 2000). This domain in *S. aureus* RNAIII carries independent regulatory functions, since it also induces the synthesis of other exoproteins (M. Possedko and P. Fechter, unpublished results; Novick 2003).

3.3.2

Other Regulatory RNAs

The case of *S. aureus* RNAIII is not unique, and other regulatory RNAs are also the effectors of a two-component system shown to be involved in virulence gene expression in other pathogens (Table 2). In *S. pyogenes*, FasX RNA (for fibronectin/fibrinogen binding/haemolytic activity/streptokinase regulator) and Pel RNA (for pleiotropic effector locus) control the expression of several virulence-associated genes. The expression of both RNAs is growth-phase dependent and reaches the maximum during the transition at the stationary phase. FasX RNA positively regulates the expression of several secreted virulence factors like streptokinase and streptolysin S, and probably inhibits the expression of fibronectin- and fibrinogen-binding proteins (Kreikemeyer et al. 2001). Like *S. aureus* RNAIII, Pel RNA contains an open reading frame encoding streptolysin S that is not required for the regulatory function (Mangold et al. 2004). The RNA positively regulates the expression of streptokinase, secreted cysteine protease (SpeB), M protein, and streptococcal inhibitor of complement (Li et al. 1999; Mangold et al. 2004). Regulation occurs both at the transcriptional and post-transcriptional levels (Mangold et al. 2004). Thus, FasX and Pel RNAs present some functional redundancies. It is worth noting that the deletion of FasX results in increased Pel RNA expression (Kreikemeyer et al. 2001). An analogous case was found in *C. perfringens*, where two non-coding RNAs (VR RNA, and VirX) activate the expression of several chromosome- and plasmid-encoded secreted toxins (Ohtani et al. 2002, 2003; Shimizu et al. 2002). In all these systems, the mode of action of these regulatory RNAs remains to be defined.

3.4

Other Types of RNAs Influencing Pathogenicity

3.4.1

The Case of tRNA Modifications

Housekeeping RNAs such as transfer (t)RNAs have also been described to be involved in adaptive responses. In *S. flexneri*, a random Tn5 mutation analysis of the genome allowed Durand et al. (1994) to identify modifications in tRNAs as essential elements for virulence expression. Indeed, an insertion of Tn5 in the gene coding for the tRNA guanosine transglycosylase, catalyzing the Q34 modification of some tRNAs, reduced the virulence of *S. flexneri* to 50% of that of the wildtype, while the growth of the bacteria was not affected. The presence of other modified nucleosides in the anticodon loop of several tRNAs (mainly at position 37) has also been shown to be required for the expression of virulence factors in *Agrobacterium tumefaciens* (Gray et al. 1992), *P. aeruginosa* (Sage et al. 1997), and *P. syringae* (Brégeon et al. 2001; Kinscherf and Willis 2002). The modified nucleosides in the anticodon stem-loop of tRNAs are of

importance for modulation of codon recognition as well as for maintenance of the correct reading frame during translation on the ribosome. Indeed, modified nucleosides at position 34 restrict or extend a wobble base pairing and thereby the decoding pattern of the tRNA. Modifications at the ubiquitous purine at position 37 plays a major role in stabilization of the codon-anticodon interaction, and because most of the modified nucleosides cannot form base-pairing, their presence directly 3' to the anticodon restricts the pairing to the in-frame codon-anticodon pair, thus avoiding frame shifting (Motorin and Grosjean 1999). While the exact role of these modifications in virulence gene expression remains to be addressed, the degree and/or nature of modification of tRNAs can also be considered as a regulatory device to modulate the translation of specific mRNAs as a response to specific environmental changes.

3.4.2

The Case of tmRNA

The primary function of transfer-messenger (tm)RNA is to specifically target abnormal proteins for further degradation. This RNA, which acts as both a tRNA and an mRNA, adds to truncated mRNA a specific RNA tag that encodes for a protease motif (Keiler et al. 1996). Interestingly, this RNA is overexpressed under stress conditions in different pathogenic bacteria [e.g., in *S. pyogenes* (Steiner and Malke 2001) and *S. enterica* serovar Typhimurium (Julio et al. 2000)]. Most likely, tmRNA is one of the effectors that counteract the perturbation of the transcriptional and translation machinery due to stress conditions. For example, amino acid starvation induces incomplete translation of mRNAs, and reactive oxidants are one of the major sources of nucleic acids and protein damage that leads to the production of potentially toxic proteins. Recently, it was shown that tmRNA is required for full virulence in *S. enterica* serovar Typhimurium and that it affects the expression of specific genes induced during infection (Julio et al. 2000). This may be related to more specific functions of tmRNA (Withey and Friedman 2002), including regulation of an alternative protease activity (Kirby et al. 1994) or the availability of lactose (Abo et al. 2000). In this latter case, it was shown that binding of LacI repressor to *lacI* mRNA cleaved the mRNA that is in turn targeted by the tmRNA to induce rapid degradation of the truncated protein (Abo et al. 2000).

3.4.3

Location of Pathogenicity Islands

An interesting observation is that many tRNA or tRNA-like encoded genes flank many of the genes associated with bacterial pathogenicity (Hou 1999). This is the case of the *ssrA* gene encoding tmRNA that is frequently associated with pathogenicity islands of several human pathogens such as *V. cholerae* (Karaolis et al. 1998), and *S. typhimurium* (Julio et al. 2000). In other cases, minor tRNA

genes have been found located at such strategic positions [e.g. *leuX* in *E. coli* (Ritter et al. 1995), *asnT* in *Y. enterocolitica* (Carniel et al. 1996), *valV* in *S. typhimurium* (Shea et al. 1996), and *serV* in *Dichelobacter nodosus* (Cheetham et al. 1995)]. Encoded tRNAs may be used to read minor codons for the synthesis of specific virulence-associated proteins. A well-documented example is the uropathogenic *E. coli* strain 536 that carries loci *leuX*, encoding the minor tRNA_{5^{Leu}}. This tRNA allows the expression of different proteins necessary for *E. coli* to fully express its virulence (Ritter et al. 1995). The transcription of this minor tRNA is also specifically induced by the heat shock-specific σ -factor RpoH after an increase of temperature (Dobrindt and Hacker 2001). This tRNA was located at the insertion site of the pathogenic island II. Given the number of tRNA genes in the bacterial genome, this would also favor an amplification of the insertion of pathogenicity islands. While the mechanism of inheritance remains unclear, bacterial pathogenicity islands exhibit features of mobile genetic elements. Because these elements are expected to participate in the horizontal transfer of bacterial genes, their association with tRNA elements may suggest a general role for tRNA or tRNA-like genes in the development of new bacterial variants (Hou 1999).

4

A Link Between Regulatory RNAs and Signal Transduction

4.1

RNAs as Effectors of Quorum-Sensing Systems

The transcription of many of the pathogenesis-related RNAs is usually growth phase-dependent. Their promoters are tightly regulated, frequently as part of well-understood regulons that respond to specific signals. In several pathogenic bacteria, the secretion of the virulence factors is regulated in response to changes in cell-population density. This process, called quorum sensing, enables bacteria to communicate using secreted signaling molecules. Quorum sensing systems have been divided into three major classes mainly based on the type of auto-inducer signals (Cotter and Miller 1998; Hoch 2000; Henke and Bassler 2004; Podbielski and Kreikemeyer 2004). The first class involves the LuxI-type enzyme, which synthesizes an acylated homoserine lactone auto-inducer (AHL), and the LuxR-type protein, which binds to the auto-inducer and in turn controls the transcription of many genes. The LuxI/R system is used by gram-negative bacteria, such as *P. aeruginosa* and *E. carotovora*, to control virulence gene expression.

For the two other classes, regulatory RNAs were shown to be the main effectors of the quorum sensing systems mainly in *S. aureus* and in *V. cholerae*. The second class found in many gram-positive bacteria uses signals synthesized as precursor peptides, which are subsequently processed and secreted

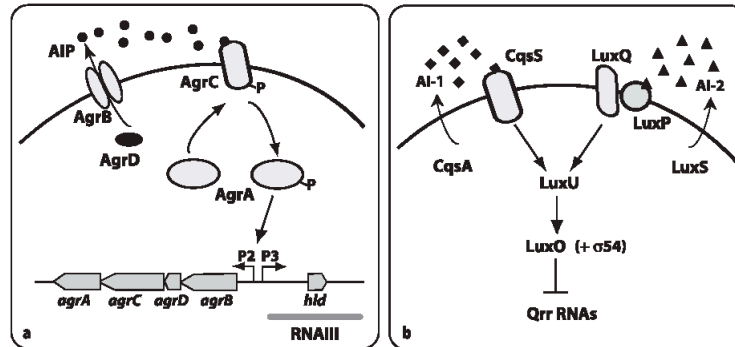


Fig. 5a, b A model of *S. aureus* and *V. cholerae* quorum sensing systems. **a** The *S. aureus* agr system, adapted from Novick (2003). The pro-auto-inducer peptide (AIP) is processed and secreted by AgrB. The AIP binds to an extracellular loop of the receptor-HPK (histidine phospho-kinase) AgrC, and activates its autophosphorylation. This in turn induces phosphorylation of AgrA, which, in conjunction with SarA, activates the two agr promoters P2 and P3, leading to the synthesis of the regulatory RNAIII. **b** In *V. cholerae*, two quorum-sensing systems function in parallel to regulate virulence gene expression (Henke and Bassler 2004). *Diamonds* and *triangles* represent the auto-inducers 1 and 2 (AI-1, AI-2), respectively. At low cell density, phospho-LuxO binds to σ_{54} factor and activates the transcription of four regulatory RNAs (Qrr sRNA). These RNAs bind to *hapR* mRNA and induce rapid mRNA degradation (Lenz et al. 2004). Conversely, at high cell density, Lux-O protein is not phosphorylated and the synthesis of Qrr RNAs is repressed

(Novick 2003). In *S. aureus*, a sensor of the population density is encoded by the agr system, which is composed of two divergent transcription units driven by promoters P2 and P3 (Fig. 5a). The P2 operon combines a density-sensing cassette (*agrD* and *B*) and a two-component signal transduction system (*agrA* and *C*). The sensor histidine kinase AgrC detects the extracellular auto-inducer and transmits information via phosphorylation of the response regulator AgrA protein. This modification is supposed to induce changes in the DNA binding properties of AgrA, allowing the autocatalytic activation of the P2 promoter and transcriptional activation of the P3 operon encoding for RNAIII, the intracellular effector of the agr regulon (Novick 2003). Recently, an agr-like locus was also identified in *L. monocytogenes* (Autret et al. 2003). The response regulator AgrA shared 41% of amino acid identity with *S. aureus* AgrA. Inactivation of *agrA* causes a significant attenuation of the virulence in a mouse model. However, in that case no RNAIII homolog was identified as the main effector of virulence expression.

Finally, the third class of quorum sensing system has been initially described to regulate bioluminescence in *V. harveyi* and virulence gene expression in *V. cholerae* (Fig. 5b). These bacteria produce at least two different signals

(AHL, and a furanosyl borate diester), which are detected by specific two-component signal transduction proteins (Henke and Bassler 2004). The sensory information converges to a response regulatory protein LuxO, which, in its phosphorylated form, interacts with the alternative σ -factor σ^{54} (Lilley and Bassler 2000). This complex further induces the activation of the Qrr RNAs synthesis (Lenz et al. 2004). Interestingly, the gene encoding one of the Qrr RNAs was shown to be located immediately upstream of the *luxOU* operon in all vibrios, suggesting that this locus represents an ancient evolutionary unit (Lenz et al. 2004).

4.2

Other Systems

Many other pathogenesis-related RNAs were shown to be activated by the two-component signal transduction systems (TCSTS). In *S. pyogenes*, the *fas* operon encodes two sensor kinases and only one response regulator (Kreikemeyer et al. 2001). The presence of two co-transcribed sensor kinases suggested that two different signal molecules might activate the same regulatory pathway. This two-component system is required to activate a synthesis of FasX RNA, which was shown to be the main effector of the *fas* operon. Although this RNA is regulated in a growth phase-dependant manner, its regulation is not driven by a quorum-sensing mechanism (Kreikemeyer et al. 2001). A second pathogenesis-related RNA encoded by the *pel* locus in *S. pyogenes* is probably part of a signal-transduction cascade that remains to be identified (Mangold et al. 2004). Indeed, transcription of *Pel* is growth phase-dependent, and the addition of conditioned media to early logarithmic cells triggered *pel* transcription, a phenomenon characteristic of the existence of a soluble auto-inducer. However, instead of *agr* and *fas* operons where the regulatory RNA is encoded by the same locus, the *pel* system does not encode for such a two-component transduction system. In *C. perfringens*, transcription of VR-RNA is activated by the two-component system VirS/VirR (Shimizu et al. 2002). In that case, the VirR protein either directly regulates the transcription of the virulence factors by binding to the promoter region (i.e., τ -toxin), or acts indirectly via transcription activation of VR-RNA (Ba-Thein et al. 1996).

The CsrA/RsmA-binding RNAs were also shown to be positively regulated by two-component signal transduction systems (Aarons et al. 2000; Altier et al. 2000; Cui et al. 2001; Suzuki et al. 2002; Valverde et al. 2003). Direct binding of the corresponding response regulator to CsrB promoter was demonstrated in *S. typhimurium* (Teplitski et al. 2003). It is of interest that orthologous RNAs are all regulated by homologous TCSTS (known as BarA/UvrY in *E. coli*, GacA/GacS in *P. aeruginosa*, and *E. carotovora*, BarA/SirA in *S. typhimurium*). The signal to which the sensor kinase responds is not known, but it must be growth-phase dependent, since the concentration of these regulatory RNAs reaches the maximum as cells enter the stationary phase.

Even if the general organization of two-component or quorum sensing systems that are involved in the activation of transcription of regulatory RNAs are different, many response regulators (*S. pyogenes* FasA, *S. aureus* AgrA, *C. perfringens* VirR) responsible for their activation share a homologous DNA-binding domain (Nikolskaya and Galperin 2002). This observation suggests that all these systems have evolved from a common ancestor two-component system.

5 Concluding Remarks

RNA is now considered a key effector of gene regulation, playing a universal function in all living organisms. This is illustrated by the recent discovery of the miRNAs (developmentally regulated) in eukaryotes (Ambros 2004), of small non-coding RNAs in archaeobacteria (Tang et al. 2002) and in bacteria (Wagner and Vogel 2003; Gottesman 2004; Storz et al. 2004). In bacteria, most of the regulatory RNAs mediate a rapid and reversible switch in response to different signals and large environmental changes. They are appropriate for adaptive processes such as stress responses, environmental cueing, quorum sensing, and virulence. Today regulatory RNAs have evolved to fulfill biological functions, and their properties reflect particular requirements of the regulatory system. Even though only a few pathogenesis-related RNAs have been identified, several general rules can nevertheless be deduced.

5.1 RNAs Regulate Directly or Indirectly Multiple Genes

Many bacterial pathogens produce a variety of extra-cellular toxins, which are tightly regulated. A high diversity is also seen in the organization of the virulence control networks. These regulatory circuits appear to be quite dynamic in an evolutionary respect, and have the ability to adapt existing regulatory networks to control horizontally acquired genes. Many of the virulence genes, for which a tight regulation of expression might be critical, are in general regulated both at the transcriptional level and at the post-transcriptional level (Novick 2003). Why pathogens have come to control their virulence through regulatory RNA molecules? One advantage is to provide a rapid response and to preserve energy. Furthermore, RNAs can simultaneously downregulate many genes. In principle, RNA-dependent regulation is driven by different mechanisms (Fig. 1). However, due to the nature of the RNA, most of the mechanisms involve sequence-specific binding to a target mRNA. In many examples, the regions of complementarity appear to be rather short and often non-contiguous (Fig. 3), thus allowing functional interactions with more than one mRNA target. Moreover, these regulatory RNAs can achieve multiple gene

regulation indirectly. Several of these regulatory RNAs target either mRNAs encoding transcriptional regulators, or sequestering post-transcriptional regulatory proteins (Table 2). Riboswitches can also occur in mRNAs encoding transcriptional activators of virulence factors (Table 1). As a consequence, cascades of downstream genes can be affected. One can also speculate that several regulatory RNAs can be made, under different experimental conditions, to regulate a single target. This would allow the bacteria to integrate many environmental signals. Several *E. coli* sRNAs produced under different stress conditions regulate *rpoS* translation (Gottesman 2004; Storz et al. 2004). The studies of several of these pathogenesis-related RNAs revealed unexpected links between metabolism, defense mechanisms, and virulence (see Fig. 2). Other connections between virulence and housekeeping networks will certainly appear as we learn more about these regulatory RNAs.

5.2

A Direct Coupling Between the Structure and the Regulatory Activity?

The astonishing variety of RNA performance is imputable to its peculiar structure capability, and its potentiality to form stable or transient interactions. Thus, RNA function is linked to its dynamic properties and versatile structure. Structure–function relationships have not yet been addressed for many regulatory RNAs. It is expected that their stability and regulatory activities are dictated by their structure. The size of the pathogenesis-related RNAs varies considerably (from 50 to 700 nt). Many of them carry several stem-loop structures connected by unpaired regions. The target sequences (in proteins or mRNAs) are generally exposed in an appropriate structural context (Figs. 3, 4). As an example, many antisense RNAs recognize their target mRNA via a loop–loop or a loop–single-stranded regions which are appropriate motifs for fast recognition (Brunel et al. 2002; Wagner et al. 2002). In several cases, chaperone proteins, such as Hfq, are needed for facilitating pairings between the two RNAs.

Another important aspect, often neglected, is the fact that sequential formation of RNA interactions during transcription can modify a folding pathway and ultimately determine the functional state of the RNA transcript (Heilman-Miller and Woodson 2003). Indeed, the stability of some of the intermediate structures formed during transcription determines the time required to rearrange to the final structure. The rate of RNA elongation and the extent of pausing may also alter the distribution of the folding intermediates by limiting the conversion of one structure to another one. Thus, kinetically trapped intermediates can create a time window for gene regulation. This is particularly true for riboswitches in mRNAs which control transcription (Figs. 1c, d). The refolding of a metastable mRNA structure regulates translation of a plasmid-encoded killer mRNA (Nagel et al. 1999). *trans*-Acting RNAs may also bind to mRNA during transcription and trap either a translationally active or inactive form of the mRNA (Figs. 1, 4b).

Another particularity of RNA molecules is for them to adopt a vast range of alternative conformations that extend from local (i.e., position of bulged nucleotides within helical groove) to drastic rearrangements of the secondary and tertiary folding. The mRNA biosensor belongs to those “switchable” RNA structures associated with protein synthesis on/off switches. The dynamic equilibrium between two RNA structures can be influenced by environmental cues (temperature), small metabolites, or by *trans*-acting factors. Interestingly some of these structural elements are highly conserved across phylogeny and can be detected by bioinformatics analysis (Abreu-Goodger et al. 2004; Barrick et al. 2004; Vitreschak et al. 2004). The recent determination of the structure of a purine-responsive riboswitch represented one major advance towards the understanding of how RNA switches function at the molecular level (Batey et al. 2004; Serganov et al. 2004).

5.3

Stable or Unstable RNAs in Cells?

In contrast to the unstable plasmid-encoded antisense RNAs, in which decay pathways have been elucidated (Wagner et al. 2002), little is known about the stability of the regulatory RNAs. Many of them were found to be stable when induced, having half-lives of 20 to 60 min, such as *S. aureus* RNAIII (Novick 2003; Huntzinger et al. 2005).

Most of the regulatory RNAs, which act as *trans*-acting antisense RNAs, induce degradation of stable mRNA targets (Massé et al. 2003; Novick 2003; Lenz et al. 2004; Huntzinger et al. 2005). These mRNAs carry either short 5' UTR or a stem-loop structure at their 5' end. It was recently proposed that in gram-negative bacteria, some of the sRNAs are self-limiting their action. They act stoichiometrically on their target RNAs and are degraded together with their target, probably via RNase E for which the mechanism of action is not clearly elucidated (Massé et al. 2003). In the gram-positive bacteria *S. aureus*, RNAIII mediates the inhibition of translation and degradation of the stable *spa* mRNA through the double-strand-specific endoribonuclease III (Huntzinger et al. 2005). It was suggested that RNase III might also be recruited for targeting the paired RNAs, since the enzyme cleaves both the free RNA species and the formed duplex.

Thus, this mutual degradation together with the fact that the synthesis of the regulatory RNAs is induced under specific signals, provide an ultrasensitive and transient response (Gottesman 2004). Indeed, if the synthesis of the regulatory RNA exceeds the rate of synthesis of its target message, the mRNA levels can be reduced considerably. Conversely, the target mRNA accumulates if its rate of synthesis exceeds that of the regulatory RNA. It remains, however, to be seen whether this model can be universally applied to all these antisense-like RNAs. The situation may be more complex for regulatory RNAs that targeted both protein and mRNA.

Regulatory signals for degradation of the non-coding RNAs, which trap regulatory proteins, are just beginning to be defined (Weilbacher et al. 2003). The half-life of *E. coli* CsrB was shown to be relatively short (around 2 min), allowing CsrA activity to respond rapidly to conditions that alter CsrB levels (Weilbacher et al. 2003). In *E. carotovora*, an increased stability of the regulatory RNA RsmB was observed in the presence of RsmA protein (Chatterjee et al. 2003).

5.4

Some Regulatory RNAs Required *trans*-Acting Proteins

The *E. coli* Hfq protein, a highly abundant protein (50,000 copies per cell in logarithmic growth) is linked to the action of several small regulatory RNAs that use base-pairings to regulate the expression of their target mRNAs (e.g., Zhang et al. 2002). This protein has been proposed to facilitate base pairings (Møller et al. 2002; Zhang et al. 2002; Geissmann and Touati 2004) and to protect sRNAs against RNase E degradation in *E. coli* (Massé et al. 2003). The crystallographic structure of *S. aureus* Hfq reveals that the protein forms a hexameric ring (Schumacher et al. 2002). The Hfq sequence is well conserved among most gram-negative and several gram-positive bacteria, and some analogies are detected with eukaryotic Sm proteins (Brescia and Sledjeski 2003). A model of how Hfq enhances RNA–RNA interactions has been recently proposed in which two Hfq hexamers bind to form a dodecamer in order to bring into close proximity the two RNA molecules (Brescia and Sledjeski 2003). It is noteworthy that in *Brucella abortus* (Robertson and Roop 1999), *L. monocytogenes* (Christiansen et al. 2004), *P. aeruginosa* (Sonnleitner et al. 2003), and *V. cholerae* (Ding et al. 2004) mutations in Hfq produced virulence defects. As shown for *V. cholerae* (Lenz et al. 2004), regulatory RNAs may also be recruited for virulence expression in these pathogens. In *Legionella pneumophila*, Hfq was shown to play a major function in exponential-phase regulatory cascades, but induced slight defects in virulence in macrophage infection models (McNealy et al. 2005). *S. aureus* RNAIII is recognized by Hfq protein in vivo and in vitro (Huntzinger et al. 2005), suggesting that the protein might also be required for full virulence.

One cannot exclude that other abundant proteins, such as the RNA chaperone StpA (Waldsich et al. 2002), the histone-like protein HU (Balandina et al. 2002), and the transcriptional regulator H-NS (Cusick and Belfort 1998), may also affect the regulatory function of these RNAs. Other RNA-binding proteins might also be critical for the function of regulatory RNAs, mainly ribonucleases or modification enzymes. It would not be so surprising that these RNAs carry post-transcriptional modifications, which may contribute to the stabilization of the RNA structure, or to specific recognition of ligands.

5.5

Functional Redundancies and How to Find Them?

The few examples described here show that the pathogenesis-related RNAs are much more prevalent than previously anticipated. One interesting feature that emerges is the functional redundancy of some of these regulatory RNAs in different pathogenic bacteria (Table 2). It is conceivable that these RNAs are differentially expressed upon different environmental/niches conditions or that they have evolved independent regulatory functions (i.e., different sequences can generate new mRNA targets).

To identify new pathogenesis-related RNAs, different experimental and global strategies (i.e., biocomputational approaches, functional screens, cloning, co-purification with proteins) can be used (Vogel and Wagner 2005). Broad criteria will be certainly required since this class of regulatory RNA is rather heterogeneous and no specific criteria (size, genomic organization, structure, presence or not of open reading frames, riboswitches) can be used to classify them into specific functional categories. So far, many of the direct targets of the identified regulatory RNAs have also not yet been assigned. For regulatory RNAs acting as antisenses, bioinformatics has proved to be useful in searching for putative target sequences. Proteomics can also be used to monitor the changes of protein synthesis from strains deleted of the regulatory RNAs, suggesting their involvement in regulatory networks or in metabolic pathways (Wagner and Vogel 2005). The ultimate goal in understanding bacterial virulence gene regulation is to assess an essential role of these RNAs in the adaptation of bacteria to their host and in developing the virulence programs in animal models, and to determine the dynamics of gene expression throughout the infectious cycle. Beyond the obvious fundamental interest of these RNA-dependent regulatory mechanisms, a number of useful applications can be envisioned, including therapeutic purpose (Johansson et al. 2002). Identification of the regulatory RNA networks required for the establishment of the pathogenicity may reveal new potential targets for bacterial treatment.

Acknowledgements We thank B. Ehresmann for constant support and interest. The authors gratefully acknowledge that funding was from the Centre National de la Recherche Scientifique, the Ministère de la Recherche (ACI microbiologie), the Ligue Régionale contre le Cancer, and the Fondation pour la Recherche Médicale. M.P. was supported by a fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale, and Alsace Region.

References

- Aarons S, Abbas A, Adams C, Fenton A, O'Gara F (2000) A regulatory RNA (PrrB RNA) modulates expression of secondary metabolite genes in *Pseudomonas fluorescens* F113. *J Bacteriol* 182:3913–3919

- Abdelnour A, Arvidson S, Bremell T, Ryden C, Tarkowski A (1993) The accessory gene regulator (*agr*) controls *Staphylococcus aureus* virulence in a murine arthritis model. *Infect Immun* 61:3879–3885
- Abo T, Inada T, Ogawa K, Aiba H (2000) SsrA-mediated tagging and proteolysis of LacI and its role in the regulation of *lac* operon. *EMBO J* 19:3762–3769
- Abreu-Goodger C, Ontiveros-Palacios N, Ciria R, Merino E (2004) Conserved regulatory motifs in bacteria: riboswitches and beyond. *Trends Genet* 20:475–479
- Altier C, Suyemoto M, Ruiz AI, Burnham KD, Maurer R (2000) Characterization of two novel regulatory genes affecting *Salmonella* invasion gene expression. *Mol Microbiol* 35:635–646
- Altuvia S, Kornitzer D, Teff D, Oppenheim AB (1989) Alternative mRNA structures of the *cIII* gene of bacteriophage λ determine the rate of its translation initiation. *J Mol Biol* 210:265–280
- Ambros V (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature* 431:350–355
- Autret N, Raynaud C, Dubail I, Berche P, Charbit A (2003) Identification of the *agr* locus of *Listeria monocytogenes*: role in bacterial virulence. *Infect Immun* 71:4463–4471
- Avedissian M, Lessing D, Gober JW, Shapiro L, Gomes SL (1995) Regulation of the *Caulobacter crescentus* *dnaKJ* operon. *J Bacteriol* 177:3479–3484
- Ba-Thein W, Lyrstis M, Ohtani K, Nisbet IT, Hayashi H, Rood JI, Shimizu T (1996) The *virR/virS* locus regulates the transcription of genes encoding extracellular toxin production in *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol* 178:2514–2520
- Bagg A, Neilands JB (1987) Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 26:5471–5477
- Baker CS, Morozov I, Suzuki K, Romeo T, Babitzke P (2002) CsrA regulates glycogen biosynthesis by preventing translation of *glgC* in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 44:1599–1610
- Balandina A, Kamashev D, Rouviere-Yaniv J (2002) The bacterial histone-like protein HU specifically recognizes similar structures in all nucleic acids. DNA, RNA, and their hybrids. *J Biol Chem* 277:27622–27628
- Barnard FM, Loughlin MF, Fainberg HB, Messenger MP, Ussery DW, Williams P, Jenks PJ (2004) Global regulation of virulence and the stress response by CsrA in the highly adapted human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 51:15–32
- Barrick JE, Corbino KA, Winkler WC, Nahvi A, Mandal M, Collins J, Lee M, Roth A, Sudarsan N, Jona I, Wickiser JK, Breaker RR (2004) New RNA motifs suggest an expanded scope for riboswitches in bacterial genetic control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:6421–6426
- Batey RT, Gilbert SD, Montange RK (2004) Structure of a natural guanine-responsive riboswitch complexed with the metabolite hypoxanthine. *Nature* 432:411–415
- Benito Y, Kolb FA, Romby P, Lina G, Etienne J, Vandenesch F (2000) Probing the structure of RNAIII, the *Staphylococcus aureus* *agr* regulatory RNA, and identification of the RNA domain involved in repression of protein A expression. *RNA* 6:668–679
- Benton BM, Zhang JP, Bond S, Pope C, Christian T, Lee L, Winterberg KM, Schmid MB, Buysse JM (2004) Large-scale identification of genes required for full virulence of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 186:8478–8489
- Brégeon D, Colot V, Radman M, Taddei F (2001) Translational misreading: a tRNA modification counteracts a +2 ribosomal frameshift. *Genes Dev* 15:2295–2306
- Brescia CC, Sledjeski DD (2003) We are legion: Noncoding regulatory RNAs and Hfq. In: Barciszewski J, Erdmann VA (eds) *Noncoding RNAs: molecular biology and molecular medicine*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp 259–269

- Regulatory RNAs as Mediators of Virulence Gene Expression in Bacteria 37
- Brunel C, Marquet R, Romby B, Ehresmann C (2002) RNA loop-loop interactions as dynamic functional motifs. *Biochimie* 84:925–944
- Bunce C, Wheeler L, Reed G, Musser J, Barg N (1992) Murine model of cutaneous infection with gram-positive cocci. *Infect Immun* 60:2636–2640
- Burrowes E, Abbas A, O'Neill A, Adams C, O'gara F (2005) Characterisation of the regulatory RNA RsmB from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Res Microbiol* 156:7–16
- Carniel E, Guilvout I, Prentice M (1996) Characterization of a large chromosomal “high-pathogenicity island” in biotype 1B *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* 178:6743–6751
- Chatterjee A, Cui Y, Liu Y, Dumenyo CK, Chatterjee AK (1995) Inactivation of rsmA leads to overproduction of extracellular pectinases, cellulases, and proteases in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in the absence of the starvation/cell density-sensing signal, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone. *Appl Environ Microbiol* 61:1959–1967
- Chatterjee A, Cui Y, Yang H, Collmer A, Alfano JR, Chatterjee AK (2003) GacA, the response regulator of a two-component system, acts as a master regulator in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 by controlling regulatory RNA, transcriptional activators, and alternate sigma factors. *Mol Plant Microbe Interact* 16:1106–1117
- Cheetham BF, Tattersall DB, Bloomfield GA, Rood JI, Katz ME (1995) Identification of a gene encoding a bacteriophage-related integrase in a vap region of the *Dichelobacter nodosus* genome. *Gene* 162:53–58
- Chen Q, Crosa JH (1996) Antisense RNA, Fur, iron, and the regulation of iron transport genes in *Vibrio anguillarum*. *J Biol Chem* 271:18885–18891
- Cheung AL, Eberhardt KJ, Chung E, Yeaman MR, Sullam PM, Ramos M, Bayer AS (1994) Diminished virulence of a sar-/agr-mutant of *Staphylococcus aureus* in the rabbit model of endocarditis. *J Clin Invest* 94:1815–1822
- Christiansen JK, Larsen MH, Ingmer H, Søgaard-Andersen L, Kallipolitis BH (2004) The RNA-binding protein Hfq of *Listeria monocytogenes*: role in stress tolerance and virulence. *J Bacteriol* 186:3355–3362
- Compan I, Touati D (1993) Interaction of six global transcription regulators in expression of manganese superoxide dismutase in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 175:1687–1696
- Cotter PA, Miller JF (1998) In vivo and ex vivo regulation of bacterial virulence gene expression. *Curr Opin Microbiol* 1:17–26
- Cui Y, Chatterjee A, Liu Y, Dumenyo CK, Chatterjee AK (1995) Identification of a global repressor gene, rsmA, of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* that controls extracellular enzymes, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone, and pathogenicity in soft-rotting *Erwinia* spp. *J Bacteriol* 177:5108–5115
- Cui Y, Chatterjee A, Chatterjee AK (2001) Effects of the two-component system comprising GacA and GacS of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* on the production of global regulatory rsmB RNA, extracellular enzymes, and harpinEcc. *Mol Plant Microbe Interact* 14:516–526
- Cusick ME, Belfort M (1998) Domain structure and RNA annealing activity of the *Escherichia coli* regulatory protein StpA. *Mol Microbiol* 28:847–857
- Ding Y, Davis BM, Waldor MK (2004) Hfq is essential for *Vibrio cholerae* virulence and downregulates σ^E expression. *Mol Microbiol* 53:345–354
- Dobrindt U, Hacker J (2001) Regulation of tRNA^{Leu}-encoding gene leuX that is associated with a pathogenicity island in the uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Mol Genet Genomics* 265:895–904
- Dorsey CW, Tomaras AP, Connerly PL, Tolmashy ME, Crosa JH, Actis LA (2004) The siderophore-mediated iron acquisition systems of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 and *Vibrio anguillarum* 775 are structurally and functionally related. *Microbiology* 150:3657–3667

- Dubrac S, Touati D (2000) Fur positive regulation of iron superoxide dismutase in *Escherichia coli*: functional analysis of the *sodB* promoter. *J Bacteriol* 182:3802–3808
- Dubrac S, Touati D (2002) Fur-mediated transcriptional and post-transcriptional regulation of FeSOD expression in *Escherichia coli*. *Microbiology* 148:147–156
- Dunman PM, Murphy E, Haney S, Palacios D, Tucker-Kellogg G, Wu S, Brown EL, Zagursky RJ, Shlaes D, Projan SJ (2001) Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the *agr* and/or *sarA* loci. *J Bacteriol* 183:7341–7353
- Durand JM, Okada N, Tobe T, Watarai M, Fukuda I, Suzuki T, Nakata N, Komatsu K, Yoshikawa M, Sasakawa C (1994) *vacC*, a virulence-associated chromosomal locus of *Shigella flexneri*, is homologous to *tgt*, a gene encoding tRNA-guanine transglycosylase (Tgt) of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 176:4627–4634
- Escobar L, Perez-Martin J, de Lorenzo V (1999) Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol* 181:6223–6229
- Geissmann TA, Touati D (2004) Hfq, a new chaperoning role: binding to messenger RNA determines access for small RNA regulator. *EMBO J* 23:396–405
- Gottesman S (2004) The small RNA regulators of *Escherichia coli*: roles and mechanisms. *Annu Rev Microbiol* 58:303–328
- Gray J, Wang J, Gelvin SB (1992) Mutation of the *miaA* gene of *Agrobacterium tumefaciens* results in reduced *vir* gene expression. *J Bacteriol* 174:1086–1098
- Griffiths-Jones S, Bateman A, Marshall M, Khanna A, Eddy SR (2003) Rfam: an RNA family database. *Nucleic Acids Res* 31:439–441
- Gudapaty S, Suzuki K, Wang X, Babitzke P, Romeo T (2001) Regulatory interactions of Csr components: the RNA binding protein CsrA activates *csrB* transcription in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183:6017–6027
- Halliwell B, Gutteridge JM (1984) Role of iron in oxygen radical reactions. *Methods Enzymol* 105:47–56
- Heilman-Miller SL, Woodson SA (2003) Effect of transcription on folding of the *Tetrahymena* ribozyme. *RNA* 9:722–733
- Henke JM, Bassler BL (2004) Bacterial social engagements. *Trends Cell Biol* 14:648–656
- Heurlier K, Williams F, Heeb S, Dormond C, Pessi G, Singer D, Camara M, Williams P, Haas D (2004) Positive control of swarming, rhamnolipid synthesis, and lipase production by the posttranscriptional RsmA/RsmZ system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 186:2936–2945
- Hoch JA (2000) Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol* 3:165–170
- Hoe NP, Goguen JD (1993) Temperature sensing in *Yersinia pestis*: translation of the LcrF activator protein is thermally regulated. *J Bacteriol* 175:7901–7909
- Hoe NP, Minion FC, Goguen JD (1992) Temperature sensing in *Yersinia pestis*: regulation of *yopE* transcription by *lcrF*. *J Bacteriol* 174:4275–4286
- Hou YM (1999) Transfer RNAs and pathogenicity islands. *Trends Biochem Sci* 24:295–298
- Huntzinger E, Boisset S, Saveanu C, Benito Y, Geissmann T, Namane A, Lina G, Etienne J, Ehresmann B, Ehresmann C, Jacquier A, Vandenesch F, Romby P (2005) *Staphylococcus aureus* RNAIII and the endoribonuclease III coordinately regulate *spa* gene expression. *EMBO J* 24:825–835
- Hurme R, Rhen M (1998) Temperature sensing in bacterial gene regulation-what it all boils down to. *Mol Microbiol* 30:1–6
- Janzon L, Arvidson S (1990) The role of the δ -lysin gene (*hld*) in the regulation of virulence genes by the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *EMBO J* 9:1391–1399

- Johansson J, Cossart P (2003) RNA-mediated control of virulence gene expression in bacterial pathogens. *Trends Microbiol* 11:280–285
- Johansson J, Mandin P, Renzoni A, Chiaruttini C, Springer M, Cossart P (2002) An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell* 110:551–561
- Julio SM, Heithoff DM, Mahan MJ (2000) *ssrA* (tmRNA) plays a role in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenesis. *J Bacteriol* 182:1558–1563
- Kamath-Loeb AS, Gross CA (1991) Translational regulation of σ^{32} synthesis: requirement for an internal control element. *J Bacteriol* 173:3904–3906
- Karaolis DK, Johnson JA, Bailey CC, Boedeker EC, Kaper JB, Reeves PR (1998) A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3134–3139
- Keiler KC, Waller PR, Sauer RT (1996) Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. *Science* 271:990–993
- Keyer K, Imlay JA (1996) Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13635–13640
- Kinscherf TG, Willis DK (2002) Global regulation by *gidA* in *Pseudomonas syringae*. *J Bacteriol* 184:2281–2286
- Kirby JE, Trempy JE, Gottesman S (1994) Excision of a P4-like cryptic prophage leads to Alp protease expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 176:2068–2081
- Kornblum J, Kreiswirth B, Projan SJ, Ross H, Novick R (1990) *Agr*: a polycistronic locus regulating exoprotein synthesis in *Staphylococcus aureus*. In: Novick R (ed) *Molecular biology of the staphylococci*. Wiley-VCH, New York, pp 373–401
- Kreikemeyer B, Boyle MD, Buttaro BA, Heinemann M, Podbielski A (2001) Group A streptococcal growth phase-associated virulence factor regulation by a novel operon (*Fas*) with homologies to two-component-type regulators requires a small RNA molecule. *Mol Microbiol* 39:392–406
- Lenz DH, Mok KC, Lilley BN, Kulkarni RV, Wingreen NS, Bassler BL (2004) The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*. *Cell* 118:69–82
- Li Z, Sledjeski DD, Kreikemeyer B, Podbielski A, Boyle MD (1999) Identification of *pel*, a *Streptococcus pyogenes* locus that affects both surface and secreted proteins. *J Bacteriol* 181:6019–6027
- Lilley BN, Bassler BL (2000) Regulation of quorum sensing in *Vibrio harveyi* by LuxO and sigma-54. *Mol Microbiol* 36:940–954
- Liu MY, Gui G, Wei B, Preston JFr, Oakford L, Yuksel U, Giedroc DP, Romeo T (1997) The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 272:17502–17510
- Liu Y, Cui Y, Mukherjee A, Chatterjee AK (1998) Characterization of a novel RNA regulator of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* that controls production of extracellular enzymes and secondary metabolites. *Mol Microbiol* 29:219–234
- Mangold M, Siller M, Roppenser B, Vlamincx BJ, Penfound TA, Klein R, Novak R, Novick RP, Charpentier E (2004) Synthesis of group A streptococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *Mol Microbiol* 53:1515–1527
- Massé E, Gottesman S (2002) A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:4620–4625
- Massé E, Escorcía FE, Gottesman S (2003) Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 17:2374–2383

- McHugh JB, Rodriguez-Quinones F, Abdul-Tehrani H, Svistunenko DA, Poole RK, Cooper CE, Andrews SC (2003) Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. A new mechanism for iron homeostasis. *J Biol Chem* 278:29478–29486
- McNealy TL, Forsbach-Birk V, Shi C, Marre R (2005) The Hfq homolog in *Legionella pneumophila* demonstrates regulation by LetA and RpoS and interacts with the global regulator CsrA. *J Bacteriol* 187:1527–1532
- Mecas J (2002) Use of signature-tagged mutagenesis in pathogenesis studies. *Curr Opin Microbiol* 5:33–37
- Michel F, Costa M, Massire C, Westhof E (2000) Modeling RNA tertiary structure from patterns of sequence variation. *Methods Enzymol* 317:491–510
- Møller T, Franch T, Hojrup P, Keene DR, Bachinger HP, Brennan RG, Valentin-Hansen P (2002) Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction. *Mol Cell* 9:23–30
- Morfeldt E, Taylor D, von Gabain A, Arvidson S (1995) Activation of a-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the trans-encoded antisense RNA, RNAIII. *EMBO J* 14:4569–4577
- Morita M, Kanemori M, Yanagi H, Yura T (1999a) Heat-induced synthesis of σ^{32} in *Escherichia coli*: structural and functional dissection of rpoH mRNA secondary structure. *J Bacteriol* 181:401–410
- Morita MT, Tanaka Y, Kodama TS, Kyogoku Y, Yanagi H, Yura T (1999b) Translational induction of heat shock transcription factor σ^{32} : evidence for a built-in RNA thermosensor. *Genes Dev* 13:655–665
- Motorin Y, Grosjean H (1999) Transfer RNA modification. In: *Nature encyclopedia of life sciences*. John Wiley and Sons, Chichester. (<http://www.els.net.gate1.inist.fr/>, cited 22 June 2005). [doi:10.1038/npg.els.0000528]
- Nagai H, Yuzawa H, Yura T (1991) Interplay of two cis-acting mRNA regions in translational control of σ^{32} synthesis during the heat shock response of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10515–10519
- Nagel JH, Gulyaev AP, Gerdes K, Pleij CW (1999) Metastable structures and refolding kinetics in hok mRNA of plasmid R1. *RNA* 5:1408–1418
- Narberhaus F (2002) mRNA-mediated detection of environmental conditions. *Arch Microbiol* 178:404–410
- Niederhoffer EC, Naranjo CM, Bradley KL, Fee JA (1990) Control of *Escherichia coli* superoxide dismutase (sodA and sodB) genes by the ferric uptake regulation (fur) locus. *J Bacteriol* 172:1930–1938
- Nikolskaya AN, Galperin MY (2002) A novel type of conserved DNA-binding domain in the transcriptional regulators of the AlgR/AgrA/LytR family. *Nucleic Acids Res* 30:2453–2459
- Nocker A, Hausherr T, Balsiger S, Krstulovic NB, Hennecke H, Narberhaus F (2001) A mRNA-based thermosensor controls expression of rhizobial heat shock genes. *Nucleic Acids Res* 29:4800–4807
- Novick RP (2003) Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol* 48:1429–1449
- Novick RP, Ross HF, Projan SJ, Kornblum J, Kreiswirth B, Moghazeh S (1993) Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J* 12:3967–3975
- Ohtani K, Bhowmik SK, Hayashi H, Shimizu T (2002) Identification of a novel locus that regulates expression of toxin genes in *Clostridium perfringens*. *FEMS Microbiol Lett* 209:113–118

- Ohtani K, Kawsar HI, Okumura K, Hayashi H, Shimizu T (2003) The VirR/VirS regulatory cascade affects transcription of plasmid-encoded putative virulence genes in *Clostridium perfringens* strain 13. *FEMS Microbiol Lett* 222:137–141
- Parsons LM, Waring AL, Limberger RJ, Shayegani M (1999) The *dnaK/dnaJ* operon of *Haemophilus ducreyi* contains a unique combination of regulatory elements. *Gene* 233:109–119
- Pessi G, Williams F, Hindle Z, Heurlier K, Holden MT, Camara M, Haas D, Williams P (2001) The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and N-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 183:6676–6683
- Podbielski A, Kreikemeyer B (2004) Cell density-dependent regulation: basic principles and effects on the virulence of Gram-positive cocci. *Int J Infect Dis* 8:81–95
- Ratledge C, Dover LG (2000) Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* 54:881–941
- Renzoni A, Klarsfeld A, Dramsi S, Cossart P (1997) Evidence that PrfA, the pleiotropic activator of virulence genes in *Listeria monocytogenes*, can be present but inactive. *Infect Immun* 65:1515–1518
- Ritter A, Blum G, Emody L, Kerenyi M, Bock A, Neuhierl B, Rabsch W, Scheutz F, Hacker J (1995) tRNA genes and pathogenicity islands: influence on virulence and metabolic properties of uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 17:109–121
- Robertson GT, Roop RMJ (1999) The *Brucella abortus* host factor I (HF-I) protein contributes to stress resistance during stationary phase and is a major determinant of virulence in mice. *Mol Microbiol* 34:690–700
- Romeo T (1998) Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol Microbiol* 29:1321–1330
- Romeo T, Gong M, Liu MY, Brun-Zinkernagel AM (1993) Identification and molecular characterization of *csrA*, a pleiotropic gene from *Escherichia coli* that affects glycogen biosynthesis, gluconeogenesis, cell size, and surface properties. *J Bacteriol* 175:4744–4755
- Sage AE, Vasil AI, Vasil ML (1997) Molecular characterization of mutants affected in the osmoprotectant-dependent induction of phospholipase C in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol Microbiol* 23:43–56
- Said-Salim B, Dunman PM, McAleese FM, Macapagal D, Murphy E, McNamara PJ, Arvidson S, Foster TJ, Projan SJ, Kreiswirth BN (2003) Global regulation of *Staphylococcus aureus* genes by Rot. *J Bacteriol* 185:610–619
- Salinas PC, Waldbeser LS, Crosa JH (1993) Regulation of the expression of bacterial iron transport genes: possible role of an antisense RNA as a repressor. *Gene* 123:33–38
- Schaible UE, Kaufmann SH (2004) Iron and microbial infection. *Nat Rev Microbiol* 2:946–953
- Schumacher MA, Pearson RF, Møller T, Valentin-Hansen P, Brennan RG (2002) Structures of the pleiotropic translational regulator Hfq and an Hfq-RNA complex: a bacterial Sm-like protein. *EMBO J* 21:3546–3556
- Serganov A, Yuan YR, Pikovskaya O, Polonskaia A, Malinina L, Phan AT, Hobartner C, Micura R, Breaker RR, Patel DJ (2004) Structural basis for discriminative regulation of gene expression by adenine- and guanine-sensing mRNAs. *Chem Biol* 11:1729–1741
- Servant P, Mazodier P (2001) Negative regulation of the heat shock response in *Streptomyces*. *Arch Microbiol* 176:237–242
- Shea JE, Hensel M, Gleeson C, Holden DW (1996) Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2593–2597

- Shimizu T, Yaguchi H, Ohtani K, Banu S, Hayashi H (2002) Clostridial VirR/VirS regulon involves a regulatory RNA molecule for expression of toxins. *Mol Microbiol* 43:257–265
- Sonnleitner E, Hagens S, Rosenau F, Wilhelm S, Habel A, Jäger KE, Bläsi U (2003) Reduced virulence of a hfq mutant of *Pseudomonas aeruginosa* O1. *Microb Pathog* 35:217–228
- Steiner K, Malke H (2001) relA-Independent amino acid starvation response network of *Streptococcus pyogenes*. *J Bacteriol* 183:7354–7364
- Storz G, Opdyke JA, Zhang A (2004) Controlling mRNA stability and translation with small, noncoding RNAs. *Curr Opin Microbiol* 7:140–144
- Suzuki K, Wang X, Weilbacher T, Pernestig AK, Melefors O, Georgellis D, Babbitzke P, Romeo T (2002) Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184:5130–5140
- Tang TH, Bachellerie JP, Rozhdetsvensky T, Bortolin ML, Huber H, Drungowski M, Elge T, Brosius J, Huttenhofer A (2002) Identification of 86 candidates for small non-messenger RNAs from the archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:7536–7541
- Tardat B, Touati D (1991) Two global regulators repress the anaerobic expression of MnSOD in *Escherichia coli*: Fur (ferric uptake regulation) and Arc (aerobic respiration control). *Mol Microbiol* 5:455–465
- Tegmark K, Morfeldt E, Arvidson S (1998) Regulation of agr-dependent virulence genes in *Staphylococcus aureus* by RNAIII from coagulase-negative staphylococci. *J Bacteriol* 180:3181–3186
- Teplitski M, Goodier RI, Ahmer BM (2003) Pathways leading from BarA/SirA to motility and virulence gene expression in *Salmonella*. *J Bacteriol* 185:7257–7265
- Touati D (1997) Superoxide dismutases in bacteria and pathogen protists. In: Scandalios J (ed) *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, pp 447–493
- Valverde C, Heeb S, Keel C, Haas D (2003) RsmY, a small regulatory RNA, is required in concert with RsmZ for GacA-dependent expression of biocontrol traits in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol Microbiol* 50:1361–1379
- Valverde C, Lindell M, Wagner EGH, Haas D (2004) A repeated GGA motif is critical for the activity and stability of the riboregulator RsmY of *Pseudomonas fluorescens*. *J Biol Chem* 279:25066–25074
- Vandenesch F, Projan SJ, Kreiswirth B, Etienne J, Novick RP (1993) agr-related sequences in *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS Microbiol Lett* 111:115–122
- Vitreschak AG, Rodionov DA, Mironov AA, Gelfand MS (2004) Riboswitches: the oldest mechanism for the regulation of gene expression. *Trends Genet* 20:44–50
- Vogel J, Wagner EGH (2005) Approaches to identify novel non-messenger RNAs in bacteria and to investigate their biological functions: RNA mining. In: Hartmann RK, Bindereif A, Schön A, Westhof E (eds) *Handbook of RNA biochemistry*. Wiley-VCH, Weinheim, pp 595–613
- Vuong C, Saenz HL, Gotz F, Otto M (2000) Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 182:1688–1693
- Wagner EGH, Simons RW (1994) Antisense RNA control in bacteria, phages, and plasmids. *Annu Rev Microbiol* 48:713–742
- Wagner EGH, Vogel J (2003) Noncoding RNAs encoded by bacterial chromosomes. In: Barciszewski J, Erdmann VA (eds) *Noncoding RNAs: molecular biology and molecular medicine*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, pp 242–258
- Wagner EGH, Vogel J (2005) Approaches to identify novel non-messenger RNAs in bacteria and to investigate their biological functions: functional analysis of identified non-mRNAs. In: Hartmann RK, Bindereif A, Schön A, Westhof E (eds) *Handbook of RNA biochemistry*. Wiley-VCH, Weinheim, pp 614–654

- Wagner EGH, Altuvia S, Romby P (2002) Antisense RNAs in bacteria and their genetic elements. *Adv Genet* 46:361–398
- Waldbeser LS, Tolmasky ME, Actis LA, Crosa JH (1993) Mechanisms for negative regulation by iron of the fatA outer membrane protein gene expression in *Vibrio anguillarum* 775. *J Biol Chem* 268:10433–10439
- Waldbeser LS, Chen Q, Crosa JH (1995) Antisense RNA regulation of the fatB iron transport protein gene in *Vibrio anguillarum*. *Mol Microbiol* 17:747–756
- Waldsich C, Grossberger R, Schroeder R (2002) RNA chaperone StpA loosens interactions of the tertiary structure in the td group I intron in vivo. *Genes Dev* 16:2300–2312
- Weilbacher T, Suzuki K, Dubey AK, Wang X, Gudapaty S, Morozov I, Baker CS, Georgellis D, Babitzke P, Romeo T (2003) A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 48:657–670
- Wesson CA, Liou LE, Todd KM, Bohach GA, Trumble WR, Bayles KW (1998) *Staphylococcus aureus* Agr and Sar global regulators influence internalization and induction of apoptosis. *Infect Immun* 66:5238–5243
- Wilderman PJ, Sowa NA, FitzGerald DJ, FitzGerald PC, Gottesman S, Ochsner UA, Vasil ML (2004) Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* involved in iron homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9792–9797
- Withey JH, Friedman DI (2002) The biological roles of trans-translation. *Curr Opin Microbiol* 5:154–159
- Yamanaka K, Mitta M, Inouye M (1999) Mutation analysis of the 5' untranslated region of the cold shock cspA mRNA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181:6284–6291
- Zhang A, Wassarman KM, Ortega J, Steven AC, Storz G (2002) The Sm-like Hfq protein increases OxyS RNA interaction with target mRNAs. *Mol Cell* 9:11–22
- Zhu J, Miller MB, Vance RE, Dziejman M, Bassler BL, Mekalanos JJ (2002) Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3129–3134

The original publication is available at www.springerlink.com

IV. Régulation de l'expression des gènes de virulence de *Staphylococcus aureus*

A. La virulence des Staphylocoques

Le genre *Staphylococcus* appartient à la famille des Micrococcaceae et se compose de cocci à Gram positif, regroupés en amas. Il comprend de nombreuses espèces et sous-espèces dont la plus fréquente en pathologie humaine est *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Cette bactérie est retrouvée dans des niches écologiques diverses, notamment dans la flore normale au niveau des fosses nasales, des surfaces humides de la peau et du lumen intestinal chez près de 50 % des individus (Rich, 2005). Un risque important d'infections diverses peut cependant se déclarer lors d'une rupture de l'équilibre entre l'hôte et la bactérie (déficit immunitaire) ou lors de la rupture de la barrière cutanée (traumatisme cutané, acte thérapeutique invasif) (Celkan et al., 2002; Hachem et Raad, 2002). Dans ces cas, des organes profonds comme les os (ostéomyélite aiguë), les valves cardiaques (endocardites), les poumons (pneumopathies), et le tube digestif peuvent être colonisés, entraînant un risque important de septicémie. *S. aureus* est également responsable d'infections cutanées, d'infections alimentaires, de diarrhées post-antibiotiques et du syndrome du choc toxique pour lequel aucun traitement n'existe (Le Loir et al., 2003; McCormick et al., 2001; Skov et Baadsgaard, 2000).

Staphylococcus aureus a le triste privilège d'être au premier rang des bactéries responsables d'infections nosocomiales (environ 30 %). Les staphylocoques représentent donc un enjeu majeur de santé publique (Kluytmans et Wertheim, 2005; Vaudaux et Schrenzel, 2004). Le traitement des infections à *S. aureus* est par ailleurs difficile en raison de la prévalence élevée des souches multi-résistantes aux antibiotiques. Ainsi, des résistances à la méthicilline (SARM) ont été isolées dans des hôpitaux où elles représentent jusqu'à 35% des infections nosocomiales à *S. aureus* (Rybak et LaPlante, 2005; Zetola et al., 2005). Ces souches ont acquis une protéine liant les pénicillines. D'autres résistances ont été décrites contre les glycopeptides (Witte, 2004), la vancomycine (Appelbaum et Bozdogan, 2004) et contre les aminosides. Dans ce dernier cas, les mécanismes sont dus à des altérations de la cible ribosomale ou à une modification de l'antibiotique par des enzymes (Shaw et al., 1993). La résistance aux fluoroquinolones résulte de mutations au niveau des gènes codant pour l'ADN gyrase (*gyrA*), la topoisomérase IV (*parC*) ou des protéines ayant une fonction dans les

mécanismes d'efflux (Sierra et al., 2005). Toutes ces résistances laissent entrevoir une impasse thérapeutique (Chopra, 2003; Tenover et al., 2001).

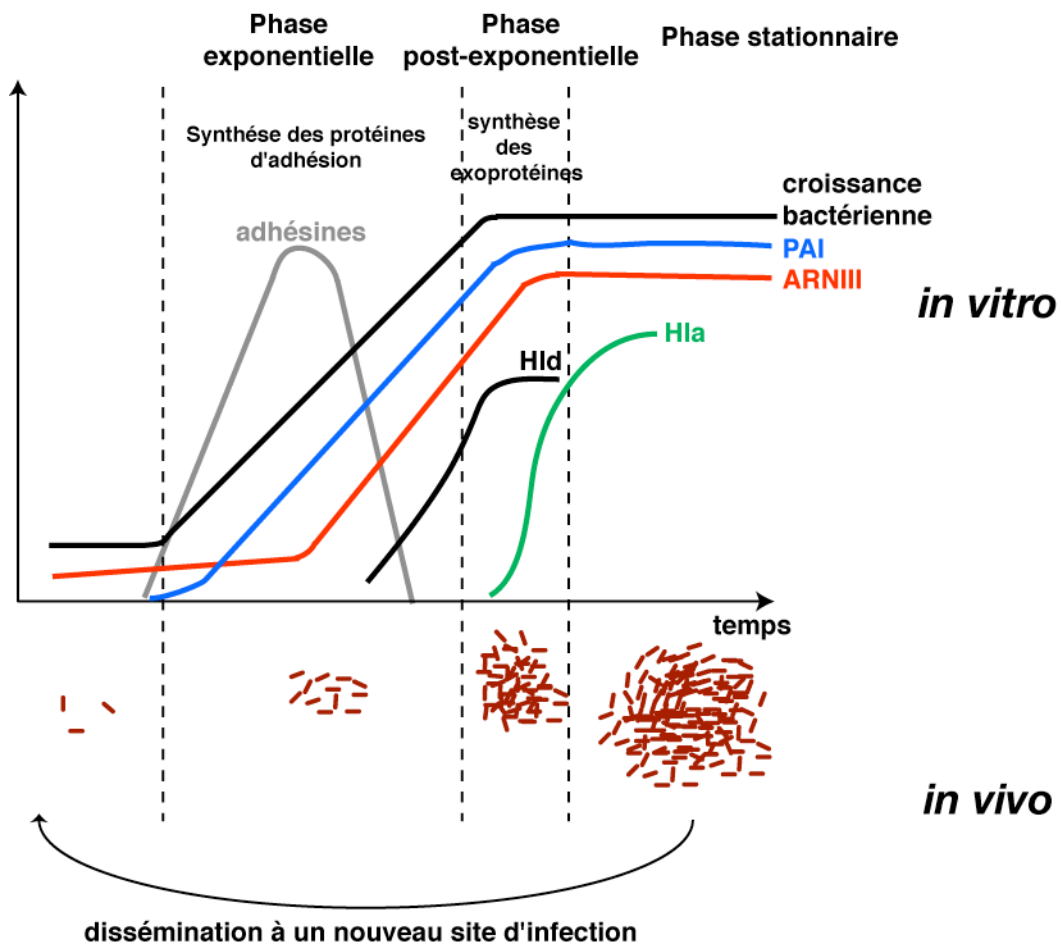


Figure 12 : Modèle proposé pour la régulation de l'expression des gènes de virulence chez *S. aureus*. *In vitro*, l'expression des protéines d'adhésion commence en début de la phase exponentielle de croissance et est maximale au milieu de la phase exponentielle. Ce profil d'expression permet, *in vivo*, d'échapper au système immunitaire et l'adhésion de la bactérie aux tissus de l'hôte. Pendant la phase post-exponentielle, une transition se déroule avec l'inhibition de l'expression de ces facteurs d'adhésion et l'activation de la synthèse des toxines et des protéines extracellulaires, comme les protéases, les lipases et les nucléases. *In vivo*, cela permet à la bactérie de se disséminer vers de nouveaux sites d'infection. Ensuite, le cycle peut recommencer. Ce profil d'expression est dû en partie à la synthèse de l'ARNIII, en fonction de la croissance cellulaire. PAI: peptide auto-inducteur; Hla et Hld: hémolysines α et β , respectivement.

Le pouvoir pathogène de *S. aureus* est multifactoriel. En effet, la bactérie produit un grand nombre de facteurs de virulence sur le site de l'infection (Foster, 2004; Lindsay et Holden, 2004; Novick, 2003). Plus de 50 gènes sont répertoriés comme ayant une action dans la virulence des staphylocoques (Baba et al., 2002; Holden et al., 2004; Kuroda et al., 2001). Ces facteurs permettent de combattre les défenses immunitaires de l'hôte, d'adhérer aux cellules et aux matrices tissulaires, de se disséminer dans l'hôte et d'utiliser les nutriments et l'énergie. Chaque type d'infection de *S. aureus* dépend d'une combinaison particulière de

facteurs de virulence. Par économie d'énergie, ces différents facteurs de virulence, aussi appelés facteurs « accessoires », ne sont synthétisés qu'au moment approprié. Leur production est finement régulée en réponse à différents stimuli comme la densité cellulaire, la disponibilité de nutriments et divers autres signaux environnementaux (Novick, 2003). *In vitro*, la production des facteurs de virulence suit un programme temporel spécifique dans lequel les adhésines sont synthétisées avant les toxines et autres protéines excrétées, mimant les différentes phases de l'infection bactérienne *in vivo* (Vandenesch et al., 1991). Ceci est corroboré par une étude récente du transcriptome où la synthèse des protéines de surface est inhibée en début de phase de croissance, alors que la synthèse des protéines excrétées est activée en fin de phase exponentielle de croissance (Dunman et al., 2001). Ainsi, un modèle a été proposé où dans un premier temps, la bactérie synthétise les facteurs d'adhésion pour coloniser un site d'infection. Lorsque les bactéries s'accumulent, la synthèse des facteurs d'adhésion est alors inhibée au profit d'une activation de la synthèse des toxines et d'autres protéines excrétées. Ces dernières vont permettre à la bactérie de trouver de nouveaux nutriments et de coloniser de nouveaux sites d'infection (figure 12).

Ces dernières années, les génomes de plusieurs souches de Staphylocoques ont été séquencés et comparés (Baba et al., 2002; Holden et al., 2004; Kuroda et al., 2001; Kuroda et al., 2005). Ces études montrent que ces génomes sont très dynamiques, avec de très nombreux transferts de gènes horizontaux entre différentes souches bactériennes. Ceci permet l'échange rapide de gènes de résistance à des antibiotiques ou de gènes permettant la synthèse de facteurs de virulence. Ainsi, *Staphylococcus epidermidis* a longtemps été considérée comme étant une souche faiblement pathogène mais, récemment, le séquençage d'une souche de *S. epidermidis* a mis en évidence l'acquisition de gènes de virulence en provenance de souches pathogènes de *S. aureus* (Gill et al., 2005). Ces transferts de gènes sont possible grâce, entre autres, à la présence d'un grand nombre d'îlots de pathogénicité chez *S. aureus*. Ces régions chromosomiques portent de nombreux gènes de résistance à des antibiotiques ainsi qu'un grand nombre de facteurs de virulence (Hochhut et al., 2005). Ainsi, chez *S. aureus*, il apparaît que la moitié des facteurs de virulence sont localisés dans de tels éléments au niveau du chromosome.

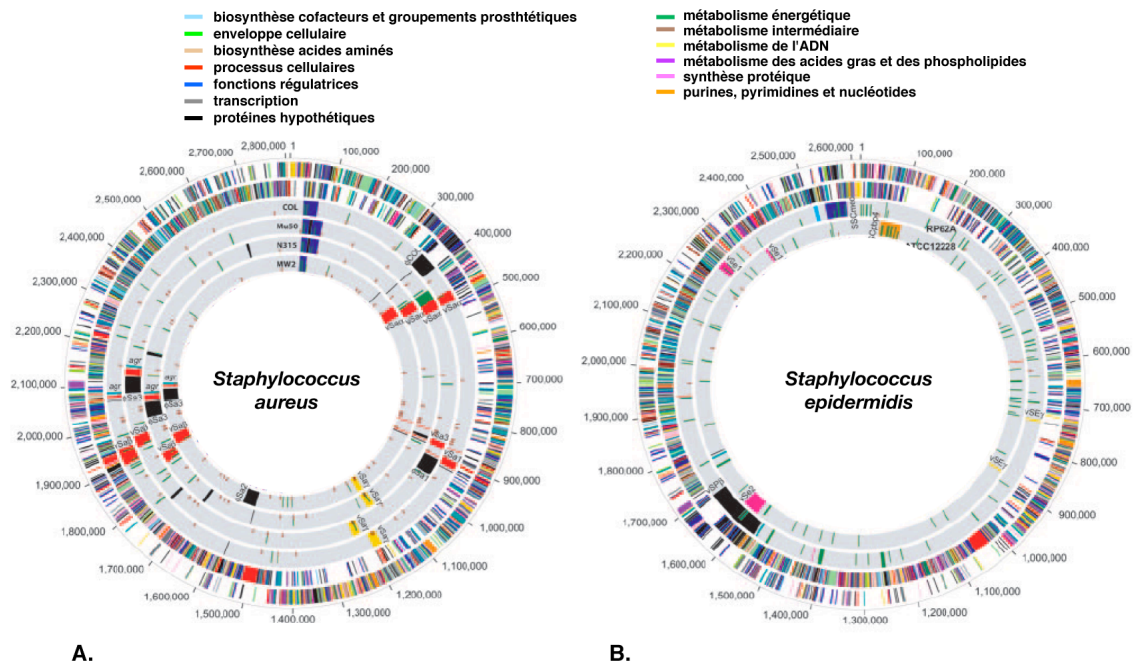


Figure 13 : Représentations circulaires des génomes de *S. aureus* (A) et de *S. epidermidis* (B). Le cercle à l'extérieur représente les coordonnées génomiques en paires de bases. Les deuxièmes et troisièmes cercles représentent les phases ouvertes de lectures prédites sur le brin plus ou le brin moins, respectivement, pour les souches de *S. aureus* COL (A) et de *S. epidermidis* RP62a (B). Ces phases ouvertes de lecture sont colorées par catégories. Le quatrième (COL), cinquième (Mu50), sixième (N315) et septième (MW2) cercles pour *S. aureus* et le quatrième (RP62a) et cinquième (ATCC 12228) cercles pour *S. epidermidis* représente les régions impliquées dans la virulence (rouge et jaune), les éléments régulateurs (turquoise), les prophages (noir), les plasmides intégrés (rose) et les éléments transposables (vert). (D'après Gill et al., 2005).

B. Les systèmes de régulation

De nombreux loci ont été identifiés comme étant responsables de la régulation temporelle de l'expression des gènes de virulence de *S. aureus* (tableau 8). L'ensemble forme un réseau de régulation complexe qui permet à la bactérie de répondre aux signaux extérieurs (figure 14), et de les transmettre à l'ensemble de la machinerie cellulaire. Les effecteurs de ces systèmes peuvent agir directement au niveau des promoteurs des gènes cibles ou bien interagir entre eux de manière complexe (Bronner et al., 2004; Cheung et al., 2004; Novick, 2003). Chez *S. aureus*, on distingue les systèmes de régulation à deux composants et les facteurs de transcription.

Système régulateur	Type	Rôle	Références
<i>agr/ARNIII</i>	SDC, peptide autoinducteur	Régulateur de l'expression de nombreuses protéines cytoplasmiques et extracellulaires	(Novick et al., 1993)
SaeRS	SDC	Régulation de l'expression de protéines extracellulaires	(Giraud et al., 1999)
ArlRS	SDC	Régulation de l'autolyse et de certains facteurs de virulence	(Fournier et al., 2001)
SrrAB	SDC	Régulation de certains facteurs de virulence aux basses pressions en oxygène	(Yarwood et al., 2001)
LytRS	SDC	Régulation de l'autolyse	(Brunskill et Bayles, 1996)
YycFG	SDC	Régulation de la perméabilité cellulaire	(Martin et al., 1999)
SvrA	Protéine membranaire	Régulation de l'expression de <i>agr</i>	(Garvis et al., 2002)
σ B	facteur sigma	Régulation de certains facteurs de virulence en fin de phase exponentielle	(Kullik et al., 1998)
SarA	facteur de transcription	Activation de <i>agr</i> , répresseur de la transcription	(Heinrichs et al., 1996)
SarS	facteur de transcription	Activation de la transcription de <i>spa</i> et peut-être d'autres protéines de surface	(Tegmark et al., 2000)
SarT	facteur de transcription	Répression de l'expression de <i>hla</i> et peut-être d'autres toxines extracellulaires	(Schmidt et al., 2001)
SarR	facteur de transcription	Facteur de transcription pour SarA et SarS	(Manna et Cheung, 2001)
SarU	facteur de transcription	Activation de la transcription de <i>agr</i>	(Manna et Cheung, 2003)
mgrA	facteur de transcription	Activation de la transcription de <i>agr</i>	(Luong et al., 2003)
Rot	facteur de transcription	Répresseur de la transcription de <i>hla</i> et d'autres exoprotéines, activation <i>spa</i>	(McNamara et al., 2000)

Tableau 8 : Liste des principaux systèmes de régulation de la virulence chez *S. aureus*. SDC : Système à deux composants. *hla*, *spa*: hémolysine α et protéine A, respectivement.

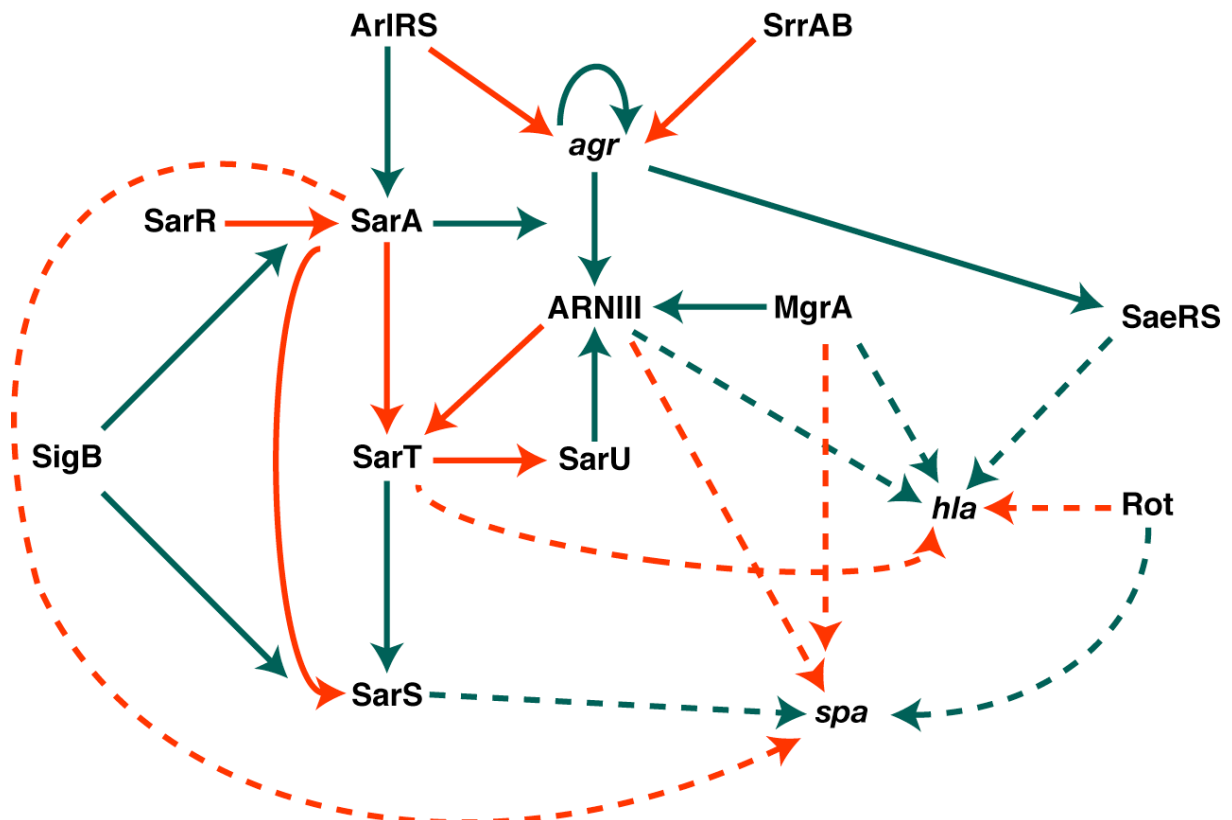


Figure 14 : Réseau de régulation chez *S. aureus*. Chaque système de régulation identifié chez *S. aureus* peut avoir un effet sur un ou plusieurs autres systèmes de régulation, ce qui crée un réseau complexe pour l'expression des gènes cibles. L'effet sur deux facteurs de virulence majeurs, la protéine A (*spa*) et l'hémolysine α (*hla*) sont représentés par des lignes en pointillés. Les flèches rouges et vertes représentent une inhibition ou une activation, respectivement.

B.1. Les systèmes à deux composants

Ils sont en général constitués de deux protéines, une protéine membranaire et une protéine cytoplasmique. La protéine membranaire (*AgrC*, *SaeS*, *SrrB*) joue le rôle de senseur. En réponse à un signal extérieur, elle va subir une autophosphorylation au niveau d'un résidu histidine conservé. Le groupement phosphate est ensuite transféré sur un résidu aspartate conservé de la protéine cytoplasmique (*AgrA*, *SaeR*, *SrrA*), qui joue le rôle de régulateur de réponse en agissant sur les promoteurs des gènes cibles (Stock et al., 2000).

B.1.1. Le système *agr* « accessory gene regulator »

Ce système est un régulateur global des facteurs de virulence. Il réprime l'expression des protéines liées à la paroi (protéine A, « Fibrinogen Binding protein ») et active l'expression des toxines excrétées (hémolysine α , hémolysine δ). Son importance a été montrée dans de nombreux modèles animaux, avec une diminution de la virulence dans des souches inactivées de l'opéron *agr* (Abdelnour et al., 1993; Cheung et al., 1994; Giese et al.,

1999; Gillaspay et al., 1995). L'opéron *agr* permet de mesurer les seuils de densité cellulaire, par un mécanisme communément appelé « quorum sensing ». Ce mécanisme est impliqué dans la communication des cellules à cellules (Bassler, 2002). Un locus homologue est présent chez *Listeria monocytogenes*, où il est aussi impliqué dans la virulence (Autret et al., 2003).

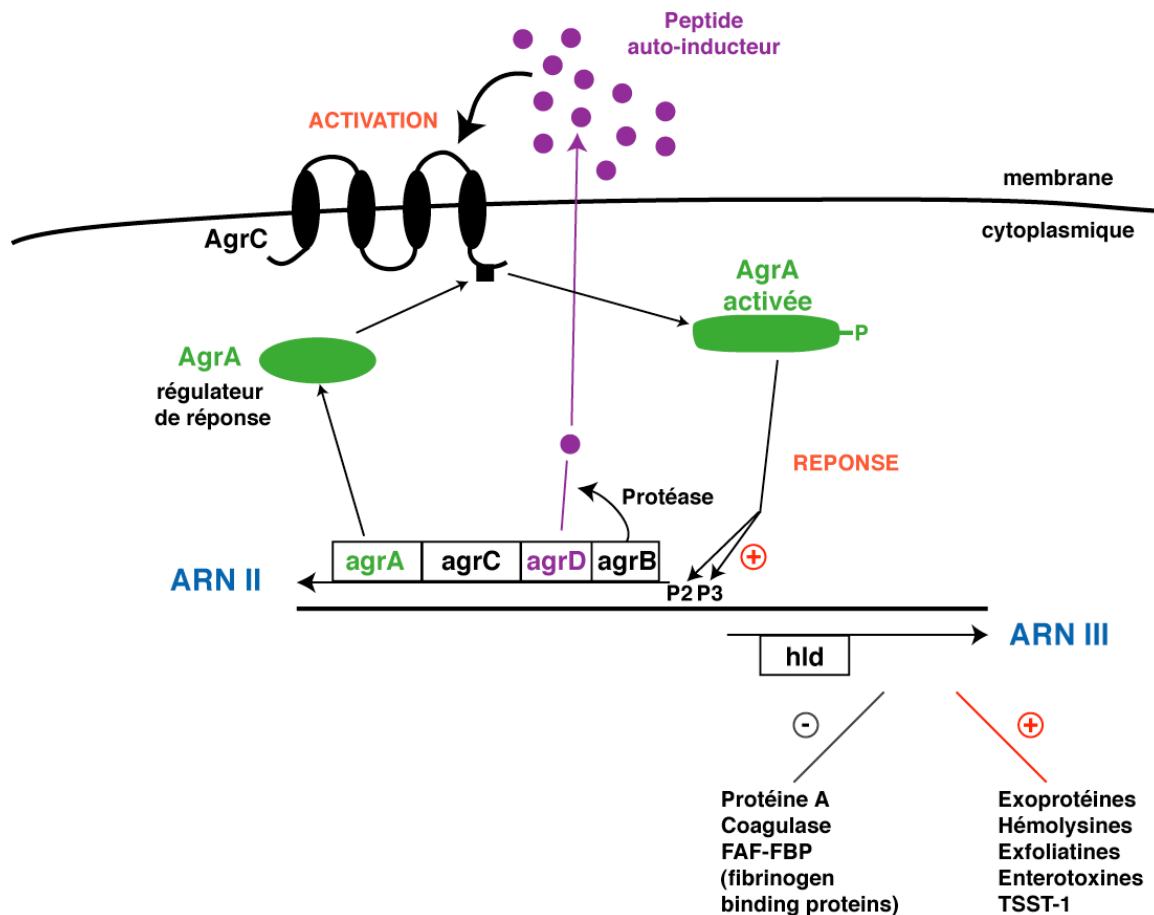


Figure 15 : Système de régulation *agr*. Les protéines AgrB et AgrD vont mettre en place un système de « quorum-sensing », dans lequel AgrD est le peptide auto-inducteur. Durant la croissance cellulaire, ce peptide s'accumule dans le milieu extracellulaire et, à partir d'une certaine concentration, il se fixe au niveau du système à deux composants qui contiennent les protéines AgrA et AgrC. AgrC est le récepteur membranaire qui reconnaît 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.

Le locus *agr* est composé de deux unités de transcription en orientation inverse, séparées de 120 pb (figure 15). Deux promoteurs indépendants, P2 et P3, permettent la synthèse de deux ARN, l'ARNII et l'ARNIII (Janzon et Arvidson, 1990). L'ARNII contient quatre phases ouvertes de lecture *agrB*, *agrD*, *agrC*, et *agrA*, qui codent pour le système à deux composants et son peptide autoinducteur (Novick et al., 1995). Ces protéines sont requises pour l'activation des promoteurs P2 et P3. En début de phase exponentielle de

croissance, un niveau basal de transcription a lieu au niveau du promoteur P2 ce qui conduit à la synthèse des protéines AgrA, AgrB, AgrC et AgrD. La protéine AgrB mature AgrD en un octapeptide appelé peptide auto-inducteur (PAI) qui est ensuite sécrété (Qiu et al., 2005; Saenz et al., 2000; Zhang et al., 2002b; Zhang et Ji, 2004). Le PAI s'accumule dans le milieu extracellulaire durant la phase exponentielle de croissance et, à une certaine concentration seuil, il se fixe au niveau de son récepteur, AgrC, une histidine kinase. Cette fixation provoquerait un changement de structure de la protéine, et induirait la phosphorylation d'un résidu histidine conservé (Ji et al., 1995; Lina et al., 1998; Lyon et al., 2002). AgrC phosphorylée active ensuite la protéine AgrA qui se fixe sur les promoteurs P2 et P3 (Koenig et al., 2004). Le promoteur P3 induit la synthèse d'un transcrit de 514 nucléotides, l'ARNIII. Cet ARN est l'effecteur intracellulaire principal du système *agr* (Janzon et Arvidson, 1990; Novick et al., 1995). Les cibles directes de l'ARNIII et ses mécanismes d'action sont encore peu connus. Il contient également une petite phase ouverte de lecture qui permet la synthèse d'une toxine, l'hémolysine δ . Toutefois, cette toxine n'exerce pas de fonction dans la régulation de l'expression des gènes cibles.

Les protéines AgrC, AgrD et AgrB présentent un polymorphisme de séquence (Dufour et al., 2002; Jarraud et al., 2000; Jarraud et al., 2002). Une activation du locus *agr* n'est possible que lorsqu'une souche donnée est mise en contact avec son propre surnageant. Inversement, la mise en contact avec un surnageant provenant de souches différentes entraîne une inhibition de *agr* (Ji et al., 1997). Ainsi, quatre groupes de *S. aureus* ont été identifiés pour le système *agr*. Ceci permet de mettre en place un système de compétition entre souches bactériennes différentes, dans laquelle l'expression des facteurs accessoires, mais pas la croissance, est inhibée (Ji et al., 1997; Lina et al., 2003). Basées sur ce résultat, plusieurs approches thérapeutiques ont été essayées en utilisant un peptide mimant le PAI pour diminuer la virulence de *S. aureus* (Mayville et al., 1999).

Une étude menée sur les mécanismes d'internalisation de *S. aureus* a mis en évidence un rôle majeur pour le locus *agr* (Wesson et al., 1998). Dans une étude récente, les auteurs montrent que lorsqu'une bactérie est internalisée, il peut y avoir une activation du système *agr* au sein de l'endosome (Qazi et al., 2001). Cette activation change le programme de la bactérie pour arrêter la synthèse des protéines d'adhésion et activer la synthèse des toxines qui permettront à la bactérie de se libérer de l'endosome. Une fois dans la cellule, la bactérie échappe aux défenses immunitaires de l'hôte et aux traitements aux antibiotiques, ce qui crée des infections récurrentes (Alexander et Hudson, 2001).

B.1.2. Les autres systèmes à deux composants

Le système *sae* (« *S. aureus* Exoprotein Expression ») a été mis en évidence par Giraudo et coll. en 1994, et la régulation des gènes cibles s'effectue au niveau transcriptionnel (Giraudo et al., 1997). La protéine transmembranaire SaeS répond aux stimuli extérieurs, conduisant à la phosphorylation de la protéine intracellulaire de réponse SaeR, protéine de liaison à l'ADN (Giraudo et al., 1999). Ce système est activé par le locus *agr* en fin de phase exponentielle de croissance et en phase stationnaire (Giraudo et al., 2003).

Le système *srr* (« Staphylococcal Respiratory Response ») est impliqué dans le métabolisme respiratoire et dans la régulation de l'expression des exoprotéines et des protéines de paroi en réponse aux niveaux d'oxygénation de l'environnement (Ster et al., 2005; Yarwood et al., 2001). La protéine SrrB est l'histidine kinase senseur, sensible aux concentrations d'oxygène, et SrrA est la protéine de réponse. L'expression de ce système entraîne une répression de la transcription des exoprotéines et une augmentation de l'expression des protéines liées à la surface.

L'opéron *arlRS* code pour un système à deux composants qui exerce un rôle activateur et inhibiteur en modulant l'expression de plus de 100 gènes impliqués dans différentes fonctions comme la lyse cellulaire, la division cellulaire, la croissance et la virulence (Liang et al., 2005).

Finalement, il a été montré que les systèmes LytRS et YycFG ont aussi un rôle dans l'expression de certains gènes de virulence. De plus, ils sont impliqués dans la régulation de la synthèse de la paroi, dans la régulation des phénomènes d'autolyse et dans la régulation de la perméabilité des cellules, respectivement (Brunskill et Bayles, 1996; Martin et al., 1999).

B.2. Les facteurs de transcription

B.2.1. L'opéron *sar* (« Staphylococcal Accessory regulator »)

L'opéron *sar* a été mis en évidence par Cheung et coll. en 1992. Le locus *sar* permet la synthèse de trois transcrits qui sont sous la dépendance de trois promoteurs différents. SarA est produite à partir de ces trois transcrits. Les deux premiers promoteurs, sous le contrôle du facteur de transcription σ^A , permettent une transcription maximale durant la phase exponentielle de croissance et qui décroît en phase stationnaire. Le troisième promoteur, sous le contrôle du facteur de transcription σ^B , induit l'expression pendant la phase stationnaire

(Manna et al., 1998). SarA est donc exprimée tout au long de la croissance bactérienne. SarA se fixe sur les régions promotrices de certains gènes au niveau de motifs de séquences conservées (Chien et al., 1999; Sterba et al., 2003). Elle peut réguler l'expression des gènes de manière positive, comme l'hémolysine α , ou de manière négative, comme la protéine A (Bayer et al., 1997; Cheung et al., 1997b). Elle est également capable de se fixer au niveau des promoteurs P2 et P3 du locus *agr* et d'en activer la transcription (Cheung et al., 1997a; Chien et Cheung, 1998; Chien et al., 1998; Morfeldt et al., 1996; Rechtin et al., 1999). SarA est impliquée dans de nombreux processus de résistance à la phagocytose ou dans l'induction de l'apoptose des cellules cibles (Wesson et al., 1998) et son rôle dans la virulence a été montré dans plusieurs modèles animaux (Blevins et al., 2003; Booth et al., 1997; Heyer et al., 2002).

B.2.2. Les facteurs homologues à *sar*

Plusieurs facteurs accessoires de la transcription présentent de fortes homologies avec la protéine SarA. La protéine SarR possède 51% d'homologie avec SarA. SarR régule négativement l'expression de SarA en fin de phase exponentielle de croissance et en phase stationnaire (Manna et Cheung, 2001). SarS, qui est situé en amont de *spa*, qui code pour la protéine A, active la transcription de ce gène en se fixant sur la région promotrice (Cheung et al., 2001; Gao et Stewart, 2004). Il est intéressant de noter que SarA et l'opéron *agr* répriment la transcription de *sarS*, ce qui peut expliquer l'effet inhibiteur observé sur la production de la protéine A. Ceci est corroboré par le fait que l'expression de SarS est maximale au début de la phase exponentielle de croissance et qu'elle décroît en fin de phase exponentielle et en phase stationnaire (Cheung et al., 2001; Schmidt et al., 2003). La protéine SarT est impliquée dans l'activation de SarS et dans la régulation négative de *hla*, du système *agr* et par conséquent de l'ARNIII. Elle est également soumise à une régulation négative de la part de SarA et de l'opéron *agr* (Schmidt et al., 2001). Finalement, la protéine SarU permet une activation de l'opéron *agr*, et est inhibée par SarT (Manna et Cheung, 2003).

La protéine de régulation Rot (« Repressor of Toxins ») agit principalement comme un inhibiteur de l'expression des facteurs de virulence (Said-Salim et al., 2003). En début de phase exponentielle de croissance, Rot inhibe la transcription des gènes codant pour diverses exo-protéines et toxines et active l'expression de la protéine A et de SarS (Oscarsson et al., 2005; Tseng et Stewart, 2005). Rot est ensuite inactivé en fin de phase exponentielle de croissance par l'ARNIII. Il a été suggéré que l'ARNIII séquestrerait la protéine Rot,

permettant la libération des régions promotrices et l'activation de la transcription des gènes cibles (McNamara et al., 2000). La formation d'un tel complexe reste cependant à être démontré. Il n'est pas à exclure que l'ARNIII puisse aussi cibler l'ARNm *rot* pour en inhiber la traduction ou induire une dégradation rapide de l'ARNm.

B.2.3. Les autres facteurs de régulation

Le facteur σ^B (SigB) permet à l'ARN polymérase de *S. aureus* de reconnaître des séquences promotrices spécifiques. Son expression est maximale en fin de phase exponentielle de croissance (Palma et Cheung, 2001). SigB active alors la transcription de *sarA* et a aussi un effet inhibiteur sur l'expression du locus *agr*, ce qui permet de prolonger l'expression des protéines de surface qui sont régulées positivement par SarA (Bischoff et al., 2001; Deora et al., 1997; Manna et al., 1998). Cependant, le facteur σ^B ne joue pas un rôle majeur dans la pathogénicité de *S. aureus*, mais est essentiel dans l'adaptation de la bactérie aux stress liés à l'environnement (Chan et al., 1998; Horsburgh et al., 2002; van Schaik et Abee, 2005).

La protéine MgrA régule la lyse cellulaire et est aussi impliquée dans la virulence (Luong et al., 2003). L'inactivation du gène *mgrA* conduit à une répression de l'ARNIII et de *hla* et à une activation de SarS et de *spa* (Ingavale et al., 2005; Oscarsson et al., 2005).

C. Les facteurs de virulence

Il existe deux grandes familles de facteurs de virulence chez *S. aureus*. La première est composée des protéines liées à la membrane externe. Ces facteurs permettent à la bactérie d'échapper aux défenses de l'hôte et d'adhérer aux tissus pour initier la colonisation. Ainsi, les protéines majeures de surface de *S. aureus* sont la protéine A, la coagulase et les protéines fixant le fibrinogène et la fibronectine. La deuxième famille est constituée de protéines sécrétées comme les toxines et autres enzymes de dégradation (protéases, nucléases; Dinges et al., 2000; Dubin, 2002; Gotz et al., 1998). Les principaux facteurs de virulence de *S. aureus* sont répertoriés dans le tableau 9.

C.1. Les facteurs d'adhésion

Les adhésines sont responsables de l'adhérence de la bactérie aux cellules ou à la matrice extracellulaire de l'hôte. Elles forment une famille de facteurs de virulence nommée MSCRAMM, pour « Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules » et sont en général associées au peptidoglycane par des liaisons covalentes. Ces protéines jouent un rôle important dans l'initiation et l'évolution de la plupart des infections, ainsi que dans la réponse de l'hôte à l'infection (Foster et Hook, 1998; Menzies, 2003).

C.1.1. Les protéines fixant la fibronectine ou le fibrinogène

La fibronectine est une glycoprotéine présente sous forme soluble dans le plasma sanguin et sous forme insoluble dans la matrice extracellulaire. Elle est impliquée dans de nombreux processus dont l'adhésion des cellules entre elles, la différenciation cellulaire et la réparation des tissus après une blessure (Miyamoto et al., 1998). De nombreuses bactéries pathogènes colonisent leur hôte en exprimant à leur surface des récepteurs qui fixent spécifiquement la fibronectine, les « Fibronectin Binding Protein » ou FnBP (Schwarz-Linek et al., 2004). *S. aureus* exprime deux protéines qui présentent de fortes homologues entre elles, FnBPA et FnBPB (Flock et al., 1987; Jonsson et al., 1991). En se liant à la fibronectine, les FnBPs permettent l'adhésion des staphylocoques aux tissus de l'hôte (Cho et al., 2001; Grundmeier et al., 2004; Heilmann et al., 2004; Mongodin et al., 2002).

Facteur de Virulence	Rôle dans la pathogénie	<i>agr</i>	<i>sarA</i>	<i>sarS</i>	<i>sarT</i>	<i>saeRS</i>	<i>rot</i>	Références
Superantigènes								
Enterotoxine A	intoxication alimentaire	0						(Tremaine et al., 1993)
Enterotoxine B	intoxication alimentaire	+						(Gaskill et Khan, 1988)
Enterotoxine C	intoxication alimentaire	+						(Regassa et al., 1991)
Enterotoxine D	intoxication alimentaire	+						(Zhang et Stewart, 2000)
Exfoliatine A, B	syndrome de la peau ébouillantée	+						(Sheehan et al., 1992)
TSST-0, TSST-1	syndrome du choc toxique	+						(Recsei et al., 1986)
Cytotoxines								
Hémolysine α	hémolyse, nécrose	+		-	-	+	-	(Giraud et al., 1997; Recsei et al., 1986; Said-Salim et al., 2003; Schmidt et al., 2001; Tegmark et al., 2000)
Hémolysine β	hémolyse, nécrose	+				+	-	(Giraud et al., 1997; Recsei et al., 1986; Said-Salim et al., 2003)
Hémolysine δ	hémolyse légère	+	+	+	-	0		(Giraud et al., 1997; Recsei et al., 1986; Schmidt et al., 2001; Tegmark et al., 2000)
Hémolysine γ	hémolyse, nécrose	+					-	(Bronner et al., 2000; Said-Salim et al., 2003)
Leucolysine	leucolyse, pneumopathies,...	+					-	(Said-Salim et al., 2003)
Enzymes								
Protéases à sérine SplA-F	diffusion, nutrition	+					-	(Said-Salim et al., 2003)
Protéase V8	diffusion, nutrition	+	-	0		0		(Arvidson et Tegmark, 2001; Chan et Foster, 1998)
Aureolysine	diffusion, nutrition	+	-					(Arvidson et Tegmark, 2001; Chan et Foster, 1998)
Protéase à cystéine	diffusion, nutrition	+					-	(Arvidson et Tegmark, 2001; Said-Salim et al., 2003)
Glycérol ester hydrolase	diffusion, nutrition	+				0		(Said-Salim et al., 2003; Smeltzer et al., 1993)
Lipase	diffusion, nutrition	+				0		(Chamberlain et Imanoel, 1996)
Nucléase	nutrition	+				+		(Smeltzer et al., 1993)
Coagulase	adhésion	-	+			+	+	(Giraud et al., 1997; Lebeau et al., 1994; Said-Salim et al., 2003; Wolz et al., 1996)
Staphylokinase	activateur du plasminogène	+				0		(Recsei et al., 1986)
Protéines de surface								
Protéine A	adhésion, anti-immunitaire	-		+			+	(Chien et al., 1999; Giraud et al., 1997; Recsei et al., 1986; Said-Salim et al., 2003)
Collagène BP	fixation au collagène	0						(Blevins et al., 1999)
Fibronectin BPA	fixation à la fibronectine		+					(Saravia-Otten et al., 1997)
Fibronectin BPB	fixation à la fibronectine		+					(Saravia-Otten et al., 1997)
Clumping Factor A	fixation au fibrinogène	0				0		(Wolz et al., 1996)
Clumping Factor B	fixation au fibrinogène	0					+	(McAleese et al., 2001; Said-Salim et al., 2003)

Tableau 9 : Principaux facteurs de virulence et régulation auxquels ils sont soumis. +: activation; -: inhibition et 0 : non déterminé. Lorsque rien n'est indiqué, cela signifie qu'il n'y a pas d'effet.

Ces protéines sont aussi impliquées dans l'internalisation des bactéries dans les cellules de l'hôte, ce qui permet aux bactéries d'échapper aux défenses immunitaires et aux traitements antibiotiques (Jett et Gilmore, 2002; Kintarak et al., 2004; Sinha et al., 2000; Sinha et Herrmann, 2005). Un des problèmes rencontrés en milieu hospitalier est l'adhésion de *S. aureus* aux parois des cathéters par le biais des protéines FnBPs (Cheung et Fischetti, 1990; Vaudaux et al., 1989).

Le fibrinogène est une protéine trouvée dans le plasma sanguin, où elle joue un rôle majeur dans les processus de coagulation (Herrick et al., 1999; Weisel, 2005). Comme pour la fibronectine, *S. aureus* possède des protéines qui permettent de se lier spécifiquement au fibrinogène, les protéines ClfA et ClfB, pour « Clumping Factor » A et B (McDevitt et al., 1994; McDevitt et al., 1997; Ni Eidhin et al., 1998). Ces deux protéines sont aussi responsables de la fixation et de l'agrégation des bactéries dans les tissus de l'hôte ou aux cathéters (Loughman et al., 2005; Palmqvist et al., 2004; Siboo et al., 2001).

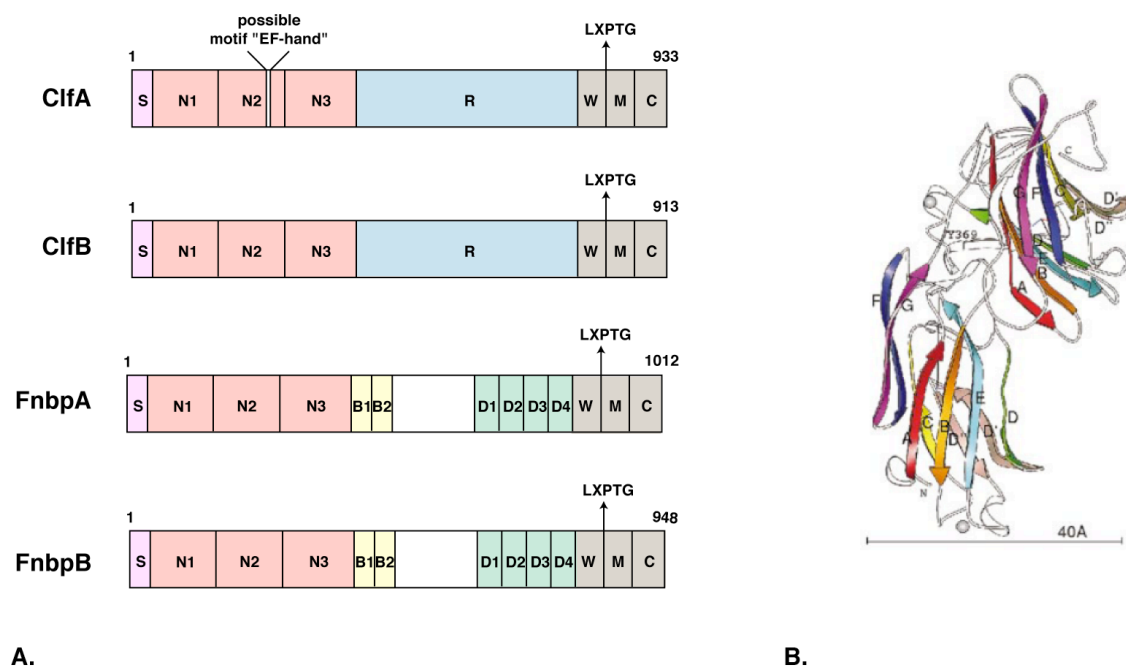


Figure 16 : Organisation schématique des protéines de liaison à la fibronectine ou au fibrinogène (A), et structure cristallographique de domaine N2 de la protéine ClfA (B). Chaque protéine comporte à son extrémité N-terminale un peptide signal pour l'export (S). Puis on trouve une région composée de trois répétitions d'un même motif et qui est le domaine de liaison du fibrinogène (N1-N3). La région R et les répétitions D1-D4 sont impliquées dans la liaison à la fibronectine. La fonction des régions B1-B2 est inconnue. Ensuite on trouve la région d'insertion dans la paroi (W), la région transmembranaire (M) et une région cytoplasmique riche en acides aminés chargés positivement (C). ClfA : « Clumping Factor A » ; ClfB : « Clumping Factor B » ; FnbpA : « Fibrinogen Binding Protein A » ; FnbpB : « Fibrinogen Binding Protein B ». D'après (Deivanayagam et al., 2002).

Les protéines de liaison au fibrinogène (Clf) et les protéines de liaison à la fibronectine (FnBP) ont des caractéristiques structurales communes (figure 16). Les deux types de protéines possèdent le motif consensus LXPTG de fixation des protéines à la surface des bactéries (Mazmanian et al., 1999). Le motif de liaison au fibrinogène est également conservé dans d'autres protéines appartenant à la famille des MSCRAMM, et la structure cristallographique de ce domaine dans la protéine ClfA a été résolue (Deivanayagam et al., 2002). Il appartient à la famille des « IgG fold » et est présent dans d'autres protéines interagissant avec le fibrinogène, notamment des protéines eucaryotiques (Wang et Springer, 1998).

D'autres membres de cette famille ont été identifiés. Les protéines Eap, Efb et Emp ont été isolées grâce à leur capacité à se fixer à diverses protéines de la matrice extracellulaire. Eap et Efb sont impliquées dans l'adhésion de *S. aureus* aux cellules de l'hôte et sont requises pour la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte (Chavakis et al., 2002; Haggar et al., 2004; Haggar et al., 2003; Harraghy et al., 2003; Lee et al., 2004; Palma et al., 2001; Shannon et al., 2005). Le rôle de la protéine Emp est moins connu. Une différence notable par rapport aux FnBP et Clf est que ces protéines ne sont pas liées de manière covalente à la paroi de la bactérie mais sont sécrétées. Cependant, il n'est pas encore défini si celles-ci demeurent associées à la membrane bactérienne par des interactions protéine-protéine, ou si elles sont actives dans le milieu extracellulaire (Chavakis et al., 2005).

L'expression des gènes *fnbA* et *fnbB* est inhibée par le système de régulation *agr* et est stimulée par *sarA* (Wolz et al., 2000). Les protéines ClfA et ClfB sont, quant à elles, régulées de manière indépendante du système *agr* (McAleese et al., 2001; Said-Salim et al., 2003; Wolz et al., 2000). Pour Eap et Emp, les systèmes *agr*, *sarA* et *sae* sont impliqués (Chavakis et al., 2005; Harraghy et al., 2005).

C.1.2. La protéine A

La protéine A est présente dans 95% des souches de Staphylocoques humaines (Patel et al., 1992). C'est l'une des protéines majeures dans la virulence de *S. aureus*. Elle est intégrée dans la paroi où elle représente jusqu'à 7% des protéines totales et joue un rôle dans les mécanismes de défense de la bactérie contre la phagocytose et l'activation du complément (Langone, 1982; Spika et al., 1981). Elle fixe avec une grande affinité les fragments Fc des immunoglobulines (King et Wilkinson, 1981). C'est également un facteur d'adhésion qui

interagit avec le facteur de von Willebrand (Hartleib et al., 2000). La protéine A est responsable d'un grand nombre d'effets biologiques, comme des réactions d'hypersensibilité retardée, de sécrétion d'histamine par les basophiles, de l'activation du complément et de la dérépression de l'activité d'opsonisation du sérum (Gomez et al., 2004; Nguyen et al., 2000). La protéine A a des propriétés de superantigène des cellules B (Silverman et Goodyear, 2002), et agit comme toxine contre les lymphocytes B (Goodyear et Silverman, 2004). Un niveau élevé d'expression de la protéine pourrait induire une trop forte stimulation du système immunitaire de l'hôte et être délétère pour la bactérie. Ainsi, une régulation fine de l'expression de la protéine A est nécessaire.

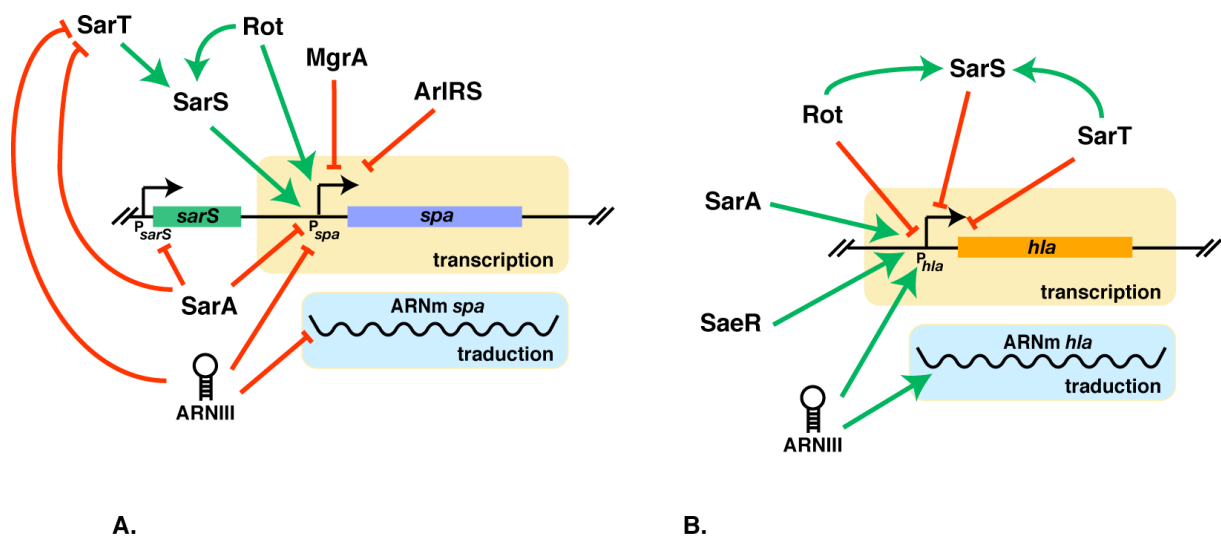


Figure 17 : Régulation de l'expression de la protéine A (A) et de l'hémolysine α (B). Les flèches vertes représentent une activation alors que les traits rouges représentent une inhibition, au niveau transcriptionnel ou traductionnel.

L'expression de la protéine A est maximale au début de la phase exponentielle de croissance, puis est réprimée durant le reste de la croissance. Cette régulation est très complexe et fait intervenir de nombreux facteurs (figure 17). En début de phase exponentielle, le facteur de transcription SarS agit comme activateur de la transcription (Cheung et al., 2001; Tegmark et al., 2000). Cette protéine se lie au niveau du promoteur et active directement la transcription du gène *spa*. Les facteurs de transcription SarT et Rot activent la synthèse de SarS, et ainsi stimulent indirectement la synthèse de la protéine A (Gao et Stewart, 2004; Said-Salim et al., 2003; Schmidt et al., 2003). Rot est également capable de se fixer directement sur le promoteur de *spa* pour activer sa transcription (Oscarsson et al., 2005). En phase exponentielle tardive et en phase stationnaire, les systèmes *agr* et *sar* répriment la transcription de *spa* (Cheung et al., 1997b; Gao et Stewart, 2004). SarA agit à la fois de

manière *agr* dépendante et de manière *agr* indépendante. Les systèmes ArlRS et la protéine MgrA sont aussi des inhibiteurs de la synthèse de la protéine A (Liang et al., 2005; Luong et al., 2003; Oscarsson et al., 2005). Par ailleurs, nous avons montré récemment que l'ARNIII réprime la traduction de l'ARNm *spa* suivie d'une dégradation rapide de l'ARNm (Huntzinger et al., 2005). Ainsi la régulation de *spa* a lieu à la fois au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. Le modèle actuel de la régulation de la synthèse de la protéine A est représenté sur la figure 17.

C.2. Les toxines produites par *S. aureus*

L'hémolysine α est un des facteurs de virulence majeurs dans la pathogénicité de *S. aureus*, et elle est produite par plus de 90% des souches (Palmer, 1998). Elle présente une activité hémolytique sur les érythrocytes, les lymphocytes, les plaquettes, les kératinocytes et les fibroblastes humains (Walev et al., 1993; Walev et al., 1994). Hla est un heptamère qui s'insère dans la membrane plasmique des cellules cibles, formant un pore qui provoque un déséquilibre osmotique (Valeva et al., 1996). Ceci a pour conséquence d'entraîner une fuite d'ions et de petites molécules ainsi qu'une entrée d'eau avec, dans certains cas, la lyse des cellules.

En début de phase exponentielle, la synthèse de Hla est réprimée par les facteurs de transcription SartT et SarS (Cheung et al., 2001; Schmidt et al., 2001). En fin de phase exponentielle, l'expression de Hla est activée au niveau transcriptionnel par les systèmes *agr* (Novick et al., 1993), *sarA* (Chan et Foster, 1998) et *sae* (Giraud et al., 1997). De plus, la traduction de l'ARNm *hla* est activée par l'ARNIII, effecteur principal du système *agr* (Morfeldt et al., 1995).

L'ARNIII, contient une phase ouverte de lecture qui code pour l'hémolysine delta, une petite protéine de 26 acides aminés. Cette protéine est capable de s'insérer dans les membranes plasmiques et de perméabiliser les cellules. Elle provoque également la lyse des érythrocytes (Dufourc et al., 1990; Freer, 1982).

De nombreuses autres toxines ont été caractérisées. Les toxines du syndrome de choc toxique (TSST) génèrent des manifestations cliniques nombreuses tels que le syndrome du choc toxique (Cunningham et al., 1996). L'expression de ces toxines est induite par les systèmes *agr* et *sarA* (Jarraud et al., 2000). La famille des entérotoxines est composée d'une

vingtaine de toxines. Elles sont responsables d'intoxications alimentaires et de maladies allergiques et auto-immunes (Balaban et Rasooly, 2000). La régulation de l'expression de ces gènes est sous la dépendance du système *agr* (Zhang et Stewart, 2000). Leur expression est induite en phase exponentielle de croissance. Les toxines exfoliantes sont responsables du syndrome de la peau ébouillantée (« Staphylococcal Scalded Skin Syndrom », SSSS) qui survient chez les nourrissons (Ladhani, 2001). Deux toxines ont été isolées, ETA (toxine exfoliante de type A) et ETB (toxine exfoliante de type B). L'expression de ces toxines est stimulée par le système de régulation *agr* (Sheehan et al., 1992).

C.3. Les exoprotéines de type protéases

S. aureus synthétise un grand nombre de protéases et de nucléases lors d'une infection. Parmi les protéases, on retrouve la sérine protéase SspA. Cette dernière induit la dégradation des protéines de surface de la bactérie, comme la protéine A ou les protéines de liaison au fibrinogène (Karlsson et al., 2001; McGavin et al., 1997). Une autre protéine, la metalloprotéase auréolysine, est nécessaire pour l'inactivation des protéines de liaison à la fibronectine ClfA et ClfB (McAleese et al., 2001). L'inactivation de ces deux protéases induit une diminution de la virulence dans des modèles animaux, ce qui renforce leur rôle dans la survie et l'adaptation de la bactérie dans l'hôte (Coulter et al., 1998; Lindsay et Foster, 1999). Leur action contre les protéines de surface est un moyen supplémentaire de réguler l'adhésion de la bactérie. Finalement, ces protéines permettent de fournir une source de nutriments à la bactérie, en dégradant les macromolécules présentes dans le milieu extracellulaire après la lyse des cellules de l'hôte (Shaw et al., 2004).

En 2001, un opéron contenant six sérines protéases a été identifié, SplA-F (Reed, 2001). Ces protéines présentent des homologies de séquence avec la protéase à sérine V8. De plus, elles contiennent le motif caractéristique du site catalytique des protéases à sérines, qui est composé d'une sérine, d'une histidine et d'un acide aspartique (Dancer et al., 1990). Elles sont exprimées en fin de phase exponentielle de croissance et sont sous la dépendance du système *agr*. Plusieurs transcrits peuvent être détectés, qui possèdent tous la même extrémité 3', après la dernière protéase, SplF. Leur rôle dans la virulence reste à être démontré, mais il est à noter que l'une de ces protéases, SplC, avait été précédemment identifiée comme étant exprimée *in vivo* chez des patients atteints d'endocardies (Rieneck et al., 1997).

Objectifs de la thèse

Durant ma thèse, je me suis intéressé à la structure-fonction de deux ARN régulateurs procaryotiques qui sont reliés à l'expression du pouvoir pathogène chez les bactéries. Le premier exerce une fonction essentielle dans le contrôle de la réplication du plasmide R1. Il régule un seul ARNm cible dont il est strictement complémentaire. Le deuxième est un grand ARN qui contrôle de nombreux facteurs de virulence chez *S. aureus*. Notre étude a conduit à l'identification de plusieurs cibles, suggérant que cet ARN agit principalement comme un ARN antisens.

I. L'ARNIII de *S. aureus* et ses multiples fonctions

Bien que l'identification du rôle de l'ARNIII dans la régulation de l'expression des gènes de virulence chez *S. aureus* remonte à 1993 (Novick et al., 1993), les mécanismes mis en jeu restent encore peu connus. Le seul mécanisme élucidé pour l'ARNIII concerne la régulation traductionnelle de l'hémolysine alpha, où l'ARNIII agit en tant qu'ARN antisens activateur de la traduction (Morfeldt et al., 1995). Pour la régulation de l'expression de ses autres gènes cibles, l'ARNIII est censé agir au niveau transcriptionnel et plusieurs hypothèses quant à son mode d'action ont été formulées. Il peut agir en séquestrant des facteurs de transcription et cela a été proposé pour la protéine Rot. Néanmoins, aucune évidence expérimentale ne valide cette hypothèse. L'ARNIII peut également agir au niveau post-transcriptionnel, en ciblant spécifiquement les ARNm de facteurs de transcription. Un tel mécanisme aurait indirectement des effets au niveau transcriptionnel, comme c'est le cas dans la régulation de l'expression de RpoS chez *E. coli* (introduction, § A.2.1.)

La structure secondaire de l'ARNm a été déterminée au laboratoire, à la fois *in vitro* et *in vivo*, par des sondes de structures chimiques et enzymatiques (Benito et al., 2000). Elle est constituée de 14 structures en tige-boucle et de deux interactions à longue distance qui délimitent des domaines structuraux (figure 18). Les structures en tige-boucle 1, 7, 13 et 14 sont très conservées entre différentes espèces de Staphylocoques. Certaines de ces boucles sont riches en cytosines, et sont donc potentiellement complémentaires à la région Shine et Dalgarno des ARNm.

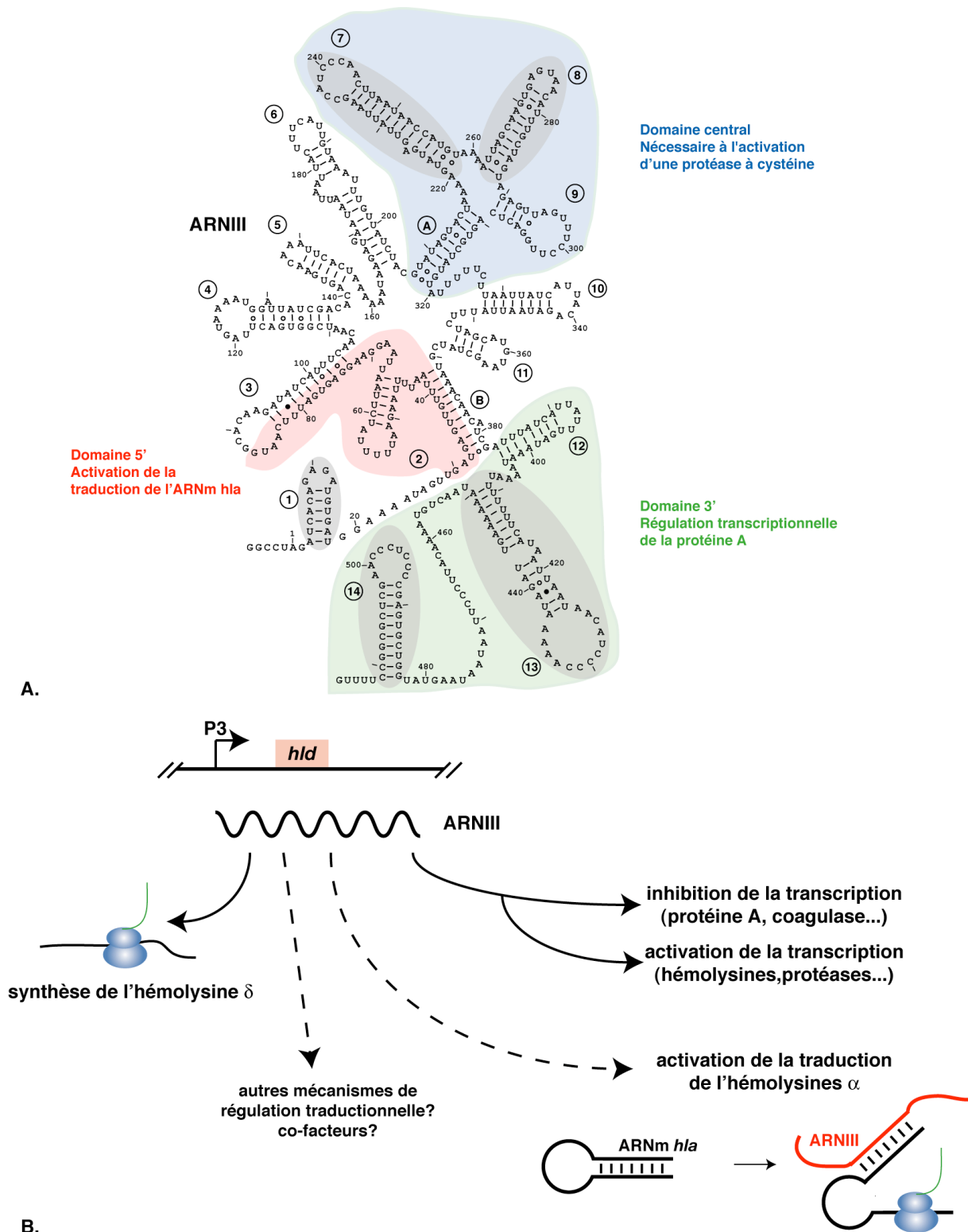


Figure 18 : Structure secondaire de l'ARNIII et domaines régulateurs identifiés (A) et état des lieux des mécanismes connus chez *S. aureus* (B). L'ARNIII est composé de 14 structures en tige-boucle et de deux interactions à longue distance. Les différents domaines régulateurs sont représentés selon un code couleur, de même que les structures en tige-boucle conservées entre souches de Staphylocoques, qui sont entourées en gris. L'ARNIII a plusieurs fonctions : il code pour l'hémolysine δ , il inhibe ou active l'expression de ses gènes cibles et il active la traduction de l'hémolysine α . L'existence d'autres mécanismes de régulation post-transcriptionnelle ou l'intervention de co-facteurs ne sont pas à exclure.

Plusieurs domaines fonctionnels distincts sont caractérisés. La région 5' de l'ARNIII présente des complémentarités de séquence avec la région 5' non codante de l'ARNm *hla*. La région de fixation du ribosome sur l'ARNm *hla* est séquestrée dans une structure secondaire stable. L'interaction entre l'ARNIII et l'ARNm est supposée libérer la région Shine et Dalgarno et induire la synthèse de l'hémolysine alpha (Morfeldt et al., 1995). Néanmoins, l'interaction entre les deux ARN n'est pas très efficace *in vitro*, et la compréhension détaillée de ce mécanisme reste à être étudiée. Par exemple, l'implication de co-facteurs pour optimiser ce contrôle n'est pas à exclure. Le domaine central, constitué des tiges-boucles 7, 8 et 9 est impliqué dans le contrôle d'une protéase à cystéine (Benito et al., 1998). Finalement, le domaine 3' est quant à lui nécessaire et suffisant pour le contrôle de la protéine A.

L'objectif de ce travail de thèse a été d'identifier les mécanismes d'actions mis en jeu par l'ARNIII, et par le domaine 3' en particulier. Nous avons émis l'hypothèse que l'ARNIII peut cibler d'autres gènes au niveau post-transcriptionnel. Ceci nécessite l'identification préalable de nouvelles cibles directes et de co-facteurs pour cet ARN. Basé sur différentes approches expérimentales *in vitro* et *in vivo*, nous avons identifié deux ARNm comme cibles du domaine 3'. Ces ARNm codent pour deux facteurs de virulence, la protéine A et la protéine SA1000. Les deux ARNm ainsi que les mécanismes de régulation dépendant de l'ARNIII présentent des caractéristiques communes. De ce travail, nous avons établi un certain nombre de règles qui nous ont conduit à l'identification de nombreuses cibles potentielles, grâce à l'utilisation d'approches globales. L'ARNIII semble agir principalement au niveau post-transcriptionnel. Cette observation pose la question de l'implication de la protéine Hfq comme co-facteur de l'ARNIII et de son rôle potentiel dans la virulence.

II. Un ARN antisens dans la régulation de la réplication plasmidique

L'ARN antisens CopA régule le taux de réplication du plasmide R1, comme décrit dans l'introduction (§ A.1.1.). Le mécanisme de formation du complexe inhibiteur entre CopA et sa cible, CopT, implique plusieurs étapes dans un ordre hiérarchique (Kolb et al., 2000a). Bien que l'ARN CopA est strictement complémentaire à sa cible, le duplex étendu n'est pas requis pour un contrôle efficace *in vivo*, mais implique un intermédiaire stable (Kolb et al., 2000b; Malmgren et al., 1997).

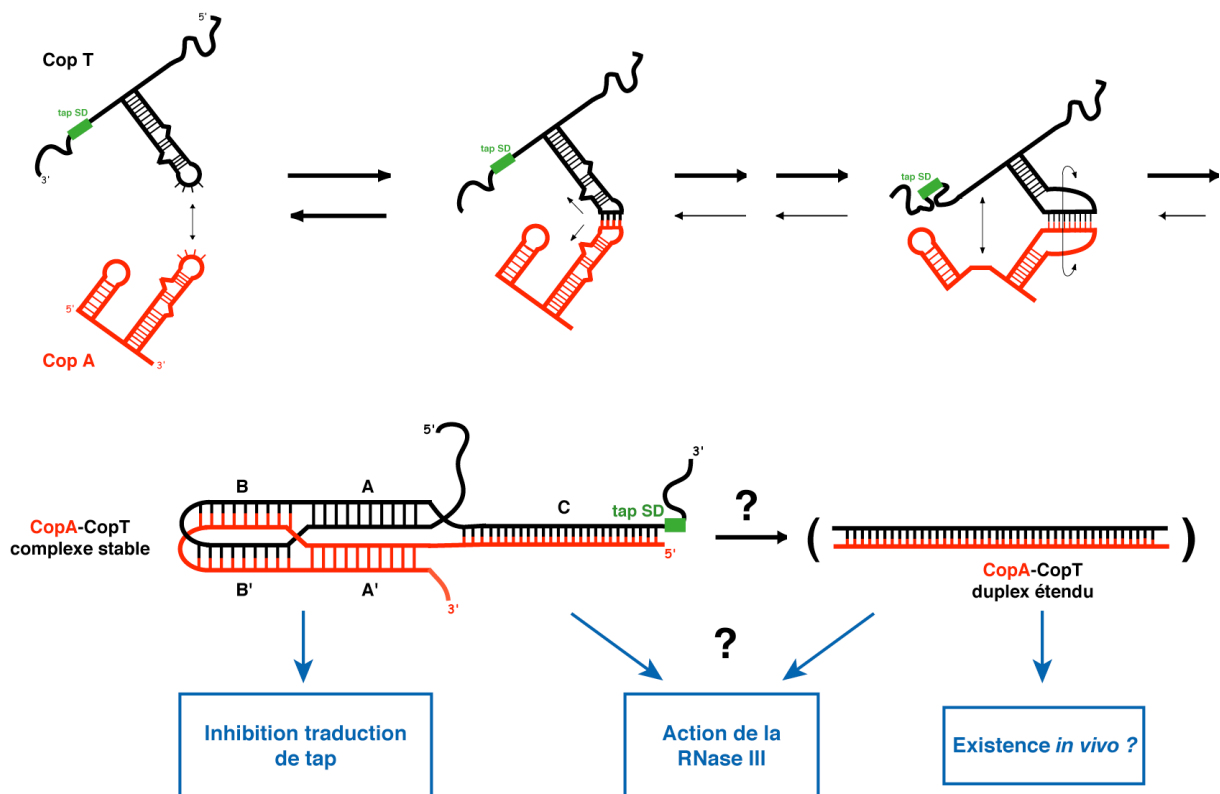


Figure 19 : Reconnaissance de CopA à sa cible, CopT et formation du complexe stable. Ce complexe est suffisant pour inhiber la traduction de *tap*. La conversion du complexe stable vers le duplex étendu ne semble pas se produire, et l'existence *in vivo* de ce dernier est incertaine. La RNase III intervient dans ce processus pour dégrader le complexe formé en se fixant au niveau de l'hélice intermoléculaire C.

Un de nos objectifs a été de définir les raisons qui bloquent la progression du complexe stable vers la formation d'un duplex étendu. La formation du complexe stable est dictée par la structure secondaire des deux ARN. Nous avons ainsi montré que les structures de l'ARN antisens et de sa cible ont évolué pour favoriser la formation rapide d'un complexe irréversible, en évitant les contraintes topologiques. La RNase III dégrade le complexe

inhibiteur ARN antisens-ARNm *repA*, mais cette étape contribue faiblement à l'efficacité du contrôle. Nous avons déterminé le site d'interaction de cette enzyme au complexe CopA-CopT et les éléments requis de ce complexe pour obtenir une dégradation efficace.

Finalement, afin d'élucider au niveau atomique la structure du complexe inhibiteur stable, nous avons entrepris la cristallisation de ce complexe. Les premiers criblages des conditions de cristallisation ont permis d'obtenir des microcristaux. Nous avons ensuite amélioré de manière significative la taille des cristaux obtenus en diminuant le nombre de points de nucléation.

La comparaison de ces deux systèmes permet de dégager quelques règles communes pour leurs modes d'action. Par exemple, les étapes de reconnaissance des ARN régulateurs avec leurs cibles respectives impliquent un contact initial de type boucle-boucle, qui dépend de la structure de l'ARN antisens et de sa cible. Ce contact initial est transitoire et est rapidement converti en un duplex plus stable. Ces deux ARN interviennent par ailleurs pour inhiber la traduction de leur ARNm cible. Cette inhibition se fait en masquant le site de fixation du ribosome et conduit à une dégradation rapide de l'ARNm. Dans les deux systèmes, la RNase III est la ribonucléase clé impliquée dans le processus de dégradation.

Résultats et discussion

I. Rôle de l'ARNIII dans la virulence de *Staphylococcus aureus*

A. Régulation post-transcriptionnelle de l'expression de la protéine A par l'ARNIII (Article n°1)

A.1. Objectifs

Plusieurs études ont été effectuées afin de définir le mode de régulation de la synthèse de la protéine A chez *S. aureus*. La protéine A est exprimée en début de phase exponentielle de croissance, puis son expression est inhibée en phase post-exponentielle puis stationnaire. Initialement, des expériences de fusion transcriptionnelle entre le promoteur du gène *spa* et un gène rapporteur ont montré que le locus *agr* exerce son activité régulatrice au niveau transcriptionnel (Novick et al., 1993; Patel et al., 1992; Vandenesch et al., 1991). Néanmoins, dans leurs constructions, les auteurs ont utilisé une partie de la région 5' non codante de l'ARNm dans leurs fusions, ce qui n'exclut pas un contrôle post-transcriptionnel. Il a été montré dans notre laboratoire que le domaine 3' de l'ARNIII est nécessaire et suffisant pour le contrôle de la synthèse de la protéine A (Benito et al., 2000). Le fait que nous ne puissions pas détecter l'ARNm *spa* lorsque l'ARNIII ou le domaine 3' sont présents indique que le contrôle peut s'effectuer au niveau de la stabilité de l'ARNm. De plus, nous avons observé une complémentarité de séquence entre le domaine 3' et la région 5' non codante de l'ARNm *spa*. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'ARNIII agirait au niveau post-transcriptionnel, *via* un mécanisme de type ARN antisens.

A.2. Stratégie expérimentale

La fonction du domaine 3' sur l'expression de la protéine A a été abordée par plusieurs approches complémentaires *in vivo* et *in vitro*. Les expériences *in vivo* ont été réalisées en collaboration avec S. Boisset et le Pr. F. Vandenesch (INSERM 0230, Lyon). Ainsi, l'utilisation de gènes rapporteurs a permis de tester l'effet de l'ARNIII sur la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle. *In vitro*, nous avons étudié la

formation du complexe par différentes approches. La vitesse de formation du complexe et sa stabilité ont été analysées par la technique de retard sur gel. Des délétions dans l'ARNIII ont été testées afin de vérifier que le domaine 3' est impliqué dans la formation du complexe. La cartographie en solution à l'aide de différentes sondes de structure chimiques et enzymatiques a permis d'établir les structures des deux ARN et les changements induits lors de la formation du complexe. Des détails sur les techniques de cartographie en solution de l'ARN sont situés au niveau de l'annexe 2. Des expériences de « toeprint » ont été effectuées afin de suivre la formation du complexe d'initiation de la traduction sur l'ARNm *spa*, en présence ou en absence de l'ARNIII. Finalement, l'implication de la RNase III, l'endoribonucléase spécifique des régions double-brin de l'ARN, a été testée dans des expériences d'hydrolyse *in vitro*. De plus, une souche délétée du gène codant pour cette protéine a été réalisée afin de vérifier *in vivo* son implication dans le mécanisme.

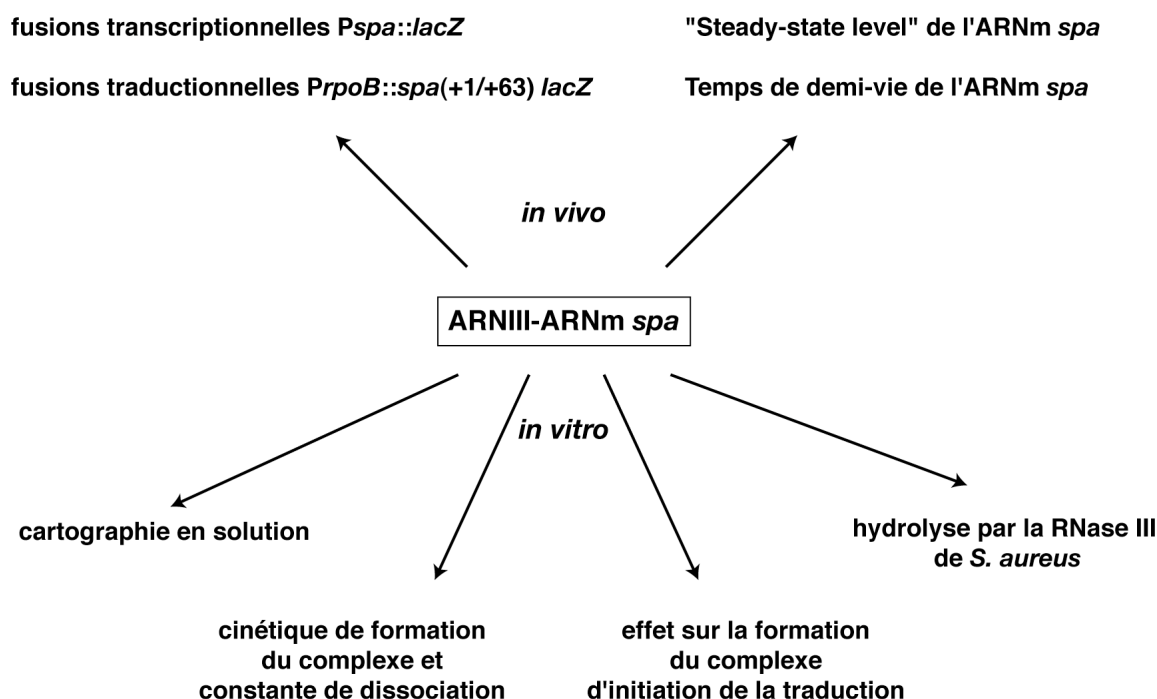


Figure 20 : Stratégie expérimentale pour l'étude de la régulation de la protéine A. Les expériences *in vivo* ont été réalisées dans une souche sauvage, dans une souche n'exprimant pas l'ARNIII, dans des souches exprimant des ARNIII mutants ou le domaine 3' et dans une souche délétée du gène codant pour la RNase III.

A.3. Résultats

Nous avons tout d'abord montré que l'ARNIII interagit avec la région de fixation du ribosome de l'ARNm *spa*. Une délétion de plusieurs nucléotides de l'ARNIII qui

réduit la complémentarité avec l'ARNm *spa* altère fortement l'interaction entre les deux ARN. Notamment, la délétion de résidus localisés au niveau de la boucle 13 abolit l'interaction entre les deux ARN *in vitro* et le contrôle *in vivo*. Ces données suggèrent fortement que la reconnaissance initiale entre les deux ARN implique une interaction boucle-boucle. Les expériences de cartographie en solution suggèrent que celle-ci est rapidement convertie en un duplex étendu qui masque le site Shine et Dalgarno et le codon d'initiation de la traduction. La fixation de l'ARNIII à l'ARNm *spa* est suffisamment rapide pour empêcher la formation du complexe d'initiation de la traduction *in vitro*. *In vivo*, la disparition de l'ARNm *spa* dans les souches exprimant l'ARNIII ou le domaine 3' suggère une dégradation rapide de ce dernier. Nous avons identifié *in vivo* et *in vitro* que le complexe ARNIII-ARNm *spa* et l'ARNm *spa* sont des cibles de la RNase III, qui est responsable de cette dégradation. L'inactivation du gène codant pour la RNase III, obtenue dans l'équipe de F. Vandenesch, abolit la répression traductionnelle de l'ARNm *spa*. Cette dégradation de l'ARNm est donc essentielle pour inhiber de manière irréversible la synthèse de la protéine A. De manière intéressante, nous avons été capable de co-purifier cette protéine avec l'ARNIII suite à des expériences de chromatographie d'affinité. *In vitro*, la protéine se lie à l'ARNIII et peut induire des coupures proches du domaine 3' et au niveau de l'hélice A. Toutefois, nous n'avons jamais observé de produits de maturation de l'ARNIII *in vivo*.

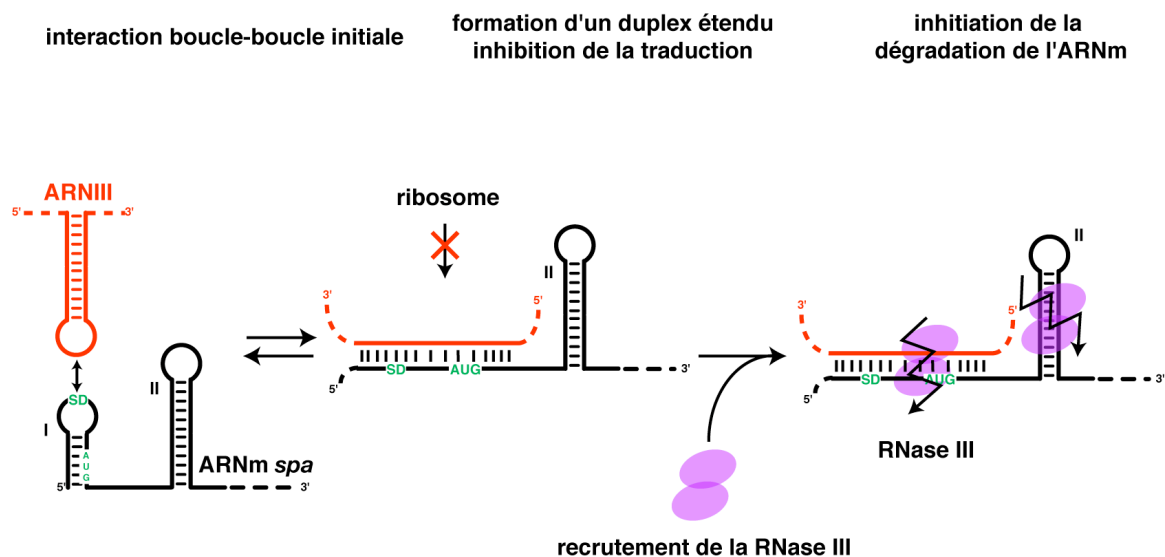


Figure 21 : Régulation de l'expression de la protéine A au niveau traductionnel. L'ARNm *spa* est la cible du domaine 3' de l'ARNIII. L'interaction initiale se fait par un contact boucle-boucle et est rapidement convertie en un duplex étendu. Ce duplex est reconnu par la RNase III, ce qui va entraîner la dégradation de l'ARNm. La tige-boucle II est également reconnue par la RNase III *in vitro* et contribue à la dégradation de l'ARNm *in vivo*.

A.4. Conclusions

Comme l'hémolysine α , la protéine A est régulée à la fois au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel par l'ARNIII. Ce double contrôle permet une régulation optimale de la synthèse de la protéine A, qui est un facteur majeur de l'expression du pouvoir pathogène de *S. aureus*. L'ensemble de nos résultats permettent de proposer le modèle suivant : en début de phase exponentielle de croissance, l'expression de la protéine A est maximale, notamment grâce à une activation de la transcription par les protéines SarS et Rot (Cheung et al., 2001; Oscarsson et al., 2005). En phase post-exponentielle et stationnaire de croissance, la synthèse de l'ARNIII est activée. Ce dernier exerce son contrôle au niveau post-transcriptionnel, *via* un mécanisme de type ARN antisens. Cette étape est aussi importante que le contrôle transcriptionnel, car l'ARNm *spa* est particulièrement stable dans la cellule. Le locus *agr* exerce également un contrôle au niveau transcriptionnel, mais le mécanisme reste encore inconnu (Cheung et al., 1997b; Gao et Stewart, 2004). Il a été montré que le locus *agr* induit une diminution de l'expression de SarS et de Rot, et cette observation pourrait expliquer l'effet observé au niveau transcriptionnel (McNamara et al., 2000; Schmidt et al., 2003). Finalement, d'autres voies de régulation interviennent pour inhiber la transcription du gène *spa*, comme les systèmes MgrA ou ArIRS (Liang et al., 2005; Luong et al., 2003).

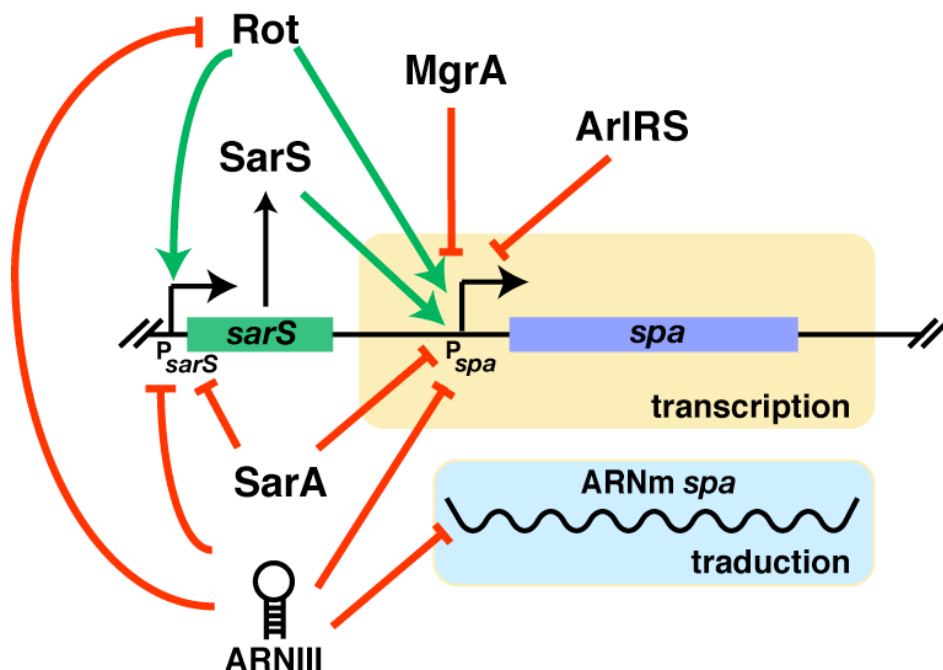


Figure 22 : Schéma récapitulatif des réseaux de régulation pour la protéine A. Les flèches vertes représentent une activation et les flèches rouge une inhibition.

Un résultat intéressant de cette étude est que l'ARNIII, ou le domaine 3', semble se comporter d'une manière similaire aux ARN antisens précédemment caractérisés. En effet, il reconnaît sa cible rapidement et le contact initial est une interaction de type boucle-boucle. Comme pour d'autres ARN antisens, le complexe formé entraîne la dégradation rapide de l'ARNm. Chez *E. coli*, la plupart des cibles des ARNnc sont des ARNm stables. C'est également le cas pour la protéine A, grâce à la présence d'une structure en tige-boucle à son extrémité 5' et un site de reconnaissance du ribosome fort qui, chez les bactéries gram positives, contribuent à stabiliser les ARNm (Condon, 2003). Cette stabilité peut expliquer la nécessité d'utiliser un ARN pour favoriser la dégradation de ces ARN. Cette caractéristique nous a servi pour l'identification de nouvelles cibles de l'ARNIII.

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

***Staphylococcus aureus* RNAIII and the endoribonuclease III coordinately regulate *spa* gene expression**

Eric Huntzinger, Sandrine Boisset, Cosmin Saveanu, Yvonne Benito, Thomas Geissmann, Abdelkader Namane, Gérard Lina, Jerome Etienne, Bernard Ehresmann, Chantal Ehresmann, Alain Jacquier, François Vandenesch and Pascale Romby

***The EMBO Journal*, 2005, Vol. 24, Pages 824–835**

Pages 824 à 835 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur : <http://www.nature.com/emboj/journal/v24/n4/full/7600572a.html>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

B. Identification de nouvelles cibles pour le domaine 3'

B.1. Régulation de l'expression de la protéine SA1000

L'ARNm *sa1000* possède des caractéristiques structurales identiques à l'ARNm *spa*. De plus, il possède des complémentarités de séquence avec le domaine 3', ce qui suggère fortement qu'il en est une cible directe. La protéine SA1000 est conservée dans les différentes souches qui ont été séquencées. Bien que sa fonction ne soit pas connue, elle semble appartenir à la famille des protéines capables de lier le fibrinogène, comme les protéines ClfA et ClfB. Elle est composée de 109 acides aminés et possède un signal d'export extracellulaire au niveau des 24 premiers acides aminés. Le reste de la protéine possède une forte homologie de séquence avec le motif N2 responsable de la liaison au fibrinogène présent dans les protéines ClfA et ClfB (figure 16). Ainsi, cette protéine pourrait se comporter de manière similaire aux protéines Emp, Eap et Efb, qui sont sécrétées par la bactérie et qui ont des fonctions communes dans l'adhésion de la bactérie et dans la modulation de la réponse immunitaire. Elles contribuent de manière significative dans la pathogénicité de *S. aureus*. Des expériences sont en cours afin de déterminer *in vitro*, par des tests elisa, si la protéine est effectivement capable de fixer le fibrinogène.

B.1.1. Expression du gène *sa1000* chez *S. aureus* et détermination du site de démarrage de la transcription

Des expériences de « Northern-blot » montrent que l'ARNm *sa1000* n'est pas détectable dans la souche sauvage de *S. aureus* (RN6390) en phase exponentielle de croissance. Il est cependant bien présent dans une souche n'exprimant pas l'ARNIII (WA400). Si le domaine 3' est exprimé dans la souche WA400, le taux d'ARNm diminue fortement (figure 23). Ces observations indiquent clairement que l'expression de la protéine SA1000 est sous le contrôle de l'ARNIII, et plus précisément du domaine 3'. Dans la souche Δrnc , l'ARNm *sa1000* est détectable, mais à un taux moindre que dans la souche WA400. Il semble donc que la RNase III soit requise pour un contrôle optimal et qu'elle participe à la dégradation de l'ARNm.

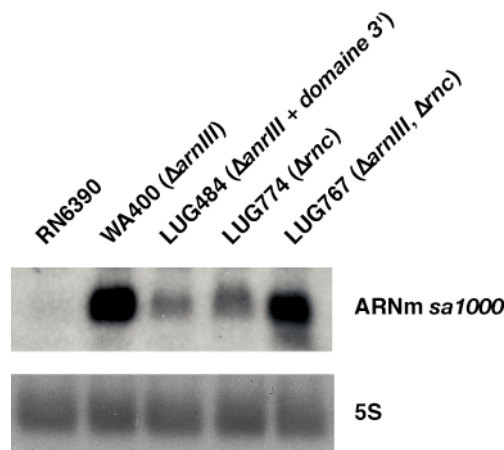


Figure 23 : « Steady-state level » de l'ARNm *sa1000* dans différentes souches de *S. aureus*. RN6390: souche sauvage, WA400; souche $\Delta rnaIII$. LUG484 : souche WA400 complétée avec le domaine 3'. LUG774 : Δrnc . LUG767 : $\Delta rnc, \Delta rnaIII$. Les ARN ont été extraits à partir de cellules en fin de phase exponentielle de croissance avec le kit « FastPrep RNA Blue Kit » de Qbiogen. Une quantité de 10 μ g d'ARN ont été déposés dans chaque piste. L'ARNm *sa1000* et l'ARNr 5S sont détectés grâce à des sondes ADN spécifiques uniformément marquées. La même membrane a successivement servie pour les deux hybridations.

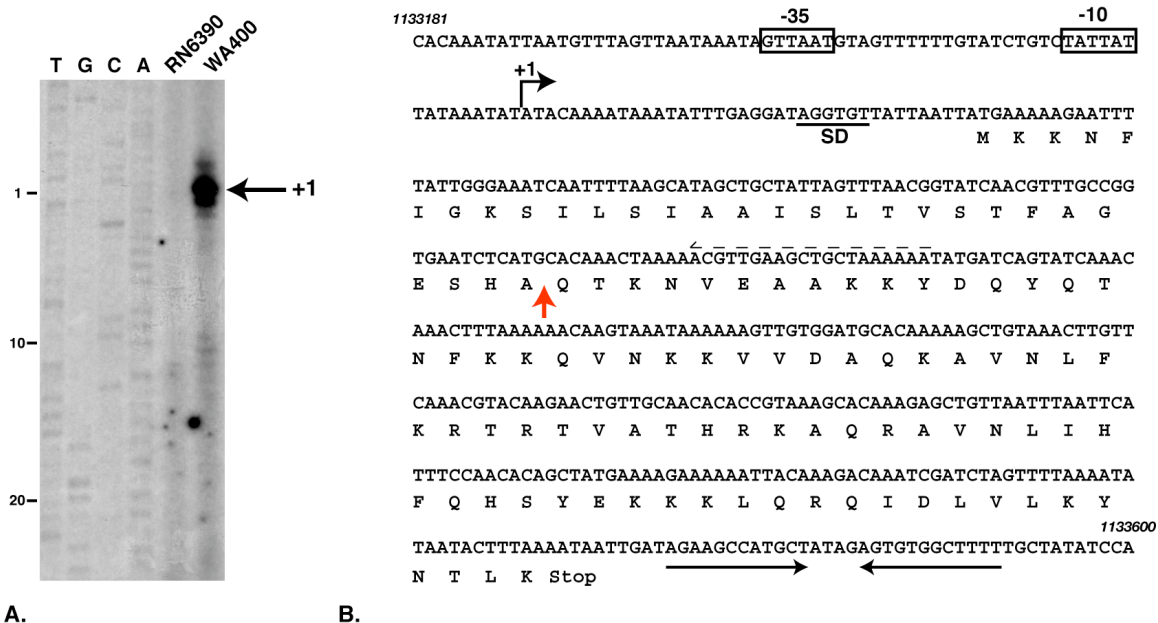


Figure 24 : Détermination du site d'initiation de la transcription de l'ARNm *sa1000* (A) et organisation du gène *sa1000* (B). (A) Expérience d'extension d'amorce avec des ARN totaux issus d'une souche sauvage ou d'une souche délétée du gène codant pour l'ARNIII. Le signal correspondant au site de démarrage de la transcription est indiqué par une flèche. La numérotation sur le côté du gel se réfère à la position +1. Une quantité de 20 μ g d'ARN totaux ont été hybridés au primer pendant 45 min à 65°C, puis soumis à la réaction d'extention d'amorce. (B) Séquence du gène *sa1000* et de la protéine SA1000. Les séquences promotrices, les sites de démarrage et de terminaison de la transcription et la séquence Shine et Dalgarno (SD) sont indiqués. La flèche rouge indique le site de clivage qui va permettre l'export de la protéine dans le milieu extracellulaire. La flèche en pointillés correspond au primer utilisé pour les expériences de transcriptase inverse. Les chiffres en italiques sont les coordonnées du gène *sa1000* dans le genome de *S. aureus* N315.

Le site de démarrage de la transcription de l'ARNm a été déterminé par extension d'amorce à la transcriptase inverse réalisée à partir d'ARN totaux. Avec une amorce spécifique pour l'ARNm *sa1000*, un signal est observé à partir des ARN totaux issus d'une souche WA400, alors qu'aucun signal n'est détecté dans une souche sauvage (figure 24).

B.1.2. Caractérisation *in vitro* de l'interaction entre l'ARNIII et l'ARNm *sa1000*

Les 200 premiers nucléotides de l'ARNm *sa1000* ont été clonés afin de produire *in vitro* l'ARN par l'ARN polymérase du bactériophage T7. La formation du complexe ARNIII-ARNm *sa1000* a été suivie par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions natives.

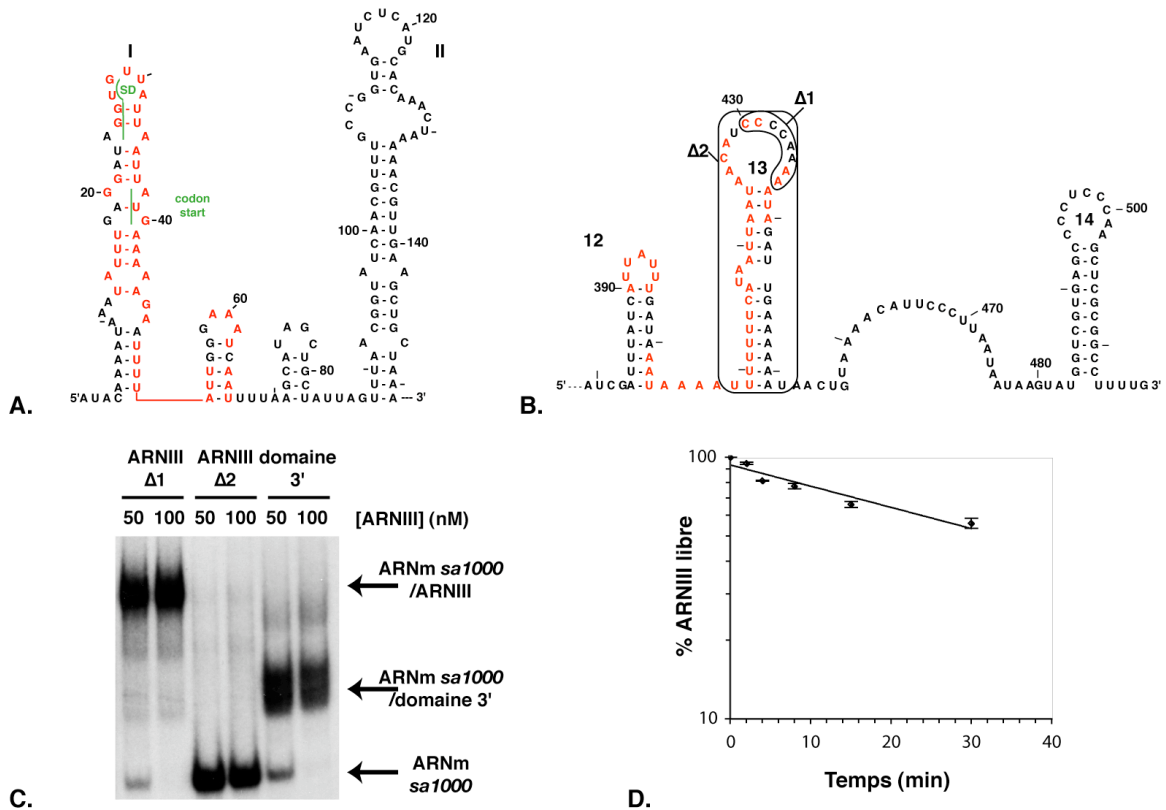


Figure 25: Structures secondaires de l'ARNIII et de l'ARNm *sa1000* et étude *in vitro* de leur interaction. (A) Structure secondaire de la région 5' de l'ARNm *sa1000* et (B) structure secondaire du domaine 3' de l'ARNIII. Les nucléotides complémentaires sont représentés en rouge. (C) Interaction de mutants de l'ARNIII et du domaine 3' avec l'ARNm *sa1000* marqué à son extrémité 5'. ARNIII Δ1 : délétion des nucléotides 430 à 437 ; ARNIII Δ2 : délétion de la tige-boucle 13. (D) Détermination de la constante de vitesse d'association du complexe. L'ARNIII marqué à son extrémité 5' est incubé avec l'ARNm *sa1000* à 37°C. Des aliquotes sont prélevés à différents temps et déposés sur gel de polyacrylamide en conditions natives. La quantification de l'ARN libre en fonction du temps permet de déterminer la constante de vitesse d'association (k_{app}).

La vitesse d'association est de $1.0 (\pm 0,3) 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$, ce qui est très proche de la valeur obtenue pour le complexe ARNIII-ARNm *spa*, mais aussi des complexes OxyS-ARNm *fhlA* ou CopA-CopT (voir introduction, chapitre 2, §A.1.1. et A.2.1.). La constante de dissociation du complexe est inférieure à 20 nM. De plus, il est possible de former un complexe entre l'ARNm *sa1000* et le domaine 3' seul. La délétion de la tige-boucle 13 (mutant $\Delta 2$) abolit l'interaction entre les deux ARN, alors que la délétion de certains nucléotides de la boucle 13 n'a pas d'effet (mutant $\Delta 1$, figure 25).

B.1.3. Le complexe formé entre les deux ARN recouvre le site d'initiation de la traduction de l'ARNm *sa1000*

La structure secondaire des ARN impliqués dans un mécanisme de régulation de type antisens est directement couplée à leur fonction. Nous avons donc déterminé la structure secondaire de la région 5' de l'ARNm *sa1000* à l'aide de sondes enzymatiques et chimiques, en présence ou en absence de l'ARNIII ou du domaine 3'. Dans ce type d'expériences, l'un des ARN est marqué à son extrémité 5' et est incubé avec l'ARN complémentaire à 37°C. Les sondes utilisées sont la RNase T1, spécifique des guanines non appariées, la RNase T2, spécifique des régions non appariées et avec une préférence pour les adénines, la RNase V1, spécifique des régions appariées et le plomb, spécifique des régions non appariées. Les résultats des expériences sont montrés sur la figure 26 et les réactivités sont indiquées sur la figure 27.

Les coupures induites par les RNases T1 et T2 sont principalement localisées dans les boucles apicales, les boucles internes et les régions simple-brin des deux ARN. Il en est de même pour les coupures au plomb, que l'on retrouve également dans des régions hélicoïdales peu stables. La fixation de l'ARNIII ou du domaine 3' à l'ARNm *sa1000* induit des changements de réactivité restreints à la région d'initiation de la traduction (+6 à +60). Ainsi, l'ARNIII induit des protections contre les hydrolyses par les RNases et par le plomb au niveau de la tige-boucle I de l'ARNm. Par ailleurs, plusieurs coupures par la RNase V1 apparaissent aux positions 60, 63-66 et 76. L'interaction avec l'ARNm *sa1000* induit des changements complémentaires au niveau de la tige-boucle 13 de l'ARNIII. L'ARNm induit de fortes protections vis-à-vis des coupures aux RNases et au plomb dans la région qui s'étend des nucléotides 410 à 430, ainsi qu'une augmentation de la réactivité

des nucléotides 433 à 450. De nouvelles coupures à la RNase V1 apparaissent également dans cette région. Ainsi, la formation du complexe ARNIII-ARNm *sa1000* implique une ouverture de la tige-boucle 13 de l'ARNIII et de la tige-boucle I de l'ARNm *sa1000*, pour former une hélice intermoléculaire d'une trentaine de paires de bases, interrompue par quelques résidus non appariés (figure 27).

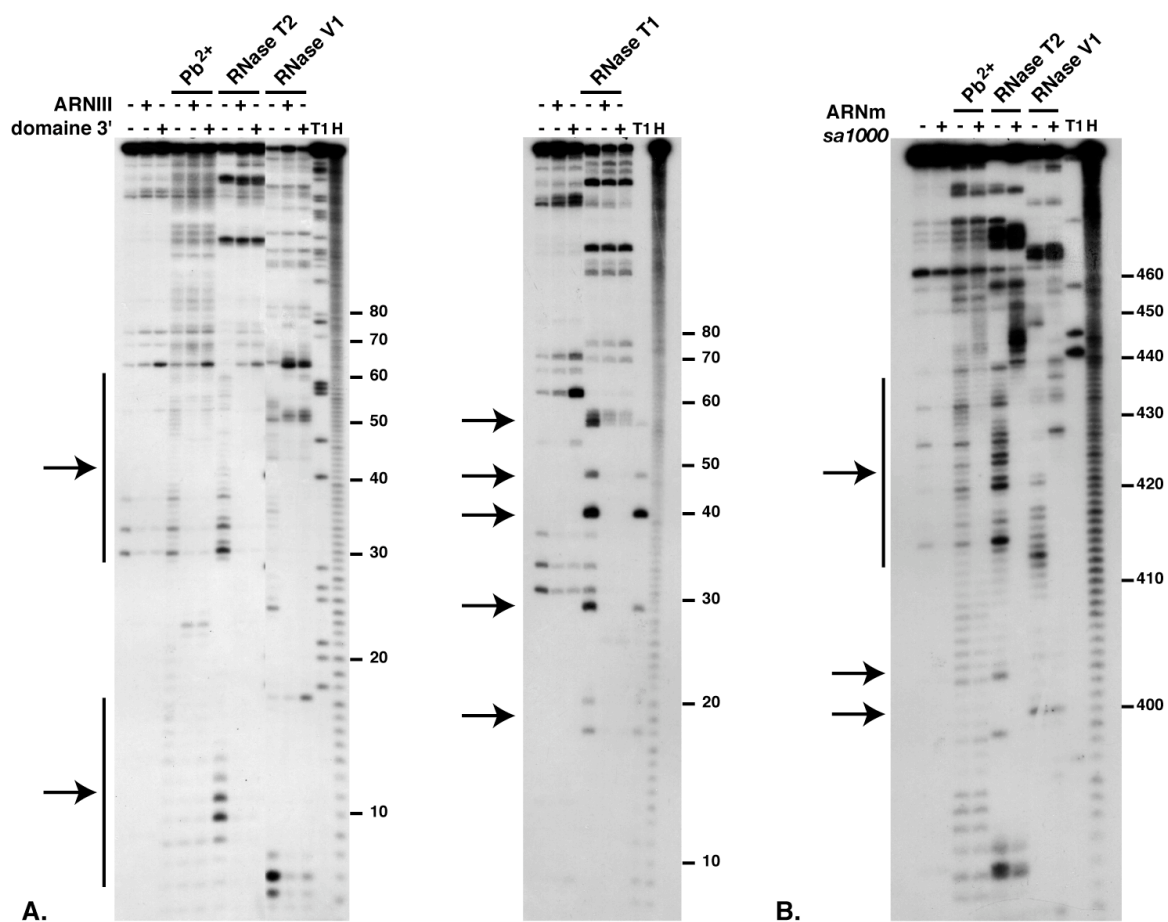


Figure 26 : L'ARNIII se fixe au niveau du site d'initiation de la traduction de *sa1000*. (A) Hydrolyse enzymatique de l'ARNm *sa1000* marqué à son extrémité 5', en présence (+) ou en absence (-) de l'ARNIII ou du domaine 3'. (B) Hydrolyse enzymatique du domaine 3' marqué à son extrémité 5', en présence (+) ou en absence (-) de l'ARNm *sa1000*. T1, H : hydrolyse en conditions dénaturantes par la RNase T1 et échelle alcaline, respectivement. Les flèches indiquent les changements de réactivité les plus importants. La formation des complexes se fait avec un excès molaire de trois fois en ARN froid pendant 15 min à 37°C. Les réaction d'hydrolyse se font à 37°C pendant 5 min, en présence de 0,1U de RNase T1, 0,05U de RNase T2, 0,01U de RNase V1 et de 40 mM d'acétate de plomb.

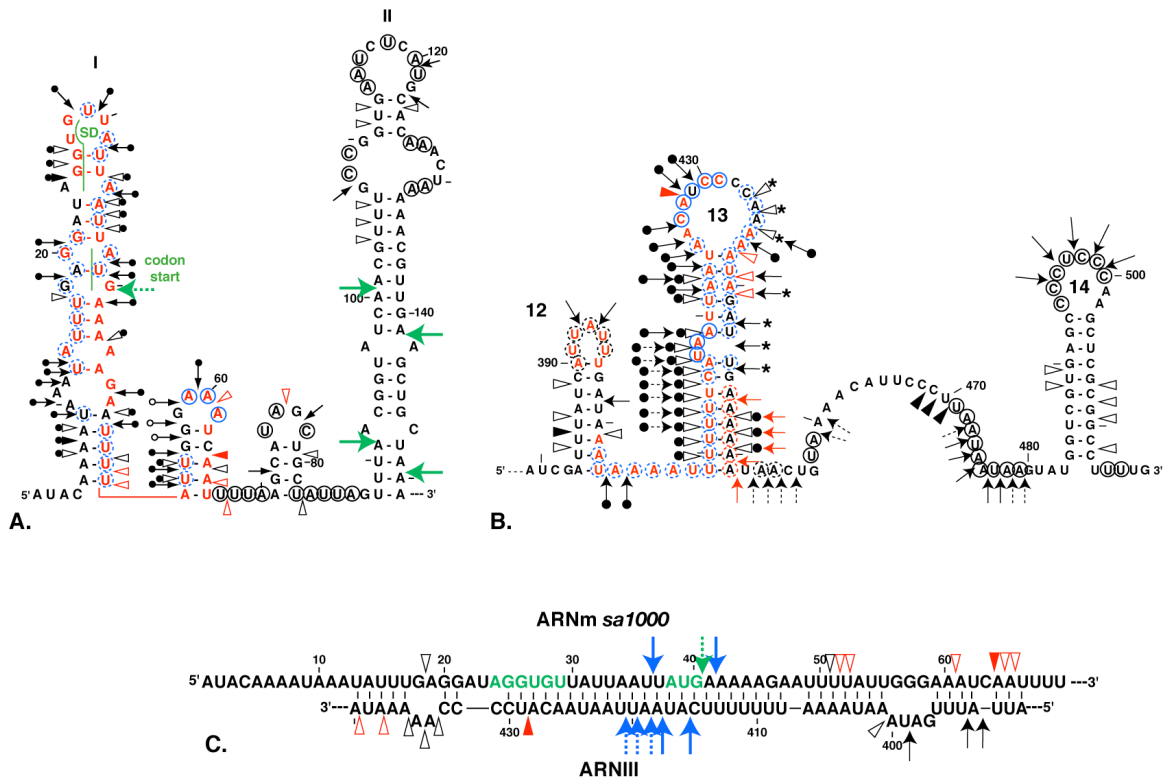


Figure 27: Modèles de structure secondaire des ARN libres et du complexe. Les résultats des expériences d'hydrolyse en solution sont représentés sur la structure secondaire de l'ARNm *sa1000* (A) et de l'ARNIII (B). Les symboles des coupures sont : RNase T1 (→), RNase T2 (→), RNase V1 (▶) modérée ou (▷) forte. Les cercles noirs ou blancs représentent les protections fortes ou modérées observées. Les augmentations de réactivité sont représentées par des astérisques. Les nouvelles coupures à la RNase V1 ou à la RNase T2 sont en rouge. Les coupures au plomb sont représentées par des cercles entourant les nucléotides. Les cercles bleus représentent les positions qui sont clivées dans les ARN seuls mais qui sont protégées lors de la formation du complexe. Les cercles rouges représentent les nouvelles coupures et les cercles noirs les coupures inchangées. Les coupures par la RNase III dépendantes de la formation du complexe sont montrées par des flèches bleues. Les coupures indépendantes sont montrées par des flèches vertes. (C) Modèle de structure secondaire du complexe formé entre l'ARNIII et l'ARNm *sa1000*.

B.1.4. La formation du complexe ARNIII-ARNm *sa1000*

bloque la formation du complexe d'initiation de la traduction

Puisque l'ARNIII séquestre la région Shine et Dalgarno, nous avons ensuite testé si le complexe ARNIII-ARNm *sa1000* pouvait empêcher la formation du complexe d'initiation de la traduction. Le complexe ternaire ribosome-ARNt^{fMet}-ARNm stable est visualisé grâce à des expériences d'extension d'amorce par la transcriptase inverse. En absence d'ARNIII, la formation de ce complexe donne une pause caractéristique en position +16 du codon d'initiation. Lorsque l'on ajoute des concentrations croissantes en ARNIII, ce signal diminue fortement. Ainsi, une inhibition de 90% dans la formation du complexe d'initiation de la traduction est obtenue dès que l'on est en concentrations équimolaires en ARNIII et en ARNm. En revanche, un ARNIII portant une délétion de la

tige-boucle 13 n'entraîne qu'une inhibition de 20% (figure 28). Ainsi, la formation d'un complexe entre l'ARNIII et l'ARNm empêche la fixation du ribosome et doit conduire à une inhibition de la traduction de l'ARNm.

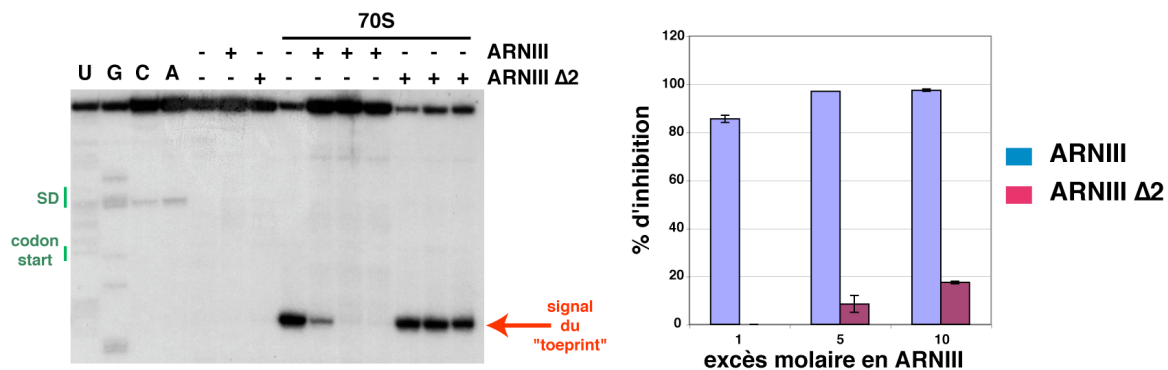


Figure 28: L'ARNIII empêche la formation du complexe ternaire d'initiation de la traduction. (A) La formation du complexe ternaire a été réalisée en absence (-) ou en présence (+) de l'ARNIII ou de l'ARNIII Δ2. U, G, C, A : séquençage aux didéoxynucléotides de l'ARNm *sa1000*. (B) Quantification de l'inhibition de la formation du complexe. Les expériences ont été reproduites trois fois indépendamment. SD : Shine et Dalgarno.

B.1.5. L'ARNIII régule l'expression de SA1000 au niveau post-transcriptionnel

Nous avons ensuite validé notre modèle *in vivo* au moyen de l'utilisation de fusions traductionnelles. La région régulatrice de l'ARNm *sa1000* a été fusionnée en phase avec le gène *lacZ* codant pour la β-galactosidase dans le vecteur pTCV-*lac*. Cette construction a été placée sous le contrôle d'un promoteur indépendant du locus *agr*, P_{rpoB} . L'activité β-galactosidase a ensuite été testée dans différentes souches de *S. aureus* : RN6390 (sauvage), WA400 ($\Delta rnaIII$), la souche délétée du gène codant pour la RNase III (Δrnc), la souche WA400 complétée avec le domaine 3' ou l'ARNIII Δ1 (délétion des nucléotides 430-437).

L'activité de la β-galactosidase est maximale dans la souche WA400, alors qu'elle diminue d'un facteur 3,5 dans la souche sauvage et d'un facteur 6 dans la souche WA400 exprimant soit le domaine 3' soit le mutant Δ1 (figure 29). La RNase III a un effet sur le contrôle, mais à un niveau moindre que celui que nous avons observé pour le contrôle de la protéine A. Ces résultats se corrént aux expériences *in vitro* et montrent que l'ARNm *sa1000* est contrôlé *via* un mécanisme proche de celui de l'ARNm *spa*.

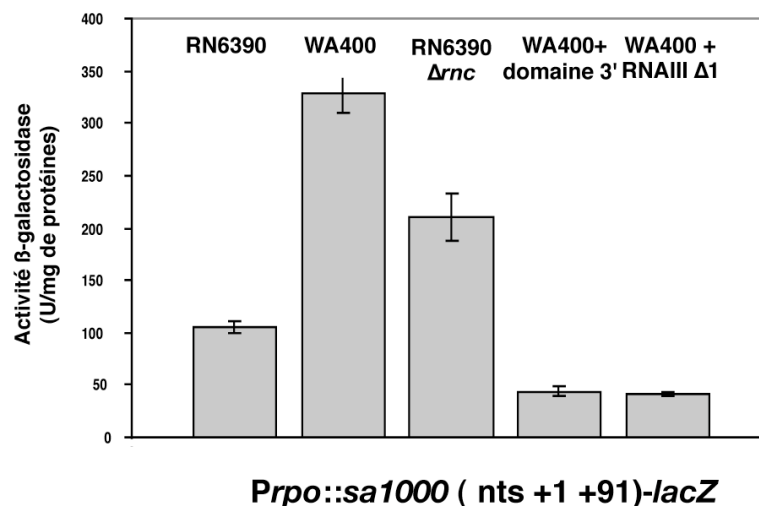


Figure 29 : Mesure de l'activité β -galactosidase pour différentes constructions. La fusion $P_{rpoB}::sa1000 (+1/+91)/lacZ$ est testée dans les souches RN6390, WA400, RN6390 Δrnc , WA400+domaine 3' et WA400+ARNIII $\Delta 1$. L'activité β -galactosidase est exprimée en unité arbitraires par milligramme de protéine. Les résultats de trois expériences indépendantes sont montrés.

B.1.6. Hydrolyse *in vitro* du complexe ARNIII-ARNm *sa1000*

Du fait que la RNase III augmente l'efficacité du contrôle (figure 23, 29), nous avons analysé le profil de coupures *in vitro* sur les ARN libres ou en duplex (figure 30). La RNase III induit plusieurs coupures dans la tige-boucle II de l'ARNm, alors que dans les mêmes conditions l'ARNIII est très peu coupé. Après formation du complexe, de nouvelles coupures apparaissent et sont localisées au niveau de la région d'appariement entre l'ARNIII et l'ARNm *sa1000* (figure 27, 30).

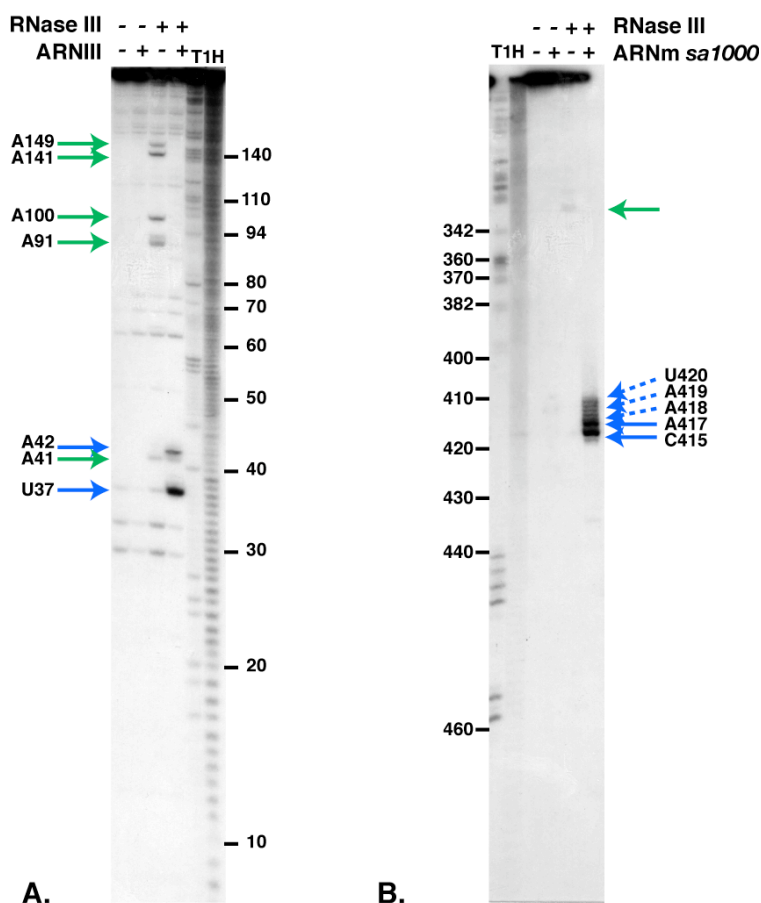


Figure 30 : Hydrolyse du complexe ARNIII-ARNm sa1000 par la RNase III. (A) L'ARNm *sa1000*, marqué à son extrémité 5', est incubé en présence (+) ou en absence (-) de l'ARNIII. (B) L'ARNIII, marqué à son extrémité 3', est incubé en présence (+) ou en absence (-) de l'ARNm *sa1000*. La formation des complexes se fait avec un excès molaire de trois fois en ARN froid pendant 15 min à 37°C. Les réactions avec la RNase III se déroulent à 37°C pendant 10 minutes. Les flèches bleues représentent les coupures dans les ARN seuls et les flèches vertes sont les coupures dépendantes de la formation du complexe. Ces coupures sont montrées sur les structures secondaires des ARN de la figure 27.

B.2. Conclusion

Ainsi, toutes nos données *in vitro* et *in vivo* montrent que l'expression de la protéine SA1000 est régulée par un mécanisme analogue à celui de la protéine A. Le domaine 3' séquestre la région d'initiation de la traduction et bloque l'accès du ribosome à l'ARNm. Le complexe formé devient une cible de la RNase III qui va initier la dégradation de l'ARNm en coupant dans le complexe mais également dans la tige-boucle II. Finalement, comme pour l'ARNm *spa*, l'ARNm *sa1000* est relativement stable pour un ARNm bactérien, avec un temps de demi-vie de 8 minutes.

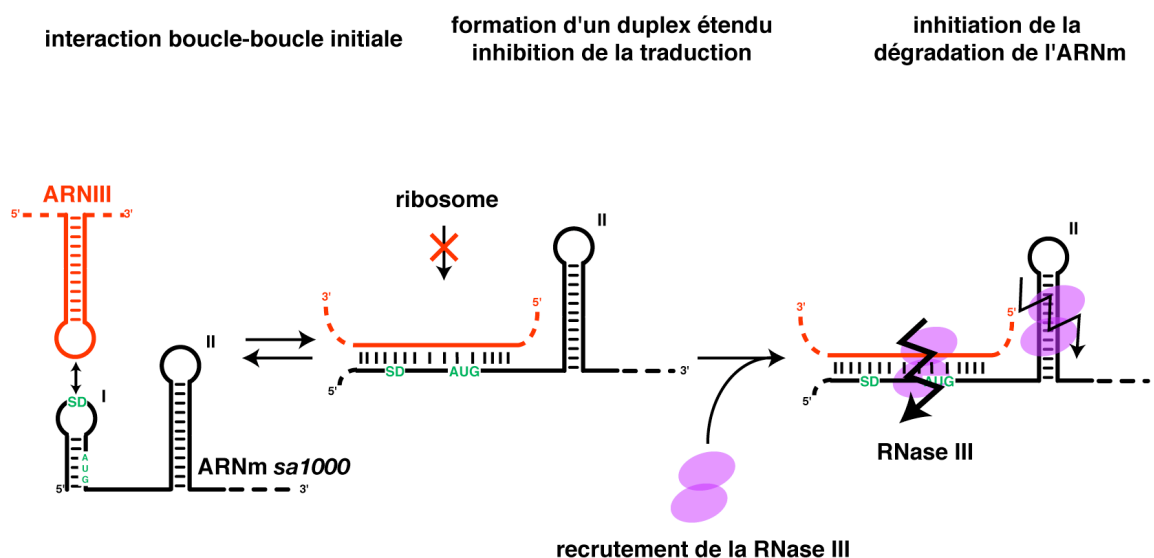


Figure 31 : Schéma récapitulatif de la régulation traductionnelle de la protéine SA1000. L'ARNm *sa1000* est la cible du domaine 3' de l'ARNIII. Après l'interaction boucle-boucle initiale, il y a formation d'un duplex étendu qui empêche la fixation du ribosome à l'ARNm. La RNase III intervient ensuite pour induire la dégradation du complexe.

C. Le domaine 3', un domaine multifonctionnel

Les résultats obtenus pour la protéine SA1000 nous ont ensuite encouragés à poursuivre la recherche de nouvelles cibles pour le domaine 3'. Pour cela, deux approches globales ont été utilisées dans l'équipe : une étude comparative du protéome de différentes souches de *S. aureus* et une étude bioinformatique, en collaboration avec C. Gaspin (Toulouse).

C.1. Recherche de nouvelles cibles du domaine 3' par étude du protéome

Le profil comparatif des protéines cytoplasmiques, sécrétées et de la paroi ont été analysées dans l'équipe par M. Possedko et P. Fechter, à partir des souches sauvages (RN6390), WA400 (*ΔrnaIII*) et la souche WA400 complémentée avec un plasmide exprimant le domaine 3'. Il apparaît que ce domaine est suffisant pour réguler l'expression de plusieurs facteurs de virulence. En phase exponentielle et stationnaire de croissance, ce domaine induit l'activation de plusieurs exoprotéines, dont des protéases à sérines (SplA, SplB et SplF) qui appartiennent à un même opéron, l'hémolysine α , l'hémolysine β et le précurseur de la protéine triacylglycérol lipase. En parallèle, il réprime la synthèse de trois protéines cytoplasmiques : la D-lactate déshydrogénase, une protéine putative de la biosynthèse de la pyridoxine et l'ornithine carbomoyltransférase, qui est impliquée dans le métabolisme de l'arginine. Cette analyse a aussi montré que le domaine 3' est suffisant pour réprimer la synthèse de la protéine A, en accord avec nos travaux précédents.

Ainsi, le domaine 3' semble induire des effets multiples dans la cellule. De manière intéressante, ce domaine agit à la fois comme activateur ou inhibiteur de l'expression de gènes. Néanmoins, ces données ne permettent pas de déterminer les mécanismes mis en jeu et il est fort probable que de nombreux effets aient une origine indirecte.

C.2. Recherche de nouvelles cibles du domaine 3' par bioinformatique.

Une étude *in silico* a été réalisée, en collaboration avec C. Gaspin (INRA, Toulouse), afin de caractériser les régions de -30 à +30 autour du site d'initiation de la traduction des phases ouvertes de lecture annotées dans plusieurs génomes de *S. aureus*, et qui contiennent des séquences complémentaires à la tige-boucle 13 de l'ARNIII. La stabilité du complexe formé, représenté par sa variation d'énergie libre ΔG , permet de repérer les candidats intéressants. De même, seuls sont pris en compte les complémentarités qui recouvrent le site Shine et Dalgarno de l'ARNm. Les résultats sont présentés dans le tableau 10.

Cette étude nous permet de retrouver les deux cibles que nous avons validé expérimentalement, la protéine A et SA1000. Parmi les autres cibles potentielles, plusieurs sont particulièrement intéressantes. On retrouve deux facteurs de virulence, la coagulase et un facteur antigène sécrété. Ces protéines sont exprimées précocement durant la croissance bactérienne et sont soumises à une régulation par le locus *agr* (Blevins et al., 1999). La coagulase appartient à la famille des adhésines et permet l'adhésion de *S. aureus in vitro* (Switalski et al., 1993). Son inactivation entraîne une diminution dans des modèles animaux d'endocardites (Patti et al., 1994). Les protéines Rot et SarT sont des facteurs de transcription apparentés à la famille *sar*. La valeur de ΔG pour SarT n'est pas très haute, mais sachant que l'ARNIII contrecarre l'action de cette protéine, il serait intéressant de vérifier si un contrôle post-transcriptionnel existe. La protéine Rot agit aussi de manière opposée à l'ARNIII, puisqu'elle est requise pour l'activation de l'expression de la protéine A et qu'elle réprime la synthèse de nombreuses exoprotéines, dont les protéases à sérines Spl. Une régulation de l'ARNm *rot* par l'ARNIII permettrait d'expliquer de nombreux effets indirects de l'ARNIII sur ses gènes cibles (Said-Salim et al., 2003).

Une autre cible intéressante est la peptidoglycane hydrolase (Ramadurai et Jayaswal, 1997). Récemment au laboratoire, T. Geissmann et M. Possedko ont observé que les souches de *S. aureus* n'exprimant pas l'ARNIII sont beaucoup plus sensible au phénomène d'autolyse que les souches sauvages. La complémentation de ces souches avec le domaine 3' est suffisante pour faire disparaître ce phénotype. La région Shine et

Dalgarno de l'ARNm codant pour la peptidoglycane hydrolase est une cible potentielle du domaine 3'. On peut supposer que cette enzyme est responsable de l'autolyse des bactéries et que le domaine 3', lorsqu'il est présent, exercera une action d'antitoxine. Sur la figure 32 sont représentées les structures secondaires des ARNm codant pour la coagulase et le facteur antigène secrète. Les complexes formés entre l'ARNIII et les ARNm *coagulase*, *Ssa*, *rot* et *lytM* sont représentés. Les ARN ciblés adoptent en général une structure similaire à celle des ARNm *spa* et *sa1000*, avec une structure en tige-boucle placée à l'extrémité 5' qui doit contribuer à leur stabilité.

gène	protéine	fonction	ΔG (kcal/mol)	complémentarité	tige-boucle en 5'
<i>sa1000</i>	protéine hypothétique, liaison au fibrinogène	virulence ?	-20,9	SD-AUG	+
<i>sa2353</i>	Ssa, précurseur antigène secrété	virulence	-20,4	SD-AUG	+
<i>sa0355</i>	protéine hypothétique	virulence ?	-19,41	SD-AUG	-
<i>sa0918</i>	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	métabolisme	-18,63	SD-AUG	-
<i>Rot</i>	Rot	facteur de transcription, virulence	-18,6	SD-AUG	+
<i>sa0064</i>	similaire à la transposase	transposition ?	-18,5	SD-AUG	+
<i>sa0104</i>	similaire régulateur de transcription GlnTR	transcription ?	-18,3	SD-AUG	-
<i>sa1183^a</i>	canal mécanosensible	transport ?	-17,3	SD-AUG	+
<i>sa0851</i>	oligonucléotide ABC transporteur	transport ?	-16,77	SD-AUG	+
<i>sa0579</i>	similaire transporteur à protons	transport ?	-16,3	SD-AUG	+
<i>spa</i>	protéine A	virulence	-16,09	SD-AUG	+
<i>sa0299</i>	similaire à la carbohydate kinase	métabolisme des sucres ?	-16,03	SD	+/-
<i>sa0857</i>	similaire transporteur magnésium	transport ?	-14,89	SD-AUG	+/-
<i>sa1012^b</i>	ornithine carbamoyltransférase	biosynthèse de l'arginine	-14,05	SD-AUG	+
<i>sa0222</i>	précurseur de la coagulase	virulence	-13,6	SD-AUG	+
<i>sa1234</i>	protéine de réponse au choc froid	réponse au stress	-13,42	SD-AUG	+
<i>sa0828</i>	sous-unité A de l'ATP dépendante nuclease	métabolisme	-12,93	SD-AUG	-
<i>sa0265</i>	peptidoglycane hydrolase	paroi ?	-12,73	SD-AUG	+/-
<i>sa1054</i>	flavoprotéine	métabolisme du panthoténate	-11,87	SD-AUG	+
<i>sa0172</i>	protéine membranaire	transport ?	-10,63	SD-AUG	+
<i>sarT</i>	SarT	virulence	-10,3	SD-AUG	+

Tableau 10 : Analyse par bioinformatique de cibles potentielles du domaine 3'. Les régions de complémentarité sont indiquées et correspondent au site Shine et Dalgarno (SD) et au codon d'initiation de la traduction (AUG). La présence d'une structure en tige-boucle bien définie, mal définie ou absente à l'extrémité 5' de l'ARNm est indiqué par le signe (+), (+/-) et (-) respectivement. Le logiciel Mfold a été utilisé pour calculer la valeur ΔG du complexe et pour déterminer la présence des structures en tige-boucle (Zuker, 2003). ^a: expression diminuée d'un facteur 3 en présence de l'ARNIII (transcriptome). ^b: expression diminuée d'un facteur 3 en présence de l'ARNIII (protéome, P. Fechter, communication personnelle).

Finalement, plusieurs protéines impliquées dans des voies métaboliques ainsi que des protéines membranaires impliquées dans le transport de petites molécules sont des cibles potentielles du domaine 3'. Si ces résultats sont confirmés expérimentalement, le domaine 3' remodelerait la composition de sa membrane plasmique et de sa paroi. Ces changements auraient des conséquences au niveau de la virulence, avec l'inhibition de la synthèse de certaines protéines d'adhésion, mais aussi au niveau du métabolisme de la bactérie, avec une modification du profil d'expression de nombreux systèmes de transport et d'enzymes clés du métabolisme. En fin de phase exponentielle de croissance, la bactérie synthétise un grand nombre de toxines, de nucléases et de protéases. De nombreux nutriments sont alors disponibles dans le milieu externe, et la bactérie a besoin de systèmes de transport pour ces métabolites différents de ceux qu'elle utilisait en phase exponentielle de croissance. De plus, avec la mise à disposition de ces métabolites, il peut sembler logique que la bactérie n'ait plus besoin d'utiliser ses propres voies de biosynthèse.

D. La protéine Hfq, co-facteur de l'ARNIII

Nos résultats précédents suggèrent fortement que l'ARNIII agirait principalement comme un ARN antisens. Comme il a été décrit dans l'introduction, la protéine Hfq est associée à de nombreux ARN antisens identifiés chez *E. coli*. De plus, cette protéine est conservée chez de nombreux organismes pathogènes, comme *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes* ou *Brucella abortus*. Il est à noter que, contrairement à *E. coli*, l'inactivation du gène *hfq* chez ces bactéries n'induit pas de phénotypes marqués au niveau de la croissance cellulaire mais plutôt des phénotypes reliés à la réponse aux stress ou à la virulence (Christiansen et al., 2004; Ding et al., 2004; Lenz et al., 2004 ; Robertson et Roop, 1999; Roop et al., 2002; Sonnleitner et al., 2003). Il nous a donc paru essentiel de vérifier si cette protéine, qui est aussi présente chez *S. aureus*, est un ligand de l'ARNIII et si elle joue un rôle dans la virulence.

D.1. Caractérisation de l'interaction entre l'ARNIII et Hfq

D.1.1. Etude de la fixation de Hfq à l'ARNIII

Le gène *hfq* a été cloné sous forme de protéine de fusion avec la « Maltose Binding Protein » dans le vecteur pMAL (New England Biolabs) en vue de la surproduire chez *E. coli*. La protéine de fusion empêche la formation de l'hexamère d'Hfq, ce qui limite la contamination par la protéine Hfq d'*E. coli*. Elle a été purifiée par chromatographie d'affinité, suivie d'une colonne échangeuse d'ions de type MonoQ. Cette étape permet d'éliminer une grande partie des acides nucléiques contaminants. Des anticorps spécifiques anti-Hfq ont été préparés et ont été utilisés pour co-immunoprécipiter *in vivo* l'ARNIII et la protéine Hfq endogène chez *S. aureus* (article 2). *In vitro*, nous avons montré que Hfq reconnaît l'ARNIII avec une affinité de 0,5 μ M. Cette affinité est probablement sous-estimée à cause de la présence d'ARN contaminants dans la préparation. Cependant, cette interaction est relativement spécifique puisque l'ARNt total, la région 5' de l'ARNm de l'hémolysine α ou l'ARN CopT ne déplacent l'ARNIII qu'aux plus hautes concentrations (figure 34). Finalement, des expériences préliminaires ont été réalisées pour déterminer la stœchiométrie du complexe

ARNIII Hfq, mais nos résultats ne sont pas interprétables et nécessiteront l'utilisation d'autres approches comme la calorimétrie ou l'ultracentrifugation.

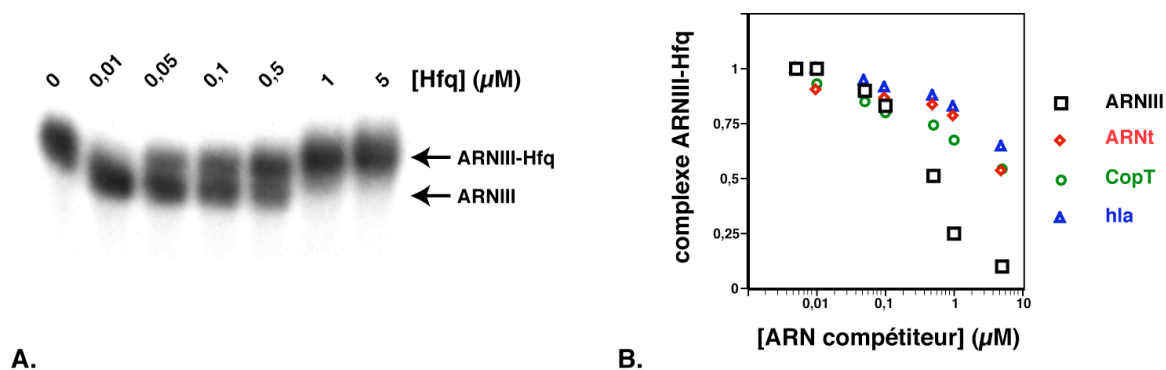


Figure 34 :Interaction in vitro entre l'ARNIII et Hfq. (A) Expérience de retard sur gel. L'ARNIII est uniformément marqué et est incubé pendant 15 min à 20°C avec des quantités croissantes de protéine Hfq purifiée. (B) Expériences de compétitions entre l'ARNIII et différents ARN pour déterminer la spécificité d'interaction entre l'ARNIII et Hfq.

D.1.2. Empreinte de la protéine Hfq sur l'ARNIII

Nous avons ensuite déterminé les sites d'interaction entre l'ARNIII et Hfq par des expériences d'empreinte en solution. Les sondes utilisées ont été la RNase T2, la RNase V1 et l'acétate de plomb. En présence de la protéine Hfq, on observe des protections fortes localisées dans trois régions distinctes de l'ARNIII riches en A/U. Il s'agit de la tige-boucle 2, de la tige-boucle 6 et d'une région comprise entre les nucléotides 320 à 327 (figure 35). Avec la RNase V1, on observe au contraire une augmentation de la réactivité au niveau de la tige-boucle 2, ce qui suggère que la protéine Hfq stabiliserait cette structure. Un tel effet a été observé pour l'ARNnc DsrA interagissant avec la protéine Hfq d'*E. coli* (Brescia et al., 2003). Cependant, nous n'avons pas observé de changement de structure important dans l'ARNIII après fixation de Hfq, comme cela avait été montré pour les ARN OxyS et Spot42 (Moller et al., 2002a ; Zhang et al., 2002a). De manière intéressante, Hfq interagit avec l'ARNIII au niveau de deux domaines régulateurs connus. Le site comprenant la tige-boucle 2 est impliqué dans l'activation traductionnelle de l'hémolysine α , par un mécanisme de type antisens. Le domaine central est requis pour la régulation de l'expression d'une protéase à cystéine par un mécanisme encore inconnu.

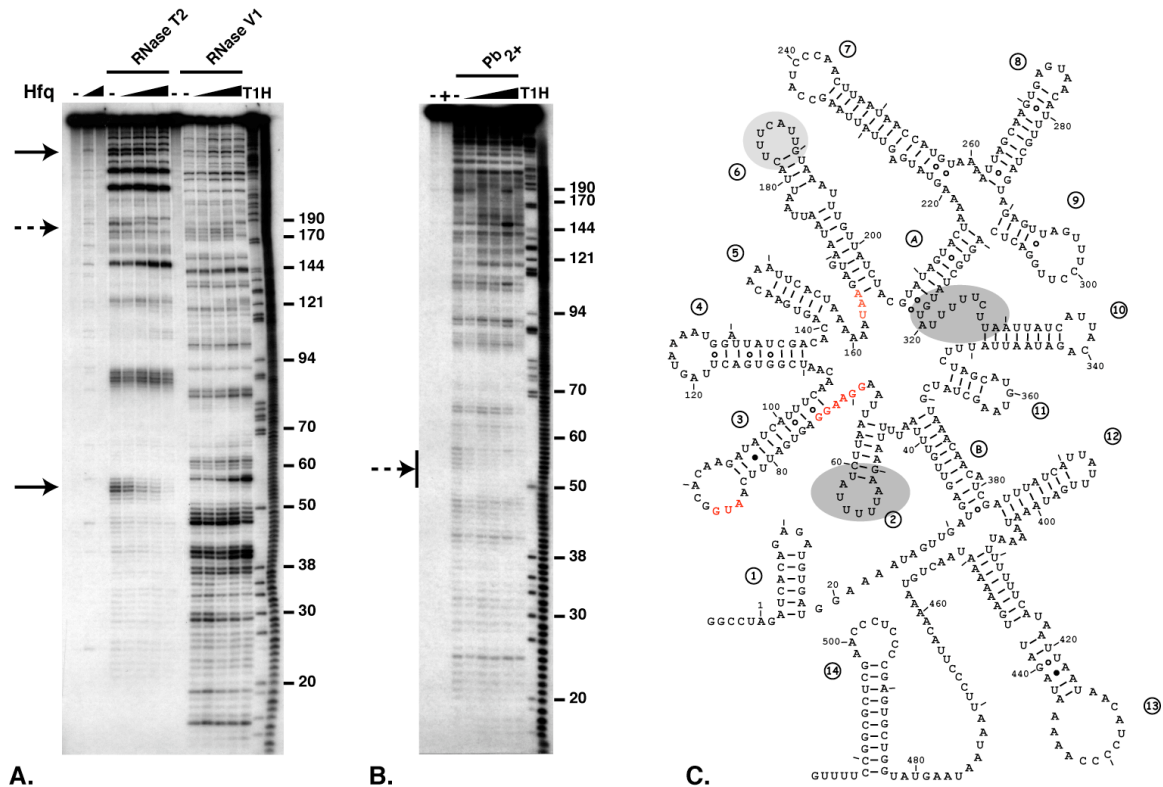


Figure 35: Empreinte de la protéine Hfq sur l'ARNIII. (A) L'ARNIII marqué à son extrémité 5' est incubé en présence de concentrations croissantes en protéine Hfq (0,05, 0,1, 0,5 et 1 µM), puis soumis à une hydrolyse par les RNases T2 (0,05U) et V1 (0,02U). (B) identique que pour (A) mais l'hydrolyse est réalisée en présence d'acétate de plomb (40 mM). T1 : hydrolyse à la RNase T1 en conditions dénaturantes. H : hydrolyse alcaline. + et - représentent la présence ou l'absence, respectivement, de la protéine Hfq. (C) Structure secondaire de l'ARNIII. Les régions protégées par la protéine Hfq sont représentées par des zones grises dont l'intensité représente l'intensité des protectins observées dans les expériences d'empreinte en solution.

D.2. Rôle de Hfq sur les interactions entre l'ARNIII et ses cibles directes

Dans un premier temps, l'effet de Hfq sur l'interaction entre l'ARNIII et l'ARNm *spa* a été testé. Aucun effet significatif n'a été détecté sur la vitesse d'association ou sur la stabilité du complexe ARNIII-ARNm *spa* (article 2, figure 6). De plus, une souche inactivée pour le gène *hfq* a été obtenue dans le laboratoire du Pr. Vandenesch. L'étude du protéome des protéines de la paroi montre que le contrôle de l'expression de la protéine A n'est pas perturbé dans cette souche. Il est probable que l'on puisse extrapoler ce résultat aux autres cibles directes du domaine 3', comme la protéine SA1000 par exemple.

En revanche, on peut supposer que la fixation de Hfq sur l'ARNIII au niveau du site d'interaction avec l'ARNm de l'hémolysine α (*hla*) puisse favoriser la formation du

complexe ARNIII-ARNm *hla* (figure 36). Ce complexe se forme difficilement à 37°C, ce qui laisse la porte ouverte à l'intervention d'un autre facteur. De nombreuses tentatives ont été menées afin de valider cette hypothèse, mais les résultats obtenus sont peu convaincants. En effet, il n'a jamais été possible d'obtenir une augmentation du taux de complexe ARNIII-ARNm *hla* en présence de la protéine Hfq. Un effet inverse a même été obtenu, ou Hfq inhiberait l'interaction entre les deux ARN (figure 37). Une étude plus détaillée est nécessaire afin de définitivement répondre à cette question. Par ailleurs, l'activité ATPasique qui a été décrite pour Hfq devra être testé pour voir si elle a un rôle dans ce mécanisme (Sukhodolets et Garges, 2003). Des études *in vivo* devraient également aider à définir la fonction de Hfq en analysant l'expression d'un gène rapporteur fusionné à la région régulatrice de l'ARNm *hla* dans la souche délétée du gène *hfq*.

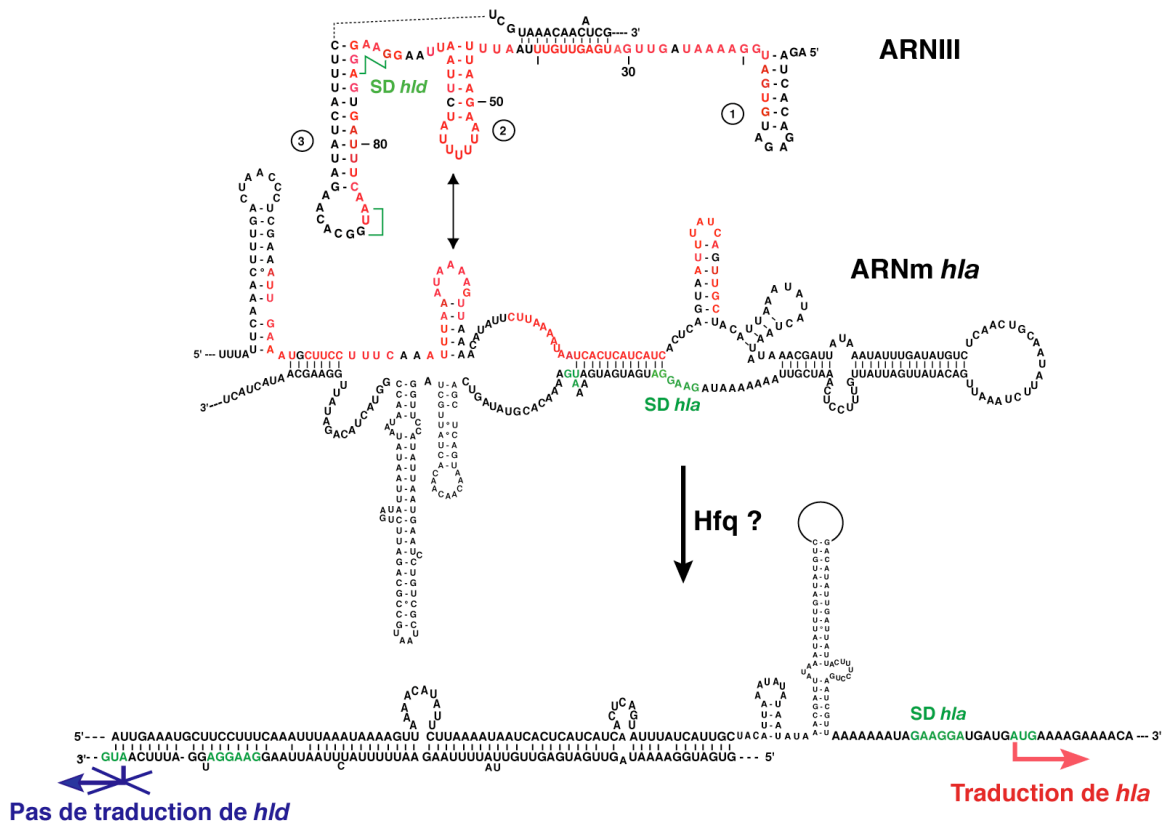


Figure 36 : Structure secondaire de l'ARNm *hla* et interaction avec l'ARNIII. Le site de fixation du ribosome de l'ARNm *hla* est séquestré dans une structure secondaire stable. Pour qu'il y ait traduction, il faut une interaction avec l'ARNIII. Le mécanisme d'interaction entre les deux ARN n'est pas connu et peut impliquer un co-facteur, comme la protéine Hfq. Lorsque l'ARNIII active la traduction de Hla, il est probable que la traduction de Hld est inhibée en raison du complexe formé.

D'autres fonctions pour Hfq peuvent être proposées. L'interaction de la protéine au niveau de la tige-boucle 2 pourrait également avoir un effet sur la traduction de *hld*, la petite phase ouverte de lecture contenue dans l'ARNIII. En effet, un décalage d'une heure

a été observé entre la synthèse de l'ARNIII et la synthèse de l'hémolysine δ (Vandenesch et al., 1991). Ce décalage pourrait s'expliquer par une inhibition de la traduction due à la fixation de Hfq à proximité du site de fixation du ribosome, comme cela a été proposé récemment dans le cas de l'autorégulation de la synthèse d'Hfq (Vecerek et al., 2005). Des expériences de « toeprint » ont apporté une réponse négative à cette hypothèse. En effet, le complexe ternaire 30S-ARNt^{fMet}-ARNm *hld* se forme correctement quelques soient les quantités d'Hfq ajoutés dans le milieu (résultat non montré).

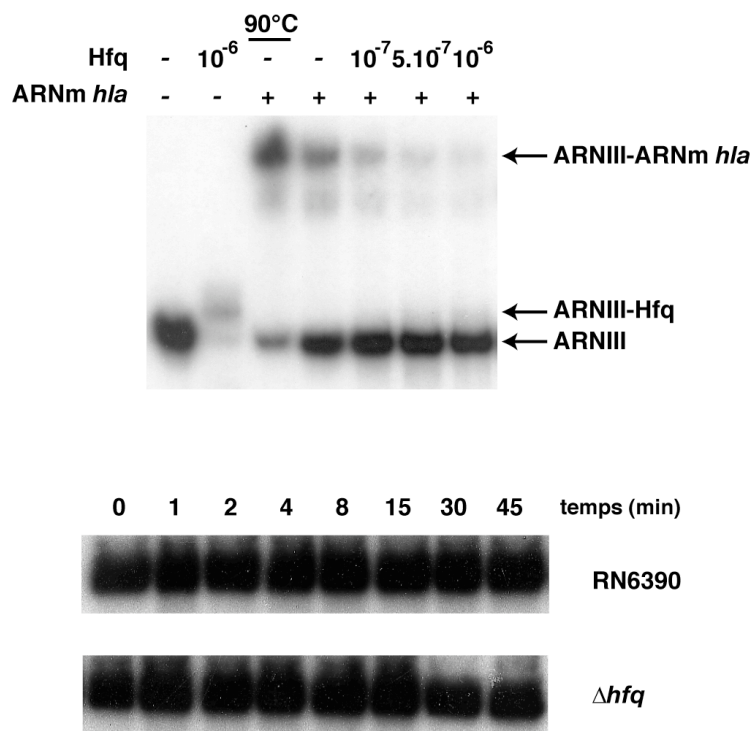


Figure 37 : Interaction ARNIII-ARNm *hla* en présence de Hfq (A) et temps de demi-vie de l'ARNIII dans une souche sauvage et une souche Δhfq (B). (A) L'ARNIII marqué à son extrémité 5' est incubé seul, en présence de Hfq (0,1 à 1 μ M), en présence de l'ARNm *hla* (excès molaire de trois fois par rapport à l'ARNIII) ou en présence des deux. La réaction se déroule à 37°C sauf pour une réaction où l'incubation se fait à 90°C. (B) Les temps de demi-vie sont mesurés en fin de phase exponentielle de croissance. Des aliquotes sont prélevés aux temps indiqués et les ARN sont extraits avec le système « FastPrep RNA Blue Kit ». Une quantité de 10 μ g d'ARN est déposée dans chaque piste. Des sondes uniformément marquées spécifiques pour l'ARNIII est l'ARN 5S (non montré) ont été successivement utilisées.

Finalement, Hfq pourrait jouer un rôle dans la stabilité de l'ARNIII. Le temps de demi-vie de l'ARNIII a été comparé dans une souche sauvage et dans la souche délétée de Hfq. Dans la souche sauvage, l'ARNIII est particulièrement stable avec un temps de demi-vie supérieur à 45 minutes. Dans la souche Δhfq , une faible diminution de la quantité d'ARNIII au temps les plus longs a été observée (figure 37). Ces résultats montrent que Hfq n'est pas essentielle à la stabilité de l'ARNIII.

D.3. Rôle de Hfq dans la virulence

L'ensemble de ces résultats ne sont cependant pas une remise en cause du rôle potentiel joué par la protéine Hfq dans les mécanismes d'action de l'ARNIII et dans le contrôle de la virulence de *S. aureus*. Afin de d'identifier les protéines dont l'expression est dépendante de Hfq, l'approche protéomique a été utilisée et les résultats sont résumés dans le tableau 11.

protéine	ARNIII	Hfq	fonction
biosynthèse du pyridoxal	-		Métabolisme
ornithine carbamoyltransférase	-		
purine nucléotide phosphorylase	-		
D-lactate déshydrogénase	-		
putative transcétolase	-		
homologue de l'aldéhyde déshydrogénase	-		
inosine 5'-monophosphate déshydrogénase	-	-	
groEL	--	--	Chaperone
grpE	---	---	
trigger factor	-	-	
DNAK	--	--	
CspA	-		
protéine ribosomique L7/L12	--	--	Traduction
alkyl hydroxyperoxidase sous-unité F	-	-	
alkyl hydroxyperoxidase sous-unité C	---	---	
putative sulfatase	--	--	
protéine A	---		
protéases à sérine A-F	+++	+++	Virulence
protéase à cystéine	+++		
protéase V8	++		
hémolysine α	+++	++	
hémolysine γ	+++	+++	
facteur de virulence esxA	++	++	
protéine C, Ser-Asp repeat	+	+	
auréolysine	+++	+++	
protéine de stress 20	+++	+++	
ferritin	+	+	Métabolisme
alcohol deshydrogénase I	+++	+++	
protéine hypothétique Ear	+++	++	

Tableau 11 : Résultats des études protéomiques dans des souches sauvages, délétée de l'ARNIII ou de Hfq. Le tableau montre les protéines qui sont soumises à une régulation par l'ARNIII ou par la protéine Hfq. Il doit se lire de la manière suivante : l'expression de l'hémolysine α est activée par l'ARNIII (+++) et à un niveau moindre par Hfq (++) . - : répression d'un facteur 1 à 3 ; -- : répression d'un facteur 4 à 10 ; --- : répression supérieure à 10. + : activation d'un facteur 3 ; ++ : activation d'un facteur 4 à 10 ; +++ : activation supérieure à 10. Pas de symbole, identique à la souche sauvage. Communication personnelle de P. Fechter et M. Possedko.

Les resultants obtenus sont assez remarquables puisque toutes les protéines dont la synthèse dépend de Hfq requièrent aussi la présence de l'ARNIII. Pour l'ARNIII, il semble qu'il y ait deux types de mécanisme : l'un dépendant de Hfq et l'autre indépendant. Ainsi, comme indiqué précédemment, Hfq n'est pas nécessaire pour le contrôle de la protéine A. C'est également le cas pour le gène *arcB1*, qui code pour l'ornithine carbamoyltransférase et qui est sous le contrôle du domaine 3'. En revanche, Hfq est nécessaire pour l'activation de la synthèse de nombreuses exoprotéines, dont l'hémolysine α et les protéases à sérine. De plus, elle est impliquée dans la régulation de l'expression de nombreuses protéines chaperones, qui permettent généralement aux bactéries de s'adapter à différents stress. Elle est également requise pour l'inhibition des gènes *ahpC* et *ahpF*, qui codent pour des sous-unités de l'alkyl hydroxyperoxydase, et pour l'activation de la ferritine. Ces protéines sont impliquées dans la réponse au stress oxydatif (Guimaraes et al., 2005; Morrissey et al., 2004; Qazi et al., 2001).

Jusqu'à présent, nous n'avons pas caractérisé de phénotype clair pour la souche Δhfq . La vitesse de croissance de cette souche est la même que celle d'une souche sauvage, que l'on soit en milieu riche ou en milieu minimal. La croissance devra être testé dans des conditions de stress différentes. De plus, une étude utilisant un modèle animal devrait permettre de confirmer définitivement le rôle de Hfq dans la virulence de *S. aureus*, comme cela a été le cas pour la protéine Hfq de *Listeria monocytogenes*, *Brucelle abortus* ou *Vibrio cholerae* (Christiansen et al., 2004; Ding et al., 2004; Robertson et Roop, 1999).

E. Discussion et perspectives

Nos résultats montrent que l'ARNIII est un assemblage de différents domaines régulateurs indépendants, qui pourraient représenter un « opéron-like » de petits ARNnc. Cet ARNnc multi-fonctionnel permet de coordonner l'expression de plusieurs gènes en réponse à un signal extérieur, la densité cellulaire. Nous avons mis en évidence un domaine régulateur, le domaine 3', conservé dans différentes souches de *S. aureus*, et dont le rôle principal est de cibler plusieurs ARNm. D'autres domaines sont connus, comme la région 5' qui active la traduction de l'hémolysine α et qui contient la phase ouverte de lecture codant pour l'hémolysine δ et le domaine central, constitué des tiges boucles 7, 8 et 9 et qui est impliqué dans l'activation d'une protéase à cystéine.

E.1. Vers l'identification de réseaux de régulation dépendants de l'ARNIII

E.1.1. Le domaine 3' et ses ARNm cibles

Nous avons montré que le domaine 3' est nécessaire et suffisant pour le contrôle post-transcriptionnel de l'expression de la protéine A et de la protéine SA1000, deux protéines impliquées dans l'adhésion de la bactérie aux tissus de l'hôte. Ce domaine est probablement impliqué dans des mécanismes de régulation similaires pour plusieurs autres gènes parmi lesquels on retrouve la coagulase et le facteur de transcription Rot. Ce domaine inhibe directement la traduction de plusieurs adhésines et active très certainement la synthèse des exoprotéines, *via* son action sur le facteur de transcription Rot. Ces fonctions se déroulent en fin de phase exponentielle et en phase stationnaire de croissance, ce qui permet le changement du profil d'expression des facteurs de virulence de *S. aureus*. Il est remarquable de constater que la tige-boucle 13 est le motif principal impliqué dans ces mécanismes de type antisens. Néanmoins, ce n'est pas un cas unique puisque d'autres ARN antisens sont capables de réguler l'expression de plusieurs gènes cibles, comme DsrA ou RhyB par exemple (Lease et Belfort, 2000a; Massé et Gottesman, 2002).

Une des caractéristiques de la tige-boucle 13 est la taille particulièrement grande de la boucle (13 nts). Cette boucle est essentielle dans l'étape de reconnaissance initiale entre l'ARNIII et ses cibles. Dans la plupart des systèmes antisens étudiés, l'interaction initiale implique la formation d'une interaction de type boucle-boucle (Wagner et al., 2002). La formation d'une telle interaction est rapide et permet de contraindre le nombre de points de nucléation entre les ARN. Elle est dictée par la structure des boucles et implique en général deux à trois paires de bases, souvent riches en G-C. Cette rapidité d'action est nécessaire pour que l'ARN antisens puisse agir avant la formation du complexe d'initiation de la traduction. Dans plusieurs systèmes impliquant des ARN antisens plasmidiques, les boucles des ARNm cibles sont caractérisées par une structure particulière de type « U-turn » qui permet de présenter les nucléotides impliqués dans le contact initial dans une orientation pré-hélicoïdale (Franch et al., 2000). Ce motif est également retrouvé dans les boucles anticodon des ARNt, où ils permettent une reconnaissance optimale du codon lors de la traduction (Westhof et al., 1988). Un motif similaire est retrouvé dans l'ARN génomique d'HIV-1, où il permet une interaction avec la boucle anticodon de l'ARNt^{Lys}₃ lors de l'étape d'initiation de la rétrotranscription du génome viral (Issel et al., 1993). Encore une fois, une partie des nucléotides de la boucle sont dans une orientation pré-hélicoïdale pour faciliter l'interaction boucle-boucle (Puglisi et Puglisi, 1998). Il est fort probable que de telles structures existent aussi dans les ARNm cibles de l'ARNIII (figure 38). A l'inverse, la boucle 13 de l'ARNIII est moins structurée, probablement pour faciliter la propagation des appariements intermoléculaires.

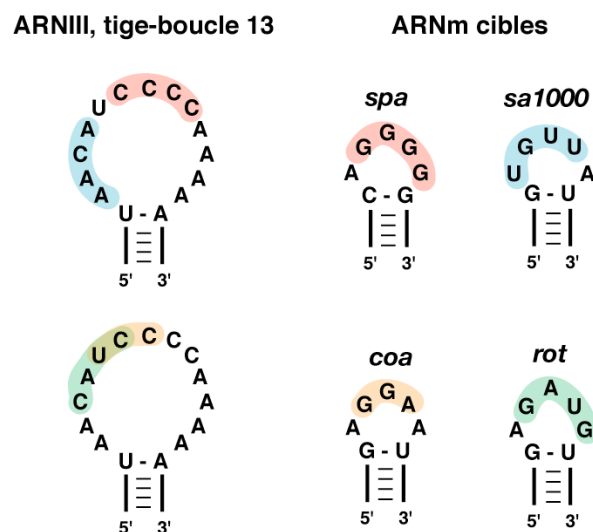


Figure 38 : Structures secondaires de la boucle 13 de l'ARNIII et des boucles des ARNm *spa*, *sa1000*, *coagulase* et *rot*. Les régions complémentaires dans les deux ARN sont représentées selon un code couleur.

En effet, le contact boucle-boucle n'implique qu'un nombre limité de nucléotides, il est donc réversible. Pour que le contrôle soit optimal, il est nécessaire qu'une propagation de l'interaction initiale ait lieu. Ceci est favorisé par des hélices de stabilité faible, c'est-à-dire riches en paires de bases A-U souvent interrompues par des nucléotides non appariés. C'est le cas de la tige-boucle 13 et de ses cibles, et nous proposons que suite à l'interaction initiale, une ouverture de ces hélices induirait une progression rapide des appariements intermoléculaires pour former un duplex étendu entre les deux ARN. Ceci pourrait également expliquer pourquoi la protéine Hfq ne joue pas de rôle pour la régulation de la protéine A.

E.1.2. Autres domaines régulateurs de l'ARNIII

La boucle apicale du domaine 3' est composée de plusieurs cytosines, ce qui est favorable pour former des appariements avec les séquences Shine et Dalgarno des ARNm. Cette caractéristique se retrouve aussi dans la tige-boucle 7 et une recherche par bioinformatique similaire à celle décrite pour le domaine 3' sera effectuée.

Le rôle de la protéine Hfq reste encore peu compris, même si celle-ci est un cofacteur de l'ARNIII dans la virulence de *S. aureus*. Comme Hfq ne joue pas de rôle majeur dans la stabilité de l'ARNIII, il est probable qu'elle intervienne comme protéine chaperone en facilitant l'hybridation de l'ARNIII à un de ses ARNm cibles. Nous n'avons pas montré de manière claire une implication de Hfq dans l'interaction entre l'ARNIII et l'ARNm *hla*. Pour *hla*, ce résultat est surprenant puisque la formation de ce complexe se fait difficilement à 37°C et que l'approche protéomique montre que Hfq est requise. Il est possible que l'ARNIII et Hfq puissent agir au cours de la transcription de l'ARNm *hla*, en captant la structure active de l'ARNm. Un tel mécanisme de piégeage a été décrit dans l'introduction pour la régulation de la réplication du plasmide ColE1 (introduction, chapitre 2, §A.1.2.). L'implication dans ce mécanisme d'une autre protéine n'est pas à exclure. Ainsi, chez *E. coli*, la protéine StpA a aussi une activité chaperone sur l'ARN (Clodi et al., 1999). Elle est impliquée dans l'activité d'un ARN régulateur, MicF, qui contrôle l'expression d'une porine (Deighan et al., 2000). L'existence d'autres protéines ayant ce type d'activité chez *S. aureus* reste à être démontrée.

L'étude comparative des souches $\Delta rnaIII$ et Δhfq a permis d'identifier des protéines dont la régulation de l'expression nécessite à la fois l'ARNIII et Hfq. Parmi ces protéines, certaines pourraient être des cibles directes de l'ARNIII. Ainsi, une complémentarité de séquence a été identifiée entre la tige-boucle 10 et la région 5' non traduite de l'ARNm *ahpC* (P. Fechter, communication personnelle). Ce gène code pour une sous-unité de l'alkyl hydroxyperoxydase, une protéine impliquée dans la réponse au stress oxydatif. Contrairement au domaine 3', un changement de structure des deux ARN serait requis pour permettre l'interaction (figure 39). De manière intéressante, la tige-boucle 10 est à proximité de l'un des sites de fixation de la protéine Hfq. C'est également à proximité de l'un des sites de coupure *in vitro* par la RNase III. L'étude de l'interaction entre l'ARNIII et cet ARNm ainsi que l'implication de ces deux protéines est en cours au laboratoire.

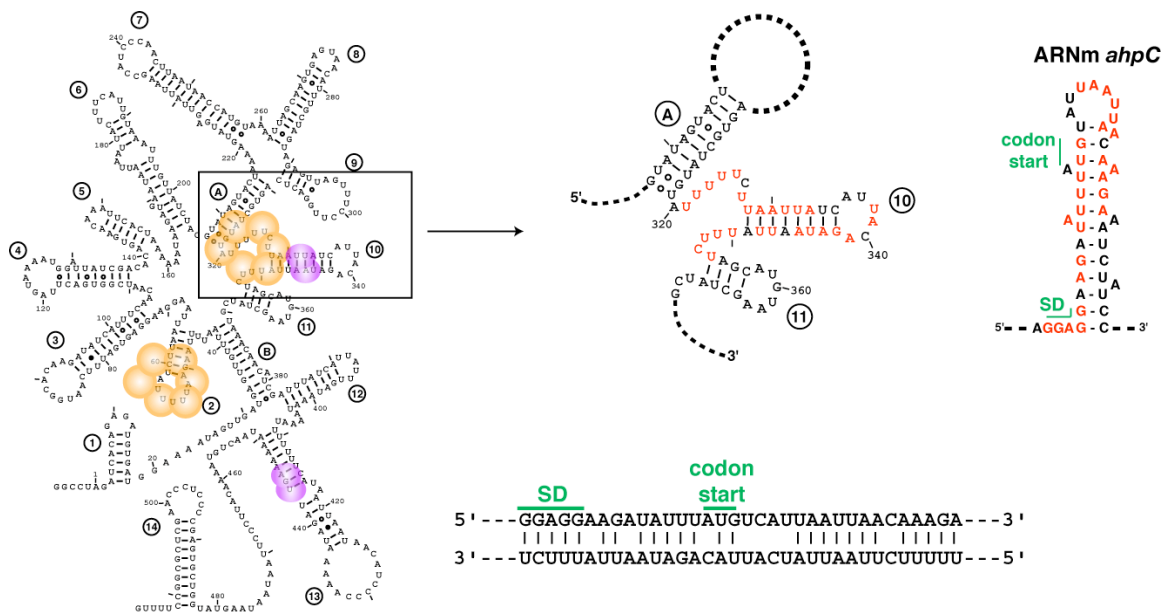


Figure 39 : Possible régulation post-transcriptionnelle du gène *ahpC* par l'ARNIII. La région régulatrice de l'ARNIII et la région d'initiation de la traduction de l'ARNm sont montrés. Les complémentarités de séquence sont représentées par des nucléotides rouges dans les deux ARN. Les deux régions sont très structurées et l'interaction nécessite un changement de conformation des deux ARN. Hfq (orange) et la RNase III sont également représentées sur la structure secondaire de l'ARNIII, basé sur les expériences d'empreinte pour Hfq et sur les expériences d'hydrolyse *in vitro* pour la RNase III.

E.1.3. L'ARNIII et le contrôle transcriptionnel

L'ARNIII régule la transcription de certains de ces gènes cibles. Les mécanismes impliqués sont encore inconnus, mais plusieurs hypothèses sont possibles. Il est cependant peu probable que l'ARNIII contrôle directement l'ensemble des facteurs de virulence. En régulant spécifiquement des ARNm codant pour des facteurs de

transcription, l'ARNIII pourrait générer des effets sur la régulation de l'expression de nombreux gènes. Ainsi, nos résultats indiquent que l'ARNIII pourrait réguler au niveau post-transcriptionnel la synthèse du facteur Rot ou du facteur SarT. Cette hypothèse est en cours de validation au laboratoire.

Il est également possible que l'ARNIII se fixe directement à des facteurs de transcription et, en modulant leur activité, induise des effets au niveau transcriptionnel. De nombreux facteurs de transcription sont présents chez *S. aureus* et une interaction entre l'ARNIII et l'un d'entre eux n'est pas à exclure. Ainsi, dans notre laboratoire, Tom Geissmann a entrepris une purification des facteurs associés à l'ARNIII par chromatographie d'affinité. La technique utilisée est similaire à celle utilisée dans l'article 1, dans lequel la RNase III a été trouvée associée à l'ARNIII. Les expériences sont toujours en cours, mais le facteur de transcription SarR a été purifié de manière reproductible avec l'ARNIII. Cette protéine inhibe l'expression de la protéine SarA, qui permet l'activation de la transcription de l'hémolysine α et inhibe la transcription de la protéine A. Ainsi, en séquestrant un facteur protéique, l'ARNIII peut avoir des effets indirects très importants au niveau de la transcription de ses gènes cible.

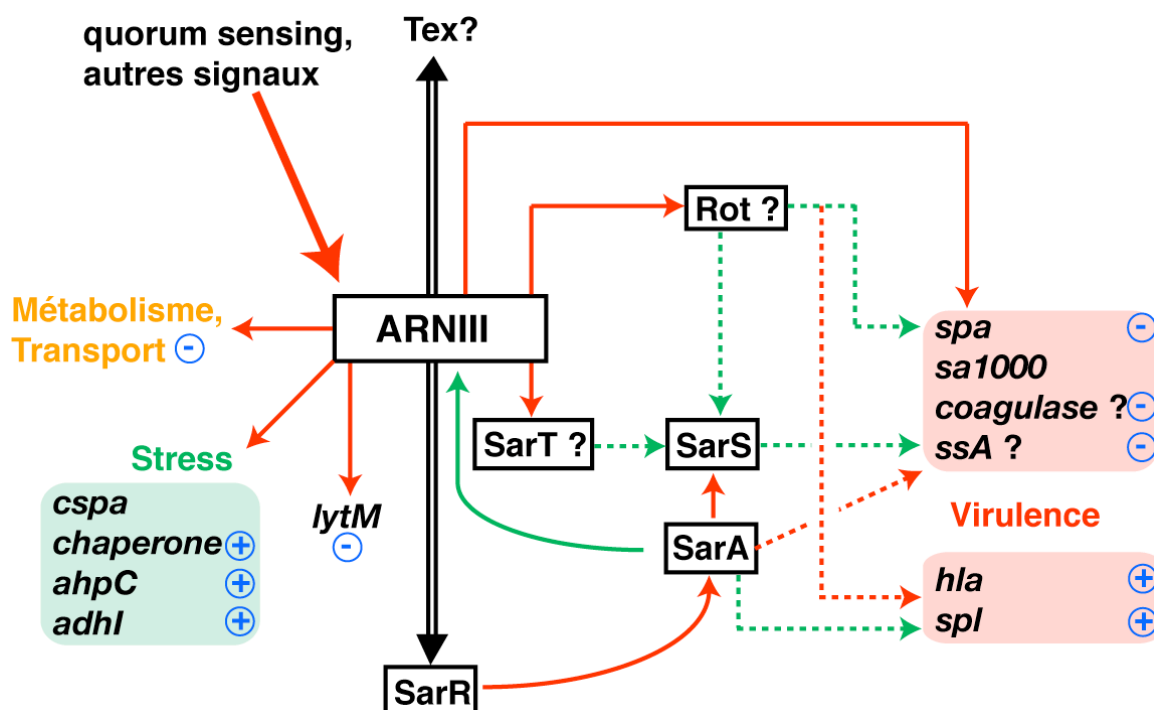


Figure 40 : Réseau de régulation global dans lequel se trouve l'ARNIII. Les flèches pleines représentent un effet au niveau traductionnel et les flèches en pointillé représentent un effet au niveau transcriptionnel. La couleur verte représente une activation et la couleur rouge représente une inhibition. L'effet de la protéine est représenté par des signes + et - de couleur bleue, selon que la protéine est impliquée ou non dans le mécanisme de régulation. Les doubles flèches indiquent une interaction avec un facteur protéique.

Un autre facteur a été purifié par cette approche. Il s'agit d'une protéine de fonction inconnue chez *S. aureus*, mais qui est un homologue d'un facteur de transcription de *Bordetella pertusis* impliqué dans la virulence de cette bactérie (Fuchs et al., 1996). Cette protéine possède un domaine de liaison à l'ARN trouvé dans la protéine ribosomique S1. La protéine a été clonée et purifiée au laboratoire et des études sont en cours pour tester la spécificité de son interaction avec l'ARNIII. Une inactivation de ce gène sera réalisée suivie d'une analyse du protéome de cette souche.

Toutes ces observations permettent de replacer l'ARNIII au centre du réseau de régulation de l'expression des gènes de virulence de *S. aureus* (figure 40).

E.2. Régulation par des ARN antisens et lien entre traduction et dégradation des ARNm

Une fois formé, le complexe entre un ARNnc et sa cible bloque la formation du complexe d'initiation de la traduction. Une compétition a donc lieu entre l'ARNnc et le ribosome pour la fixation à l'ARNm. Une vitesse d'association rapide permet aux ARNnc d'interagir efficacement avec leur cible. Dans le cas de l'ARN SgrS, l'interaction avec l'ARNm est défavorisée dans le cytoplasme, où le ribosome agit plus rapidement (introduction, chapitre 2, §A.2.1.). Lorsque la traduction de l'ARNm commence, le complexe ARNm-ribosome est dirigé vers la membrane plasmique. A cet endroit, une réinitiation de la traduction est moins favorable, ce qui permet à SgrS d'agir. Il est intéressant de signaler que les ARNnc vont souvent cibler des protéines membranaires, comme nous avons pu le voir pour le domaine 3' de l'ARNIII.

Contrairement aux ARN antisens plasmidiques, le complexe formé entre l'ARNIII et les ARNm cibles ne conduit pas à un duplex irréversible. Nous pensons donc que l'irréversibilité du contrôle nécessite l'intervention d'un autre facteur, la RNase III, qui clive le duplex et induit la dégradation rapide de l'ARNm cible. Dans le cas des ARN antisens plasmidiques, qui sont strictement complémentaires à leur cible, la RNase III intervient également dans la dégradation du duplex formé, mais cette étape n'est pas essentielle au contrôle dans la mesure où les complexes formés sont irréversibles.

Chez *E. coli*, et pour les ARN antisens codés par le chromosome, c'est la RNase E qui est impliquée dans cette étape, où elle dégrade l'ARNnc et l'ARNm. Ainsi, lorsque la synthèse d'un ARN antisens est activée, ce dernier est dégradé en même temps que sa

cible et ne sert donc qu'une fois. Récemment, Morita et coll. ont montré que la protéine Hfq, associée aux ARNnc, peut recruter la RNase E (Morita et al., 2005). Ceci permettrait de concentrer les différents acteurs pour un contrôle optimal. Comme Hfq est impliqué dans la stabilité de nombreux ARNnc, on peut imaginer qu'elle protège ces derniers en séquestrant la RNase E jusqu'à ce que l'interaction avec l'ARNm ait eu lieu. Les étapes conduisant ensuite à la dégradation de l'ARNnc et de l'ARNm sont inconnues, et passent peut-être par un relargage de Hfq. On peut se demander si l'activité ATPasique de la protéine est impliquée dans ces processus (Sukhodolets et Garges, 2003). Le rôle de la RNase III a été bien étudié dans les systèmes de régulation plasmidique. A l'heure actuelle, peu d'ARNnc codés par le chromosome bactérien dépendent de la RNase III pour leur contrôle. Dans le cas de la régulation de l'ARNm *sodB* par l'ARNnc RyhB, la RNase E et la RNase III sont impliquées dans la dégradation de l'ARNm et de RyhB (Afonyushkin et al., 2005). Pour IstR-1, il a été montré que la RNase III dégrade le duplex formé (Vogel et al., 2004), et on peut donc s'attendre à trouver d'autres exemples impliquant aussi la RNase III dans le futur. Ainsi, il serait intéressant de vérifier si la RNase III se retrouve associée au complexe Hfq-RNase E chez *E. coli*. Chez les eucaryotes, les protéine Sm sont en général à la base de la formation de complexes ribonucléoprotéiques, comme par exemple le spliceosome et on peut se demander si Hfq ne remplirait pas la même fonction chez les procaryotes (Yong et al., 2004).

Dans *S. aureus*, nous montrons que l'enzyme impliquée dans nos mécanismes est la RNase III. De manière intéressante, cette enzyme reconnaît l'ARNIII et induit des coupures *in vitro* dans l'ARN. L'un de ces coupures est localisée à proximité d'un site de fixation de Hfq (figure 40). Par comparaison avec le modèle proposé chez *E. coli*, on peut se poser la question de savoir si Hfq ne permet pas le recrutement de la RNase III sur l'ARNIII. Encore une fois, ceci permettrait de concentrer les différents partenaires pour un contrôle optimal. De plus, les ARNm *spa* et *sa1000* possèdent des structures en tige-boucle à proximité du site d'interaction avec le domaine 3'. Ces structures sont reconnues et clivées par la RNase III, ce qui accélère la dégradation de l'ARNm (figures 21 et 31). Il est probable que la RNase III induit la dégradation simultanée de l'ARNIII, comme c'est le cas pour les ARNnc d'*E. coli*.

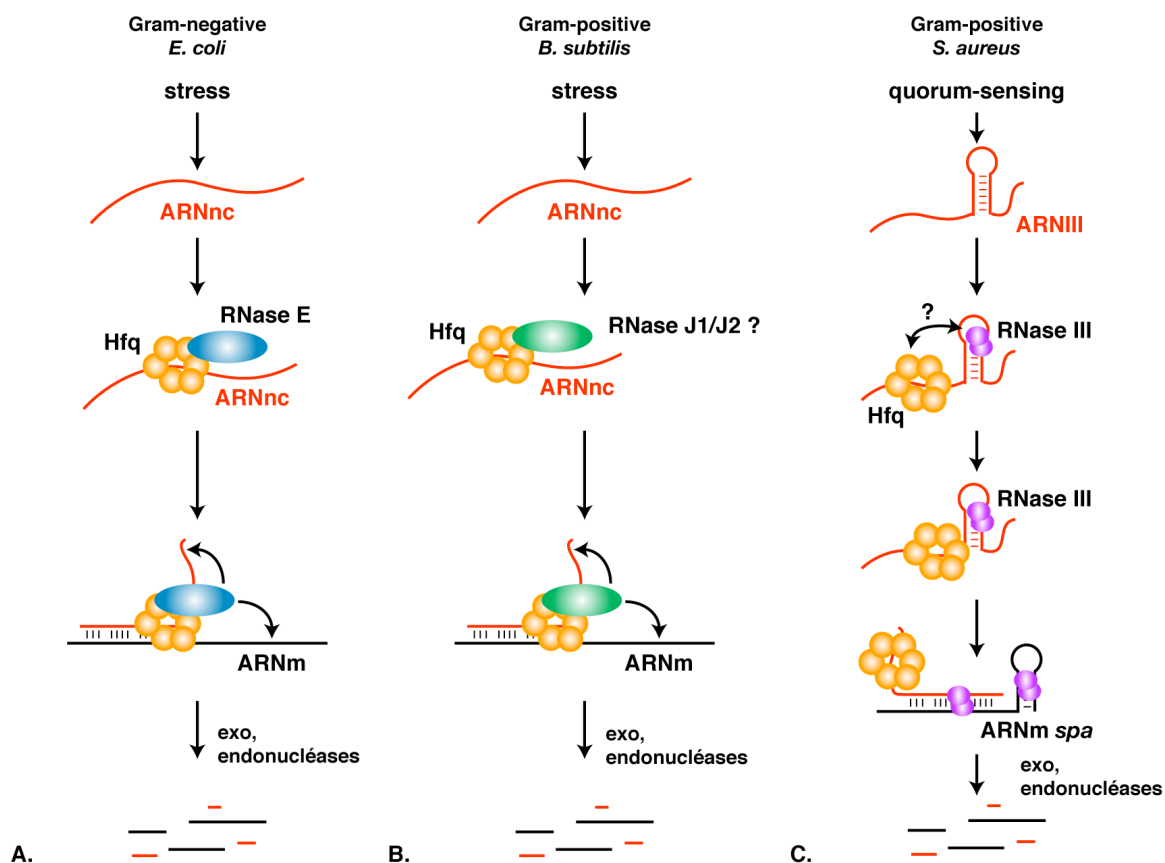


Figure 41 : Voies de dégradation des ARNm via les ARNnc. (A) Chez *E. coli*, l'ARNnc, Hfq et la RNase E forment un complexe ribonucléoprotéique qui va dégrader l'ARNm et l'ARNnc (Morita et al., 2005). Les détails du processus restent inconnus. (B) Chez les bactéries gram-positives, les RNases J1/J2 pourraient se substituer à la RNase E, mais cela reste à être démontré. (C) Nous avons montré que chez *S. aureus*, la RNase III est impliquée dans la dégradation de l'ARNm. Elle est également associée à l'ARNIII et induit des coupures à proximité du site de fixation de Hfq. Une interaction entre les deux protéines n'est donc pas à exclure.

Chez les bactéries gram-positives, la stabilité d'un ARNm dépend en grande partie de la structure de son extrémité 5' (Condon, 2003). En effet, la dégradation d'un ARNm chez *B. subtilis* commence généralement par l'extrémité 5' (Drider et al., 2002), et la présence de structures secondaires stables ou de protéines fixées au niveau de l'extrémité 5' entraîne une stabilisation des transcrits (DiMari et Bechhofer, 1993; Hambræus et al., 2002; Hambræus et al., 2000; Sharp et Bechhofer, 2003; Sharp et Bechhofer, 2005). De même, la présence d'un ribosome bloqué au niveau du site d'initiation de la traduction d'un ARNm entraîne également sa stabilisation (Jurgen et al., 1998; Wei et Bechhofer, 2002). Contrairement à ce qui se passe chez *E. coli*, l'ARNm n'a pas besoin d'être recouvert de protéines ou de ribosomes pour être protégé contre la dégradation (Condon, 2003; Jain, 2002). Dans le cas des ARNm *spa* et *sa1000*, la présence de structures en tige-boucle directement à l'extrémité 5' et d'un site fort de fixation du ribosome favorisent certainement leur stabilité, ce qui explique leur temps de

demi-vie relativement long. Pour que la dégradation puisse avoir lieu, il faut la présence d'un certain nombre de nucléotides non appariés au niveau de l'extrémité 5'. L'absence d'une exonucléase 5'→3' dans ces bactéries suggère l'intervention d'une endoribonucléase. Chez *E. coli*, la RNase E est responsable de cette étape initiale mais chez les bactéries Gram positives, la RNase E n'est pas présente (Condon et Putzer, 2002). Toutefois, deux protéines ayant une activité analogue à la RNase E ont été identifiées chez *Bacillus subtilis* et ces protéines sont conservées chez *S. aureus* (Even et al., 2005). Il sera donc intéressant d'analyser leurs fonctions dans la dégradation des ARNm et leur implication dans l'activité d'ARNnc.

E.3. L'ARNIII et la virulence de *S. aureus*

L'ARNIII régule l'expression d'un grand nombre de facteurs de virulence. Nos travaux montrent qu'il est aussi impliqué dans la régulation de protéines impliquées dans le métabolisme, le transport de petites molécules et la réponse au stress. Précédemment, une étude par transcriptome avait montré que les locus *agr* et *sarA* sont impliqués dans la régulation de l'expression de plus d'une centaine de protéines chez *S. aureus* (Dunman et al., 2001). Ces résultats indiquent que la régulation des gènes de virulence est étroitement connectée au métabolisme de la bactérie. Ceci permet à la bactérie de synthétiser les facteurs de virulence lorsqu'elle en a besoin. La production de toxines, de protéases ou de nucléases est un moyen d'obtenir de nouveaux nutriments par exemple. Mais lorsque ces nutriments sont déjà présents dans le milieu extracellulaire, la synthèse de ces facteurs est inutile.

S. aureus est capable de coloniser un très grand nombre de sites dans un organisme. La bactérie doit être capable de synthétiser au bon moment les facteurs adéquats qui lui permettront d'échapper au système immunitaire et d'initier un nouveau site d'infection. L'intégration dans la cellule des signaux extérieurs est donc un élément capital pour le développement correct de la colonie et cette intégration se fait par l'ensemble des facteurs de régulation présents chez *S. aureus*. Ainsi, la mise en place de la réponse au phénomène de « quorum-sensing » pendant une infection se déroule au sein d'un réseau régulateur complexe qui modifie en permanence l'activité de l'ARNIII (figure 40). Il est très difficile d'établir précisément les fonctions de chacun, car suivant le lieu et le moment de l'infection ils auront des importances variables (Bronner et al., 2004; Cheung et al., 2004; Novick, 2003). Par exemple, le rôle de l'ARNIII dans la

pathogénie de *S. aureus* a été étudié dans différents modèles animaux (Abdelnour et al., 1993; Blevins et al., 2003; Cheung et al., 1994; Gillaspay et al., 1995). Ces études montrent qu'une inactivation du locus *agr* diminue la virulence des souches de *S. aureus*. Néanmoins, d'autres études ont néanmoins montré que dans certains modèles animaux l'ARNIII est très faiblement exprimé dans une souche sauvage de *S. aureus*, ce qui n'empêche pas l'expression correcte des facteurs de virulence (Goerke et al., 2000; Yarwood et al., 2002). Ces observations indiquent donc bien qu'il existe une redondance fonctionnelle pour la régulation des facteurs de virulence chez *S. aureus*.

Des études *in vivo* sont donc nécessaires pour évaluer l'importance de chacun des facteurs de régulation. Généralement, ces études se font dans des modèles animaux comme la souris ou le lapin mais, récemment, des modèles d'infection chez des invertébrés, comme *C. elegans* et *D. melanogaster*, ont été développés (Garcia-Lara et al., 2005; Needham et al., 2004; Sifri et al., 2003). Ces modèles ont déjà servi pour identifier des facteurs requis pour la virulence *in vivo* (Bae et al., 2004; Begun et al., 2005). Leur usage plus simple permettra de tester les fonctions des différents facteurs de régulation ainsi que la fonction de l'ARNIII ou de Hfq dans l'hôte.

Finalement, les bactéries sont constamment confrontées à différents stress lorsqu'elles sont dans un hôte. L'utilisation d'un ARN régulateur leur permet de s'adapter rapidement aux nouvelles conditions de croissance, et on peut supposer que d'autres ARNnc existent chez *S. aureus*. De plus, leur implication dans la virulence n'est pas à exclure. Récemment, une étude a pu identifier six de ces ARNnc (Pichon et Felden, 2005). De manière intéressante, ils sont localisés dans les îlots de pathogénicité et curieusement ils sont constitutivement exprimés. Des études similaires effectuées par T. Geissmann sont en cours au laboratoire, en collaboration avec C. Gaspin (INRA, Toulouse), afin d'identifier de nouveaux ARNnc chez *S. aureus*.

II. ARN antisens-ARNm et régulation de la réplication du plasmide R1

A. Le contrôle de la réplication du plasmide R1 : état des lieux :

Comme décrit dans l'introduction, le plasmide R1 est présent à un faible nombre de copies dans la cellule, et sa fréquence de réplication est contrôlée à la fois au niveau transcriptionnel et au niveau post-transcriptionnel.

A.1. Contrôle transcriptionnel de l'expression de *repA*

La protéine CopB est responsable du contrôle transcriptionnel de l'expression de *repA*, mais ce contrôle ne joue qu'un rôle mineur (Riise et al., 1982). Deux transcrits différents, produits à partir des promoteurs P1 et P2, permettent la synthèse de la protéine RepA. Le plus long de ces transcrits code pour un répresseur transcriptionnel, CopB (figure 42). A l'équilibre, CopB est présent dans la cellule en quantité saturante et intervient sous la forme d'un tétramère pour réprimer la transcription à partir du promoteur P2 (Riise et Molin, 1986). La protéine RepA est alors synthétisée à partir d'un transcrit polycistronique *copB-tap-repA* (figure 42). Lorsque la concentration intracellulaire en plasmide chute, comme par exemple lors de la division cellulaire ou lors de l'entrée du plasmide dans une nouvelle bactérie, la quantité de CopB n'est plus suffisante pour réprimer le promoteur P2. RepA est alors synthétisée à partir de deux transcrits, *copB-tap-repA* et *tap-repA*. La quantité en protéine RepA augmente ce qui conduit à une augmentation de la réplication plasmidique.

A.2. Contrôle post-transcriptionnel de l'expression de *repA*

La synthèse de RepA est régulée par un ARN antisens exprimé de manière constitutive. Cette régulation s'effectue de manière indirecte. En effet, la région d'initiation de la traduction de *repA* est séquestrée dans une structure secondaire stable (figure 42). En amont de *repA* se trouve une phase ouverte de lecture, *tap* (*t*ranslational

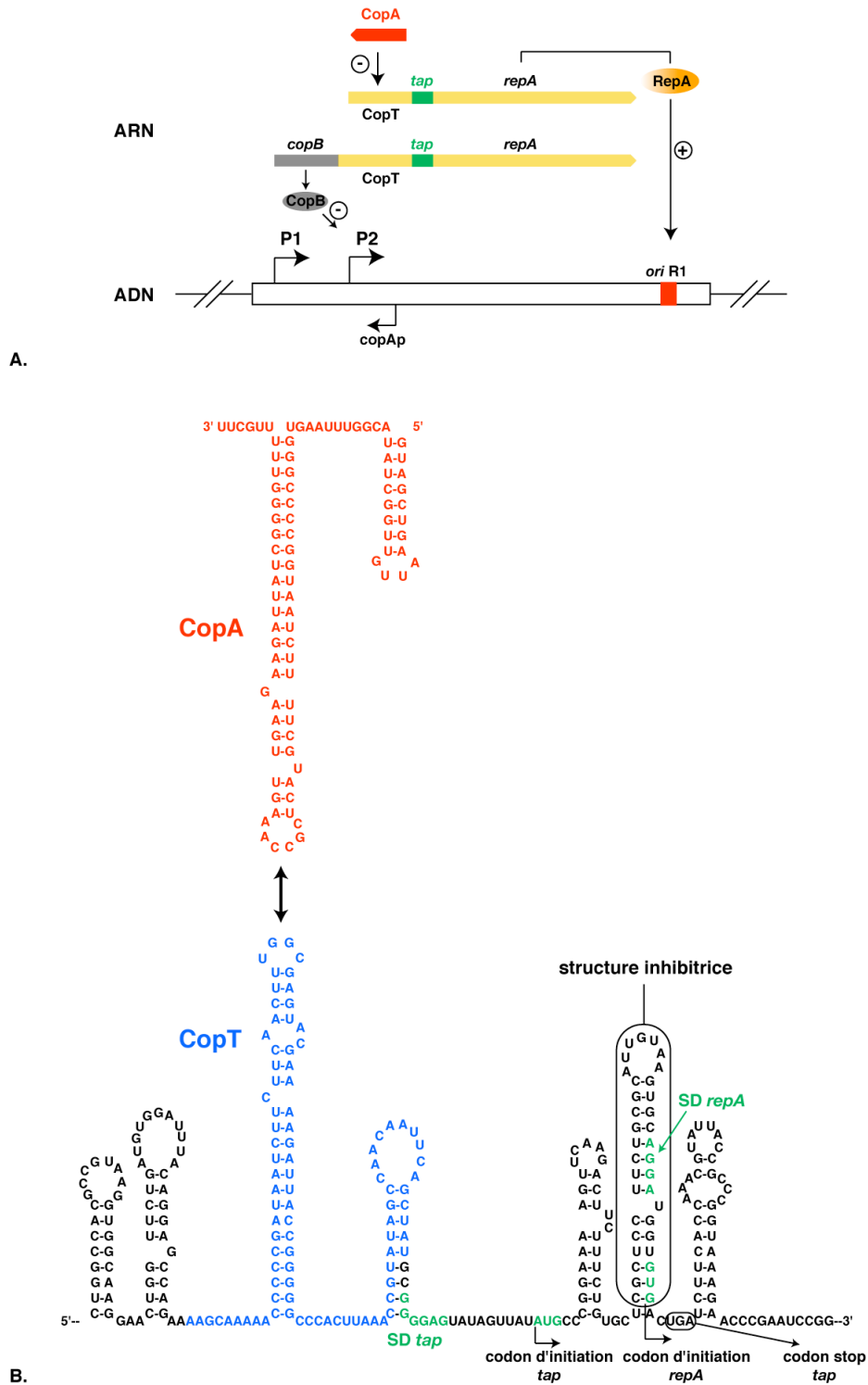


Figure 42 : Organisation génétique de la région de l'origine de réplication du plasmide R1 (A) et structures secondaires de la région 5' non traduite de l'ARNm *repA* et de l'ARN anrisens *CopA* (B). (A) Les promoteurs sens (P1 et P2) et antisens (*copAp*) sont indiqués sur l'ADN, de même que la position de l'origine de réplication du plasmide. Les différents ARN transcrits à partir de cette région sont également représentés. Le produit du gène *copB* induit une inhibition de la transcription au niveau du promoteur P2. L'ARN antisens *CopA* entraîne une inhibition de la traduction de *tap*. En raison du couplage traductionnel qui existe entre *tap* et *repA*, l'inhibition de la traduction de *tap* entraîne l'inhibition de la traduction de *repA*. Lorsque la protéine *RepA* est produite, elle initie la réplication du plasmide. (B) La séquence de *CopT* complémentaire à *CopA* est représentée en bleu. Les séquences Shine et Dalgarno (SD) et les codons d'initiation de la traduction de *tap* et de *repA* sont en vert. Le codon de terminaison de la traduction de *tap*, ainsi que la structure inhibitrice de la traduction de *repA* sont encadrés.

activator peptide), qui code pour un peptide de 24 acides aminés (Ohman et Wagner, 1991). La traduction de *tap* est nécessaire pour l'activation traductionnelle de *repA*. En effet, la traduction de *tap* s'achève deux nucléotides en aval du codon d'initiation de la traduction de *repA* (figure 42, Blomberg et al., 1992). Un couplage traductionnel induit la déstabilisation de la structure inhibitrice séquestrant la région d'initiation de la traduction de *repA* et permet une réinitiation de la traduction par le ribosome (Blomberg et al., 1994). Seule la traduction de *tap* est importante car la séquence en acides aminés de la protéine n'est pas essentielle au contrôle.

Le locus *repA* code également pour l'ARN antisens CopA, long de 91 nucléotides. Cet ARN est strictement complémentaire à sa séquence cible, CopT, localisée dans la région 5' non traduite de l'ARNm *repA*. L'extrémité 3' de la région CopT est localisée deux nucléotides en amont de la séquence Shine et Dalgarno de *tap*. En se fixant à CopT, CopA inhibe la traduction de *tap* et, à cause du couplage traductionnel qui existe entre *tap* et *repA*, réprime indirectement l'expression de *repA* au niveau post-transcriptionnel. L'interaction entre les deux ARN empêche de manière irréversible la fixation de la sous-unité 30S du ribosome à la séquence Shine et Dalgarno de *tap* (Malmgren et al., 1996).

L'ARN antisens CopA favorise également la dégradation de l'ARNm *repA* via la RNase III (Blomberg et al., 1990). En effet, des expériences *in vivo* et *in vitro* montrent que le complexe CopA-CopT est une cible de la RNase III (Wagner et al., 1992). Cette étape n'est cependant pas essentielle au contrôle *in vivo*. En effet, l'efficacité d'inhibition de la synthèse de RepA n'est diminuée que d'un facteur 3 dans une souche d'*E. coli* délétée du gène *rnc* codant pour la RNase III, alors que la durée de vie de l'ARNm *repA* est augmentée de façon significative (Wagner et al., 1992). Ces données nous indiquent que l'inhibition de la traduction de *tap* est l'étape essentielle dans le contrôle post-transcriptionnel de la synthèse de RepA mais que cette inhibition rend le complexe accessible à la RNase III qui initie la dégradation de l'ARNm *repA*.

A.3. Mécanisme de reconnaissance de l'ARN antisens CopA à sa cible, CopT

De nombreuses études réalisées au laboratoire ont permis de définir les éléments structuraux de CopA essentiels à son activité *in vivo* et *in vitro* (Kolb et al., 2000b). Les résultats montrent une corrélation entre la vitesse d'association et l'efficacité de

l'inhibition (Wagner et Simons, 1994). La formation du complexe s'effectue en plusieurs étapes qui ont lieu dans un ordre hiérarchique, et la formation du duplex étendu est un processus très lent *in vitro*. L'interaction initiale entre CopA et CopT implique les deux boucles apicales des motifs en tige-boucle II et II' (figure 43). Cette interaction boucle-boucle est réversible et transitoire. Elle est détruite au profit de la formation d'appariements intermoléculaires qui nécessitent l'ouverture du haut des hélices II et II' donnant lieu à deux hélices intermoléculaires B et B'. Cette conversion est facilitée par la présence de nucléotides non appariés dans le haut des tiges de chacun des ARN et est directionnelle, la formation de l'hélice B' étant dépendante de celle de l'hélice B. Des contraintes topologiques bloquent la progression de ces appariements, donnant lieu à une jonction à quatre hélices constituée des deux hélices intermoléculaires B et B' et des deux hélices intramoléculaires A et A'. Notons ici que l'ARN antisens CopI constitué de la tige-boucle II est suffisant pour inhiber la synthèse de RepA *in vivo* (Wagner et al., 1992), et pour empêcher la fixation du ribosome *in vitro* (Wagner et al., 1992). Le complexe CopI-CopT est réversible, il ne forme pas de duplex étendu, mais est aussi caractérisé par la jonction à quatre hélices (Wagner et al., 1992). Enfin, la juxtaposition des deux longs segments hélicoïdaux formés par A-B et A'-B', favorise le rapprochement des régions en simple brin localisées en 5' de CopA et 3' de CopT pour former l'hélice stabilisatrice C. Il en résulte un complexe stable qui bloque de façon irréversible l'accès du ribosome au site d'initiation de *tap in vitro* (Wagner et al., 1992). Ainsi, le duplex étendu ne semble pas être la forme biologique active.

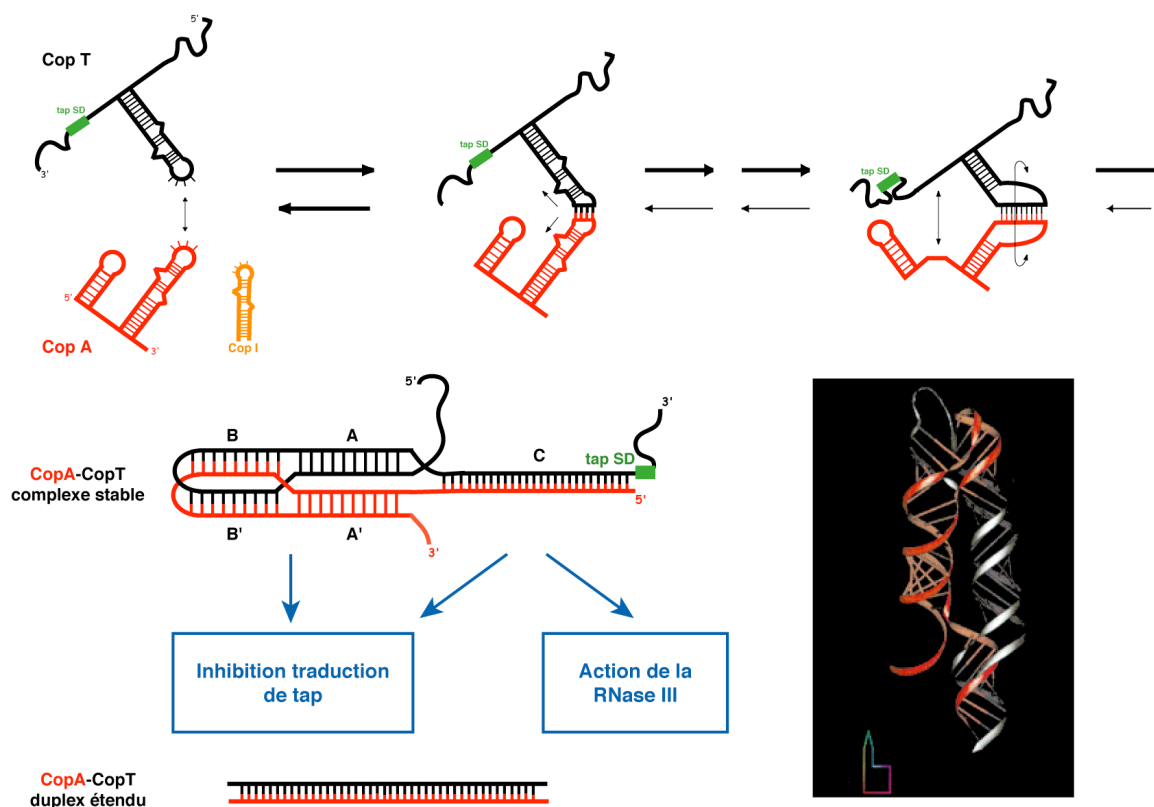


Figure 43: Modèle d'interaction entre l'ARN antisens CopA et sa cible, CopT, et modèle de structure tridimensionnelle proposé pour le complexe (Kolb et al., 2000b). L'interaction entre les deux ARN conduit à la formation d'un complexe stable formé d'une jonction à quatre hélices et d'une longue hélice intermoléculaire, l'hélice C. Ce complexe est suffisant pour inhiber la traduction de *tap* et est reconnu par la RNase III qui induit sa dégradation.

B. Influence de la structure des deux ARN sur le devenir du complexe

La formation d'un duplex étendu est un processus très lent *in vitro*, malgré le fait que les deux ARN soient parfaitement complémentaires. Il a été montré que la structure des boucles est essentielle à la reconnaissance initiale et que les résidus non appariés au sein des hélices favorisent ensuite la formation de la jonction à quatre hélices (Hjalt et Wagner, 1995a ; Kolb et al., 2001; Persson et al., 1990). Nous avons voulu déterminer par la suite les éléments qui empêchent la formation du duplex étendu. Le pied des hélices II et II' de CopA et CopT, respectivement, sont caractérisés par la présence de plusieurs paires de bases G-C consécutives. Lors de la formation d'un duplex étendu, la destruction de ces appariements intramoléculaires au profit de la formation de nouveaux appariements intermoléculaires pourrait être un processus énergétiquement défavorable. Afin de tester expérimentalement cette hypothèse, nous avons introduit des mutations

dans les ARN CopA et CopT pour diminuer la stabilité des hélices, en changeant les paires de bases G-C en paires de bases A-U (figure 44).

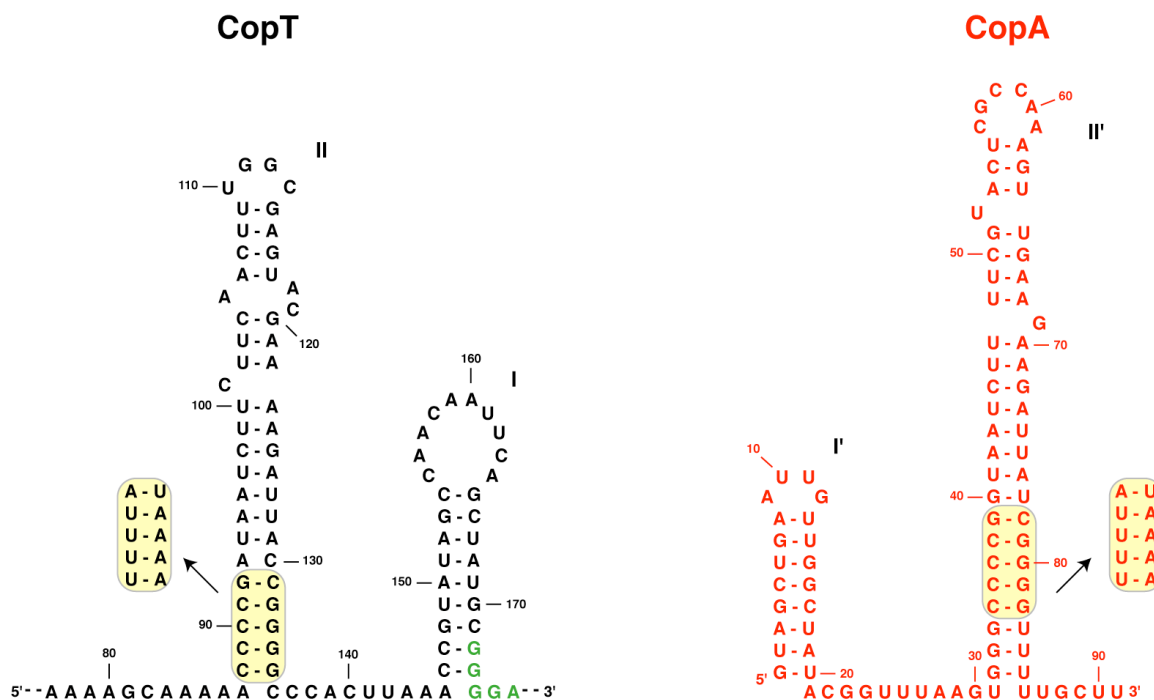


Figure 44: Structures secondaires des ARN CopA et CopT. Les mutations introduites sont représentées.

Dans un premier temps, nous avons analysé l’effet de ces mutations au niveau de la vitesse d’association des différents complexes CopA-CopT (tableau 12). Les mutations n’ont qu’un effet mineur sur la vitesse d’association des ARN, il semblerait donc que l’étape d’initiation de la formation du complexe ne soit pas affectée.

complexe	k_{app} ($M^{-1}.sec^{-1}$)
CopA-CopT	$1,9 (\pm 0,05) 10^6$
CopA-CopT _{FF}	$5,1 (\pm 1,2) 10^5$
CopA _{FF} -CopT	$1,45 (\pm 0,15) 10^6$
CopA _{FF} -CopT _{FF}	$4,6 (\pm 0,3) 10^5$

Tableau 12 : Constantes de vitesse d’association des différents complexes CopA-CopT. La détermination des constantes de vitesse d’association (k_{app}) des différents complexes a été effectuée comme décrit précédemment (Kolb et al., 2000b).

La structure des différents complexes a été étudiée par cartographie en solution en utilisant comme sonde l’acétate de plomb. Une signature caractéristique du complexe CopA-CopT est obtenue lors de cette hydrolyse (Kolb et al., 2000b). En effet, de fortes coupures apparaissent au niveau des nucléotides 58 à 62 de CopA et U108-U110 de CopT (figure 45). Nous avons obtenu un profil de coupure identique avec les complexes hétérologues contenant un ARN sauvage et un ARN mutant. En revanche, dans le complexe CopA_{FF}-CopT_{FF}, CopT_{FF} induit une complète protection de CopA_{FF} contre

l'hydrolyse par le plomb (figure 45). Comme le plomb n'induit pas de clivage au sein des doubles hélices d'ARN régulières, ces résultats suggèrent que les mutations dans CopA et CopT favorisent la formation d'un duplex étendu.

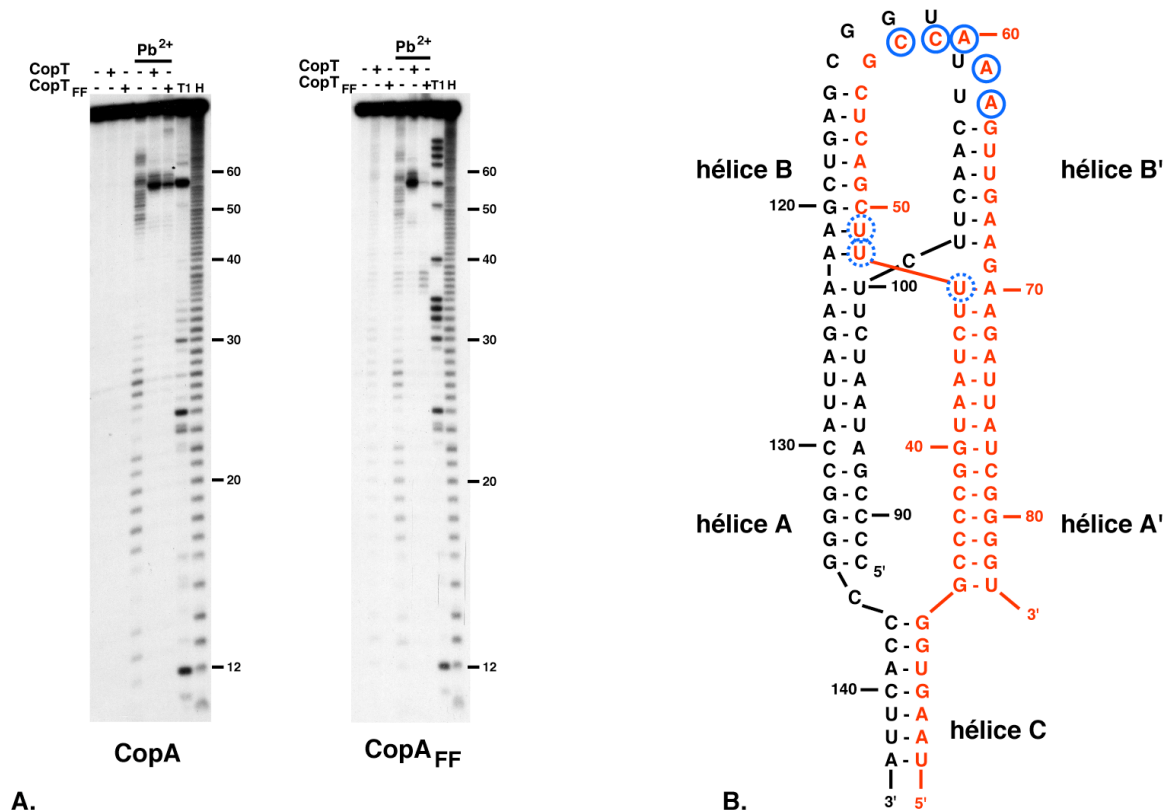


Figure 45 : Hydrolyse à l'acétate de plomb des différents complexes CopA-CopT. (A) Les ARN CopA ou CopA_{FF} sont soumis à l'action de l'acétate de plomb, seuls ou en présence d'un excès molaire de trois fois des ARN CopT ou CopT_{FF}. (B) Structure secondaire du complexe CopA-CopT. Les coupures au plomb dans l'ARN CopA représentatives de la formation de la jonction à quatre hélices sont indiquées par des cercles bleus.

Nous avons par ailleurs utilisé comme sonde la RNase III puisqu'elle génère des profils de coupures différents dans le complexe stable ou le duplex étendu. Ainsi, dans le duplex étendu CopA-CopT, des produits courts apparaissent, localisés dans CopT aux positions A93, U94, U99 et U100, et à un niveau moindre aux positions A83 et C90. Dans le complexe stable, des coupures fortes sont localisées exclusivement dans l'hélice intermoléculaire stabilisatrice C, au niveau des nucléotides U149 et C154 de CopT. Dans CopA, une coupure majoritaire est observée en position C18 (figure 46). Le même profil de coupures est observé dans les complexes hétérologues CopA_{FF}-CopT et CopA-CopT_{FF}. En revanche, dans le complexe CopA_{FF}-CopT_{FF}, les coupures les plus fortes correspondent à la signature du duplex étendu, avec des coupures fortes localisées de A92 à U97 (figure 46). Il est intéressant de noter que des coupures faibles subsistent au niveau des nucléotides U149 et C154.

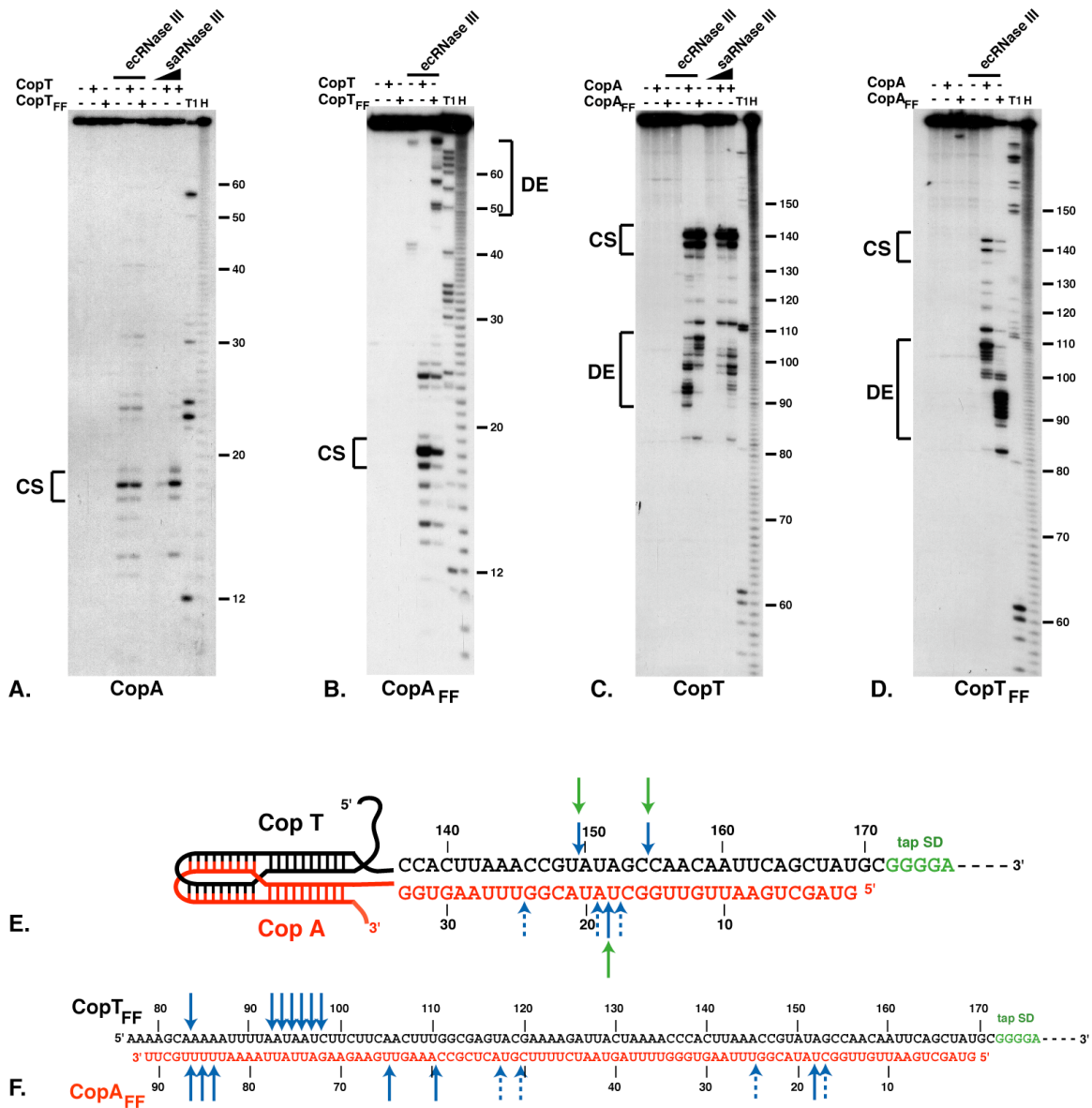


Figure 46: Hydrolyse par la RNase III de différents complexes CopA-CopT. (A, B) Les ARN CopA et CopA_{FF}, respectivement, sont marqués à leurs extrémités 5' et incubés en présence des ARN CopT et CopT_{FF} pour permettre la formation des différents complexes. Ces complexes sont ensuite soumis à l'action de la RNase III d'*E. coli*. (C, D) Même chose que pour (A, B), mais en utilisant les ARN CopT et CopT_{FF} marqués. (A, C) Les complexes CopA-CopT sauvages sont aussi soumis à une hydrolyse par la RNase III de *S. aureus*. Les coupures représentatives du complexe stable (CS) ou du duplex étendu (DE) sont indiquées. (E, F) Structures secondaires du complexe stable CopA-CopT et du duplex étendu CopA_{FF}-CopT_{FF}. Les coupures observées sont représentées par des flèches bleues pour la RNase III d'*E. coli* et par des flèches vertes pour la RNase III de *S. aureus*.

Ces résultats suggèrent bien que la présence de ces paires de bases G-C au pied des hélices de CopA et CopT bloque la progression des appariements intermoléculaires entre CopA et CopT. Le duplex étendu ne peut donc pas se former, ce qui confirme qu'il n'est pas la forme biologique active. Il suggère également que l'hydrolyse du duplex étendu démarre au niveau des nucléotides U149 et C154, puis se propage au reste du duplex.

C. Reconnaissance et clivage du complexe stable par la RNase III

La RNase III clive de façon efficace le duplex étendu mais aussi le complexe stable CopA-CopT *in vitro*, et les coupures principales se trouvent localisées dans l'hélice intermoléculaire C. Le complexe stable semble être donc composé d'un site spécifique pour la RNase III, l'hélice intermoléculaire C, mais aussi d'une structure résistante formée par la jonction à quatre hélices. Comme le complexe stable est une cible de la RNase III, l'enzyme peut intervenir avant la formation du duplex étendu. Une corrélation est observée avec l'analyse *in vivo* des sites de coupures dépendants de la RNase III dans l'ARNm *repA* et dans CopA (Blomberg et al., 1990).

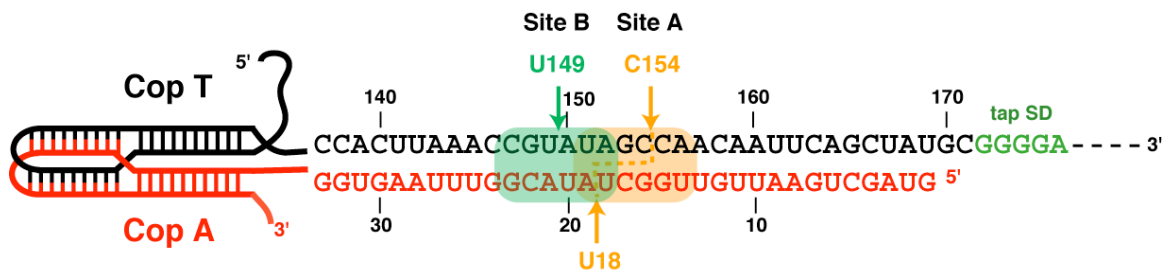


Figure 47 : Représentation des sites A et B sur la structure secondaire du complexe stable CopA-CopT.

La RNase III active est un homodimère, chaque monomère reconnaissant de façon symétrique environ un tour d'hélice d'ARN (Nicholson, 1999). Après fixation de la protéine, le complexe enzyme-substrat subit des changements de conformation pour permettre d'atteindre l'état de transition nécessaire à la catalyse (Campbell et al., 2002). Une seule coupure est induite sur chaque brin de l'hélice d'ARN de façon coordonnée mais non concertée (Sun et Nicholson, 2001). Chaque clivage produit des extrémités 5' phosphate et 3' hydroxyle, avec des fragments double brin se terminant à l'extrémité 3' par des nucléotides non appariés. De manière inattendue, alors que la RNase III ne possède pas de spécificité stricte de séquence de paires de bases, seulement deux coupures fortes dans CopT ont lieu dans l'hélice intermoléculaire C. Ceci suggère que cette hélice contient deux sites de fixation privilégiés pour l'enzyme, que nous appellerons les sites A et B (figure 47).

C.1. Clivage de l'hélice intermoléculaire C par la RNase III

La comparaison d'un grand nombre de substrats naturels de la RNase III montre que l'enzyme reconnaît les régions double brin avec peu de spécificité de séquence. La taille de l'hélice (22 pb) est un élément important, mais ne dicte pas la position du site de coupure (Nicholson, 1999). En revanche, certains éléments de structure au niveau de l'ARN modulent son activité et peuvent diriger la coupure à une position déterminée. Une boucle interne dans une double hélice peut inhiber la catalyse de l'un des deux monomères de l'enzyme (Li et Nicholson, 1996). La présence de résidus non appariés dans l'hélice II de CopA ou II' de CopT empêche aussi leur dégradation par la RNase III (Hjalt et Wagner, 1995b). Enfin, l'introduction de certains appariements Watson-Crick à des positions précises par rapport au site de coupure d'un substrat naturel inhibe la fixation de l'enzyme (Zhang et Nicholson, 1997). Ces appariements, considérés comme "anti-déterminants", protègent les ARN contre l'attaque par la RNase III. Cette notion d'anti-déterminant, initialement montrée dans les complexes ARNt aminoacyl-ARNt synthétase (Giege et al., 1998), peut expliquer pourquoi la RNase III ne coupe que certains ARN cellulaires et viraux. L'introduction de tels anti-déterminants dans le complexe CopA-CopT a été utilisé pour essayer de discriminer les sites de la RNase III dans l'hélice intermoléculaire C. Par ailleurs, ayant purifié la RNase III de *S. aureus*, nous avons comparé la spécificité des deux enzymes sur les différents substrats. Les résultats montrent que les deux enzymes reconnaissent les différents substrats d'une manière identique et qu'elles nécessitent la présence de magnésium pour leur activité.

Le mutant site A est censé inhiber la coupure au niveau des positions C154 de CopT et U18 de CopA. Pour le mutant site B, c'est la coupure U149 qui doit être inhibée. Les mutations introduites dans les ARN sont présentées sur la figure 48 et les résultats des expériences d'hydrolyse sont présentées sur les figures 48 et 49. On peut voir que le profil de coupures par la RNase III n'est que très peu modifié suite à l'introduction des mutations. Dans le complexe CopA_A-CopT_A, une coupure additionnelle de même intensité apparaît en position A157 dans CopT_A. Dans CopA_A, une coupure apparaît en position U14. Dans le complexe CopA_B-CopT_B, la coupure en position U149 est diminuée et une coupure de même intensité apparaît en position A157 au niveau de CopT_B. Dans CopA_B, on retrouve à nouveau la coupure en U14. Ainsi, l'introduction des

mutations a faiblement perturbé l'affinité de la RNase III au niveau des sites A ou B, et elle a révélé l'existence d'un troisième site (site C), de plus faible affinité (figure 48).

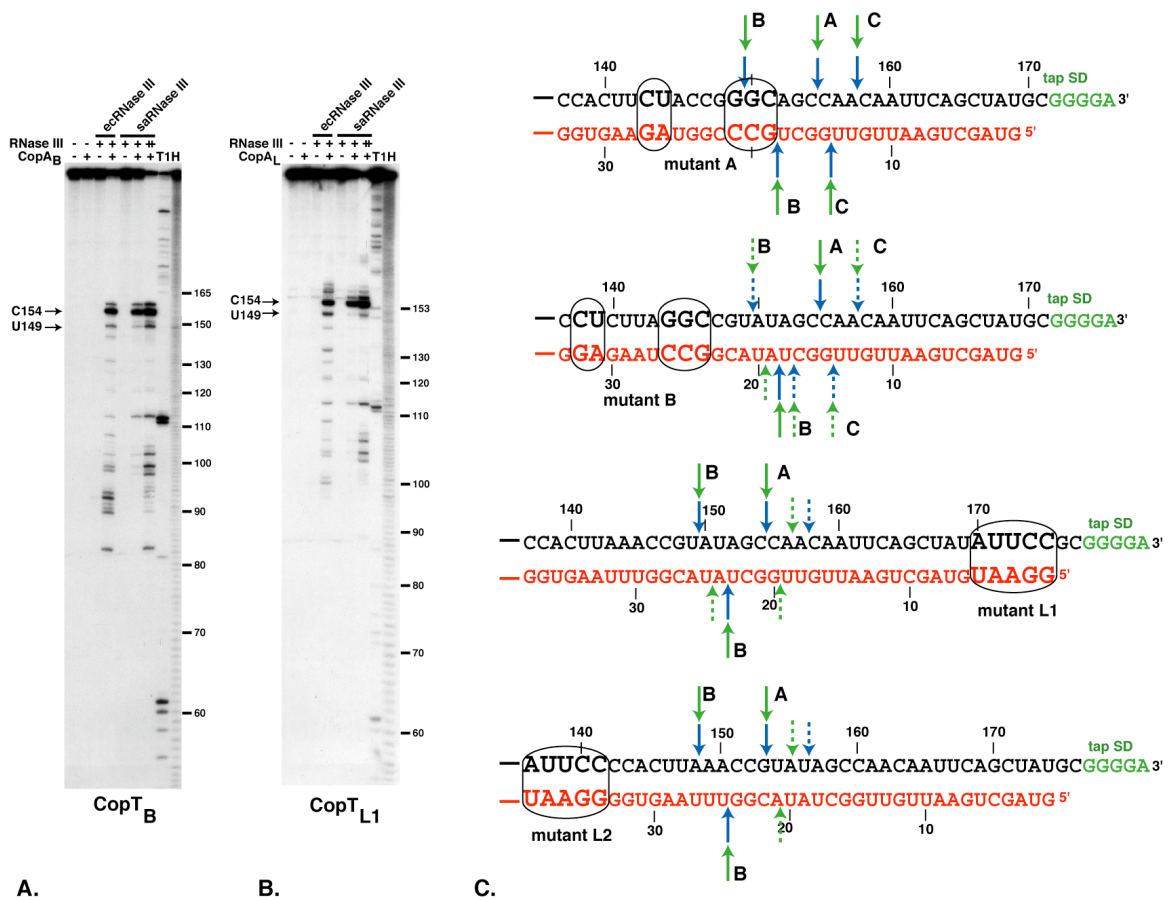


Figure 48 : Hydrolyse des différents complexes CopA-CopT mutants par les RNase III d'E. coli et de S. aureus. Les ARN CopT mutants marqués sont incubés en présence d'un excès molaire de trois fois de leurs ARN CopA complémentaires. Les complexes sont formés pendant 15 min à 37°C puis soumis à l'hydrolyse par la RNase III. (A) mutant site AB; (B) mutant site L1 . Les gels correspondants mutants sites A et L2 ne sont pas montrés. (C) Les coupures observées sont indiquées sur la structure secondaire du complexe correspondant. Les flèches bleues correspondent aux coupures par la RNase III d'E. coli et les flèches vertes correspondent aux coupures par la RNase III de S. aureus.

Afin de déterminer si la structure particulière de la jonction à quatre hélices restreint le nombre de sites accessibles à la RNase III, nous avons introduit cinq paires de bases supplémentaires, soit un demi tour d'hélice, en aval ou en amont de l'hélice C. De manière remarquable, ces mutations ne changent ni le profil de coupure observé dans CopT, ni celui observé dans CopA (figures 48 et 49, mutants L1 et L2).

Finalement, nous avons utilisé des ARN CopA et CopT tronqués qui reconstituent l'hélice intermoléculaire C (mutants HCA et HCT, figure 49). De manière remarquable, la RNase III induit les mêmes coupures que celles observées dans le complexe sauvage. Dans CopA, on retrouve la coupure majoritaire A18 et dans CopT on retrouve les

coupures U149 et C155. Cette dernière est cependant décalée d'un nucléotide par rapport au complexe sauvage. Ces données nous indiquent que, dans l'hélice C, la RNase III possède deux sites de fixation bien spécifiques. L'intensité des coupures dans le complexe sauvage indique que les deux sites ont une affinité comparable pour l'hélice intermoléculaire C. Néanmoins, en raison des mécanismes de fixation de la RNase III à ses cibles, ils sont mutuellement exclusifs.

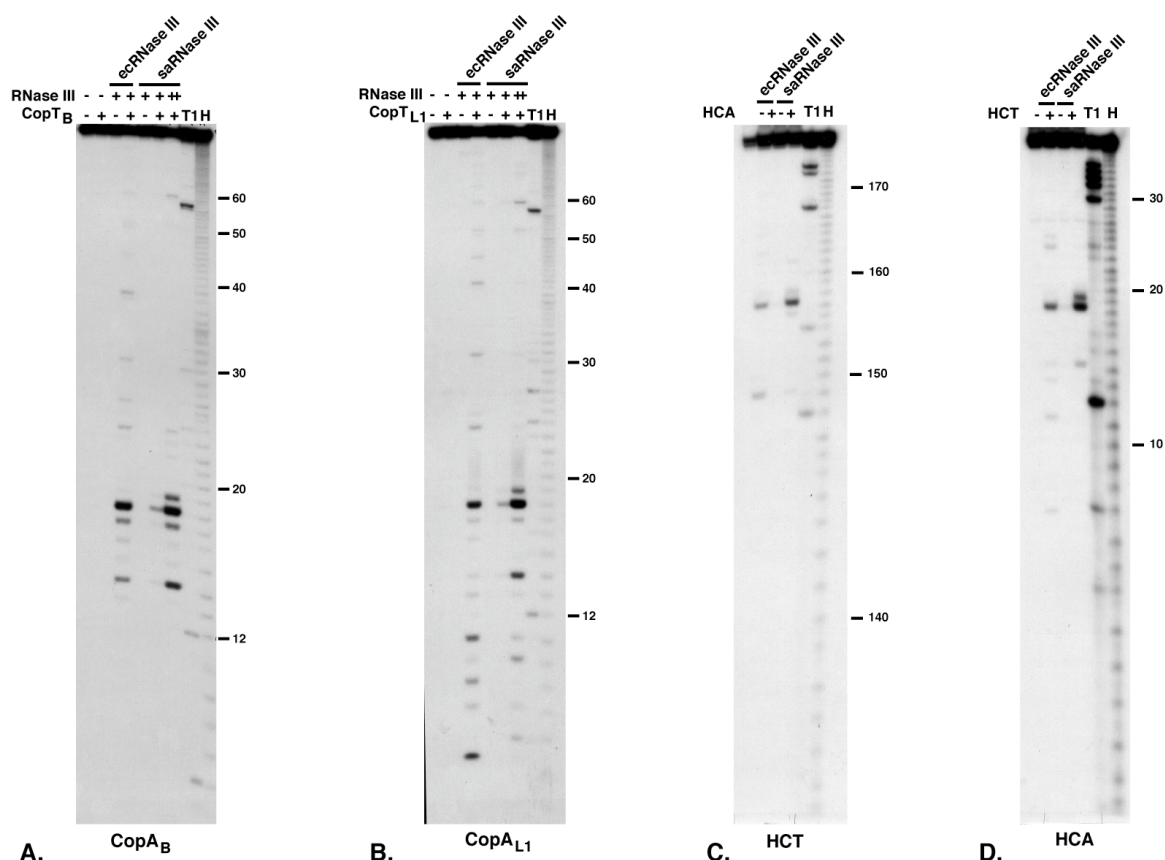


Figure 49: Hydrolyse des différents complexes CopA-CopT mutants par les RNase III d'E. coli et de S. aureus. Les ARN CopA mutants marqués sont incubés en présence d'un excès molaire de trois fois de leurs ARN CopT complémentaires. Les complexes sont formés pendant 15 min à 37°C puis soumis à l'hydrolyse par la RNase III. Dans le cas des ARN HCT et HCA, l'ARN marqué est incubé en présence d'un excès molaire de trois en ARN complémentaire à 90°C pendant 2 min, puis on laisse la température descendre lentement à 37°C pour permettre la formation de l'hélice. (A) mutant site B ; (B) mutant site L1 ; (C, D) hélice C, les positions des nucléotides correspondent aux positions dans le complexe sauvage.

C.2. Fixation de la RNase III sur les différents complexes CopA-CopT

La fixation de la RNase III sur le complexe stable CopA-CopT et le duplex étendu a été suivie par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions natives (figure 50). La formation des complexes a été réalisée avec CopA marqué à l'extrémité 5', en présence de chlorure de calcium à la place du magnésium pour inhiber l'hydrolyse par la RNase III sauvage. Après formation du complexe stable et du duplex étendu, des quantités croissantes d'enzyme (50 nM à 0,8 μ M) ont été ajoutées et incubées pendant 10 min à 20°C.

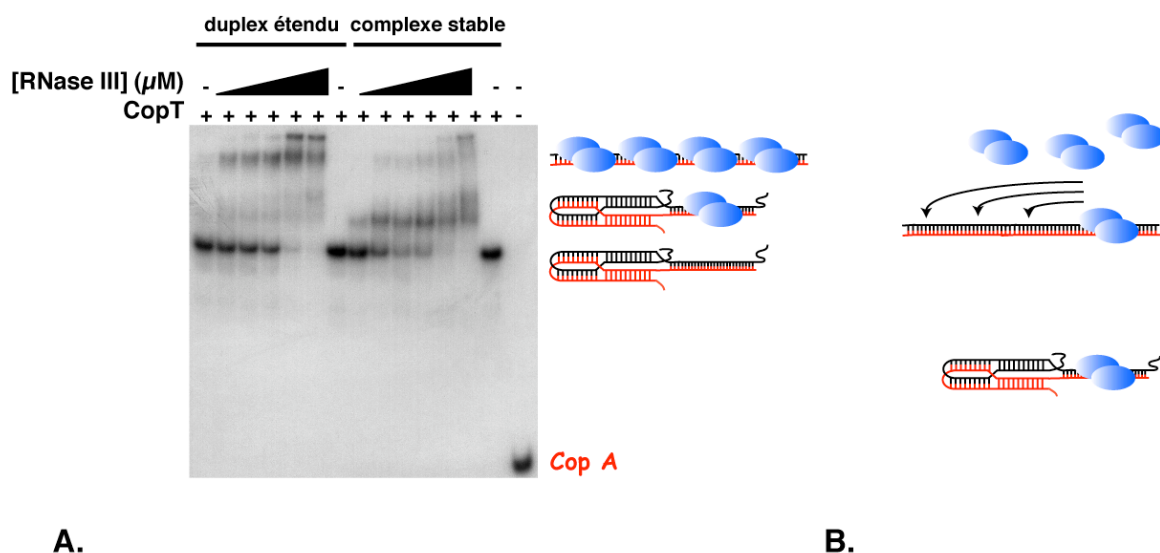


Figure 50 : Fixation de la RNase III d'*E. coli* sur le complexe stable et le duplex étendu. (A) CopA marqué à son extrémité 5' est incubé avec un excès molaire de trois fois avec CopT. Le complexe stable est formé pendant 15 minutes à 37°C. Le duplex étendu est formé en incubant les deux ARN à 90°C puis en laissant baisser lentement la température. La RNase III est ajoutée à des concentrations croissantes et les complexes se forment pendant 15 minutes à 20°C. (B) Schéma de la fixation de la RNase III au niveau de l'hélice intermoléculaire C. Dans le duplex étendu, nous pensons qu'il y a une fixation coopérative de plusieurs RNase III suite à une fixation initiale au niveau de la région correspondant à l'hélice C.

En absence de RNase III, le complexe stable et le duplex étendu adoptent un profil de migration similaire. Ainsi, les topologies différentes des deux complexes ne sont pas différenciés par cette méthode. En revanche, en présence de la protéine, le retard observé pour le duplex étendu est bien plus important que celui observé avec le complexe stable. Cette différence peut s'expliquer par la fixation de plusieurs molécules de RNase III sur le duplex étendu. Li et Nicholson ont montré que la RNase III agit comme homodimère et nécessite 22 paires de bases pour une interaction optimale (Li et

Nicholson, 1996). Le duplex CopA-CopT contient huit tours d'hélice pouvant potentiellement fixer 4 molécules alors que dans le complexe stable, la stœchiométrie serait d'une molécule par complexe. De manière remarquable, ce phénomène se produit dès les plus basses concentrations en enzyme, et aucun intermédiaire n'est détecté. Ceci pourrait s'expliquer par une fixation coopérative des différentes protéines de RNase III sur le duplex étendu. Nous proposons que la RNase III se fixe tout d'abord au niveau de l'hélice intermoléculaire C puis, de manière coopérative, recouvre le duplex étendu.

C.3. Conclusions

Dans ce travail, nous avons montré que les structures de l'ARN antisens et de l'ARNm ont évolué afin de bloquer la progression du complexe stable vers le duplex étendu. Au sein du complexe stable, l'hélice intermoléculaire C a deux fonctions essentielles : stabiliser de façon irréversible le complexe CopA-CopT, et créer un site de fixation pour la RNase III. La stabilisation du complexe CopA-CopT garantit le contrôle au niveau de la traduction alors que la coupure par la RNase III génère un intermédiaire de dégradation de l'ARNm *repA* qui est rapidement éliminé par la machinerie de dégradation cellulaire des ARNm. Un résultat non montré, surprenant mais reproductible, est que la signature du duplex étendu apparaît lorsque l'on augmente la concentration en RNase III dans les expériences d'hydrolyses (Malmgren et al., 1997). Il est possible que la RNase III puisse perturber le pied des hélices A et A' des deux ARN en se fixant au complexe, favorisant le passage au duplex étendu pour dégrader l'ensemble du complexe *in vivo*.

D. Cristallogenèse du complexe CopA-CopT

Le modèle du complexe CopA-CopT construit par modélisation graphique est basé sur de nombreuses évidences expérimentales. Néanmoins, les détails exacts de la topologie de la jonction à quatre hélices et de la conformation des boucles restent à être précisés. C'est pourquoi nous avons débuté au laboratoire avec F. Kolb la cristallisation du complexe CopA-CopT, afin d'obtenir la structure du complexe à haute résolution.

D.1. Choix des séquences de CopA et de CopT

La formation d'un complexe étendu entre les ARN CopA et CopT est un processus très lent *in vitro*. Néanmoins, les essais de cristallisation se déroulent sur des durées longues, avec l'utilisation de hautes concentrations en ARN et en sels. Ces derniers paramètres pourraient déplacer l'équilibre du complexe stable CopA-CopT vers la formation d'un duplex étendu. Afin d'empêcher cette transition, la séquence de l'ARN CopA a été modifiée, avec une inversion des paires de bases de la partie inférieure de l'hélice II (figure 51). Nous avons aussi réduit l'hélice intermoléculaire C, qui ne contient plus que 13 paires de bases. Nous avons tout d'abord vérifié que ce complexe se forme de manière identique au complexe sauvage. Les deux ARN interagissent avec une vitesse d'association identique à celle du complexe sauvage, et des expériences de cartographie en solution au plomb et à la RNase V1 montrent que ce complexe adopte une topologie identique au complexe sauvage (résultats non montrés).

D.2. Préparation des ARN et formation du complexe

Les deux ARN ont été produits par transcription *in vitro* avec l'ARN polymérase du bactériophage T7. Les séquences d'ADN correspondant aux deux ARN ont été reconstituées par cassettes d'oligonucléotides, puis introduites dans le vecteur pUT7 (Serganov et al., 1997). Après transcription, les ARN obtenus sont de taille hétérogène à leur extrémité 3'. Afin de purifier des ARN d'une taille correcte, une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes a été effectuée (Kao et al., 2001). Après électroélution du gel, les ARN sont ensuite purifiés sur une chromatographie échangeuse

d'anions MonoQ, puis précipités. Les ARN sont conservés sous forme de précipités éthanoliques à -20°C.

Avant chaque essai de cristallisation, les ARN sont centrifugés et les culots sont repris dans un tampon Na cacodylate 5 mM pH 6,5, MgAc 2 mM, en fonction de la concentration d'ARN finale souhaitée. Cette concentration est vérifiée par mesure de l'absorbance de l'ARN à 260 nm. Les ARN sont incubés séparément à 37°C pendant 30 min puis incubés ensemble en quantité équimolaire pendant 30 minutes à 37°C pour former le complexe. Nous avons vérifié qu'il ne reste plus d'ARN libre à la fin de cette étape par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition native (résultat non montré).

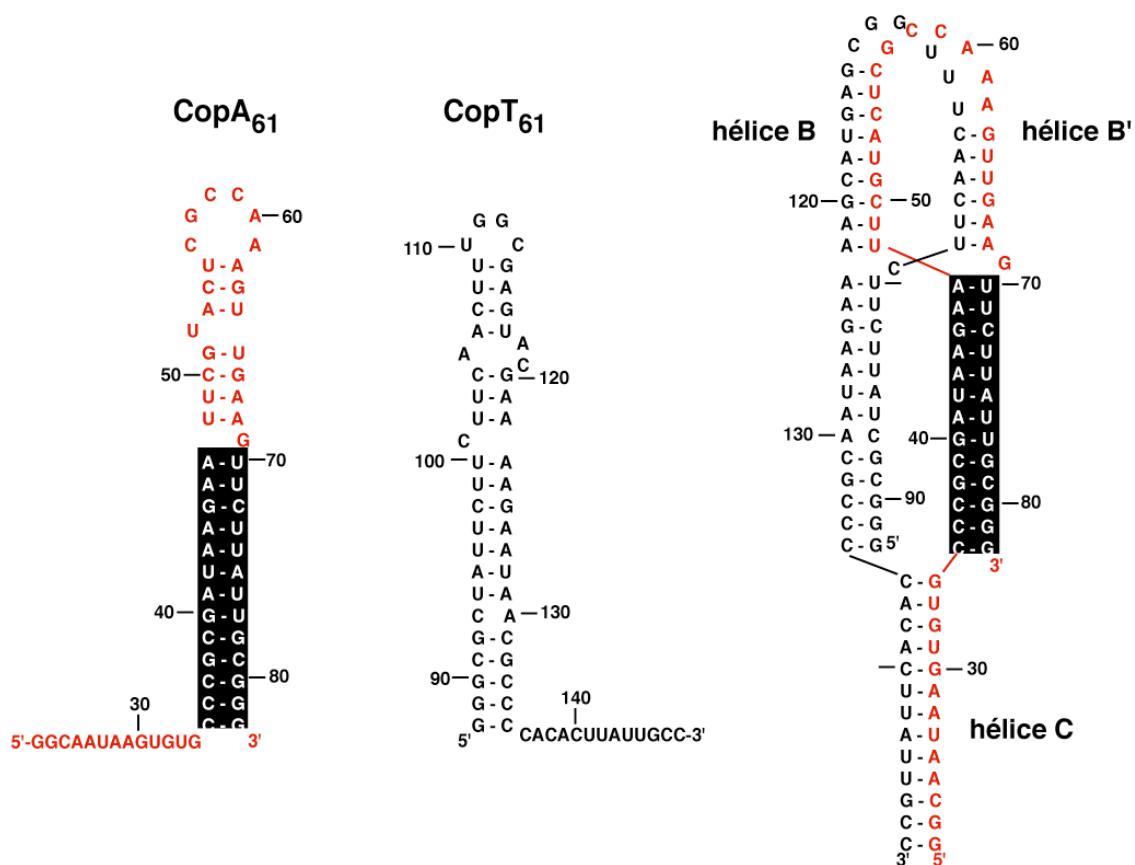


Figure 51: Structures secondaires des ARN CopA₆₁ et CopT₆₁ utilisés dans les essais de cristallogénèse et du complexe résultant. Les positions mutées dans CopA₆₁ par rapport à l'ARN sauvage sont indiquées par une boîte noire. Les nucléotides sont numérotés de la même manière que dans les ARN sauvages.

D.3. Essais de cristallisation du complexe CopA₆₁-CopT₆₁

Les gouttes de cristallisation sont composées de 2 µl de solution de complexe ARN-ARN, à des concentrations variables, et de 4 µl de solution mère de cristallisation.

Les essais sont effectués à 20°C par la technique des gouttes suspendues. Certains des résultats obtenus sont présentés sur la figure 52 et les conditions de cristallisation correspondantes sont présentées dans le tableau 13. Dans une première série d'essais de cristallisation, à partir d'un screen Natrix (Hampton Research), des microcristaux ont été obtenus en présence de divers agents précipitants comme le MPD, le PEG, le sulfate de lithium et le sulfate d'ammonium. Cependant, un trop grand nombre de points de nucléation existait, quelque soit l'agent précipitant utilisé. Dans une première étape, nous avons varié différents paramètres afin de réduire le nombre de points de nucléation, comme la concentration en ARN, le volume des gouttes, la concentration de l'agent précipitant, la concentration en ions divalents et l'ajout d'additifs. Dans l'ensemble, les cristaux ou microcristaux obtenus apparaissent entre un jour et une semaine après le lancement des gouttes.

La concentration en ARN et en ions divalents se sont avérés être les deux paramètres qui modulent le nombre de points de nucléation (figure 52, tableau 13). Ainsi, plus la concentration en magnésium est élevée, plus le nombre de microcristaux augmente. Dans les premiers essais, les gouttes contenaient 10 mg/ml d'ARN et, dans de nombreux cas, on observait l'apparition de précipités. La diminution de la concentration en ARN jusqu'à 1 mg/ml a également permis de diminuer le nombre de points de nucléation.

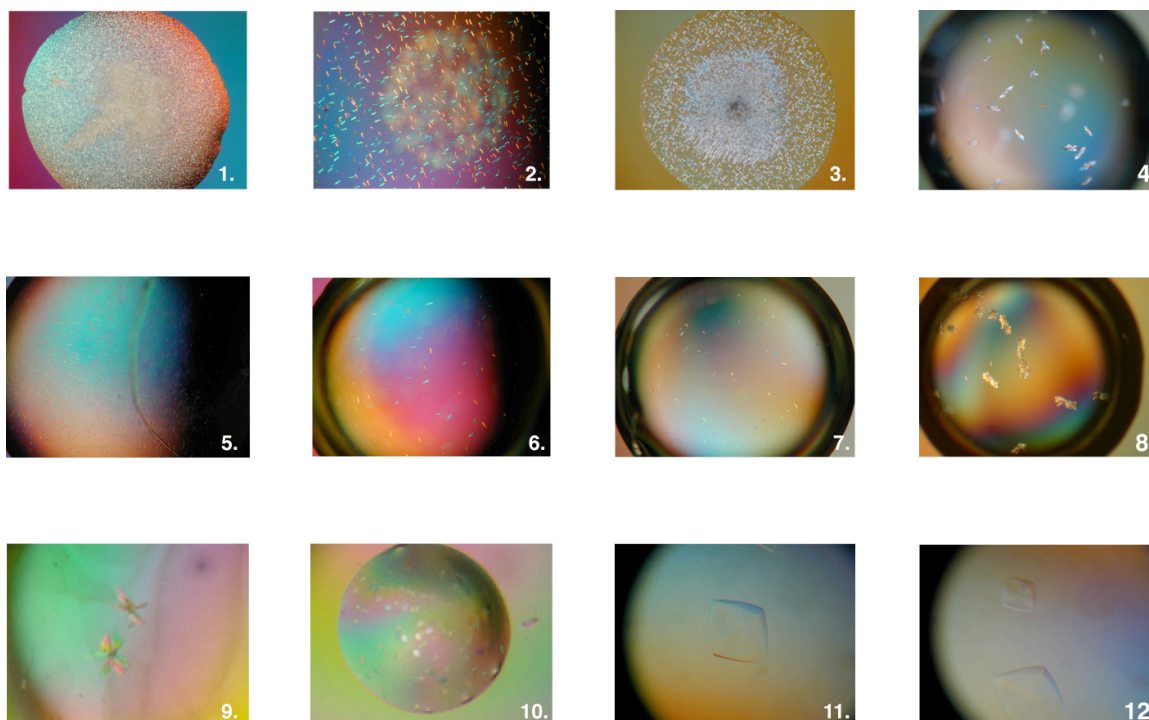


Figure 52 : Photos de quelques gouttes de cristallisation. Les conditions de cristallisation correspondantes sont dans le tableau 13.

photo	condition	[ARN] (mg/ml)
1	10 mM MgCl ₂ , 1,8M LiSO ₄	5
2	10 mM MgCl ₂ , 1,8M LiSO ₄	2
3	50 mM MgCl ₂ , 1M LiSO ₄	5
4	50 mM MgCl ₂ , 1,2M LiSO ₄	1
5	50 mM MgCl ₂ , 1,2M LiSO ₄ + 1mM Spermine	1
6	50 mM MgCl ₂ , 1,2M LiSO ₄ + 1mM Spermine	0,75
7	50 mM MgCl ₂ , 1,2M LiSO ₄ + 1mM Spermine	0,75
8	20 mM MgCl ₂ , 10% MPD	1
9	20 mM MgCl ₂ , 10% MPD+1,2mM Spermine	1
10	10 mM MgCl ₂ , 1,2M sulfate d'ammonium	1
11	50 mM MgCl ₂ , 1,2M sulfate d'ammonium	1
12	50 mM MgCl ₂ , 1,4M sulfate d'ammonium	1

Tableau 13: *Conditions de cristallisation utilisées.*

Nous avons obtenu des cristaux d'une taille de 100 µm en utilisant le sulfate d'ammonium comme agent précipitant. Les cristaux obtenus sont de forme cubique et sont relativement fragiles (figure 52, photos 11 et 12). Certains de ces cristaux ont été dissous afin de vérifier par mesure de l'absorbance à 260 nm qu'ils contiennent bien de l'ARN. D'autres cristaux ont été récemment obtenus dans le MPD (figure 52, photos 8 et 9). Les cristaux obtenus ont été congelés dans l'azote afin de les conserver et de les protéger lors de l'acquisition des clichés de diffraction. Malheureusement, nos cristaux ne diffractent pas, et il est possible que l'étape de congélation nécessite d'être optimisée.

Ces résultats sont malgré tout encourageants. En effet, quel que soit l'agent précipitant utilisé, nous avons obtenu des cristaux du complexe. Le processus de nucléation peut être maîtrisé en jouant sur les concentrations en ARN et en ions divalents. La prochaine étape consistera à trouver d'autres formes cristallines. Pour cela, on pourra jouer sur d'autres paramètres en ajoutant certains additifs, comme la spermine, dans les gouttes de cristallisation. Des essais d'ensemencement, en utilisant des microcristaux déjà obtenus, pourront éventuellement permettre d'obtenir des cristaux plus larges. Enfin, il est nécessaire de varier les séquences et les tailles des deux ARN. Par exemple, la longueur de l'hélice C pourrait être modifiée, avec ou non l'addition de nucléotides non appariés aux extrémités de l'hélice. L'acquisition par notre UPR d'un robot de cristallisation (Mosquito) aura l'avantage de tester rapidement différentes constructions, avec peu de matériel, et dans de nombreuses conditions de cristallisation.

Conclusion générale

L'étude de ces deux ARN régulateurs procaryotiques permet de comparer le mode d'action de deux ARN régulateurs dont la fonction est de cibler des ARNm. L'ARN antisens CopA régule la réplication du plasmide R1 au niveau post-transcriptionnel, grâce à la formation d'un complexe inhibiteur stable formé d'une jonction à quatre hélices. Les structures de l'ARN antisens et de sa cible favorisent la formation de cette structure. Le complexe formé crée un site de fixation pour la RNase III, qui entraîne la dégradation simultanée de l'ARN antisens et de sa cible.

L'ARNIII régule de multiples cibles par différents mécanismes. Le domaine 3' agit comme un ARN antisens, en inhibant la traduction de ces ARNm cibles et en favorisant leur dégradation. Une différence majeure entre les systèmes CopA et ARNIII réside dans la structure finale du complexe ARN-ARN formé. Dans les deux systèmes, l'interaction initiale est de type boucle-boucle. Le mécanisme de conversion est ensuite dicté par la structure des ARN. L'ARN CopA forme avec sa cible une structure particulière qui est suffisante pour un contrôle optimal. La tige-boucle 13 de l'ARNIII possède des résidus non appariés dans une hélice peu stable, ce qui favorise son ouverture pour induire la propagation des contacts intermoléculaires. La stabilité de ce duplex n'est pas suffisante pour assurer une répression de la traduction irréversible. Dans ce cas, la RNase III est essentielle pour induire la dégradation rapide de l'ARNm.

La protéine Hfq est associée aux mécanismes de régulation dépendant des ARNnc chez *E. coli*. Toutefois, dans le cas de CopA-CopT, elle n'est pas nécessaire pour le contrôle. CopA est un ARN instable dans la cellule, ce qui lui permet de compter à tout moment la concentration en plasmide dans la cellule. Une interaction avec Hfq, qui stabilise les ARNnc, est donc à proscrire. Dans le cas de l'ARNIII, la protéine Hfq est un ligand de l'ARNIII et est nécessaire pour la virulence de *S. aureus*. Sa fonction reste néanmoins à être déterminé, et elle ne semble pas être requise pour l'activité du domaine 3'. D'autres résultats préliminaires indiquent que l'ARNIII peut fixer des facteurs de transcription, peut être pour de moduler leur activité. Ainsi, l'ARNIII est unique puisqu'il possède une phase ouverte de lecture, agit comme antisens (activateur/répresseur) et pourrait séquestrer des protéines régulatrices. Le fait que les domaines antisens soient

portés par des régions différentes de l'ARN nous fait penser à un « operon-like » de petits ARNnc.

De manière intéressante, des similitudes existent dans les modes d'action utilisés par les ARN régulateurs eucaryotiques et procaryotiques. Ainsi, nous pouvons comparer des ARN antisens procaryotiques au miARN eucaryotiques (Sontheimer et Carthew, 2005). Les deux types d'ARN agissent en s'hybridant spécifiquement à leur ARNm. Cette hybridation se fait dans la région 3' non traduite des ARNm eucaryotiques et majoritairement au niveau du site d'initiation de la traduction dans les ARNm procaryotiques. Malgré cette différence, les conséquences de l'hybridation sont analogues, à savoir une inhibition de la traduction ou une dégradation de l'ARNm cible. Les ARN antisens bactérien peuvent également activer la traduction de l'ARNm cible ou induire sa stabilisation. Même si de tels mécanismes n'ont pas encore été découverts chez les eucaryotes, on ne peut pas exclure qu'ils ne puissent pas exister. Finalement, dans les deux cas on retrouve ces ARN associés à un complexe protéique, comme le complexe RISC chez les eucaryotes ou le complexe Hfq-RNase E chez *E. coli* (Filipowicz, 2005; Morita et al., 2005) et, au sein de ces complexes, l'ARN amène la spécificité de reconnaissance.

Ce type de parallèle peut également être fait pour les ARN régulateurs modulant l'activité d'une protéine. L'ARN 6S d'*E. coli* possède des homologues fonctionnels chez les eucaryotes. Ainsi, chez la souris, l'ARN B2 est exprimé suite à un stress par la chaleur. Après son induction, il se fixe à l'ARN polymérase II et inhibe la formation des complexes de pré-initiation de la transcription. De plus, cet ARN possède une spécificité d'action puisqu'il ne bloque pas la transcription des gènes impliqués dans la réponse à ce stress (Allen et al., 2004; Espinoza et al., 2004).

Ainsi, comme décrit dans l'introduction de ce manuscrit, les ARN non codants occupent une place de plus en plus importante dans les cellules procaryotiques et eucaryotiques. De plus, on peut s'attendre à ce que l'on découvre d'autres molécules d'ARN et de nouvelles fonctions inattendues qui leur seront associées. Ces découvertes permettent de proposer une vision plus moderne du «RNA World» (Gesteland et al., 1999), dans laquelle les ARN sont des acteurs essentiels dans le contrôle de l'expression des gènes. L'étude de leurs mécanismes d'action et l'identification de leurs cibles est essentielle pour pouvoir les intégrer dans les réseaux complexes de régulation qui sont présents dans les cellules et les organismes.

Bibliographie

- Abdelnour, A., Arvidson, S., Bremell, T., Ryden, C. et Tarkowski, A. (1993) The accessory gene regulator (*agr*) controls *Staphylococcus aureus* virulence in a murine arthritis model. *Infect Immun*, **61**, 3879-3885.
- Afonyushkin, T., Vecerek, B., Moll, I., Blasi, U. et Kaberdin, V.R. (2005) Both RNase E and RNase III control the stability of *sodB* mRNA upon translational inhibition by the small regulatory RNA *RyhB*. *Nucleic Acids Res*, **33**, 1678-1689.
- Alexander, E.H. et Hudson, M.C. (2001) Factors influencing the internalization of *Staphylococcus aureus* and impacts on the course of infections in humans. *Appl Microbiol Biotechnol*, **56**, 361-366.
- Allen, T.A., Von Kaenel, S., Goodrich, J.A. et Kugel, J.F. (2004) The SINE-encoded mouse B2 RNA represses mRNA transcription in response to heat shock. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 816-821.
- Altuvia, S., Weinstein-Fischer, D., Zhang, A., Postow, L. et Storz, G. (1997) A small, stable RNA induced by oxidative stress: role as a pleiotropic regulator and antimutator. *Cell*, **90**, 43-53.
- Altuvia, S., Zhang, A., Argaman, L., Tiwari, A. et Storz, G. (1998) The *Escherichia coli* OxyS regulatory RNA represses *fhlA* translation by blocking ribosome binding. *Embo J*, **17**, 6069-6075.
- Ambros, V. (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature*, **431**, 350-355.
- Appelbaum, P.C. et Bozdogan, B. (2004) Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin Lab Med*, **24**, 381-402.
- Argaman, L. et Altuvia, S. (2000) *fhlA* repression by OxyS RNA: kissing complex formation at two sites results in a stable antisense-target RNA complex. *J Mol Biol*, **300**, 1101-1112.
- Argaman, L., Hershberg, R., Vogel, J., Bejerano, G., Wagner, E.G., Margalit, H. et Altuvia, S. (2001) Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*. *Curr Biol*, **11**, 941-950.
- Arluisson, V., Derreumaux, P., Allemand, F., Folichon, M., Hajnsdorf, E. et Regnier, P. (2002) Structural Modelling of the Sm-like Protein Hfq from *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, **320**, 705-712.
- Arvidson, S. et Tegmark, K. (2001) Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol*, **291**, 159-170.
- Autret, N., Raynaud, C., Dubail, I., Berche, P. et Charbit, A. (2003) Identification of the *agr* locus of *Listeria monocytogenes*: role in bacterial virulence. *Infect Immun*, **71**, 4463-4471.
- Axmann, I.M., Kensche, P., Vogel, J., Kohl, S., Herzel, H. et Hess, W.R. (2005) Identification of cyanobacterial non-coding RNAs by comparative genome analysis. *Genome Biol*, **6**, R73.
- B**aba, T., Takeuchi, F., Kuroda, M., Yuzawa, H., Aoki, K., Oguchi, A., Nagai, Y., Iwama, N., Asano, K., Naimi, T., Kuroda, H., Cui, L., Yamamoto, K. et Hiramatsu, K. (2002) Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet*, **359**, 1819-1827.

- Bachellerie, J.P., Cavaille, J. et Huttenhofer, A. (2002) The expanding snoRNA world. *Biochimie*, **84**, 775-790.
- Bae, T., Banger, A.K., Wallace, A., Glass, E.M., Aslund, F., Schneewind, O. et Missiakas, D.M. (2004) Staphylococcus aureus virulence genes identified by bursa aurealis mutagenesis and nematode killing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 12312-12317.
- Balaban, N. et Rasooly, A. (2000) Staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbiol*, **61**, 1-10.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B. et Steitz, T.A. (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*, **289**, 905-920.
- Barrick, J.E., Corbino, K.A., Winkler, W.C., Nahvi, A., Mandal, M., Collins, J., Lee, M., Roth, A., Sudarsan, N., Jona, I., Wickiser, J.K. et Breaker, R.R. (2004) New RNA motifs suggest an expanded scope for riboswitches in bacterial genetic control. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 6421-6426.
- Barrick, J.E., Sudarsan, N., Weinberg, Z., Ruzzo, W.L. et Breaker, R.R. (2005) 6S RNA is a widespread regulator of eubacterial RNA polymerase that resembles an open promoter. *Rna*, **11**, 774-784.
- Bassler, B.L. (2002) Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell*, **109**, 421-424.
- Batey, R.T., Gilbert, S.D. et Montange, R.K. (2004) Structure of a natural guanine-responsive riboswitch complexed with the metabolite hypoxanthine. *Nature*, **432**, 411-415.
- Baulcombe, D. (2005) RNA silencing. *Trends Biochem Sci*, **30**, 290-293.
- Bayer, A.S., Ramos, M.D., Menzies, B.E., Yeaman, M.R., Shen, A.J. et Cheung, A.L. (1997) Hyperproduction of alpha-toxin by Staphylococcus aureus results in paradoxically reduced virulence in experimental endocarditis: a host defense role for platelet microbicidal proteins. *Infect Immun*, **65**, 4652-4660.
- Bayne, E.H. et Allshire, R.C. (2005) RNA-directed transcriptional gene silencing in mammals. *Trends Genet*, **21**, 370-373.
- Begun, J., Sifri, C.D., Goldman, S., Calderwood, S.B. et Ausubel, F.M. (2005) Staphylococcus aureus virulence factors identified by using a high-throughput Caenorhabditis elegans-killing model. *Infect Immun*, **73**, 872-877.
- Benito, Y., Kolb, F.A., Romby, P., Lina, G., Etienne, J. et Vandenesch, F. (2000) Probing the structure of RNAIII, the Staphylococcus aureus agr regulatory RNA, and identification of the RNA domain involved in repression of protein A expression. *Rna*, **6**, 668-679.
- Benito, Y., Lina, G., Greenland, T., Etienne, J. et Vandenesch, F. (1998) trans-complementation of a Staphylococcus aureus agr mutant by Staphylococcus lugdunensis agr RNAIII. *J Bacteriol*, **180**, 5780-5783.
- Bischoff, M., Entenza, J.M. et Giachino, P. (2001) Influence of a functional sigB operon on the global regulators sar and agr in Staphylococcus aureus. *J Bacteriol*, **183**, 5171-5179.
- Blackburn, E.H. (2005) Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions. *FEBS Lett*, **579**, 859-862.
- Blevins, J.S., Elasri, M.O., Allmendinger, S.D., Beenken, K.E., Skinner, R.A., Thomas, J.R. et Smeltzer, M.S. (2003) Role of sarA in the pathogenesis of Staphylococcus aureus musculoskeletal infection. *Infect Immun*, **71**, 516-523.
- Blevins, J.S., Gillaspay, A.F., Rechtin, T.M., Hurlburt, B.K. et Smeltzer, M.S. (1999) The Staphylococcal accessory regulator (sar) represses transcription of the

- Staphylococcus aureus collagen adhesin gene (cna) in an agr-independent manner. *Mol Microbiol*, **33**, 317-326.
- Blomberg, P., Engdahl, H.M., Malmgren, C., Romby, P. et Wagner, E.G. (1994) Replication control of plasmid R1: disruption of an inhibitory RNA structure that sequesters the repA ribosome-binding site permits tap-independent RepA synthesis. *Mol Microbiol*, **12**, 49-60.
- Blomberg, P., Nordstrom, K. et Wagner, E.G. (1992) Replication control of plasmid R1: RepA synthesis is regulated by CopA RNA through inhibition of leader peptide translation. *Embo J*, **11**, 2675-2683.
- Blomberg, P., Wagner, E.G. et Nordstrom, K. (1990) Control of replication of plasmid R1: the duplex between the antisense RNA, CopA, and its target, CopT, is processed specifically in vivo and in vitro by RNase III. *Embo J*, **9**, 2331-2340.
- Booth, M.C., Cheung, A.L., Hatter, K.L., Jett, B.D., Callegan, M.C. et Gilmore, M.S. (1997) Staphylococcal accessory regulator (sar) in conjunction with agr contributes to Staphylococcus aureus virulence in endophthalmitis. *Infect Immun*, **65**, 1550-1556.
- Brantl, S., Birch-Hirschfeld, E. et Behnke, D. (1993) RepR protein expression on plasmid pIP501 is controlled by an antisense RNA-mediated transcription attenuation mechanism. *J Bacteriol*, **175**, 4052-4061.
- Brescia, C.C., Mikulecky, P.J., Feig, A.L. et Sledjeski, D.D. (2003) Identification of the Hfq-binding site on DsrA RNA: Hfq binds without altering DsrA secondary structure. *Rna*, **9**, 33-43.
- Bronner, S., Monteil, H. et Prevost, G. (2004) Regulation of virulence determinants in Staphylococcus aureus: complexity and applications. *FEMS Microbiol Rev*, **28**, 183-200.
- Bronner, S., Stoessel, P., Gravet, A., Monteil, H. et Prevost, G. (2000) Variable expressions of Staphylococcus aureus bicomponent leucotoxins semiquantified by competitive reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol*, **66**, 3931-3938.
- Brown, L. et Elliott, T. (1997) Mutations that increase expression of the rpoS gene and decrease its dependence on hfq function in Salmonella typhimurium. *J Bacteriol*, **179**, 656-662.
- Brownlee, G.G. (1971) Sequence of 6S RNA of E. coli. *Nat New Biol*, **229**, 147-149.
- Brunel, C., Marquet, R., Romby, P. et Ehresmann, C. (2002) RNA loop-loop interactions as dynamic functional motifs. *Biochimie*, **84**, 925-944.
- Brunskill, E.W. et Bayles, K.W. (1996) Identification and molecular characterization of a putative regulatory locus that affects autolysis in Staphylococcus aureus. *J Bacteriol*, **178**, 611-618.
- Burrowes, E., Abbas, A., O'Neill, A., Adams, C. et O'Gara, F. (2005) Characterisation of the regulatory RNA RsmB from Pseudomonas aeruginosa PAO1. *Res Microbiol*, **156**, 7-16.
- C**ampbell, F.E., Jr., Cassano, A.G., Anderson, V.E. et Harris, M.E. (2002) Pre-steady-state and stopped-flow fluorescence analysis of Escherichia coli ribonuclease III: insights into mechanism and conformational changes associated with binding and catalysis. *J Mol Biol*, **317**, 21-40.
- Carattoli, A. (2003) Plasmid-mediated antimicrobial resistance in Salmonella enterica. *Curr Issues Mol Biol*, **5**, 113-122.
- Cavaille, J., Buiting, K., Kiefmann, M., Lalande, M., Brannan, C.I., Horsthemke, B., Bachelier, J.P., Brosius, J. et Huttenhofer, A. (2000) Identification of brain-

- specific and imprinted small nucleolar RNA genes exhibiting an unusual genomic organization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 14311-14316.
- Cavaille, J., Vitali, P., Basyuk, E., Huttenhofer, A. et Bachellerie, J.P. (2001) A novel brain-specific box C/D small nucleolar RNA processed from tandemly repeated introns of a noncoding RNA gene in rats. *J Biol Chem*, **276**, 26374-26383.
- Cawley, S., Bekiranov, S., Ng, H.H., Kapranov, P., Sekinger, E.A., Kampa, D., Piccolboni, A., Sementchenko, V., Cheng, J., Williams, A.J., Wheeler, R., Wong, B., Drenkow, J., Yamanaka, M., Patel, S., Brubaker, S., Tammana, H., Helt, G., Struhl, K. et Gingeras, T.R. (2004) Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs. *Cell*, **116**, 499-509.
- Cech, T.R. (2002) Ribozymes, the first 20 years. *Biochem Soc Trans*, **30**, 1162-1166.
- Celkan, T., Ozkan, A., Apak, H., Diren, S., Can, G., Yuksel, L. et Yildiz, I. (2002) Bacteremia in childhood cancer. *J Trop Pediatr*, **48**, 373-377.
- Chamberlain, N.R. et Imanoel, B. (1996) Genetic regulation of fatty acid modifying enzyme from *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol*, **44**, 125-129.
- Chan, P.F. et Foster, S.J. (1998) Role of SarA in virulence determinant production and environmental signal transduction in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, **180**, 6232-6241.
- Chan, P.F., Foster, S.J., Ingham, E. et Clements, M.O. (1998) The *Staphylococcus aureus* alternative sigma factor sigmaB controls the environmental stress response but not starvation survival or pathogenicity in a mouse abscess model. *J Bacteriol*, **180**, 6082-6089.
- Chavakis, T., Hussain, M., Kanse, S.M., Peters, G., Bretzel, R.G., Flock, J.I., Herrmann, M. et Preissner, K.T. (2002) *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat Med*, **8**, 687-693.
- Chavakis, T., Wiechmann, K., Preissner, K.T. et Herrmann, M. (2005) *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: the role of bacterial "secretable expanded repertoire adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thromb Haemost*, **94**, 278-285.
- Chen, S., Lesnik, E.A., Hall, T.A., Sampath, R., Griffey, R.H., Ecker, D.J. et Blyn, L.B. (2002) A bioinformatics based approach to discover small RNA genes in the *Escherichia coli* genome. *Biosystems*, **65**, 157-177.
- Chen, S., Zhang, A., Blyn, L.B. et Storz, G. (2004) MicC, a second small-RNA regulator of Omp protein expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **186**, 6689-6697.
- Cheung, A.L., Bayer, A.S., Zhang, G., Gresham, H. et Xiong, Y.Q. (2004) Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **40**, 1-9.
- Cheung, A.L., Bayer, M.G. et Heinrichs, J.H. (1997a) sar Genetic determinants necessary for transcription of RNAII and RNAIII in the agr locus of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, **179**, 3963-3971.
- Cheung, A.L., Eberhardt, K. et Heinrichs, J.H. (1997b) Regulation of protein A synthesis by the sar and agr loci of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, **65**, 2243-2249.
- Cheung, A.L., Eberhardt, K.J., Chung, E., Yeaman, M.R., Sullam, P.M., Ramos, M. et Bayer, A.S. (1994) Diminished virulence of a sar-/agr- mutant of *Staphylococcus aureus* in the rabbit model of endocarditis. *J Clin Invest*, **94**, 1815-1822.
- Cheung, A.L. et Fischetti, V.A. (1990) The role of fibrinogen in staphylococcal adherence to catheters in vitro. *J Infect Dis*, **161**, 1177-1186.

- Cheung, A.L., Schmidt, K., Bateman, B. et Manna, A.C. (2001) SarS, a SarA homolog repressible by agr, is an activator of protein A synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, **69**, 2448-2455.
- Chien, Y. et Cheung, A.L. (1998) Molecular interactions between two global regulators, sar and agr, in *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*, **273**, 2645-2652.
- Chien, Y., Manna, A.C. et Cheung, A.L. (1998) SarA level is a determinant of agr activation in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*, **30**, 991-1001.
- Chien, Y., Manna, A.C., Projan, S.J. et Cheung, A.L. (1999) SarA, a global regulator of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*, binds to a conserved motif essential for sar-dependent gene regulation. *J Biol Chem*, **274**, 37169-37176.
- Cho, S.H., Strickland, I., Boguniewicz, M. et Leung, D.Y. (2001) Fibronectin and fibrinogen contribute to the enhanced binding of *Staphylococcus aureus* to atopic skin. *J Allergy Clin Immunol*, **108**, 269-274.
- Chopra, I. (2003) Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*: concerns, causes and cures. *Expert Rev Anti Infect Ther*, **1**, 45-55.
- Christiansen, J.K., Larsen, M.H., Ingmer, H., Sogaard-Andersen, L. et Kallipolitis, B.H. (2004) The RNA-binding protein Hfq of *Listeria monocytogenes*: role in stress tolerance and virulence. *J Bacteriol*, **186**, 3355-3362.
- Condon, C. (2003) RNA processing and degradation in *Bacillus subtilis*. *Microbiol Mol Biol Rev*, **67**, 157-174, table of contents.
- Condon, C. et Putzer, H. (2002) The phylogenetic distribution of bacterial ribonucleases. *Nucleic Acids Res*, **30**, 5339-5346.
- Coulter, S.N., Schwan, W.R., Ng, E.Y., Langhorne, M.H., Ritchie, H.D., Westbrook-Wadman, S., Hufnagle, W.O., Folger, K.R., Bayer, A.S. et Stover, C.K. (1998) *Staphylococcus aureus* genetic loci impacting growth and survival in multiple infection environments. *Mol Microbiol*, **30**, 393-404.
- Cunningham, R., Cockayne, A. et Humphreys, H. (1996) Clinical and molecular aspects of the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* bone and joint infections. *J Med Microbiol*, **44**, 157-164.
- D**ancer, S.J., Garratt, R., Saldanha, J., Jhoti, H. et Evans, R. (1990) The epidermolytic toxins are serine proteases. *FEBS Lett*, **268**, 129-132.
- Deivanayagam, C.C., Wann, E.R., Chen, W., Carson, M., Rajashankar, K.R., Hook, M. et Narayana, S.V. (2002) A novel variant of the immunoglobulin fold in surface adhesins of *Staphylococcus aureus*: crystal structure of the fibrinogen-binding MSCRAMM, clumping factor A. *Embo J*, **21**, 6660-6672.
- del Solar, G. et Espinosa, M. (1992) The copy number of plasmid pLS1 is regulated by two trans-acting plasmid products: the antisense RNA II and the repressor protein, RepA. *Mol Microbiol*, **6**, 83-94.
- Delihias, N. (1995) Regulation of gene expression by trans-encoded antisense RNAs. *Mol Microbiol*, **15**, 411-414.
- Delihias, N. et Forst, S. (2001) MicF: an antisense RNA gene involved in response of *Escherichia coli* to global stress factors. *J Mol Biol*, **313**, 1-12.
- Deora, R., Tseng, T. et Misra, T.K. (1997) Alternative transcription factor sigmaSB of *Staphylococcus aureus*: characterization and role in transcription of the global regulatory locus sar. *J Bacteriol*, **179**, 6355-6359.
- DiMari, J.F. et Bechhofer, D.H. (1993) Initiation of mRNA decay in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, **7**, 705-717.
- Ding, Y., Davis, B.M. et Waldor, M.K. (2004) Hfq is essential for *Vibrio cholerae* virulence and downregulates sigma expression. *Mol Microbiol*, **53**, 345-354.

- Dinges, M.M., Orwin, P.M. et Schlievert, P.M. (2000) Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev*, **13**, 16-34, table of contents.
- Drider, D., DiChiara, J.M., Wei, J., Sharp, J.S. et Bechhofer, D.H. (2002) Endonuclease cleavage of messenger RNA in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, **43**, 1319-1329.
- Dubin, G. (2002) Extracellular proteases of *Staphylococcus* spp. *Biol Chem*, **383**, 1075-1086.
- DuBow, M.S., Ryan, T., Young, R.A. et Blumenthal, T. (1977) Host factor for coliphage Q beta RNA replication: presence in procaryotes and association with the 30S ribosomal subunit in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*, **153**, 39-43.
- Dufour, P., Jarraud, S., Vandenesch, F., Greenland, T., Novick, R.P., Bes, M., Etienne, J. et Lina, G. (2002) High genetic variability of the *agr* locus in *Staphylococcus* species. *J Bacteriol*, **184**, 1180-1186.
- Dufourc, E.J., Dufourcq, J., Birkbeck, T.H. et Freer, J.H. (1990) Delta-haemolysin from *Staphylococcus aureus* and model membranes. A solid-state 2H-NMR and 31P-NMR study. *Eur J Biochem*, **187**, 581-587.
- Dunman, P.M., Murphy, E., Haney, S., Palacios, D., Tucker-Kellogg, G., Wu, S., Brown, E.L., Zagursky, R.J., Shlaes, D. et Projan, S.J. (2001) Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the *agr* and/or *sarA* loci. *J Bacteriol*, **183**, 7341-7353.
- E**ddy, S.R. (2001) Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nat Rev Genet*, **2**, 919-929.
- Eguchi, Y. et Tomizawa, J. (1990) Complex formed by complementary RNA stem-loops and its stabilization by a protein: function of ColE1 Rom protein. *Cell*, **60**, 199-209.
- Epshtein, V., Mironov, A.S. et Nudler, E. (2003) The riboswitch-mediated control of sulfur metabolism in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 5052-5056.
- Espinoza, C.A., Allen, T.A., Hieb, A.R., Kugel, J.F. et Goodrich, J.A. (2004) B2 RNA binds directly to RNA polymerase II to repress transcript synthesis. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 822-829.
- Even, S., Pellegrini, O., Zig, L., Labas, V., Vinh, J., Brechemmier-Baey, D. et Putzer, H. (2005) Ribonucleases J1 and J2: two novel endoribonucleases in *B.subtilis* with functional homology to *E.coli* RNase E. *Nucleic Acids Res*, **33**, 2141-2152.
- F**errieres, L. et Clarke, D.J. (2003) The RcsC sensor kinase is required for normal biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 and controls the expression of a regulon in response to growth on a solid surface. *Mol Microbiol*, **50**, 1665-1682.
- Filipowicz, W. (2005) RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine. *Cell*, **122**, 17-20.
- Flock, J.I., Froman, G., Jonsson, K., Guss, B., Signas, C., Nilsson, B., Raucci, G., Hook, M., Wadstrom, T. et Lindberg, M. (1987) Cloning and expression of the gene for a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus*. *Embo J*, **6**, 2351-2357.
- Folichon, M., Arluison, V., Pellegrini, O., Huntzinger, E., Regnier, P. et Hajnsdorf, E. (2003) The poly(A) binding protein Hfq protects RNA from RNase E and exoribonucleolytic degradation. *Nucleic Acids Res*, **31**, 7302-7310.
- Foster, T.J. (2004) The *Staphylococcus aureus* "superbug". *J Clin Invest*, **114**, 1693-1696.
- Foster, T.J. et Hook, M. (1998) Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*, **6**, 484-488.

- Fournier, B., Klier, A. et Rapoport, G. (2001) The two-component system ArlS-ArlR is a regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*, **41**, 247-261.
- Freer, J.H. (1982) Cytolytic toxins and surface activity. *Toxicon*, **20**, 217-221.
- Fuchs, T.M., Deppisch, H., Scarlato, V. et Gross, R. (1996) A new gene locus of *Bordetella pertussis* defines a novel family of prokaryotic transcriptional accessory proteins. *J Bacteriol*, **178**, 4445-4452.
- G**ao, J. et Stewart, G.C. (2004) Regulatory elements of the *Staphylococcus aureus* protein A (Spa) promoter. *J Bacteriol*, **186**, 3738-3748.
- Garcia-Lara, J., Needham, A.J. et Foster, S.J. (2005) Invertebrates as animal models for *Staphylococcus aureus* pathogenesis: a window into host-pathogen interaction. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **43**, 311-323.
- Garvis, S., Mei, J.M., Ruiz-Albert, J. et Holden, D.W. (2002) *Staphylococcus aureus* svrA: a gene required for virulence and expression of the agr locus. *Microbiology*, **148**, 3235-3243.
- Gaskill, M.E. et Khan, S.A. (1988) Regulation of the enterotoxin B gene in *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*, **263**, 6276-6280.
- Gerdes, K., Gulyaev, A.P., Franch, T., Pedersen, K. et Mikkelsen, N.D. (1997) Antisense RNA-regulated programmed cell death. *Annu Rev Genet*, **31**, 1-31.
- Gerhart, E., Wagner, H. et Brantl, S. (1998) Kissing and RNA stability in antisense control of plasmid replication. *Trends Biochem Sci*, **23**, 451-454.
- Giege, R., Sissler, M. et Florentz, C. (1998) Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. *Nucleic Acids Res*, **26**, 5017-5035.
- Giese, M.J., Berliner, J.A., Riesner, A., Wagar, E.A. et Mondino, B.J. (1999) A comparison of the early inflammatory effects of an agr-/sar- versus a wild type strain of *Staphylococcus aureus* in a rat model of endophthalmitis. *Curr Eye Res*, **18**, 177-185.
- Gill, S.R., Fouts, D.E., Archer, G.L., Mongodin, E.F., Deboy, R.T., Ravel, J., Paulsen, I.T., Kolonay, J.F., Brinkac, L., Beanan, M., Dodson, R.J., Daugherty, S.C., Madupu, R., Angiuoli, S.V., Durkin, A.S., Haft, D.H., Vamathevan, J., Khouri, H., Utterback, T., Lee, C., Dimitrov, G., Jiang, L., Qin, H., Weidman, J., Tran, K., Kang, K., Hance, I.R., Nelson, K.E. et Fraser, C.M. (2005) Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J Bacteriol*, **187**, 2426-2438.
- Gillaspy, A.F., Hickmon, S.G., Skinner, R.A., Thomas, J.R., Nelson, C.L. et Smeltzer, M.S. (1995) Role of the accessory gene regulator (agr) in pathogenesis of staphylococcal osteomyelitis. *Infect Immun*, **63**, 3373-3380.
- Giraud, A.T., Calzolari, A., Cataldi, A.A., Bogni, C. et Nagel, R. (1999) The sae locus of *Staphylococcus aureus* encodes a two-component regulatory system. *FEMS Microbiol Lett*, **177**, 15-22.
- Giraud, A.T., Cheung, A.L. et Nagel, R. (1997) The sae locus of *Staphylococcus aureus* controls exoprotein synthesis at the transcriptional level. *Arch Microbiol*, **168**, 53-58.
- Giraud, A.T., Mansilla, C., Chan, A., Raspanti, C. et Nagel, R. (2003) Studies on the expression of regulatory locus sae in *Staphylococcus aureus*. *Curr Microbiol*, **46**, 246-250.

- Goerke, C., Campana, S., Bayer, M.G., Doring, G., Botzenhart, K. et Wolz, C. (2000) Direct quantitative transcript analysis of the agr regulon of *Staphylococcus aureus* during human infection in comparison to the expression profile in vitro. *Infect Immun*, **68**, 1304-1311.
- Gomez, M.I., Lee, A., Reddy, B., Muir, A., Soong, G., Pitt, A., Cheung, A. et Prince, A. (2004) *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. *Nat Med*, **10**, 842-848.
- Gong, H., Liu, C.M., Liu, D.P. et Liang, C.C. (2005) The role of small RNAs in human diseases: potential troublemaker and therapeutic tools. *Med Res Rev*, **25**, 361-381.
- Goodyear, C.S. et Silverman, G.J. (2004) Staphylococcal toxin induced preferential and prolonged in vivo deletion of innate-like B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 11392-11397.
- Gottesman, S., Storz, G., Rosenow, C., Majdalani, N., Repoila, F. et Wassarman, K.M. (2001) Small RNA regulators of translation: mechanisms of action and approaches for identifying new small RNAs. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **66**, 353-362.
- Gotz, F., Verheij, H.M. et Rosenstein, R. (1998) Staphylococcal lipases: molecular characterisation, secretion, and processing. *Chem Phys Lipids*, **93**, 15-25.
- Gregory, R.I. et Shiekhattar, R. (2005) MicroRNA biogenesis and cancer. *Cancer Res*, **65**, 3509-3512.
- Grohmann, E., Muth, G. et Espinosa, M. (2003) Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, **67**, 277-301, table of contents.
- Grundmeier, M., Hussain, M., Becker, P., Heilmann, C., Peters, G. et Sinha, B. (2004) 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*, **72**, 7155-7163.
- Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N. et Altman, S. (1983) The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*, **35**, 849-857.
- Guimaraes, B.G., Souchon, H., Honore, N., Saint-Joanis, B., Brosch, R., Shepard, W., Cole, S.T. et Alzari, P.M. (2005) Structure and mechanism of the alkyl hydroperoxidase AhpC, a key element of the *Mycobacterium tuberculosis* defense system against oxidative stress. *J Biol Chem*, **280**, 25735-25742.
- Gulyaev, A.P., van Batenburg, F.H. et Pleij, C.W. (1995) The influence of a metastable structure in plasmid primer RNA on antisense RNA binding kinetics. *Nucleic Acids Res*, **23**, 3718-3725.
- H**achem, R. et Raad, I. (2002) Prevention and management of long-term catheter related infections in cancer patients. *Cancer Invest*, **20**, 1105-1113.
- Haggar, A., Ehrnfelt, C., Holgersson, J. et Flock, J.I. (2004) The extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* inhibits neutrophil binding to endothelial cells. *Infect Immun*, **72**, 6164-6167.
- Haggar, A., Hussain, M., Lonnie, H., Herrmann, M., Norrby-Teglund, A. et Flock, J.I. (2003) Extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* enhances internalization into eukaryotic cells. *Infect Immun*, **71**, 2310-2317.
- Hajnsdorf, E. et Regnier, P. (2000) Host factor Hfq of *Escherichia coli* stimulates elongation of poly(A) tails by poly(A) polymerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 1501-1505.
- Halic, M. et Beckmann, R. (2005) The signal recognition particle and its interactions during protein targeting. *Curr Opin Struct Biol*, **15**, 116-125.

- Hambraeus, G., Karhumaa, K. et Rutberg, B. (2002) A 5' stem-loop and ribosome binding but not translation are important for the stability of *Bacillus subtilis* aprE leader mRNA. *Microbiology*, **148**, 1795-1803.
- Hambraeus, G., Persson, M. et Rutberg, B. (2000) The aprE leader is a determinant of extreme mRNA stability in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, **146 Pt 12**, 3051-3059.
- Harraghy, N., Hussain, M., Hagggar, A., Chavakis, T., Sinha, B., Herrmann, M. et Flock, J.I. (2003) The adhesive and immunomodulating properties of the multifunctional *Staphylococcus aureus* protein Eap. *Microbiology*, **149**, 2701-2707.
- Harraghy, N., Kormanec, J., Wolz, C., Homerova, D., Goerke, C., Ohlsen, K., Qazi, S., Hill, P. et Herrmann, M. (2005) sae is essential for expression of the staphylococcal adhesins Eap and Emp. *Microbiology*, **151**, 1789-1800.
- Hartleib, J., Kohler, N., Dickinson, R.B., Chhatwal, G.S., Sixma, J.J., Hartford, O.M., Foster, T.J., Peters, G., Kehrel, B.E. et Herrmann, M. (2000) Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. *Blood*, **96**, 2149-2156.
- Heard, E. (2004) Recent advances in X-chromosome inactivation. *Curr Opin Cell Biol*, **16**, 247-255.
- Heeb, S., Blumer, C. et Haas, D. (2002) Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J Bacteriol*, **184**, 1046-1056.
- Heilmann, C., Niemann, S., Sinha, B., Herrmann, M., Kehrel, B.E. et Peters, G. (2004) *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein (FnBP)-mediated adherence to platelets, and aggregation of platelets induced by FnBPA but not by FnBPB. *J Infect Dis*, **190**, 321-329.
- Heinrichs, J.H., Bayer, M.G. et Cheung, A.L. (1996) Characterization of the sar locus and its interaction with agr in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, **178**, 418-423.
- Hengge-Aronis, R. (2002) Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol Rev*, **66**, 373-395, table of contents.
- Herrick, S., Blanc-Brude, O., Gray, A. et Laurent, G. (1999) Fibrinogen. *Int J Biochem Cell Biol*, **31**, 741-746.
- Heyer, G., Saba, S., Adamo, R., Rush, W., Soong, G., Cheung, A. et Prince, A. (2002) *Staphylococcus aureus* agr and sarA functions are required for invasive infection but not inflammatory responses in the lung. *Infect Immun*, **70**, 127-133.
- Hjalt, T.A. et Wagner, E.G. (1995a) Bulged-out nucleotides in an antisense RNA are required for rapid target RNA binding in vitro and inhibition in vivo. *Nucleic Acids Res*, **23**, 580-587.
- Hjalt, T.A. et Wagner, E.G. (1995b) Bulged-out nucleotides protect an antisense RNA from RNase III cleavage. *Nucleic Acids Res*, **23**, 571-579.
- Hochhut, B., Dobrindt, U. et Hacker, J. (2005) Pathogenicity islands and their role in bacterial virulence and survival. *Contrib Microbiol*, **12**, 234-254.
- Holden, M.T., Feil, E.J., Lindsay, J.A., Peacock, S.J., Day, N.P., Enright, M.C., Foster, T.J., Moore, C.E., Hurst, L., Atkin, R., Barron, A., Bason, N., Bentley, S.D., Chillingworth, C., Chillingworth, T., Churcher, C., Clark, L., Corton, C., Cronin, A., Doggett, J., Dowd, L., Feltwell, T., Hance, Z., Harris, B., Hauser, H., Holroyd, S., Jagels, K., James, K.D., Lennard, N., Line, A., Mayes, R., Moule, S., Mungall, K., Ormond, D., Quail, M.A., Rabinowitsch, E., Rutherford, K., Sanders, M., Sharp, S., Simmonds, M., Stevens, K., Whitehead, S., Barrell, B.G., Spratt, B.G. et Parkhill, J. (2004) Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus*

- strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 9786-9791.
- Horsburgh, M.J., Aish, J.L., White, I.J., Shaw, L., Lithgow, J.K. et Foster, S.J. (2002) sigmaB modulates virulence determinant expression and stress resistance: characterization of a functional rsbU strain derived from *Staphylococcus aureus* 8325-4. *J Bacteriol*, **184**, 5457-5467.
- Huntzinger, E., Boisset, S., Saveanu, C., Benito, Y., Geissmann, T., Namane, A., Lina, G., Etienne, J., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Jacquier, A., Vandenesch, F. et Romby, P. (2005) *Staphylococcus aureus* RNAIII and the endoribonuclease III coordinately regulate spa gene expression. *Embo J*, **24**, 824-835.
- Huttenhofer, A., Kiefmann, M., Meier-Ewert, S., O'Brien, J., Lehrach, H., Bachellerie, J.P. et Brosius, J. (2001) RNomics: an experimental approach that identifies 201 candidates for novel, small, non-messenger RNAs in mouse. *Embo J*, **20**, 2943-2953.
- I**ngavale, S., van Wamel, W., Luong, T.T., Lee, C.Y. et Cheung, A.L. (2005) Rat/MgrA, a regulator of autolysis, is a regulator of virulence genes in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, **73**, 1423-1431.
- J**acob, F. et Monod, J. (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol*, **3**, 318-356.
- Jain, C. (2002) Degradation of mRNA in *Escherichia coli*. *IUBMB Life*, **54**, 315-321.
- Janzon, L. et Arvidson, S. (1990) The role of the delta-lysin gene (hld) in the regulation of virulence genes by the accessory gene regulator (agr) in *Staphylococcus aureus*. *Embo J*, **9**, 1391-1399.
- Jarraud, S., Lyon, G.J., Figueiredo, A.M., Gerard, L., Vandenesch, F., Etienne, J., Muir, T.W. et Novick, R.P. (2000) Exfoliatin-producing strains define a fourth agr specificity group in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, **182**, 6517-6522.
- Jarraud, S., Mougel, C., Thioulouse, J., Lina, G., Meugnier, H., Forey, F., Nesme, X., Etienne, J. et Vandenesch, F. (2002) Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infect Immun*, **70**, 631-641.
- Jett, B.D. et Gilmore, M.S. (2002) Internalization of *Staphylococcus aureus* by human corneal epithelial cells: role of bacterial fibronectin-binding protein and host cell factors. *Infect Immun*, **70**, 4697-4700.
- Ji, G., Beavis, R. et Novick, R.P. (1997) Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science*, **276**, 2027-2030.
- Ji, G., Beavis, R.C. et Novick, R.P. (1995) Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 12055-12059.
- Johansen, L.E., Nygaard, P., Lassen, C., Agerso, Y. et Saxild, H.H. (2003) Definition of a second *Bacillus subtilis* pur regulon comprising the pur and xpt-pbuX operons plus pbuG, nupG (yxjA), and pbuE (ydhL). *J Bacteriol*, **185**, 5200-5209.
- Johansson, J., Mandin, P., Renzoni, A., Chiaruttini, C., Springer, M. et Cossart, P. (2002) An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell*, **110**, 551-561.
- Jonsson, K., Signas, C., Muller, H.P. et Lindberg, M. (1991) Two different genes encode fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus*. The complete nucleotide

- sequence and characterization of the second gene. *Eur J Biochem*, **202**, 1041-1048.
- Jurgen, B., Schweder, T. et Hecker, M. (1998) The stability of mRNA from the *gsiB* gene of *Bacillus subtilis* is dependent on the presence of a strong ribosome binding site. *Mol Gen Genet*, **258**, 538-545.
- Kaberdin, V.R., Chao, Y.H. et Lin-Chao, S. (1996) RNase E cleaves at multiple sites in bubble regions of RNA I stem loops yielding products that dissociate differentially from the enzyme. *J Biol Chem*, **271**, 13103-13109.
- Kajitani, M., Kato, A., Wada, A., Inokuchi, Y. et Ishihama, A. (1994) Regulation of the *Escherichia coli* *hfq* gene encoding the host factor for phage Q beta. *J Bacteriol*, **176**, 531-534.
- Kampa, D., Cheng, J., Kapranov, P., Yamanaka, M., Brubaker, S., Cawley, S., Drenkow, J., Piccolboni, A., Bekiranov, S., Helt, G., Tammana, H. et Gingeras, T.R. (2004) Novel RNAs identified from an in-depth analysis of the transcriptome of human chromosomes 21 and 22. *Genome Res*, **14**, 331-342.
- Kandror, O., DeLeon, A. et Goldberg, A.L. (2002) Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 9727-9732.
- Kao, C., Rudisser, S. et Zheng, M. (2001) A simple and efficient method to transcribe RNAs with reduced 3' heterogeneity. *Methods*, **23**, 201-205.
- Karlsson, A., Saravia-Otten, P., Tegmark, K., Morfeldt, E. et Arvidson, S. (2001) Decreased amounts of cell wall-associated protein A and fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* *sarA* mutants due to up-regulation of extracellular proteases. *Infect Immun*, **69**, 4742-4748.
- Karzai, A.W., Roche, E.D. et Sauer, R.T. (2000) The SsrA-SmpB system for protein tagging, directed degradation and ribosome rescue. *Nat Struct Biol*, **7**, 449-455.
- Katzif, S., Danavall, D., Bowers, S., Balthazar, J.T. et Shafer, W.M. (2003) The major cold shock gene, *cspA*, is involved in the susceptibility of *Staphylococcus aureus* to an antimicrobial peptide of human cathepsin G. *Infect Immun*, **71**, 4304-4312.
- Kawamoto, H., Morita, T., Shimizu, A., Inada, T. et Aiba, H. (2005) Implication of membrane localization of target mRNA in the action of a small RNA: mechanism of post-transcriptional regulation of glucose transporter in *Escherichia coli*. *Genes Dev*, **19**, 328-338.
- Kawano, M., Oshima, T., Kasai, H. et Mori, H. (2002) Molecular characterization of long direct repeat (LDR) sequences expressing a stable mRNA encoding for a 35-amino-acid cell-killing peptide and a cis-encoded small antisense RNA in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **45**, 333-349.
- Kidner, C.A. et Martienssen, R.A. (2005) The developmental role of microRNA in plants. *Curr Opin Plant Biol*, **8**, 38-44.
- Kim, K. et Meyer, R.J. (1986) Copy-number of broad host-range plasmid R1162 is regulated by a small RNA. *Nucleic Acids Res*, **14**, 8027-8046.
- Kim, V.N. (2005) MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 376-385.
- King, B.F. et Wilkinson, B.J. (1981) Binding of human immunoglobulin G to protein A in encapsulated *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, **33**, 666-672.
- Kintarak, S., Whawell, S.A., Speight, P.M., Packer, S. et Nair, S.P. (2004) Internalization of *Staphylococcus aureus* by human keratinocytes. *Infect Immun*, **72**, 5668-5675.
- Kluytmans, J.A. et Wertheim, H.F. (2005) Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and prevention of nosocomial infections. *Infection*, **33**, 3-8.

- Kochhar, S. et Paulus, H. (1996) Lysine-induced premature transcription termination in the *lysC* operon of *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, **142** (Pt 7), 1635-1639.
- Koenig, R.L., Ray, J.L., Maleki, S.J., Smeltzer, M.S. et Hurlburt, B.K. (2004) *Staphylococcus aureus* AgrA binding to the RNAIII-agr regulatory region. *J Bacteriol*, **186**, 7549-7555.
- Kolb, F.A., Engdahl, H.M., Slagter-Jager, J.G., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Westhof, E., Wagner, E.G. et Romby, P. (2000a) Progression of a loop-loop complex to a four-way junction is crucial for the activity of a regulatory antisense RNA. *Embo J*, **19**, 5905-5915.
- Kolb, F.A., Malmgren, C., Westhof, E., Ehresmann, C., Ehresmann, B., Wagner, E.G. et Romby, P. (2000b) An unusual structure formed by antisense-target RNA binding involves an extended kissing complex with a four-way junction and a side-by-side helical alignment. *Rna*, **6**, 311-324.
- Kolb, F.A., Westhof, E., Ehresmann, C., Ehresmann, B., Wagner, E.G. et Romby, P. (2001) Bulged residues promote the progression of a loop-loop interaction to a stable and inhibitory antisense-target RNA complex. *Nucleic Acids Res*, **29**, 3145-3153.
- Koraimann, G., Koraimann, C., Koronakis, V., Schlager, S. et Hogenauer, G. (1991) Repression and derepression of conjugation of plasmid R1 by wild-type and mutated *finP* antisense RNA. *Mol Microbiol*, **5**, 77-87.
- Kubodera, T., Watanabe, M., Yoshiuchi, K., Yamashita, N., Nishimura, A., Nakai, S., Gomi, K. et Hanamoto, H. (2003) Thiamine-regulated gene expression of *Aspergillus oryzae* *thiA* requires splicing of the intron containing a riboswitch-like domain in the 5'-UTR. *FEBS Lett*, **555**, 516-520.
- Kullik, I., Giachino, P. et Fuchs, T. (1998) Deletion of the alternative sigma factor *sigmaB* in *Staphylococcus aureus* reveals its function as a global regulator of virulence genes. *J Bacteriol*, **180**, 4814-4820.
- Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K., Nagai, Y., Lian, J., Ito, T., Kanamori, M., Matsumaru, H., Maruyama, A., Murakami, H., Hosoyama, A., Mizutani-Ui, Y., Takahashi, N.K., Sawano, T., Inoue, R., Kaito, C., Sekimizu, K., Hiramatsu, H., Kuhara, S., Goto, S., Yabuzaki, J., Kanehisa, M., Yamashita, A., Oshima, K., Furuya, K., Yoshino, C., Shiba, T., Hattori, M., Ogasawara, N., Hayashi, H. et Hiramatsu, K. (2001) Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, **357**, 1225-1240.
- Kuroda, M., Yamashita, A., Hiramatsu, H., Kumano, M., Morikawa, K., Higashide, M., Maruyama, A., Inose, Y., Matoba, K., Toh, H., Kuhara, S., Hattori, M. et Ohta, T. (2005) Whole genome sequence of *Staphylococcus saprophyticus* reveals the pathogenesis of uncomplicated urinary tract infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 13272-13277.
- Kuwabara, T., Hsieh, J., Nakashima, K., Taira, K. et Gage, F.H. (2004) A small modulatory dsRNA specifies the fate of adult neural stem cells. *Cell*, **116**, 779-793.
- L**adhani, S. (2001) Recent developments in staphylococcal scalded skin syndrome. *Clin Microbiol Infect*, **7**, 301-307.
- Langone, J.J. (1982) Protein A of *Staphylococcus aureus* and related immunoglobulin receptors produced by streptococci and pneumococci. *Adv Immunol*, **32**, 157-252.

- Lanz, R.B., McKenna, N.J., Onate, S.A., Albrecht, U., Wong, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. et O'Malley, B.W. (1999) A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex. *Cell*, **97**, 17-27.
- Le Chatelier, E., Ehrlich, S.D. et Janniere, L. (1996) Countertranscript-driven attenuation system of the pAM beta 1 repE gene. *Mol Microbiol*, **20**, 1099-1112.
- Le Derout, J., Folichon, M., Briani, F., Deho, G., Regnier, P. et Hajnsdorf, E. (2003) Hfq affects the length and the frequency of short oligo(A) tails at the 3' end of Escherichia coli rpsO mRNAs. *Nucleic Acids Res*, **31**, 4017-4023.
- Le Loir, Y., Baron, F. et Gautier, M. (2003) Staphylococcus aureus and food poisoning. *Genet Mol Res*, **2**, 63-76.
- Lease, R.A. et Belfort, M. (2000a) Riboregulation by DsrA RNA: trans-actions for global economy. *Mol Microbiol*, **38**, 667-672.
- Lease, R.A. et Belfort, M. (2000b) A trans-acting RNA as a control switch in Escherichia coli: DsrA modulates function by forming alternative structures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 9919-9924.
- Lease, R.A., Cusick, M.E. et Belfort, M. (1998) Riboregulation in Escherichia coli: DsrA RNA acts by RNA:RNA interactions at multiple loci. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 12456-12461.
- Lebeau, C., Vandenesch, F., Greenland, T., Novick, R.P. et Etienne, J. (1994) Coagulase expression in Staphylococcus aureus is positively and negatively modulated by an agr-dependent mechanism. *J Bacteriol*, **176**, 5534-5536.
- Lee, L.Y., Hook, M., Haviland, D., Wetsel, R.A., Yonter, E.O., Syribeys, P., Vernachio, J. et Brown, E.L. (2004) Inhibition of complement activation by a secreted Staphylococcus aureus protein. *J Infect Dis*, **190**, 571-579.
- Lehner, B., Williams, G., Campbell, R.D. et Sanderson, C.M. (2002) Antisense transcripts in the human genome. *Trends Genet*, **18**, 63-65.
- Lenz, D.H., Mok, K.C., Lilley, B.N., Kulkarni, R.V., Wingreen, N.S. et Bassler, B.L. (2004) The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in Vibrio harveyi and Vibrio cholerae. *Cell*, **118**, 69-82.
- Li, H. et Nicholson, A.W. (1996) Defining the enzyme binding domain of a ribonuclease III processing signal. Ethylation interference and hydroxyl radical footprinting using catalytically inactive RNase III mutants. *Embo J*, **15**, 1421-1433.
- Liang, X., Zheng, L., Landwehr, C., Lunsford, D., Holmes, D. et Ji, Y. (2005) Global regulation of gene expression by ArlRS, a two-component signal transduction regulatory system of Staphylococcus aureus. *J Bacteriol*, **187**, 5486-5492.
- Lin-Chao, S. et Cohen, S.N. (1991) The rate of processing and degradation of antisense RNAI regulates the replication of ColE1-type plasmids in vivo. *Cell*, **65**, 1233-1242.
- Lina, G., Boutite, F., Tristan, A., Bes, M., Etienne, J. et Vandenesch, F. (2003) Bacterial competition for human nasal cavity colonization: role of Staphylococcal agr alleles. *Appl Environ Microbiol*, **69**, 18-23.
- Lina, G., Jarraud, S., Ji, G., Greenland, T., Pedraza, A., Etienne, J., Novick, R.P. et Vandenesch, F. (1998) Transmembrane topology and histidine protein kinase activity of AgrC, the agr signal receptor in Staphylococcus aureus. *Mol Microbiol*, **28**, 655-662.
- Lindsay, J.A. et Foster, S.J. (1999) Interactive regulatory pathways control virulence determinant production and stability in response to environmental conditions in Staphylococcus aureus. *Mol Gen Genet*, **262**, 323-331.
- Lindsay, J.A. et Holden, M.T. (2004) Staphylococcus aureus: superbug, super genome? *Trends Microbiol*, **12**, 378-385.

- Lippman, Z. et Martienssen, R. (2004) The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature*, **431**, 364-370.
- Liu, M.Y., Gui, G., Wei, B., Preston, J.F., 3rd, Oakford, L., Yuksel, U., Giedroc, D.P. et Romeo, T. (1997) The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **272**, 17502-17510.
- Livny, J., Fogel, M.A., Davis, B.M. et Waldor, M.K. (2005) sRNAPredict: an integrative computational approach to identify sRNAs in bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*, **33**, 4096-4105.
- Loughman, A., Fitzgerald, J.R., Brennan, M.P., Higgins, J., Downer, R., Cox, D. et Foster, T.J. (2005) Roles for fibrinogen, immunoglobulin and complement in platelet activation promoted by *Staphylococcus aureus* clumping factor A. *Mol Microbiol*, **57**, 804-818.
- Luong, T.T., Newell, S.W. et Lee, C.Y. (2003) Mgr, a novel global regulator in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, **185**, 3703-3710.
- Lyon, G.J., Wright, J.S., Muir, T.W. et Novick, R.P. (2002) Key determinants of receptor activation in the agr autoinducing peptides of *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry*, **41**, 10095-10104.
- M**a, Z., Richard, H., Tucker, D.L., Conway, T. et Foster, J.W. (2002) Collaborative regulation of *Escherichia coli* glutamate-dependent acid resistance by two AraC-like regulators, GadX and GadW (YhiW). *J Bacteriol*, **184**, 7001-7012.
- Majdalani, N., Chen, S., Murrow, J., St John, K. et Gottesman, S. (2001) Regulation of RpoS by a novel small RNA: the characterization of RprA. *Mol Microbiol*, **39**, 1382-1394.
- Majdalani, N., Cuning, C., Sledjeski, D., Elliott, T. et Gottesman, S. (1998) DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 12462-12467.
- Majdalani, N., Hernandez, D. et Gottesman, S. (2002) Regulation and mode of action of the second small RNA activator of RpoS translation, RprA. *Mol Microbiol*, **46**, 813-826.
- Malmgren, C., Engdahl, H.M., Romby, P. et Wagner, E.G. (1996) An antisense/target RNA duplex or a strong intramolecular RNA structure 5' of a translation initiation signal blocks ribosome binding: the case of plasmid R1. *Rna*, **2**, 1022-1032.
- Malmgren, C., Wagner, E.G., Ehresmann, C., Ehresmann, B. et Romby, P. (1997) Antisense RNA control of plasmid R1 replication. The dominant product of the antisense rna-mrna binding is not a full RNA duplex. *J Biol Chem*, **272**, 12508-12512.
- Mandal, M., Boese, B., Barrick, J.E., Winkler, W.C. et Breaker, R.R. (2003) Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Cell*, **113**, 577-586.
- Mandal, M. et Breaker, R.R. (2004a) Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 29-35.
- Mandal, M. et Breaker, R.R. (2004b) Gene regulation by riboswitches. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 451-463.
- Mandal, M., Lee, M., Barrick, J.E., Weinberg, Z., Emilsson, G.M., Ruzzo, W.L. et Breaker, R.R. (2004) A glycine-dependent riboswitch that uses cooperative binding to control gene expression. *Science*, **306**, 275-279.

- Manna, A. et Cheung, A.L. (2001) Characterization of sarR, a modulator of sar expression in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, **69**, 885-896.
- Manna, A.C., Bayer, M.G. et Cheung, A.L. (1998) Transcriptional analysis of different promoters in the sar locus in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, **180**, 3828-3836.
- Manna, A.C. et Cheung, A.L. (2003) sarU, a sarA homolog, is repressed by SarT and regulates virulence genes in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, **71**, 343-353.
- Marker, C., Zemann, A., Terhorst, T., Kiefmann, M., Kastenmayer, J.P., Green, P., Bachellerie, J.P., Brosius, J. et Huttenhofer, A. (2002) Experimental RNomics: identification of 140 candidates for small non-messenger RNAs in the plant *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol*, **12**, 2002-2013.
- Martin, P.K., Li, T., Sun, D., Biek, D.P. et Schmid, M.B. (1999) Role in cell permeability of an essential two-component system in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, **181**, 3666-3673.
- Martinez, J.L. et Baquero, F. (2002) Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev*, **15**, 647-679.
- Masse, E., Escorcia, F.E. et Gottesman, S. (2003) Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes Dev*, **17**, 2374-2383.
- Masse, E. et Gottesman, S. (2002) A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 4620-4625.
- Mattick, J.S. (2004) RNA regulation: a new genetics? *Nat Rev Genet*, **5**, 316-323.
- Mattick, J.S. et Makunin, I.V. (2005) Small regulatory RNAs in mammals. *Hum Mol Genet*, **14 Spec No 1**, R121-132.
- Mayville, P., Ji, G., Beavis, R., Yang, H., Goger, M., Novick, R.P. et Muir, T.W. (1999) Structure-activity analysis of synthetic autoinducing thiolactone peptides from *Staphylococcus aureus* responsible for virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 1218-1223.
- Mazmanian, S.K., Liu, G., Ton-That, H. et Schneewind, O. (1999) *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science*, **285**, 760-763.
- McAleese, F.M., Walsh, E.J., Sieprawska, M., Potempa, J. et Foster, T.J. (2001) Loss of clumping factor B fibrinogen binding activity by *Staphylococcus aureus* involves cessation of transcription, shedding and cleavage by metalloprotease. *J Biol Chem*, **276**, 29969-29978.
- McCormick, J.K., Yarwood, J.M. et Schlievert, P.M. (2001) Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annu Rev Microbiol*, **55**, 77-104.
- McDaniel, B.A., Grundy, F.J., Artsimovitch, I. et Henkin, T.M. (2003) Transcription termination control of the S box system: direct measurement of S-adenosylmethionine by the leader RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 3083-3088.
- McDevitt, D., Francois, P., Vaudaux, P. et Foster, T.J. (1994) Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*, **11**, 237-248.
- McDevitt, D., Nanavaty, T., House-Pompeo, K., Bell, E., Turner, N., McIntire, L., Foster, T. et Hook, M. (1997) Characterization of the interaction between the *Staphylococcus aureus* clumping factor (ClfA) and fibrinogen. *Eur J Biochem*, **247**, 416-424.

- McGavin, M.J., Zahradka, C., Rice, K. et Scott, J.E. (1997) Modification of the Staphylococcus aureus fibronectin binding phenotype by V8 protease. *Infect Immun*, **65**, 2621-2628.
- McNamara, P.J., Milligan-Monroe, K.C., Khalili, S. et Proctor, R.A. (2000) Identification, cloning, and initial characterization of rot, a locus encoding a regulator of virulence factor expression in Staphylococcus aureus. *J Bacteriol*, **182**, 3197-3203.
- Menzies, B.E. (2003) The role of fibronectin binding proteins in the pathogenesis of Staphylococcus aureus infections. *Curr Opin Infect Dis*, **16**, 225-229.
- Meynell, E. et Datta, N. (1967) Mutant drug resistant factors of high transmissibility. *Nature*, **214**, 885-887.
- Miranda, G., Schuppli, D., Barrera, I., Hausherr, C., Sogo, J.M. et Weber, H. (1997) Recognition of bacteriophage Qbeta plus strand RNA as a template by Qbeta replicase: role of RNA interactions mediated by ribosomal proteins S1 and host factor. *J Mol Biol*, **267**, 1089-1103.
- Miranda-Rios, J., Navarro, M. et Soberon, M. (2001) A conserved RNA structure (thi box) is involved in regulation of thiamin biosynthetic gene expression in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9736-9741.
- Mironov, A.S., Gusarov, I., Rafikov, R., Lopez, L.E., Shatalin, K., Kreneva, R.A., Perumov, D.A. et Nudler, E. (2002) Sensing small molecules by nascent RNA: a mechanism to control transcription in bacteria. *Cell*, **111**, 747-756.
- Miyamoto, S., Katz, B.Z., Lafrenie, R.M. et Yamada, K.M. (1998) Fibronectin and integrins in cell adhesion, signaling, and morphogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, **857**, 119-129.
- Moll, I., Afonyushkin, T., Vytvytska, O., Kaberdin, V.R. et Blasi, U. (2003) Coincident Hfq binding and RNase E cleavage sites on mRNA and small regulatory RNAs. *Rna*, **9**, 1308-1314.
- Moller, T., Franch, T., Hojrup, P., Keene, D.R., Bachinger, H.P., Brennan, R.G. et Valentin-Hansen, P. (2002a) Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction. *Mol Cell*, **9**, 23-30.
- Moller, T., Franch, T., Udesen, C., Gerdes, K. et Valentin-Hansen, P. (2002b) Spot 42 RNA mediates discoordinate expression of the E. coli galactose operon. *Genes Dev*, **16**, 1696-1706.
- Mongodin, E., Bajolet, O., Cutrona, J., Bonnet, N., Dupuit, F., Puchelle, E. et de Bentzmann, S. (2002) Fibronectin-binding proteins of Staphylococcus aureus are involved in adherence to human airway epithelium. *Infect Immun*, **70**, 620-630.
- Morey, C. et Avner, P. (2004) Employment opportunities for non-coding RNAs. *FEBS Lett*, **567**, 27-34.
- Morfeldt, E., Taylor, D., von Gabain, A. et Arvidson, S. (1995) Activation of alpha-toxin translation in Staphylococcus aureus by the trans-encoded antisense RNA, RNAlII. *Embo J*, **14**, 4569-4577.
- Morfeldt, E., Tegmark, K. et Arvidson, S. (1996) Transcriptional control of the agr-dependent virulence gene regulator, RNAlII, in Staphylococcus aureus. *Mol Microbiol*, **21**, 1227-1237.
- Morita, M., Kanemori, M., Yanagi, H. et Yura, T. (1999a) Heat-induced synthesis of sigma32 in Escherichia coli: structural and functional dissection of rpoH mRNA secondary structure. *J Bacteriol*, **181**, 401-410.
- Morita, M.T., Tanaka, Y., Kodama, T.S., Kyogoku, Y., Yanagi, H. et Yura, T. (1999b) Translational induction of heat shock transcription factor sigma32: evidence for a built-in RNA thermosensor. *Genes Dev*, **13**, 655-665.

- Morita, T., Maki, K. et Aiba, H. (2005) RNase E-based ribonucleoprotein complexes: mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. *Genes Dev*, **19**, 2176-2186.
- Morrissey, J.A., Cockayne, A., Brummell, K. et Williams, P. (2004) The staphylococcal ferritins are differentially regulated in response to iron and manganese and via PerR and Fur. *Infect Immun*, **72**, 972-979.
- Murakami, K.S., Masuda, S., Campbell, E.A., Muzzin, O. et Darst, S.A. (2002) Structural basis of transcription initiation: an RNA polymerase holoenzyme-DNA complex. *Science*, **296**, 1285-1290.
- Nahvi, A., Barrick, J.E. et Breaker, R.R. (2004) Coenzyme B12 riboswitches are widespread genetic control elements in prokaryotes. *Nucleic Acids Res*, **32**, 143-150.
- Namy, O., Rousset, J.P., Naphtine, S. et Brierley, I. (2004) Reprogrammed genetic decoding in cellular gene expression. *Mol Cell*, **13**, 157-168.
- Needham, A.J., Kibart, M., Crossley, H., Ingham, P.W. et Foster, S.J. (2004) *Drosophila melanogaster* as a model host for *Staphylococcus aureus* infection. *Microbiology*, **150**, 2347-2355.
- Nguyen, T., Ghebrehwet, B. et Peerschke, E.I. (2000) *Staphylococcus aureus* protein A recognizes platelet gC1qR/p33: a novel mechanism for staphylococcal interactions with platelets. *Infect Immun*, **68**, 2061-2068.
- Ni Eidhin, D., Perkins, S., Francois, P., Vaudaux, P., Hook, M. et Foster, T.J. (1998) Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*, **30**, 245-257.
- Nicholson, A.W. (1999) Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases. *FEMS Microbiol Rev*, **23**, 371-390.
- Nikulin, A., Stolboushkina, E., Perederina, A., Vassilieva, I., Blaesi, U., Moll, I., Kachalova, G., Yokoyama, S., Vassylyev, D., Garber, M. et Nikonov, S. (2005) Structure of *Pseudomonas aeruginosa* Hfq protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **61**, 141-146.
- Noeske, J., Richter, C., Grundl, M.A., Nasiri, H.R., Schwalbe, H. et Wohnert, J. (2005) An intermolecular base triple as the basis of ligand specificity and affinity in the guanine- and adenine-sensing riboswitch RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 1372-1377.
- Noller, H.F., Yusupov, M.M., Yusupova, G.Z., Baucom, A., Lieberman, K., Lancaster, L., Dallas, A., Fredrick, K., Earnest, T.N. et Cate, J.H. (2001) Structure of the ribosome at 5.5 Å resolution and its interactions with functional ligands. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **66**, 57-66.
- Nou, X. et Kadner, R.J. (2000) Adenosylcobalamin inhibits ribosome binding to btuB RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7190-7195.
- Novick, R.P. (2003) Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol*, **48**, 1429-1449.
- Novick, R.P., Iordanescu, S., Projan, S.J., Kornblum, J. et Edelman, I. (1989) pT181 plasmid replication is regulated by a countertranscript-driven transcriptional attenuator. *Cell*, **59**, 395-404.
- Novick, R.P., Projan, S.J., Kornblum, J., Ross, H.F., Ji, G., Kreiswirth, B., Vandenesch, F. et Moghazeh, S. (1995) The agr P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet*, **248**, 446-458.

- Novick, R.P., Ross, H.F., Projan, S.J., Kornblum, J., Kreiswirth, B. et Moghazeh, S. (1993) Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *Embo J*, **12**, 3967-3975.
- Nudler, E. et Mironov, A.S. (2004) The riboswitch control of bacterial metabolism. *Trends Biochem Sci*, **29**, 11-17.
- O**hman, M. et Wagner, E.G. (1991) Regulation of replication of plasmid R1: an analysis of the intergenic region between copA and repA. *Mol Gen Genet*, **230**, 321-328.
- Opdyke, J.A., Kang, J.G. et Storz, G. (2004) GadY, a small-RNA regulator of acid response genes in Escherichia coli. *J Bacteriol*, **186**, 6698-6705.
- Oscarsson, J., Harlos, C. et Arvidson, S. (2005) Regulatory role of proteins binding to the spa (protein A) and sarS (staphylococcal accessory regulator) promoter regions in Staphylococcus aureus NTCC 8325-4. *Int J Med Microbiol*, **295**, 253-266.
- P**alma, M. et Cheung, A.L. (2001) sigma(B) activity in Staphylococcus aureus is controlled by RsbU and an additional factor(s) during bacterial growth. *Infect Immun*, **69**, 7858-7865.
- Palma, M., Shannon, O., Quezada, H.C., Berg, A. et Flock, J.I. (2001) Extracellular fibrinogen-binding protein, Efb, from Staphylococcus aureus blocks platelet aggregation due to its binding to the alpha-chain. *J Biol Chem*, **276**, 31691-31697.
- Palmer, M. (1998) Staphylococcal alpha toxin. *Symp Ser Soc Appl Microbiol*, **27**, 125S-126S.
- Palmqvist, N., Patti, J.M., Tarkowski, A. et Josefsson, E. (2004) Expression of staphylococcal clumping factor A impedes macrophage phagocytosis. *Microbes Infect*, **6**, 188-195.
- Pasquinelli, A.E., Hunter, S. et Bracht, J. (2005) MicroRNAs: a developing story. *Curr Opin Genet Dev*, **15**, 200-205.
- Patel, A.H., Kornblum, J., Kreiswirth, B., Novick, R. et Foster, T.J. (1992) Regulation of the protein A-encoding gene in Staphylococcus aureus. *Gene*, **114**, 25-34.
- Patte, J.C., Akrim, M. et Mejean, V. (1998) The leader sequence of the Escherichia coli lysC gene is involved in the regulation of LysC synthesis. *FEMS Microbiol Lett*, **169**, 165-170.
- Patti, J.M., Bremell, T., Krajewska-Pietrasik, D., Abdelnour, A., Tarkowski, A., Ryden, C. et Hook, M. (1994) The Staphylococcus aureus collagen adhesin is a virulence determinant in experimental septic arthritis. *Infect Immun*, **62**, 152-161.
- Peluso, P., Herschlag, D., Nock, S., Freymann, D.M., Johnson, A.E. et Walter, P. (2000) Role of 4.5S RNA in assembly of the bacterial signal recognition particle with its receptor. *Science*, **288**, 1640-1643.
- Persson, C., Wagner, E.G. et Nordstrom, K. (1990) Control of replication of plasmid R1: formation of an initial transient complex is rate-limiting for antisense RNA--target RNA pairing. *Embo J*, **9**, 3777-3785.
- Pichon, C. et Felden, B. (2005) From The Cover: Small RNA genes expressed from Staphylococcus aureus genomic and pathogenicity islands with specific expression among pathogenic strains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 14249-14254.
- Q**azi, S.N., Counil, E., Morrissey, J., Rees, C.E., Cockayne, A., Winzer, K., Chan, W.C., Williams, P. et Hill, P.J. (2001) agr expression precedes escape of internalized Staphylococcus aureus from the host endosome. *Infect Immun*, **69**, 7074-7082.

- Qiu, R., Pei, W., Zhang, L., Lin, J. et Ji, G. (2005) Identification of the putative staphylococcal AgrB catalytic residues involving the proteolytic cleavage of AgrD to generate autoinducing peptide. *J Biol Chem*, **280**, 16695-16704.
- Quentin, Y. (1994) Emergence of master sequences in families of retroposons derived from 7sl RNA. *Genetica*, **93**, 203-215.
- R**amadurai, L. et Jayaswal, R.K. (1997) Molecular cloning, sequencing, and expression of *lytM*, a unique autolytic gene of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, **179**, 3625-3631.
- Rechtin, T.M., Gillaspay, A.F., Schumacher, M.A., Brennan, R.G., Smeltzer, M.S. et Hurlburt, B.K. (1999) Characterization of the SarA virulence gene regulator of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*, **33**, 307-316.
- Recsei, P., Kreiswirth, B., O'Reilly, M., Schlievert, P., Gruss, A. et Novick, R.P. (1986) Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by agar. *Mol Gen Genet*, **202**, 58-61.
- Regassa, L.B., Couch, J.L. et Betley, M.J. (1991) Steady-state staphylococcal enterotoxin type C mRNA is affected by a product of the accessory gene regulator (*agr*) and by glucose. *Infect Immun*, **59**, 955-962.
- Repoila, F. et Gottesman, S. (2001) Signal transduction cascade for regulation of RpoS: temperature regulation of DsrA. *J Bacteriol*, **183**, 4012-4023.
- Repoila, F., Majdalani, N. et Gottesman, S. (2003) Small non-coding RNAs, coordinators of adaptation processes in *Escherichia coli*: the RpoS paradigm. *Mol Microbiol*, **48**, 855-861.
- Rich, M. (2005) Staphylococci in animals: prevalence, identification and antimicrobial susceptibility, with an emphasis on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Br J Biomed Sci*, **62**, 98-105.
- Rieneck, K., Renneberg, J., Diamant, M., Gutschik, E. et Bendtzen, K. (1997) Molecular cloning and expression of a novel *Staphylococcus aureus* antigen. *Biochim Biophys Acta*, **1350**, 128-132.
- Riise, E. et Molin, S. (1986) Purification and characterization of the CopB replication control protein, and precise mapping of its target site in the R1 plasmid. *Plasmid*, **15**, 163-171.
- Riise, E., Stougaard, P., Bindslev, B., Nordstrom, K. et Molin, S. (1982) Molecular cloning and functional characterization of a copy number control gene (*copB*) of plasmid R1. *J Bacteriol*, **151**, 1136-1145.
- Rivas, E., Klein, R.J., Jones, T.A. et Eddy, S.R. (2001) Computational identification of noncoding RNAs in *E. coli* by comparative genomics. *Curr Biol*, **11**, 1369-1373.
- Robertson, G.T. et Roop, R.M., Jr. (1999) The *Brucella abortus* host factor I (HF-I) protein contributes to stress resistance during stationary phase and is a major determinant of virulence in mice. *Mol Microbiol*, **34**, 690-700.
- Rodionov, D.A., Vitreschak, A.G., Mironov, A.A. et Gelfand, M.S. (2002) Comparative genomics of thiamin biosynthesis in prokaryotes. New genes and regulatory mechanisms. *J Biol Chem*, **277**, 48949-48959.
- Romby, P. et Springer, M. (2003) Bacterial translational control at atomic resolution. *Trends Genet*, **19**, 155-161.
- Roop, R.M., 2nd, Robertson, G.T., Ferguson, G.P., Milford, L.E., Winkler, M.E. et Walker, G.C. (2002) Seeking a niche: putative contributions of the *hfq* and *bacA* gene products to the successful adaptation of the brucellae to their intracellular home. *Vet Microbiol*, **90**, 349-363.

- Rybak, M.J. et LaPlante, K.L. (2005) Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a review. *Pharmacotherapy*, **25**, 74-85.
- Saenz, H.L., Augsburg, V., Vuong, C., Jack, R.W., Gotz, F. et Otto, M. (2000) Inducible expression and cellular location of AgrB, a protein involved in the maturation of the staphylococcal quorum-sensing pheromone. *Arch Microbiol*, **174**, 452-455.
- Said-Salim, B., Dunman, P.M., McAleese, F.M., Macapagal, D., Murphy, E., McNamara, P.J., Arvidson, S., Foster, T.J., Projan, S.J. et Kreiswirth, B.N. (2003) Global regulation of *Staphylococcus aureus* genes by Rot. *J Bacteriol*, **185**, 610-619.
- Saravia-Otten, P., Muller, H.P. et Arvidson, S. (1997) Transcription of *Staphylococcus aureus* fibronectin binding protein genes is negatively regulated by agr and an agr-independent mechanism. *J Bacteriol*, **179**, 5259-5263.
- Sauter, C., Basquin, J. et Suck, D. (2003) Sm-like proteins in Eubacteria: the crystal structure of the Hfq protein from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, **31**, 4091-4098.
- Schmidt, K.A., Manna, A.C. et Cheung, A.L. (2003) SarT influences sarS expression in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, **71**, 5139-5148.
- Schmidt, K.A., Manna, A.C., Gill, S. et Cheung, A.L. (2001) SarT, a repressor of alpha-hemolysin in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, **69**, 4749-4758.
- Schumacher, M.A., Pearson, R.F., Moller, T., Valentin-Hansen, P. et Brennan, R.G. (2002) Structures of the pleiotropic translational regulator Hfq and an Hfq-RNA complex: a bacterial Sm-like protein. *Embo J*, **21**, 3546-3556.
- Schwarz-Linek, U., Hook, M. et Potts, J.R. (2004) The molecular basis of fibronectin-mediated bacterial adherence to host cells. *Mol Microbiol*, **52**, 631-641.
- Serganov, A., Rak, A., Garber, M., Reinbolt, J., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Grunberg-Manago, M. et Portier, C. (1997) Ribosomal protein S15 from *Thermus thermophilus*--cloning, sequencing, overexpression of the gene and RNA-binding properties of the protein. *Eur J Biochem*, **246**, 291-300.
- Serganov, A., Yuan, Y.R., Pikovskaya, O., Polonskaia, A., Malinina, L., Phan, A.T., Hobartner, C., Micura, R., Breaker, R.R. et Patel, D.J. (2004) Structural basis for discriminative regulation of gene expression by adenine- and guanine-sensing mRNAs. *Chem Biol*, **11**, 1729-1741.
- Shannon, O., Uekotter, A. et Flock, J.I. (2005) Extracellular fibrinogen binding protein, Efb, from *Staphylococcus aureus* as an antiplatelet agent in vivo. *Thromb Haemost*, **93**, 927-931.
- Sharp, J.S. et Bechhofer, D.H. (2003) Effect of translational signals on mRNA decay in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, **185**, 5372-5379.
- Sharp, J.S. et Bechhofer, D.H. (2005) Effect of 5'-proximal elements on decay of a model mRNA in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, **57**, 484-495.
- Sharp, P.A. (2005) The discovery of split genes and RNA splicing. *Trends Biochem Sci*, **30**, 279-281.
- Shaw, K.J., Rather, P.N., Hare, R.S. et Miller, G.H. (1993) Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev*, **57**, 138-163.
- Shaw, L., Golonka, E., Potempa, J. et Foster, S.J. (2004) The role and regulation of the extracellular proteases of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, **150**, 217-228.
- Sheehan, B.J., Foster, T.J., Dorman, C.J., Park, S. et Stewart, G.S. (1992) Osmotic and growth-phase dependent regulation of the eta gene of *Staphylococcus aureus*: a role for DNA supercoiling. *Mol Gen Genet*, **232**, 49-57.

- Shiba, K. et Mizobuchi, K. (1990) Posttranscriptional control of plasmid ColIb-P9 repZ gene expression by a small RNA. *J Bacteriol*, **172**, 1992-1997.
- Siboo, I.R., Cheung, A.L., Bayer, A.S. et Sullam, P.M. (2001) Clumping factor A mediates binding of Staphylococcus aureus to human platelets. *Infect Immun*, **69**, 3120-3127.
- Sierra, J.M., Cabeza, J.G., Ruiz Chaler, M., Montero, T., Hernandez, J., Mensa, J., Llagostera, M. et Vila, J. (2005) The selection of resistance to and the mutagenicity of different fluoroquinolones in Staphylococcus aureus and Streptococcus pneumoniae. *Clin Microbiol Infect*, **11**, 750-758.
- Sifri, C.D., Begun, J., Ausubel, F.M. et Calderwood, S.B. (2003) Caenorhabditis elegans as a model host for Staphylococcus aureus pathogenesis. *Infect Immun*, **71**, 2208-2217.
- Silvaggi, J.M., Perkins, J.B. et Losick, R. (2005) Small untranslated RNA antitoxin in Bacillus subtilis. *J Bacteriol*, **187**, 6641-6650.
- Silverman, G.J. et Goodyear, C.S. (2002) A model B-cell superantigen and the immunobiology of B lymphocytes. *Clin Immunol*, **102**, 117-134.
- Sinha, B., Francois, P., Que, Y.A., Hussain, M., Heilmann, C., Moreillon, P., Lew, D., Krause, K.H., Peters, G. et Herrmann, M. (2000) Heterologously expressed Staphylococcus aureus fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infect Immun*, **68**, 6871-6878.
- Sinha, B. et Herrmann, M. (2005) Mechanism and consequences of invasion of endothelial cells by Staphylococcus aureus. *Thromb Haemost*, **94**, 266-277.
- Skov, L. et Baadsgaard, O. (2000) Bacterial superantigens and inflammatory skin diseases. *Clin Exp Dermatol*, **25**, 57-61.
- Sledjeski, D. et Gottesman, S. (1995) A small RNA acts as an antisilencer of the H-NS-silenced rcsA gene of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 2003-2007.
- Sledjeski, D.D., Whitman, C. et Zhang, A. (2001) Hfq is necessary for regulation by the untranslated RNA DsrA. *J Bacteriol*, **183**, 1997-2005.
- Sleutels, F., Zwart, R. et Barlow, D.P. (2002) The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes. *Nature*, **415**, 810-813.
- Smeltzer, M.S., Hart, M.E. et Iandolo, J.J. (1993) Phenotypic characterization of xpr, a global regulator of extracellular virulence factors in Staphylococcus aureus. *Infect Immun*, **61**, 919-925.
- Sonnleitner, E., Hagens, S., Rosenau, F., Wilhelm, S., Habel, A., Jager, K.E. et Blasi, U. (2003) Reduced virulence of a hfq mutant of Pseudomonas aeruginosa O1. *Microb Pathog*, **35**, 217-228.
- Sontheimer, E.J. et Carthew, R.W. (2005) Silence from within: endogenous siRNAs and miRNAs. *Cell*, **122**, 9-12.
- Spika, J.S., Verbrugh, H.A. et Verhoef, J. (1981) Protein A effect on alternative pathway complement activation and opsonization of Staphylococcus aureus. *Infect Immun*, **34**, 455-460.
- Ster, C., Gilbert, F.B., Cochard, T. et Poutrel, B. (2005) Transcriptional profiles of regulatory and virulence factors of Staphylococcus aureus of bovine origin: oxygen impact and strain-to-strain variations. *Mol Cell Probes*, **19**, 227-235.
- Sterba, K.M., Mackintosh, S.G., Blevins, J.S., Hurlburt, B.K. et Smeltzer, M.S. (2003) Characterization of Staphylococcus aureus SarA binding sites. *J Bacteriol*, **185**, 4410-4417.
- Stetefeld, J. et Ruegg, M.A. (2005) Structural and functional diversity generated by alternative mRNA splicing. *Trends Biochem Sci*, **30**, 515-521.

- Stock, A.M., Robinson, V.L. et Goudreau, P.N. (2000) Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem*, **69**, 183-215.
- Stougaard, P., Molin, S. et Nordstrom, K. (1981) RNAs involved in copy-number control and incompatibility of plasmid R1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 6008-6012.
- Stuart, K.D., Schnauffer, A., Ernst, N.L. et Panigrahi, A.K. (2005) Complex management: RNA editing in trypanosomes. *Trends Biochem Sci*, **30**, 97-105.
- Sudarsan, N., Barrick, J.E. et Breaker, R.R. (2003) Metabolite-binding RNA domains are present in the genes of eukaryotes. *Rna*, **9**, 644-647.
- Sugiyama, T. et Itoh, T. (1993) Control of ColE2 DNA replication: in vitro binding of the antisense RNA to the Rep mRNA. *Nucleic Acids Res*, **21**, 5972-5977.
- Sukhodolets, M.V. et Garges, S. (2003) Interaction of Escherichia coli RNA polymerase with the ribosomal protein S1 and the Sm-like ATPase Hfq. *Biochemistry*, **42**, 8022-8034.
- Sun, W. et Nicholson, A.W. (2001) Mechanism of action of Escherichia coli ribonuclease III. Stringent chemical requirement for the glutamic acid 117 side chain and Mn²⁺ rescue of the Glu117Asp mutant. *Biochemistry*, **40**, 5102-5110.
- Sun, X., Zhulin, I. et Wartell, R.M. (2002) Predicted structure and phyletic distribution of the RNA-binding protein Hfq. *Nucleic Acids Res*, **30**, 3662-3671.
- Switalski, L.M., Butcher, W.G., Caufield, P.C. et Lantz, M.S. (1993) Collagen mediates adhesion of Streptococcus mutans to human dentin. *Infect Immun*, **61**, 4119-4125.
- T**egmark, K., Karlsson, A. et Arvidson, S. (2000) Identification and characterization of SarH1, a new global regulator of virulence gene expression in Staphylococcus aureus. *Mol Microbiol*, **37**, 398-409.
- Tenover, F.C., Biddle, J.W. et Lancaster, M.V. (2001) Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in Staphylococcus aureus. *Emerg Infect Dis*, **7**, 327-332.
- Thomas, C.M. (2000) Paradigms of plasmid organization. *Mol Microbiol*, **37**, 485-491.
- Tomizawa, J. (1990) Control of ColE1 plasmid replication. Intermediates in the binding of RNA I and RNA II. *J Mol Biol*, **212**, 683-694.
- Tomizawa, J., Itoh, T., Selzer, G. et Som, T. (1981) Inhibition of ColE1 RNA primer formation by a plasmid-specified small RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 1421-1425.
- Tremaine, M.T., Brockman, D.K. et Betley, M.J. (1993) Staphylococcal enterotoxin A gene (sea) expression is not affected by the accessory gene regulator (agr). *Infect Immun*, **61**, 356-359.
- Trotochaud, A.E. et Wassarman, K.M. (2004) 6S RNA function enhances long-term cell survival. *J Bacteriol*, **186**, 4978-4985.
- Trotochaud, A.E. et Wassarman, K.M. (2005) A highly conserved 6S RNA structure is required for regulation of transcription. *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 313-319.
- Tseng, C.W. et Stewart, G.C. (2005) Rot repression of enterotoxin B expression in Staphylococcus aureus. *J Bacteriol*, **187**, 5301-5309.
- Tsui, H.C., Feng, G. et Winkler, M.E. (1996) Transcription of the mutL repair, miaA tRNA modification, hfq pleiotropic regulator, and hflA region protease genes of Escherichia coli K-12 from clustered Esigma32-specific promoters during heat shock. *J Bacteriol*, **178**, 5719-5731.
- Tsui, H.C., Leung, H.C. et Winkler, M.E. (1994) Characterization of broadly pleiotropic phenotypes caused by an hfq insertion mutation in Escherichia coli K-12. *Mol Microbiol*, **13**, 35-49.

- Tucker, B.J. et Breaker, R.R. (2005) Riboswitches as versatile gene control elements. *Curr Opin Struct Biol*, **15**, 342-348.
- Udekwi, K.I., Darfeuille, F., Vogel, J., Reimegard, J., Holmqvist, E. et Wagner, E.G. (2005) Hfq-dependent regulation of OmpA synthesis is mediated by an antisense RNA. *Genes Dev*, **19**, 2355-2366.
- Urbanowski, M.L., Stauffer, L.T. et Stauffer, G.V. (2000) The *gcvB* gene encodes a small untranslated RNA involved in expression of the dipeptide and oligopeptide transport systems in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **37**, 856-868.
- Valentin-Hansen, P., Eriksen, M. et Udesen, C. (2004) The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions. *Mol Microbiol*, **51**, 1525-1533.
- Valeva, A., Weisser, A., Walker, B., Kehoe, M., Bayley, H., Bhakdi, S. et Palmer, M. (1996) Molecular architecture of a toxin pore: a 15-residue sequence lines the transmembrane channel of staphylococcal alpha-toxin. *Embo J*, **15**, 1857-1864.
- Valverde, C., Heeb, S., Keel, C. et Haas, D. (2003) RsmY, a small regulatory RNA, is required in concert with RsmZ for GacA-dependent expression of biocontrol traits in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol Microbiol*, **50**, 1361-1379.
- van Schaik, W. et Abee, T. (2005) The role of sigmaB in the stress response of Gram-positive bacteria -- targets for food preservation and safety. *Curr Opin Biotechnol*, **16**, 218-224.
- Vandenesch, F., Kornblum, J. et Novick, R.P. (1991) A temporal signal, independent of *agr*, is required for *hla* but not *spa* transcription in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, **173**, 6313-6320.
- Vanderpool, C.K. et Gottesman, S. (2004) Involvement of a novel transcriptional activator and small RNA in post-transcriptional regulation of the glucose phosphoenolpyruvate phosphotransferase system. *Mol Microbiol*, **54**, 1076-1089.
- Vanderpool, C.K. et Gottesman, S. (2005) Noncoding RNAs at the membrane. *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 285-286.
- Vaudaux, P., Pittet, D., Haeberli, A., Huggler, E., Nydegger, U.E., Lew, D.P. et Waldvogel, F.A. (1989) Host factors selectively increase staphylococcal adherence on inserted catheters: a role for fibronectin and fibrinogen or fibrin. *J Infect Dis*, **160**, 865-875.
- Vaudaux, P. et Schrenzel, J. (2004) Nosocomial bacteraemia caused by *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, **364**, 644-645.
- Vecerek, B., Moll, I. et Blasi, U. (2005) Translational autocontrol of the *Escherichia coli* hfq RNA chaperone gene. *Rna*, **11**, 976-984.
- Vitreschak, A.G., Rodionov, D.A., Mironov, A.A. et Gelfand, M.S. (2002) Regulation of riboflavin biosynthesis and transport genes in bacteria by transcriptional and translational attenuation. *Nucleic Acids Res*, **30**, 3141-3151.
- Vitreschak, A.G., Rodionov, D.A., Mironov, A.A. et Gelfand, M.S. (2004) Riboswitches: the oldest mechanism for the regulation of gene expression? *Trends Genet*, **20**, 44-50.
- Vogel, J., Argaman, L., Wagner, E.G. et Altuvia, S. (2004) The small RNA IstR inhibits synthesis of an SOS-induced toxic peptide. *Curr Biol*, **14**, 2271-2276.
- Vogel, J., Bartels, V., Tang, T.H., Churakov, G., Slagter-Jager, J.G., Huttenhofer, A. et Wagner, E.G. (2003) RNomics in *Escherichia coli* detects new sRNA species and indicates parallel transcriptional output in bacteria. *Nucleic Acids Res*, **31**, 6435-6443.

- Voinnet, O. (2002) RNA silencing: small RNAs as ubiquitous regulators of gene expression. *Curr Opin Plant Biol*, **5**, 444-451.
- Wagner, E.G., Altuvia, S. et Romby, P. (2002) Antisense RNAs in bacteria and their genetic elements. *Adv Genet*, **46**, 361-398.
- Wagner, E.G., Blomberg, P. et Nordstrom, K. (1992) Replication control in plasmid R1: duplex formation between the antisense RNA, CopA, and its target, CopT, is not required for inhibition of RepA synthesis. *Embo J*, **11**, 1195-1203.
- Wagner, E.G. et Simons, R.W. (1994) Antisense RNA control in bacteria, phages, and plasmids. *Annu Rev Microbiol*, **48**, 713-742.
- Walev, I., Martin, E., Jonas, D., Mohamadzadeh, M., Muller-Klieser, W., Kunz, L. et Bhakdi, S. (1993) Staphylococcal alpha-toxin kills human keratinocytes by permeabilizing the plasma membrane for monovalent ions. *Infect Immun*, **61**, 4972-4979.
- Walev, I., Palmer, M., Martin, E., Jonas, D., Weller, U., Hohn-Bentz, H., Husmann, M. et Bhakdi, S. (1994) Recovery of human fibroblasts from attack by the pore-forming alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microb Pathog*, **17**, 187-201.
- Wang, J. et Springer, T.A. (1998) Structural specializations of immunoglobulin superfamily members for adhesion to integrins and viruses. *Immunol Rev*, **163**, 197-215.
- Wassarman, K.M., Repoila, F., Rosenow, C., Storz, G. et Gottesman, S. (2001) Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays. *Genes Dev*, **15**, 1637-1651.
- Wassarman, K.M. et Storz, G. (2000) 6S RNA regulates *E. coli* RNA polymerase activity. *Cell*, **101**, 613-623.
- Wassarman, K.M., Zhang, A. et Storz, G. (1999) Small RNAs in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol*, **7**, 37-45.
- Wei, Y. et Bechhofer, D.H. (2002) Tetracycline induces stabilization of mRNA in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, **184**, 889-894.
- Weilbacher, T., Suzuki, K., Dubey, A.K., Wang, X., Gudapaty, S., Morozov, I., Baker, C.S., Georgellis, D., Babitzke, P. et Romeo, T. (2003) A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **48**, 657-670.
- Weisel, J.W. (2005) Fibrinogen and fibrin. *Adv Protein Chem*, **70**, 247-299.
- Wesson, C.A., Liou, L.E., Todd, K.M., Bohach, G.A., Trumble, W.R. et Bayles, K.W. (1998) *Staphylococcus aureus* Agr and Sar global regulators influence internalization and induction of apoptosis. *Infect Immun*, **66**, 5238-5243.
- Wickiser, J.K., Cheah, M.T., Breaker, R.R. et Crothers, D.M. (2005a) The kinetics of ligand binding by an adenine-sensing riboswitch. *Biochemistry*, **44**, 13404-13414.
- Wickiser, J.K., Winkler, W.C., Breaker, R.R. et Crothers, D.M. (2005b) The speed of RNA transcription and metabolite binding kinetics operate an FMN riboswitch. *Mol Cell*, **18**, 49-60.
- Wilderman, P.J., Sowa, N.A., FitzGerald, D.J., FitzGerald, P.C., Gottesman, S., Ochsner, U.A. et Vasil, M.L. (2004) Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* involved in iron homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 9792-9797.
- Wilkins, J.F. (2005) Genomic imprinting and methylation: epigenetic canalization and conflict. *Trends Genet*, **21**, 356-365.
- Will, C.L. et Luhrmann, R. (2001) Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 290-301.

- Willkomm, D.K., Minnerup, J., Huttenhofer, A. et Hartmann, R.K. (2005) Experimental RNomics in *Aquifex aeolicus*: identification of small non-coding RNAs and the putative 6S RNA homolog. *Nucleic Acids Res*, **33**, 1949-1960.
- Winkler, W., Nahvi, A. et Breaker, R.R. (2002a) Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature*, **419**, 952-956.
- Winkler, W.C., Cohen-Chalamish, S. et Breaker, R.R. (2002b) An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 15908-15913.
- Winkler, W.C., Nahvi, A., Roth, A., Collins, J.A. et Breaker, R.R. (2004) Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. *Nature*, **428**, 281-286.
- Winkler, W.C., Nahvi, A., Sudarsan, N., Barrick, J.E. et Breaker, R.R. (2003) An mRNA structure that controls gene expression by binding S-adenosylmethionine. *Nat Struct Biol*, **10**, 701-707.
- Witte, W. (2004) Glycopeptide resistant *Staphylococcus*. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, **51**, 370-373.
- Wolz, C., McDevitt, D., Foster, T.J. et Cheung, A.L. (1996) Influence of agr on fibrinogen binding in *Staphylococcus aureus* Newman. *Infect Immun*, **64**, 3142-3147.
- Wolz, C., Pohlmann-Dietze, P., Steinhuber, A., Chien, Y.T., Manna, A., van Wamel, W. et Cheung, A. (2000) Agr-independent regulation of fibronectin-binding protein(s) by the regulatory locus sar in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*, **36**, 230-243.
- Y**arwood, J.M., McCormick, J.K., Paustian, M.L., Kapur, V. et Schlievert, P.M. (2002) Repression of the *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator in serum and in vivo. *J Bacteriol*, **184**, 1095-1101.
- Yarwood, J.M., McCormick, J.K. et Schlievert, P.M. (2001) Identification of a novel two-component regulatory system that acts in global regulation of virulence factors of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, **183**, 1113-1123.
- Yong, J., Wan, L. et Dreyfuss, G. (2004) Why do cells need an assembly machine for RNA-protein complexes? *Trends Cell Biol*, **14**, 226-232.
- Yusupov, M.M., Yusupova, G.Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T.N., Cate, J.H. et Noller, H.F. (2001) Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science*, **292**, 883-896.
- Z**alfa, F., Giorgi, M., Primerano, B., Moro, A., Di Penta, A., Reis, S., Oostra, B. et Bagni, C. (2003) The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses. *Cell*, **112**, 317-327.
- Zetola, N., Francis, J.S., Nuermberger, E.L. et Bishai, W.R. (2005) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infect Dis*, **5**, 275-286.
- Zhang, A., Altuvia, S., Tiwari, A., Argaman, L., Hengge-Aronis, R. et Storz, G. (1998) The OxyS regulatory RNA represses rpoS translation and binds the Hfq (HF-I) protein. *Embo J*, **17**, 6061-6068.
- Zhang, A., Wassarman, K.M., Ortega, J., Steven, A.C. et Storz, G. (2002a) The Sm-like Hfq protein increases OxyS RNA interaction with target mRNAs. *Mol Cell*, **9**, 11-22.

- Zhang, A., Wassarman, K.M., Rosenow, C., Tjaden, B.C., Storz, G. et Gottesman, S. (2003) Global analysis of small RNA and mRNA targets of Hfq. *Mol Microbiol*, **50**, 1111-1124.
- Zhang, K. et Nicholson, A.W. (1997) Regulation of ribonuclease III processing by double-helical sequence antideterminants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 13437-13441.
- Zhang, L., Gray, L., Novick, R.P. et Ji, G. (2002b) Transmembrane topology of AgrB, the protein involved in the post-translational modification of AgrD in *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*, **277**, 34736-34742.
- Zhang, L. et Ji, G. (2004) Identification of a staphylococcal AgrB segment(s) responsible for group-specific processing of AgrD by gene swapping. *J Bacteriol*, **186**, 6706-6713.
- Zhang, S. et Stewart, G.C. (2000) Characterization of the promoter elements for the staphylococcal enterotoxin D gene. *J Bacteriol*, **182**, 2321-2325.
- Zuker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*, **31**, 3406-3415.

Annexe 1 : La protéine Hfq et la polyadénylation (Article n°2)

Ce travail est issu d'une collaboration entre notre laboratoire et le laboratoire du Dr. Eliane Hanjendorf (IBPC, Paris), suite à la visite de M. Folichon dans notre équipe. Précédemment, ce laboratoire a montré que Hfq influence la polyadénylation des ARNm, en rendant la polyA polymérase plus processive. En utilisant l'ARNm *rpsO*, codant pour la protéine ribosomique S15, il a pu être déterminé que la protéine Hfq possède une très forte affinité pour la séquence polyA présente à l'extrémité 3' d'un ARNm. Dans cette étude, ma contribution a été de déterminer par des expériences de cartographie en solution, l'empreinte de la protéine Hfq sur un fragment polyadénylé de l'ARNm *rpsO*. Nous avons montré que la protéine protège la séquence polyadénylée et un deuxième site, décrit comme étant un site de coupure par la RNase E. *In vitro*, Hfq protège l'ARNm contre la dégradation *via* la RNase E, mais aussi contre l'attaque de l'extrémité 3' par la PNPase et la RNase II.

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

The poly(A) binding protein Hfq protects RNA from RNase E and exoribonucleolytic degradation

Marc Folichon, Véronique Arluison, Olivier Pellegrini, **Eric Huntzinger**, Philippe Régnier et Eliane Hajnsdorf

Nucleic Acids Research, 2003, Vol. 31, Pages 7302-7310

Pages 7302 à 7310 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur : <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/full/31/24/7302>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

Annexe 2 : Techniques de cartographie en solution des ARN

Cette revue fait le point sur les applications de la cartographie en solution, sur les avantages et les limites de cette méthode. Elle donne aussi des protocoles détaillés qui ont été utilisés au cours de mon travail de thèse.

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Probing RNA Structures with Enzymes and Chemicals *In Vitro* and *In Vivo*

Eric Huntzinger, Maria Possedko, , Flore Winter, Hervé Moine, Chantal Ehresmann et Pascale Romby

Handbook of RNA Biochemistry, 2005, Pages 151-171

Pages 151 à 171 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Il est possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr