

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ (414)

Unité de recherche : Architecture et Réactivité de l'ARN (UPR9002)

Institut de biologie moléculaire et cellulaire (IBMC), Strasbourg

THÈSE présentée par :

Noémie MERCIER

soutenue le : **15 septembre 2023**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie**

**Étude des ARN régulateurs et de leurs
réseaux impliqués dans la formation
des biofilms chez *Staphylococcus
aureus***

THÈSE dirigée par :

Mme CALDELARI Isabelle

Maître de conférence, IBMC - Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme SOUTOURINA Olga

M MOREILLON Philippe

Professeur, I2BC – Université Paris Saclay

Professeur émérite, DMF – Université de Lausanne

EXAMINATEUR INTERNE :

M SMIRNOV Alexandre

Chargé de recherches, IPCB – Université de Strasbourg

Unité de recherche : Architecture et
Réactivité de l'ARN (UPR9002)

Institut de biologie moléculaire et
cellulaire (IBMC), Strasbourg

Étude des ARN régulateurs et de leurs réseaux impliqués dans la formation des biofilms chez *Staphylococcus aureus*

Discipline/ Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

**Thèse dirigée par :
Isabelle CALDELARI**

**Thèse présentée par :
Noémie MERCIER**

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier les membres de mon jury, **Olga Soutourina, Philippe Moreillon et Alexandre Smirnov** d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse et de se déplacer à cette occasion.

Pascale, merci de m'avoir accueillie dans l'équipe en master. Merci de m'avoir poussée à me dépasser et à donner le meilleur de moi-même. Ta passion, ton implication dans chacun des sujets et ta rigueur ont été des aides précieuses dans la réalisation de cette thèse.

Isa, merci de courir dans les couloirs sans raison et de faire tomber tes salades de fruit dans ton sac (à deux reprises ???). Merci d'avoir toléré mon second degré et d'être devenue le propre auteur de tes blagues. Tu as fais en sorte de me simplifier la vie au maximum, tu es très engagée dans tes projets et rien que pour ça tu es ma chef préférée.

David Lalaloulila, merci pour ton aide précieuse, la route du sel et tes chemises à carreaux. Ton stress n'a d'égal que tes superstitions (c'est dire à quel point t'es chiant). On remercie RsaC d'être un quite unique sRNA et le MAPS d'être une technique parfaite et formidable (mais pas autant que le Canada).

Mathilde Charbonna AHAHAHAHA, je te HAHAAHAHAHAHAHAmerci d'avoir atterri chez nous. Ton doux rire, ton alter mathématique et ton sang-froid à tout épreuve sont autant de qualités requises pour intégrer le club med (voir §Barientosse). Tu es évidemment mon influenceuse préférée numéro 1 puisque tu m'as fait acheter tout un tas de conneries (utiles néanmoins).



Barrientosse, merci pour ta passion sans faille pour la science, tes crises de panique dans l'avion, tes pleurs à ton bureau de bon matin. Merci également de me voler mes solutions, de monter le chauffage même quand il fait 30 degrés dans le box et de traduire les chansons allemandes. Evidemment merci de me faire des câlins et de me toucher l'épaule, je suis toujours très à l'aise dans ces situations. En tant que membre exclusif du club med (voir §Charbonnax), j'attends notre prochain voyage au début de ton écriture.

Ced-ced, merci pour tes blagues pourries, ton sens du détail et ton manteau anti-pluie. Merci de nous offrir des cadeaux le jour de ton anniversaire, de faire des malaises devant ton plat de pâtes et de nous fournir sans interruption des photos de chatons mignons. Et bien évidemment, merci d'être l'éternel avant-dernier.

Matthieu, merci pour toutes ces soirées dont seules les photos nous restent, tes patates au micro-ondes et ton talent divin du devinage des cartes. En tant que chapi chapo, j'en profite pour remercier **Antonin** dans ce paragraphe notamment pour son aide, la cuillère en or dans la bouche et sa bonne humeur particulière dans les files d'attentes (c'est faux).

Emma, mon maître, mon phare dans la nuit ou encore ma meuf, merci de m'avoir tout appris. On retiendra les folles soirées au BM et les innombrables T-shirt qui t'ont servi de torchon.

Lucas, je te remercie d'avoir toujours été là pour simplifier la vie à tout le monde, notamment la mienne. Merci de m'avoir fait mes solutions et mes devoirs de tampons communs.

Hiroki, Max and Roberto, thank for your help and our interesting discussions.

José, je te remercie pour tous les services que tu nous rends (et avec plaisir). T'es sympa quand t'es sobre, mais encore plus quand t'es bourré, et ça, ça n'a pas de prix.

Gaby, merci de claquer tes mains frénétiquement sans raison apparente et de nous refaire découvrir la langue française.

Ludivine, merci d'avoir accepté toutes les missions que je te donnais sans hésiter, même les plus pénibles. Tu as également été un support moral et un réceptacle compatissant de mes plaintes. Hâte de suivre en septembre la suite de tes aventures au sein du 436.

Orian, merci d'avoir postillonné dans mon œil et de me rappeler de fermer ma gueule.

Morgane, merci de me sortir d'absolument tous mes boursiers. Ton aide m'a été précieuse que ce soit pour les expériences, l'écriture de la thèse et le support moral. J'espère qu'on va bien manger à ton pot de thèse.

Tous les stagiaires, aka **Julie, Marion, Lénaïc**, merci d'être passé faire quelques temps avec nous, c'était sympa.

Merci à tous les gens du master, spécifiquement **Lilow, Josh, Agathe, Antho et Gaël**. Evidemment je n'aurais pas eu ce master si vous ne m'aviez pas trainée à la BU. Hâte de cueillir des champignons avec vous de nouveau cet hiver.

Pageaut, merci de m'avoir appris la tolérance et la patience. Le dicton « jamais mieux servi que par soi-même » n'a jamais été aussi pertinent qu'en étant ton binôme de TP. Merci de m'avoir laissée faire des présentations sur les dinosaures, de me raconter ta vie trépidante et de perdre ton porte-monnaie au pire moment possible. Tes aventures sont infinies et j'espère pouvoir les suivre sur le terrain au Canada un de ces jours.

Elie, dit « la maturité », merci d'être mon assistante sociale attitrée et d'écouter mes jérémiades. Ton coaching de vie fut nécessaire et efficace, je me sens devenir une adulte responsable et autonome

(non). Désolée d'avoir brisé ton rêve de devenir l'étudiant à Isabelle, elle m'a évidemment choisie à ta place sans hésiter une seule seconde.

Léo Gonzlong dit « la machine », merci pour ton soutien moral et tes dilemmes cornéliens. Merci d'avoir équipée absolument toute ma cuisine et de documenter tes rencontres avec les canards. Evidemment je te remercie d'avoir écoutées mes plaintes des heures durant sans vaciller, je pense constituer un bon entraînement pour tes durs combats à venir. Ce paragraphe n'est évidemment qu'un épilogue à ta biographie qui sera épique sans aucun doute.

Lucie, merci pour nos rendez-vous biannuels toujours croustillants. J'espère qu'un jour tu finiras enfin tes études, ça commence à être long.

Je remercie également toutes les personnes de l'IBMC qui m'ont, de près ou de loin, aidé tout au long de cette thèse. Merci également à Afida Turner d'être une fucking star et à Nathalie de jibuler.

Des bisous,

Liste des abréviations

AA	Acide aminé
A	Adénine
C	Cytosine
G	Guanine
T	Thymine
U	Uracile

CDS	Région codante
ORF	Cadre ouvert de lecture
RBS	Site de fixation du ribosome
SD	Shine et Dalgarno
UTR	Région non traduite

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNe	ADN extracellulaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNas	ARN anti-sens
ARNi	Interférence à ARN
ARNm	ARN messenger
ARNnc	ARN non codant
ARNr	ARN ribosomique
ARNt	ARN de transfert
miRNA	Micro RNAs
sARN	<i>small</i> ARN
snoRNA	<i>Small nucleolar</i> RNA

<i>agr</i>	<i>Accessory genes regulator</i>
AIP	Peptide auto induit
Bap	<i>Biofilm associated protein</i>
CcpA	<i>Carbon catabolite control protein A</i>
Clf	<i>Clumping factor</i>
<i>cre</i>	<i>catabolite responsive elements</i>
FNBP	<i>Fibronectin binding proteins</i>
Hla	α -Hémolysine
<i>ica</i>	<i>intracellular adhesion</i>
PBP	Protéine liant la pénicilline
PIA	Polysaccharide d'adhésion intracellulaire
PNAG	β -1,6-N-acétyl-glucosamine
PSM	<i>Phenol soluble modulins</i>
PVL	Leucocidine de Panton Valentine
Rbf	<i>Regulator of biofilm formation</i>
ROS	Espèces réactives à l'oxygène
RosA	<i>Regulator of sRNA A</i>
RoxS	<i>Related to oxydative stress</i>
Rsa	<i>RNA of S. aureus</i>
Spa	<i>Staphylococcale protein A</i>
Spr	<i>Small pathogenicity island RNAs</i>
SrrAB	<i>Staphylococcal respiratory response AB</i>
TSST	Syndrome du choc toxique

°C	Degrés Celsius
cpm	Coups par minute
DO	Densité optique
H	Heure
J	Joule
kb	Kilobase
l	Litre
M	Molaire
m	Mole
nt	Nucléotide
pb	Paire de base
pH	Potentiel hydrogène
rpm	Rotations par minute
UV	Ultraviolets
V	Volt
X	fois

Amp	Ampicilline
Cam	Chloramphénicol
DNase	Désoxyribonucléase
Ery	Erythromycine
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
Hfq	<i>Host factor Qβ</i>
RNase	Ribonucléase
TCS	<i>Two components system</i>

<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
MRSA	<i>S. aureus</i> résistant à la méthycilline
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>S. saprophyticus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
SCVs	<i>Small colony variants</i>
VISA	<i>S. aureus</i> résistant intermédiaire à la vancomycine
VRSA	<i>S. aureus</i> résistant à la vancomycine
WT	<i>Wild type</i>
<i>X. fastidiosa</i>	<i>Xylella fastidiosa</i>
<i>Y. pestis</i>	<i>Yersinia pestis</i>

ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
CLASH	<i>cross-linking, ligation and sequencing of hybrids</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
DBRI	<i>Direct determination of bacterial RNA-RNA interactome ;</i>
LIGR-seq	<i>Ligation of interacting RNA and high-throughput sequencing</i>
MAPS	<i>MS2-affinity purification coupled with RNA-seq</i>
PARIS	<i>Psoralen analysis of RNA interactions and structures</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
RIL-seq	<i>RNA interaction by ligation and sequencing</i>

AMT	4'-Aminométhyltrioxsalène hydrochloride
Ca	Calcium
DIG	Digoxygénine
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
GMP	Guanosine monophosphate
Mg	Magnésium
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NO	Oxyde nitrique
PCI	Phénol, chloroforme, alcool isoamylique
PTA	Psoralène TEG-azide
SDS	Sodium dodécyl sulfate
UDP	Uridine diphosphate

Table des matières

INTRODUCTION

Partie 1 : *Staphylococcus aureus*

I.	DECOUVERTE HISTORIQUE	1
II.	CARACTERES MICROBIOLOGIQUES DE <i>S. AUREUS</i>	3
III.	PATHOLOGIES ASSOCIEES	5
IV.	RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES	6
A)	HISTORIQUE DES RESISTANCES	6
B)	MECANISMES DE RESISTANCE	6

Partie 2 : Biofilms

I.	CONTEXTES FAVORABLES A LA FORMATION DE BIOFILMS	8
A)	LES BIOFILMS DANS LE MONDE BACTERIEN	8
B)	BIOFILMS DE <i>S. AUREUS</i> EN MEDECINE	9
II.	LES ETAPES DE LA FORMATION D'UN BIOFILM	10
III.	SPECIFICITES METABOLIQUES AU SEIN DU BIOFILM	12
A)	ACCES A L'OXYGENE & CROISSANCE	12
B)	« SMALL COLONY VARIANTS »	12
IV.	COMPOSITION DE LA MATRICE	13
A)	BIOFILM <i>ICA</i> -INDEPENDANT	13
B)	BIOFILM <i>ICA</i> -DEPENDANT	18
V.	REGULATEURS DES BIOFILMS	18
A)	COMPOSES ISSUS DE L'ENVIRONNEMENT	18
B)	REGULATEURS TRANSCRIPTIONNELS	19
VI.	LES BIOFILMS DANS LE CONTEXTE D'INFECTIONS CLINIQUES	24
A)	QUEL TYPE DE BIOFILM POUR QUEL TYPE D'INFECTION ?	24
B)	LIEN ENTRE BIOFILM ET RESISTANCES AUX ANTIBIOTIQUES	25

Partie 3 : Les ARN régulateurs

I.	HISTORIQUE	26
A)	DEBUT DE LA NOTION D'ARN REGULATEUR	26
B)	IDENTIFICATION DES SARN EUCARYOTES & PERSPECTIVES	27
II.	MECANISMES D' ACTIONS DES SARN	28
A)	ARN REGULATEURS AGISSANT EN <i>CIS</i>	31
B)	ARN REGULATEURS AGISSANT EN <i>TRANS</i>	32
C)	PROTEINES LIANT L'ARN	33

III. IDENTIFICATION DES CIBLES ARN	34
A) PURIFICATION D’AFFINITE MS2 COUPLEE AU SEQUENÇAGE ARN (MAPS).....	35
MS2-Affinity Purification Coupled with RNA Sequencing in Gram-Positive Bacteria.....	36
B) ETUDE DE L’INTERACTOME ARN-ARN	54

Partie 4 : sARN chez *S. aureus*

I. INTEGRATION DES SIGNAUX ENVIRONNEMENTAUX	57
II. LES ARN REGULATEURS CHEZ <i>S. AUREUS</i>.....	58
A) QUELQUES SARN CARACTERISES EXPERIMENTALEMENT	58
B) LES ARN REGULATEURS RSA.....	59
Assembling the Current Pieces: The Puzzle of RNA-Mediated Regulation in <i>Staphylococcus aureus</i>	67
III. MECANISMES DE REGULATION DE BIOFILM PAR LES SARN CHEZ D’AUTRES BACTERIES	74

OBJECTIFS DE LA THESE

I. IMPLICATION DES SARN DANS LA REGULATION DE LA FORMATION DE BIOFILM CHEZ <i>S. AUREUS</i>.....	76
A) REGULATION DE LA FORMATION DE BIOFILM <i>ICA</i> -DEPENDANT ET <i>ICA</i> -INDEPENDANT PAR LE SARN RSAE	76
B) REGULATION DE L’EXPRESSION D’ <i>ICA</i> R PAR LES TROIS SARN.....	77
II. MISE AU POINT D’UNE METHODE DE CARACTERISATION DE L’INTERACTOME ARN-ARN	77

CHAPITRE 1 : Régulation de la formation de biofilms par RsaE

Résultats

I. LES CIBLES ARNM DU SARN RSAE REVELEES PAR LA METHODE DU MAPS	80
II. FORMATION DE BIOFILM <i>ICA</i>-DEPENDANT.....	82
A) RSAE INTERAGIT AVEC L’ARNM <i>ICA</i> R	82
B) L’INTERACTION DE RSAE AVEC LA REGION 5’UTR D’ <i>ICA</i> R INDUIT LE CLIVAGE DE L’ARNM PAR LA RNASE III	85
C) RSAE INTERFERE AVEC L’INITIATION DE LA TRADUCTION D’ <i>ICA</i> R.....	85
D) RSAE PROMEUT L’EXPRESSION <i>IN VIVO</i> DE L’OPERON <i>ICAADBC</i>	89
E) RSAE N’AFFECTE PAS LA SECRETION DE PIA/PNAG.....	91
III. REGULATION GLOBALE DE LA FORMATION DE BIOFILM	91
A) RSAE ACTIVE LA FORMATION DE BIOFILM <i>ICA</i> -INDEPENDANT	91
B) LA COMPOSITION DE LA MATRICE DU BIOFILM DEPEND DE RSAE.....	94
IV. FORMATION DE BIOFILM <i>ICA</i>-INDEPENDANT	97
A) RSAE INTERAGIT AVEC DES ARNM RESPONSABLES DE LA FORMATION DE BIOFILM <i>ICA</i> -INDEPENDANT	97
B) RSAE MODULE L’INITIATION DE LA TRADUCTION DES OPERONS <i>PSMAB</i>	97
C) LE DUPLEXE RSAE/PSMA EST CLIVE PAR LA RNASE III	100
D) RSAE ACTIVERAIT L’EXPRESSION DE PSMA2 ET PSMb2	100

Discussion & perspectives

I. RSAE & LA FORMATION DE BIOFILM <i>ICA</i>-DEPENDANT.....	104
II. RSAE & LA FORMATION DE BIOFILM <i>ICA</i>-INDEPENDANT	106

CHAPITRE 2 : Caractérisation de l'interaction entre RsaE et RsaI

RNase III CLASH in MRSA uncovers sRNA regulatory networks coupling metabolism to toxin expression.....115

CHAPITRE 3 : Dynamique des interactions liant RsaE, RsaI et RsaA dans la régulation de la formation de biofilm

Résultats

I.	LES PARTENAIRES ARN POTENTIELS DE L'ARNM <i>ICAR</i> REVELES PAR LA METHODE DU MAPS	170
II.	CARACTERISATION DE L'INTERACTION RSAA/ <i>ICAR</i>	172
A)	LA VERSION LONGUE DE RSAA INTERAGIT AVEC L'ARNM <i>ICAR</i>	172
B)	LE DUPLEXE 3'- <i>ICAR</i> /RSAA EST CLIVE PAR LA RNASE III.....	172
III.	ETUDE DE LA LIAISON CONJOINTE DES SARN SUR L'ARNM <i>ICAR</i>	175
A)	CARACTERISATION <i>IN VITRO</i> DES INTERACTIONS	175
B)	LA REGULATION DE L'OPERON <i>ICAADBC</i> DEPEND D'UNE DYNAMIQUE ENTRE LES TROIS SARN RsaI, RSAA ET RsaE	175
C)	IMPACT DE LA DYNAMIQUE LIANT LES TROIS SARN SUR LA FORMATION DE BIOFILM ICA-INDEPENDANT	179

Discussion & perspectives

CHAPITRE 4 : Application de la technique DBRI « *Direct determination of Bacterial RNA-RNA Interactome* »

Matériels & méthodes

I.	COLLECTE DES ARNS TOTAUX	195
A)	CULTURE DES BACTERIES	195
B)	PONTAGE DES INTERACTIONS ARN/ARN <i>IN VIVO</i>	195
C)	EXTRACTION DES ARNS	195
II.	TRAITEMENTS DES ARNS	196
A)	ELIMINATION DE L'ADN	196
B)	ELIMINATION DES ARN RIBOSOMAU.....	196
III.	SELECTION & TRAITEMENTS DES ARNS PONTES	197
A)	REACTION DE CHIMIE <i>CLICK</i>	197
B)	PURIFICATION DES ARN « <i>CLIKES</i> ».....	197
C)	DIGESTION DES ARN PAR LA NUCLEASE S1	198
D)	ELUTION DES ARN PONTES.....	198
E)	ADENYLATION DES ARN	198
F)	LIGATION DES ARN ADENYLES.....	198
IV.	REVERSION DU PONTAGE AUX UV.....	199
V.	SEQUENÇAGE & ANALYSE BIO-INFORMATIQUE.....	199

Résultats

I.	CARACTERISATION DES ECHANTILLONS.....	200
A)	PROFILS DES ARNS OBTENUS.....	200
B)	CARACTERISATION DES CHIMERES	200
II.	ANALYSE DE CHIMERES IMPLIQUANT LES SARN	203

Discussion & perspectives

MATERIELS & METHODES

I.	LISTE DES OLIGONUCLEOTIDES	216
II.	SOUCHES & PLASMIDES.....	218
A)	LISTE DES SOUCHES ET DES PLASMIDES	218
B)	CONSTRUCTION DES PLASMIDES	219
C)	TRANSFORMATION DES SOUCHES.....	220
III.	TAMPONS & SOLUTIONS	222
IV.	TRANSCRIPTION <i>IN VITRO</i>	223
A)	PRODUCTION DES ARN	223
B)	EXTRACTION DES ARN.....	224
C)	PURIFICATION DES ARN.....	224
V.	<i>POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)</i>	224
VI.	VISUALISATION DES ARNS PAR NORTHERN BLOT	225
A)	EXTRACTION DES ARNS TOTAUX.....	225
B)	PRODUCTION DES SONDES DIG	225
C)	SEPARATION DES ARNS & TRANSFERT SUR MEMBRANE.....	226
D)	REVELATION DES ARNS PAR LE SYSTEME DIG.....	226
VII.	EXPERIENCE DE RIFAMPICINE	227
A)	CULTURE DES BACTERIES	227
B)	PREPARATION DES ECHANTILLONS.....	227
VIII.	VISUALISATION DES PROTEINES PAR WESTERN BLOT	227
A)	EXTRACTION DES PROTEINES	227
B)	SEPARATION DES PROTEINES & TRANSFERT SUR MEMBRANE.....	228
IX.	FORMATION DE DUPLEXES ARN PAR RETARD SUR GEL	229
A)	MARQUAGE RADIOACTIF DES ARNS A L'EXTREMITÉ 5'	229
B)	FORMATION DES COMPLEXES ARN/ARN	229
X.	EMPREINTE DU RIBOSOME.....	230
A)	PREPARATION DES SEQUENCES	230
B)	PREPARATION DES ECHANTILLONS.....	230
XI.	CLIVAGE A LA RNASE III	231
A)	PREPARATION DES ECHELLES ALCALINES (OH) ET RNASE T1 (T1)	231
B)	PREPARATION DES ECHANTILLONS.....	232
XII.	FORMATION DE BIOFILMS.....	232
A)	COLORATION AU CRYSTAL VIOLET.....	232
B)	TRAITEMENTS A LA DNASE I ET PROTEINASE K.....	233
C)	DENOMBREMENT DES BACTERIES ADHERENTES	233
D)	DETECTION DE PIA/PNAG PAR DOT BLOT	234
XIII.	CULTURE EN PLASMA DESACTIVE.....	235
XIV.	EXPERIENCE DE MAPS.....	235
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	235

Introduction

Partie 1 - *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus colonise de manière permanente près de 30 % de la population (Gorwitz *et al.*, 2008), à la surface de la peau ou dans les cavités nasales. De ce fait, la majorité des infections liées à cette bactérie sont issues d'une altération de l'intégrité physique des tissus épithéliaux. Une autre porte d'entrée est l'ingestion de la bactérie ou de ses toxines par des aliments contaminés, mais les cas d'empoisonnements sont rares. Concernant les infections nosocomiales, elles résultent essentiellement de la formation de biofilm à la surface du matériel médical.

En 2019, parmi les 13.7 millions de morts associés à des infections bactériennes, plus de 1 million de décès ont été attribués à *S. aureus* (Murray *et al.*, 2022). Cette bactérie est fatale dans 25 % des cas de bactériémie déclarés dans les pays à hauts revenus, représentant 299'000 décès en 2019.

I. Découverte historique

En 1880, le chirurgien écossais Sir Alexander Ogston décrit pour la première fois une infection pyogène survenue après une chirurgie et liée à des organismes microscopiques. L'observation de pus isolé d'abcès lui révèle la présence de bactéries rondes, arrangées en diplocoques ou grappes de raisin (**figure 1A-B** ; Ogston, 1881). Il nommera cet organisme *Staphylococcus*, du grec « staphyle » (grappes) et « kokkos » (grains). Un an plus tard, il observe que l'inoculation de pus contaminé à des cochons d'Inde et à des souris conduit à la formation d'abcès. Par la suite, le physicien allemand Friedrich Rosenbach isola des staphylocoques d'origine humaine et distingua plusieurs catégories selon leur apparence en culture. Il accorda le nom *aureus*, du latin *aureum* (or), aux colonies jaunes et dorées, différenciées des colonies blanches du *Staphylococcus albus* (blanc ; Rosenbach, 1884) renommé plus tard *Staphylococcus epidermidis*.

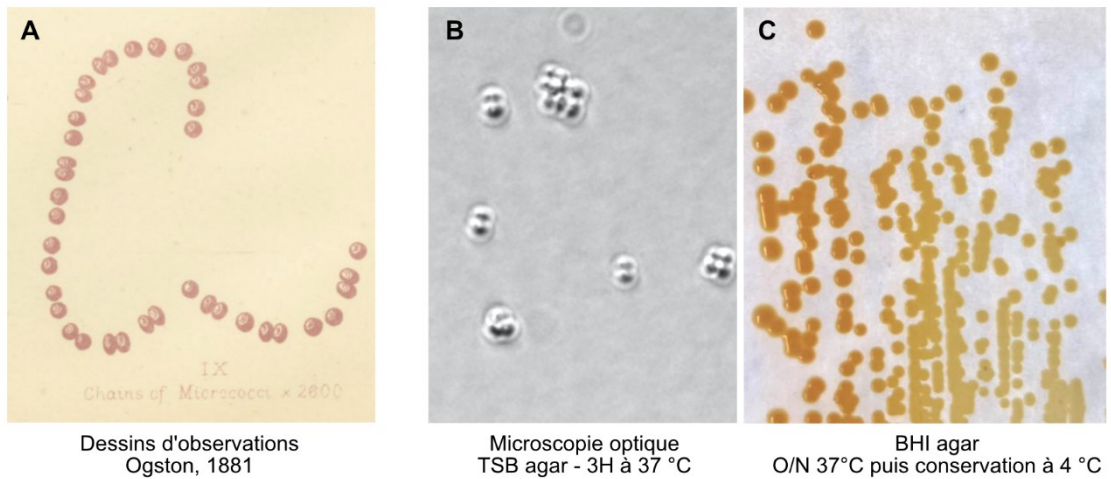


Figure 1 : Morphologie de *S. aureus*. Les premiers dessins d'observations de Ogston (A) décrivent une chaîne de coques, seules ou associées par deux, présentes dans le pus issu d'abcès. Ces observations sont fidèles aux images obtenues de nos jours (B) avec les microscopes électroniques. Les colonies "dorées" apparaissent orangées (C) suite à la production de staphyloxanthine, un pigment caroténoïde.

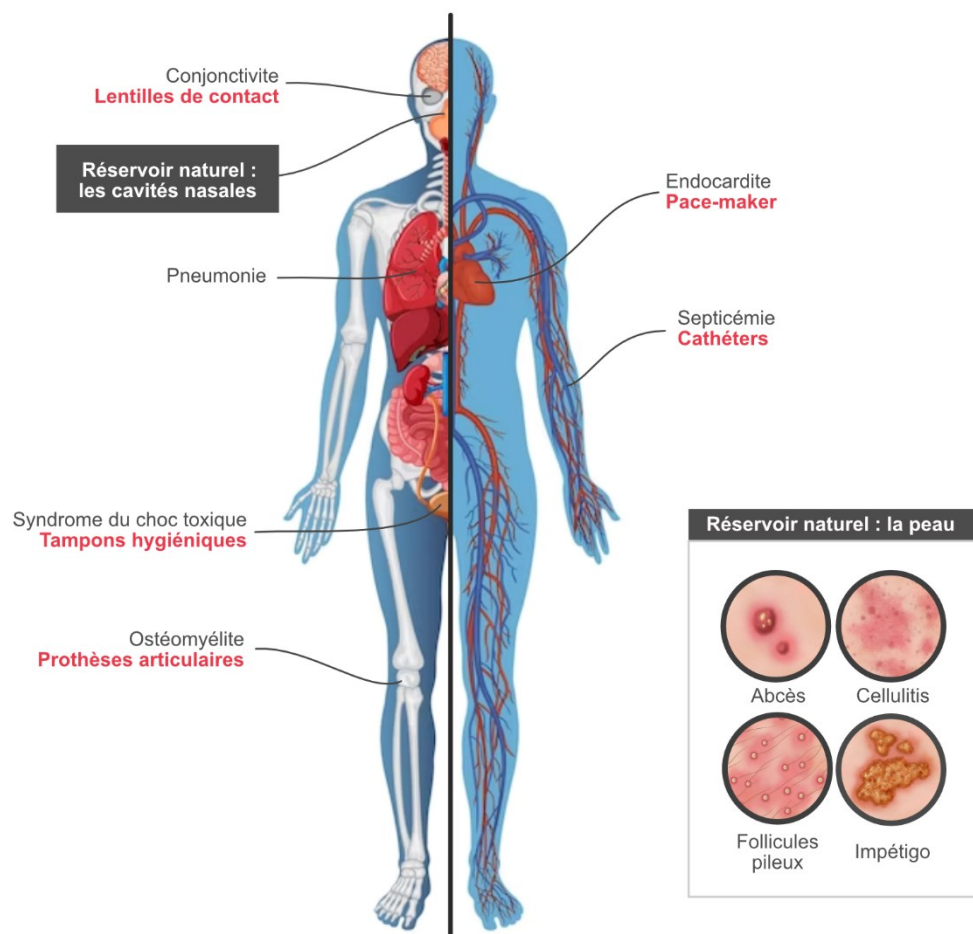


Figure 2 : Les différentes pathologies associées à *S. aureus*

En **ROSE** le matériel médical susceptible d'être le support de la formation de biofilms

II. Caractères microbiologiques de *S. aureus*

S. aureus est une bactérie à coloration de Gram positif, en forme de coques (**figure 1B**) dont le diamètre est compris entre 0.5 et 1.5 μm , rassemblées en grappes ou par paires. La bactérie n'est pas mobile, possède un métabolisme respiratoire aérobie-anaérobie facultatif et sa température optimale de croissance est comprise entre 18 et 40 °C. Concernant ses caractéristiques biochimiques, *S. aureus* est positive à la catalase et négative à l'oxydase. Certains tests biochimiques sont pratiqués en laboratoire d'analyses médicales pour identifier rapidement cette bactérie : par exemple, *S. aureus* sécrète la coagulase, une enzyme qui permet l'agglutination du plasma, ce qui n'est pas le cas de *S. epidermidis* et *S. saprophyticus* (Kateete *et al.*, 2010). La bactérie est usuellement cultivée sur gélose au sang où l'on peut observer des colonies lisses, rondes et bombées de couleur jaune dorée (**figure 1C**). Cette teinte particulière concerne la grande majorité des souches de *S. aureus* même si certaines souches développent des colonies blanches. Cette couleur orangée résulte de la production de staphyloxanthine, un caroténoïde impliqué dans la résistance aux espèces réactives de l'oxygène (ROS ; Beavers and Skaar, 2016). La gélose au sang permet également d'observer une zone de lyse des hématies entourant les colonies, due à la production d'hémolysines.

Le pathogène *S. aureus* est capable de produire un large panel de facteurs de virulence dont les principaux sont listés dans le **tableau 1**. Ces protéines permettent à la bactérie d'échapper au système immunitaire de l'hôte, de résister aux différents stress rencontrés lors d'une infection ou encore d'optimiser l'assimilation de nutriments. Ces facteurs favorisent l'adhésion, le maintien ou la dissémination de l'infection bactérienne, selon le contexte. Le système de réponse à la densité cellulaire Agr (ou « *quorum sensing* » ; §2.V.b.1) favorise la virulence par l'activation de la production de toxines formant des pores. A l'inverse, le système de *quorum sensing* diminue les capacités d'adhésion de la bactérie *via* l'inhibition de l'expression de protéines de surfaces, comme la protéine A (Le and Otto, 2015). Par exemple, lors du syndrome du choc toxique (TSST) la toxine sécrétée est capable de traverser la muqueuse vaginale et d'interagir avec les récepteurs CMH-II et TCR (complexe majeur d'histocompatibilité de classe II ; récepteur des cellules T) des lymphocytes T de l'hôte. Cette interaction conduit à l'activation massive du système immunitaire adaptatif qui relargue des cytokines pro-inflammatoires à l'origine des symptômes observés (fièvre, hypotension, desquamation). La toxine associée TSST-1 est catégorisée comme un « super antigène », c'est

Tableau 1 : Quelques facteurs de virulence décrit chez *S. aureus*

Ig = Immunoglobulines NET = *neutrophil extracellular traps*

Facteur de virulence	gène	Fonction
A la surface de la cellule		
Capsule	<i>CP</i>	Evasion immunitaire, colonisation des surfaces
Protéine A	<i>spa</i>	Inhibition de la phragocytose (se lie aux IgG/IgM)
<i>Clumping factor</i>	<i>clfA/B</i>	Formation de fibres par liaison au fibrinogène
Protéine liant le collagène	<i>cna</i>	Formation de pores chez les leucocytes et érythrocytes
Protéine liant le fibrinogène	<i>fnbp</i>	Aggrégation des plaquettes
Protéine d'adhérence extracellulaire	<i>eap/map</i>	Liaison aux protéines plasmatiques et module le système immunitaire
<i>von Willebrand factor binding protein</i>	<i>vWbp</i>	Coagulation du sérum, formation de caillots sanguins
Coagulase	<i>coa</i>	
Sécrété dans le milieu		
Lyse des cellules		
Hémolysine α	<i>hla</i>	Formation de pores (cellules épithéliales, érythrocytes, monocytes, fibroblastes)
Hémolysine γ	<i>hlg</i>	Formation de pores (neutrophiles, monocytes, macrophages)
Leucocidine	<i>luk</i>	Formation de pores chez les leucocytes
Leucocidine de Panton Valentine	<i>pvl</i>	
Protéines solubles dans le phénol	<i>psm</i>	Formation de pores chez les leucocytes/érythrocytes
Interférence avec la réponse immunitaire		
Staphylokinase	<i>ska</i>	Coagulation du sérum et neutralise les défensines
Protéines inhibitrices du chimiotactisme	<i>CHIPS</i>	Inactivation des récepteurs du chimiotactisme des neutrophiles
Auréolysine	<i>aur</i>	Dégradation des Ig et inactivation des inhibiteurs de protéinases
Nucléases	<i>nuc</i>	Echappement des NET produit par les neutrophiles
Toxine du Syndrome du Choc Toxique	<i>tstH</i>	Active une réponse immunitaire disproportionnée
<i>Formyl peptide receptor-like 1 inhibitory protein</i>	<i>FLIPr</i>	Evasion immunitaire
Entérotoxines	<i>SE</i>	20 SE décrites, activation anarchique des lymphocytes T

à dire une molécule capable d'activer la prolifération et la différenciation des lymphocytes T de manière anarchique et conduisant au choc septique (Kim, 2019). Autre exemple, lors de la colonisation des poumons, de nombreux facteurs de virulence contribuent au développement de pneumonies dont certaines nécrosantes. Dans ce contexte, *S. aureus* dégrade le mucus pulmonaire par l'excrétion de protéases puis déstabilise les jonctions serrées de la barrière épithéliale *via* l'expression de la protéine A de surface. Dans le modèle de pneumonie chez le lapin, la PVL est la toxine à l'origine des pneumonies nécrosantes. Cependant, l'épithélium de l'hôte est également dégradé par l'hémolysine Hla qui est sécrétée et qui interagit avec les mêmes récepteurs que la PVL (Pivard *et al.*, 2021).

III. Pathologies associées

La diversité des facteurs de virulence exprimés par *S. aureus* est le reflet de la variété des infections humaines engendrées par cette bactérie (**figure 2**). Le réservoir principal de la bactérie se localise au niveau des cavités nasales, principales sources de contaminations.

Les pathologies les plus communes et généralement associées à *S. aureus* sont les infections de la peau (plaies, folliculites ou impétigo bulleux) et des tissus mous. On retrouve également des infections pyogènes des glandes apocrines qui sont localisées au niveau des aisselles, paupières, pubis et des organes génitaux. *S. aureus* est à l'origine d'infection de la glande mammaire chez les mères qui allaitent. La bactérie est l'une des causes principales d'endocardites parfois induites par la contamination de prothèses ou de valves cardiaques natives. Elle est également capable de coloniser les poumons entraînant des pneumonies, et est fréquemment à l'origine d'ostéomyélites notamment au niveau des articulations.

Une minorité d'infections aboutissent à une septicémie souvent associée à une propagation de la bactérie à partir de la colonisation de cathéter intra-veineux. Ce type de maladie entraîne parfois des complications majeures comme l'endocardite, les embolies vasculaires ou des infections récurrentes à *S. aureus*. Les pathologies spécifiquement associées aux biofilms seront décrites dans la suite de ce manuscrit (§2.1.b).

IV. Résistance aux antibiotiques

a) Historique des résistances

Les premiers traitements d'infections à la pénicilline en 1941 ont été immédiatement suivis de l'apparition de souches résistantes à cet antibiotique. Actuellement, 97 % des souches de *S. aureus* retrouvées au sein des individus sains sont résistantes à la pénicilline. Moins d'un an après la mise sur le marché de la prometteuse méticilline en 1959, les souches résistantes à ce composé (*methicillin resistant S. aureus* ; MRSA) se sont répandues à travers l'Europe. De nos jours, en France, près de 20 % des isolats issus d'infections à *S. aureus* présentent une résistance à la méticilline. Il faut noter qu'en 2019, les MRSA étaient responsables à travers le monde de 68 % des décès liés à une infection par *S. aureus* (Murray *et al.*, 2022).

Depuis les années 1980, la vancomycine est utilisée en traitement des infections causées par les souches MRSA. Cependant, les souches résistantes intermédiaires à la vancomycine (VISA) font leur apparition dès 1997 au Japon. Le premier isolat de souche résistante (*vancomycin resistant S. aureus* ; VRSA) prélevé en 2002, est issu d'un patient diabétique sous traitement prolongé à la vancomycine. Cependant, les cas cliniques de VRSA restent rares et isolés, plaçant la vancomycine comme traitement de dernier recours en cas d'infection par un MRSA. Malgré la faible prévalence des souches VRSA, celles-ci demeurent sous surveillance et l'usage de la vancomycine est strictement limitée afin de restreindre le développement de résistances.

b) Mécanismes de résistance

1. Pénicilline et Méticilline

La pénicilline et la méticilline appartiennent à la famille des β -lactames qui se lient aux PBPs (*penicillin-binding protein*) de la paroi bactérienne et limitent la synthèse du peptidoglycane. L'une des stratégies de résistance développée par *S. aureus* repose sur l'expression d'enzymes comme la pénicillinase ou la β -lactamase dont le gène *blaZ* est localisé sur un plasmide. La seconde stratégie consiste à acquérir le gène *mecA* responsable de l'expression de la protéine PBP2a dont l'affinité pour les pénicillines est faible. Ce gène est localisé sur un élément mobile nommé la cassette chromosomique *SCCmec* (*staphylococcal*

cassette chromosome mec). Elle se compose de gènes *crr* exprimant des recombinaisons qui permettent à la cassette d'être excisée et intégrée dans le génome bactérien ; ainsi qu'une combinaison de gènes *mec* comprenant *mecA* et ses régulateurs (Ito and Hiramatsu, 1998). Le transfert horizontal des cassettes *SCCmec* est à l'origine de l'apparition des MRSA. D'après des analyses génétiques et phylogéniques, il semblerait que les *SCCmec* soient issues d'un transfert horizontal entre des staphylocoques du groupe *sciuri* et des souches de *S. aureus* (Zeman *et al.*, 2017). Depuis, les *SCCmec* sont classifiées selon la combinaison des gènes *mec* et *crr* : on distingue 5 classes de gènes *crr* et 8 types de *SCCmec*, chacune associée à des résistances à des antibiotiques variés (Turlej *et al.*, 2011).

2. Vancomycine

La vancomycine appartient à la classe des glycopeptides. Comme les β -lactames, cet antibiotique inhibe la synthèse de la paroi cellulaire mais le mécanisme d'action est différent. En effet, les glycopeptides ciblent l'étape de transglycosylation en se liant aux précurseurs D-Ala-D-Ala, bloquant la synthèse du peptidoglycane. La résistance intermédiaire à la vancomycine (*vancomycin intermediate S. aureus* ; VISA) est liée à l'accumulation de mutations. Ces mutations provoquent l'épaississement de la paroi cellulaire et la synthèse d'autres cibles jouant le rôle de leurre vis-à-vis de l'antibiotique. En parallèle, l'apparition de VRSA est corrélée à l'acquisition du cluster de gènes *vanA* qui semble être originaire de transfert de gène depuis des entérocoques. L'expression de ligases Van permet la modification de la cible, c'est-à-dire le précurseur D-Ala-D-Ala qui devient D-Ala-D-Lac. Néanmoins l'expression de cette résistance possède un coût biologique considérable pour la bactérie (Foucault *et al.*, 2009), ce qui pourrait expliquer que la propagation des souches VRSA soit moins efficace que celle observée pour les MRSA.

Partie 2. Biofilms

I. Contextes favorables à la formation de biofilms

Le biofilm est une structure stable et dense qui confère une protection mécanique contre les multiples stress environnementaux : températures extrêmes, exposition à des antibiotiques, carences en nutriments, déshydratation ou encore évasion de la réponse immunitaire de l'hôte.

a) Les biofilms dans le monde bactérien

La formation de biofilm est à l'origine de maladies impactant le domaine agricole, comme la bactérie *Xylella fastidiosa* dont les biofilms obstruent le xylème de plants de vignes (Castiblanco and Sundin, 2016). On retrouve également les biofilms à l'origine de près de 60 % des cas d'infections alimentaires dont une haute proportion est attribuée à *Listeria monocytogenes*, *Salomella spp* ou *Escherichia coli* (Bai *et al.*, 2021). Les biofilms sont un enjeu de santé majeur puisqu'ils seraient responsables de plus de 65 % des infections bactériennes (Assefa and Amare, 2022). Les pathogènes les plus récurrents dans la formation de biofilm dans le contexte médical sont *S. aureus*, *S. epidermidis* et *Pseudomonas aeruginosa*. Concernant *P. aeruginosa*, cette bactérie est à l'origine de production de biofilm à l'intérieur des poumons (Maurice *et al.*, 2018). Par ailleurs, ces communautés bactériennes se développent dans les canalisations du réseau hydraulique des hôpitaux (Loveday *et al.*, 2014) et le système de traitement des eaux usées de la station spatiale internationale (Zea *et al.*, 2020).

Les biofilms ne représentent pas uniquement une menace directe à la santé humaine, ils possèdent aussi un rôle crucial dans la bio-fertilisation des plantes et leurs confèrent parfois une protection contre les maladies. Ils contribuent à la dégradation de produits toxiques ou de polluants. De ce fait, leur utilisation est étudiée pour la bioremédiation des déchets industriels, le traitement des eaux usées et la dégradation des particules de plastique (Saini *et al.*, 2023).

b) Biofilms de *S. aureus* en médecine

Comme décrit précédemment, *S. aureus* est une bactérie opportuniste que l'on retrouve à la surface de la peau : le développement d'une infection est la conséquence d'un système immunitaire fragilisé associé à des tissus abimés ou des plaies ; celle-ci peut également être liée à l'installation d'un matériel médical invasif. Une grande proportion des études menées sur ce sujet se focalisent sur la formation de biofilm à la surface des cathéters, des prothèses, des pace-makers mais aussi des lentilles de contact. Les études portant sur la formation de biofilm au sein même des tissus de l'hôte, notamment à l'intérieur de l'os ou lors de la formation de caillots dans les vaisseaux sanguins, restent limitées.

Dans le cas d'endocardites, l'infection est majoritairement associée au développement de biofilms à la surface des valves cardiaques, généralement liées à l'installation de prothèses valvulaires ou de pacemaker (Lerche *et al.*, 2021). Près de 53 % des endocardites associées à des pacemakers sont attribuées à *S. aureus* (Santos *et al.*, 2011). C'est également la capacité d'élaboration de biofilms sur des tampons hygiéniques qui serait à l'origine du syndrome du choc toxique (TSS). L'expression de la toxine responsable du TSS dépend de la présence d'oxygène qui est apporté par le tampon. Sa production est activée par le système à deux composants SrrAB qui permet la régulation transcriptionnelle des gènes cibles en conditions d'hypoxie. Les systèmes à deux composants connus chez *S. aureus* seront décrits ultérieurement (§ 4.I). A noter que la toxine TSS est exprimée abondamment lorsque les bactéries sont associées en biofilm (Schlievert and Davis, 2020). Dans le cas d'ostéomyélites, les biofilms se forment au niveau des implants orthopédiques et au sein de tissus osseux nécrosés. Dans l'ensemble, la capacité à élaborer des biofilms est un des paramètres essentiels dans la pathogénicité (Masters *et al.*, 2022) et la persistance de la bactérie au sein de l'organisme hôte (Kavanagh *et al.*, 2018) lors d'une infection.

II. Les étapes de la formation d'un biofilm

La formation de biofilms rassemble une succession d'étapes (**figure 3**) dont la durée dépend et varie grandement selon les conditions environnementales. La première étape repose sur l'adhésion des bactéries à une surface inerte (verre, implant, plastique, ...) ou biologique (tissus). Les caractéristiques intrinsèques à cette surface participent à la capacité d'adhésion de la bactérie, comme les propriétés hydrophobes du support (Lee *et al.*, 2015) ou la présence de points d'encrage (fibrinogène, épithélium,...). Cette étape repose sur la production par la bactérie d'éléments d'origine variée comme des protéines de surfaces ou encore de petites molécules à charges négatives. Cet événement d'adhésion précède une phase de division cellulaire intense et d'agrégation entre cellules qui sécrètent la matrice extra-cellulaire pour englober les bactéries.

La seconde étape consiste au processus de maturation qui induit la transition entre le mode de vie planctonique et l'établissement de communautés immobiles et compactes. Cette phase est associée à l'élaboration d'une structure 3D dense et constituée de couches successives de bactéries qui s'agglomèrent. L'armature de l'édifice repose sur le renforcement de l'adhésion intra-cellulaire et l'élaboration de la matrice qui enveloppe et structure la communauté microbienne.

L'étape finale de dispersion du biofilm est fondée sur la dégradation des composants de la structure qui permet la libération des bactéries. Selon la composition de la matrice, cette étape nécessite l'intervention d'enzymes qui dégradent ces composés, influençant la texture et la densité du biofilm : protéases (protéines), DNase (ADNe), et dispersine B (PIA/PNAG). Néanmoins, l'étape de dispersion repose en grande majorité sur l'expression des PSMs qui modulent la texture de la structure, et dont les fonctions seront amplement décrites par la suite (§ 2.IV.a.3.). La dispersion est à l'origine de nouveaux foyers d'infections qui apparaissent au sein de l'hôte. Tout au long de l'élaboration du biofilm, quelques cellules peuvent se détacher de la structure dès le début du développement du biofilm. Ce phénomène nommé « l'exode » ne dépend pas du système de densité cellulaire et résulte de la sécrétion de la nucléase Nuc dont l'expression concerne une infime partie de la population du biofilm (Moormeier *et al.*, 2014).

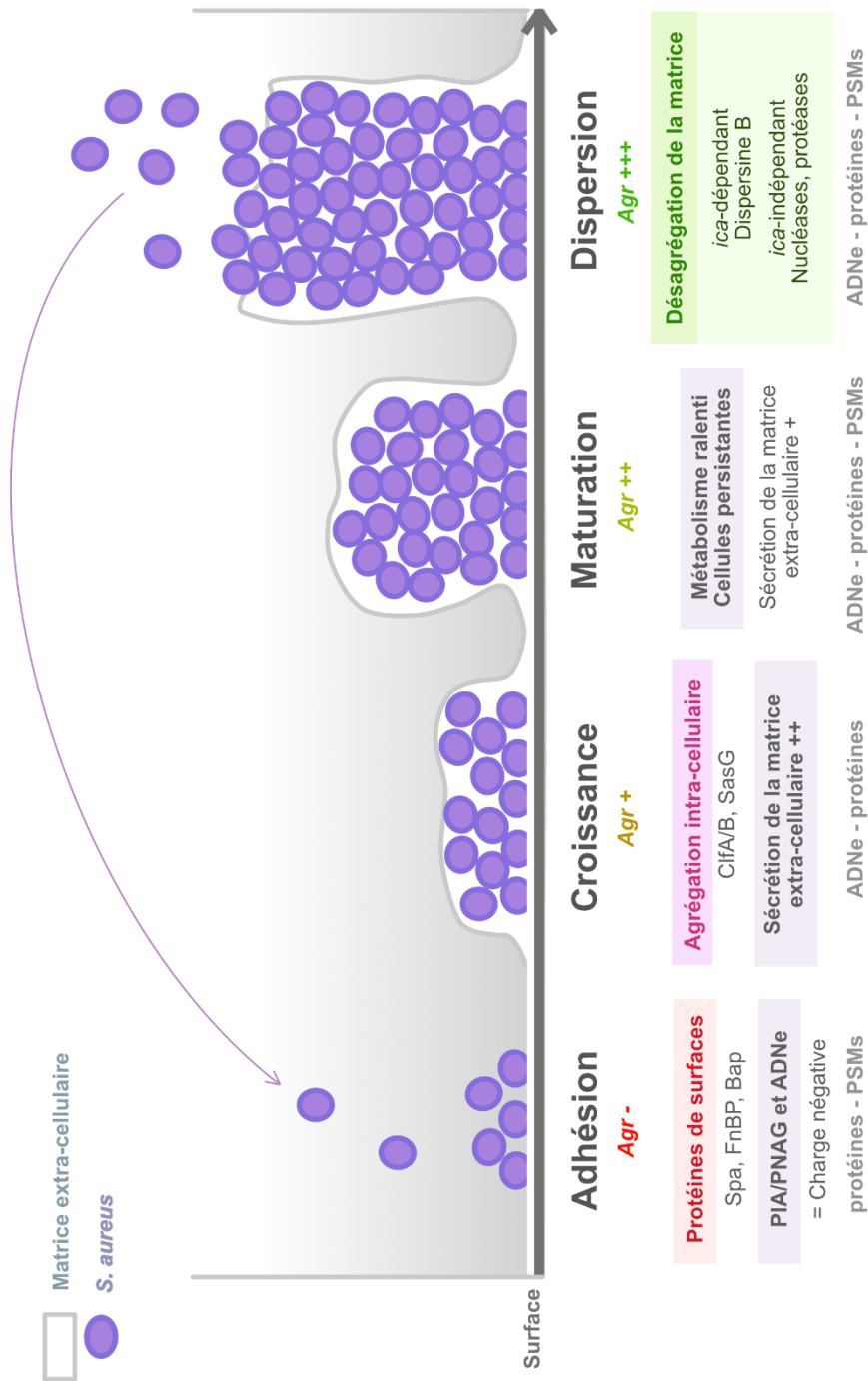


Figure 3 : Les étapes de la formation de biofilm chez *S. aureus*. La première étape d'adhésion à une surface biotique ou abiotique nécessite l'intervention de protéines de surfaces et de molécules chargées négativement (ADNe ou/et PIA/PNAG). La croissance des cellules conduit à la sécrétion et l'accumulation de la matrice extra-cellulaire dont la composition façonne la structure de l'édifice. Le biofilm mature présente des cellules au métabolisme ralenti, engluées dans une structure rigide et protectrice. Enfin, l'étape de dispersion est enclenchée par le système Agr par la sécrétion de nucléase, protéase et dispersines. Ces enzymes dégradent la matrice, libérant les bactéries qui vont fonder de nouveaux foyers d'infections à proximité ou prospérer à l'état planctonique.

III. Spécificités métaboliques au sein du biofilm

a) Accès à l'oxygène & croissance

La nature même de la structure du biofilm instaure des expositions diverses à l'environnement notamment l'accès aux nutriments et à l'oxygène (Asai *et al.*, 2015) mais également l'exposition aux antibiotiques. La pénétration de l'oxygène à travers les biofilms ne dépasse pas 22 μm de profondeur, créant des zones anaérobiques localisées (Rani *et al.*, 2007). Au regard de la notion de « communauté » bactérienne associée aux biofilms, la population bactérienne au sein de ce type de structure se caractérise par son hétérogénéité en termes de métabolisme et de physiologie. Par ailleurs, le taux de croissance de *S. aureus* est lourdement affecté : 0.06 h^{-1} au sein de biofilm contre 0.7 h^{-1} à l'état planctonique (Hodgson *et al.*, 1995). De ce fait, l'efficacité des antibiotiques contre ce type de communauté bactérienne au métabolisme ralenti est fortement réduite.

b) « Small Colony Variants »

Dans certaines conditions, *S. aureus* peut former des colonies nommées « Variants à Petite Colonie » ou « Small Colony Variants » (SCVs) caractérisées, comme leur nom l'indique, par des colonies de petite taille. Cette sous-population est associée à une croissance réduite et une baisse de la production des facteurs de virulence sécrétés liés à une dérégulation du système *agr* (Tuchscher *et al.*, 2020). En revanche, une augmentation de l'expression des protéines d'adhésion est observée, corrélée à une amplification de la formation de biofilm (Zhou *et al.*, 2022). Les SCVs sont caractérisées par la perturbation de la chaîne de transport des électrons, l'abaissement du potentiel de membrane et donc la diminution des quantités d'ATP produit (Tuchscher *et al.*, 2020). Les SCVs sont assimilées aux infections chroniques étant donné leurs capacités à persister au sein de l'hôte, à échapper au système immunitaire et à résister aux traitements antibiotiques (Tuchscher *et al.*, 2010). Le terme de « persistance » définit un organisme qui demeure viable malgré son exposition répétée aux traitements. Une bactérie peut devenir persistante après une exposition à un stress ou de manière spontanée lors de la phase exponentielle de croissance. La capacité des SCVs à être sélectionnées du fait de leur tolérance aux antibiotiques permet donc de les définir comme des cellules persistantes (Tuchscher *et al.*, 2020).

IV. Composition de la matrice

La matrice extra-cellulaire est composée de multiples éléments, sécrétés par les bactéries vivant au sein du biofilm ou issus de la lyse de celles-ci. La composition de la matrice du biofilm est particulièrement hétérogène et varie selon les souches, le contexte environnemental, le type de surface (Hiltunen *et al.*, 2019) ou la phase de développement du biofilm. Précisément, *S. aureus* est capable de produire deux types de biofilms communément classifiés comme *ica*-indépendant et *ica*-dépendant. Le premier implique des protéines et de l'ADN extracellulaire (ADNe) ; le second repose sur la sécrétion de polysaccharides. Si la matrice est prédominante dans la structure du biofilm en représentant plus de 90 % du poids sec (Flemming *et al.*, 2007), elle procure également des caractéristiques physiques essentielles : parmi elles, une structure rigide et stable, une protection contre les stress environnementaux mais aussi un support d'échanges moléculaires intenses entre les cellules.

a) Biofilm *ica*-indépendant

1. Protéines d'adhésion

Les protéines liant la fibronectine A et B (FnBPA, FnBPB) sont impliquées dans les interactions intra-cellulaires. Ces protéines appartiennent à la famille des « composants de la surface microbienne reconnaissant des molécules adhésives de la matrice » (MSCRAMMs). Comme leur nom l'indique, l'extrémité C terminale s'associe aux molécules de fibrinogène et d'élastine de l'hôte. Cette propriété serait à l'origine du succès de la colonisation de *S. aureus* au niveau du cœur (Que *et al.*, 2005) et de leur adhésion à la surface des cathéters (Vergara-Irigaray *et al.*, 2009).

La protéine de surface G (SasG) consolide l'adhésion entre les cellules voisines lors de la phase d'accumulation. Cette protéine est ancrée dans la paroi et établit des interactions avec les autres protéines SasG protubérantes des autres cellules. Ce mécanisme est activé par la présence de zinc et il se produit également avec les protéines Aap dont la structure est similaire à celle de SasG (Formosa-Dague *et al.*, 2016). Par ailleurs, Aap a été décrite comme l'équivalent de SasG chez *S. epidermidis* avec une identité dans la composition d'acides aminés de 59 % entre les deux espèces.

La protéine A Staphylococcale (codée par le gène *spa*) est la première molécule de surface identifiée chez *S. aureus*. Elle a d'abord été décrite comme un facteur de virulence essentiel dans l'évasion immunitaire en reconnaissant les immunoglobulines G (Graille *et al.*, 2000). Toutefois, cette protéine participe également à la formation de biofilm en induisant l'agrégation entre bactéries, que ce soit sous une forme ancrée à la membrane ou sécrétée dans le milieu (Merino *et al.*, 2009).

Le Clumping Factor B (ClfB) permet l'adhérence de la bactérie à l'épithélium *via* son attachement à la kératine. Cette protéine est primordiale pour la colonisation des cavités nasales par *S. aureus* (Mulcahy *et al.*, 2012) et la formation de biofilm en l'absence de calcium (Abraham and Jefferson, 2012).

La protéine associée aux biofilms (Bap) serait essentielle à l'attachement initial des cellules à une surface abiotique puis à leur cohésion intracellulaire (Lasa and Penadés, 2006). Cliniquement, on retrouve cette protéine exprimée chez certains isolats issus de mastite de ruminants (Cucarella *et al.*, 2004). Néanmoins, les cas de mastites liés à la présence de *bap* sont sporadiques (Ibrahim *et al.*, 2022) et ce gène n'est pas retrouvé parmi l'abondance des cas d'infections humaines décrit dans la littérature.

2. ADN extracellulaire

L'ADN extracellulaire (ADNe) agit directement sur la structure et l'adhésion du biofilm. La charge négative caractéristique de ce type de molécule agirait comme un polymère électrostatique qui fixerait les cellules entre elles. L'ADNe participe également à l'attachement initial des bactéries aux cellules hôtes et aux surfaces. L'ampleur des caractéristiques physiques conférées par la présence d'ADNe peut être constatée par la désagrégation des biofilms suite à un traitement à la DNase I (Mann *et al.*, 2009). La principale source d'ADNe est la lyse des cellules, qu'elle soit provoquée naturellement ou induite par la bactérie elle-même. De nombreux gènes sont impliqués dans le phénomène de lyse programmée, et sont finement régulés en cohérence avec les conséquences irrévocables de leur expression. Deux opérons majeurs interviennent dans cette régulation : *cid* et *lrg*. Les gènes *lrgA* et *cidA* encodent deux protéines membranaires dont la structure est similaire aux holines des bactériophages lambda. L'opéron *lrgAB* conduit à l'inhibition de la lyse cellulaire au contraire de *cidABC* dont l'expression induit la mort de la cellule. Cet antagonisme suggère que LrgAB serait une anti-holine dont le rôle serait de contrer la lyse induite par CidABC. En ce sens, l'inhibition de

l'expression de *lrgAB* conduit à la potentialisation de l'activité de l'holine CidA, entraînant la lyse cellulaire et la production d'ADNe. De plus, la matrice produite par le mutant $\Delta lrgAB$ contient une proportion sensiblement élevée d'ADNe (Mann *et al.*, 2009). Concernant les conséquences structurelles, l'expression constitutive de *lrgAB* conduit à la formation de larges « tours » de biofilm. À l'inverse, l'expression de *cid* conduit à la formation de plus petites « tours » associées à une absence d'ADNe (Moormeier *et al.*, 2013).

3. PSMs

Les modulines solubles dans le phénol ou *phenol soluble modulins* (PSMs) sont des petits peptides impliqués dans la virulence (Peschel and Otto, 2013). Découverts en 1999 chez *S. epidermidis* (Mehlin *et al.*, 1999), ces molécules ont ensuite été étudiées chez *S. aureus* pour leurs propriétés cytolytiques envers les neutrophiles, leur activité hémolytique et antimicrobiennes (Li *et al.*, 2014). Néanmoins leur rôle est crucial dans l'architecture et l'agrégation intra-cellulaires des cellules du biofilm, mais surtout dans l'étape de détachement (Periasamy *et al.*, 2012). En effet, les PSMs agissent comme des biosurfactants et modifient la texture du biofilm, basculant entre le renforcement de la rigidité ou de la fluidité de l'édifice.

Chez *S. aureus*, 4 types de PSMs sont sécrétés : PSM α 1-4, PSM β 1-2, PSM γ (*hld*) et PSM-*mec*. Ces molécules amphiphiles sont composées d'un domaine hydrophile et d'un domaine hydrophobique. Les PSM α et PSM β , retrouvées dans les biofilms, sont de petites protéines dont la taille est comprise entre 20 à 25 acides aminés concernant les PSM α et près de 44 acides aminés pour les PSM β (**tableau 2**). Les molécules de PSM individuelles et solubles sont composées d'hélices α . Néanmoins, ces peptides peuvent s'assembler et former des fibres amyloïdes organisées en feuillets β structurant le biofilm (Schwartz *et al.*, 2012). La capacité d'agrégation diverge pour chaque PSM, mais la cinétique de structuration des fibres est influencée par la présence et la quantité des autres PSM du biofilm (Zaman and Andreasen, 2020). D'un autre côté, l'analyse structurale par cryomicroscopie électronique (Cryo-EM) des PSM α 3 et PSM β 2 révèle l'assemblage des protofilaments produit par ces peptides sous forme de nanotubes (Kreutzberger *et al.*, 2022). Toutes ces observations structurelles mettent en évidence la complexité d'établir des liens entre les caractéristiques physiques et les conséquences physiologiques liés aux PSMs. En effet, malgré leur structure commune, PSM α 3 et PSM β 2 n'ont pas les mêmes propriétés. PSM α 3 n'a aucune action antimicrobienne mais possède la plus forte activité cytolytique des PSM α et un rôle majeur dans la dispersion des

bactéries (Tsompanidou *et al.*, 2013) alors que la production de PSM β 2 est strictement liée à la formation de biofilm.

Les souches délétées des deux opérons *psma* et *psm β* développent des biofilms denses et volumineux mais particulièrement fragiles. Néanmoins ce type de biofilm compact est moins sensible aux cellules immunitaires de l'hôte (He *et al.*, 2019). A l'opposé, l'induction de

Tableau 2 : Propriétés & fonctions des PSMs issus des opérons *psma* et *psm β*
AA : Acides aminés

		AA	Charge	Activité		Biofilms
				Anti-microbienne	Cytolitique	
PSM α	1	21	+2	+	+	Formation de fibrilles (structure) et dissémination
	2	21	+3	+	++	
	3	22	+2	-	+++	
	4	22	+2	-	++	
PSM β	1	44	-1	-	-	Maturation et dissémination
	2	44	0	-	-	

l'expression des PSM $\alpha\beta$ au sein d'un biofilm préformé induit la dissémination des bactéries (Periasamy *et al.*, 2012). Les PSM β ont une activité cytolitique réduite et leur rôle semble être focalisé sur la régulation de la structure des biofilms. Parmi tous les PSM, ce sont ceux produits en plus faibles quantités mais dont l'impact sur l'ossature du biofilm est majeur (Otto, 2013). Au contraire, chez *S. epidermidis*, les PSM β sont produits en grandes quantités et sont essentiels dans le détachement des cellules lors de la maturation du biofilm. Ces résultats se confirment *in vivo* dans le contexte de formation de biofilm à la surface de cathéter en modèle murin (Wang *et al.*, 2011).

Les PSM ne possèdent pas de peptide signal et sont sécrétés par le transporteur dédié *phenol-soluble modulin transporter* (Pmt) dont l'absence conduit à l'accumulation des PSM au niveau du cytosol puis à l'apoptose de la bactérie (Chatterjee *et al.*, 2013).

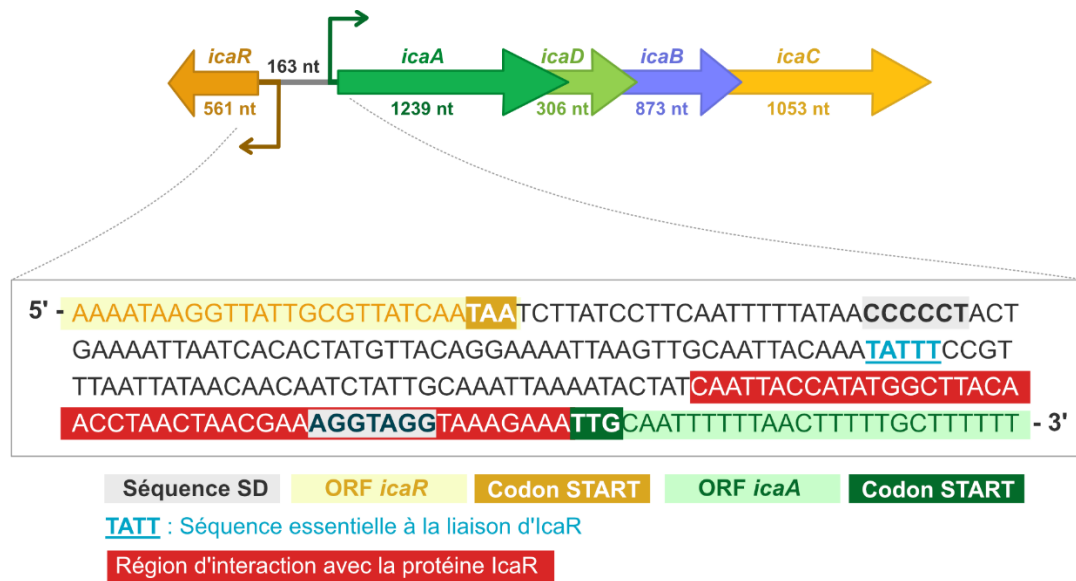


Figure 4 : Organisation du locus *icaABDC* chez *S. aureus* et représentation de la région inter-génique des gènes *icaR* et *icaA*.
SD = Séquence de Shine & Dalgarno
ORF = open reading frame

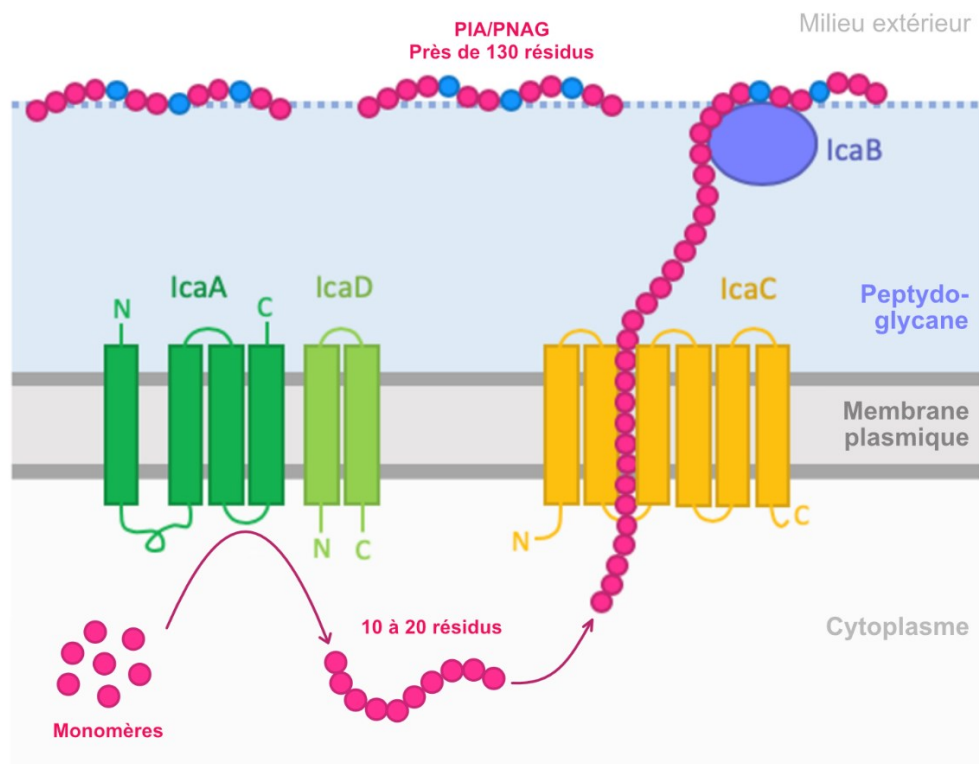


Figure 5 : Synthèse et sécrétion de PIA/PNAG. La protéine IcaA aidée de la protéine accessoire IcaD sont responsables de la polymérisation de monomères de UDP-N-acetylglucosamine. Ces chaînes sont exportées *via* la protéine membranaire IcaC. Enfin, IcaB procède à la dé-acétylation de quelques résidus, conférant une charge négative au PIA/PNAG sécrété.

b) Biofilm *ica*-dépendant

La matrice des biofilms *ica*-dépendant est composée majoritairement du polysaccharide d'adhésion intracellulaire (PIA) également connu sous le nom de β -1,6-N-acétyl-glucosamine (PNAG). Cet exo-polysaccharide s'accumule à la surface des cellules bactériennes agrégées et confère résistance et cohésion à la structure. Les chaînes de ce sucre sont chargées négativement, favorisant les interactions entre les surfaces négatives des cellules de la communauté microbienne mais également avec la surface utilisée comme support.

Les gènes responsables de la production de PIA/PNAG sont organisés au sein de l'opéron *icaADBC* (**figure 4**). Le locus *ica* (*intercellular adhesion*) a été identifié dans un premier temps chez *S. epidermidis* (Heilmann *et al.*, 1996) avant d'être décrit par homologie chez *S. aureus* (O'Gara, 2007). La protéine transmembranaire IcaA (**figure 5**) est une N-acétyl-glucosaminyltransférase dont l'activité est potentialisée par la présence d'IcaD. Cette enzyme catalyse la synthèse d'oligomères de PIA à partir d'UDP-N-acétylglucosamine. Le complexe IcaAD produit une chaîne d'oligomères n'excédant pas 20 résidus, nécessitant l'intervention d'IcaC afin d'allonger et d'exporter la chaîne en cours de production. L'enzyme IcaB est localisée au niveau de la surface externe de la cellule et possède une activité de dé-acétylisation des chaînes de PIA. C'est cette action qui introduit une charge négative au sein de certains résidus et permet au polymère de s'ancrer fermement à la surface de la bactérie. La majorité des souches de *S. aureus* possèdent les gènes du locus *ica*. Néanmoins, seuls certains isolats prélevés *in vivo* dépendent intégralement de la génération de ce composé dans l'élaboration de biofilms (Rohde *et al.*, 2007).

V. Régulateurs des biofilms

a) Composés issus de l'environnement

L'exposition de biofilm préformé à de l'alcool promeut leur formation notamment par la hausse de la transcription de *icaA* et *icaD* (Redelman *et al.*, 2012). Les bactéries au sein de la matrice sont métaboliquement actives mais le mécanisme impliqué dans cette régulation par l'alcool demeure inconnu. L'addition de NaCl dans le milieu de culture active la formation de biofilm, toutefois ce mécanisme dépend particulièrement de la souche. Ce composé augmente

l'agrégation entre les cellules et renforce la stabilité et la densité du biofilm. Le NaCl stimule la transcription de *icaA* (Lee *et al.*, 2014) via le facteur de transcription Rbf (Lim *et al.*, 2004) chez certaines souches issues de cas de contaminations alimentaires. Cependant, il ne semble pas que ce phénomène concerne la majorité des souches cliniques (Singh *et al.*, 2017). Enfin, l'ajout de glucose favorise la formation de biofilm par l'activation de la transcription de *icaA*. Un effet additif est observé lorsque le glucose et le NaCl sont associés (Vázquez-Sánchez *et al.*, 2013).

b) Régulateurs transcriptionnels

1. Locus *agr* & ARN III

Le système de *quorum-sensing* (réponse à la densité cellulaire) déployé par *S. aureus* résulte de l'expression du locus du régulateur de gènes accessoires (*agr*) (**figure 6**). Les deux promoteurs divergents de ce locus produisent l'ARN II et l'ARN III. L'ARN II encode les gènes nécessaires au quorum-sensing (AgrA-D) et l'ARN III. Succinctement, AgrD est synthétisé puis maturé en peptide auto-induit (AIP) et secrété par la protéase membranaire AgrB. Au-delà d'une certaine concentration seuil d'AIP dans le milieu extracellulaire, le système à deux composants constitué d'AgrC (le récepteur membranaire) et AgrA (le régulateur de réponse) est activé et devient l'effecteur d'une cascade complexe de régulation de gènes. L'effecteur phosphorylé AgrA active la transcription de l'opéron *agrBDCA* et se lie également au promoteur des opérons *psma* et *psm β* pour activer leur transcription. L'inhibition du locus *agr* est nécessaire pour le développement du biofilm, mais son activation déclenche l'étape finale de dispersion des bactéries (Boles and Horswill, 2008).

L'ARN III est un ARN régulateur bifonctionnel qui régule de manière temporelle de multiples gènes de virulence au niveau post-transcriptionnel et qui possède un cadre de lecture ouverte codant pour une PSM, l'hémolysine δ . Il active directement la production de toxines telles que Hla ou indirectement par l'inhibition de la traduction du répresseur Rot (Bronesky *et al.*, 2016). D'un autre côté, cet ARN inhibe l'expression de protéines de surface comme la protéine A. En conséquence, l'inactivation du système *agr* conduit à la sur-expression de la protéine A et à la formation de biofilm (Merino *et al.*, 2009).

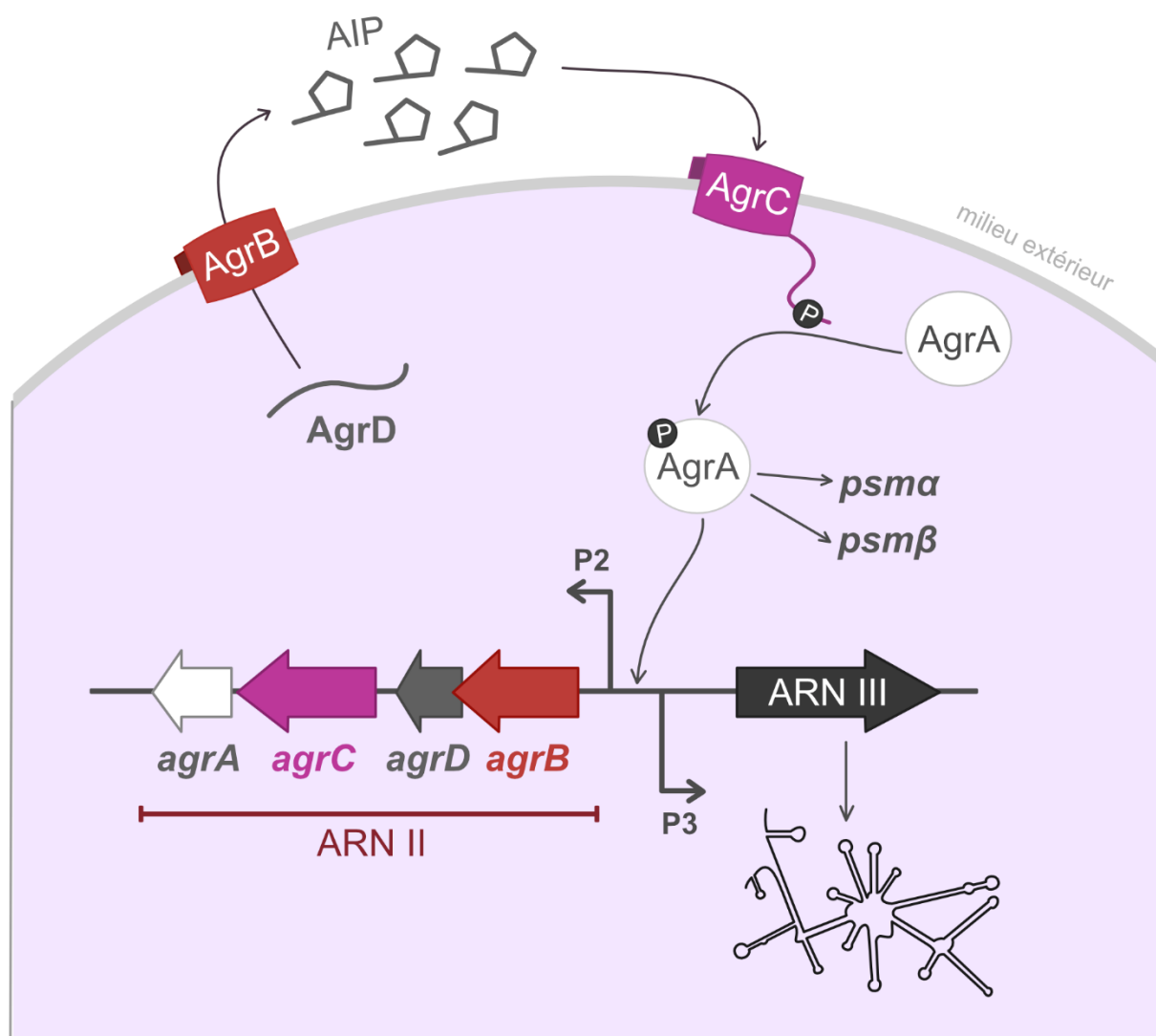


Figure 6 : Le système de *quorum-sensing* Agr chez *S. aureus*. Le peptide précurseur **AgrD** est excrété par la protéine transmembranaire **AgrB** dont l'activité de protéase permet la production de **AIP**. La protéine trans-membranaire **AgrC** est une histidine kinase activée suite à la liaison de AIP, **AgrC** permet donc de phosphoryler le modulateur de réponse **AgrA** qui va activer la transcription de l'**ARN II** et l'**ARN III** via la fixation de la protéine au niveau des promoteurs P2 et P3. La phosphorylation de **AgrA** induit également l'activation de la transcription des opérons *psmA* et *psmβ*.

2. IcaR

Le répresseur majeur de l'opéron *ica* est transcrit de manière divergente : près de 163 pb séparent le codon stop d'*icaR* du codon start d'*icaA* (**figure 4**). Cette protéine de 22 kDa appartient à la famille des Répresseurs de la Tétracycline (TetR) (Jeng *et al.*, 2008). Ces homodimères présentent un domaine N-terminal qui se lie à l'ADN et d'un domaine C-terminal nécessaire à la dimérisation. La région de fixation d'IcaR se situe directement en amont du gène *icaA* et couvre près de 42 pb de la région promotrice de l'opéron (Jefferson *et al.*, 2003). Cette interaction empêcherait la liaison du facteur σ^B de l'ARN polymérase et ainsi inhiberait la transcription de l'opéron. La délétion du gène *icaR* amplifie la transcription de l'opéron *ica* d'un facteur 100 et la production de PIA-PNAG d'un facteur 10 (Jefferson *et al.*, 2004).

La structure même de l'ARNm *icaR* ajoute un niveau de complexité dans la régulation de l'expression du répresseur (**figure 7**). En effet le transcrit comporte une extrémité 3'UTR particulièrement longue de près de 390 nt et conservée parmi les différentes souches de *S. aureus* (Mozos *et al.*, 2013). Cette région 3'UTR n'est cependant pas conservée parmi les Staphylococcaceae dont *S. epidermidis* (Conlon *et al.*, 2002). Cette observation surprenante suggère que les régions 3'UTR pourraient contribuer à l'évolution rapide des espèces et à leur diversification, notamment au niveau de la régulation de la formation des biofilms. Chez *S. aureus*, on retrouve au sein de la région 3'UTR d'*icaR* un motif UCCCC partiellement complémentaire à la séquence SD retrouvée en 5'UTR de ce même ARN messenger. L'interaction 5'UTR/3'UTR masque la séquence SD et empêche le recrutement du ribosome lors de l'initiation de la traduction. Dans un second temps, cette interaction est ciblée par la RNase III, une endonucléase clivant spécifiquement les ARN en double brin (§ 3.II.c.2) dont le recrutement entraîne la dégradation de l'ARNm *icaR* (Mozos *et al.*, 2013). Ainsi la séquence des deux extrémités non traduites de l'ARNm *icaR* sont à l'origine de l'inhibition de l'expression de la protéine IcaR. A noter que le motif UCCCC de la région 3'UTR est conservé chez *S. argenteus* et *S. simiae* (Menendez-Gil *et al.*, 2020).

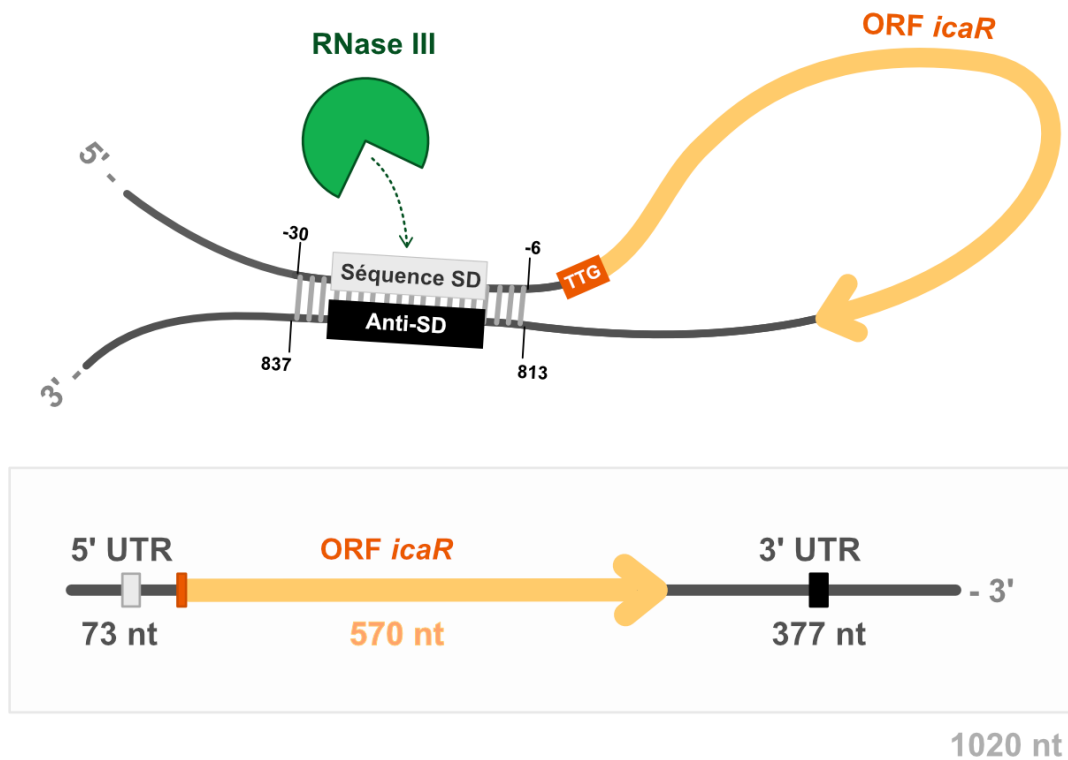


Figure 7 : Organisation et modèle de la régulation post-transcriptionnelle de l'ARNm *icaR*. L'interaction SD/anti-SD entraîne le recrutement de la **RNase III** et la dégradation de l'ARNm. Adapté depuis Ruiz de los Mozos *et al.* (2013).

SD = Séquence Shine & Dalgarno

ORF = *open reading frame*

TTG = Codon START

3. Facteur Sigma B

Le facteur sigma alternatif σ^B est impliqué dans la réponse aux stress et la régulation de facteurs de virulence comme l'ARN III. Il est requis pour la formation de biofilm *ica*-indépendant en induisant la production de protéines de surfaces comme SasG ou FnBPs et en inhibant l'expression de protéases (Martí *et al.*, 2010). Néanmoins ce facteur jouerait également un rôle dans la production de PIA/PNAG. Le mutant délété de σ^B montre une accumulation du polysaccharide et de la protéine IcaC (Valle *et al.*, 2019), indiquant un rôle d'inhibition de l'opéron *ica* par le facteur alternatif.

4. SarA

Le régulateur transcriptionnel SarA est la première protéine caractérisée parmi la « famille de protéines SarA » comprenant dix protéines dont la séquence en acide aminé est proche. On retrouve également SarX et MgrA au sein de cette famille. La protéine SarA régule sous forme de dimère l'expression de nombreux ARNm : elle active la transcription de *fnbP*, *bap*, *ica* et réprime *spa* et certaines protéases (Oriol *et al.*, 2021). Ainsi, SarA active la formation de biofilm *ica*-dépendant et réprime sa dispersion.

5. SarX

La protéine SarX possède un site de liaison localisé dans la région promotrice d'*icaA*. L'interaction SarX/*icaA* interfère avec la régulation exercée par IcaR. A hautes concentrations, SarX se lie à la région intergénique qui comporte également la région promotrice d'*icaR* (Cue *et al.*, 2013). Le mécanisme précis impliqué dans cette régulation demeure inconnu. En définitive, cette protéine activerait la formation de biofilm *via* l'activation de la production de PIA/PNAG (Hao *et al.*, 2021).

6. Rbf

Le régulateur transcriptionnel Rbf active la transcription de *icaA* et par conséquent la production de PIA/PNAG. Cette activation est indirecte et est induite par l'activation de la transcription de *sarX* par Rbf (Cue *et al.*, 2013). D'un autre côté, Rbf diminue l'expression de l'opéron *psmA* (Fang *et al.*, 2020).

7. SrrAB

SrrAB est un système à deux composants (*two-component system*, TCS ; § 4.I) qui est impliqué dans la régulation de l'expression de RsaE (§ 4.II.b.3). Ce TCS est activé en condition d'hypoxie ou de stress oxydatif associés à un contexte infectieux (Kinkel *et al.*, 2013). La protéine phosphorylée SarA se lie à la région promotrice de l'opéron *icaADBC* et active sa transcription (Ulrich *et al.*, 2007).

8. MgrA

MgrA est un régulateur transcriptionnel majeur essentiel à la régulation de l'activité autolytique, la résistance aux antibiotiques, l'expression de facteurs de virulence et de la formation de la capsule. Cette protéine inhibe la formation de biofilm en réprimant l'expression des protéines de surface et des protéases extracellulaires chez *S. aureus* (Crosby *et al.*, 2016). D'un autre côté, MgrA inhibe la libération d'ADNe en activant la transcription de *lrgAB*, le système anti-holine impliqué dans la mort cellulaire. De plus, ce régulateur réprime la transcription de l'opéron *psmA* et *psm β* : MgrA limite la production des PSMs, donc la structuration des biofilms lors de la phase d'attachement et la dissémination des biofilms lors de la maturation (Jiang *et al.*, 2018). Finalement, MgrA agit sur de nombreux acteurs de la formation de biofilm indépendant de *ica* : ADNe, protéines de surfaces et peptides bio-surfactants. L'expression de MgrA est réprimée par le sARN RsaA (Romilly *et al.*, 2014a) et activée par l'ARN III (Gupta *et al.*, 2015).

VI. Les biofilms dans le contexte d'infections cliniques

a) Quel type de biofilm pour quel type d'infection ?

La présence du locus *ica* est décrite dans la majorité des souches cliniques de *S. aureus* (Silva *et al.*, 2021), mais la présence de l'opéron n'implique pas forcément que les biofilms produits sont composés de PIA/PNAG. La plupart des études sont restreintes à la prévalence des gènes associés aux biofilms et non au type de biofilm finalement produit par ces souches, ne prenant pas en compte les niveaux de régulation au niveau de la transcription et de la traduction.

Les premiers cas cliniques associés à la formation de biofilm *ica*-indépendant sont reportés chez les animaux dans le contexte de mastites bovines (Cucarella *et al.*, 2004). Néanmoins, certains cas plus récents dévoilent que la production de PIA/PNAG est également associée à ce type d'infection (Schoenborn and Kroemker, 2016). Par la suite, chez l'Homme, l'étude d'isolats issus de prothèses articulaires infectées par *S. aureus* révèle que les deux types de biofilms sont établis conjointement (Rohde *et al.*, 2007).

b) Lien entre biofilm et résistances aux antibiotiques

De nombreuses études ont entrepris de lier la quantité et/ou le type de biofilm aux pathologies et aux origines anatomiques de l'isolat clinique étudié. Une majorité écrasante de ces études se concentrent, à raison, sur les souches les plus mortelles de *S. aureus* c'est-à-dire les MRSA. Par exemple, les souches MRSA isolées de pieds de patients diabétiques produisent plus de biofilms que celles issues d'ostéomyélites (Silva *et al.*, 2021). De la même manière, les MRSA isolées d'échantillons sanguins forment moins de biofilms que ceux provenant de la peau (Piechota *et al.*, 2018). L'étude des souches à l'origine d'infections nosocomiales révèle que les isolats MRSA ne secrètent pas de PIA/PNAG malgré la transcription du locus *ica*, mais produisent des biofilms liés aux adhésines. A l'inverse, les isolats MSSA forment des biofilms composés de PIA/PNAG (O'Neill *et al.*, 2007). Les souches de *S. aureus* MSSA seraient donc associées à une formation de biofilm *ica*-dépendant, tandis que les souches MRSA forment des biofilms d'origine protéique et contenant de l'ADNe (McCarthy *et al.*, 2015). Le lien entre la présence des gènes de résistances à la méticilline et l'expression du locus *ica* a été adressé mais demeure obscure (Pozzi *et al.*, 2012). Concernant les souches VRSA, le traitement des biofilms à la vancomycine promeut leur formation (Hsu *et al.*, 2011). De surcroît, la production de biofilm sous traitement à la vancomycine est favorisée par l'exposition au glucose *in vitro* et dans le modèle d'infections à la surface de cathéters au sein de souris diabétiques (Hsu *et al.*, 2015).

La structure même du biofilm limite l'efficacité des traitements antibiotiques. Cela est en partie due à une diffusion des molécules peu efficace à travers la matrice (Singh *et al.*, 2010), et par la présence de cellules dites persistantes dans les biofilms. L'augmentation de la concentration du traitement antibiotique est limitée et ne suffit pas à éradiquer complètement les biofilms formés. C'est pourquoi les traitements classiques échouent lors de ce type d'infection, orientant la stratégie thérapeutique vers une combinaison de molécules (Barber *et al.*, 2015).

Partie 3 - Les ARN régulateurs

La classe prédominante des ARN régulateurs (sARN) régulent l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel, en interagissant directement avec leurs ARN cibles. La production des sARN réponds à une grande diversité de signaux environnementaux et leurs actions contribuent à apporter une réponse adaptative rapide de la bactérie. La vaste majorité des sARN sont non codants, mais on découvre progressivement une multitude de sARN bifonctionnels qui sont également à l'origine de la production de protéines. L'exemple le plus célèbre chez *S. aureus* est l'ARN III qui code pour l'hémolysine δ et dont les fonctions régulatrices en tant que sARN sont amplement documentées et seront décrites succinctement dans la suite de ce manuscrit.

I. Historique

a) Début de la notion d'ARN régulateur

Après la description de la double hélice d'ADN (Watson and Crick, 1953), puis du dogme central liant ADN, ARN et protéines (Crick, 1958), l'ARN était considéré uniquement comme un intermédiaire entre le support de l'information génétique et la production de protéines. Lors de la caractérisation de l'opéron *lac*, il a été suggéré que le répresseur soit constitué d'ARN (Jacob and Monod, 1961). Même si cette hypothèse s'est avérée fausse par la suite, se fut la première fois que l'idée émergeait qu'un ARN puisse avoir des fonctions régulatrices.

Néanmoins de nombreux sARN ont été « découverts » sans être identifiés comme tels entre 1960 et 1980, notamment l'ARN 6S et Spot 42 d'*E. coli* dont les fonctions régulatrices n'ont été décrites que durant les années 2000. Le premier s'associe à l'ARN polymérase et module l'activité du facteur σ^{70} (Wassarman and Storz, 2000), alors que le second se lie à divers ARNm et régule l'expression de plus de 40 opérons impliqués dans le métabolisme des sources carbonées (Beisel and Storz, 2011).

En 1981, à 7 mois d'intervalle, deux équipes mettent en évidence qu'un ARN instable et non traduit (Stougaard *et al.*, 1981) inhibe la production de précurseurs ARN issus du clivage

de l'ARN II par la RNase H (Tomizawa *et al.*, 1981). L'interaction par complémentarité de séquence entre le sARN et l'ARN II est suffisante pour inhiber la réplication du plasmide R1. Le modèle de formation de duplexe sens/anti-sens est nommé « kissing interaction », qui repose sur la reconnaissance des boucles complémentaires des deux partenaires sARN/ARNII (Tomizawa, 1984). Toujours chez *E. coli*, on retrouve en 1984 la première description d'un sARN qui contrôle l'expression d'un gène. Il s'agit de *micF* qui est transcrit depuis le brin opposé à l'ARNm de la porine membranaire OmpF. Par conséquent cet ARN anti-sens s'hybride à l'ARNm *ompF* par complémentarité parfaite de séquence et inhibe l'initiation de sa traduction (Mizuno *et al.*, 1984).

b) Identification des sARN eucaryotes & perspectives

Concernant les eucaryotes, il a fallu attendre les années 1990 et la découverte de petits ARN de près de 20 nucléotides impliqués dans la régulation du développement de *Caenorhabditis elegans* (Lee *et al.*, 1993). Cette étude met en lumière une complémentarité de séquence entre la région 3'UTR de certains ARNm et les sARN, qui seront par la suite identifiés comme des microRNAs (miRNAs). Par la suite, le concept d'interférence médié par l'ARN (ARNi), c'est-à-dire l'inhibition de l'expression de gènes suite à la formation d'un duplexe ARNm/sARN, a été formulé (Waterhouse *et al.*, 1998). A noter que ces expériences décrivent un ARN double brin exogène d'origine virale, qui va être clivé au sein de la plante hôte en fragments de taille similaire aux miARN, appelés siARN. Ce sont ces fragments qui vont moduler l'expression des gènes de l'hôte. Que ce mécanisme existe dans le contexte de la relation hôte/pathogène a fait germer l'idée qu'il existerait un système endogène similaire développé chez les eucaryotes. Effectivement, il a fallu attendre quelques années avant l'identification des multiples acteurs impliqués dans l'interférence à l'ARN médié par les miARN/siARN, comme les protéines Dicer et Drosha (Lee *et al.*, 2003). La grande variété des différentes classes de petits ARN régulateurs décrits jusqu'à aujourd'hui sont exposés dans le **tableau 3**.

Depuis ces événements, il est apparu évident que les ARN sont des régulateurs majeurs de l'expression des gènes dans tous les domaines du vivant, et qu'ils sont au cœur de mécanismes de régulation complexes. Les progrès technologiques associés à l'étude des ARN non codants ont permis d'identifier des marqueurs de maladies liés à l'expression de miARN spécifiques dans la maladie d'Alzheimer, les myopathies ou encore le cancer du sein (Bhatti *et*

al., 2021). Les ARN sont devenus des outils thérapeutiques de choix notamment le célèbre système CRISPR-Cas9 développé pour l'édition dirigée de génome. Succinctement, un ARN guide (ou *CRISPR RNA* ; crRNA) reconnaît par complémentarité de séquence une cible ADN ou ARN et induit son clivage par la nucléase Cas9. Ce système immunitaire adaptatif et d'origine procaryote est décrit pour la première fois chez *E. coli* (Ishino *et al.*, 1987) et sa fonction a été démontrée expérimentalement chez *Streptococcus thermophilus* (Barrangou *et al.*, 2007). Depuis le système et ses applications ont été largement étudiés et ont fait l'objet des prix Nobel de chimie en 2020 attribués à Emmanuelle Charpentier et Jennifer Doudna (2014).

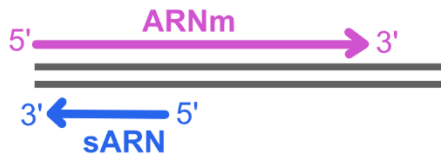
Tableau 3 : Caractéristiques des différentes classes d'ARN décrites chez les procaryotes et chez les eucaryotes.

	Nom	Taille	Organisme	
<i>small non-coding</i>	sARN ou ncARN	≤ 200 nt	Tous	ARN non codant, majoritairement moins de 200 nt
<i>long non-coding</i>	lncARN	> 200 nt		Grand ARN non codant
<i>anti-sens</i>	asARN			Transcrit en <i>trans</i> , parfaitement complémentaire à leur cible
<i>ARN régulateur</i>	sARN		Procaryotes	Cibles les ARN phagiques
<i>micro interfering</i>	miARN	~22 nt	Eucaryotes	Processé par Drosha et Dicer puis mûré
<i>small interfering</i>	siARN	~21 nt		Produit à partir d'ARN double brin
<i>piwi interacting</i>	piARN	24-30 nt		Se lie à la famille PIWI des protéines Argonaute
<i>circular</i>	circARN			ARN circulaire avec des fonctions régulatrices

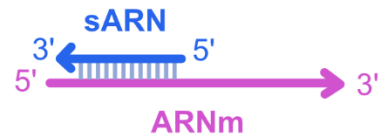
II. Mécanismes d'actions des sARN

Les stratégies de régulation déployées par les sARN bactériens sont multiples et particulièrement variées. Les sARN agissant en *cis* sont issus des régions non traduites de l'ARNm cible et répondent à divers stimuli : cette catégorie comporte les riboswitch, thermosenseurs et les T-box. A l'inverse, les sARN agissant en *trans* sont codés à partir de gènes spécifiques à distance des ARNm cibles. Cette spécificité implique que la complémentarité de séquence entre les deux ARN est partielle, qu'un seul sARN peut réguler plusieurs cibles et qu'une cible peut être régulée par plusieurs sARN. Ils peuvent également être codés à partir du brin opposé de l'ARNm qu'il régule, et dans ce cas le sARN sera parfaitement complémentaire à sa cible : ce sont les ARN anti-sens (asARN).

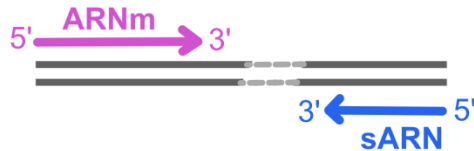
ARN régulateurs



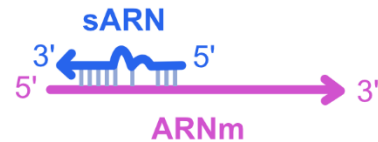
ARN anti-sens



Complémentarité de séquence parfaite



Transcrit en *trans*



Complémentarité de séquence partielle

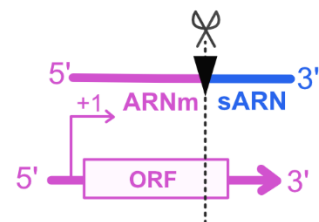
Production du sARN



Promoteur spécifique

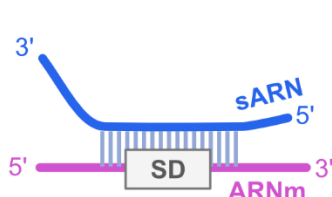


Promoteur interne

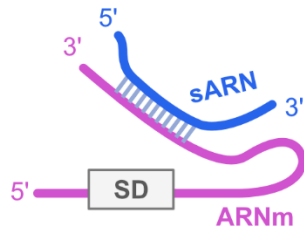


Maturation

Traduction de l'ARNm



Inhibition de la traduction

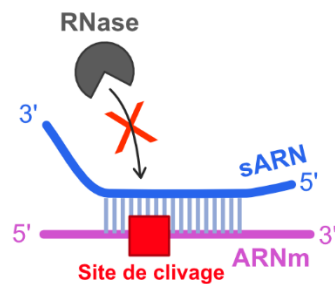


Activation de la traduction

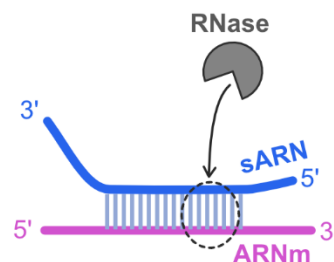


Interaction 5'UTR/3'UTR

Stabilité de l'ARNm



Stabilisation de l'ARNm



Dégradation de l'ARNm

Riboswitchs

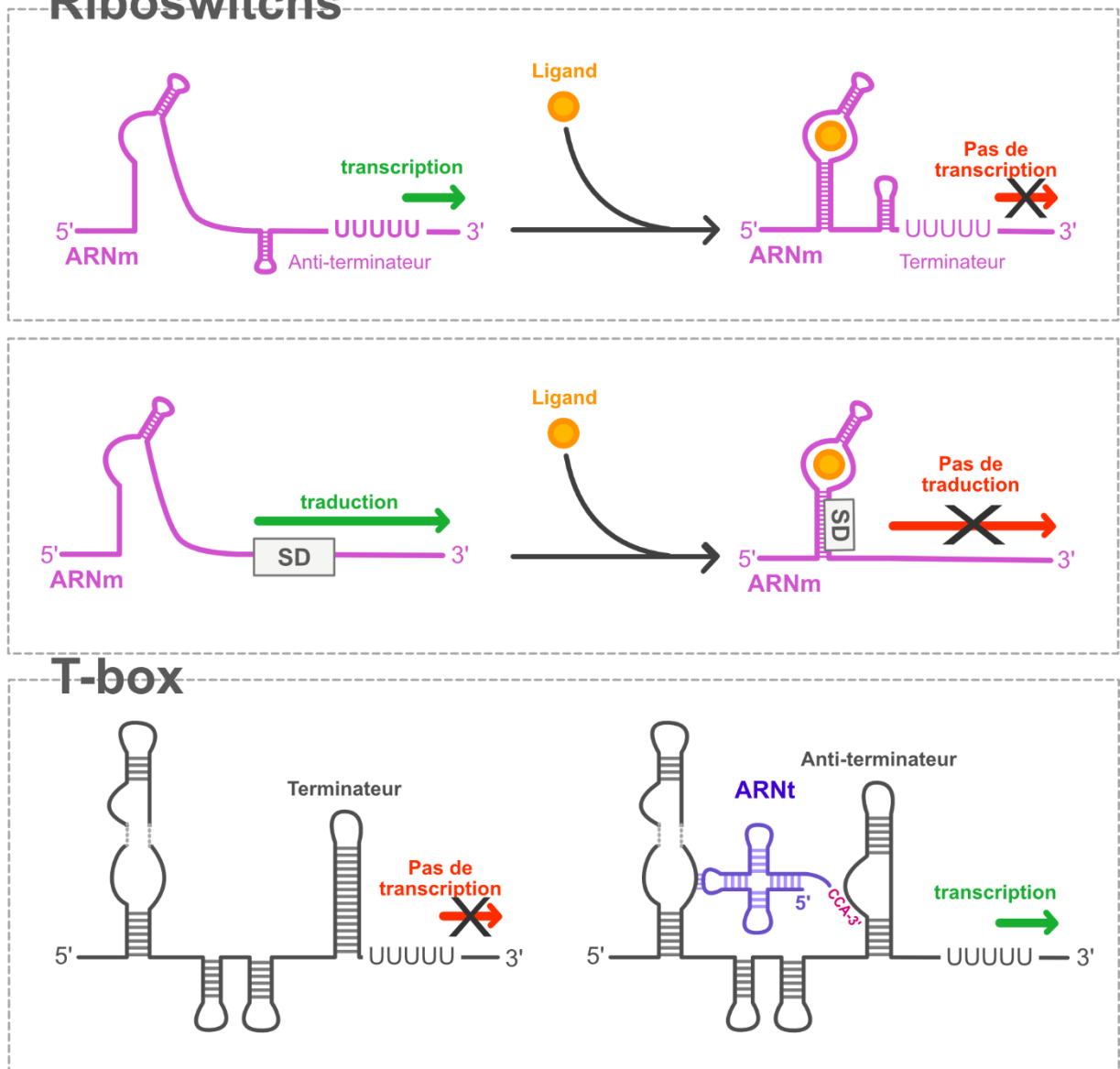


Figure 8 : Mécanisme d'action des ARN régulateurs

Les sARN sont transcrit en *cis* ou en *trans* de leurs ARNm cibles. Les régions 3'UTR peuvent subir une maturation par une RNase ou présenter un second promoteur. Les régions 3'UTR des ARNm peuvent elles-mêmes être à l'origine d'une régulation par la présence d'une séquence anti-SD qui se lie à la séquence SD. Les régions 5'UTR des ARNm peuvent être la cible de ces sARN dont l'interaction peut masquer ou libérer un site essentiel à la traduction (séquence SD), séquence reconnue par d'autres régulateurs,...). Les ARNm qui forment un duplexe avec les sARN sont la cible de RNases conduisant à leur dégradation ou, à l'inverse, sont protégés de l'action des RNases par séquestration d'un site de clivage. Concernant les riboswitchs, la fixation du ligand entraîne la formation de boucle terminatrice ou, à l'opposé, conduit à l'apparition d'une boucle anti-terminatrice impactant la transcription de l'ARNm. De la même manière, la liaison du ligand entraîne la séquestration ou la libération de la séquence SD, régulant la traduction du transcrit. Enfin, les motifs consensus des T-box permettent la liaison d'ARNt méthionylés conduisant à la formation d'une boucle anti-terminatrice de la transcription.

SD = Séquence de Shine & Dalgarno

ORF = *open reading frame*

a) ARN régulateurs agissant en *cis*

Le sARN agissant en *cis* impliquent la liaison des métabolites ou de petites molécules diverses avec l'ARN, entraînant des changements conformationnels majeurs au sein du transcrit. La modification de la structure secondaire entraîne de nombreuses conséquences sur l'expression de l'ARNm : apparition de tiges-boucles terminatrices ou anti-terminatrices, séquestration ou encore libération de motifs essentiels comme la séquence SD (**figure 8**). Les T-box sont des motifs qui répondent à des ARNt non aminoacylés. Ces éléments se retrouvent dans les régions non traduites de certains ARNm codant pour des aminoacyl-ARNt synthétases et des enzymes impliquées dans le métabolisme des acides aminés. Concernant les riboswitchs, ce sont des ARN non codants localisés au niveau des régions 5'UTR de certains ARNm qui codent pour des enzymes souvent impliquées dans la production du métabolite reconnaissant le riboswitch. Les riboswitchs sont composés d'une région aptamère qui fixe le métabolite et d'une plateforme d'expression dont la structure va dépendre de la fixation d'un ligand au niveau de l'aptamère situé en amont des gènes régulés.

Chez *S. aureus*, on dénombre plus de 7 opérons et 33 gènes sous le contrôle de riboswitch (Felden *et al.*, 2011). Un exemple captivant est le riboswitch répondant à la guanine. Ce dernier contrôle l'expression d'un opéron de quatre gènes dont *guaA*, une GMP synthétase essentielle à la survie de la bactérie dans le contexte d'infection (Mulhbachter *et al.*, 2010). La liaison de la guanine conduit à la formation d'un terminateur prématuré en aval du codon START, achevant prématurément la transcription. Des ligands analogues ont été mis au point pour cibler et inhiber de manière constitutive l'action de ce riboswitch, conduisant à une forte inhibition de la croissance cellulaire. Cette drogue a été utilisée dans le modèle de mastite bovine et a montré une diminution significative de l'infection à *S. aureus* (Ster *et al.*, 2013).

Concernant les T-box chez *S. aureus*, l'expression des gènes responsables de la synthèse de la méthionine est régulée par cette classe d'ARN. La région 5'UTR de l'opéron *met* comporte une T-box qui interagit spécifiquement avec les ARNt^{Met} non aminacylés à deux endroits clés : la séquence anticodon de l'ARNt se fixe spécifiquement à une séquence mimant le codon Met, alors que l'extrémité 3' CCA se fixe sur la région complémentaire présente dans la région anti-terminatrice de la T-box (**figure 8**). Lors d'une carence en méthionine, cette deuxième interaction stabilise la formation d'une tige-boucle anti-terminatrice (ON) de la transcription, induisant la transcription de l'opéron. A l'inverse, la présence de méthionine à l'extrémité 3'CCA de l'ARNt empêche l'interaction avec la T-box : la tige-boucle terminatrice de la

transcription est alors formée induisant une terminaison prématurée de la transcription de l'opéron *met* (OFF). La structure de cette T-box lorsque la boucle terminatrice est formée (OFF) serait la cible de la RNase III qui initierait la dégradation de l'ARNm suivi de l'attaque par la RNase J (Wencker *et al.*, 2021). Comme il a été mentionné pour les riboswitchs, les T-box reconnaissent un ARNt spécifique et régule des gènes liés à ce régulateur : ici les ARNt^{Met} se lient à une T-box qui régule l'expression de gènes responsable de la synthèse de la méthionine. Une étude décrit également la présence d'une T-box en amont du gène *glyS* codant pour la glycyl-ARNt synthétase. Dans ce cas, les anticodons GCC ou UCC des ARNt^{Gly} se lie à la T-box et entraîne la formation d'une boucle anti-terminaison de la transcription (Apostolidi *et al.*, 2015).

Le changement de structure de certains ARN messagers est sous la dépendance des changements de température, appelé thermo-senseur. Ce processus est retrouvé dans les mécanismes de régulation de l'expression de protéines associées à la résistance au froid ou au chaud chez *E. coli* (Giuliodori *et al.*, 2010). Les thermo-senseurs sont également responsables de la régulation de l'expression des facteurs de virulence chez *Yersinia pestis* (Quinn *et al.*, 2019) et *Listeria monocytogenes* (Johansson *et al.*, 2002). Chez *S. aureus*, le premier thermosenseur identifié est localisé au niveau de la région 5'UTR du gène *cidA*, responsable de la libération d'ADNe lors de la formation de biofilm (Hussein *et al.*, 2019). Ce thermo-senseur favoriserait l'expression du gène à basses températures, à hauteur de 30 °C, comme c'est le cas lorsque la bactérie colonise le nez. Néanmoins, le mécanisme moléculaire expliquant l'effet de la température à l'origine de cette régulation reste à déterminer.

b) ARN régulateurs agissant en *trans*

Concernant les sARN agissant en *trans*, la régulation de l'expression des gènes repose en grande majorité sur la liaison directe du sARN sur l'ARNm cible. Cette interaction peut entraîner la séquestration ou la libération de motifs essentiels comme le site de reconnaissance du ribosome (RBS) conduisant à la modulation de la traduction (**figure 8**). Par exemple, l'interaction du sARN SprD avec l'ARNm *sbi* codant pour la protéine liant les immunoglobulines entraîne la séquestration du RBS (Chabelskaya *et al.*, 2010). Chez *Salmonella*, le sARN GcvB réprime la traduction de l'ARNm *gltI* en se liant et en séquestrant des séquences riches en C/A (Yang *et al.*, 2014). Ces motifs C/A situées en amont du RBS sont des activateurs traductionnels mais dont le mécanisme reste inconnu. La formation du duplexe

peut stabiliser l'ARNm en masquant un site de clivage, ou, à l'inverse, favoriser la dégradation de l'ARNm en recrutant des RNases. D'autres mécanismes originaux ont été décrits, comme les ARN éponges qui vont limiter l'action d'autres ARN régulateurs en formant des duplexes avec ces derniers, ou encore en séquestrant des protéines régulatrices et diminuant leur disponibilité. La caractérisation du sARN SprY est un exemple récent de ce type de mécanisme chez *S. aureus*. En effet, SprY forme un duplexe avec l'ARN III et limite ses capacités régulatrices. Cette interaction conduit à une diminution de l'activité hémolytique et de la virulence de la bactérie dans le contexte d'une infection systémique (Le Huyen *et al.*, 2021).

c) Protéines liant l'ARN

Un autre acteur impliqué dans les mécanismes de régulations liés aux sARN sont les protéines chaperonnes à ARN ou les RNases. Ces protéines permettent d'ajuster le repliement de l'ARN ou encore de favoriser les liaisons intramoléculaires survenant entre les acides nucléiques complémentaires. Ces protéines interviennent donc sur la structure même de l'ARN mais également dans la stimulation de la formation de duplexe sARN/ARN.

1. Chaperonne à ARN

L'une des protéines chaperonnes les plus étudiées chez les bactéries est Hfq. Découverte chez *E. coli*, cet homohexamère abondant est nécessaire à une vaste majorité des interactions sARN/ARN chez les entérobactéries (Santiago-Frangos and Woodson, 2018). L'action de Hfq repose sur la stabilisation des ARN, la favorisation et l'agencement des interactions (dos Santos *et al.*, 2019). Même si Hfq est exprimé dans certaines souches de *S. aureus*, son rôle dans la régulation médiée par les ARN régulateurs est loin d'être limpide (Bohn *et al.*, 2007; Huntzinger *et al.*, 2005). Une autre protéine chaperonne majeure nommée ProQ a été décrite chez les entérobactéries (Attaiech *et al.*, 2017; Holmqvist *et al.*, 2020). Les deux protéines Hfq et ProQ sont donc des cibles idéales pour caractériser les interactomes sARN/ARN chez les bactéries (Melamed *et al.*, 2020) mais ces deux protéines sont soit non essentielle (Hfq), soit absente (ProQ) chez *S. aureus*. Par conséquent, les méthodes d'identification des réseaux de régulation médiés par les sARN ne peuvent pas se reposer sur une protéine chaperonne dans la formation de duplexes ARN. Il devient donc important d'utiliser des méthodes globales pour caractériser les protéines fixant l'ARN chez *S. aureus* et qui pourraient agir dans la régulation par les ARN (Chu *et al.*, 2022).

2. RNases chez *S. aureus*

Les principales RNases de *S. aureus* sont présentées dans le **tableau 4**. Parmi les RNases les plus étudiées (Durand *et al.*, 2015b), on retrouve l'endoribonucléase III (RNase III) essentielle à la maturation et la dégradation des ARN en double brin dont l'activité dépend de la présence de Mg^{2+} (Chevalier *et al.*, 2008). La délétion du gène *rnc* entraîne une diminution de la sécrétion de protéines extra-cellulaires et de la virulence (Liu *et al.*, 2011). La RNase III joue un rôle majeur dans la régulation de la transcription pervasive (Lasa *et al.*, 2011), dans la maturation des ARNr, des ARNt et des ARNm (Lioliou *et al.*, 2012). Les duplexes généralement reconnus par la RNase III impliquent au moins 22 nt. Certains duplexes sont générés par un empilement co-axial formé par des interactions boucle-boucle ou encore « *kissing complex* » issu de la reconnaissance de deux tiges-boucles (Chevalier *et al.*, 2010). Du fait qu'il n'existe pas encore de protéine chaperonne chez *S. aureus*, les RNases ont été utilisées pour identifier les complexes ARN/ARN ciblés par ces protéines. C'est le cas des expériences de CLASH de McKellar *et al.* (2022) présentées au **chapitre 2** qui se focalisent sur les interactions ARN/ARN reconnues par la RNase III.

Tableau 4 : Rôle des ribonucléases identifiées chez *S. aureus*

Ribonucléase	gène	Fonction
RNase III	<i>rnc</i>	Dégradation des complexes sARN/ARNm, maturation des ARNr précurseurs
RNase Y	<i>rny</i>	Endonucléase, maturation des ARNs
RNase J1/J2	<i>rnjA/B</i>	5'-3' exonucléase
RNase P	<i>rnpA</i>	Maturation en 5' des ARNt précurseurs
RNase Z	<i>Rnz</i>	Maturation en 3' des ARNt précurseurs
PNPase	<i>pnpA</i>	3'-5' exonucléase, phosphorolyse
RNase R	<i>Rnr</i>	3'-5' exonucléase, maturation en 3' des ARNt précurseurs

III. Identification des cibles ARN

L'évolution rapide des connaissances sur les sARN est également associée au développement des techniques de caractérisation des sARN et surtout de l'identification des partenaires ARN. Les outils bio-informatiques de prédictions d'interactions *in silico* comme

IntaRNA et CopraRNA (Wright *et al.*, 2014) permettent de prédire des cibles ARN. Ces programmes tiennent compte de divers paramètres : la structure des ARN et la conservation des appariements. Ces outils qui génèrent, néanmoins, de nombreux faux positifs sont complémentaires aux expériences réalisées *in vivo* comme le MAPS (*MS2-affinity purification coupled with sequencing*, présentée par la suite). Une comparaison du MAPS et l'analyse par CopraRNA du sARN RsaA a révélé 40 cibles communes entre les deux approches (Georg *et al.*, 2020). Concernant les expériences d'identification *in vivo* des duplexes sARN/ARN, la majorité repose sur des protéines chaperonnes. Par exemple la technique de RIL-seq (*RNA interaction by ligation and sequencing*) développée chez *E. coli* est basée sur l'immunoprécipitation de la protéine chaperonne Hfq puis sur l'identification par séquençage des duplexes ARN associés à la protéine (Melamed *et al.*, 2018). L'efficacité du RIL-seq rayonnera également dans l'étude de l'interactome médié par Hfq chez *Salmonella enterica* (Matera *et al.*, 2022) et *Clostridioides difficile* (Fuchs *et al.*, 2023). Une autre technique similaire nommée CLASH (*UV-crosslinking, ligation and sequencing of hybrids*) repose cette fois-ci sur l'identification de couple ARN/ARN protégés par leur interaction avec la RNase E (Waters *et al.*, 2017). C'est cette méthode qui a été utilisée pour identifier les couples ARN/ARN ciblés par la RNase III chez *S. aureus* (McKellar *et al.*, 2022).

a) Purification d'affinité MS2 couplée au séquençage ARN (MAPS)

Le développement d'une technique qui permet d'identifier les cibles ARN et qui ne dépend pas de l'intervention d'une protéine chaperonne a été essentielle dans la caractérisation des réseaux de régulations médiés par les sARN chez *S. aureus*. Le MAPS a d'abord été mis en place chez *E. coli* conduisant en outre à l'identification de petits fragments d'ARNt qui agissent comme éponge des sARN RhyB and RybB. Ces interactions empêcheraient le « bruit de fond » transcriptionnel (Lalaouna *et al.*, 2015). De manière parallèle, le MAPS a été adapté pour les bactéries à Gram-positif dont *S. aureus* (Tomasini *et al.*, 2017). Un article descriptif du protocole du MAPS adapté chez *S. aureus* a été publié dans la revue JoVE dont je suis première auteure, cet article est présenté à la suite de ce manuscrit (Mercier *et al.*, 2021).

MS2-Affinity Purification Coupled with RNA Sequencing in Gram-Positive Bacteria

Noémie Mercier¹, Karine Prévost², Eric Massé², Pascale Romby¹, Isabelle Caldelari¹, David Lalaoua¹

¹ Université de Strasbourg, CNRS ² Department of Biochemistry, Université de Sherbrooke

Corresponding Authors

Isabelle Caldelari

i.caldelari@ibmc-cnrs.unistra.fr

David Lalaoua

d.lalaoua@ibmc-cnrs.unistra.fr

Citation

Mercier, N., Prévost, K.,
Massé, E., Romby, P., Caldelari, I.,
Lalaoua, D. MS2-Affinity Purification
Coupled with RNA Sequencing in Gram-
Positive Bacteria. *J. Vis. Exp.* (168),
e61731, doi:10.3791/61731 (2021).

Date Published

February 23, 2021

DOI

10.3791/61731

URL

jove.com/video/61731

Abstract

Although small regulatory RNAs (sRNAs) are widespread among the bacterial domain of life, the functions of many of them remain poorly characterized notably due to the difficulty of identifying their mRNA targets. Here, we described a modified protocol of the MS2-Affinity Purification coupled with RNA Sequencing (MAPS) technology, aiming to reveal all RNA partners of a specific sRNA in vivo. Broadly, the MS2 aptamer is fused to the 5' extremity of the sRNA of interest. This construct is then expressed in vivo, allowing the MS2-sRNA to interact with its cellular partners. After bacterial harvesting, cells are mechanically lysed. The crude extract is loaded into an amylose-based chromatography column previously coated with the MS2 protein fused to the maltose binding protein. This enables the specific capture of MS2-sRNA and interacting RNAs. After elution, co-purified RNAs are identified by high-throughput RNA sequencing and subsequent bioinformatic analysis. The following protocol has been implemented in the Gram-positive human pathogen *Staphylococcus aureus* and is, in principle, transposable to any Gram-positive bacteria. To sum up, MAPS technology constitutes an efficient method to deeply explore the regulatory network of a particular sRNA, offering a snapshot of its whole targetome. However, it is important to keep in mind that putative targets identified by MAPS still need to be validated by complementary experimental approaches.

Introduction

Hundreds, perhaps even thousands of small regulatory RNAs (sRNAs) have been identified in most bacterial genomes, but the functions of the vast majority of them remain uncharacterized. Overall, sRNAs are short non-coding molecules, playing major roles in bacterial physiology and adaptation to fluctuating environments^{1,2,3}. Indeed, these

macromolecules are at the center of numerous intricate regulatory networks, impacting metabolic pathways, stress responses but also virulence and antibiotic resistance. Logically, their synthesis is triggered by specific environment stimuli (e.g., nutrient starvation, oxidative or membrane stresses). Most sRNAs regulate multiple target mRNAs at the

post-transcriptional level through short and non-contiguous base pairing. They usually prevent translation initiation by competing with ribosomes for translation initiation regions⁴. The formation of sRNA:mRNA duplexes also often results in the active degradation of the target mRNA by recruitment of specific RNases.

The characterization of an sRNA targetome (i.e., the whole set of its target RNAs) allows the identification of the metabolic pathways in which it intervenes and the potential signal it answers to. Consequently, the functions of a specific sRNA can generally be inferred from its targetome. For this purpose, several in silico prediction tools have been developed such as IntaRNA and CopraRNA^{5,6,7}. They notably rely on sequence complementarity, pairing energy and accessibility of the potential interaction site to determine putative sRNA partners. However, prediction algorithms do not integrate all factors influencing base-pairing in vivo such as the involvement of RNA chaperones⁸ favoring sub-optimal interactions or the co-expression of both partners. Due to their inherent limitations, the false positive rate of prediction tools remains high. Most experimental large-scale approaches are based on the co-purification of sRNA:mRNA couples interacting with a tagged RNA binding protein (RBP)^{6,9}. For example, the RNA Interaction by Ligation and sequencing (RIL-seq) method identified RNA duplexes co-purified with RNA chaperones such as Hfq and ProQ in *Escherichia coli*^{10,11}. A similar technology called UV-Crosslinking, Ligation And Sequencing of Hybrids (CLASH) was applied to RNase E- and Hfq-associated sRNAs in *E. coli*^{12,13}. Despite the well-described roles of Hfq and ProQ in sRNA-mediated regulation in multiple bacteria^{8,14,15}, sRNA-based regulation seems to be RNA chaperone-independent in several organisms like *S. aureus*^{16,17,18}. Even if the purification of RNA duplexes in association

with RNases is feasible as demonstrated by Waters and coworkers¹³, this remains tricky as RNases trigger their rapid degradation. Hence, the MS2-Affinity Purification coupled with RNA Sequencing (MAPS) approach^{19,20} constitutes a solid alternative in such organisms.

Unlike above-mentioned methods, MAPS uses a specific sRNA as bait to capture all interacting RNAs and hence does not rely on the involvement of an RBP. The entire process is depicted in **Figure 1**. In brief, the sRNA is tagged at the 5' with the MS2 RNA aptamer that is specifically recognized by the MS2 coat protein. This protein is fused with the maltose binding protein (MBP) to be immobilized on an amylose resin. Therefore, MS2-sRNA and its RNA partners are retained on the affinity chromatography column. After elution with maltose, co-purified RNAs are identified using high-throughput RNA sequencing followed by bioinformatic analysis (**Figure 2**). The MAPS technology ultimately draws an interacting map of all potential interactions occurring in vivo.

MAPS technology was originally implemented in the non-pathogenic Gram-negative bacterium *E. coli*²¹. Remarkably, MAPS helped identify a tRNA-derived fragment specifically interacting with both RyhB and RybB sRNAs and preventing any sRNA transcriptional noise to regulate mRNA targets in non-inducing conditions. Thereafter, MAPS has been successfully applied to other *E. coli* sRNAs like DsrA²², RprA²³, CyaR²³ and GcvB²⁴ (**Table 1**). In addition to confirming previously known targets, MAPS extended the targetome of these well-known sRNAs. Recently, MAPS has been performed in *Salmonella* Typhimurium and revealed that SraL sRNA binds to *rho* mRNA, coding for a transcription termination factor²⁵. Through this pairing, SraL protects *rho* mRNA from the premature transcription termination triggered

by Rho itself. Interestingly, this technology is not restricted to sRNAs and can be applied to any type of cellular RNAs as exemplified by the use of a tRNA-derived fragment²⁶ and a 5'-untranslated region of mRNA²² (**Table 1**).

MAPS method has been also adapted to the pathogenic Gram-positive bacterium *S. aureus*¹⁹. Specifically, the lysis protocol has been widely modified to efficiently break cells due to a thicker cell wall than Gram-negative bacteria and to maintain RNA integrity. This adapted protocol already unravelled the interactome of RsaA²⁷, RsaI²⁸ and RsaC²⁹. This approach gave insights into the crucial role of these sRNAs in regulatory mechanisms of cell surface properties, glucose uptake, and oxidative stress responses.

The protocol developed and implemented in *E. coli* in 2015 has been recently described in great detail³⁰. Here, we provide the modified MAPS protocol, which is particularly suitable for studying sRNA regulatory networks in Gram-positive (thicker cell wall) bacteria whether non-pathogenic or pathogenic (safety precautions).

Protocol

1. Buffers and media

- For MAPS experiments, prepare the following buffers and media:
 - Buffer A (150 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM MgCl₂ and 1 mM DTT)
 - Buffer E (250 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8, 12 mM maltose, 0.1% Triton, 1 mM MgCl₂ and 1 mM DTT)
 - RNA loading buffer (0.025% xylene cyanol and 0.025% bromophenol blue in 8 M urea)

- Brain Heart Infusion (BHI) medium (12.5 g of calf brain, 10 g of peptone, 5 g of beef heart, 5 g of NaCl, 2.5 g of Na₂HPO₄ and 2 g of glucose for 1 L)
- Lysogeny Broth (LB) medium (10 g of peptone, 5 g of yeast extract and 10 g of NaCl for 1 L)

- For Northern blot assays, prepare the following buffers:
 - Blocking solution (1x maleic acid and 1% blocking reagent)
 - Hybridization solution (50% formamide, 5x SSC, 7% SDS, 1% blocking solution and 0.2% N-lauryl sarcosine, 50 mM sodium phosphate). Heat with agitation to dissolve.

CAUTION: Carefully follow the safety precautions related to each product.

 - 1 M sodium phosphate (58 mM sodium phosphate dibasic and 42 mM sodium phosphate monobasic)
 - Saline, sodium citrate (SSC) buffer, 20x concentrate (3 M NaCl and 300 mM trisodium citrate)

2. Safety issues

- Carry out all steps involving viable pathogenic bacteria in a level 2 containment lab.
- NOTE:** Only cell extracts can be taken outside after lysis (step 5).
- Put on a lab coat and gloves.
 - Ensure that the wrists are covered.
 - Clean the biological safety cabinet (Class II) with a disinfectant solution.
 - Dispose solid wastes exposed to bacteria in the appropriate biomedical bin.
 - Treat flasks containing contaminated liquids with a disinfectant solution. Then, discard it in a sink.

7. Carefully wash hands and wrists with soap and remove the lab coat before leaving the level 2 containment lab.

3. Plasmid construction

NOTE: For cloning purposes, it is crucial to first identify the boundaries of the endogenous sRNA. The pCN51-P3 and pCN51-P3-MS2 plasmids are described in Tomasini et al. (2017)²⁷. The P3 promoter allows high expression of the sRNA in a cell-density-dependent manner (i.e., when bacteria enter the stationary phase of growth). Many staphylococcal sRNAs accumulate during this growth phase.

1. Amplify the sRNA sequence by PCR using a high-fidelity DNA polymerase and a PCR machine. Carefully follow manufacturer's instructions and read Garibyan and Avashia (2013)³¹ for more details.

2. Use the following templates to design the specific primers:

5'-CGCCTGCAGCGTACACCATCAGGGTACGTTTTTCAGACA
CCATCAGGGTCTGTTT(N)-3'

and 5'-CGCGGATCC(N)-3' for forward and reverse primers, respectively.

NOTE: These oligonucleotides enable to fuse the MS2 sequence (in bold) to the 5' end of the sRNA of interest. *Pst*I and *Bam*HI restriction sites (underlined) are added at the 5' and 3' extremities of the MS2-sRNA construct to clone the amplicon into the pCN51-P3 plasmid²⁷. (N) corresponds to the gene-specific sequence (15-20 nucleotides).

3. Digest 1 µg of pCN51-P3 plasmid and 1 µg of the MS2-sRNA PCR product with 2 U of *Pst*I and 1 U of *Bam*HI in the appropriate buffer according to manufacturer's recommendations.

4. Incubate 1 h at 37 °C and purify DNA using a PCR purification kit (see **Table of Materials**).

5. Mix the digested pCN51-P3 plasmid (300 ng) and MS2-sRNA amplicon (molar ratio for vector:insert = 1:3) in a 1.5 mL tube. See Revie et al. (1988)³² to maximize ligation efficiency. Add 1 µL of the Ligase Buffer and 10 U of T4 Ligase in each tube. Adjust the volume to 10 µL with ultrapure water.

6. Incubate at 22 °C for at least 2 h.

7. Add 5 µL of ligation mixture to 50 µL of frozen DH5α chemically competent *E. coli* cells. Read Seidman et al. (2001)³³ to learn more about plasmid transformation and chemically competent cells.

8. Incubate 30 min on ice.

9. Heat shock (45 s at 42 °C) the transformation tube using a heat block or water bath.

10. Add 900 µL of LB medium and incubate at 37 °C for 30 min.

11. Plate 100 µL of the bacterial suspension on a LB agar plate supplemented with ampicillin (100 µg/µL).

NOTE: the pCN51-P3 vector encodes an ampicillin resistance gene, which enables to select only *E. coli* clones carrying the pCN51-P3-MS2-sRNA plasmid.

12. Extract the pCN51-P3-MS2-sRNA plasmid from an overnight bacterial culture (5 mL) grown in the presence of ampicillin (100 µg/µL) using a plasmid DNA miniprep kit (see **Table of Materials**).

13. Verify the construct by Sanger sequencing³⁴ using the following primer, 5'-TCTCGAAAATAATAGAGGG-3'.

14. Transform the pCN51-P3-MS2-sRNA plasmid into DC10B chemically competent *E. coli* cells. Repeat steps 3.7 to 3.11.

15. Extract the pCN51-P3-MS2-sRNA plasmid (see step 3.12) and transform 1-5 µg of plasmid DNA into HG001 ΔsRNA electrocompetent *S. aureus* cells using an electroporation apparatus. Carefully follow manufacturer's instructions. Read Grosser and Richardson (2016)³⁵ to learn more about methods for preparing electrocompetent *S. aureus*.

CAUTION: This step involves handling of pathogenic bacteria (see step 2).

16. Add 900 µL of BHI medium and incubate at 37 °C for 3 h.

17. Centrifuge 1 min at 16,000 x *g*. Discard the supernatant.

18. Resuspend the pellet in 100 µL of BHI and plate the bacterial suspension on BHI agar plates supplemented with erythromycin (10 µg/µL).

NOTE: The pCN51-P3 vector also encodes an erythromycin resistance gene, which enables to select only *S. aureus* clones carrying the pCN51-P3-MS2-sRNA plasmid.

4. Bacteria harvesting

CAUTION: This step involves handling of pathogenic bacteria (see step 2).

1. Grow one colony of strains carrying either pCN51-P3-MS2-sRNA or pCN51-P3-MS2²⁷ plasmids in 3 mL of BHI medium supplemented with erythromycin (10 µg/µL) in duplicates.

2. Dilute each overnight culture in 50 mL (≈1/100) of fresh BHI medium supplemented with erythromycin (10 µg/µL)

to reach an OD_{600nm} of 0.05. Use 250 mL sterilized flasks (5:1 flask-to-medium ratio).

NOTE: Medium and growth conditions should be set according to the expression pattern of the studied sRNA.

3. Grow cultures at 37 °C with shaking at 180 rpm for 6 h.
4. Transfer each culture into a 50 mL centrifuge tube.
5. Centrifuge at 2,900 x *g* during 15 min at 4 °C. Discard the supernatant.
6. Keep pellets on ice and directly perform mechanical cell lysis (step 5) or freeze and store pellets at -80 °C.

5. Mechanical cell lysis

CAUTION: Following steps must be performed on ice and buffers must be at 4 °C. Use gloves and take all precautions to protect samples from RNases.

1. Resuspend pellets (step 4.6) in 5 mL of Buffer A.
2. Transfer the resuspended cells in 15 mL centrifuge tubes with 3.5 g of silica beads (0.1 mm).
3. Insert tubes in a mechanical cell lysis instrument (see **Table of Materials**). Run a cycle of 40 s at 4.0 m/s.

NOTE: If one cycle is not enough to break cells, let the device cool for 5 min while keeping samples on ice. Then, repeat another cycle of 40 s at 4.0 m/s. The efficiency of cell lysis can be tested by plating the supernatant on BHI-agar plate.

4. Centrifuge at 15,700 x *g* for 15 min. Recover the supernatant and keep it on ice.

6. Column preparation

CAUTION: Be careful not to allow the amylose resin to dry. If needed, seal the column with an end-cap. Prepare all the solutions before starting the affinity purification.

1. Put a chromatography column in a column rack (see **Table of Materials**).
2. Remove the column tip and wash the column with ultrapure water.
3. Add 300 μ L of amylose resin.
4. Wash the column with 10 mL of Buffer A.
5. Dilute 1,200 pmol of MBP-MS2 protein in 6 mL of Buffer A and load it into the column.
6. Wash the column with 10 mL of Buffer A.

7. MS2-affinity purification (Figure 1)

1. Load the cell lysate into the column.
NOTE: Keep 1 mL of the cell lysate (Crude extract, CE) to extract total RNA (step 8) and perform Northern blot (step 9) and transcriptomic (step 10) analysis.
2. Collect the flow-through fraction (FT) in a clean collection tube.
3. Wash the column 3 times with 10 mL of Buffer A. Collect the wash fraction (W).
4. Elute the column with 1 mL of Buffer E and collect the elution fraction (E) in a 2 mL microtube.
5. Keep all collected fractions on ice until RNA extraction (step 8) or freeze them at -20°C for later use.

8. RNA extraction of collected fractions (CE, FT, W and E)

1. Use 1 mL of each fraction (including FT and W) for RNA extraction.
2. Add 1 volume of phenol. Mix vigorously.
CAUTION: Phenol is volatile and corrosive, pay attention and work safely under a fume hood.
3. Centrifuge at $16,000 \times g$ for 10 min at 20°C .
4. Transfer the upper phase in a clean 2 mL microtube.
5. Add 1 volume of chloroform/isoamyl alcohol (24:1) and repeat steps 8.3 to 8.4.
CAUTION: Work safely under a fume hood.
6. Add 2.5 volumes of cold ethanol 100% and 1/10 volume of 3 M sodium acetate (NaOAc) pH 5.2.
7. Precipitate overnight at -20°C .
NOTE: Precipitation can also be performed in an ethanol/dry ice bath during 20 min or at -80°C during 2 h.
8. Centrifuge at $16,000 \times g$ for 15 min at 4°C . Slowly remove ethanol with a pipette while being careful not to disturb the pellet.
CAUTION: The RNA pellet is not always visible and is sometimes loose in presence of ethanol.
9. Add 500 μ L of 80% cold ethanol.
10. Centrifuge at $16,000 \times g$ for 5 min at 4°C .
11. Discard ethanol by pipetting it slowly. Dry the pellet using a vacuum concentrator, 5 min on run mode.
12. Resuspend the pellet in an appropriate volume (15-50 μ L) of ultrapure water. Freeze the pellet at -20°C for later use.
13. Assess RNA quantity (260 nm) and quality (260/280 and 260/230 wavelength ratios) using a spectrophotometer/

fluorometer (see **Table of Materials**). Carefully follow manufacturer's instructions.

NOTE: 3-4 μg are generally obtained in the elution fraction (E). This mainly depends on tested conditions.

9. Analysis of MS2-affinity purification by Northern blot ³⁶

1. Dilute 5 μg of RNA of CE, FT, W fractions and 500 ng of E fraction in 10 μL of ultrapure water and mix with 10 μL of RNA loading buffer.
2. Incubate 3 min at 90 °C.
3. Load samples into wells of an 1% agarose gel supplemented with 20 mM of guanidium thiocyanate and run the gel at 100-150 V in TBE 1x buffer at 4 °C. Read Koontz (2013)³⁷ for more details.

4. Transfer RNAs on a nitrocellulose membrane by vacuum transfer for 1h or capillarity transfer overnight.

NOTE: The capillarity method is more efficient for large RNAs.

5. UV cross-link RNAs on the membrane (120 mJ at 254 nm) using an ultraviolet crosslinker.
6. Insert the membrane in a hybridization bottle with the RNA side facing up.
7. Add 10-20 mL of preheated hybridization solution. Incubate 30 min at 68 °C.
8. Discard the solution and add 10-20 mL of fresh hybridization solution supplemented with 1 μL of the sRNA-specific probe. Incubate overnight at 68 °C.

NOTE: The DIG-labelled RNA probe is synthesized using a DIG RNA labelling kit and following manufacturer's instructions. Alternatively, a radiolabelled probe can be used.

9. Wash the membrane with 10-20 mL of wash solution 1 (2x SSC and 0.1% SDS) for 5 min at 20 °C. Repeat once.
10. Wash the membrane with 10-20 mL of wash solution 2 (0.2x SSC and 0.1% SDS) for 15 min at 68 °C. Repeat once.
11. Incubate with 10-20 mL of blocking solution for at least 30 min at 20 °C.
12. Discard the solution and add 10-20 mL of the blocking solution supplemented with the polyclonal anti-digoxigenin antibody (1/1000), conjugated to alkaline phosphatase. Incubate 30 min at 20 °C.
13. Wash the membrane with 10-20 mL of the wash solution 3 (1x maleic acid and 0.3% Tween 20) for 15 min at 20 °C. Repeat once.
14. Incubate the membrane with 10-20 mL of the detection solution (0.1 M Tris HCl and 0.1 M NaCl pH 9.5) 5 min at 20 °C.
15. Put the membrane on a plastic film and soak it with the substrate (see **Table of Materials**). Incubate 5 min in the dark.
16. Seal the membrane in a plastic film. Put the membrane in an autoradiography cassette.
17. Expose the membrane to an autoradiography film in the dedicated dark room.
18. Reveal the exposed film in an automatic developing device.

NOTE: The exposition time depends on the signal strength, from few seconds to minutes.

10. Preparation of the samples for RNA sequencing

NOTE: This step only concerns RNAs extracted from E and CE fractions.

1. Add to each sample 10 μ L of 10x DNase buffer and DNase I (1 U/ μ g of treated RNAs). Add water for a final volume of 100 μ L.
2. Incubate 1 h at 37 °C.
3. Extract and purify RNAs as previously described (steps 8.2 to 8.11).

4. Resuspend the RNA pellet in 20 μ L of ultrapure water.

NOTE: The presence of remaining DNA can be checked using PCR and specific primers (e.g., 16S gene).

5. Assess RNA quantity and quality using a microfluidics-based electrophoresis analysis system (see **Table of Materials**).

NOTE: 1 μ g is generally obtained in the elution fraction (E) after DNase treatment.

6. Remove ribosomal RNAs with a bacterial rRNA depletion kit.

NOTE: Large and abundant RNAs (i.e., rRNAs) tend to non-specifically interact with the affinity column. 500 ng of extracted RNA are required to perform this step.

7. Again assess RNA quantity and quality using a microfluidics-based electrophoresis analysis system.

8. Prepare cDNA libraries with 10-20 ng of ribodepleted RNA using a cDNA library preparation kit and following manufacturer's instructions.

9. Sequence the obtained libraries using a sequencing instrument (e.g., single-end, 150 bp; see **Table of Materials**).

NOTE: 5-10 million reads per sample are generally enough.

11. RNAseq data analysis (Figure 2)

1. Download the FastQ sequencing files from the sequencing platform.
2. Access to the Galaxy instance of Roscoff biological station (<https://galaxy.sb-roscoff.fr/>) and log in.

NOTE: Every mentioned algorithm can be easily found using the search bar. A user guide is provided for each tool.

CAUTION: The version of required tools may differ from the public Galaxy server³⁸.

3. Click on **Get Data** icon and then **Upload File from your computer**. Upload FastQ sequencing file of each MS2 control and MS2-sRNA samples. Upload also FASTA reference genome file and GFF annotation file.
4. Run FastQC Read Quality reports (Galaxy Version 0.69).
NOTE: This tool provides a quality assessment of raw sequences (e.g., quality score, presence of adapter sequences).
5. Run Trimmomatic flexible read trimming tool (Galaxy Version 0.36.6) to notably remove adapter sequences and poor-quality reads. Indicate adapter sequences used for library preparation (e.g., TruSeq 3, single-ended). Add the following Trimmomatic operations: SLIDINGWINDOW (Number of bases=4; Average quality=20) and MINLEN (Min length of reads=20).
6. Run again FastQC Read Quality reports (Galaxy Version 0.69).
7. Run Bowtie2 - map reads against reference genome (Galaxy Version 2.3.2.2). Use the Genome Reference

FASTA file from the history to map reads with default settings (very sensitive local).

NOTE: BAM file generated by Bowtie2 tool can be visualized using the Integrative Genomics Viewer (IGV). Associated BAI file will also be required.

8. Optionally, Run Flagstat which compiles stats for BAM dataset (Galaxy Version 2.0).
9. Run htseq-count - Count (Galaxy Version 0.6.1) which aligns reads overlapping features in the GFF annotation file. Use the Intersection (non-empty) mode.
10. Archive all raw counts files from htseq-count analysis into a single Zip file.
11. Run SARTools DESeq2 to compare data (Galaxy Version 1.6.3.0). Provide the Zip file containing raw counts files and the design file, a tab delimited file describing the experiment. Carefully follow provided instructions to generate the design file.

Representative Results

The representative results originate from the study of RsaC targetome in *S. aureus*²⁹. RsaC is an unconventional 1,116 nt-long sRNA. Its 5' end contains several repeated regions while its 3' end (544 nt) is structurally independent and contains all predicted interaction sites with its mRNA targets. The expression of this sRNA is induced when manganese (Mn) is scarce, which is often encountered in the context of host immune response. Using MAPS technology, we identified several mRNAs interacting directly with RsaC, revealing its crucial role in oxidative stress (*sodA*, *ldh1* and *sarA*) and metal-related (*znuBC-zur* and *sufCDSUB*) responses.

Validation of the MS2-sRNA construct and experimental conditions

Before performing MAPS experiments, it is important to determine the optimum conditions of expression of the studied sRNA. If a non-native promoter is used, it will definitely help produce the MS2-sRNA construct when its targets are present. In addition, the MS2-sRNA construct should be carefully validated with regard to size, stability, expression and function. The MS2 aptamer was fused to the 5' end of either the full-length RsaC (MS2-RsaC₁₁₁₆) or the shorter form (MS2-RsaC₅₄₄) corresponding to the 3' part of RsaC. Both constructs were expressed in vivo under the control of the quorum sensing dependent P3 promoter in *S. aureus* HG001 Δ *rsaC*. The deletion of *rsaC* gene avoids a competition between the endogenous RsaC and MS2-RsaC. The wild-type strain containing the same vector with the MS2 tag alone was used as control. This control allows subtracting unspecific interactions occurring with the MS2 tag.

To confirm the constructs and visualize their pattern of expression, bacterial cells were harvested after 2 h, 4 h and 6 h of growth in BHI medium at 37 °C. After RNA extraction, Northern blot analysis was performed using RsaC-specific DIG probe (**Figure 3A**). The level of endogenous RsaC (lanes 1-3) significantly increased after 6 h of growth, justifying the selection of this time point for MAPS experiments. Importantly, the levels of MS2-RsaC₅₄₄ (lanes 7-9) and MS2-RsaC_{1,116} (lanes 10-12) were comparable to endogenous RsaC at 6 h. Hence, they should mimic the endogenous expression pattern of RsaC. A larger but minor form of RsaC was distinguishable and might be due to an inefficient end of transcription. This phenomenon is frequently observed when a MS2-sRNA is expressed under the control of a strong promoter from a plasmid²¹. No shorter forms resulting from aberrant transcription termination or degradation were observed.

The addition of the MS2 aptamer at the 5' of sRNAs could also disrupt their proper folding and affect their functions. This step is critical for highly structured sRNAs as RsaC. Hence MS2-sRNA activity should be tested and compared to endogenous sRNA when possible. A previously known target or an observable phenotype can help to monitor it. For example, the impact of RsaC on intracellular ROS accumulation was used to validate MS2-RsaC₅₄₄ and MS2-RsaC_{1,116} constructs²⁹.

Analysis of collected fractions during affinity purification

RNAs were extracted from CE, FT and E fractions in WT strain expressing MS2 tag alone and Δ rsaC strain expressing MS2-RsaC₅₄₄ construct. We showed using Northern blot analysis that the 1,116 nt-long endogenous RsaC was enriched in the elution fraction but turned out to interact non-specifically with the affinity column (**Figure 3B**, lanes 2-3). We observed the same phenomenon with MS2-RsaC_{1,116} (data not shown). This is certainly due to its length and complex secondary structure. Therefore, only a less structured and shorter form (544 nt) of RsaC corresponding to its 3' part was used to perform MAPS experiments. In **Figure 3B**, the MS2-RsaC₅₄₄ was highly enriched in the elution fraction demonstrating that it was successfully retained by the MS2-MBP fusion protein (lane 6). A larger but minor form of MS2-RsaC₅₄₄ was observed as in **Figure 3A**. Here, the stringency and number of washes can be adjusted to either reduced non-specific

binding or, on the contrary, to limit loss of true interacting partners.

Validation of putative mRNA targets after MAPS analysis

Following bioinformatic analysis, putative mRNA targets are listed according to the Fold-change between MS2-sRNA and MS2 control, obtained using DeSeq2 (**Figure 2**). For instance, MS2-RsaC₅₄₄ MAPS data²⁹ suggested that *sodA* mRNA, coding for a superoxide dismutase in *S. aureus*, is a main target (best hit, higher Fold-change). A Northern blot analysis, performed with a *sodA*-specific DIG probe after MS2-affinity purification, shows that *sodA* was efficiently co-enriched with MS2-RsaC₅₄₄ compared to the MS2 control (**Figure 3C**).

A global transcriptomic analysis is systematically performed on the CE fraction. The comparison of MAPS data and this transcriptomic analysis helps adjust the enrichment ratio and reveals a potential target hierarchy. Indeed, a poorly expressed mRNA, which is highly enriched after MS2-affinity purification has certainly a greater binding affinity than a highly enriched and highly expressed mRNA.

It is important to note that all candidates identified by MAPS must be individually validated using in vitro and/or in vivo experiments such as Electrophoresis Mobility Shift Assays (EMSA) or reporter gene assays (see Jagodnik et al. (2017)³⁹ for more details).

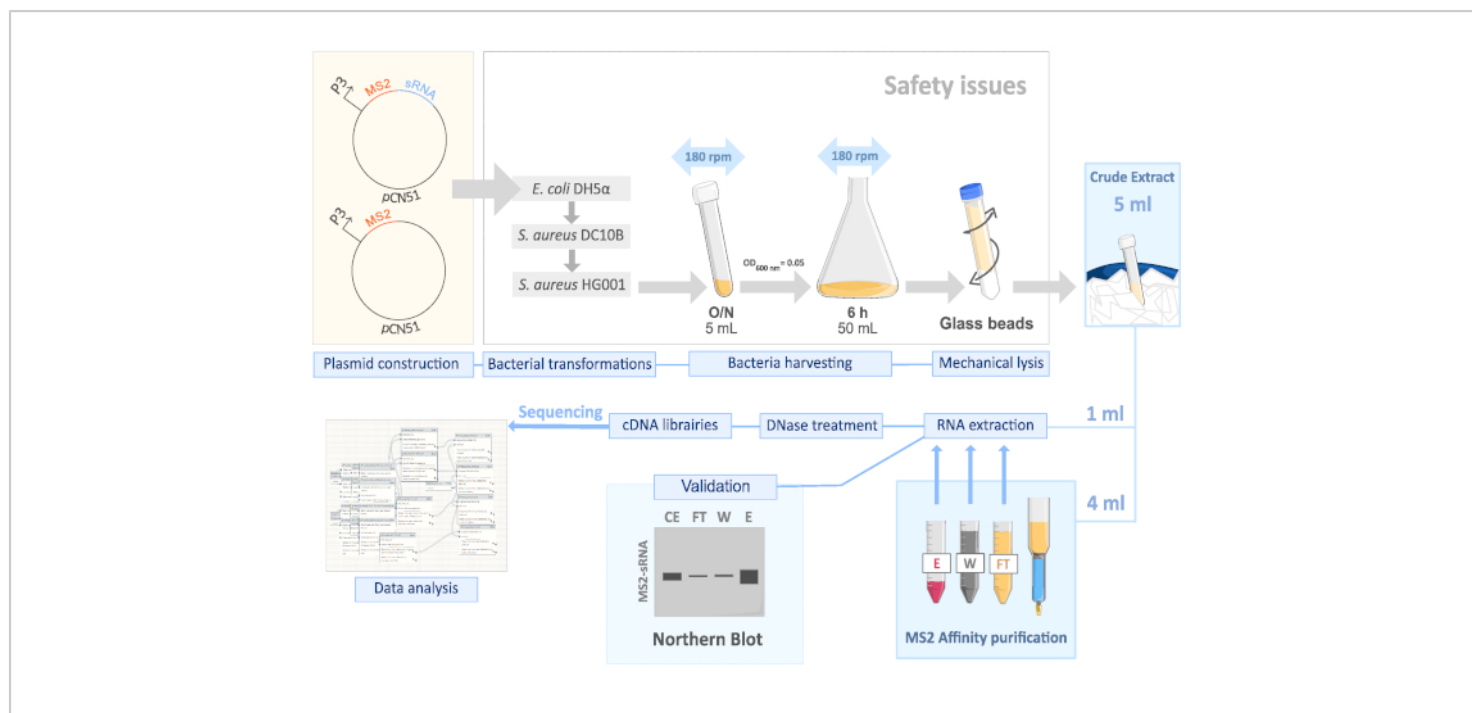


Figure 1. Schematic illustration of the MAPS protocol adapted to *S. aureus*. From plasmid construction to data analysis.

Please click [here](#) to view a larger version of this figure.

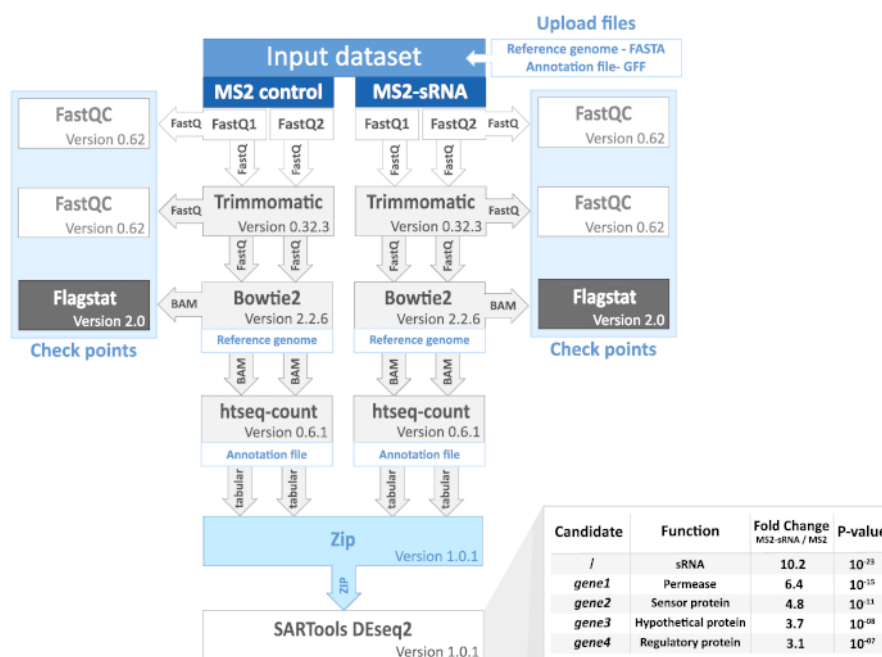


Figure 2. MAPS analysis workflow and processed data. Each step, check point and file format are represented (see also step 11). FastQ format is a text file consisting of the DNA sequences and corresponding quality scores. BAM format is a compressed file containing aligned sequences. Tabular format is a tab-delimited text file with counts for each gene. The results chart illustrates the kind of data obtained after bioinformatic analysis. Presented results are fictitious and do not originate from any study. For further details, basic tutorials are available on Galaxy Project website (<https://galaxyproject.org/>). [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

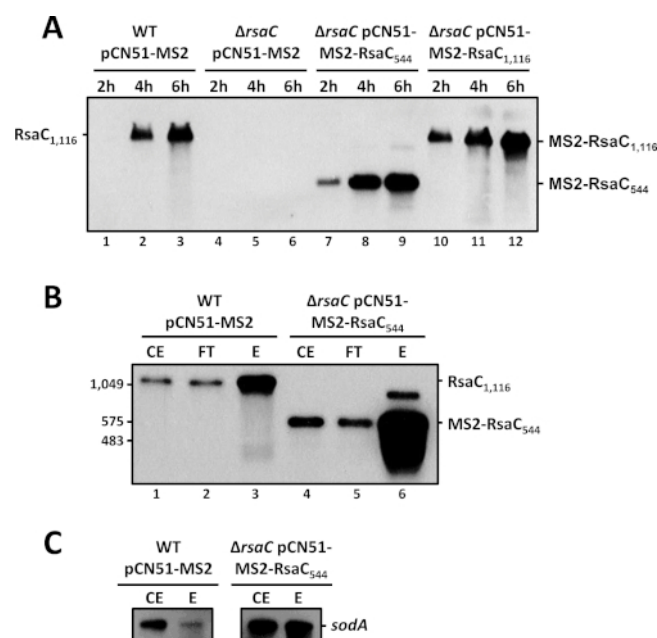


Figure 3: Constructs validation and MAPS controls. **A.** Northern blot analysis of endogenous RsaC sRNA and related MS2 constructs. WT strain carries the pCN51-P3-MS2 (control) and Δ *rsaC* mutant strain carry either the pCN51-P3-MS2, pCN51-P3-MS2-RsaC₅₄₄ or pCN51-P3-MS2-RsaC_{1,116}. Samples were taken after 2 h, 4 h and 6 h of growth in BHI at 37 °C. Northern blot assays were performed using a RsaC-specific DIG probe. **B.** Northern blot analysis of MS2-affinity purification fractions using a RsaC-specific DIG probe. The co-purification was performed using WT strain + pCN51-P3-MS2 (control) and Δ *rsaC* mutant strain + pCN51-P3-MS2-RsaC₅₄₄. Cells were harvested after 6 h of growth in BHI at 37 °C. Crude extract (CE), flow-through (FT), elution (E). **C.** Northern blot analysis of MS2-affinity purification fractions (CE and E) using a *sodA*-specific DIG probe. See **(B)** for details. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

RNA	Type	Reference
<i>Escherichia coli</i>		
RyhB	sRNA	Lalaouna <i>et al.</i> (2015) ²¹
RybB	sRNA	Lalaouna <i>et al.</i> (2015) ²¹
3'ETS ^{leuZ}	tRNA-derived fragment	Lalaouna and Massé (2015) ²⁶
DsrA	sRNA	Lalaouna <i>et al.</i> (2015) ²²
hns	mRNA (5'UTR)	Lalaouna <i>et al.</i> (2015) ²²
CyaR	sRNA	Lalaouna <i>et al.</i> (2018) ²³
RprA	sRNA	Lalaouna <i>et al.</i> (2018) ²³
GcvB	sRNA	Lalaouna <i>et al.</i> (2019) ²⁴
<i>Salmonella Typhimurium</i>		
SraL	sRNA	Silva <i>et al.</i> (2019) ²⁵
<i>Staphylococcus aureus</i>		
RsaA	sRNA	Tomasini <i>et al.</i> (2017) ²⁷
RsaC	sRNA	Lalaouna <i>et al.</i> (2019) ²⁹
RsaI	sRNA	Bronesky <i>et al.</i> (2019) ²⁸

Table 1. MAPS technology revealed the targetome of several RNAs in various organisms.

Discussion

A modified protocol for Gram-positive bacteria

The initial protocol of MAPS was developed to study sRNA interactome in the model organism *E. coli*^{20,30}. Here, we describe a modified protocol which is suitable for the characterization of sRNA-dependent regulatory networks in the opportunistic human pathogen *S. aureus* and is certainly transposable to other Gram-positive bacteria, pathogenic or not.

Particular attention was paid to the cell lysis step. The French press has been replaced by a mechanical cell lysis instrument. This method is effective to break Gram-positive cells and to limit risks associated to the handling of pathogenic strains. To improve the yield of the MS2-affinity purification, the quantity of MS2-MBP immobilized on the amylose resin has been drastically increased. This has required to adjust the stringency and number of washes.

Unlike the initial protocol, MAPS is here performed in duplicate, from two biological replicates. A workflow has been

developed to implement statistical analysis (**Figure 2**), which definitively increases the robustness of obtained data.

MS2 construct and its expression

This MAPS protocol was established to identify the targetome of staphylococcal sRNAs. The MS2-sRNA construct is expressed from a low-copy number plasmid (pCN51, 20 to 25 copies/cell) and under the control of the quorum-sensing dependent P3 promoter, mainly induced during stationary phase. This expression pattern corresponds to studied sRNAs in *S. aureus* (i.e. RsaA, RsaI and RsaC) and ensures a rather strong MS2-sRNA synthesis. However, we cannot exclude that in other cases, the P3 promoter may not be appropriate and does not reflect the natural physiological state of bacteria when the sRNA is induced. Another way to control MS2-sRNA production is to use chemically inducible promoters (e.g., tetracycline-inducible promoters). These tools allow a pulse expression of the MS2-sRNA construct, but this setting does not guarantee that RNA targets will be concomitantly expressed. Another drawback is that expression from a plasmid can lead to the overproduction of the studied sRNA, even more emphasized with high copy number vector. This might potentially result in artefactual interactions or the disruption of associated RNA chaperone functions. The most appropriate alternative is to insert a MS2 tag at the 5' end of the endogenous sRNA gene. Thus, the MS2-sRNA would be chromosomally encoded and under the control of its native promoter. This should better mimic the endogenous expression of studied sRNA and avoid bias due to the overproduction of the studied sRNA. In any case, the crucial step is to carefully verify the length, stability and functionality of the MS2-sRNA construct, notably using Northern blot assays with total RNA extracted from cultures grown under conditions that trigger the endogenous sRNA production and function.

Undeniably, the use of an improper/unfunctional MS2-sRNA construct can drastically affect generated results, supporting the significance of controls described above. Finally, the MS2-sRNA is always produced in a Δ sRNA background to maximize the enrichment of mRNA targets. Moreover, experiments can be performed in host strains with specific mutations in RNases (e.g., deletion mutants or temperature-sensitive mutants) to avoid mRNA targets degradation by sRNA-dependent recruitment of RNases.

The experimental validation of candidates identified by MAPS is still required

One point which needs to be considered is that MAPS provides a list of putative RNA targets. However, some RNAs may be indirectly enriched via interaction with a shared mRNA target or an RNA binding protein. Consequently, revealed candidates must be confirmed by other experimental approaches. EMSA and footprinting experiments are commonly used to visualize the direct binding of an sRNA to putative RNA targets in vitro. Then, in vitro toeprinting assays help monitor the impact of an sRNA on translation initiation of its mRNA target. Finally, Northern blot and/or gene reporter assays (*lacZ* or *gfp*) complement this experimental validation in vivo. All these approaches are described in Jagodnik et al. (2017)³⁹.

Unlike RIL-seq and CLASH technologies, MAPS does not directly provide information on the interaction sites. Nevertheless, a peak of mapped reads is frequently observed in a restricted region of the RNA target (e.g., the 3' end of *glyW-cysT-leuZ* operon²¹), facilitating the identification of the pairing site. Alternatively, several prediction tools can be used to predict the putative binding site on the identified target such as IntaRNA⁴⁰.

MAPS scrutinizes the targetome of a particular sRNA

MAPS technology is suitable for the study of sRNA targetome in Gram-negative bacteria such as *E. coli* and *S. Typhimurium*, but also now with this modified protocol in Gram-positive bacteria like *S. aureus*. Basically, MAPS offers a snapshot of RNA:sRNA duplexes formed at a given time and in specific growth conditions. Unfortunately, the list of mRNA targets could be incomplete. For instance, a cognate mRNA target could be missed due to inappropriate experimental conditions, justifying the above-mentioned precautions.

Compared to other commonly used methods such as RIL-seq or CLASH, MAPS uses a specific sRNA to co-purify all interacting RNA targets. Here, sRNA:RNA interaction are not diluted among other RBP-associated duplexes, allowing theoretically to characterize its targetome more deeply. However, it seems that RIL-seq/CLASH and MAPS methods revealed different sets of putative sRNA targets^{12,41}, suggesting that these experimental approaches are complementary. This discrepancy could be explained by variations in growth conditions and/or bias generated by each method.

Accordingly, the purpose of the study should influence the choice of the method. For a global analysis of sRNA targetomes and when an RBP is involved in sRNA-mediated regulation, RIL-seq and CLASH methods should be preferred. Both approaches provide an overview of regulatory networks relying on a particular RBP and, consequently, uncover a wide variety of sRNAs and associated targets. On the contrary, for the study of a specific sRNA or when no RBP is known/involved, MAPS represents an appropriate option.

Disclosures

The authors have nothing to disclose.

Acknowledgments

This work was supported by the “Agence Nationale de la Recherche” (ANR, Grant ANR-16-CE11-0007-01, RIBOSTAPH, and ANR-18-CE12-0025-04, CoNoCo, to PR). It has also been published under the framework of the labEx NetRNA ANR-10-LABX-0036 and of ANR-17-EURE-0023 (to PR), as funding from the state managed by ANR as part of the investments for the future program. DL was supported by the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under the Marie Skłodowska-Curie Grant Agreement No. 753137-SaRNAReg. Work in E. Massé Lab has been supported by operating grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), and the National Institutes of Health NIH Team Grant R01 GM092830-06A1.

References

1. Carrier, M. C., Lalaouna, D., Masse, E. Broadening the Definition of Bacterial Small RNAs: Characteristics and Mechanisms of Action. *Annual Review of Microbiology*. **72**, 141-161 (2018).
2. Hör, J., Matera, G., Vogel, J., Gottesman, S., Storz, G. Trans-Acting Small RNAs and Their Effects on Gene Expression in Escherichia coli and Salmonella enterica. *EcoSal Plus*. **9** (1) (2020).
3. Desgranges, E., Marzi, S., Moreau, K., Romby, P., Caldelari, I. Noncoding RNA. *Microbiology Spectrum*. **7** (2) (2019).
4. Adams, P. P., Storz, G. Prevalence of small base-pairing RNAs derived from diverse genomic loci. *Biochimica et*

- Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. **1863** (7), 194524 (2020).
5. Pain, A. et al. An assessment of bacterial small RNA target prediction programs. *RNA Biology*. **12** (5), 509-513 (2015).
6. Desgranges, E., Caldelari, I., Marzi, S., Lalaouna, D. Navigation through the twists and turns of RNA sequencing technologies: Application to bacterial regulatory RNAs. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. 194506 (2020).
7. Wright, P. R. et al. CopraRNA and IntaRNA: predicting small RNA targets, networks and interaction domains. *Nucleic Acids Research*. **42** (Web Server issue), W119-123 (2014).
8. Smirnov, A., Schneider, C., Hor, J., Vogel, J. Discovery of new RNA classes and global RNA-binding proteins. *Current Opinion in Microbiology*. **39**, 152-160 (2017).
9. Saliba, A. E., C Santos, S., Vogel, J. New RNA-seq approaches for the study of bacterial pathogens. *Current Opinion in Microbiology*. **35**, 78-87 (2017).
10. Melamed, S., Adams, P. P., Zhang, A., Zhang, H., Storz, G. RNA-RNA Interactomes of ProQ and Hfq Reveal Overlapping and Competing Roles. *Molecular Cell*. **77** (2), 411-425.e417 (2020).
11. Melamed, S. et al. Global Mapping of Small RNA-Target Interactions in Bacteria. *Molecular Cell*. **63** (5), 884-897 (2016).
12. Iosub, I. A. et al. Hfq CLASH uncovers sRNA-target interaction networks linked to nutrient availability adaptation. *Elife*. **9** (2020).
13. Waters, S. A. et al. Small RNA interactome of pathogenic *E. coli* revealed through crosslinking of RNase E. *The EMBO Journal*. **36** (3), 374-387 (2017).
14. Dos Santos, R. F., Arraiano, C. M., Andrade, J. M. New molecular interactions broaden the functions of the RNA chaperone Hfq. *Current Genetics*. (2019).
15. Kavita, K., de Mets, F., Gottesman, S. New aspects of RNA-based regulation by Hfq and its partner sRNAs. *Current Opinion in Microbiology*. **42**, 53-61 (2018).
16. Bohn, C., Rigoulay, C., Boulloc, P. No detectable effect of RNA-binding protein Hfq absence in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiology*. **7**, 10 (2007).
17. Jousset, A., Metzinger, L., Felden, B. On the facultative requirement of the bacterial RNA chaperone, Hfq. *Trends in Microbiology*. **17** (9), 399-405 (2009).
18. Olejniczak, M., Storz, G. ProQ/FinO-domain proteins: another ubiquitous family of RNA matchmakers? *Molecular Microbiology*. **104** (6), 905-915 (2017).
19. Lalaouna, D., Desgranges, E., Caldelari, I., Marzi, S. Chapter Sixteen - MS2-Affinity Purification Coupled With RNA Sequencing Approach in the Human Pathogen *Staphylococcus aureus*. *Methods in Enzymology*. **612**, 393-411 (2018).
20. Lalaouna, D., Prevost, K., Eyraud, A., Masse, E. Identification of unknown RNA partners using MAPS. *Methods*. **117**, 28-34 (2017).
21. Lalaouna, D. et al. A 3' external transcribed spacer in a tRNA transcript acts as a sponge for small RNAs to prevent transcriptional noise. *Molecular Cell*. **58** (3), 393-405 (2015).
22. Lalaouna, D., Morissette, A., Carrier, M. C., Masse, E. DsrA regulatory RNA represses both *hns* and *rbsD*

- pRNAs through distinct mechanisms in
- Escherichia coli*
- .
- Molecular Microbiology*
- .
- 98**
- (2), 357-369 (2015).
23. Lalaouna, D., Prevost, K., Laliberte, G., Houe, V., Masse, E. Contrasting silencing mechanisms of the same target mRNA by two regulatory RNAs in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*. **46** (5), 2600-2612 (2018).
 24. Lalaouna, D., Eyraud, A., Devinck, A., Prevost, K., Masse, E. GcvB small RNA uses two distinct seed regions to regulate an extensive targetome. *Molecular Microbiology*. **111** (2), 473-486 (2019).
 25. Silva, I. J. et al. SraL sRNA interaction regulates the terminator by preventing premature transcription termination of rho mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **116** (8), 3042-3051 (2019).
 26. Lalaouna, D., Masse, E. Identification of sRNA interacting with a transcript of interest using MS2-affinity purification coupled with RNA sequencing (MAPS) technology. *Genomics Data*. **5**, 136-138 (2015).
 27. Tomasini, A. et al. The RNA targetome of *Staphylococcus aureus* non-coding RNA RsaA: impact on cell surface properties and defense mechanisms. *Nucleic Acids Research*. **45** (11), 6746-6760 (2017).
 28. Bronesky, D. et al. A multifaceted small RNA modulates gene expression upon glucose limitation in *Staphylococcus aureus*. *The EMBO Journal*. **38** (6) (2019).
 29. Lalaouna, D. et al. RsaC sRNA modulates the oxidative stress response of *Staphylococcus aureus* during manganese starvation. *Nucleic Acids Research*. **47** (1), 9871-9887 (2019).
 30. Carrier, M. C., Laliberte, G., Masse, E. Identification of New Bacterial Small RNA Targets Using MS2 Affinity Purification Coupled to RNA Sequencing. *Methods in Molecular Biology*. **1737** 77-88 (2018).
 31. Garibyan, L., Avashia, N. Polymerase chain reaction. *Journal of Investigative Dermatology*. **133** (3), 1-4 (2013).
 32. Revie, D., Smith, D. W., Yee, T. W. Kinetic analysis for optimization of DNA ligation reactions. *Nucleic Acids Research*. **16** (21), 10301-10321 (1988).
 33. Seidman, C. E., Struhl, K., Sheen, J., Jessen, T. Introduction of plasmid DNA into cells. *Current Protocols in Molecular Biology*. **Chapter 1** Unit 1.8 (2001).
 34. Sanger, F., Coulson, A. R., Barrell, B. G., Smith, A. J. H., Roe, B. A. Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing. *Journal of Molecular Biology*. **143** (2), 161-178 (1980).
 35. Grosser, M. R., Richardson, A. R. Method for Preparation and Electroporation of *S. aureus* and *S. epidermidis*. *Methods in Molecular Biology*. **1373**, 51-57 (2016).
 36. Krumlauf, R. Northern blot analysis. *Methods in Molecular Biology*. **58**, 113-128 (1996).
 37. Koontz, L. Agarose gel electrophoresis. *Methods in Enzymology*. **529**, 35-45 (2013).
 38. Afgan, E. et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. *Nucleic Acids Research*. **44** (W1), W3-w10 (2016).
 39. Jagodnik, J., Brosse, A., Le Lam, T. N., Chiaruttini, C., Guillier, M. Mechanistic study of base-pairing small regulatory RNAs in bacteria. *Methods*. **117**, 67-76 (2017).
 40. Mann, M., Wright, P. R., Backofen, R. IntaRNA 2.0: enhanced and customizable prediction of RNA-RNA interactions. *Nucleic Acids Res.* **45** (W1), W435-w439 (2017).

41. Georg, J. et al. The power of cooperation: Experimental and computational approaches in the functional characterization of bacterial sRNAs. *Molecular Microbiology*. **113** (3), 603-612 (2020).

b) Etude de l'interactome ARN-ARN

Les méthodes qui sont présentées ci-dessous permettent d'étudier les interactions ARN-ARN de manière globale, sans nécessité d'un ligand protéique. Cette approche ne se limite pas à l'interactome d'un seul ARN comme dans le cas du MAPS. La **figure 9** présente une brève description et une comparaison des protocoles associés aux méthodes exposées, qui reposent toutes sur le même principe : les duplexes ARN/ARN sont pontés *in vivo* après addition d'un intercalant et une exposition aux UV ; après des étapes successives de traitements enzymatiques et de purification, les ARN qui interagissant subissent une ligation de proximité et produisent des chimères. Le séquençage à haut débit des chimères permet d'identifier les deux partenaires ARN qui les composent et d'estimer l'interactome au global.

La méthode PARIS (*psoralen analysis of RNA interactions and structures*) repose sur l'utilisation d'AMT (4'-aminométhyltrioxsalen), un dérivé du psoralène qui s'intercale au niveau des duplexes ARN (Lu *et al.*, 2018). Cette molécule est utilisée pour ponter les duplexes ARN *in vivo* grâce à une exposition des cellules aux UV (**figure 9**). Le protocole a été développé pour des lignées cellulaires humaines HeLa, 293T et des cellules souches de souris mES. La méthode PARIS nécessite ensuite une purification des duplexes sur gel 2D, suivie d'une ligation et du séquençage haut débit des hybrides. L'étape de purification des duplexes ARN sur gel 2D natif permet de sélectionner les ARNs digérés et pontés dont la taille est comprise en 30 et 150 bp. Le second gel d'électrophorèse est effectué en conditions dénaturantes et permet de distinguer spécifiquement les duplexes qui sont pontés par l'AMT. L'analyse bioinformatique de la méthode de PARIS dissocie les interactions intra-moléculaires et inter-moléculaires ; ainsi les résultats obtenus permet de modéliser les structures secondaires des ARN étudiés. Enfin, la méthode du SPLASH (*sequencing of psoralen crosslinked, ligated and selected hybrids*) utilise le psoralène modifié par une biotine pour ponter les duplexes ARN *in vivo* et comporte une étape d'enrichissement des duplexes sur des billes de streptavidine. Le SPLASH a été réalisé à partir de lignées cellulaires humaines, dont HeLa, mais également de la levure *S. cerevisiae* (Aw *et al.*, 2016a). Cette technique a révélé une diversité d'interactions intramoléculaires au sein des ARNm, conservées entre les cellules humaines et les levures, et a démontré que la présence de structures intramoléculaires au niveau de l'extrémité 5' des ARNm conduit à une inefficacité de la traduction. Par ailleurs, ces expériences ont identifié de nouvelles interactions entre les ARNr et des snoARN (*small nucleolar RNAs*) qui sont essentiels à la maturation des ARNr (Aw *et al.*, 2016a).

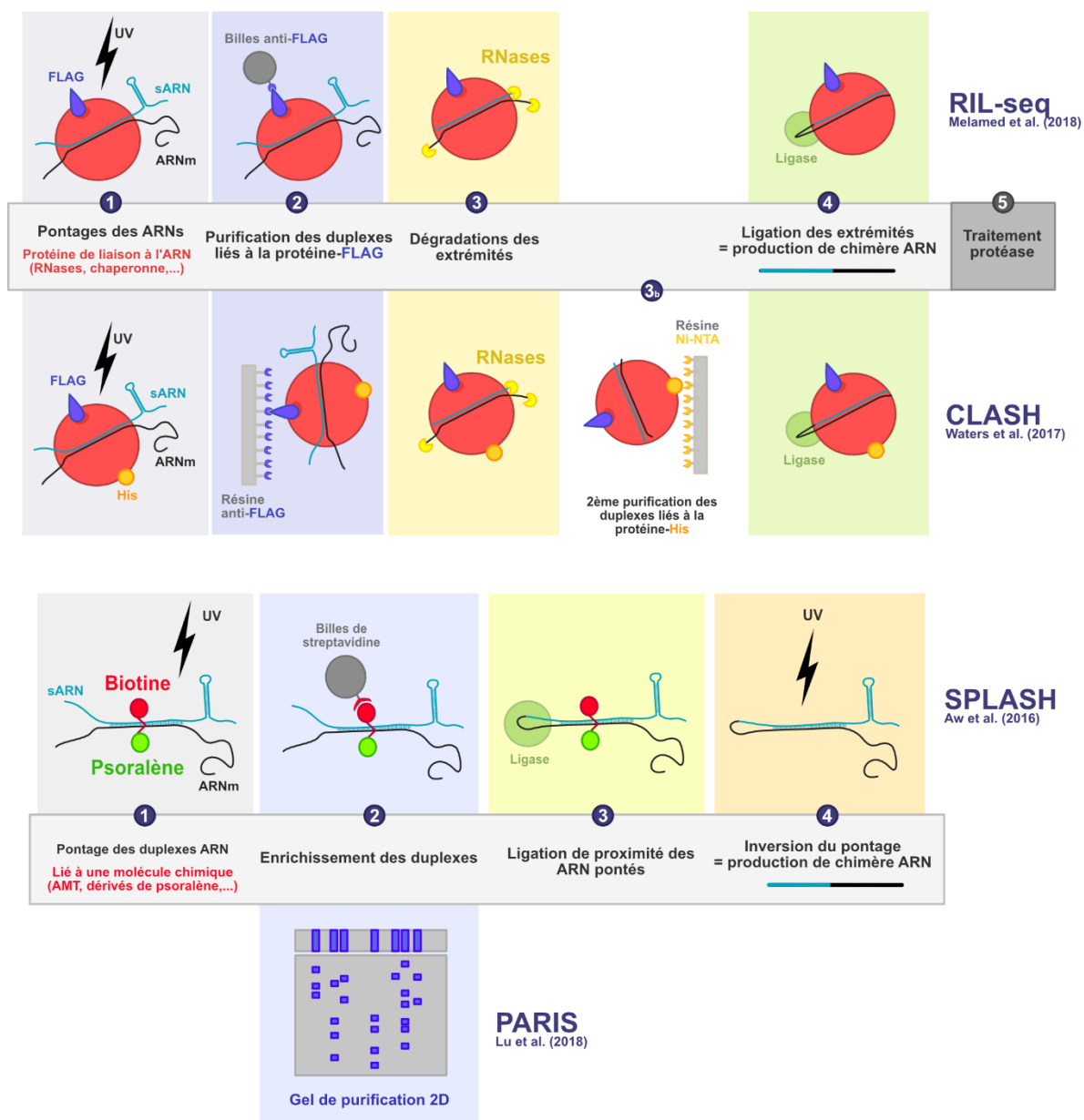


Figure 9 : Comparaison des différents protocoles mis en place pour l'étude des interactions ARN-ARN *in vivo*. Ces techniques reposent sur la ligation des deux partenaires ARNs puis du séquençage des chimères formées. Les premières méthodes développées reposent sur l'intervention d'une **protéine** dans la formation des duplexes, comme le RIL-seq ou le CLASH. Par la suite, les méthodes de PARIS et de SPLASH ont été développées grâce à des **molécules intercalantes** comme l'AMT ou des dérivés du psoralène. Ces composés permettent de ponter les interactions ARN-ARN *in vivo* après une exposition aux UV. Ce pontage est réversible après une seconde exposition aux UV, libérant les chimères produites.

La méthode du LIGR-seq (*ligation of interacting RNA followed by high-throughput sequencing*) a été développée avec des cellules humaines 293T (Sharma *et al.*, 2016). Le protocole repose également sur l'ajout d'AMT. Après différents traitements par des RNases, les deux ARN qui composent les chimères formées sont identifiés par séquençage. Depuis, la méthode du LIGR-seq a été employée chez les bactéries notamment *B. subtilis* (Durand *et al.*, 2021). Cette étude a révélé un aspect de la régulation de RoxS, qui sera présentée ultérieurement lors la présentation du sARN RsaE (RoxS chez *B. subtilis*).

Toutes ces méthodes présentent les mêmes objectifs : identifier l'ensemble des interactions qui ont lieu dans un contexte cellulaire précis et de caractériser des nouveaux partenaires ARN/ARN. Le but ultime est de caractériser les duplexes qui exercent une fonction clé dans la régulation de l'expression des gènes et dans la physiopathologie de la bactérie. L'un des enjeux de ces méthodes est de détecter les interactions ARNm/sARN dont l'enrichissement est déséquilibré par la présence écrasante des couples composés d'ARNr ou d'ARNt. Dans ce contexte, le protocole de la méthode de LIGR-seq a été adaptée et ajustée notamment par l'ajout d'une étape de purification des duplexes ARN afin d'augmenter l'enrichissement et la spécificité des chimères produites. Cette méthode sera développée lors du **chapitre 4**.

Partie 4 - sARN chez *S. aureus*

I. Intégration des signaux environnementaux

L'intégration des signaux environnementaux chez *S. aureus* repose sur une pléthore de facteurs de transcription (CcpA, SarA, Fur, ...) et de 16 systèmes à deux composants (*two-component systems*, TCS) qui régulent l'expression de multiples gènes. Ces TCS et leurs caractéristiques sont présentés dans le **tableau 5**. Ces protéines impliquées dans la transduction des signaux externes sont au cœur des mécanismes de régulation qui conduisent à la transcription des sARN.

Tableau 5 : Les systèmes à deux composants de *S. aureus*

	Signal	Régulation	Référence
WalRK	Détergent non ionique	Autolyse	Dubrac <i>et al.</i> (2007)
LytSR	SpoVG (sporulation)	Autolyse via lrgAB, biofilm	Bronner <i>et al.</i> (2004)
ArlRS	/	Autolyse, MgrA	Bronner <i>et al.</i> (2004)
AirSR	O ₂	Autolyse, résistance à H2O2 et à la vancomycine	Sun <i>et al.</i> (2012)
BraRS	Nisine, bacitracine	Résistance à la nisine et bacitracine	Hiron <i>et al.</i> (2011)
VraRS	Antibiotiques	Résistance aux stress de la paroi	Villanueva <i>et al.</i> (2018)
GraRS	Peptides antimicrobiens	Résistance aux peptides anti-microbiens	Farold <i>et al.</i> (2011)
AgrCA	Densité cellulaire	Facteurs de virulences, ARN III	Bronner <i>et al.</i> (2004)
KdpDE	NaCl, sucrose, K ⁺	Facteurs de virulences, import de K ⁺	Xue <i>et al.</i> (2011)
SaeRS	Phagocytose	Facteurs de virulences (coagulase et hémolysines)	Giraud <i>et al.</i> (1999)
SrrAB	O ₂ , NO	Facteurs de virulences, biofilm	Bronner <i>et al.</i> (2004)
HptRS	G6P	Métabolisme et transport du G6P	Park <i>et al.</i> (2015)
PhoRP	Phosphate inorganique	Transporteur de phosphate	Kelliher <i>et al.</i> (2018)
HssRS	Hème extracellulaire	Homéostasie des hèmes	Stauff <i>et al.</i> (2007)
NreBC	O ₂	Transport et réduction du nitrate en nitrite	Schlag <i>et al.</i> (2008)

L'un des TCS majeur de *S. aureus* est le locus *agr* qui constitue le système de densité cellulaire (§ 2.V.b.1). Ce locus comprend deux transcrits : l'ARN II et l'ARN III. Concernant l'ARN III, c'est l'ARN régulateur le plus étudié chez *S. aureus*. Cet ARN contrôle à la fois la production de toxines, la formation de biofilm et la dissémination de la bactérie. Comme indiqué précédemment, l'ARN III est bifonctionnel : il code la δ -hémolysine (Hld) tout en

exerçant une fonction de régulateur. Cet ARN de 514 nt possède une structure complexe composée de 14 tiges-boucles et de 4 motifs riches en C ciblant la séquence SD des ARNm cibles. L'ARN III interagit avec de multiples ARNm codant pour des protéines de surface (*spa*, *coa*, *sbi*), des régulateurs transcriptionnels (*rot*, *mgrA*) ainsi que la toxine Hla (*hla*). Il agit sur la stabilité et la traduction de ses ARNm cibles et est un exemple parfait des multiples mécanismes de régulation médiée par les sARN. Par exemple, l'ARN III se lie à la région 5'UTR de *hla* pour libérer la séquence SD et stimuler la traduction de la toxine. L'interaction *mgrA*/ARNIII stabilise l'ARNm et le protège de la dégradation par une ribonucléase encore inconnue. Enfin, l'ARN III masque la séquence SD de l'ARNm *rot* en formant des interactions boucle-boucle incluant deux boucles apicales riches en C. Ces interactions inhibent la traduction de l'ARNm et recrutent la RNase III pour initier la dégradation (Bronesky *et al.*, 2016).

II. Les ARN régulateurs chez *S. aureus*

a) Quelques sARN caractérisés expérimentalement

La revue à laquelle j'ai participé en tant que 2^{ème} auteur, qui décrit les ARN régulateurs chez *S. aureus* et les différents réseaux de régulation qui les intègrent, est proposée à la fin du chapitre (Barrientos *et al.*, 2021). A noter que tous ces réseaux sont imbriqués dans un mécanisme global de régulation et comportent des acteurs communs, que ce soit au niveau des cibles, ou des facteurs de transcription qui relaient les signaux externes. Les paragraphes suivants sont consacrés aux ARN qui jouent un rôle dans les biofilms.

Depuis la publication de cette revue, de nouveaux sARN ont été ajoutés à la liste des ARN régulateurs identifiés chez *S. aureus* nommés Teg58, Teg41 et SprY. La transcription de Teg58 est réprimée par SarA et le mutant $\Delta teg58$ est associé à une diminution de la formation de biofilm (Manna *et al.*, 2022). Cette étude a montré que Teg58 se lie à l'ARNm de l'opéron *argGH*, codant pour deux enzymes essentielles à la biosynthèse d'arginine, et inhibe leur expression. Parallèlement, Teg58 conduit à l'activation de la formation de biofilm *ica*-indépendant mais le lien entre les deux phénomènes reste flou.

Le sARN Teg41 est transcrit de manière divergente au locus *psmA* et active leur production, associé à l'augmentation de l'activité hémolytique et de la virulence de la bactérie

dans le contexte de formation d'abcès en modèle murin (Zapf *et al.*, 2019). Teg41 activerait la synthèse de PSM α mais également celle des PSM β par un mécanisme encore non élucidé ; et réprimerait la traduction de la protéine A en interagissant avec l'ARNm *spa*, entraînant la dégradation de l'ARNm (Briaud *et al.*, 2022). Concernant SprY, ses fonctions régulatrices et le rôle d'« éponge » vis-à-vis de l'ARN III ont été évoqués précédemment (§ 3.II.b).

b) Les ARN régulateurs Rsa

Une étude des régions inter-géniques (IGR) de *S. aureus* a permis d'identifier 36 ARN non codants nommés Rsa pour RNA from S. aureus (Geissmann *et al.*, 2009). Les IGR ont été sélectionnées selon de multiples critères : conservation des séquences nucléotidiques parmi les souches de *S. aureus*, des Staphylococcaceae, et des firmicutes, présence de terminateurs orphelins, de régions promotrices, de motifs structuraux et l'environnement génique. Les sARN les plus exprimés en phase stationnaire ont été annotés RsaA à RsaK, tous possédant au moins un motif riche en C, sauf RsaF, I et K. Les 25 autres ARN ont été annotés RsaX01 à RsaX25 car leur expression n'a pas été validée. Une brève caractérisation des différents Rsa identifiés est présentée dans le **tableau 6**. Les trois ARN régulateurs RsaA, RsaI et RsaE qui font l'objet de mon travail de thèse seront approfondis dans la suite de ce manuscrit.

Tableau 6 : Caractéristiques et fonctions des ARN régulateurs Rsa identifiés par l'équipe de Geissmann *et al.* (2009). Exp/Stat : Phase exponentielle/stationnaire de croissance

	Taille	Expression	Conservation	Signal	Cibles	Références
RsaA	139 et 286 nt	Exp.	<i>Staphylococcus</i>	σ B	Capsule, protéines de surface	Romilly <i>et al.</i> , 2014; Tomasini <i>et al.</i> , 2017
RsaB	60 nt	Stat.	<i>S. aureus</i>	/	/	
RsaC	544 nt	Exp.	<i>S. aureus</i>	Manganese	Réponse au stress oxydatif	Lalaouina <i>et al.</i> , 2019
RsaD	177 nt	Stat.	<i>Staphylococcus</i>	SrrAB	Métabolisme du carbone	Geissman <i>et al.</i> , 2009; Augagneur <i>et al.</i> , 2019
RsaE	100 nt	Exp.	<i>Firmicutes</i>	SrrAB	Métabolisme du carbone	Geissman <i>et al.</i> , 2009; Bohn <i>et al.</i> , 2010; Rochat <i>et al.</i> , 2018
RsaF	104 nt	Exp.	<i>S. aureus</i>	σ B	Facteurs de virulence	Patel <i>et al.</i> , 2021
RsaG	194 nt	Stat.	<i>S. aureus</i>	G6P	Homéostasie redox	Bronesky <i>et al.</i> , 2019; Desgranges <i>et al.</i> , 2021
RsaH	124 nt	Stat.	<i>Staphylococcus</i>	/	/	
RsaI	144 nt	Exp.	<i>Staphylococcus</i>	HptRS	Métabolisme du glucose	Bronesky <i>et al.</i> , 2019
RsaJ	287 nt	Exp.	<i>S. aureus</i>	/	/	
RsaK	209 nt	/	<i>Staphylococcus</i>	/	/	

1. RsaA

L'ARN régulateur RsaA est produit sous deux formes : une forme longue de 286 nt rapidement dégradée et une forme courte de 139 nt (**figure 10**). La forme longue de RsaA est stabilisée dans le mutant Δrnc (Lioliou *et al.*, 2012) et le mutant Δrny (Marincola *et al.*, 2012) suggérant que les deux endoribonucléases RNase III et RNase Y seraient à l'origine de la maturation de RsaA. Néanmoins, c'est la forme courte qui est majoritairement exprimée au sein de la cellule, et qui a été étudiée dans les différentes études présentées ci-dessous. L'expression de ce sARN dépend du facteur alternatif σ^B (Geissmann *et al.*, 2009). L'une des cibles majeures de RsaA est le régulateur transcriptionnel MgrA, dont les mécanismes de régulation ont été décrit précédemment. Le sARN, qui possède un motif riche en C interagit au niveau de la région 5'UTR de l'ARNm *mgrA* et séquestre le RBS, conduisant à l'inhibition de la traduction de l'ARNm. La diminution de la production de MgrA est associée à une augmentation de la production de biofilm et une baisse de la synthèse de la capsule (Romilly *et al.*, 2014b). La technique du MAPS a été utilisée pour identifier les cibles ARN de RsaA (Tomasini *et al.*, 2017). On retrouve inévitablement l'ARNm *mgrA* mais également les ARNm codant la protéine anti-inflammatoire FLIPr et les protéines SsaA de la famille des « *staphylococcal secretory antigen A* ». Ces dernières sont impliquées dans le maintien de la viabilité de la paroi et du métabolisme du peptidoglycane (Delauné *et al.*, 2011). L'interaction de RsaA avec ces ARNm conduit à l'inhibition de la traduction et indirectement à l'activation des protéines de surface qui sont réprimées par MgrA. Dans un modèle murin d'infection par cathéter sous-cutané, RsaA favorise le développement d'infection chronique et restreint les infections aiguës (Romilly *et al.*, 2014b).

2. RsaI

La production du sARN RsaI est réprimé par la protéine du contrôle catabolique (*catabolite control protein A* ; CcpA) en présence de glucose (Bronesky *et al.*, 2019). Il possède deux régions riches en G non appariées (**figure 11**). Une séquence promotrice *cre* (*catabolite-responsive element* ; *cre*) a été mis en évidence où se fixe le répresseur transcriptionnel CcpA. Par conséquent, cet ARN s'accumule lors de carence en glucose ou lorsque celui-ci est métabolisé en phase stationnaire de croissance, mais également après une exposition à la vancomycine (Howden *et al.*, 2013).

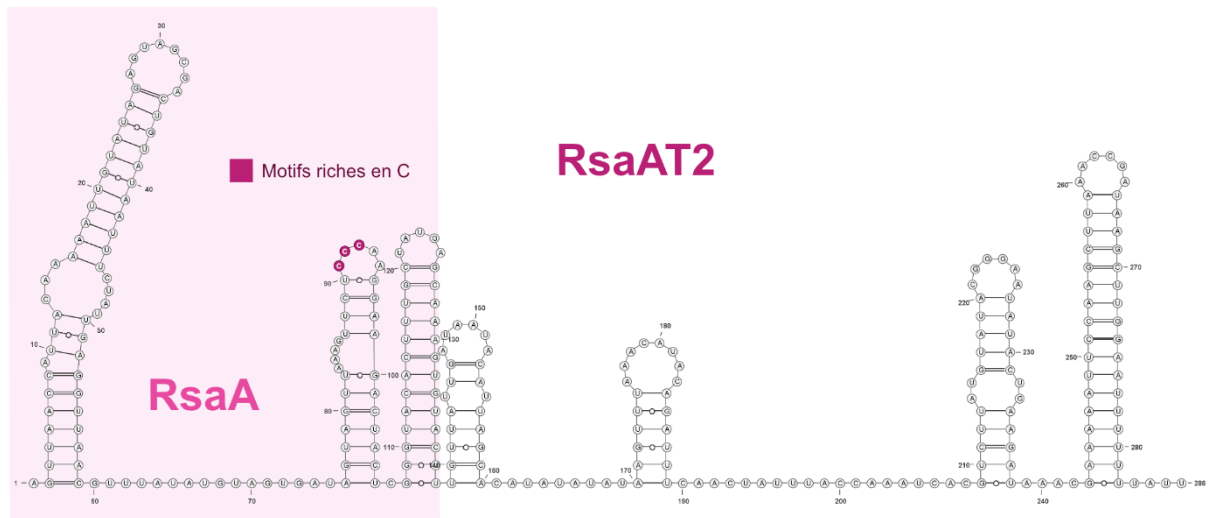


Figure 10: Structure secondaire de la forme courte RsaA et longue RsaAT2 chez *S. aureus* obtenues à partir des données de Geissmann *et al.*, 2009. La structure secondaire de la petite forme de RsaA a été réalisée par des expériences de cartographie en solution (Geissmann *et al.*, 2009). La structure secondaire de la longue forme "RsaAT2" a été effectuée avec l'outil RNAfold (Lorenz *et al.*, 2011).

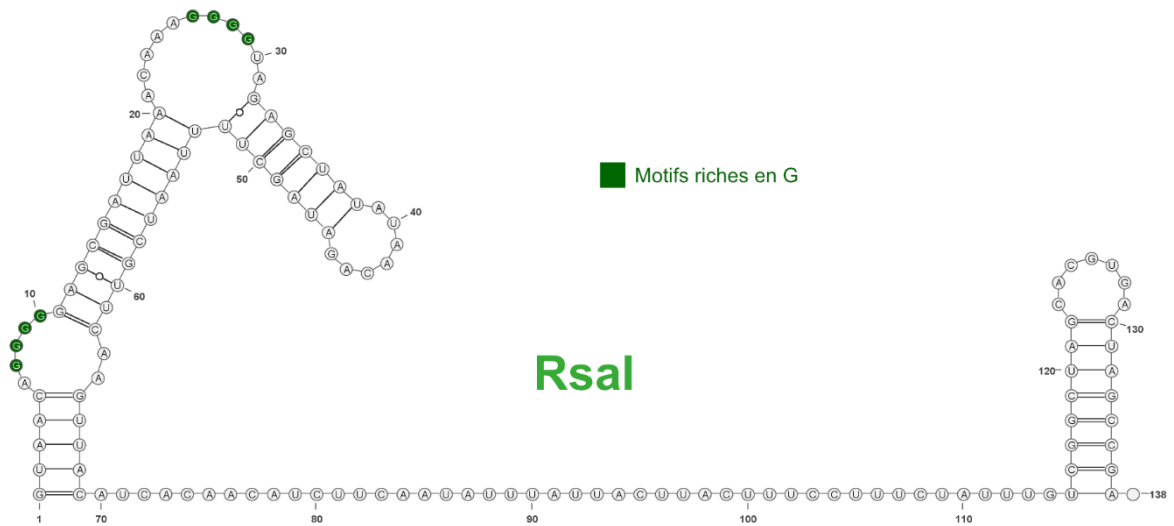


Figure 11 : Structure secondaire de RsaI chez *S. aureus* qui a été réalisée avec l'outil RNAfold (Lorenz *et al.*, 2011) à partir des données de Geissmann *et al.* (2009).

Une expérience de MAPS a été réalisée en utilisant RsaI comme appât et a permis d'identifier de nombreuses cibles potentielles du sARN. On retrouve parmi elles plusieurs ARNm des acteurs du métabolisme du glucose : le transporteur majeur du glucose GlcU_2, la fructosamine-3-kinase Fn3K, et le transporteur spécifique du tréhalose TreB. RsaI interagit avec les ARNm *glcU_2* et *fn3K* au niveau de la séquence SD et inhibe l'initiation de la traduction. En utilisant des fusions traductionnelles pour valider l'effet de RsaI sur ses ARNm cibles, il a été montré que RsaI inhibe l'expression des ARNm *treB*, *fn3K* et *glcU_2*. Après la consommation du glucose par la bactérie, RsaI régule le métabolisme du sucre en réprimant l'expression du transporteur, des enzymes impliquées dans le catabolisme et dans la détoxification liée aux hautes concentrations du glucose (Bronesky *et al.*, 2019). Il est intéressant de signaler que l'expression de RsaI est accompagnée d'une diminution de la transcription des gènes impliqués dans le catabolisme des sources carbonées et une activation des gènes liés à la production d'énergie, la fermentation et la détoxification du dioxyde d'azote (NO). Ainsi cet ARN aux multiples facettes pourrait représenter une signature métabolique lorsque la croissance est arrêtée.

Un autre aspect des réseaux de régulations médiés par RsaI est la régulation de la production de biofilm. En effet, l'ARNm *IcaR* est la première cible retrouvée lors de l'expérience de MAPS. RsaI se lie directement au niveau de la région 3'UTR de l'ARNm conduisant à la répression de la production de PIA/PNAG (Bronesky *et al.*, 2019). Néanmoins les mécanismes moléculaires impliqués dans cette régulation restent mystérieux. De plus, les données de MAPS révèlent que RsaI interagiraient avec les deux sARN RsaG et RsaE. Alors que la liaison de RsaG n'empêche pas RsaI d'interagir avec ses cibles, RsaI pourrait interférer avec seulement une partie des fonctions de RsaG (Bronesky *et al.*, 2019, Desgranges *et al.*, 2022). La caractérisation du duplexe RsaI/RsaE sera décrite lors du **chapitre 2** des résultats présentés dans ce manuscrit.

3. RsaE

RsaE est l'un des seuls sARN agissant *in trans* conservé parmi certains Firmicutes, que ce soit au niveau de sa séquence nucléotidique mais également au niveau de ses fonctions régulatrices. Ce petit ARN de moins de 100 nt est issu d'une duplication de séquence et contient 2 motifs UCCC semblables (**figure 12**) qui vont interagir spécifiquement avec les sites de fixation du ribosome de nombreux ARNm cibles.

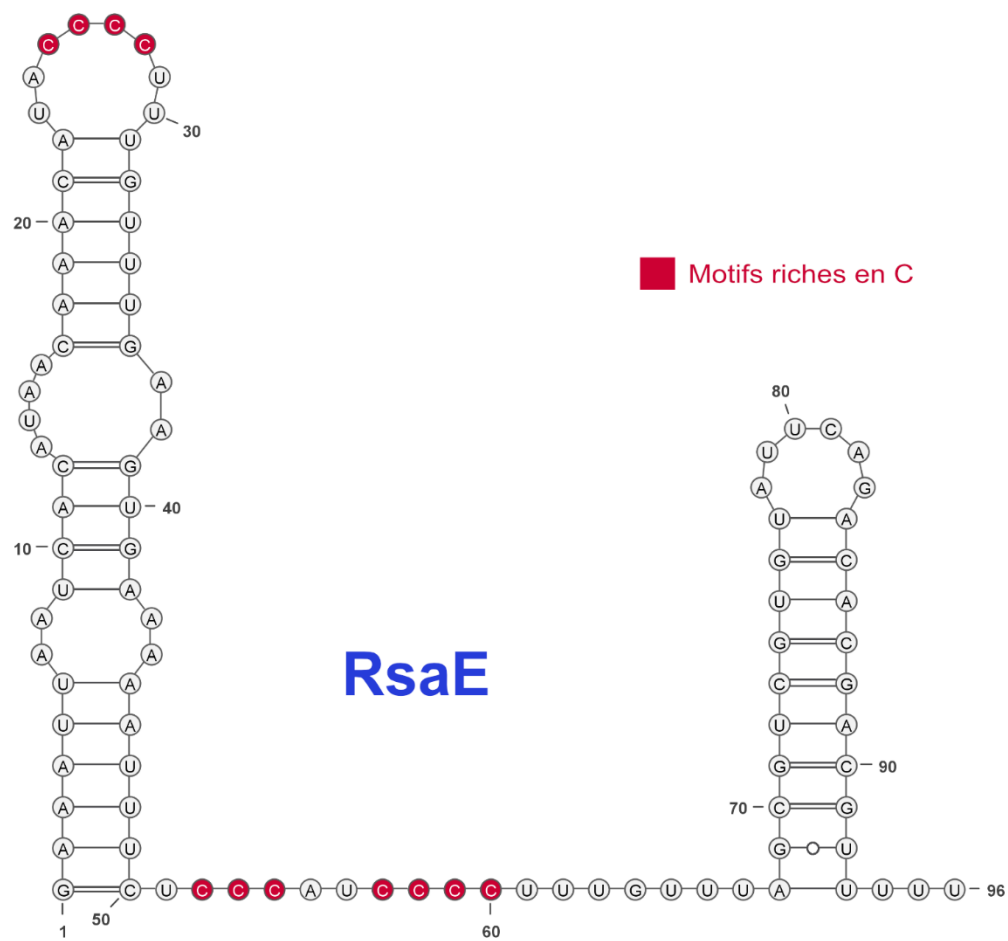


Figure 12 : Structure secondaire de RsaE chez *S. aureus* qui a été obtenue par des expériences de cartographie en solution (Geissmann *et al.*, 2009).

Chez *Bacillus subtilis*, RsaE est nommé RoxS (**figure 13A**) pour *related to oxydative stress*. Son expression est induite par l'exposition à l'oxyde nitrique (NO) *via* le système à deux composants ResDE, l'équivalent de SrrAB chez *S. aureus*. Comme son nom l'indique, RoxS est un acteur de la réponse au stress oxydatif et aux réactions d'oxydo-réductions. De nombreuses protéines voient leur expression augmentée dans la souche Δ roxS. Parmi elles, on retrouve des peroxyrédoxines et une thiorédoxine, c'est-à-dire des enzymes antioxydantes ; mais aussi des protéines protégeant l'ADN et des mono-oxygénases. Tous ces acteurs sont impliqués dans les mécanismes de résistance au stress oxydatif, et ces informations suggèrent que RoxS limite les réponses liées au stress NO. D'un autre côté, RoxS interagit avec l'ARNm *ppnkB*, une kinase qui convertit NAD⁺ en NADP⁺. L'interaction RoxS/*ppnkB* conduit à l'inhibition de l'initiation de la traduction de l'ARNm (Durand *et al.*, 2015a).

Comme énoncé précédemment, la méthode du LIGR-seq a été utilisée chez *B. subtilis* et dévoile un des nombreux mécanismes de régulation développé par RoxS (Durand *et al.*, 2021). Après avoir identifié les chimères formées, la majorité était composée de paires sARN-ARNm, mais les auteurs se sont intéressés aux duplexes établis entre sARN. Parmi eux, le duplexe RoxS/RosA (*regulator of sRNA A*) a été particulièrement enrichi dans les chimères récupérées. RosA est un sARN de 225 nt dont la transcription est réprimée par CcpA. Les expériences effectuées *in vitro* confirment l'interaction RoxS/RosA qui repose sur la complémentarité de séquence entre les motifs riches en C de RoxS et les motifs riches en G de RosA. Cette interaction semble activer le clivage de RoxS, et les données de protéomique révèlent que l'absence de RosA entraîne l'augmentation de l'expression des cibles de RoxS. Dans son ensemble, les résultats obtenus supportent l'hypothèse que RosA agirait comme une éponge en interagissant avec RoxS et en le séquestrant, limitant ses activités régulatrices. L'interaction RoxS/RosA s'inscrit dans la régulation du métabolisme central : en présence de malate, source préférentielle de carbone, l'expression de RosA est réprimée par CcpA et celle de RoxS est activée conduisant à l'inhibition de la production des enzymes impliquées dans le cycle de Krebs. A l'inverse, en présence d'arabinose, RosA est exprimé et réprime RoxS conjointement avec le régulateur Rex, activant le cycle de Krebs (Durand *et al.*, 2021). On remarquera que RosA serait donc l'orthologue de RsaI chez *S. aureus*.

Chez *Staphylococcus epidermidis*, le transcrit RsaE est particulièrement abondant dans le contexte de formation de biofilm, mais ce phénomène est spécifiquement dépendant de la souche. En effet, RsaE active la production de PIA/PNAG et la libération d'ADNe. RsaE

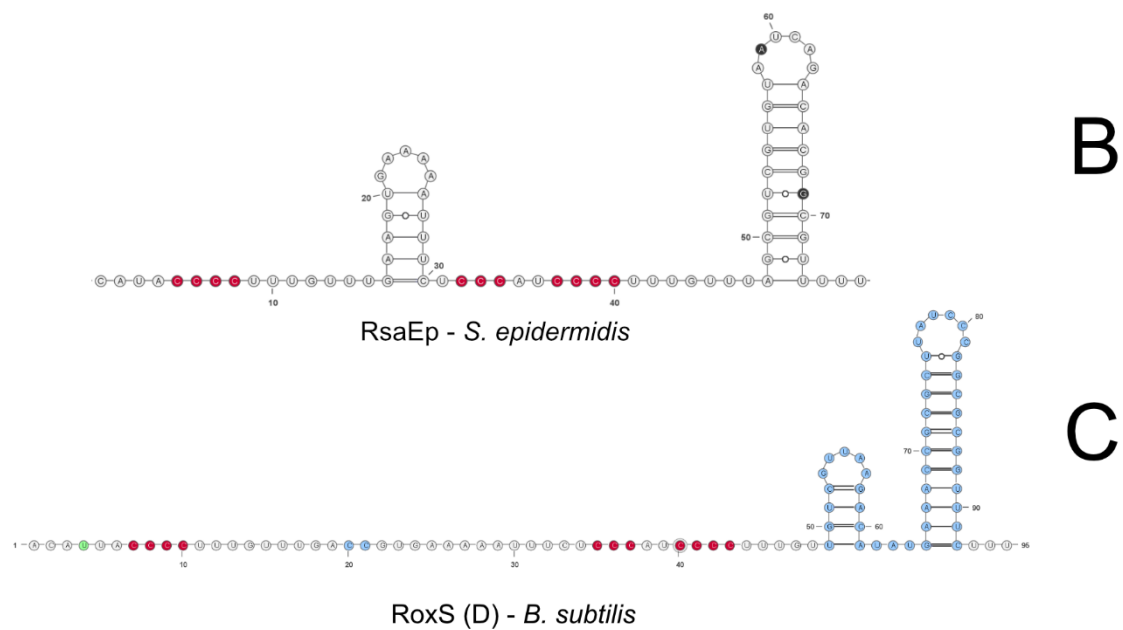
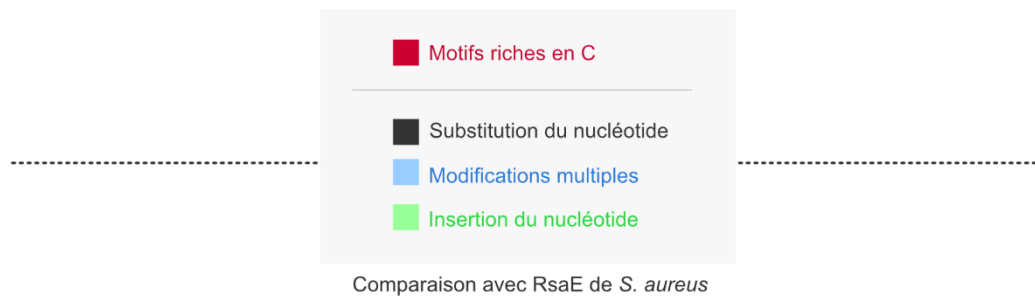
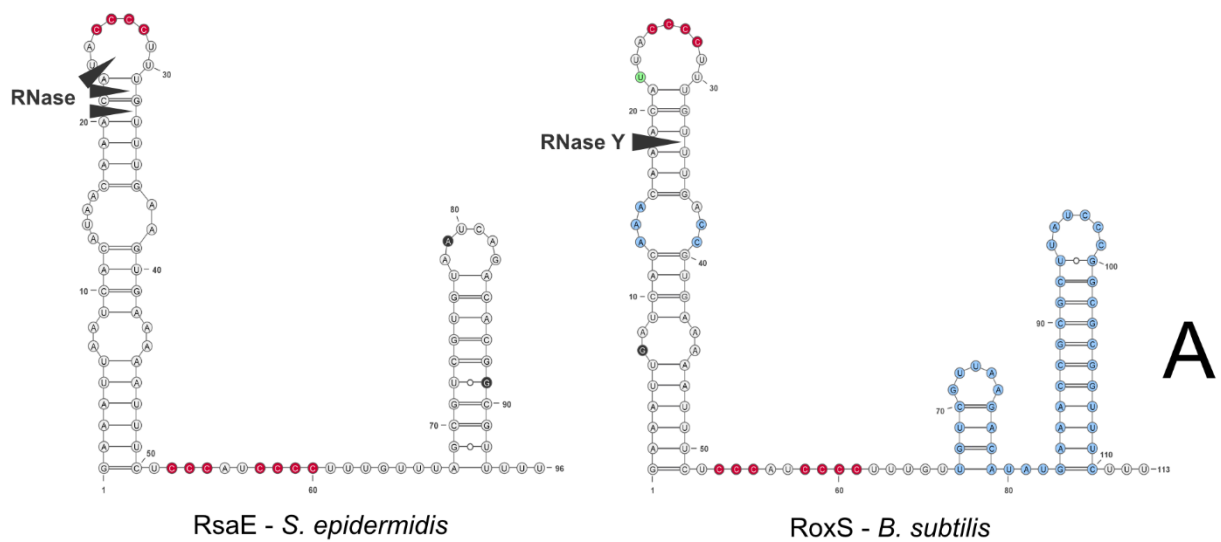


Figure 13 : Structure secondaire de RsaE/RoxS chez *S. epidermidis* et *B. subtilis*. Les différences de séquence nucléotidique et structurale par rapport à RsaE de *S. aureus* sont indiquées, ainsi que les formes clivées de chaque sARN respectif. Les triangles ► indiquent les sites de clivages identifiés expérimentalement. La RNase n'a pas été identifiée chez RsaE, et il s'agit de la RNase Y pour la maturation de RoxS. (Figure adaptée de Marincola *et al.*, 2019)

interagit directement avec l'ARNm *lrgA* qui code une anti-holine qui inhibe la libération d'ADNe via la répression de CidA. La formation du duplexe RsaE/*lrgA* masque le RBS et semble inhiber la traduction. L'étude de la formation de biofilm révèle que l'induction de l'expression de RsaE augmente la formation de biofilm qui résulte de la hausse de la production de PIA/PNAG, probablement par l'inhibition de la traduction du répresseur IcaR, et de la libération d'ADNe. A l'inverse, la délétion du gène *rsaE* conduit à une baisse de la formation de biofilm, connectée à la diminution de la production de PIA/PNAG et d'ADNe (Schoenfelder *et al.*, 2019).

Dans le cas de *S. aureus*, l'expression de RsaE est induite par le système à deux composants SrrAB (Durand *et al.*, 2015a). L'accumulation de RsaE conduit à la répression de la quantité de transcrits de plus de 20 gènes dont de nombreuses enzymes du cycle de Krebs comme *citB*, *citC*, *citZ*, *sucC* et *sucD* (Bohn *et al.*, 2010; Geissmann *et al.*, 2009). Par ailleurs, RsaE est un régulateur du catabolisme des acides aminés (Bohn *et al.*, 2010) dont celui de l'arginine puisqu'il interagit directement avec l'ARNm *rocF* pour inhiber la traduction (Rochat *et al.*, 2018). Les multiples volets de la régulation médiée par RsaE suggèrent que ce sARN limite le métabolisme central et freine le catabolisme des acides aminés.

Chez *B. subtilis*, RoxS est clivé par la RNase Y en 5' du sARN, l'amputant de 20 nt (**figure 13C**). La forme tronquée de RoxS nommée RoxS (D) agit spécifiquement sur de nouvelles cibles ARNm (Durand *et al.*, 2015a). Par exemple, la forme clivée de RoxS interagit spécifiquement avec l'ARNm *sucCD* pour inhiber la traduction de la succinyl-CoA synthase impliquée dans le cycle de Krebs. Un phénomène similaire est observé chez *S. epidermidis* puisqu'une version plus courte d'une vingtaine de nucléotides est produite, nommée RsaEp (**figure 13B**). De la même manière, la version clivée de RsaE agit sur de nouveaux ARNm cibles comme l'ARNm *icaR*, codant pour le répresseur majeur de la formation de biofilm *ica*-dépendant. En effet, RsaEp interagit avec la région 5'UTR d'*icaR* au niveau du RBS ce qui pourrait conduire à l'inhibition la traduction, hypothèse qui n'a pas été validée expérimentalement à ce jour. La formation du duplexe avec l'ARNm *icaR* est exclusive à RsaEp puisqu'elle n'a pas lieu avec RsaE (Schoenfelder *et al.*, 2019). Jusqu'à présent, aucune version clivée n'a été observée chez *S. aureus*. Néanmoins, une hétérogénéité de l'extrémité 3' de RsaE a été observée en présence de sérum (McKellar *et al.*, 2022 ; article présenté dans ce manuscrit).



Assembling the Current Pieces: The Puzzle of RNA-Mediated Regulation in *Staphylococcus aureus*

Laura Barrientos, Noémie Mercier, David Lalaouna and Isabelle Caldelari*

Université de Strasbourg, CNRS, Architecture et Réactivité de l'ARN, UPR 9002, Strasbourg, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Olga Soutourina,
UMR 9198 Institut de Biologie
Intégrative de la Cellule (I2BC), France

Reviewed by:

Shanshan Liu,
The First Affiliated Hospital of Bengbu
Medical College, China
Amy H. Lee,
Simon Fraser University, Canada

*Correspondence:

Isabelle Caldelari
i.caldelari@unistra.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Microbial Physiology and Metabolism,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 07 May 2021

Accepted: 30 June 2021

Published: 21 July 2021

Citation:

Barrientos L, Mercier N,
Lalaouna D and Caldelari I (2021)
Assembling the Current Pieces:
The Puzzle of RNA-Mediated
Regulation in *Staphylococcus aureus*.
Front. Microbiol. 12:706690.
doi: 10.3389/fmicb.2021.706690

The success of the major opportunistic human *Staphylococcus aureus* relies on the production of numerous virulence factors, which allow rapid colonization and dissemination in any tissues. Indeed, regulation of its virulence is multifactorial, and based on the production of transcriptional factors, two-component systems (TCS) and small regulatory RNAs (sRNAs). Advances in high-throughput sequencing technologies have unveiled the existence of hundreds of potential RNAs with regulatory functions, but only a fraction of which have been validated *in vivo*. These discoveries have modified our thinking and understanding of bacterial physiology and virulence fitness by placing sRNAs, alongside transcriptional regulators, at the center of complex and intertwined regulatory networks that allow *S. aureus* to rapidly adapt to the environmental cues present at infection sites. In this review, we describe the recently acquired knowledge of characterized regulatory RNAs in *S. aureus* that are associated with metal starvation, nutrient availability, stress responses and virulence. These findings highlight the importance of sRNAs for the comprehension of *S. aureus* infection processes while raising questions about the interplay between these key regulators and the pathways they control.

Keywords: regulatory RNA, interconnected network, *Staphylococcus aureus*, virulence, metabolism

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus is a major opportunistic human pathogen capable of causing an extensive array of human infections, ranging from easy-treatable sinusitis to life-threatening endocarditis or septicemia. Its versatility in colonizing diverse human organs relies on the temporally coordinated expression of numerous virulence factors allowing the bacterium to adhere, invade and disseminate into host tissues. Regulation of virulence factors expression is conducted by two-component systems (TCS), transcriptional regulators and in particular small regulatory RNAs (sRNAs). These include *cis*-acting RNAs such as antisense RNAs or riboswitches, and *trans*-acting RNAs (Carrier et al., 2018; Jørgensen et al., 2020).

The latter generally control multiple messenger RNAs, especially by targeting their Shine-Dalgarno (SD) sequence, which results in translational repression and/or stability modulation. Indeed, many staphylococcal sRNAs contain a characteristic C-rich sequence complementary to the SD sequence of targeted mRNAs (Geissmann et al., 2009). In many bacteria, sRNA:mRNA interactions are mediated by the chaperones Hfq or ProQ. However, the role of Hfq in *S. aureus*

is still controversial and ProQ is not present (Christopoulou and Granneman, 2021). Even though staphylococcal Hfq is able to bind some sRNAs *in vivo* and *in vitro*, it does not facilitate sRNA-mRNA interactions (Bohn et al., 2007). In addition, its deletion has no effect on sRNA-mediated regulation and did not present any specific phenotype. The dispensability of Hfq may result from longer and, consequently more stable, sRNA-mRNA duplexes than the ones requiring Hfq in *Escherichia coli* (Jousselin et al., 2009).

The functions of sRNAs in gene regulation and physiological responses in bacteria are now well established. Their ability to regulate specific metabolic pathways and stress responses makes them ideal candidates to regulate virulence in pathogenic bacteria. Indeed, in *S. aureus* the bi-functional sRNA RNAIII is the main intracellular effector of the quorum sensing system and controls temporal expression of virulence genes, in addition to containing the open reading frame (ORF) for the phenol soluble modulins (PSM) hemolysin delta (Bronesky et al., 2016). Besides, RNAIII, RsaA, SprC, SprD; Teg49 and SSR42 contribute to different facets of virulence regulation in animal models of infection (Desgranges et al., 2019).

DISCOVERY OF sRNA IN *Staphylococcus aureus*

The use of predictive bioinformatic searches, microarrays and expression studies led to the discovery of the first sRNAs in *S. aureus* (Pichon and Felden, 2005; Geissmann et al., 2009; Nielsen et al., 2011). Then, the advances in high-throughput sequencing technologies opened the door to a whole new era in the small RNA field (Desgranges et al., 2020). It not only helped and accelerated the discovery of further RNAs with regulatory functions in *S. aureus* (Abu-Qatouseh et al., 2010; Beaume et al., 2010; Bohn et al., 2010; Howden et al., 2013; Carroll et al., 2016; Mäder et al., 2016), but also facilitated their characterization by promoting global analyses of transcriptional changes they induce. sRNAs are commonly encoded in intergenic regions or are originated from 3' or 5'-UTR of mRNAs and are associated to the regulation of numerous metabolic pathways and virulence. Accessibility of these sequencing techniques accumulated huge transcriptomic data. However, the lack of a consensual and fully annotated *S. aureus* genome added to a missing unified sRNA nomenclature led to numerous redundancies and misannotated sRNAs. To overcome this matter, Sassi et al. (2015) designed the *Staphylococcus* Regulatory RNA Database (SRD) which provides a simple and non-redundant list of sRNAs identified in *S. aureus*. Sequences of transcribed sRNAs were compiled from various RNAseq analyses to yield a non-redundant catalog of ca. 500 sRNAs assigned with a single identifier. This list is drastically reduced to 50 when only *trans*-acting sRNAs are considered (Liu et al., 2018). Unfortunately, most putative 5'/3'-UTR-derived sRNAs are discarded here. Very recently, Carroll's team re-analyzed published RNAseq and ribosome profiling data scrutinizing the expression and stability or capacities to encode peptides of 303 sRNAs in different conditions, showing their diversity in behavior and functions (Sorensen et al., 2020).

Altogether, these studies raise issues about the poor annotation of staphylococcal genome concerning sRNAs. Furthermore, the effort of the scientific community in sequencing genomes of many staphylococcal isolates will considerably improve it.

DIVING INTO sRNA NETWORKS

To unravel the functions of a newly identified sRNA, it is necessary to define its partners. The identification of RNA candidates as direct targets of sRNAs would provide hints of their roles and pathways, in which a specific sRNA might be involved. Several experimental techniques have been recently developed to characterize sRNA targetomes in bacteria, mostly based on the pull-down of chaperone proteins such as Hfq followed by sequencing of associated RNAs (Desgranges et al., 2020). In *S. aureus*, preference was given to a distinct approach, which relies on the co-purification of binding partners with a biotinylated/tagged sRNA. These methods called MAPS (Lalaouna et al., 2015; Mercier et al., 2021) and Hybrid-trap-seq (Rochat et al., 2018) have been used to determine the interactome of various sRNAs in *S. aureus*, generating ever more complex regulatory networks picturing many events: one sRNA involved in different pathways, several sRNA involved in the same pathway or sRNAs associated with one another (Figure 1). This has highlighted the complexity and intertwined nature of sRNA networks in *S. aureus*, which most certainly accounts for the versatility of this pathogen.

Overall, of the numerous sequences for potential sRNAs, only a small fraction has been experimentally confirmed and many more remain to be characterized. In this work we will review the current state of the art of the sRNA world from *S. aureus*, featuring those involved in virulence, nutrient availability, metal starvation and stress responses. We will focus predominantly on recent results deciphering functions of staphylococcal sRNAs, while others were extensively reviewed in Guillet et al. (2013), Tomasini et al. (2013), and Desgranges et al. (2019).

THE QUEST OF POWER: A LARGER ARSENAL OF sRNAs REGULATING VIRULENCE: Teg41 AND SSR42

Besides the well described RNAIII, RsaA, Teg49 and SprC/D (Desgranges et al., 2019), two sRNAs, Teg41 and SSR42, appeared recently to regulate virulence in *S. aureus*. Teg41 is a 205 nt-long sRNA that is divergently transcribed from the locus encoding alpha phenol soluble modulins (α PSM), highly potent pore-forming toxins exhibiting cytolytic activity (Zapf et al., 2019). The deletion of 24 nts in its 3' end is sufficient to lower α PSM production at the protein level, reduce hemolytic activity and attenuate virulence in a murine abscess model. Conversely, Teg41 overexpression enhances hemolytic activity by increasing α PSM protein levels. *In silico* predictions suggest the binding of Teg41 after the start codon of α PSM4, the 4th gene of the operon and most abundant α PSM. However, this interaction remains to be confirmed as well as the activation mechanism of *psma4*. Several

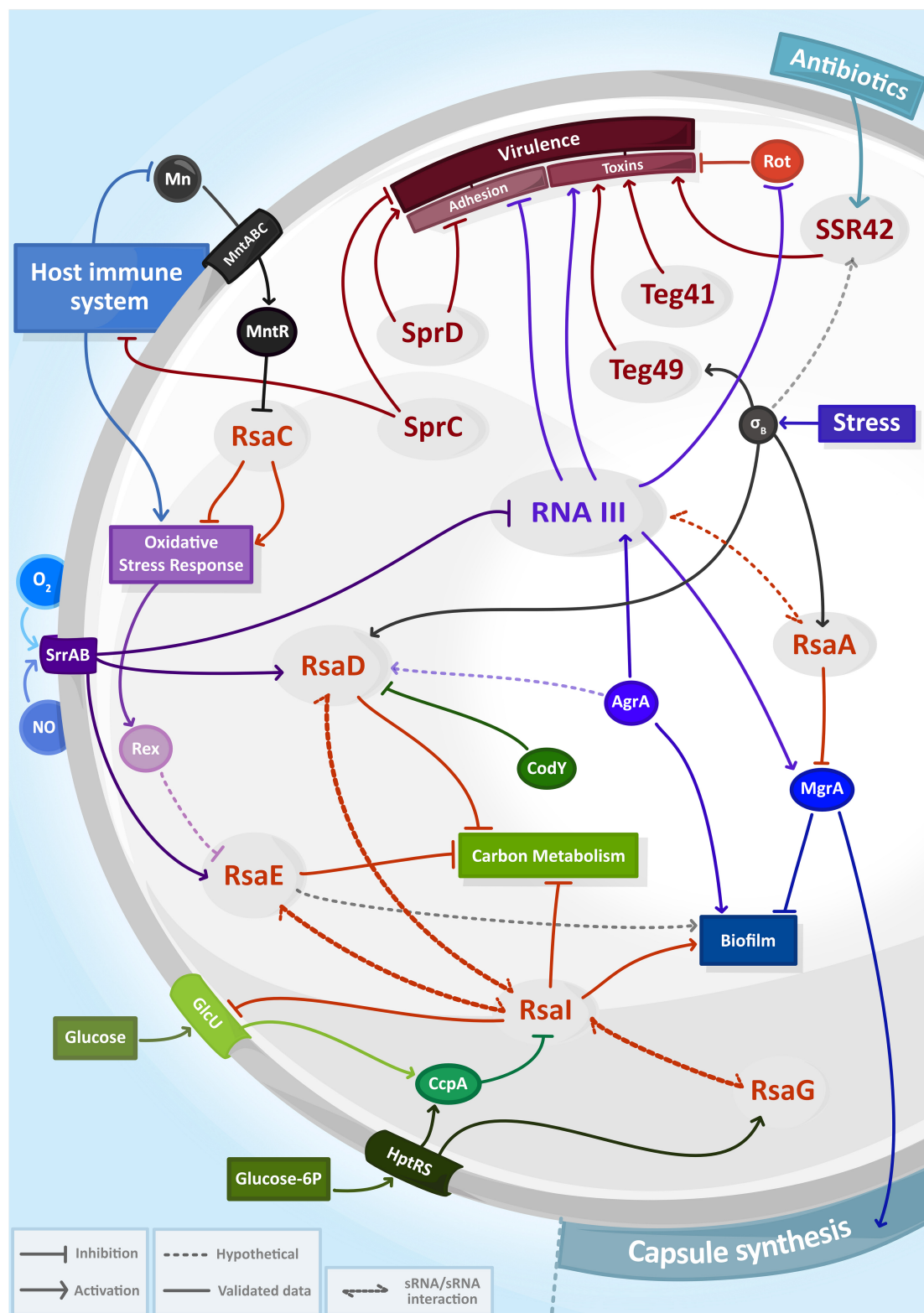


FIGURE 1 | The complexity and entanglement of regulatory RNA (sRNA) networks in *Staphylococcus aureus*. Expression of sRNAs (in gray circles) are induced by environmental signals including antibiotics, host immune system responses, exposure to reactive species (NO , O_2^-) and nutrient availability. Together with transcriptional factors (solid circle) or two-component systems, sRNAs control capsule synthesis, biofilm production, carbon metabolism, oxidative stress response or virulence and then form intricate regulatory networks.

hypotheses are raised, such as a positive regulation where T_{eg}41 would stabilize the PSM transcript to facilitate its translation or induce conformational changes to free the ribosome binding site (RBS) together with an unknown partner. This would be the first time that an sRNA has been directly linked to the regulation of α PSM, since only protein regulators such as MgrA or AgrA are known to regulate the transcription of mRNA encoding these toxins (Jiang et al., 2018). Interestingly, the *teg41* gene is restricted to *S. aureus* and the very closely related *Staphylococcus argenteus*, and this conservation seems to correlate with the presence of the α PSM locus. This suggests that both might be genetically linked (Zapf et al., 2019).

The 1,232 nt-long SSR42 belongs to the family of small stable RNAs (SSR), a group of regulatory RNAs induced and/or stabilized during stress-related conditions such as log-phase growth, heat/cold shock or stringent response (Anderson et al., 2006; Morrison et al., 2012). SSR42 is stabilized during stationary phase where it mostly represses expression of several virulence genes through an indirect yet undescribed mechanism, probably by regulating transcriptional regulators of these virulence factors (Morrison et al., 2012). This sRNA is also required for hemolysis and for virulence in a murine model of skin infection. SSR42 is located directly upstream and in an antiparallel orientation from the gene encoding Rsp, the repressor of surface proteins, a regulator of hemolysis that positively controls the production of *hla* via the *agr* system (Li et al., 2015). Rsp activates the expression of SSR42 in presence of antibiotics as oxacillin. Consecutively, SSR42 enhances hemolysis by acting indirectly on the *hla* promoter during stationary phase (Horn et al., 2018). SSR42 therefore places itself in line with regulators such as SaeR and SarA for transcriptional activation of *hla* and RNAIII for its translation. Besides, SSR42 stabilizes the *sae* transcript encoding the major transcriptional regulator of *hla* through a yet unknown mechanism (Horn et al., 2018). This suggests that modulation of *sae* transcript impacts Hla production. SSR42 therefore participates in the complex regulation of *hla* transcription in response to antibiotics even though the molecular mechanisms remain elusive.

RsaC, THE MISSING LINK BETWEEN MANGANESE HOMEOSTASIS AND OXIDATIVE STRESS

RsaC length is highly variable across *S. aureus* isolates due to the presence of repeated sequences at its 5' end and, consequently, ranges from 584 to 1,116 nts (Lalaouna et al., 2019). Remarkably, the characterization of RsaC provided the missing link between manganese homeostasis and oxidative stress response. The mutation of *mntABC*, coding for the major manganese ABC transporter, was previously reported as detrimental for Mn acquisition, but also for oxidative stress resistance (Handke et al., 2018). Lalaouna et al. (2019) demonstrated that RsaC derives from the 3' untranslated region of *mntABC* after cleavage by the double-stranded ribonuclease RNase III. In manganese-limiting conditions, RsaC negatively regulates the non-essential Mn-containing superoxide dismutase A (SodA), which is involved

in reactive oxygen species detoxification (O_2^- to H_2O_2). Concurrently, RsaC favors the SodM-dependent oxidative stress response, an alternative SOD enzyme using either Fe or Mn as cofactor. Besides helping maintain the appropriate cellular Mn^{2+} concentration, it restores the ROS detoxification pathway and counteracts Mn sequestration by host immune cells.

Noteworthy, RsaC could also interconnect and balance various metallostasis systems (Fe and Zn) (Lalaouna et al., 2019), but is apparently not involved in the MntABC-mediated increased resistance to copper (Al-Tameemi et al., 2021).

THE BLURRED LINE BETWEEN METABOLISM AND VIRULENCE: RsaD, RsaE, RsaI, AND RsaG

RsaD, a 176 nt-long sRNA, is conserved in multiple staphylococcal species (Geissmann et al., 2009). It accumulates in the late exponential phase of growth and is highly expressed in strains with an active σ_B factor, which is responsible of the regulation of genes involved in stress response in *S. aureus*. Nonetheless, the exact mechanism of *rsaD* regulation by this factor remains uncertain. More recently, Augagneur et al. (2020) observed that expression of *rsaD* is repressed by CodY, a global regulator activated by branched amino-acids and GTP and regulating genes involved in primary metabolism and virulence (Brinsmade, 2017). The promoter region of *rsaD* contains a putative CodY binding motif, which was detected in at least 15 staphylococcal species, indicating that the regulation of *rsaD* by CodY is probably conserved (Augagneur et al., 2020). In addition, RsaD is activated during nitric oxide (NO) stress, sensed by the TCS SrrAB (Bronsky et al., 2019) and possibly by the quorum sensing system Agr (Marroquin et al., 2019). Thus, RsaD seems to assimilate multiple signals from the environment. To determine the physiological functions of RsaD, *in silico* analyses using RNA Predator, TargetRNA2 and IntaRNA identified *alsS*, which is positively regulated by CodY and whose product is involved in carbon metabolism, as a possible target. RsaD binds the RBS of *alsSD* mRNA through its C-rich region and inhibits its translation initiation, leading to a decrease in AlsS enzymatic activity (Augagneur et al., 2020). Thus, by repressing RsaD, CodY permits AlsS synthesis. When glucose is in excess, AlsSD (acetolactate synthase/decarboxylase) generates acetoin (a neutral-pH compound) from pyruvate and therefore protects bacteria from death due to acidification of the cytoplasm by increased acetate production. Then, in these conditions, RsaD must be repressed for survival. This work revealed the *trans*-acting regulatory activity of RsaD on at least one mRNA and highlights the balancing role of this sRNA in carbon overflow and its implications in cell survival (Augagneur et al., 2020). All these mechanisms by which RsaD might be regulated, integrate, and respond to different environmental cues remain to be unveiled. Its place in the complex regulatory RNA networks of *S. aureus* awaits to be established.

RsaE is a highly conserved sRNA among the Firmicute phylum. This striking conservation emphasizes the crucial role of RsaE in metabolism adaptation. First discovered in *S. aureus*,

this 93 nt long sRNA is composed of two UCCCC motifs critical for its interaction with the RBS of its mRNA targets (Geissmann et al., 2009; Rochat et al., 2018). Its expression depends on the activation of the TCS SrrAB that responds to low oxygen concentration and NO exposure (Kinkel et al., 2013). A similar activation pattern is described in *B. subtilis* with its homolog RoxS (Durand et al., 2015). In addition, RoxS is repressed by the NAD⁺/NADH sensor Rex whose binding site is conserved, which suggests that Rex could fulfill a similar role in *S. aureus*.

RsaE is involved in the regulation of central metabolic pathways, in particular by negatively regulating numerous enzymes of the TCA cycle and folate metabolism (Geissmann et al., 2009; Bohn et al., 2010; Rochat et al., 2018). Among its targets, RsaE inhibits the translation of *rocF* mRNA, which encodes an arginase responsible of converting arginine into ornithine (Rochat et al., 2018). Furthermore, the absence of RsaE stimulates growth rate in a medium containing exclusively 18 amino acids (all except glutamine and asparagine) as sole carbon sources, positioning RsaE as a major repressor of amino-acid catabolism.

Surprisingly, RsaE is processed in *S. epidermidis* and *B. subtilis* but apparently not in *S. aureus* (Rochat et al., 2018). In *S. epidermidis*, the processed form of RsaE (RsaEp) expands its targetome with the transcripts of the main biofilm repressor IcaR or of the succinyl-CoA synthetase SucCD, an enzyme involved in TCA cycle (Schoenfelder et al., 2019). Interestingly, both mRNAs only interact with RsaEp. In *B. subtilis*, RNase Y is responsible of RoxS cleavage, however, in a *S. aureus* RNase Y mutant strain, the levels of RsaE or its targets are not impacted (Marincola et al., 2012). Still, a processed RsaE could act on yet unknown mRNAs. Altogether, RsaE interferes with the TCA cycle by directly inhibiting related enzymes and by limiting the production of amino-acid alternative substrates. It has been suggested in *S. aureus* and in *B. subtilis* that RsaE balances NAD⁺/NADH ratio when environmental stimuli (such as O₂ concentration or NO exposure) trigger a metabolism slowdown (Durand et al., 2015).

Additionally, RsaE interacts with another sRNA named RsaI involved in sugar metabolism control (Rochat et al., 2018; Bronesky et al., 2019), that could potentially connect the regulation network of both sRNAs. It cannot be excluded that RsaE or RsaI could behave as an sRNA sponge of one another, promoting the decay or sequestration of the other partner. RsaI is a 144 nt long sRNA conserved among the *Staphylococcaceae* family. The expression of RsaI is repressed by the catabolite control protein A (CcpA) in presence of glucose (Bronesky et al., 2019). When glucose has been metabolized, RsaI inhibits the translation of the main glucose uptake protein GlcU and activates enzymes acting in glucose fermentation. On the other hand, RsaI represses FN3K expression, a protein protecting the bacterium from the damages caused by high glucose concentration, positioning RsaI at the core of regulatory pathways of sugar metabolism. Interestingly, RsaI binds the 3'UTR of *icaR* mRNA and thus promotes biofilm formation by a mechanism which is still unsolved (Bronesky et al., 2019). To note, the *icaR* messenger was pulled out with RsaE *in vitro*, and sequencing suggested that it interacts with the 5'UTR of *icaR* such

as in *S. epidermidis* (Rochat et al., 2018). Knowing that RsaE and RsaI form a duplex, further experiments would be necessary to decipher the intricacy of regulatory lines among all these RNAs.

In addition to RsaE, RsaD (see above) and the glucose-6-phosphate induced sRNA RsaG were enriched with RsaI in MAPS, but the relevant significance of these interactions has not been explained yet (Bronesky et al., 2019). Interestingly, it has been suggested that RsaI promotes the expression of NO detoxification or anaerobic metabolism enzymes as an indirect effect of its interaction with RsaE, RsaD and RsaG. Nevertheless, shared signals and targets between these sRNAs imply tight connections and that all these regulatory networks would rationally impact each other at different levels, connecting sugar metabolism and stress responses.

CONCLUSION

In the recent years, several tools were developed to decipher the functions of staphylococcal sRNAs. They revealed that sRNAs sense and reply to different environmental stimuli and that they mostly control mRNA translation to remodel metabolomic pathways to adapt and survive in harsh environments conditions.

The more the identified sRNAs are studied, the clearer it becomes that there is no isolated node in regulatory network or pathway, but a myriad of interconnections that we are only at the beginning to acknowledge. Exciting discoveries await for us in the years to come, as all these interrelationships will be straightened out and a clearer map of sRNA interactions will be drawn.

In the meantime, many questions about the sRNA world in *S. aureus* remain to be addressed. The significance of RNA-binding proteins in all these networks is still very uncertain, besides the established role of RNase III in sRNA maturation and target degradation. However, there could be holes in the puzzle that might be filled in by some of these proteins, which may help explaining unsolved sRNA-dependent mechanisms of action.

The study of the complex regulatory networks of *S. aureus*, in which sRNAs are at the center, is undoubtedly essential for understanding its virulence and adaptation mechanisms and will ultimately guide us in the design of treatments to fight this pathogen.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LB, NM, DL, and IC contributed to the manuscript writing. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by the labEx NetRNA ANR-10-labEx-0036 and of the Interdisciplinary Thematic Institute IMCBio, as part of the ITI 2021-2028 program of the University of Strasbourg, CNRS and Inserm, by IdEx Unistra (ANR-10-IDEX-0002), by SFRI-STRAT'US project and EUR

IMCBio (IMCBio ANR-17-EURE-0023) under the framework of the French Investments for the Future Program. LB was supported by the “Fondation pour la Recherche Médicale” (N° ECO202006011534).

REFERENCES

- Abu-Qatouseh, L. F., Chinni, S. V., Seggewiss, J., Proctor, R. A., Brosius, J., Rozhdestvensky, T. S., et al. (2010). Identification of differentially expressed small non-protein-coding RNAs in *Staphylococcus aureus* displaying both the normal and the small-colony variant phenotype. *J. Mol. Med. (Berl)* 88, 565–575. doi: 10.1007/s00109-010-0597-2
- Al-Tameemi, H., Beavers, W. N., Norambuena, J., Skaar, E. P., and Boyd, J. M. (2021). *Staphylococcus aureus* lacking a functional MntABC manganese import system has increased resistance to copper. *Mol. Microbiol.* 115, 554–573. doi: 10.1111/mmi.14623
- Anderson, K. L., Roberts, C., Disz, T., Vonstein, V., Hwang, K., Overbeek, R., et al. (2006). Characterization of the *Staphylococcus aureus* heat shock, cold shock, stringent, and SOS responses and their effects on log-phase mRNA turnover. *J. Bacteriol.* 188, 6739–6756. doi: 10.1128/jb.00609-06
- Augagneur, Y., King, A. N., Germain-Amiot, N., Sassi, M., Fitzgerald, J. W., Sahukhal, G. S., et al. (2020). Analysis of the CodY RNome reveals RsaD as a stress-responsive riboregulator of overflow metabolism in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 113, 309–325. doi: 10.1111/mmi.14418
- Beaume, M., Hernandez, D., Farinelli, L., Deluen, C., Linder, P., Gaspin, C., et al. (2010). Cartography of methicillin-resistant *S. aureus* transcripts: detection, orientation and temporal expression during growth phase and stress conditions. *PLoS One* 5:e10725. doi: 10.1371/journal.pone.0010725
- Bohn, C., Rigoulay, C., and Boulou, P. (2007). No detectable effect of RNA-binding protein Hfq absence in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* 7:10. doi: 10.1186/1471-2180-7-10
- Bohn, C., Rigoulay, C., Chabelskaya, S., Sharma, C. M., Marchais, A., Skorski, P., et al. (2010). Experimental discovery of small RNAs in *Staphylococcus aureus* reveals a riboregulator of central metabolism. *Nucleic Acids Res.* 38, 6620–6636. doi: 10.1093/nar/gkq462
- Brinsmade, S. R. (2017). CodY, a master integrator of metabolism and virulence in Gram-positive bacteria. *Curr. Genet.* 63, 417–425. doi: 10.1007/s00294-016-0656-5
- Bronsky, D., Desgranges, E., Corvaglia, A., Francois, P., Caballero, C. J., Prado, L., et al. (2019). A multifaceted small RNA modulates gene expression upon glucose limitation in *Staphylococcus aureus*. *EMBO J.* 38:e99363.
- Bronsky, D., Wu, Z., Marzi, S., Walter, P., Geissmann, T., Moreau, K., et al. (2016). *Staphylococcus aureus* RNAIII and its regulon link quorum sensing, stress responses, metabolic adaptation, and regulation of virulence gene expression. *Annu. Rev. Microbiol.* 70, 299–316. doi: 10.1146/annurev-micro-102215-095708
- Carrier, M. C., Lalaouna, D., and Masse, E. (2018). Broadening the definition of bacterial small RNAs: characteristics and mechanisms of action. *Annu. Rev. Microbiol.* 72, 141–161. doi: 10.1146/annurev-micro-090817-062607
- Carroll, R. K., Weiss, A., Broach, W. H., Wiemels, R. E., Mogen, A. B., Rice, K. C., et al. (2016). Genome-wide annotation, identification, and global transcriptomic analysis of regulatory or small RNA gene expression in *Staphylococcus aureus*. *MBio* 7, e1990–e1915.
- Christopoulou, N., and Granneman, S. (2021). The role of RNA-binding proteins in mediating adaptive responses in Gram-positive bacteria. *Febs J. [Online ahead of print]* doi: 10.1111/febs.15810
- Desgranges, E., Caldelari, I., Marzi, S., and Lalaouna, D. (2020). Navigation through the twists and turns of RNA sequencing technologies: application to bacterial regulatory RNAs. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regulatory Mechan.* 1863:194506. doi: 10.1016/j.bbagr.2020.194506
- Desgranges, E., Marzi, S., Moreau, K., Romby, P., and Caldelari, I. (2019). Noncoding RNA. *Microbiol. Spectr.* 7.
- Durand, S., Tomasini, A., Braun, F., Condon, C., and Romby, P. (2015). sRNA and mRNA turnover in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 39, 316–330. doi: 10.1093/femsre/fuv007
- Geissmann, T., Chevalier, C., Cros, M. J., Boisset, S., Fechter, P., Noirot, C., et al. (2009). A search for small noncoding RNAs in *Staphylococcus aureus* reveals a conserved sequence motif for regulation. *Nucleic Acids Res.* 37, 7239–7257. doi: 10.1093/nar/gkp668
- Guillet, J., Hallier, M., and Felden, B. (2013). Emerging functions for the *Staphylococcus aureus* RNome. *PLoS Pathog* 9:e1003767. doi: 10.1371/journal.ppat.1003767
- Handke, L. D., Gribenko, A. V., Timofeyeva, Y., Scully, I. L., and Anderson, A. S. (2018). MntC-dependent manganese transport is essential for *Staphylococcus aureus* oxidative stress resistance and virulence. *mSphere* 3, e336–e318.
- Horn, J., Klepsch, M., Manger, M., Wolz, C., Rudel, T., and Fraunholz, M. (2018). Long noncoding RNA SSR42 controls *Staphylococcus aureus* alpha-toxin transcription in response to environmental stimuli. *J. Bacteriol.* 200, e252–e218.
- Howden, B. P., Beaume, M., Harrison, P. F., Hernandez, D., Schrenzel, J., Seemann, T., et al. (2013). Analysis of the small RNA transcriptional response in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* after antimicrobial exposure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 3864–3874. doi: 10.1128/aac.00263-13
- Jiang, Q., Jin, Z., and Sun, B. (2018). MgrA negatively regulates biofilm formation and detachment by repressing the expression of psm operons in *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, e1008–e1018.
- Jørgensen, M. G., Pettersen, J. S., and Kallipolitis, B. H. (2020). sRNA-mediated control in bacteria: an increasing diversity of regulatory mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* 1863:194504. doi: 10.1016/j.bbagr.2020.194504
- Jousselin, A., Metzinger, L., and Felden, B. (2009). On the facultative requirement of the bacterial RNA chaperone, Hfq. *Trends Microbiol.* 17, 399–405. doi: 10.1016/j.tim.2009.06.003
- Kinkel, T. L., Roux, C. M., Dunman, P. M., and Fang, F. C. (2013). The *Staphylococcus aureus* SrrAB two-component system promotes resistance to nitrosative stress and hypoxia. *mBio* 4, e696–e613.
- Lalaouna, D., Baude, J., Wu, Z., Tomasini, A., Chicher, J., Marzi, S., et al. (2019). RsaC sRNA modulates the oxidative stress response of *Staphylococcus aureus* during manganese starvation. *Nucleic Acids Res.* 47, 9871–9887. doi: 10.1093/nar/gkz728
- Lalaouna, D., Carrier, M. C., Semsey, S., Brouard, J. S., Wang, J., Wade, J. T., et al. (2015). A 3' external transcribed spacer in a tRNA transcript acts as a sponge for small RNAs to prevent transcriptional noise. *Mol. Cell* 58, 393–405. doi: 10.1016/j.molcel.2015.03.013
- Li, T., He, L., Song, Y., Villaruz, A. E., Joo, H. S., Liu, Q., et al. (2015). AraC-Type regulator Rsp adapts *Staphylococcus aureus* gene expression to acute infection. *Infect. Immun.* 84, 723–734. doi: 10.1128/iai.01088-15
- Liu, W., Rochat, T., Toffano-Nioche, C., Le Lam, T. N., Boulou, P., and Morvan, C. (2018). Assessment of bona fide sRNAs in *Staphylococcus aureus*. *Front. Microbiol.* 9:228. doi: 10.3389/fmicb.2018.00228
- Mäder, U., Nicolas, P., Depke, M., Pané-Farré, J., Debarbouille, M., Van Der Kooy, Pol, M. M., et al. (2016). *Staphylococcus aureus* transcriptome architecture: from laboratory to infection-mimicking conditions. *PLoS Genet.* 12:e1005962. doi: 10.1371/journal.pgen.1005962
- Marincola, G., Schäfer, T., Behler, J., Bernhardt, J., Ohlsen, K., Goerke, C., et al. (2012). RNase Y of *Staphylococcus aureus* and its role in the activation of virulence genes. *Mol. Microbiol.* 85, 817–832. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08144.x
- Marroquin, S., Gimza, B., Tomlinson, B., Stein, M., Frey, A., Keogh, R. A., et al. (2019). MroQ is a novel abi-domain protein that influences virulence gene expression in *Staphylococcus aureus* via modulation of agr activity. *Infect. Immun.* 87, e00002–e00019.
- Mercier, N., Prévost, K., Massé, E., Romby, P., Caldelari, I., and Lalaouna, D. (2021). MS2-Affinity purification coupled with RNA sequencing in gram-positive bacteria. *J. Vis. Exp.* 23.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Pascale Romby for helpful advice and discussions.

- Morrison, J. M., Miller, E. W., Benson, M. A., Alonzo, F. 3rd, Yoong, P., Torres, V. J., et al. (2012). Characterization of SSR42, a novel virulence factor regulatory RNA that contributes to the pathogenesis of a *Staphylococcus aureus* USA300 representative. *J. Bacteriol.* 194, 2924–2938. doi: 10.1128/jb.06708-11
- Nielsen, J. S., Christiansen, M. H., Bonde, M., Gottschalk, S., Frees, D., Thomsen, L. E., et al. (2011). Searching for small σ B-regulated genes in *Staphylococcus aureus*. *Arch. Microbiol.* 193, 23–34. doi: 10.1007/s00203-010-0641-1
- Pichon, C., and Felden, B. (2005). 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. doi: 10.1073/pnas.0503838102
- Rochat, T., Bohn, C., Morvan, C., Le Lam, T. N., Razvi, F., Pain, A., et al. (2018). The conserved regulatory RNA RsaE down-regulates the arginine degradation pathway in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res.* 46, 8803–8816. doi: 10.1093/nar/gky584
- Sassi, M., Augagneur, Y., Mauro, T., Ivain, L., Chabelskaya, S., Hallier, M., et al. (2015). SRD: a *Staphylococcus* regulatory RNA database. *RNA* 21, 1005–1017. doi: 10.1261/rna.049346.114
- Schoenfelder, S. M. K., Lange, C., Prakash, S. A., Marincola, G., Lerch, M. F., Wencker, F. D. R., et al. (2019). The small non-coding RNA RsaE influences extracellular matrix composition in *Staphylococcus epidermidis* biofilm communities. *PLoS Pathog.* 15:e1007618. doi: 10.1371/journal.ppat.1007618
- Sorensen, H. M., Keogh, R. A., Wittekind, M. A., Caillet, A. R., Wiemels, R. E., Laner, E. A., et al. (2020). Reading between the lines: utilizing RNA-Seq data for global analysis of sRNAs in *Staphylococcus aureus*. *mSphere* 5, e439–e420.
- Tomasini, A., François, P., Howden, B. P., Fechter, P., Romby, P., and Caldelari, I. (2013). The importance of regulatory RNAs in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Genet. Evol.* 21, 616–626. doi: 10.1016/j.meegid.2013.11.016
- Zapf, R. L., Wiemels, R. E., Keogh, R. A., Holzschu, D. L., Howell, K. M., Trzeciak, E., et al. (2019). The small RNA Teg41 regulates expression of the alpha phenol-soluble modulins and is required for virulence in *staphylococcus aureus*. *mBio* 10, e2484–e2418.

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Barrientos, Mercier, Lalaouna and Caldelari. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

III. Mécanismes de régulation de biofilm par les sARN chez d'autres bactéries

Le passage d'un état planctonique à un mode de vie immobile n'est pas anodin et doit être contrôlé par un réseau de régulation complexe. Outre les différents acteurs protéiques et environnementaux, on retrouve les sARN au cœur de la régulation de la formation de biofilm chez les bactéries. Dans la suite de ce paragraphe, sont décrit quelques exemples captivants de la régulation de la formation de biofilm par les sARN dans le monde bactérien.

Chez la bactérie modèle *E. coli*, l'ARN régulateur McaS (*multicellular adhesive*) interagit directement avec la région 5'UTR du transcrit *csgD*. Le duplexe est la cible de l'endoribonucléase E conduisant à la diminution de l'expression de CsgD (Andreassen *et al.*, 2018). Cette protéine est le régulateur transcriptionnel majeur activant la production des fibres amyloïdes, essentielles à l'agrégation intra-cellulaire et à l'adhésion de surface. Par conséquent, la dégradation de l'ARNm *csgD* induite par McaS conduit à la diminution de la formation de biofilm. Les deux sARN CsrB et CsrC se lient à la protéine CsrA et la séquestrent, limitant son action régulatrice sur ses ARNm cibles. Précisément, CsrA réprime la formation de biofilms par de multiples mécanismes, notamment en inhibant la synthèse de β -1,6-N-acétyl-D-glucosamine. Ainsi, le duo de sARN CsrB/CsrC favorise indirectement la formation de biofilm (Weilbacher *et al.*, 2003).

Chez *P. aeruginosa*, le complexe du sARN ErsA et de l'ARNm *algC* avec la protéine chaperone Hfq inhibe la traduction de l'enzyme AlgC, qui fournit les précurseurs essentiels à la synthèse de polysaccharides qui composeront la matrice extra-cellulaire (Ferrara *et al.*, 2015). D'un autre côté, ErsA active la traduction de l'ARNm *armZ*, un facteur transcriptionnel qui favorise la maturation de biofilm. Plus récemment, l'équipe de Cao *et al.* (2023) a identifié le sARN SicX exprimé abondamment dans le contexte d'infections de blessures et de mucoviscidose. L'augmentation de SicX en conditions d'anaérobiose est associée à une infection chronique et au biofilm. À l'inverse, la diminution de SicX est liée au passage des bactéries à un état planctonique, synonyme d'infection aiguë (Cao *et al.*, 2023).

Objectifs de la thèse

Comme illustré dans cette introduction de manière non exhaustive, la formation des biofilms est intimement liée au contexte dans lequel la bactérie évolue. Des passerelles co-existent entre les mécanismes mis en jeu dans la formation des biofilms, les réponses au stress, la virulence, mais aussi dans la compétition entre bactéries pour l'accès aux ressources disponibles et limitées. Les ARN régulateurs participent à obtenir une régulation fine et rapide qui est particulièrement appropriée pour tous ces processus adaptatifs. C'est pourquoi je me suis intéressée à mieux définir la fonction et le mécanisme d'action des sARN dans les réseaux de régulation de la formation de biofilm qui constituent une source majeure d'échecs thérapeutiques dans les infections à *S. aureus*. Des expériences de MAPS avaient été effectuées au laboratoire (Eva Renard, manuscrit M2, 2018) en utilisant l'ARNm *icaR* comme appât. Les résultats ont révélé que trois sARN interagiraient avec *icaR* : RsaI, RsaA, déjà décrits comme impliqués dans le contrôle des biofilms (Bronesky *et al*, 2019, Tomasini *et al*, 2017) et RsaE. Ces résultats suggéraient que l'ARNm *icaR* est au centre d'un réseau de régulation complexe dont l'étude a été le point de départ de mon travail de thèse. Dans un premier temps, j'ai analysé le targetome (l'ensemble des cibles ARN) de RsaE par l'approche MAPS, décrite dans le **chapitre 1** révélant de nouvelles cibles impliquées dans les biofilms *ica*-dépendant et -indépendant. Mes données révèlent aussi que les sARN RsaI et RsaE seraient des partenaires potentiels : la caractérisation du duplexe RsaI/RsaE est adressée lors du **chapitre 2**. Finalement, afin de comprendre les possibles interactions établies entre RsaA, RsaE et RsaI dans le contexte de la régulation de l'expression de *icaR*, j'ai construit les doubles et triple mutants au niveau des gènes des sARN dont la caractérisation des souches est décrite dans le **chapitre 3**. Ces données mettent en lumière l'importance de la description des mécanismes de régulation des sARN dans la régulation de biofilm chez *S. aureus*.

Etant consciente que le MAPS présente quelques limites, dont celle qui est de renouveler cette approche pour chaque sARN, je voulais m'investir dans une méthode plus globale afin de suivre les interactions ARN-ARN au cours de la formation d'un biofilm. C'est pourquoi, pour le second projet de ma thèse, j'ai mis au point et adapté plusieurs étapes de la technique de DBRI (*direct determination of bacterial RNA-RNA interactome*), déjà développée au sein du laboratoire par Emma Desgranges (thèse de doctorat, 2020). Cette méthode d'identification de

l'interactome ARN-ARN a été utilisée dans des conditions de cultures en milieu riche et en phase exponentielle de croissance. Ceci m'a permis d'obtenir suffisamment de matériel biologique pour déterminer les paramètres optimaux ou limitant associés à chaque étape du procédé. L'objectif à long terme est d'utiliser cette technique avec des bactéries soumises à des stress et nécessitant l'intervention de sARN spécifiques afin de s'adapter aux changements environnementaux.

I. Implication des sARN dans la régulation de la formation de biofilm chez *S. aureus*

IcaR est le répresseur majeur de l'opéron *icaADBC* responsable de la production de l'exopolysaccharide PIA/PNAG chez *S. aureus*. Ce sucre est le composant majeur de la matrice extracellulaire sécrétée lors de la formation de biofilm *ica*-dépendant. Étonnement, l'ARNm *icaR* serait la cible de trois ARN régulateurs, chacun ayant des cibles spécifiques mais qui partagent la fonction commune de réguler l'expression de ce régulateur.

Comme énoncé précédemment, l'identification des cibles potentielles de RsaE dévoile de multiples acteurs de la formation de biofilm comme l'ARNm *icaR*. On retrouve également les transcrits des opérons *psmA* et *psm β* , à l'origine de la production de peptides biosurfactants ; ainsi que l'opéron *lrgAB*, dont l'expression est essentielle à l'inhibition de la sécrétion d'ADNe.

a) Régulation de la formation de biofilm *ica*-dépendant et *ica*-indépendant par le sARN RsaE

La première partie de l'étude repose sur la caractérisation du duplexe *icaR*/RsaE et de ses conséquences sur la traduction de l'ARNm et donc de la production de PIA/PNAG. Dans un second temps, l'objectif a été de valider *in vitro* et *in vivo* l'interaction de RsaE avec les transcrits des opérons *psmA* et *psm β* et de déterminer quelles étaient les effets de la fixation de RsaE sur la synthèse des PSM. L'effet de RsaE sur la production de biofilm a été analysé à la fois par l'étude de la formation et de la composition de la matrice de biofilm, et à la fois par l'analyse de la modulation de l'expression de ses composants issus du locus *ica* (PIA/PNAG) ou des opérons *psmA* et *psm β* .

b) Régulation de l'expression d'*icaR* par les trois sARN

Les données de MAPS suggèrent que RsaI et RsaE interagissent ensemble, ce qui devrait entraîner des conséquences directes sur les activités régulatrices de chaque sARN. La caractérisation du duplexe RsaI/RsaE permettrait de formuler l'hypothèse selon laquelle RsaI interférerait sur la capacité de RsaE à réguler la formation de biofilm.

Les prédictions d'interactions effectuées *in silico* indiquaient que chaque sARN se lierait à une région différente de l'ARNm *icaR* : RsaI et RsaA sur la région 3'UTR et RsaE sur la séquence Shine et Dalgarno. *A priori*, il n'y aurait donc pas de compétition entre les sARN quant à la fixation sur l'ARNm. Dans un premier temps, j'ai validé les interactions *in vitro* entre *icaR* et les trois ARN régulateurs, confirmant les prédictions. Enfin, dans un second temps, cette étude ambitionnait de caractériser *in vivo* la dynamique de ces trois sARN sur la régulation de l'expression de l'opéron *icaADBC* et de la production de biofilm. Ce chapitre de thèse s'inscrit dans la définition des mécanismes de régulation impliquant et reliant RsaA, RsaI et RsaE dans la régulation de biofilm *ica*-dépendant et met en lumière la complexité des mécanismes mis en place par la bactérie pour utiliser les biofilms comme moyen de protection contre les défenses de l'hôte.

II. Mise au point d'une méthode de caractérisation de l'interactome ARN-ARN

Le développement des outils d'identification des duplexes ARN-ARN mis au point ces dernières années repose principalement sur les duplexes dont la formation est médiée par des protéines, comme la protéine chaperonne Hfq ou les RNases. La méthode du MAPS permet d'outre-passer cette nécessité d'intermédiaire protéique et d'identifier les partenaires ARN, mais se limite à l'interactome d'un seul ARN et requiert l'addition d'une étiquette pour la purification. Certaines techniques déjà développées chez les eucaryotes comme le LigR (Sharma *et al.*, 2016), le SPLASH (Aw *et al.*, 2016b) ou PARIS (Lu *et al.*, 2016) s'appuient sur le pontage des duplexes ARN *in vivo* par les UV, suivi d'une ligation de proximité des ARN en interaction, puis de l'identification des partenaires ARN par séquençage des chimères. La technique du DBRI s'inspire de ces méthodes et a été initiée dans le laboratoire chez *S. aureus* par Emma Desgranges. Mon objectif était d'optimiser certaines étapes du protocole pour

améliorer la spécificité des chimères produites. Le but est d'identifier l'interactome dans le contexte de conditions classiques de culture et de valider la méthode en identifiant des duplexes ARN déjà démontrés dans la littérature. A plus long terme, cette technique pourra être utilisée dans des conditions de stress retrouvées lors d'infections comme des carences en nutriments et métaux, une exposition à des antibiotiques, ou encore une culture en sérum humain ou lors de la formation d'un biofilm. Ces expériences permettront de caractériser les réseaux de régulations médiés par les sARN qui interviennent dans chaque contexte. Ce projet a été mené en collaboration avec B. Voss (Université de Stuttgart) pour l'analyse bioinformatique de mes résultats.

Chapitre 1 : Régulation de la formation de biofilms par RsaE

Résultats

I. Les cibles ARNm du sARN RsaE révélées par la méthode du MAPS

La méthode du MAPS a été utilisée pour identifier le targetome de RsaE (**tableau 7**). Cette expérience révèle l'identité des partenaires ARN potentiels de RsaE lors d'une culture de 6 H en BHI (Isabelle Caldelari, non publié). Les résultats de cette expérience se démarquent par le nombre réduit de partenaires ARN identifiés dans ces conditions, suggérant que la spécificité des cibles soit élevée. Parmi les ARNm identifiés, on retrouve certaines cibles déjà caractérisées dans la littérature : des acteurs du cycle de Krebs (*sucCD*, *citB*), des voies de dégradation des acides aminés (*rocF*, *gcvPB*), du métabolisme des tétrahydrofolate (*fhs*) ou du transport d'oligopeptide (*opp*), validant notre approche. On notera la présence de l'ARN régulateur RsaI, dont l'interaction avec l'ARN RsaE sera explorée dans le **chapitre 2**, et de ses cibles directes telles que des enzymes reliées au métabolisme du glucose (*glcU* et *treB*), *fn3K* ou *icaR* (Bronesky *et al.*, 2019). On retrouve également le transcrit de l'opéron PSM β suivi de l'opéron PSM α qui interviennent tous les deux dans la formation de biofilm *ica*-indépendant (Periasamy *et al.*, 2012). D'autres ARNm cibles sont potentiellement impliquées dans la formation de biofilm : l'opéron *lrgAB* responsable de l'inhibition de la sécrétion d'ADNe, et l'ARNm codant PfbA, une adhésine qui favorise les interactions intra-cellulaires.

MS2contr_R1	MS2contr_R2	MS2RsaE_R1	MS2RsaE_R2	baseMean	FoldChange	log2FoldChange	pvalue	padj	HG001_XXXX	Gène
555	365	8283	5874	3735.46	15.298	3.935	2.43E-36	4.21E-33	HG001_03243;HG001_00847	RsaE
6	9	135	80	57.41	14.014	3.809	2.20E-09	2.95E-07	HG001_01262	-
756	521	6572	3005	2722.39	7.544	2.915	7.28E-13	2.11E-10	HG001_01022	psmB1
705	415	5266	2173	2150.14	6.741	2.753	4.17E-10	6.60E-08	HG001_01023	psmB2
38	24	219	203	119.02	6.689	2.742	7.75E-12	1.69E-09	HG001_02704	icaR/icaR
240	210	1518	1015	741.9	5.544	2.471	5.75E-14	2.50E-11	HG001_00862	-
16	14	82	82	47.72	5.315	2.441	4.86E-06	4.23E-04	HG001_00263	yblJ
396	248	1622	1705	973.41	5.076	2.344	4.71E-18	4.10E-15	HG001_01025	-
54	40	271	202	140.48	4.962	2.311	4.79E-09	5.95E-07	HG001_03170	RsaX25
14767	8106	62840	47132	32843.63	4.807	2.265	2.08E-12	5.17E-10	HG001_02347;HG001_03272	RsaL
324	306	1633	1400	905.75	4.691	2.23	3.56E-16	2.07E-13	HG001_01688	fadM
207	141	821	619	442.72	4.096	2.034	3.84E-10	6.60E-08	HG001_00785	yilD
382	345	1391	1300	843.84	3.602	1.849	5.77E-13	1.99E-10	HG001_02628	fn3K
6302	4706	27044	12380	12650.07	3.592	1.845	3.46E-06	3.17E-04	HG001_02755	psmA
177	105	563	414	311.63	3.449	1.786	5.36E-07	5.49E-05	HG001_00120	-
139	114	447	395	270.61	3.255	1.703	2.90E-08	3.36E-06	HG001_02191	arg/rocF
326	249	1174	644	597.94	3.149	1.655	1.14E-05	8.65E-04	HG001_02587	ogt
72	70	190	222	136.29	2.798	1.484	1.59E-05	1.12E-03	HG001_02293	glcU
396	227	845	898	580.26	2.757	1.463	7.84E-07	7.58E-05	HG001_01052	pyrC
72	64	218	161	128.03	2.733	1.45	1.99E-04	9.23E-03	HG001_00386	treB
146	106	368	320	232.27	2.683	1.424	9.52E-06	7.53E-04	HG001_01952	pfbA
3087	2461	7463	7781	5119.99	2.677	1.421	1.47E-10	2.84E-08	HG001_02371	hutG
86	90	251	217	159.82	2.581	1.368	1.04E-04	5.15E-03	HG001_00767	tlvC
4947	3908	10877	12201	7850.92	2.534	1.342	5.83E-10	8.46E-08	HG001_01096	sucC
223	132	406	502	308.81	2.504	1.324	2.10E-05	1.36E-03	HG001_01051	pyrB
1150	717	2651	2012	1616.29	2.483	1.312	2.06E-05	1.36E-03	HG001_00329	-
1154	593	2211	2124	1493.86	2.466	1.302	2.97E-05	1.78E-03	HG001_01053	carA
140	75	287	230	180.65	2.394	1.26	1.00E-03	3.23E-02	HG001_03221	sRNA380
51	55	119	143	90.69	2.374	1.247	1.58E-03	4.59E-02	HG001_02495	ybbL
2010	1040	3651	3497	2505.38	2.329	1.22	7.17E-05	3.67E-03	HG001_01054	carB
2162	2839	7053	4786	4217.01	2.293	1.197	4.75E-04	1.80E-02	HG001_02520	-
114	97	286	198	173.06	2.257	1.175	1.70E-03	4.86E-02	HG001_01178	cls 1
14710	8086	28185	23091	18276.88	2.242	1.165	1.58E-04	7.64E-03	HG001_01653	fhs
530	481	1030	1171	791.72	2.105	1.074	7.18E-06	5.95E-04	HG001_02336	adh
10188	5747	17637	15390	12068.7	2.06	1.043	4.09E-04	1.65E-02	HG001_02222	asp23
554	481	1049	1128	792.44	2.041	1.029	1.69E-05	1.17E-03	HG001_00642	-
489	377	830	960	653.22	2.009	1.007	4.32E-05	2.50E-03	HG001_00643	csbB
754	635	1518	1268	1035.68	1.964	0.974	3.01E-04	1.31E-02	HG001_02403	mgo1
596	382	794	1178	719.88	1.958	0.97	8.03E-04	2.69E-02	HG001_00913	fold
299	278	593	568	430.42	1.954	0.967	3.72E-04	1.54E-02	HG001_00629	ybhI
259	183	421	459	325.25	1.945	0.96	6.53E-04	2.27E-02	HG001_01461	gcvT
307	310	624	616	460.12	1.944	0.959	4.35E-04	1.72E-02	HG001_01768	traP
2095	1785	3259	4275	2804.55	1.873	0.905	7.11E-05	3.67E-03	HG001_00206	lrpB
1269	1060	1697	2845	1678.96	1.868	0.901	1.19E-03	3.68E-02	HG001_01915	ptpA
387	345	713	683	526.88	1.855	0.892	6.77E-04	2.31E-02	HG001_01611	phoR
4957	4410	7592	9515	6518.73	1.761	0.816	2.01E-04	9.23E-03	HG001_02127	murA1
5089	4947	7860	10306	6947.28	1.736	0.796	5.98E-04	2.17E-02	HG001_02588	clpL
1840	2833	3252	3239.66	1.732	1.732	0.792	3.12E-04	1.33E-02	HG001_02216	iucA 2
2948	2056	4058	4746	3393.58	1.717	0.78	9.30E-04	3.05E-02	HG001_01097	sucD
10391	9561	15497	19318	13498.98	1.68	0.749	6.51E-04	2.27E-02	HG001_00413	purR

Tableau 7 : Partenaires ARN potentiels de RsaE identifiés par la méthode du MAPS

Les résultats sont exprimés en FoldChange des réplicats des échantillons MS2-RsaE par rapport aux contrôles MS2. Précisément, les ARN identifiés sont comptés pour chaque échantillon afin de définir les ARN enrichi spécifiquement entre MS2-RsaE et MS2. Les détails de l'analyse bio-informatique associée à cette expérience sont amplement décrits dans le Jove (Mercier et al., 2021). Les cibles de RsaE déjà identifiées et caractérisées dans la littérature sont en **BLEU**, les cibles de RsaL en **VERT**, le messager *icaR* impliqué dans la formation de biofilm *ica*-dépendant en **ORANGE**, les opérons responsables de la formation de biofilm *ica*-indépendant en **ROSE**.

II. Formation de biofilm *ica*-dépendant

a) RsaE interagit avec l'ARNm *icaR*

Il a été montré que RsaE régula l'expression du messager *icaR* chez *S. epidermidis* (Schoenfelder *et al.*, 2019). Comme il apparaît avec un facteur d'enrichissement de presque 7 dans le MAPS, j'ai prédit *in silico* (**figure 14**) que RsaE posséderait deux sites d'interactions éventuels avec *icaR*. Le premier se situe au début de l'ORF, le second est localisé au niveau de la séquence SD, et ces deux sites impliquent les motifs riches en C de RsaE. Ainsi d'après les prédictions, le premier motif riche en C se fixerait au niveau de la séquence codante d'*icaR* entre les nucléotides +39 et +61 à partir du codon start UUG. Quant au deuxième motif riche en C, il se lierait à la séquence SD entre les nucléotides -19 et -9. Néanmoins, puisque l'identité de séquence des deux motifs de RsaE est élevée, il est envisageable qu'ils soient interchangeables. L'interaction potentielle de RsaE au niveau de la séquence SD suggère que RsaE interférerait avec l'initiation de la traduction d'*icaR*, comme c'est le cas avec les nombreuses cibles déjà décrites du sARN.

Dans l'objectif de confirmer la liaison de RsaE sur l'ARNm *icaR*, des expériences de retard sur gel ont été réalisées. Ces expériences ont été effectuées avec RsaE radiomarké à l'extrémité 5' qui a été incubé avec le transcrit *icaR* en entier, l'extrémité 3' ou la région 5'UTR d'*icaR* (**figure 15**). Les résultats *in vitro* concordent avec les prédictions *in silico* : RsaE interagit avec l'ARNm *icaR* au niveau du 5'UTR et non au niveau du 3'UTR. En revanche, nous n'observons pas de « super-shift » qui indiquerait que deux molécules de RsaE se lieraient à un même transcrit d'*icaR*. Par ailleurs, il a été montré que la formation du duplexe 3'UTR/5'UTR d'*icaR* qui implique l'hybridation de la séquence anti-SD avec la séquence SD inhibe la traduction de l'ARNm et active la production de PIA-PNAG. RsaE, en se fixant également sur la séquence SD, pourrait interférer avec cette régulation. Des expériences de compétition ont été réalisées en incubant conjointement le fragment 5' d'*icaR* radiomarké, des concentrations croissantes du 3' d'*icaR* et une concentration constante du sARN RsaE (**figure 16**). Les résultats révèlent que la formation du duplexe 5'*icaR*/RsaE est favorisée au détriment de la formation du duplexe 5'/3', et ce malgré l'incubation du fragment 5' avec des quantités conséquentes de la région 3'. On notera la présence d'une faible proportion de la formation

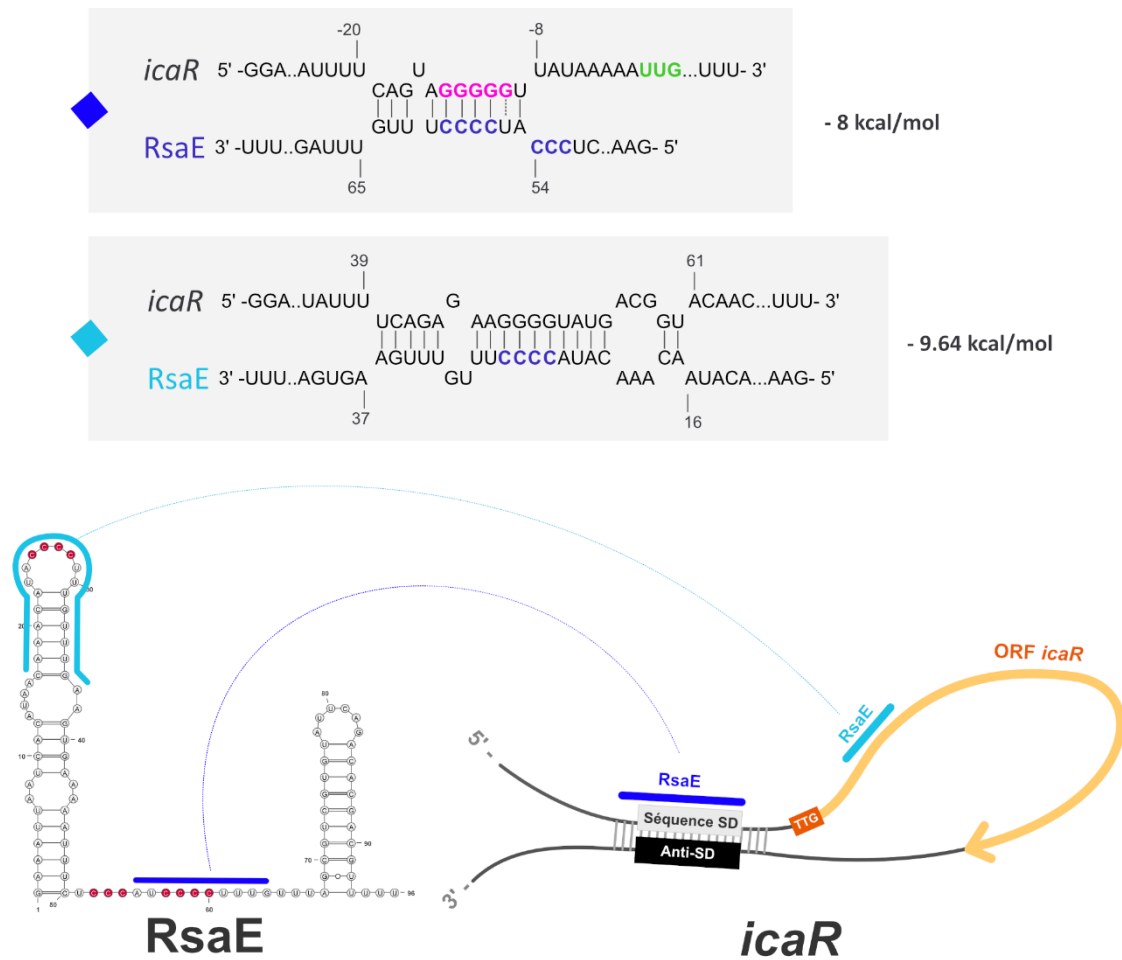


Figure 14 : Modèle des deux régions d'interaction prédites entre RsaE et l'ARNm *icaR*

Les prédictions sont réalisées en utilisant le logiciel IntaRNA. La séquence **Shine & Dalgarno**, le codon **START** et les **motifs riches en cytosine** de RsaE sont indiqués.

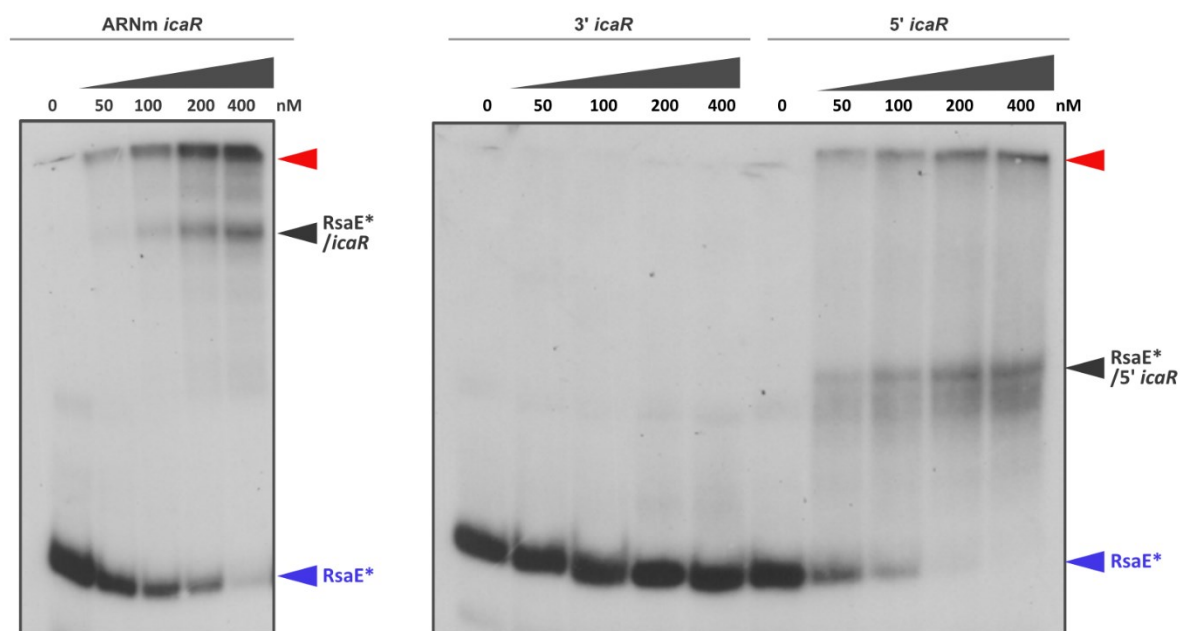


Figure 15 : RsaE interagit avec l'ARNm *icaR* au niveau de l'extrémité 5' du messager

Les expériences de retard sur gel sont réalisées avec le sARN **RsaE** radiomarcué (*) qui est incubé avec des concentrations croissantes de l'ARNm *icaR* et des fragments correspondants aux extrémités 3' et 5'. La quantité des ARN cibles sont indiquées en haut des radiographies des gels. La flèche **rouge** montre les duplexes qui sont restés dans les puits du gel lors de la migration des échantillons.

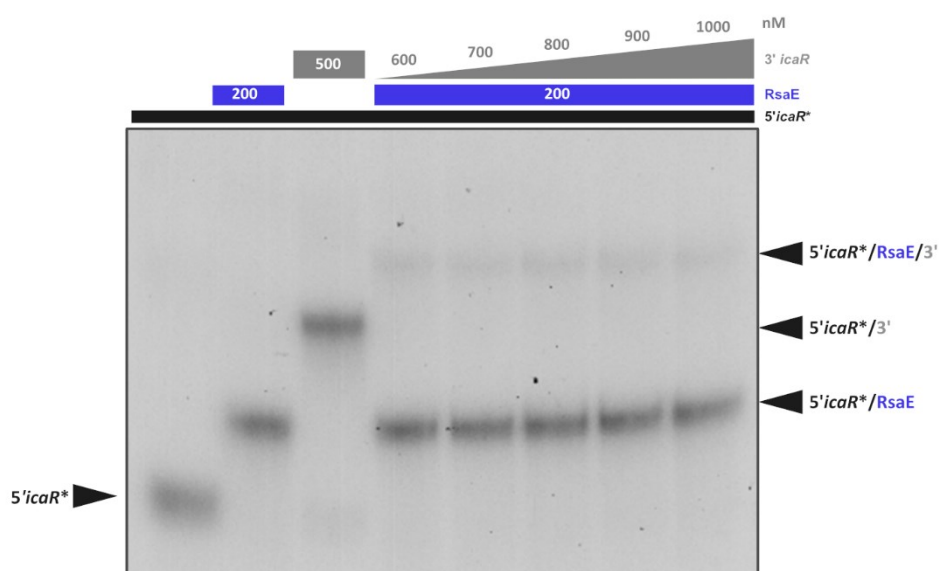


Figure 16 : RsaE empêche la formation du duplexe 3'/5' de l'ARNm *icaR*

Les expériences de retard sur gel sont réalisées avec la région 5' d'*icaR* radiomarcuée (*) qui est incubée avec des concentrations croissantes de la région 3' de l'ARNm *icaR* et une concentration constante du sARN **RsaE**.

d'un complexe ternaire 5'*icaR*/3'*icaR*/RsaE. Ce complexe ternaire peut s'expliquer par la fixation de RsaE au niveau du second site potentiel d'interaction avec *icaR*, c'est-à-dire le site de fixation de RsaE localisée au niveau de l'ORF. Cette interaction n'entrerait donc pas en compétition avec la formation du complexe 5'*icaR*/3'*icaR*.

Afin de vérifier quel motif riche en cytosine de RsaE serait impliqué dans l'interaction du sARN avec l'ARNm *icaR*, des substitutions nucléotidiques ont été effectuées au sein de chaque motif, conduisant à la production de deux mutants de RsaE nommés mutant 1 et mutant 2 (**figure 17A**). La modification du premier motif riche en C de RsaE conduit à la perte totale de l'interaction du sARN avec l'extrémité 5' d'*icaR* (**figure 17B**). L'interaction 5'*icaR*/RsaE mutant 2 est conservée malgré une légère diminution de l'affinité apparente des duplexes formés. Ces expériences de retard sur gel démontrent que le premier motif riche en cytosine de RsaE serait essentiel dans l'interaction du sARN avec l'ARNm *icaR*.

b) L'interaction de RsaE avec la région 5'UTR d'*icaR* induit le clivage de l'ARNm par la RNase III

Comme il a été démontré par l'équipe de Ruiz de los Mozos (2013), le duplexe formé par le 3'UTR et le 5'UTR de l'ARNm *icaR* entraîne la séquestration de la séquence SD et induit le clivage du complexe par la RNase III. Par conséquent, l'hypothèse est que l'interaction de RsaE avec le 5'UTR d'*icaR* conduirait également au clivage de l'ARNm par la RNase III. Les expériences de clivage *in vitro* par la RNase III (**figure 18**) confirment que la liaison de RsaE sur la région 5' d'*icaR* induirait le clivage de ce dernier au niveau de 2 sites différents : un au niveau de l'ORF d'*icaR*, et un second en amont de la séquence SD. Pour le duplexe 3'*icaR*/5'*icaR*, on retrouve également le premier site de clivage, celui localisé dans l'ORF d'*icaR*, mais le site situé au niveau de la séquence SD est situé plus en aval. Cette expérience devra être répétée avec RsaE radiomarké afin de déterminer la localisation des clivages sur le sARN.

c) RsaE interfère avec l'initiation de la traduction d'*icaR*

Les prédictions *in silico* et les expériences de clivage à la RNase III suggèrent que RsaE se lierait au niveau de la séquence SD de l'ARNm *icaR*. Rationnellement, l'interaction de RsaE sur le messager aurait donc un impact sur l'initiation de sa traduction en séquestrant le site de fixation du ribosome. Des expériences d'empreinte du ribosome (**figure 19**) ont été effectuées

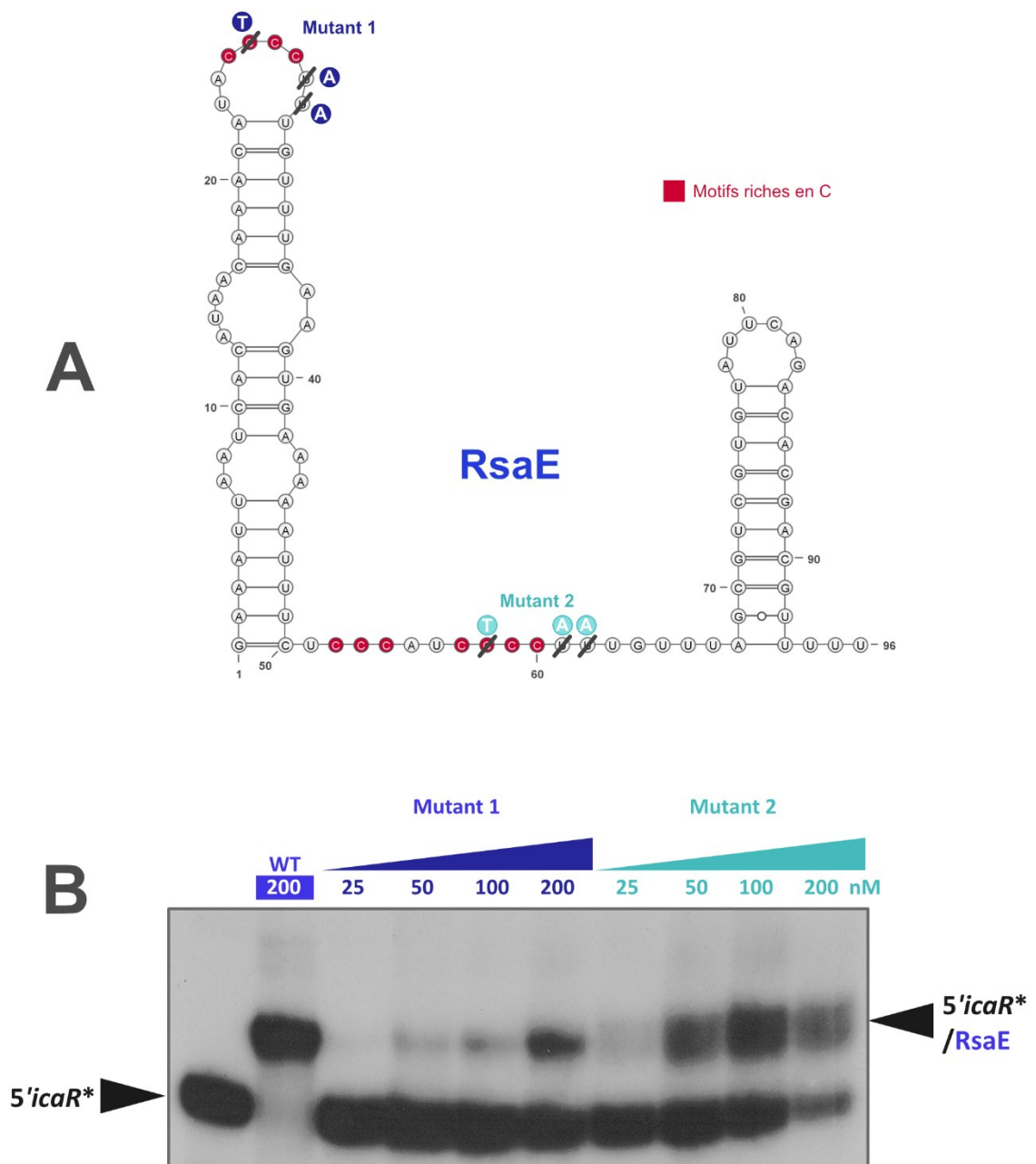


Figure 17 : Le premier motif riche en cytosine de RsaE est impliqué dans l'interaction avec l'extrémité 5' d'*icaR*. A) Modèle de la structure secondaire de RsaE selon Geissmann et al. (2015). Les substitutions réalisées dans les mutants 1 et 2 sont indiquées respectivement en **bleu foncé** et en **bleu clair**. B) Les expériences de retard sur gel sont réalisées avec le fragment 5' d'*icaR* radiomarqué (*) qui est incubé avec des concentrations croissantes des deux versions du sARN RsaE mutées.

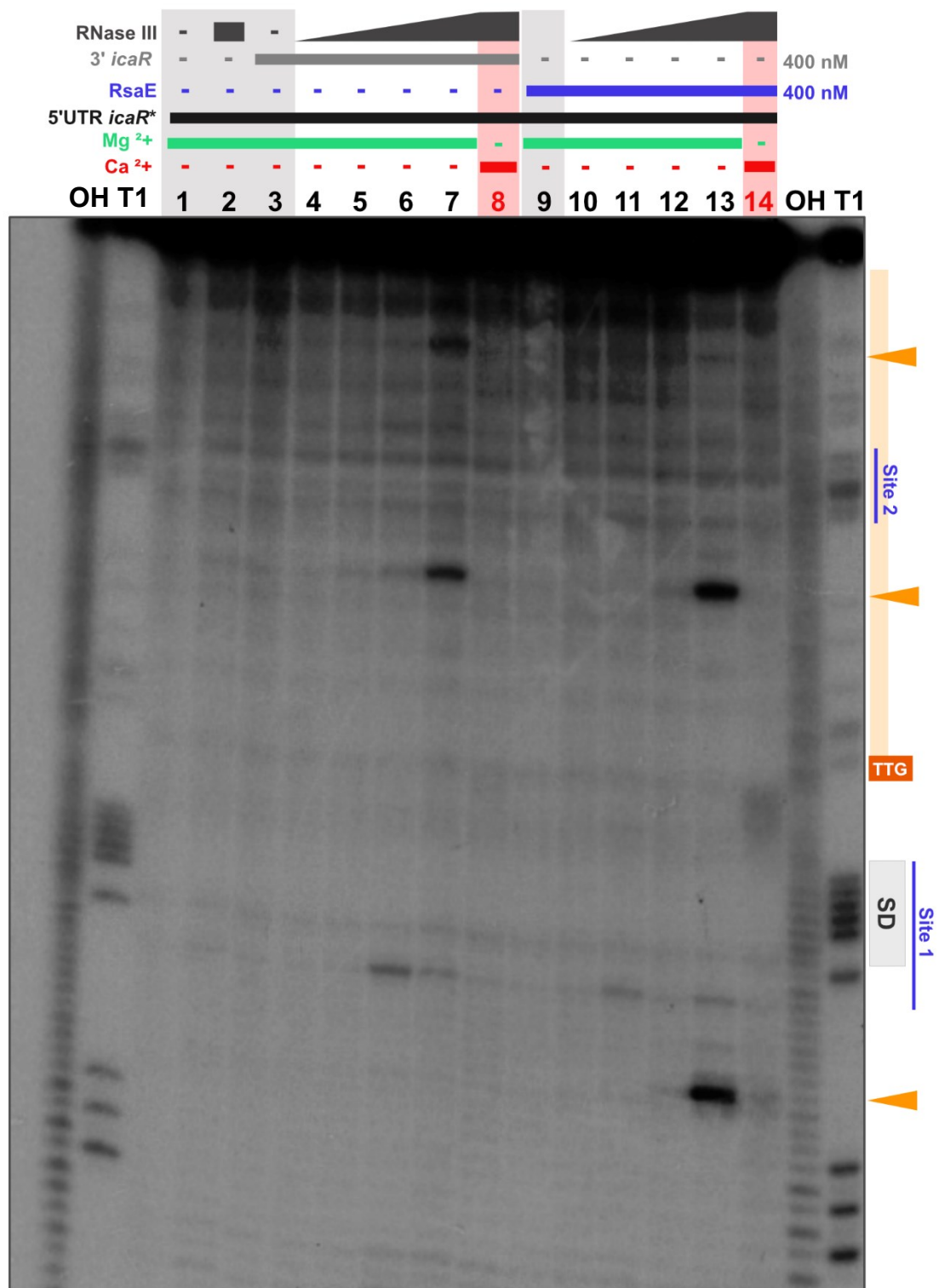


Figure 18 : RsaE provoque le clivage de la région 5'UTR d'*icaR* par la RNase III

Les expériences *in vitro* de clivage par la RNase III sont effectuées en incubant le fragment 5'UTR d'*icaR* radiomarqué (*) avec des concentrations croissantes de la RNase III de *S. aureus* purifiée, en présence de la région 3'UTR d'*icaR* ou du sARN RsaE. Le **magnésium** est essentiel à l'activité de la RNase III, à l'inverse, le **calcium** inhibe son activité. L'échelle alcaline (OH) coupe entre chaque nucléotide et l'échelle T1 après les G. Elles permettent d'identifier et de localiser les séquences nucléotidiques impliquées. Les sites de clivages sont représentés par des **flèches**, et les sites de liaison potentiels de RsaE sont représentés en **bleu**.

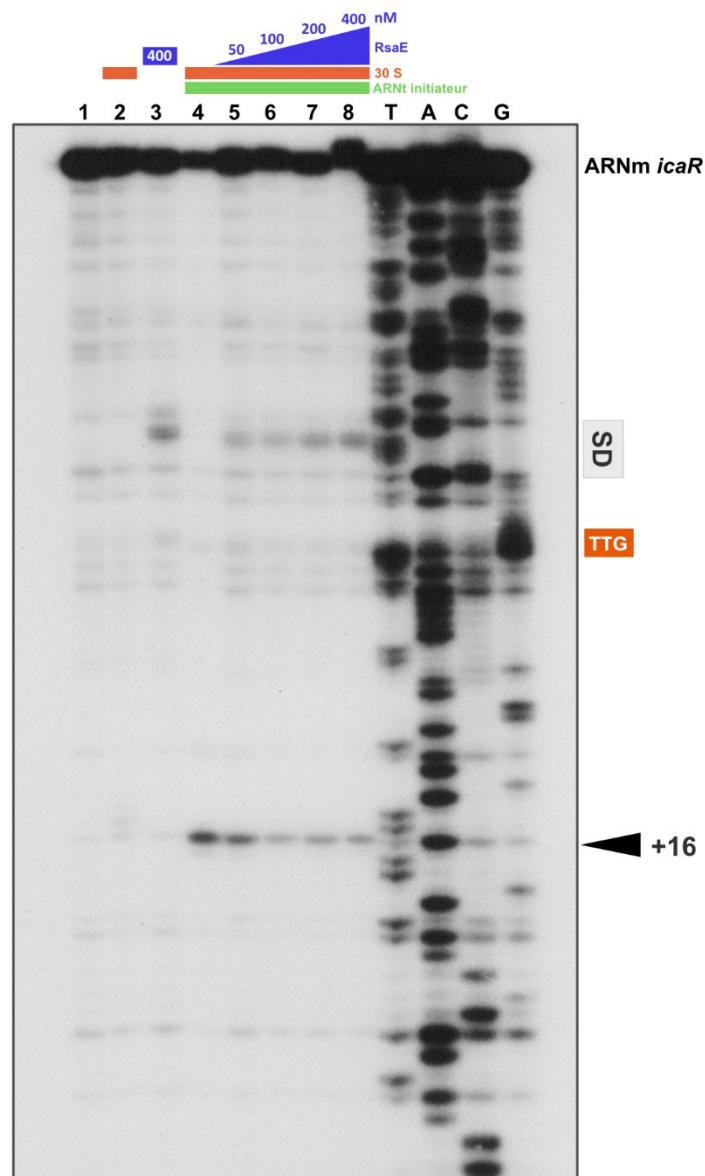


Figure 19 : RsaE interfère avec l'initiation de la traduction de l'ARNm *icaR*

Le complexe d'initiation de la traduction est formé suite à l'incubation de l'ARNm *icaR* avec l'ARNt initiateur et la sous unité ribosomale 30S de *S. aureus*, en présence de concentrations croissantes de RsaE. Les échantillons sont visualisés après RT en utilisant une amorce radioactive, dont l'élongation sera interrompue par la présence de complexes liés à l'ARNm notamment la fixation du ribosome en position +16 indiquée par une . Les échelles de séquence A, T, G et C sont réalisées par la méthode de Sanger sur l'ARNm *icaR*. La séquence Shine et Dalgarno (SD) et le codon START (TTG) d'*icaR* sont indiqués.

Des échantillons contrôles sont effectués : **Ligne 1** : Incubation de l'ARNm seul

Ligne 2 : Incubation de l'ARNm avec la sous unité 30 S du ribosome

Ligne 3 : Incubation de l'ARNm avec le sARN

Ligne 4 : Fixation du complexe d'initiation de la traduction (ARNm, sous unité 30 S du ribosome et ARNt initiateur)

afin d'observer la formation du complexe d'initiation de la traduction. Ce complexe se compose de trois acteurs : l'ARNt initiateur, l'ARNm *icaR* et la sous-unité 30 S purifiée de *S. aureus* qui ont été incubés en présence de concentrations croissantes de RsaE. La formation du complexe d'initiation de la traduction interrompt l'élongation de l'ADNc par la rétrotranscriptase (RT) au niveau du nucléotide +16 de l'ARNm. Comme attendu, la présence du sARN RsaE réduit l'efficacité de la formation du complexe d'initiation de la traduction, sans l'abolir complètement. On remarquera également la présence d'une pause de la RT-PCR au niveau de la séquence SD et qui dépend de la présence de RsaE. Cet arrêt serait la conséquence de la liaison de RsaE au niveau de la séquence SD du 5'UTR d'*icaR*.

d) RsaE promeut l'expression *in vivo* de l'opéron *icaADBC*

La quantité de l'ARNm d'*icaR* et l'expression de la protéine *in vivo* au sein de la souche HG001 ne sont pas suffisantes pour permettre leur analyse par Northern Blot ou Western Blot. C'est pourquoi l'impact de la liaison du sARN RsaE sur l'ARNm *icaR* est étudiée indirectement *via* l'expression de l'opéron *icaADBC*. Dans cet objectif, le plasmide pCN52-PicaA-GFP (Valle *et al.*, 2019) a été utilisé : il comporte la région promotrice de l'opéron *ica* fusionnée au gène codant pour la GFP (**figure 20**). L'expression de l'opéron *ica* est analysée dans la souche HG001 WT, Δ *rsaE* et la souche mutante Δ *rsaE*+*rsaE*, dont l'expression de RsaE est restaurée par le plasmide pCN38 comportant le sARN RsaE exprimé sous son propre promoteur (**figure 21A**). Les résultats montrent une activation de l'expression de l'opéron *icaADBC* seulement au sein de la souche Δ *rsaE*+*rsaE*, principalement à faible densité cellulaire.

Afin d'éviter d'éventuelles interférences liées à la liaison de deux autres sARN, RsaA (Tomasini *et al.*, 2017) et RsaI (Bronesky *et al.*, 2019), sur l'ARNm *icaR*, l'étude a également été réalisée au sein de la souche HG001 Δ *rsaI Δ *rsaA Δ *rsaE* (**figure 21B**). Les dynamiques liant RsaE, RsaI et RsaA seront abordées lors du **chapitre 3**. Les résultats concordent avec les précédents : l'expression de l'opéron *icaADBC* est augmentée au sein de la souche Δ *rsaI Δ *rsaA Δ *rsaE*+*rsaE*, notamment au début de la phase de croissance de la bactérie. On remarquera que d'après les Northern Blots, dans les deux expériences, l'effet observé de RsaE sur l'expression du promoteur *icaA* ne dépend pas de la quantité détectée du sARN. En conclusion de ces expériences, le sARN RsaE active l'expression de l'opéron *icaADBC*, en particulier lors du début de la phase exponentielle de croissance probablement en inactivant la traduction de *icaR*.****

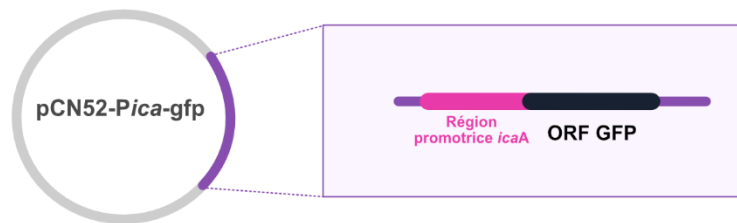


Figure 20 : Organisation schématique du plasmide rapporteur pCN52-PicaA-GFP (Valle et al., 2019)
La région inter-génique complète de l'opéron *icaADBC* (176 nt) est placée en amont du gène codant pour la GFP au sein du plasmide pCN52 (Charpentier *et al.*, 2004).

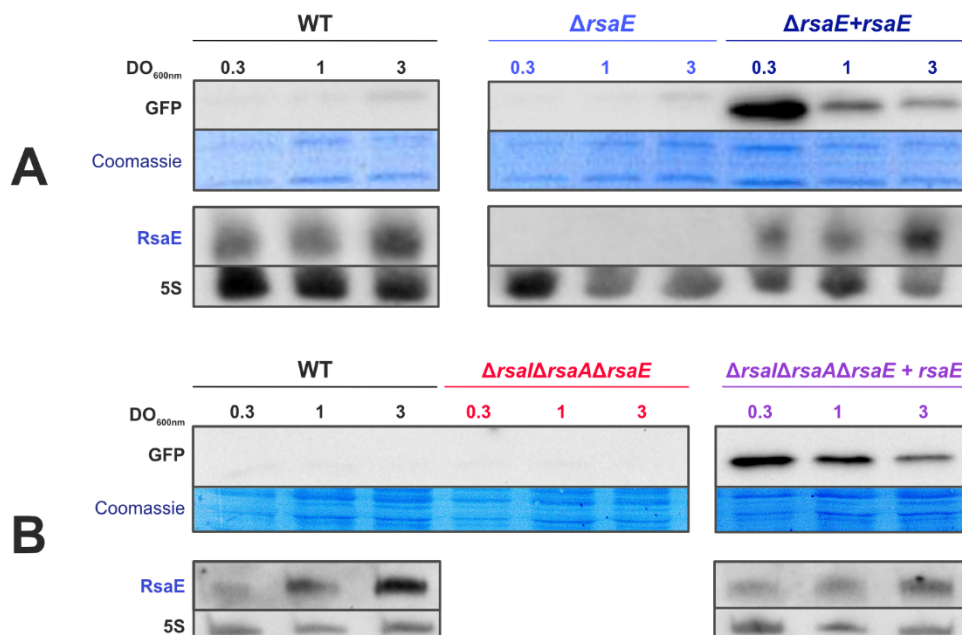


Figure 21 : RsaE active l'expression de l'opéron *icaADBC*

A) La souche sauvage (WT), délétée de RsaE ($\Delta rsaE$) et complétée ($\Delta rsaE + rsaE$) contenant les plasmides pCN52-PicaA-GFP et pCN38 ou pCN38-RsaE sont cultivées à 37°C dans du TSB supplémenté d'érythromycine et de chloramphénicol, puis des fractions de la culture sont récoltées aux DO suivantes : 0.3, 1 et 3. **B)** La souche sauvage (WT), délétée de RsaI, RsaA et RsaE ($\Delta rsaI \Delta rsaA \Delta rsaE$) et complétée ($\Delta rsaI \Delta rsaA \Delta rsaE + rsaE$) contenant les plasmides pCN52-PicaA-GFP et pCN38 ou pCN38-RsaE sont cultivées à 37°C dans du TSB supplémenté d'érythromycine et de chloramphénicol, puis des fractions de la culture sont récoltées aux DO suivantes : 0.3, 1 et 3.

Les protéines et les ARN de chaque fraction sont extraits. Une expérience de Western Blot est réalisée sur la fraction protéique afin d'analyser l'expression de la GFP. La membrane est colorée au bleu de Coomassie afin de vérifier la quantité de protéines chargées. Une expérience de Northern Blot est effectuée sur la fraction ARN pour visualiser le sARN RsaE. La révélation de l'ARN 5S est utilisé comme témoin de charge.

e) RsaE n'affecte pas la sécrétion de PIA/PNAG

RsaE semble activer l'expression de l'opéron *icaADBC* par conséquent le produit de l'opéron, c'est-à-dire la sécrétion de PIA/PNAG, devrait être impactée par la présence de RsaE. Dans cet objectif, une expérience de Dot Blot a été effectuée avec des anti-corps spécifiques dirigés contre le PIA/PNAG afin de détecter la production de ce composé (**figure 22**). La production de PIA/PNAG n'a pas pu être détectée en culture liquide. C'est pourquoi les bactéries sont cultivées en plaque statique pendant 18 H afin de permettre aux bactéries de former des biofilms et de favoriser l'expression du locus *ica*. Les résultats révèlent que la sécrétion de PIA/PNAG n'est pas impactée par l'absence de RsaE, ni par l'expression de RsaE issue du plasmide de complémentation, au sein de la souche *S. aureus* HG001, dans les conditions qui ont été décrites.

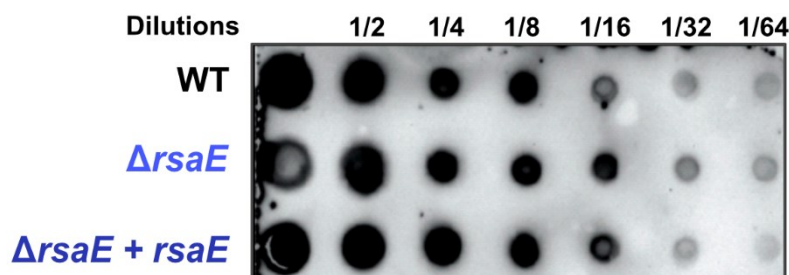


Figure 22 : RsaE n'interfère pas avec l'expression et la sécrétion de PIA/PNAG

La souche sauvage (WT) délétée de RsaE (Δ rsaE) et complétée (Δ rsaE + *rsaE*) contenant les plasmides **pCN38** ou **pCN38-RsaE** sont cultivées dans du TSB supplémenté de chloramphénicol pendant 18 H à 37°C, dans une plaque 96 puits en polystyrène statique. Seules les cellules adhérentes au fond des puits sont collectées pour la suite de l'analyse. Pour chaque souche, le même nombre de puits a été collecté. La production de PIA/PNAG est détectée par des anticorps polyclonaux dirigés contre ce composé par une expérience de Dot Blot.

III. Régulation globale de la formation de biofilm

a) RsaE active la formation de biofilm *ica*-indépendant

L'expérience de MAPS a permis d'identifier de nombreuses cibles ARNm de RsaE qui sont impliquées dans la formation de biofilm. L'hypothèse est donc que le sARN aurait un impact général sur la production de biofilm. C'est pourquoi des expériences de coloration des

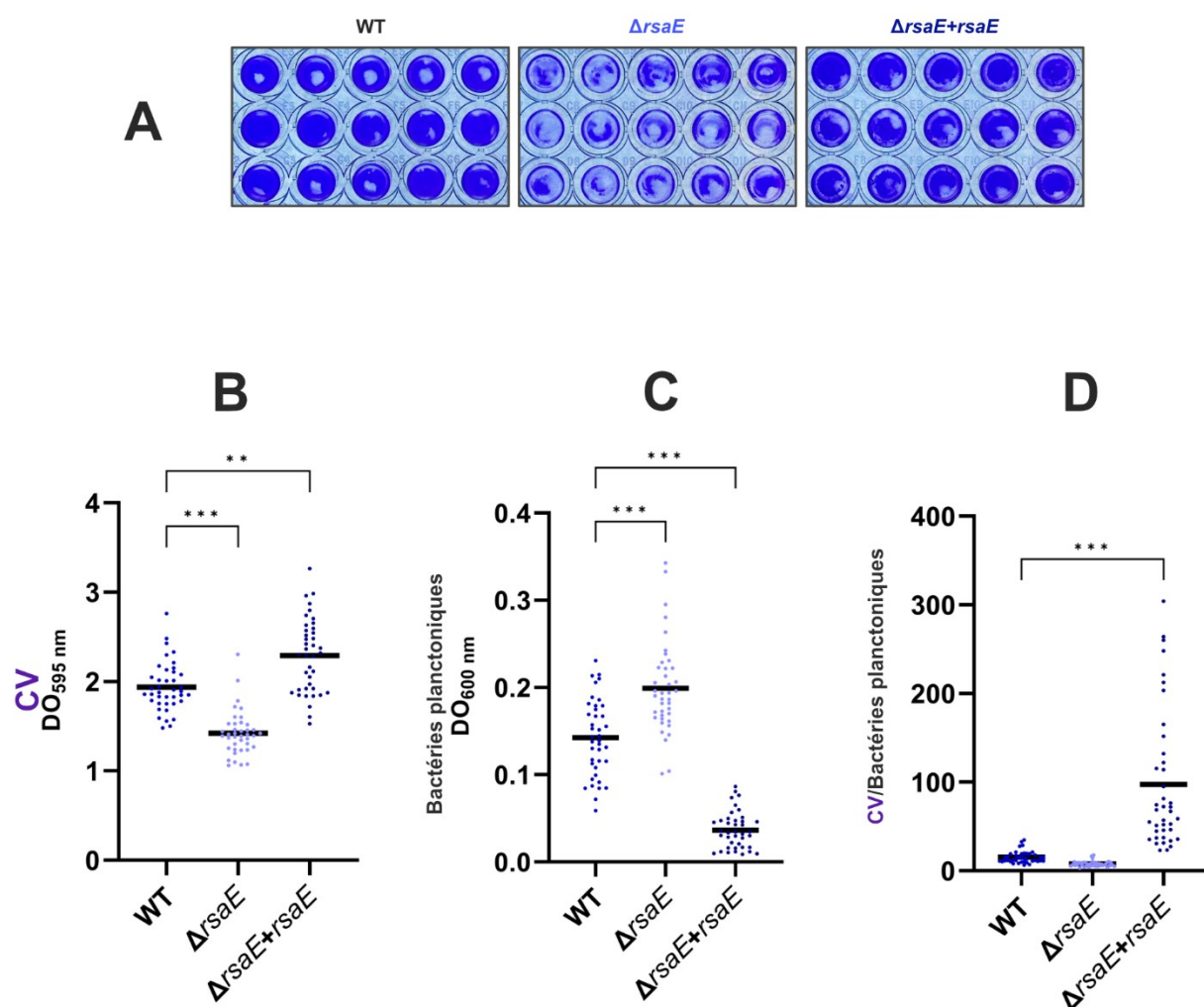


Figure 23 : RsaE module la formation de biofilm

A) Coloration au crystal violet (**CV**) des biofilms formés par la souche sauvage (**WT**) délétée de RsaE (Δ rsaE) et complétée (Δ rsaE + rsaE) contenant les plasmides pCN38 ou pCN38-RsaE. Les bactéries sont cultivées dans du TSB supplémenté de chloramphénicol pendant 18 H à 37°C, dans une plaque 96 puits en polystyrène statique. Des puits contenant uniquement le milieu de culture sont utilisés comme témoins.

B) Mesure à DO_{595nm} de la coloration au crystal violet de chaque puit, corrélée à la quantité de biofilm formé.

C) Mesure à DO_{600nm} des bactéries planctoniques présentes dans le surnageant de la culture en plaque.

D) Rapport de la biomasse de biofilm sur la quantité de bactéries planctoniques associé à chaque puit. Le rapport augmente en lien avec la proportion de bactéries adhérees au fond des puits. **B,C,D)** La barre centrale représente la moyenne des échantillons (n=40 pour chaque souche). Chaque réplicat est représenté par un point. Les statistiques sont effectuées par un test one-way ANOVA. Les valeurs significatives sont indiquées par des astérisques : *** p < 0.001, ** p < 0.002.

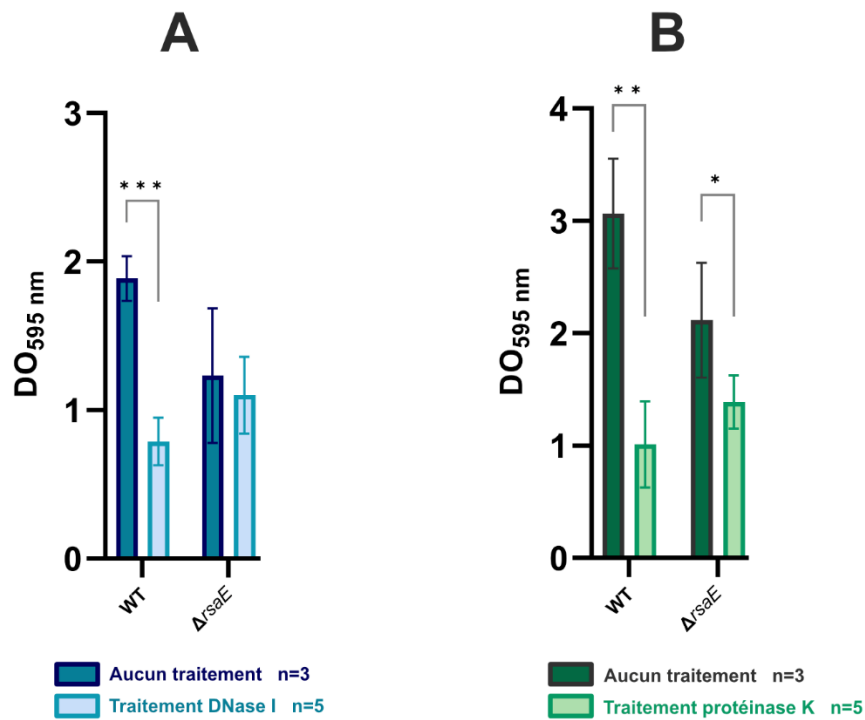


Figure 24 : La composition de la matrice du biofilm dépend de RsaE

La souche (WT) et délétée de RsaE (Δ rsaE) sont cultivées dans une plaque microtitre en polystyrène. Après 3 H d'incubation statique à 37 °C, et 28 U de **DNase I** (A) ou 10 ng de **protéinase K** (B) sont dans les puits. Après 18 H d'incubation au total, les biofilms formés au fond des puits sont colorés au crystal violet. La coloration est dissoute puis resuspendue dans de l'éthanol, avant d'être mesurée à la DO de 595 nm. Les écarts types sont représentés par les barres d'erreurs sur les histogrammes. Les statistiques sont effectuées par un *multiple unpaired* T-TEST. Les valeurs significatives sont indiquées par des astérisques : *** $p < 0.001$, ** $p < 0.002$, * $p < 0.033$

biofilms au crystal violet ont été réalisées au sein de la souche HG001 WT, du mutant Δ *rsaE* et la souche mutante complémentée Δ *rsaE*+*rsaE* (**figure 23A**). Après une incubation de 18 H, on observe une diminution significative de la formation de biofilm lorsque RsaE est absent ($p < 0.001$; **figure 23B**) associée à une hausse de la quantité de bactérie planctoniques ($p < 0.001$; **figure 23C**). A l'inverse, la restauration plasmidique de l'expression de RsaE entraîne une augmentation significative de la production de biofilm ($p < 0.002$; **figure 23B**) corrélée à une baisse des bactéries non adhérentes ($p < 0.001$; **figure 23C**). La proportion de bactéries adhérentes de la souche Δ *rsaE*+*rsaE* est particulièrement élevée en comparaison avec la souche WT ($p < 0.001$; **figure 23D**). L'expérience de Dot Blot permettant de mettre en évidence la production de PIA/PNAG a été réalisée dans les mêmes conditions que l'expérience de la coloration des biofilms au crystal violet. Cela signifie que les variations phénotypiques observées par rapport à la production de biofilm ne dépendraient pas de la sécrétion de PIA/PNAG. En conclusion, ces résultats démontrent que RsaE active la formation de biofilm, notamment par la voie indépendante du locus *ica*.

b) La composition de la matrice du biofilm dépend de RsaE

La production de biofilm dépend de l'adhésion des cellules au support, de la composition et de la sécrétion de la matrice du biofilm. Afin de vérifier l'impact du sARN RsaE sur la composition globale de la matrice sécrétée, des expériences de traitement des biofilms à la DNase I et à la protéinase K ont été réalisées (**figure 24**). L'objectif est de déterminer l'effet de RsaE sur la sécrétion d'ADNe et de protéines lors de la production de la matrice extra-cellulaire. Les résultats dévoilent que les biofilms formés par la souche WT sont sensibles au traitement à la DNase I ($p < 0.001$; **figure 24A**). A l'inverse, la quantité de biofilm produite par la souche Δ *rsaE* ne semble pas avoir été impactée par la présence de DNase suggérant que ceux-ci ne contiennent pas ou peu d'ADNe. Concernant les protéines, les biofilms formés par les deux souches WT et Δ *rsaE* sont impactés par le traitement à la protéinase K, mais plus particulièrement dans la souche WT (**figure 24B**). Dans l'ensemble, ces résultats montrent que l'absence de RsaE conduit à la formation d'un biofilm plus résistant à la DNase I et partiellement à la protéinase K. Cet effet démontre que RsaE est impliqué dans la régulation des composants de la matrice extra-cellulaire, notamment au niveau de la sécrétion d'ADNe et de protéines impliquées dans l'adhésion. Ainsi RsaE activerait la sécrétion d'ADNe et la synthèse des protéines impliquées dans la formation de la matrice du biofilm.



Figure 27 : Organisation de l'opéron *psmβ*. Les régions d'interactions avec le régulateur transcriptionnel MgrA ont été définies par Jiang *et al.*, 2018. La région d'interaction avec RsaE a été prédites *in silico* en utilisant le logiciel IntaRNA.

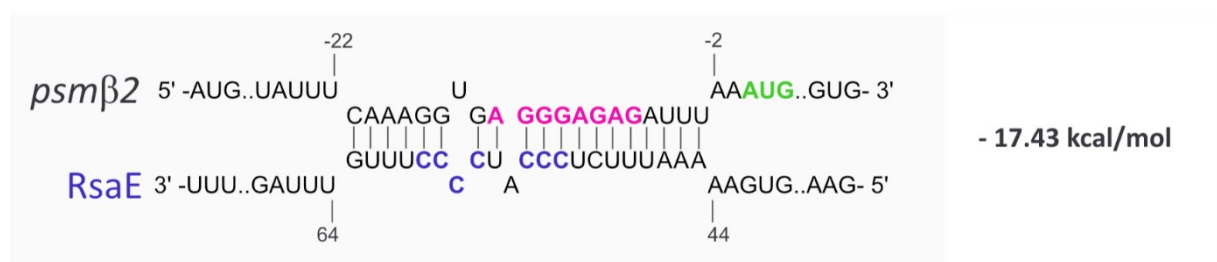


Figure 28 : Prédiction du site d'interaction de RsaE sur l'opéron *psmB*. Les régions d'interaction avec RsaE ont été prédites *in silico* en utilisant le logiciel IntaRNA. La séquence de Shine & Dalgarno, le codon START et le motif riche en cytosines de RsaE sont indiqués.

IV. Formation de biofilm *ica*-indépendant

a) RsaE interagit avec des ARNm responsables de la formation de biofilm *ica*-indépendant

Outre l'ARNm *icaR*, les cibles potentielles de RsaE identifiées par la méthode de MAPS révèlent que les transcrits des opérons *psma* et *psmβ* seraient également la cible du sARN. L'organisation des opérons *psma* et *psmβ* au niveau du génome sont représentés respectivement dans les **figures 25** et **27**. Selon les prédictions *in silico*, on retrouve trois sites d'interactions différents au niveau de l'opéron *psma* (**figure 26**). Ces régions d'interactions impliquent la séquence SD de *psma1*, *psma2* et *psma3* (**figure 25**) et le second motif riche en C de RsaE. Concernant l'opéron *psmβ*, RsaE interagirait uniquement au niveau de la séquence SD de *psmβ2* (**figure 28**), également par la liaison du second motif riche en C. Des expériences de retard sur gel ont été effectuées afin de confirmer la formation de duplexes entre RsaE et les ARNm de ces deux opérons. Effectivement, RsaE interagit avec l'ARNm polycistronique codant pour les PSMα et PSMβ (**figure 29**). Les prédictions *in silico* suggèrent une interaction de RsaE avec *psma1*, *psma2* et *psma3* : les fragments de chaque *psma1-3* ont été transcrits et testés pour leur interaction avec RsaE. De façon surprenante, seul le duplexe RsaE/*psma1* est formé (**figure 30**). En conclusion, RsaE interagit *in vitro* avec les ARNm des opérons *psma* et *psmβ*.

b) RsaE module l'initiation de la traduction des opérons *psmaβ*

Comme il a été énoncé précédemment, les prédictions *in silico* suggèrent que le sARN interagirait au niveau des séquences SD des *psma1*, *psma2* et *psma3* et de *psmβ2*. Dans l'objectif d'évaluer l'impact de la liaison de RsaE sur la traduction de ces ARNm, des expériences d'empreinte du ribosome ont été réalisées (**figure 31**). L'expérience repose sur la visualisation de la formation du complexe d'initiation de la traduction, dont l'assemblage peut être influencé par la présence de RsaE, lié à l'ARNm au niveau du la 5'UTR de *psma1* et *psmβ2*. Les résultats obtenus pour les deux opérons présentent le même profil inattendu : la formation du complexe d'initiation de la traduction dépend de la quantité de RsaE incubé avec le messenger cible. A faibles concentrations (25 nM pour *psma* et 5 nM pour *psmβ*), la fixation de RsaE tend à favoriser la formation du complexe d'initiation sur les messagers. En augmentant les quantités

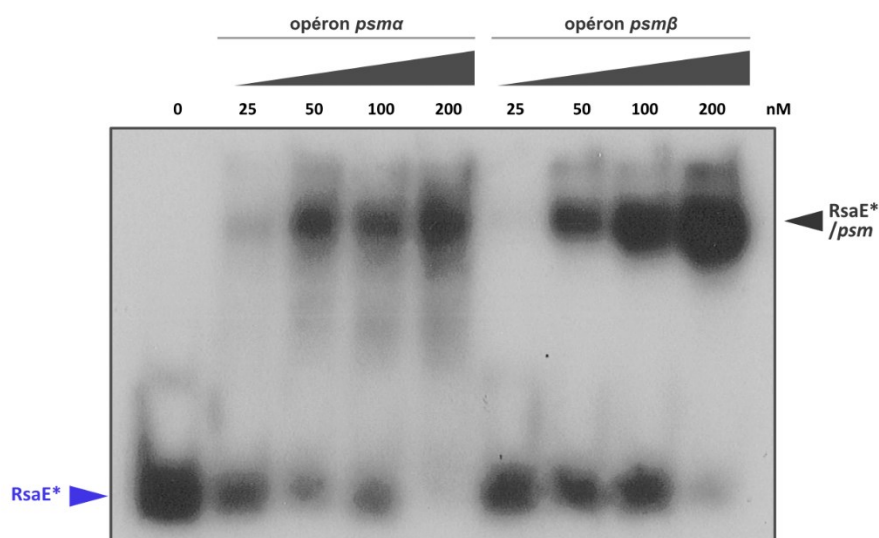


Figure 29 : RsaE interagit avec l'ARNm des deux opérons *psmA* et *psmB*

Les expériences de retard sur gel sont réalisées avec le sARN **RsaE** radiomarké (*) qui est incubé avec des concentrations croissantes de l'ARNm de chaque opéron. La quantité des ARN cibles sont indiquées en haut des radiographies des gels.

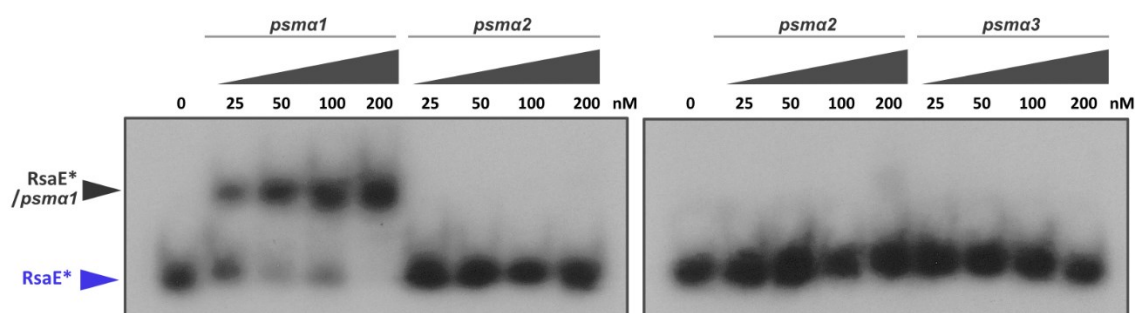


Figure 30 : RsaE interagit avec le fragment *psmA1* de l'opéron

Les expériences de retard sur gel sont réalisées avec le sARN **RsaE** radiomarké (*) qui est incubé avec des concentrations croissantes des différents *psm* transcrits sous forme de fragments comportant chacun l'ORF du *psm*, mais également la région promotrice pour *psmA1*. La quantité des ARN cibles sont indiquées en haut des radiographies des gels.

de RsaE, le signal disparaît progressivement (**figure 31A et 31B**). Donc, la liaison du sARN sur les ARNm semble essentielle pour la fixation du ribosome, mais dépend de la quantité de RsaE. En conclusion, ces résultats ne nous ont pas permis de conclure de manière définitive sur l'effet de la fixation de RsaE sur la traduction de *psmA1* et *psmβ2*.

c) Le duplexe RsaE/PSMα est clivé par la RNase III

La formation de duplexe sARN/ARNm peut être la cible de RNases, notamment la RNase III qui coupe spécifiquement les ARN double-brins. Selon McKellar *et al.*, (2022 ; l'étude à laquelle j'ai participé est présentée dans ce manuscrit au **chapitre 2**), RsaE forme des duplexes avec l'opéron *psmA* et entraîne le recrutement de la RNase III *in vivo*. C'est pourquoi des expériences de clivage *in vitro* par la RNase III ont été effectuées pour confirmer ces données et déterminer la région de RsaE clivée par l'enzyme. Les expériences montrent que le duplexe RsaE/ *psmA* est la cible de la RNase III (**figure 32**), qui clive RsaE *in vitro* dans une région comprise entre G62 et U66 au niveau du 2^{ème} motif riche en C validant les prédictions. En revanche, il semblerait que le duplexe RsaE/ *psmβ* ne soit pas clivé par la RNase III, du moins au niveau de RsaE. Ces expériences seront répétées avec les transcrits *psmA* et *psmβ* radiomarqués pour localiser les sites de clivage au niveau des ARNm.

d) RsaE activerait l'expression de PSMα2 et PSMβ2

RsaE interagit avec les opérons *psmA* et *psmβ* notamment au niveau de la séquence SD de certains *psm*, ce qui semble influencer l'initiation de la traduction des transcrits *psmA1* et *psmβ2* associés. En raison de ces observations, l'expression des différents PSMs (**figure 33**) a été évaluée grâce à la fusion d'une étiquette 3XFlag au niveau de l'extrémité C terminale des protéines (Menendez-Gill *et al.*, non publié). Dans un premier temps, je me suis focalisée sur les peptides PSMα1 et PSMβ2. Néanmoins, malgré l'absence d'une interaction observée *in vitro* entre RsaE et PSMα2 ou PSMα3, on ne peut exclure que l'interaction ait lieu *in vivo*. On peut également supposer que l'interaction qui a lieu entre RsaE et la région de *psmA1* impacte l'expression des autres PSM de l'opéron, c'est pourquoi l'expression de PSMα2 a également été analysée. L'expression de PSMα1 a été étudiée dans le contexte de la formation de biofilm en plaque de polystyrène (**figure 33A**) ou en culture liquide sous agitation (**figure 33B**), pour les souches HG001 WT, Δ *rsaE* et Δ *rsaE+rsaE*. Ainsi, lorsque les bactéries ont adhéré à la plaque de polystyrène (**figure 33A**), RsaE active la synthèse de PSM. Les bactéries ont

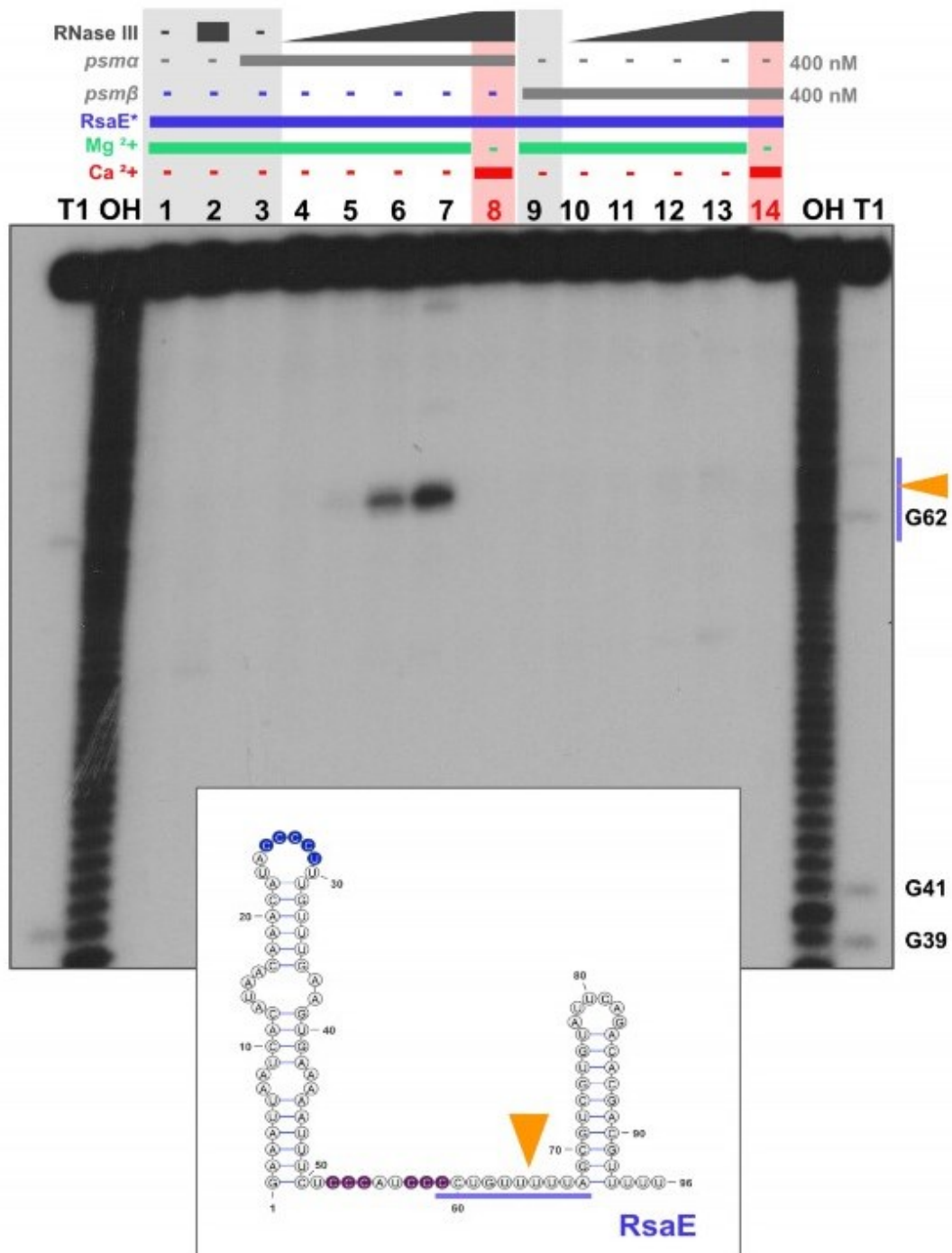


Figure 32 : Le duplexe RsaE/*psma* est clivé par la RNase III

Les expériences *in vitro* de clivage par la RNase III sont effectuées en incubant le sARN RsaE radiomarqué (*) avec des concentrations croissantes de la RNase III de *S. aureus* purifiée, en présence de l'ARNm des opérons *psma* ou *psmβ*. Le **magnésium** est essentiel à l'activité de la RNase III, à l'inverse, le **calcium** inhibe son activité. L'échelle alcaline (OH) coupe entre chaque nucléotide et l'échelle T1 après chaque G qui sont indiqués à gauche du gel. Elles permettent d'identifier et de localiser les séquences nucléotidiques impliquées. La structure secondaire de RsaE est présentée dans l'encart et présente le site de clivage sur le **sARN*** qui est représenté par une **flèche**, et le site d'interaction potentiel avec le fragment PSMα1 est représenté en **bleu**.

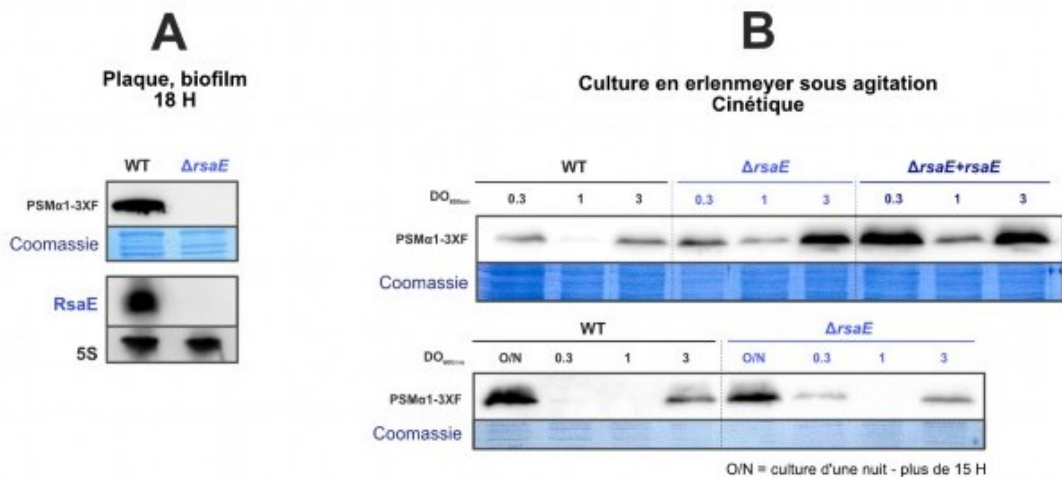


Figure 33 : L'expression de PSM α 1 dépend des conditions de culture et de la cinétique de l'expérience

A) La souche sauvage (WT) et délétée de RsaE (Δ rsaE) contenant le plasmide pCN-PSM α 1-3XF sont cultivées à 37°. Les biofilms formés au fond des puits sont lavés une fois puis ils sont resuspendus dans du PBS. Pour chaque souche, 20 puits sont récoltés pour l'extraction protéique et 20 autres puits pour l'extraction des ARN. **B)** La souche sauvage (WT), délétée de RsaE (Δ rsaE) et complétée (Δ rsaE + rsaE) contenant les plasmides pCN-PSM α 1-3XF et pCN38 ou pCN38-RsaE sont cultivées sous agitation à 37°C dans du TSB supplémenté d'érythromycine et de chloramphénicol. Différentes fractions de la cultures sont récoltées à la DO correspondante. Les protéines et les ARN de chaque fraction sont extraits. **A et B)** Un Western Blot est réalisé avec des anticorps spécifiques de l'étiquette 3XF afin d'analyser l'expression du PSM α 1-3XF. Après révélation, la membrane est colorée au bleu de coomassie afin de vérifier la quantité de protéines chargées. Un Northern Blot est effectué sur la fraction ARN afin de confirmer l'expression de RsaE au sein de la souche WT. La révélation de l'ARN 5S est utilisée comme témoin de charge.

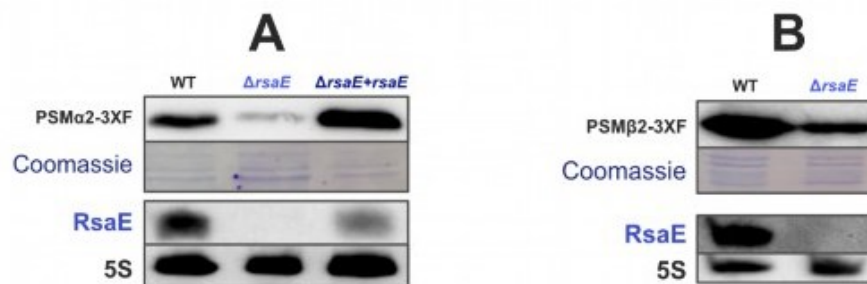


Figure 34 : RsaE active l'expression de PSM α 2 et PSM β 2

A) La souche sauvage (WT) et délétée de RsaE (Δ rsaE) et complétée (Δ rsaE + rsaE) contenant les plasmides pCN-PSM α 2-3XF et pCN38 ou pCN38-RsaE sont cultivées sous agitation à 37°C dans du TSB supplémenté de chloramphénicol et d'érythromycine jusqu'à atteindre une DO à 600nm de 1.8. Les protéines et les ARN sont extraits. **B)** La souche sauvage (WT) et délétée de RsaE (Δ rsaE) et contenant le plasmide pCN38-PSM β 2-3XF sont cultivées sous agitation à 37°C dans du TSB supplémenté de chloramphénicol jusqu'à atteindre une DO à 600nm de 1.8. Les protéines et les ARN sont extraits. **A et B)** Un Western Blot est réalisé avec des anticorps spécifiques de l'étiquette 3XF afin d'analyser l'expression de chaque PSM-3XF. Après révélation, la membrane est colorée au bleu de coomassie afin de vérifier la quantité de protéines chargées. Un Northern Blot est effectué sur la fraction ARN afin de confirmer l'expression de RsaE au sein de la souche WT. La révélation de l'ARN 5S est utilisée comme témoin de charge.

également été cultivées en agitation et des échantillons ont été prélevés aux DO 0,3, 1 et 3 (**figure 33B**). Dans la souche WT, le peptide apparaît en début et en fin de croissance, ce qui pourrait correspondre à l'attachement et au détachement du biofilm. Dans la souche $\Delta rsaE$, il semblerait qu'il n'y ait pas d'effet majeur, pourtant dans la souche complémentée $\Delta rsaE+rsaE$, nous observons une accumulation de PSM α 1 (**figure 33B**). A ce stade ces résultats ne sont pas convaincants et seraient influencés par les conditions expérimentales. Il semblerait que RsaE ait un impact sur l'expression du peptide et que la régulation soit dépendante de la cinétique de formation des biofilms. Concernant PSM α 2, les résultats montrent que l'expression de PSM α 2-3XF diminue fortement lorsque RsaE est absent dans des bactéries cultivées en agitation (**figure 34A**) et que cette réduction est compensée dans la souche complémentée $\Delta rsaE+rsaE$. Les observations sont identiques pour PSM β 2 (**figure 34B**), mais ces données devront être confirmées avec une souche complémentée.

En conclusion, RsaE aurait un impact global sur la traduction des opérons *psmA* et *psm β* . Précisément, RsaE activerait l'expression de PSM α 2 et PSM β 2. Concernant PSM α 1, les résultats recueillis ne nous ont pas permis de conclure quant à la régulation exercée par RsaE sur la traduction de cette protéine, même si les données suggèrent une activation de l'expression de PSM α 1 en présence de RsaE.

Discussion & perspectives

Cette étude avait pour objectif de caractériser l'impact de RsaE au niveau de la régulation de la formation de biofilm *ica*-indépendant et *ica*-dépendant chez *S. aureus*. Des données ont déjà été obtenues chez *S. epidermidis* (Schoenfelder *et al.*, 2019) montrant l'activation de la production de PIA/PNAG par RsaE. Cet effet serait probablement la conséquence de l'inhibition de la traduction d'*icaR* à la suite de la séquestration du RBS lors de la liaison du sARN sur la séquence SD du messenger. L'identification des cibles ARNm de RsaE par la méthode du MAPS a permis de dévoiler de nombreuses cibles potentielles impliquées dans la formation de biofilm comme *icaR* ou les opérons *psma* et *psmβ*. Les expériences réalisées permettent de mettre en lumière l'implication de RsaE dans l'inhibition de l'expression du régulateur IcaR qui réprime la production de PIA/PNAG ; mais également dans la modulation des composants du biofilm *ica*-indépendant, notamment la production des PSMs.

I. RsaE & la formation de biofilm *ica*-dépendant

La formation du duplexe *in vitro* 5'UTR/3'UTR d'*icaR* n'a pas lieu en présence de RsaE

D'après l'étude réalisée par los Mozos *et al.* (2013), l'interaction des régions 3'UTR et 5'UTR de l'ARNm d'*icaR* conduit à la séquestration de la séquence SD puis à la dégradation du messenger, par conséquent à l'inhibition de sa propre traduction. Les résultats de notre étude montrent que RsaE interfère avec ce processus en se liant au même site d'interaction que le 3'UTR c'est-à-dire au niveau de la séquence SD, empêchant la formation du duplexe 5'*icaR*/3'*icaR*. Néanmoins, la régulation exercée par RsaE aurait le même résultat que la liaison du 3'UTR : l'expression d'*icaR* est inhibée. Dans le contexte de la bactérie, la transcription et la traduction ont lieu simultanément. L'hypothèse est que RsaE agirait au niveau de l'expression d'*icaR* dès le début de la transcription de l'ARNm et dans les conditions où RsaE est activé par le système à deux composantes SrrAB, c'est-à-dire dans le contexte d'une hypoxie ou en présence de NO.

RsaE inhibe la traduction de *icaR* mais n'impacte pas la sécrétion de PIA/PNAG chez *S. aureus* HG001

Les expériences réalisées *in vitro* montrent que RsaE se lie à l'ARNm d'*icaR* au niveau de la séquence SD mais également au niveau de la région codante. Ces interactions auraient deux conséquences : la diminution de l'initiation de la traduction d'*icaR* et le recrutement de la RNase III. Par conséquent, la formation du duplexe RsaE/*icaR* aurait un impact sur la synthèse d'IcaR et la stabilité du messager. Ces deux paramètres n'ont pas pu être vérifiés à cause de l'expression faible et indétectable à la fois de l'ARNm et de la protéine IcaR dans la souche *S. aureus* HG001. Par conséquent, l'étude de la régulation d'IcaR par RsaE s'est orientée vers une analyse indirecte de l'expression du répresseur par l'utilisation du système rapporteur *icaA*-GFP et la détection du produit de l'opéron *ica*, c'est-à-dire l'analyse de la sécrétion de PIA/PNAG.

Dans ce contexte, il semblerait que l'expression du locus *ica* reste négligeable dans la souche de *S. aureus* HG001 puisque qu'on ne détecte pas de GFP au sein de la souche WT dans laquelle le niveau de RsaE ne serait pas suffisante pour réprimer le répresseur IcaR. L'effet de RsaE sur l'expression de l'opéron est visualisé uniquement lorsque RsaE est exprimé à partir d'un plasmide dans les souches $\Delta\text{rsaE}+\text{rsaE}$ et $\Delta\text{rsaI}\Delta\text{rsaA}\Delta\text{rsaE}+\text{rsaE}$.

En revanche, si l'expression de l'opéron *ica* est trop faible dans la souche WT cultivée sous agitation, nous avons détecté du PIA/PNAG lorsque les bactéries se développent en culture statique. Néanmoins, les expériences de Dot Blot, révélant l'accumulation de PIA/PNAG après 18 h de croissance, ne montrent aucun effet de RsaE sur la production de l'exo-polysaccharide. Nous ne pouvons pas exclure que RsaE pourrait agir principalement dans la phase d'adhésion des bactéries au support comme le suggèrent les expériences avec le système rapporteur *icaA*-GFP ou qu'un autre sARN compense la perte de RsaE, tel que RsaI (Bronesky *et al*, 2019). Il faudra répéter ces expériences en cinétique et aussi dans le double mutant $\Delta\text{rsaE}\Delta\text{rsaI}$. Ainsi la régulation de la formation de biofilm dépendant de l'opéron *ica* inclut plusieurs facteurs en plus de RsaE, et cette problématique sera adressée lors du **chapitre 3**.

Le locus *ica* est présent dans la majorité des souches de *S. aureus* (Silva *et al.*, 2021), mais ses conditions d'expression sont hétérogènes. Par exemple, la caractérisation de l'effet activateur de la production de PIA/PNAG du sARN RsaI a été mis en évidence dans la souche *S. aureus* 132 (Bronesky *et al.*, 2019). Dans le cas de la souche 132, la production de PIA/PNAG est spécifiquement activée lorsque que la bactérie est cultivée dans du TSB supplémenté de 3

% de NaCl. La souche 15981 produit du PIA/PNAG de manière constitutive (Vergara-Irigaray *et al.*, 2009). C'est pourquoi la régulation de l'expression d'*icaR* par RsaE devra être étudiée dans diverses souches ou dans des conditions de culture qui induisent une production majeure de biofilms *ica*-dépendants, ce qui ne semble pas être le cas pour *S. aureus* HG001.

Certaines études suggèrent que la production de PIA/PNAG a un coût biologique conséquent pour la bactérie (Brooks and Jefferson, 2014; Rogers *et al.*, 2008), ce qui pourrait justifier la multiplicité et la complexité des systèmes de régulation du locus *ica*. De plus, les résultats de MAPS avec *icaR* comme proie révèlent qu'en plus de RsaI, RsaA interagiraient avec l'ARNm *icaR* conjointement avec RsaE, ajoutant un niveau de complexité supplémentaire au réseau de régulation de la production de biofilm médié par les sARN. A noter que le rôle des trois sARN RsaI, RsaA et RsaE dans la régulation de l'expression du messenger *icaR* fera l'objet du chapitre 3.

II. RsaE & la formation de biofilm *ica*-indépendant

RsaE se lie à la séquence SD et active la production des PSMs

L'absence de RsaE est associée à la diminution de la formation de biofilm et à la baisse de la sensibilité de ces biofilms à la DNase I et à la protéinase K. Ces résultats signifieraient que RsaE active la sécrétion d'ADNe et des protéines de surfaces ou excrétées impliquées dans la formation de biofilms. Le MAPS a montré que RsaE interagit avec les ARNm des opérons *psma* et *psmβ*. Bien que les prédictions *in silico* et les données *in vivo* issues de l'expérience de CLASH (McKellar *et al.*, 2022) suggèrent un site d'interaction au niveau des séquences SD des trois premiers PSMα1-3, seule la formation du duplexe RsaE-*psma1* a été mis en évidence par la méthode de retard sur gel. Il faut noter que les expériences de retard sur gel effectuées utilisent des fragments ARN de chaque *psm*. Ces fragments ne possèdent pas forcément le même repliement ou la même structure secondaire que celle retrouvée *in vivo* lorsque l'opéron entier est transcrit. Ce biais issu de la fragmentation de l'opéron pourrait expliquer l'absence d'interaction *in vitro* entre RsaE et les fragments *psma2-3*. Enfin, nous ne pouvons pas exclure qu'une protéine chaperonne soit nécessaire à l'interaction dans le contexte de la cellule. Des

expériences de gel retard peuvent être effectuées en présence d'une protéine chaperonne, mais celle-ci doit être identifiée et purifiée, ce qui n'est pas le cas pour l'interaction RsaE/*psma*.

Les expériences d'empreinte du ribosome semblent indiquer que RsaE à faibles concentrations active la formation du complexe de traduction sur *psma1*. Ces résultats paraissent contradictoires avec la fixation de RsaE sur la séquence SD qui devrait interférer avec la fixation du complexe d'initiation de la traduction. De plus, nos expériences ne nous permettent pas de conclure si RsaE se fixe sur les SD de *psma2* et *psma3*. Il est prévu de répéter l'expérience en changeant d'amorce pour la RT afin de visualiser les régions correspondant à ces deux *psm*. Par ailleurs, on ne peut exclure que la liaison de RsaE affecterait la traduction de l'ensemble des PSM α de l'opéron, que ce soit par des changements structuraux induit par la fixation de RsaE ou à sa liaison directe avec les SD des *psm*. Quant à l'opéron *psm β* , nous avons également observé une augmentation du signal de l'empreinte du ribosome en présence de faibles concentrations de RsaE sur le SD de *psm β 2*. Il sera donc essentiel de déterminer précisément la région d'interaction entre RsaE et les transcrits *psma* et *psm β* pour confirmer les prédictions, notamment avec des expériences d'empreinte enzymatique ou chimique. Par la suite, des mutations dans les sites de liaison de RsaE et des *psm* et les mutations compensatoires correspondantes pourront être effectuées afin de valider les régions d'interactions impliquées dans la formation du duplexe ARN-ARN. Au laboratoire, des expériences de SHAPE (*Selective 2' Hydroxyl Acylation analyzed by Primer Extension*) ont démontré que la structure secondaire des transcrits *psma* et *psm β* est constituée de plusieurs longues tiges-boucles et que les quatre SD de *psma* (**figure 35**) et le premier RBS de *psm β* (**figure 36**) sont séquestrés dans des éléments structurés (Jol *et al.*, non publié). Il n'est donc pas étonnant qu'un facteur, que ce soit un ARN ou une protéine, soit nécessaire pour rendre le RBS accessible et ainsi permettre au ribosome de se fixer.

Ensuite, afin de vérifier l'effet de RsaE sur l'expression de chaque PSM, des versions de PSM α 2 et PSM β 2 fusionnées à une étiquette 3X-FLAG en position C-terminale ont été détectées, en présence ou en absence de RsaE, par *Western blot*. Ces expériences ont montré que RsaE activerait la production de PSM α 2 et β 2. Concernant PSM β 2, il sera nécessaire de confirmer le résultat en construisant la souche complémentée par RsaE avec un vecteur comprenant une résistance autre que celle au chloramphénicol. Il faudra également caractériser l'effet de RsaE sur l'activation des PSM α 1 et α 3, car comme il a été décrit précédemment, RsaE pourrait avoir une incidence sur leur expression. Nos résultats sont cohérents avec l'étude

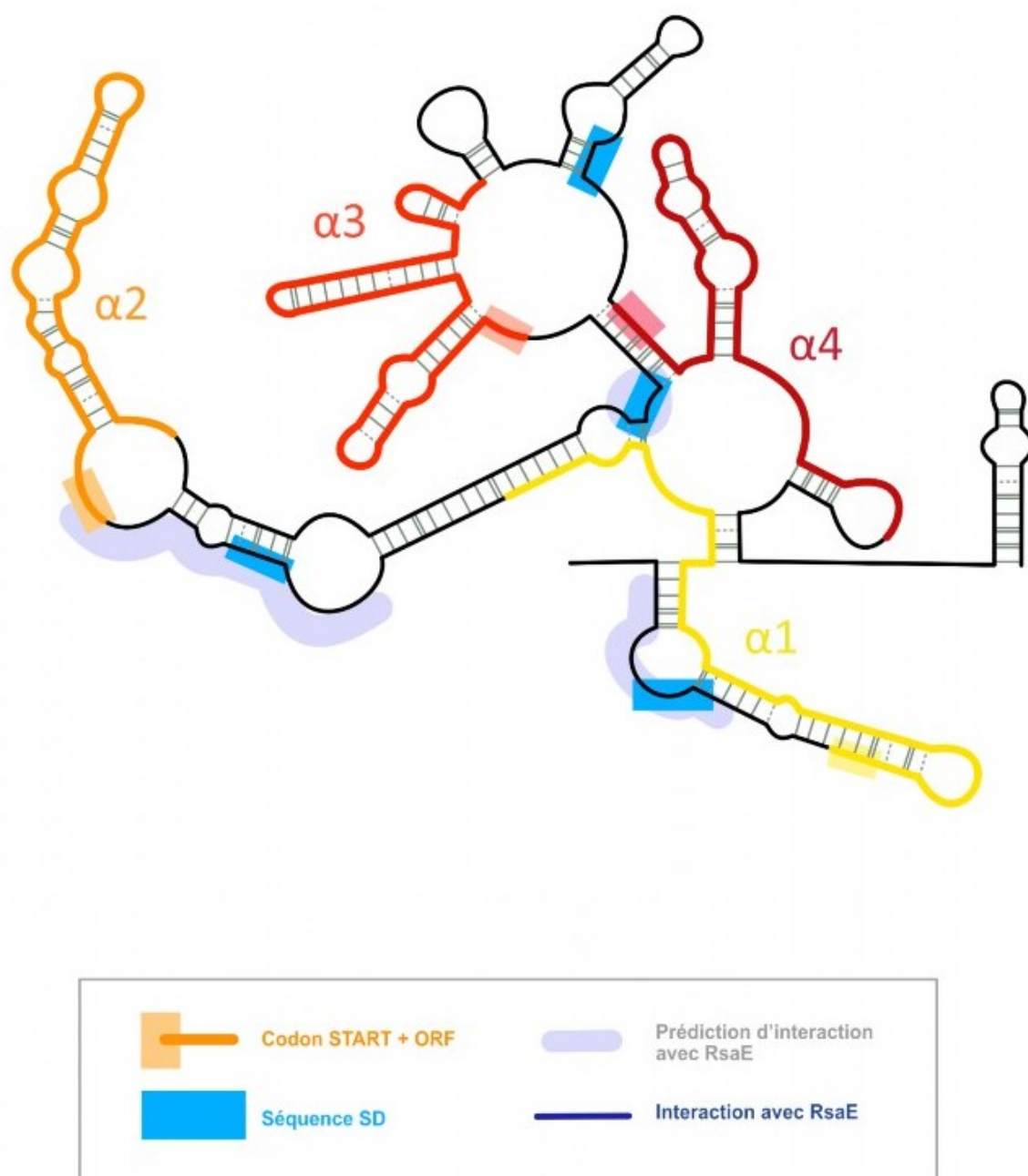


Figure 35 : Modèle de la structure secondaire de l'ARNm *psma*

La structure secondaire représentée est adaptée des données de cartographie enzymatique de J. Moreno (données non publiées). La séquence SD, le codon START et l'ORF de chaque *psma* sont indiqués et localisés sur la structure. La **région d'interaction** du sARN RsaE sur l'ARNm *psma* a été prédite *in silico* avec le logiciel intaRNA et confirmées *in vivo* par l'expérience de CLASH de McKellar et al. (2022).

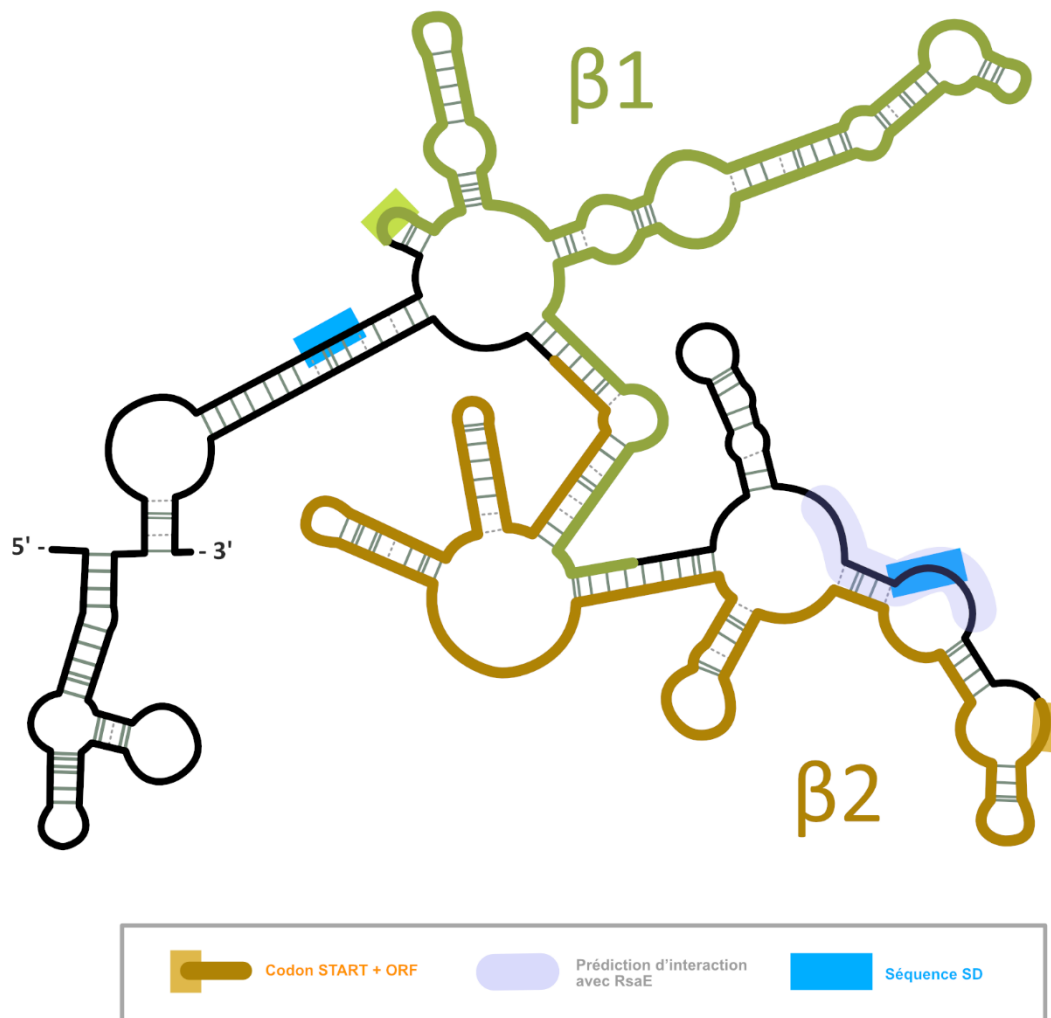


Figure 36 : Modèle de la structure secondaire de l'ARNm *psmβ*

La structure secondaire représentée est adaptée des données de cartographie enzymatiques de J. Moreno (données non publiées). La séquence SD, le codon START et l'ORF de chaque *psmβ* sont indiqués et localisés sur la structure. La **région d'interaction** du sARN RsaE sur l'ARNm *psmβ* a été prédite *in silico* avec le logiciel intaRNA et confirmées *in vivo* par l'expérience de CLASH de McKellar et al. (2022).

de McKellar *et al.* (2022) qui a démontré que RsaE stimule l'activité hémolytique de *S. aureus*, associée à l'augmentation de la production des PSM α 1 et PSM α 2 détectés dans le surnageant. Le mécanisme d'action de RsaE demeure inconnu, mais la RNase III est requise dans ce processus. Des résultats préliminaires (qui ne sont pas présentés ici) de stabilité du transcrit *psmA* en présence de rifampicine indiquent que le niveau de *psmA* est plus élevé en l'absence de RsaE. Cet effet stabilisateur est retrouvé partiellement en l'absence de la RNase III bien que la synthèse de PSM α soit diminuée dans ces conditions (L. Hoyo, manuscrit de M2). Ces expériences devront être reproduites afin d'estimer le temps de demi-vie des transcrits *psmA* et de *psm β* en présence et en absence de la RNase III. Ces données suggèrent que *psmA* et/ou *psm β* subiraient une maturation par la RNase III en présence de RsaE, et que ce clivage favoriserait la traduction de l'ARNm. Une expérience d'extension d'amorce avec des ARN issus de la souche WT ou issus d'une souche délétée du gène codant la RNase III permettra de déterminer si les transcrits subissent une maturation. Pourtant, nous nous serions attendus qu'un transcrit non traduit soit rapidement dégradé. En effet, il a été montré que l'ARNm *cspA* subit un clivage d'une tige-boucle dans sa région 5' non traduite par la RNase III, ce qui génère un transcrit plus court et traductible, alors que le transcrit long est rapidement dégradé (Lioliou, *et al.*, 2012). Dans le cas des *psm*, leur structure secondaire pourrait les protéger de la dégradation.

La reconnaissance de la séquence SD d'un ARNm par un sARN conduisant à l'activation de la traduction du messenger reste un mécanisme intrigant et non décrit. Des expériences de traduction *in vitro* des PSM α ou PSM β avec de la méthionine ³⁵S permettront de visualiser l'impact de RsaE et/ou de la RNase III (déjà purifiée au laboratoire) sur la synthèse des PSM. Le rôle de la RNase III dans la formation des biofilms sera également adressée par des expériences de cristal violet.

Le MAPS de RsaE révèle la composition de la matrice du biofilm *ica*-indépendant

Les données de MAPS obtenues en utilisant RsaE comme appât révèlent que l'ARNm de l'opéron *lrgAB* serait une cible potentielle du sARN. Cet opéron est responsable de la production d'une anti-holine qui inhibe l'action de CidA dont l'activité est à l'origine de la libération d'ADNe. Les prédictions *in silico* suggèrent que RsaE interagirait au niveau de la séquence SD de *lrgB* (**figure 37**). L'activation de la sécrétion d'ADNe pourrait alors être liée à l'interaction de RsaE avec l'ARNm *lrgB*, dont la liaison entraînerait la diminution de l'expression de LrgB et par conséquent l'activation de CidA. Les expériences de DNase I et

protéinase K effectuées sur les biofilms tendent à s'orienter en ce sens, puisqu'en l'absence de RsaE le biofilm est davantage résistant à la DNase I et en moindre mesure à la protéinase K. Parmi les cibles potentielles on retrouve également l'ARNm *pfbA* qui code pour une adhésine de surface favorisant les interactions intra-cellulaires (**figure 37**). Les prédictions *in silico* indiquent que RsaE se fixerait sur la séquence SD de l'ARNm. Dans ce cas et comme pour les PSM, nous nous attendrions à nouveau à une activation de la traduction.

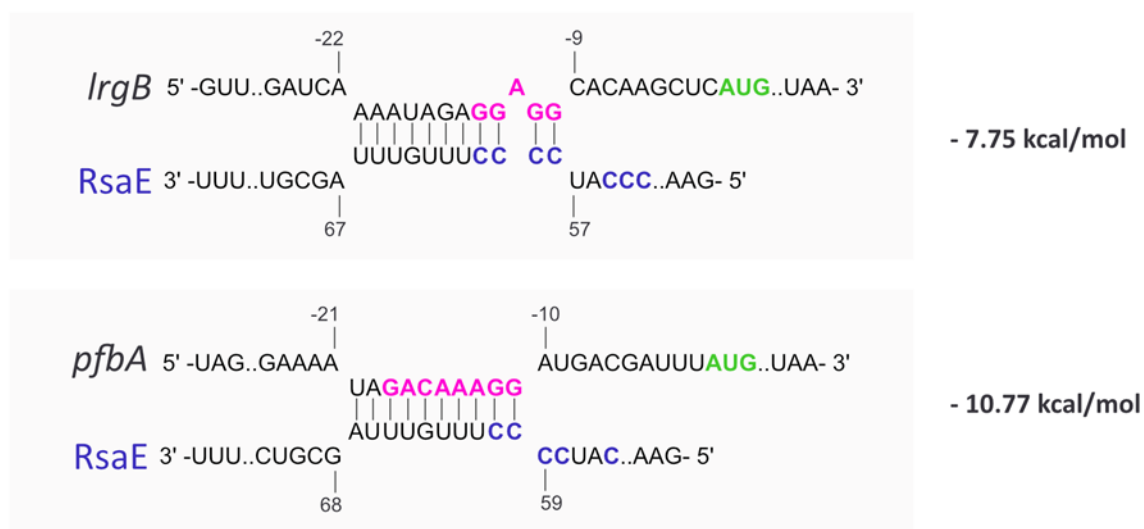


Figure 37 : Prédiction des sites d'interaction de RsaE avec les ARNm de *pfbA* et *lrgB*.

Les régions d'interaction avec RsaE ont été prédites *in silico* en utilisant le logiciel IntaRNA. La séquence de **Shine & Dalgarno**, le codon **START** et le **motif riche en cytosines** de RsaE sont indiqués.

Conclusions & modèle de régulation

En conclusion, cette étude a permis de démontrer que RsaE active la formation de biofilm chez *S. aureus*. Parmi toutes les cibles ARNm de RsaE identifiées par la méthode du MAPS, on retrouve plusieurs acteurs impliqués dans la formation de biofilm : les ARNm d'*icaR* et des opérons *psma* et *psm β* . Les résultats montrent que RsaE interagit avec l'ARNm d'*icaR*, inhibe la traduction d'IcaR et active l'expression de l'opéron *icaADBC*. Néanmoins, l'effet du sARN sur la production de PIA/PNAG n'a pas pu être établi. Le phénotype observé lors des expériences de formation de biofilms serait donc lié à la formation de biofilm *ica*-indépendant. Parmi les acteurs de la formation de ce type de biofilm, on retrouve les PSMs dont RsaE modulerait leur expression par un mécanisme encore inconnu. D'autres acteurs de la formation de biofilm semblent appartenir au réseau de régulation médié par RsaE, comme l'ARNm de l'opéron *lrgAB* qui serait lié à l'activation de la sécrétion d'ADNe ou *pfbA*, codant pour une adhésine. Un modèle est proposé **figure 38**, représentant le réseau de régulation médié par RsaE et les ARNm cibles des acteurs impliqués dans la formation de biofilm *ica*-dépendant et *ica*-indépendant chez *S. aureus*. RsaE est également important dans la répression du cycle TCA ou du métabolisme d'acides aminés telle que l'arginine, ce qui pourrait expliquer l'état de persistance ou de dormance des bactéries sessiles.

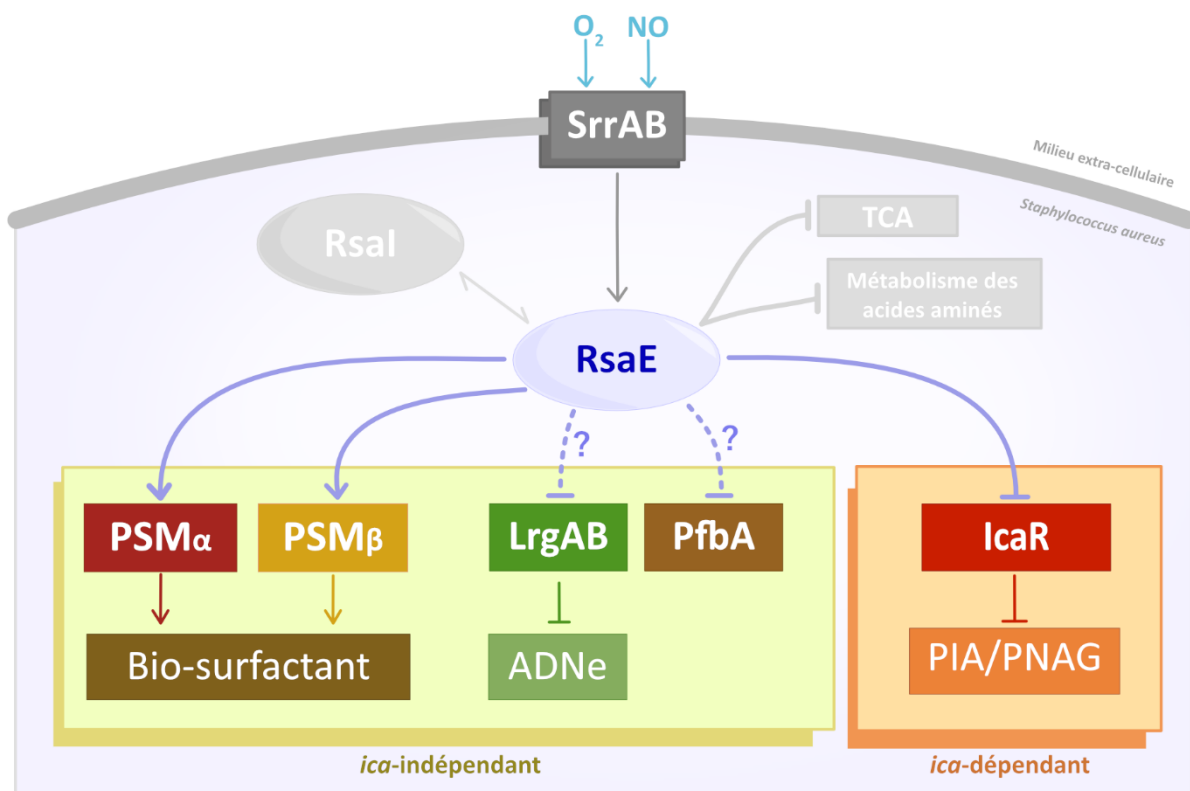


Figure 38 : Modèle du réseau de régulation de la formation de biofilm médié par RsaE

L'expression de RsaE dépend du système à deux composant SrrAB dont l'activation répond à l'hypoxie et au stress oxydant. Le sARN RsaE régule des acteurs du cycle de Krebs et de la biosynthèse des acides aminés. RsaE interagit également avec un autre ARN régulateur, RsaI, dont les mécanismes moléculaires et les conséquences au niveau de la bactérie seront décrites lors du **chapitre 2**. Au niveau de la formation de biofilm *ica*-indépendant, RsaE activerait la production des PSM α et PSM β . De plus, RsaE activerait la sécrétion d'ADNe en inhibant la production de LrgB, et pourrait moduler la production de la protéine de surface PfbA. Concernant la formation de biofilm *ica*-dépendant, RsaE activerait la production de PIA/PNAG via l'inhibition de la traduction d'*icaR*.

Chapitre 2 : Caractérisation de l'interaction entre RsaE et RsaI

RNase III CLASH in MRSA uncovers sRNA regulatory networks coupling metabolism to toxin expression.

McKellar S, Ivanova I, Arede Rei P, Zapf R, Mediati D, Mercier N, Pickering A, Foster R, Kudla G, Caldelari I, Fitzgerald R, O'Carroll R, Tree JJ, Granneman S. Nature Commun. 2022 Jun 22;13(1):3560. doi: 10.1038/s41467-022-31173-y.

Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline (SARM) est une bactérie pathogène à l'origine d'infections associées à un taux de morbidité et de mortalité humaine conséquents. La régulation post-transcriptionnelle par les petits ARN (sARN) est un mécanisme essentiel impliqué dans la régulation de l'expression de la virulence. Cependant, la fonctionnalité de la majorité des ARN engagés dans les systèmes de régulations qui ont lieu lors d'une infection est inconnue. Pour y remédier, nous avons procédé au pontage UV, à la ligation et au séquençage des hybrides (CLASH) chez SARM afin d'identifier les interactions sRNA-RNA dans des conditions qui reproduisent l'environnement de l'hôte. En utilisant l'endoribonucléase III (RNase III) qui cible les ARN double brin comme appât, nous avons découvert des centaines de nouvelles paires sARN-ARN. De manière frappante, nos résultats suggèrent que la production de toxines à l'origine de la perméabilisation des membranes est largement régulée par les sARN et que leur expression est finement liée au métabolisme. En outre, nous avons également découvert une interaction entre les deux sARN RsaE et RsaI. Dans l'ensemble, nous présentons une analyse complète des interactions entre les sARN et leurs cibles ARN chez SARM et fournissons des détails sur la façon dont celles-ci contribuent à la régulation de la virulence en réponse à des changements métaboliques.

Contributions à l'étude de McKellar *et al.*, (2022)

Ma participation à cette étude s'est focalisée sur la confirmation *in vitro* de l'interaction entre les deux ARN régulateurs RsaE et RsaI et du clivage par la RNase III du duplexe ainsi formé. La contribution comporte les expériences de retard sur gel entre les deux sARN RsaE et RsaI et celles réalisées avec des versions mutées de chacun des deux partenaires ARN. Enfin, j'ai réalisé les expériences de clivage à la RNase III afin de confirmer et définir précisément les sites de clivage au niveau de RsaE et RsaI.

ARTICLE



<https://doi.org/10.1038/s41467-022-31173-y>

OPEN

RNase III CLASH in MRSA uncovers sRNA regulatory networks coupling metabolism to toxin expression

Stuart W. McKellar ¹, Ivayla Ivanova¹, Pedro Arede¹, Rachel L. Zapf², Noémie Mercier³, Liang-Cui Chu ¹, Daniel G. Mediati⁴, Amy C. Pickering ⁵, Paul Briaud², Robert G. Foster ⁶, Grzegorz Kudla ⁶, J. Ross Fitzgerald ⁵, Isabelle Caldelari ³, Ronan K. Carroll ^{2,7}, Jai J. Tree⁴ & Sander Granneman ¹✉

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a bacterial pathogen responsible for significant human morbidity and mortality. Post-transcriptional regulation by small RNAs (sRNAs) has emerged as an important mechanism for controlling virulence. However, the functionality of the majority of sRNAs during infection is unknown. To address this, we performed UV cross-linking, ligation, and sequencing of hybrids (CLASH) in MRSA to identify sRNA-RNA interactions under conditions that mimic the host environment. Using a double-stranded endoribonuclease III as bait, we uncovered hundreds of novel sRNA-RNA pairs. Strikingly, our results suggest that the production of small membrane-permeabilizing toxins is under extensive sRNA-mediated regulation and that their expression is intimately connected to metabolism. Additionally, we also uncover an sRNA sponging interaction between RsaE and RsaI. Taken together, we present a comprehensive analysis of sRNA-target interactions in MRSA and provide details on how these contribute to the control of virulence in response to changes in metabolism.

¹Centre for Synthetic and Systems Biology, University of Edinburgh, Edinburgh EH9 3BF, UK. ²Department of Biological Sciences, Ohio University, Athens, OH 45701, USA. ³Université de Strasbourg, CNRS, Architecture et Réactivité de l'ARN, UPR9002, F-67000 Strasbourg, France. ⁴School of Biotechnology and Biomolecular Sciences, University of New South Wales, Sydney 2052 NSW, Australia. ⁵The Roslin Institute and Edinburgh Infectious Diseases, University of Edinburgh, Easter Bush Campus, Edinburgh, Scotland, UK. ⁶MRC Human Genetics Unit, University of Edinburgh, Edinburgh EH4 2XU, UK. ⁷The Infectious and Tropical Disease Institute, Ohio University, Athens, OH 45701, USA. ✉email: Sander.Granneman@ed.ac.uk

The dynamic means by which bacteria respond to stress facilitates their survival in a diverse range of environments. Survival relies on transcriptional networks whose plasticity allows bacteria to adapt their transcriptome on near-instantaneous time-scales¹. However, it is now becoming established that effective responses are dependent upon post-transcriptional regulatory mechanisms involving RNA-binding proteins (RBPs), cis-acting riboswitches and non-coding RNAs. In particular, non-coding RNAs, termed small RNAs (sRNAs), regulate the translational efficiency and stability of targeted mRNAs and can also be linked directly to transcriptional control^{2,3}. Recent research into Gram-negative bacteria such as *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* has shown the wide variety of roles that sRNAs play in mediating adaptive processes^{4–6}, but our understanding of the biology of sRNAs in Gram-positive species, such as *Staphylococcus aureus*, lags far behind.

Expression of sRNAs can either be cis to the target RNA, i.e., encoded on the opposite strand, or trans at separate genomic loci. While cis-encoded sRNAs are crucial players in specific toxin-antitoxin systems in *S. aureus*^{7,8}, trans-encoded sRNAs have the capacity to regulate numerous RNA targets involved in separate signalling pathways. To date, around 500 transcripts have been annotated as potential sRNAs in *S. aureus*⁹, however, it is unclear how many of these are genuine. Indeed, one study suggests that there are only around 50 trans-acting sRNAs that are expressed as individual transcriptional units¹⁰.

The best characterised *S. aureus* sRNA is RNAIII, which is the main effector molecule of the quorum sensing, *agr* operon. At sufficient cellular densities, RNAIII is induced and then regulates a myriad of virulence-related targets¹¹. For example, RNAIII uses its distinctive ‘UCCC’ seed motifs to prevent translation of the *spa*, *rot*, and *coa* mRNAs by binding to G-rich Shine-Dalgarno sequences^{12–14}. Additionally, RNAIII is also known to stimulate translation of *hla*, encoding for the haemolytic alpha toxin, thus showing that sRNAs can also promote the translation of mRNAs. Other sRNAs with established biology are several of the Rsa family, which are known to be involved in stress responses and regulating metabolism^{15–17}. For example, RsaE regulates the expression of genes involved in respiration and the TCA cycle^{15–18}, while RsaI is involved in sugar uptake, sugar metabolism, and biofilm formation¹⁹.

The function of sRNAs is often mediated through RBPs that regulate or stabilise (‘chaperone’) the base-pairing interactions between sRNAs and their targets. Hfq and ProQ in Gram-negative species are the best studied RNA chaperones, however, the importance of Hfq in Gram-positive species is unclear while ProQ does not have a homologue (reviewed²⁰). Thus, how sRNA-target interactions are regulated in Gram-positive bacteria may be mechanistically different from that in Gram-negative bacteria. Indeed, it has been hypothesised that sRNA-target interactions in *S. aureus* may involve more extensive base-pairing than those in Gram-negatives to circumvent the lack of a global chaperone²¹. Interestingly, in *S. aureus*, a multitude of proteins have been shown to bind sRNAs^{21,22}. For example, duplexes between RNAIII and its targets, such as *rot*, *spa* and *coa*, can be targeted by endoribonuclease III (RNase III), leading to degradation of the mRNA^{12–14,23–26}. Immunoprecipitation and sequencing experiments also showed that RNase III binds a large number of sRNAs²⁷, implying this ribonuclease plays an important role in sRNA-mediated regulation of gene expression. A brief overview of sRNA biogenesis and functionality is pictorialised in Supplementary Fig. 1.

S. aureus encounters a variety of different and hostile environments when it infects a host. Previous studies have implied that sRNAs could play an important role during host infection as

sRNA expression levels can change significantly under infection conditions^{28–30}. However, it is unclear how the vast majority of these sRNAs contribute to the infection process, underscoring the need for more detailed functional analyses. As a first step in unravelling their function, we have adapted the Cross-linking, Ligation And Sequencing of Hybrids (CLASH)^{31–34} technology for *S. aureus*. To enrich for sRNA-RNA duplexes, we used RNase III as a bait protein and performed RNase III CLASH on cells in conditions mimicking the host environment. In addition to previously known sRNA-RNA interactions, we identified hundreds of novel sRNA-RNA interactions that were condition-specific, suggesting that RNase III plays a much larger role in sRNA-mediated regulation than anticipated. In addition, many mRNA-mRNA and sRNA-sRNA interactions were identified, revealing that many metabolic pathways are connected through RNA-RNA interactions.

One strategy that *S. aureus* adopts to adjust to the host environment is to express various toxins to acquire essential nutrients by lysing host cells, to kill innate immune cells, or to escape from the intracellular environment. Our data suggest that the expression of toxins is subjected to extensive sRNA-mediated regulation. A striking discovery was the regulation of the alpha phenol soluble modulin (PSMa) toxins by RsaE. Here we show that RsaE base-pairing with the *psma* transcripts enhances the production of cytolytic toxins and increases *S. aureus*’ ability to lyse erythrocytes. Furthermore, we show that the activity of RsaE in the host environment is directly controlled by another sRNA, RsaI. We demonstrate that RsaI acts as an sRNA sponge³⁵ and functions in concert with RNase III to inactivate RsaE activity in the bloodstream.

Taken together, our data greatly expands the repertoire of sRNA-target interactions in *S. aureus* and provides details on how these contribute to adjusting virulence in response to changes in metabolism.

Results

Validation of in vitro models for the transition to the bloodstream and intracellular environment. To understand how sRNAs contribute to adaptation of *S. aureus* to the intracellular and host bloodstream environment, we performed an RNA-RNA proximity-dependent ligation method termed CLASH³² to identify directly sRNA-RNA interactions in strains JKD6009 and USA300. As these strains differ in their evolutionary history and represent distinct clonal lineages (ST239 and ST8 respectively), we hypothesised that RNA-RNA interactions conserved across them would be more likely to be genuine or be involved in fundamental signalling pathways crucial to *S. aureus* survival.

The relatively large quantities of bacterial cells (~0.5 g) required to generate high-complexity CLASH libraries made it practically and ethically challenging to perform CLASH under physiological infection conditions. Therefore, as an alternative approach, we adopted an in vitro system to mimic two different environments encountered during host infection. Previous studies have shown that specific culture media are able to recapitulate the bloodstream and intracellular environment. A commercially available eukaryotic cell culture medium, RPMI 1640, induces a similar transcriptomic response in *S. aureus* as human blood plasma²⁹. Most importantly, the lack of iron in this medium induces a strong upregulation in iron-responsive genes, a phenomenon also observed in human plasma²⁹. Additionally, low phosphate, low magnesium (LPM) media was designed to have a similar salt composition as eukaryotic cytoplasm and has been used in various bacterial infection studies^{36–41}. We therefore utilised LPM media at pH 7.6 to examine the nutritional adaptations to the intracellular environment. Finally, LPM at

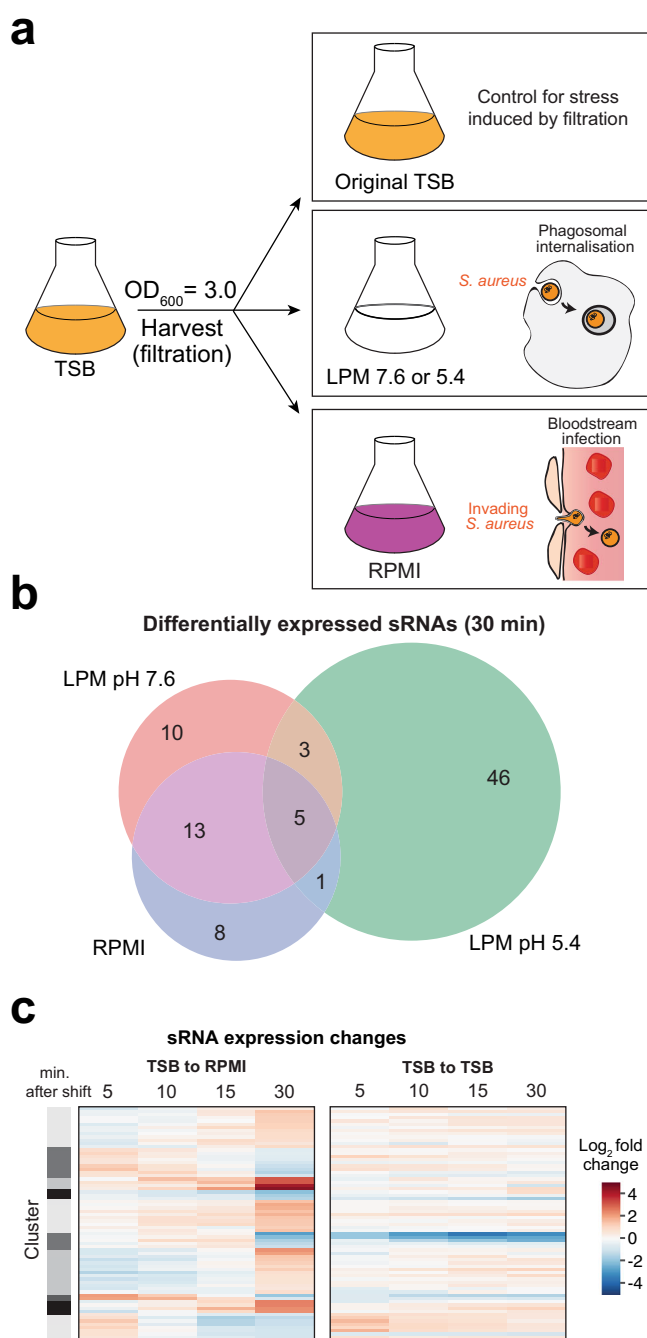


Fig. 1 Mimicking the transition to the bloodstream and intracellular environment. **a** Experimental set up for shift experiments. *S. aureus* was grown to $OD_{600} \sim 3$ in TSB and harvested through vacuum filtration. Cells were then resuspended in RPMI to simulate the bloodstream or LPM pH 5.4 to simulate intracellular phagosomes. As controls, cells were shifted into LPM pH 7.6 to model for the nutritional profile of this medium, or back into their original TSB to model for any stresses incurred by the shift. **b** Number of sRNAs with significantly changed expression after 30 min of stress. Each stress condition is uniquely coloured, with sRNAs found in LPM pH 7.6 shown in red, LPM pH 5.4 in green and RPMI in blue. **c** Changes in the expression levels of individual sRNAs during the shift to RPMI and shift back to the original TSB medium. The darker the red in colour, the higher the increase in gene expression. The darker the blue in colour, the stronger the reduction in gene expression. Expression was compared to data obtained from the TSB ($t = 0$) sample. Only sRNAs that were differentially expressed during the time-course, according to DESeq2¹¹⁶, are shown.

pH 5.4 was used to investigate the response to acidic stress which is encountered in cellular compartments such as phagolysosomes.

As mRNA half-lives in bacteria can vary from seconds to minutes⁴², we focused on the initial phases of stress adaptation. We utilised a novel cell harvesting device^{43,44} that facilitates the transfer of cells from one medium to another in under one minute, enabling stress adaptation studies at high temporal resolution. We grew *S. aureus* in tryptic soya broth (TSB) to post-exponential phase ($OD_{600} \sim 3.0$) to induce expression of virulence genes and then rapidly transferred the cells to either RPMI, LPM pH 7.6 or LPM pH 5.4 media (Fig. 1a). We used RNAtag-Seq⁴⁵ to examine the transcriptomic response of *S. aureus* to these media under our experimental conditions. We took samples 5, 10, 15 and 30 minutes after the shift to the new media. A very high correlation between replicate experiments was observed (Supplementary Fig. 2), demonstrating the reproducibility of the results. We observed dramatic and dynamic changes in sRNA gene expression (see example in Fig. 1b, c), the majority of which were specific to the infection-mimicking media. To control for mechanical stresses induced by the rapid vacuum filtration, we shifted *S. aureus* back into their original TSB medium.

Data from these TSB control cells imply that the rapid filtration has minimal impact on gene expression as most genes displayed a linear expression pattern (i.e., either continued to rise or continued to fall) after the shift back to TSB. However, the cells shifted to the stressful media showed a markedly different gene expression behaviour (Fig. 1c and Supplementary Fig. 3), suggesting that the induced changes in gene expression are largely due to the changes in media composition.

Although our RNA-seq analyses were carried out at very early time-points following the shift from TSB, we already observed transcriptomic changes that were previously detected after hours of growth in similar media. For example, after shifting to RPMI, we observed upregulation in iron-related transcripts, including members of the *isd*, *feu*, *fhu* and *sir* operons (Supplementary Fig. 4a)^{28,29}. Additionally, previous work studying transcriptome changes in *S. aureus* in response to blood and serum exposure identified upregulation of amino acid metabolism, immune evasion proteins, virulence factors and transcripts involved in iron acquisition²⁸, some of which were recapitulated in our RPMI shifts (Supplementary Fig. 4a, b). With regards to LPM pH 5.4, we observed strong upregulation in many amino acid biosynthesis pathways (Supplementary Fig. 4c), which matches previous observations of *S. aureus* internalised into human macrophages and epithelial cells²⁹. Further evidence of metabolic remodelling was also observed with upregulation in TCA cycle members. The gamma haemolysin cytolytic toxins (*hlgA*, *hlgB* and *hlgC*), which are also highly upregulated in human blood, have been hypothesised to play a role in *S. aureus* escape from internalisation of polymorphonuclear granulocytes²⁸. Interestingly, we observed rapid (within 5 min) upregulation of transcripts encoding these toxins in LPM pH 7.6, whereas the induction in LPM pH 5.4 and RPMI medium was more modest (Supplementary Fig. 4d). We conclude that our shift experiments recapitulate key aspects of the human bloodstream and intracellular environments, facilitating their use as model systems.

RNase III CLASH robustly detects RNA-RNA interactions in *S. aureus*. To be able to effectively apply the CLASH method to Gram-positive bacteria, the cell lysis and affinity purification steps required optimisation (see Supplementary Fig. 5 and Supplementary Data for further details). Because the available evidence suggests that Hfq is unlikely to play a major role in chaperoning sRNA-target interactions in *S. aureus*, the RNase III protein was

used as a bait to capture sRNA-target duplexes. To purify the protein, we generated a strain in which RNase III was fused to a HIS6-TEV-3xFLAG (HTF) tag at its C-terminus. Subsequent CLASH experiments were performed in two different methicillin-resistant *S. aureus* strains; USA300 LAC, a representative of sequence type (ST) 8, and JKD6009, an ST239 clone. For USA300, we performed CLASH on cells grown in TSB and after shifting to RPMI, LPM pH 7.6 and LPM pH 5.4 medium. For JKD6009, we only performed CLASH in the TSB and RPMI growth conditions (Supplementary Fig. 5c). Because the bulk of gene expression changes were already detected 15 min after the shift, CLASH experiments were performed on samples harvested at this timepoint. Sequencing data from 3 or 4 independent biological replicates were merged and significantly enriched interactions were identified using *hyb*⁴⁶ combined with a probabilistic pipeline⁴⁷, as previously described^{33,34}.

Analysis of the USA300 data was challenging as the quality of the annotation of this genome (USA300 FPR3757) was not equal to that of JKD6009. To improve the annotation of USA300, we used the Rockhopper software⁴⁸ on our RNA-seq data to map untranslated regions (UTRs) and identify novel transcripts. Our updated genome annotation is included in the accompanying Gene Expression Omnibus deposition. This revealed that many annotated sRNAs overlapped with UTRs, as was observed previously in other strains¹⁰. Because it was unclear whether these UTRs harboured genuine sRNAs, we focused our analyses on sRNAs that are transcribed as independent transcriptional units¹⁰. For convenience, we hereafter refer to these bona fide sRNAs as “bf sRNAs”. The complete list of all sRNA target interactions can be found in Supplementary Data 3 and 4, and further detailed in the included Supplementary Data^{49–51} and Figures documentation.

Many of the predicted sRNA-target interactions in USA300 had poorer folding energies compared to chimeras identified in JKD6009 and experimentally verified *S. aureus* sRNA-mRNA interactions captured through CLASH (Fig. 2a). Manual inspection of the data revealed that many of the USA300 chimeras with poor folding energies consisted mainly of sequences with low GC content (Fig. 2b) that mapped to multiple annotated features in the USA300 genome. These were therefore likely incorrectly assigned as intermolecular interactions. As a result, we only considered interactions that contained a bf sRNA and had a minimum folding energy (MFE) equal or smaller than -10 kcal/mol, which removed most of these likely false-positive interactions. The remaining sRNA-target interactions had GC contents and folding energies closer to that of captured known interactions, which acted as positive controls (Fig. 2a, b).

Because RNase III is an endonuclease that cleaves double-stranded RNA substrates generally consisting of relatively long stem structures interrupted by few bulges⁵², we reasoned that interactions obtained from CLASH should have a strong folding potential and contain such structures. To test this, we used RNADuplex⁵³ to compute the hybridization potential (in kcal/mol) of each half of the filtered chimeras (Fig. 2c). This showed that the data were statistically significantly enriched for structured RNAs compared to randomised, shuffled data. Moreover, RNA structural motif analyses revealed that the filtered chimeras were highly enriched for structures with long stems and only a few single nucleotide bulges (Fig. 2d), fitting the established mode of RNase III binding to its targets⁵⁴ and giving further credibility to identified interactions.

Overall, we obtained thousands of unique hybrids in the RNase III-HTF data (Fig. 2e). Within each experimental condition, we also detected hundreds of fragments containing bf sRNAs (Fig. 2f). Very few chimeras were detected in the CLASH data from the parental strains, suggesting that those interactions

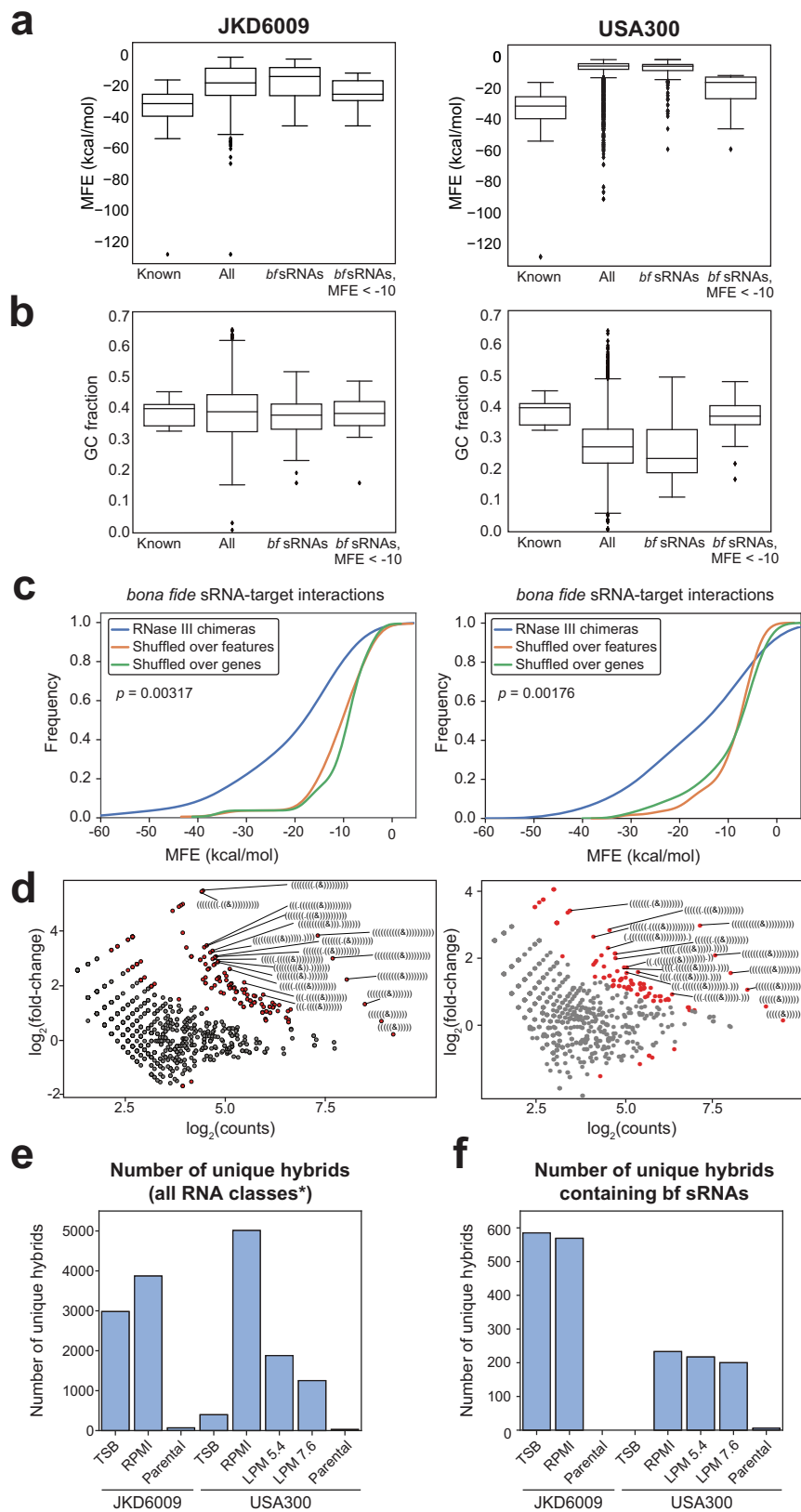
detected through RNase III CLASH are specific. As such, we conclude that RNase III CLASH effectively captures RNA-RNA duplexes in *S. aureus*.

The types of interactions obtained were overall similarly abundant across the different strains and conditions (Fig. 3a). Notably, we obtained 721 hybrids between mRNAs and transcripts antisense to mRNAs (mRNA_{AS}), agreeing with previous RNase III RIP-seq experiments that identified mRNA_{AS} transcripts as major targets of RNase III²⁷. Of these mRNA-mRNA_{AS} interactions, 72% (JKD6009) and 53% (USA300) were between cognate RNAs (Supplementary Fig. 6a); this confirms that we can capture significant numbers of canonical mRNA-mRNA_{AS} interactions but also raises the interesting possibility of cis-encoded mRNA_{AS} transcripts regulating distinct targets in trans. We also recovered a large number of sRNA-mRNA interactions (~11% of each condition, on average), consistent with established RNase III biology^{14,55–57}. Of note, an average of 7% of the interactions were between sRNAs and other sRNAs (Fig. 3a). Examples of such interactions have recently been identified in *S. aureus*^{17,19,58}. Finally, we also recovered a significant amount of mRNA-mRNA interactions. Given that UTRs are known to be a source of trans-acting regulatory RNAs in other bacterial species^{5,59,60}, these may contain such examples. Consistent with this idea, Mediati et al.⁶¹ identified a long 3' UTR in *S. aureus* that is not processed from the mRNA but functions as a non-coding RNA in regulating vancomycin resistance. We conclude that we recovered examples of all known RNase III target categories.

Overall, we identified 42 bf sRNA-target interactions in USA300, represented by 855 unique hybrids, and 48 bf sRNA-target interactions in JKD6009, represented by 1689 unique hybrids. These were primarily between sRNAs and mRNAs, but a noteworthy number of sRNA-sRNA interactions were also identified (Fig. 3b). As such, we conclude that RNase III recognises many bf sRNA-target duplexes. The interactome is visualised in Supplementary Fig. 7.

We reasoned that bf sRNAs predicted to base-pair at or near the mRNA Shine-Dalgarno (SD) sequence and/or start codon would most likely have an impact on the mRNA or protein steady-state levels. Indeed, a large number of our bf sRNA-mRNA interactions (Fig. 3c) included these ribosome binding sites, implying a canonical mode of sRNA-mediated regulation⁶². We also found examples of bf sRNAs base-pairing with the coding sequences as well as the extreme 3' end of transcripts involved in operons (Supplementary Fig. 6b). This included the RNAIII-*murQ* interaction that was also detected by Mediati et al.⁶¹ and was shown to be a functional interaction.

To assess the quality of our CLASH data, we firstly looked for experimentally verified interactions (Supplementary Fig. 8). Several type I toxin-antitoxin systems are well characterised in *S. aureus*, where an unstable antisense RNA represses the translation of a more stable, toxic mRNA. The best characterised of these is between *sprA1*/SprA1_{AS}, and *sprA* has been identified as an RNase III target through RIP-seq experiments^{7,8,27}. These interactions were by far the most abundant in the data and were detected in all strains and conditions tested. Additionally, the in silico folded structures of the corresponding chimeric reads are consistent with the published literature. We also identified several known sRNA-mRNA interactions, including RsaA-*mgrA*; RsaA-*HG001_01977* (annotated here as SAA6008_01954 and SAUSA300_1921); RsaE-*opp3B*; RsaE-*purH* and SprX-*spoVG* (Supplementary Fig. 8). Again, the predicted structure of the chimera halves was consistent with published literature^{15,17,26,63}. A detailed description of these verified interactions is provided and discussed in the Supplementary Data. Overall, we conclude that RNase III CLASH reliably detects sRNA-mRNA interactions in *S. aureus*.



RsaI directly and specifically binds RsaE in vitro. We identified six unique sRNA-sRNA interactions using RNase III CLASH. Two stood out due to their being represented by a relatively large number of hybrids; RsaI-RsaE and RsaA-RNAIII. We detected interactions between RsaA-RNAIII in JKD6009 in TSB and RPMI (Supplementary Fig. 9a, b) and RsaI-RsaE interactions could be detected in

both strains, but primarily in the RPMI, LPM 7.4 and LPM 5.4 media (Supplementary Fig. 10a). We were able to demonstrate specific binding between RsaA and RNAIII in vitro (Supplementary Fig. 9c and d). However, we did not pursue this interaction further as its functional significance was unclear (see Supplementary Fig. 9e-g and Supplementary Data for a description of the results).

Fig. 2 Folding and structural analyses of hybrids identified through RNase III CLASH. **a** Boxplots showing the minimum folding energy (MFE) of identified RNA-RNA interactions in all independent RNase III CLASH datasets ($n = 4$). Plotted are the previously verified interactions (“Known”) captured through CLASH, all the interactions identified by CLASH; only those containing a bona fide sRNA (bf sRNAs); and those containing a bona fide sRNA and filtered for MFE < -10 kcal/mol. The boxplot extends from first to the third quartile values of the data, with a line at the median. The whiskers extend from the edges of box to show the interquartile range multiplied by 1.5. Outliers are plotted as separate dots. **b** As in **a** but with reference to GC content. **c** Cumulative distribution of the MFE of the filtered interactions involving bona fide sRNAs in JKD6009 (left) and USA300 (right). Folding energies were calculated using RNADuplex⁵³. As controls, interactions were shuffled randomly against other partners of the same class (orange line) or randomly across the gene (green line) of their partner identified through CLASH. Significance was tested with the Kolmogorov-Smirnov test. **d** Enriched structural motifs (red dots) in hybrids identified through RNase III CLASH. The incidence of each structure generated by RNADuplex was counted and compared to interactions randomly shuffled against different partners. Significance was calculated using a one-sided Fisher’s exact test and Benjamini-Hochberg correction was applied to account for multiple tests. The x-axis displays the total number of counts for each structure in the data, whereas the y-axis indicates the $\log_2$ -fold difference for each structure between the experimental data and the randomly shuffled data. **e** Total number of unique hybrids identified in each experimental condition. The parental controls for each strain were merged. *tRNA-tRNA and rRNA-rRNA chimeras were excluded due to their high sequence similarity, meaning that we could not unambiguously determine if these represented intermolecular or intramolecular interactions. **f** As in **e**, but with respect to hybrids involving a bf sRNA.

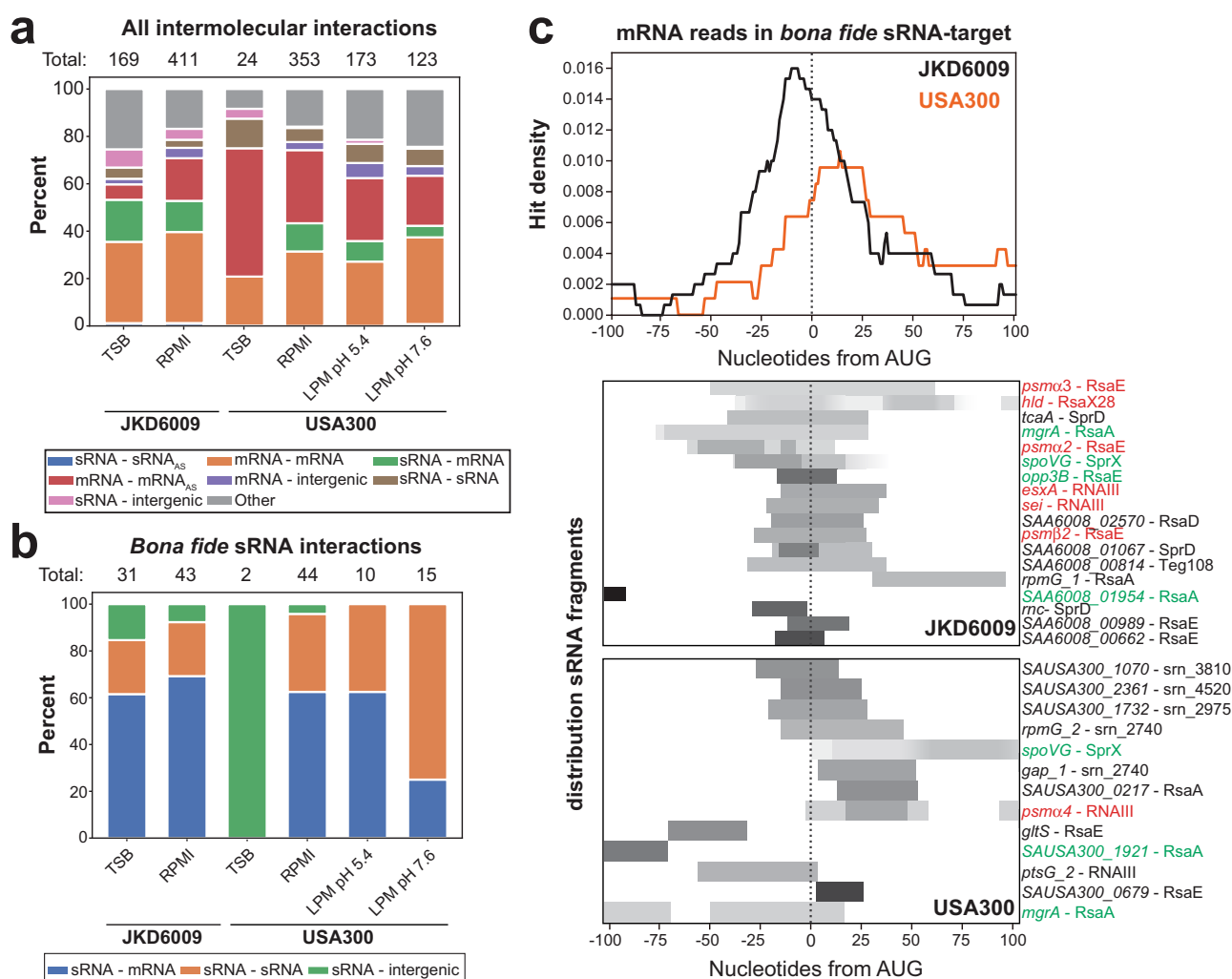


Fig. 3 RNase III CLASH captures canonical sRNA - mRNA interactions. **a** Categories of identified intermolecular RNA interactions. Here, a single interaction can be represented by many hybrids. tRNA-tRNA and rRNA-rRNA chimeras were excluded due to their high sequence similarity, meaning that we could not unambiguously determine if these represented intermolecular or intramolecular interactions. “Total” indicates the total number of unique RNA-RNA interactions identified in each dataset. Colour of each stacked bar denotes the type of interaction represented. **b** As in **a**, but only for interactions containing a bona fide sRNA. **c** Top: distribution of the mRNA fragments in bf sRNA-mRNA interactions around the translational start codon (AUG). Orange line shows data from USA300 and the black line from JKD6009. Bottom: heatmaps showing the read distribution for the mRNA fragments for each individual interaction. Interactions highlighted in green are those that have previously been experimentally verified, and in red are those interactions involving toxins. Interactions coloured in black are other novel interactions identified in this study.

The interaction between RsaI and the highly conserved RsaE (RoxS in *Bacillus subtilis*) has previously been proposed in Gram-positive bacteria^{17,19,64}. However, precisely how these sRNAs base-pair and the functionality of this interaction was unclear. RsaE is characterized by a sequence duplication comprising the characteristic UCCCC seed motif. Our CLASH data imply that the two G-rich regions of RsaI base-pair with the 5' and the 3' UCCCC motifs of RsaE when cells are transferred to RPMI and LPM medium (Supplementary Fig. 10b). The reason we primarily detected the RsaI-RsaE interaction in RPMI and LPM media could be explained by the expression levels of the two sRNAs under these stress conditions; RsaI was rapidly upregulated in response to RPMI and LPM exposure but not in TSB (Supplementary Fig. 10c). RsaE remained relatively stable in the TSB control and RPMI, while decreasing in the two LPM media.

We performed electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) with (mutant) RsaI and RsaE transcripts (Supplementary Fig. 11). This revealed that the 3' UCCCC motif in RsaE is essential for binding RsaI in vitro (Supplementary Fig. 11a). Furthermore, these data confirmed that both GGGG motifs in RsaI are involved in the base-pairing interactions as only mutations in both G-tracts completely disrupted the interaction with RsaE (Supplementary Fig. 11b; RsaI mut 3). However, base-pairing could be partially restored with this G-tract mutant when compensatory mutations were made in RsaE (Supplementary Fig. 11c; RsaE mut 1 and RsaI mut 3).

Because the RsaE-RsaI interaction was recovered using RNase III as bait, it is logical to assume that this sRNA-sRNA duplex is a substrate for RNase III-mediated cleavage. To test this possibility, we 5'-end radiolabelled RsaE or RsaI, mixed them respectively with cold RsaI or RsaE and increasing concentrations of recombinant RNase III in presence of Mg^{2+} (enzyme activator) or Ca^{2+} (enzyme inhibitor). Consistent with this idea, we found that RNase III specifically cleaves a fraction of RsaE and RsaI at a single position but only when they formed a duplex in vitro (Supplementary Fig. 12a, b). However, RNase III cleavage was only detected in the stem where the 5' UCCCC motif of RsaE is base-paired to the 3' GGGG motif of RsaI (Supplementary Fig. 12c). We conclude that RsaE specifically base-pairs with RsaI in vitro and that this duplex can be cleaved by RNase III.

RsaI and RsaE are trimmed at the 3' end. Because RsaE regulates multiple metabolic pathways^{15–17} and RsaI plays a role in glucose starvation¹⁹, we hypothesised that this interaction may mediate metabolic remodelling when entering the host environment. This led us to a model where RsaI is upregulated during stress and then base-pairs with RsaE to inhibit RsaE's regulation of its mRNA targets. Given that RsaI's interaction with RsaE was primarily detected under host infection conditions and that RsaI has been proposed to play a role in the infection process¹¹, we decided to test this hypothesis during growth in human serum to better mimic physiologically-relevant infectious conditions. Northern blot analyses showed that RsaE species slightly longer than 100 nt could be detected in human serum, which is approximately the expected length (102 nt; Fig. 4a, lane 2). However, in TSB, shorter RsaE species accumulated, indicating that in rich medium RsaE is processed (Fig. 4a, lane 1). Similarly, we found that RsaI accumulates as slightly shorter species in human serum (Fig. 4a, lane 2).

In addition to the detection of alternative sRNA species, quantifying the total levels of all forms of RsaE revealed that these were significantly lower in human serum compared to TSB, implying RsaE downregulation in this environment (Fig. 4a, lanes 1 and 2; Fig. 4b; Supplementary Fig. 13a, lanes 1). In opposition to this, all forms of RsaI were comparable in TSB and human

serum (Fig. 4a, lanes 1 and 2; Fig. 4b). As a result of this regulation, RsaI levels in human serum are therefore increased relative to RsaE (Fig. 4a, b). This is an important point as their relative expression levels likely determines the regulatory impact.

To gain more insights into the processing of RsaE and RsaI, we mapped the extremities of these molecules in TSB and human serum using Nanopore sequencing (Fig. 4c, d). This revealed that both RsaE and RsaI undergo trimming of the U-tract of the transcription terminator, resulting in heterogenous RNA sub-species of varying lengths. This was particularly evident for RsaE in TSB, mirroring the northern blot data. We found that full-length RsaE has an 8-nucleotide terminator sequence composed of 7 Us and a terminal A (UUUUUUUA). In human serum, RsaE is observed primarily as the full-length product or with a two-nucleotide trim. In comparison, RsaE in TSB is only very rarely present as the full length, and instead exhibits a variety of trimmed subspecies containing terminators between 2 and 6 nucleotides in length with the most abundant being 4 (Fig. 4c). Overall, we conclude from the northern blot data and Nanopore sequencing that RsaE undergoes 3'-end trimming in TSB, with full length (or only a small degrees of trimming) RsaE observed in human serum.

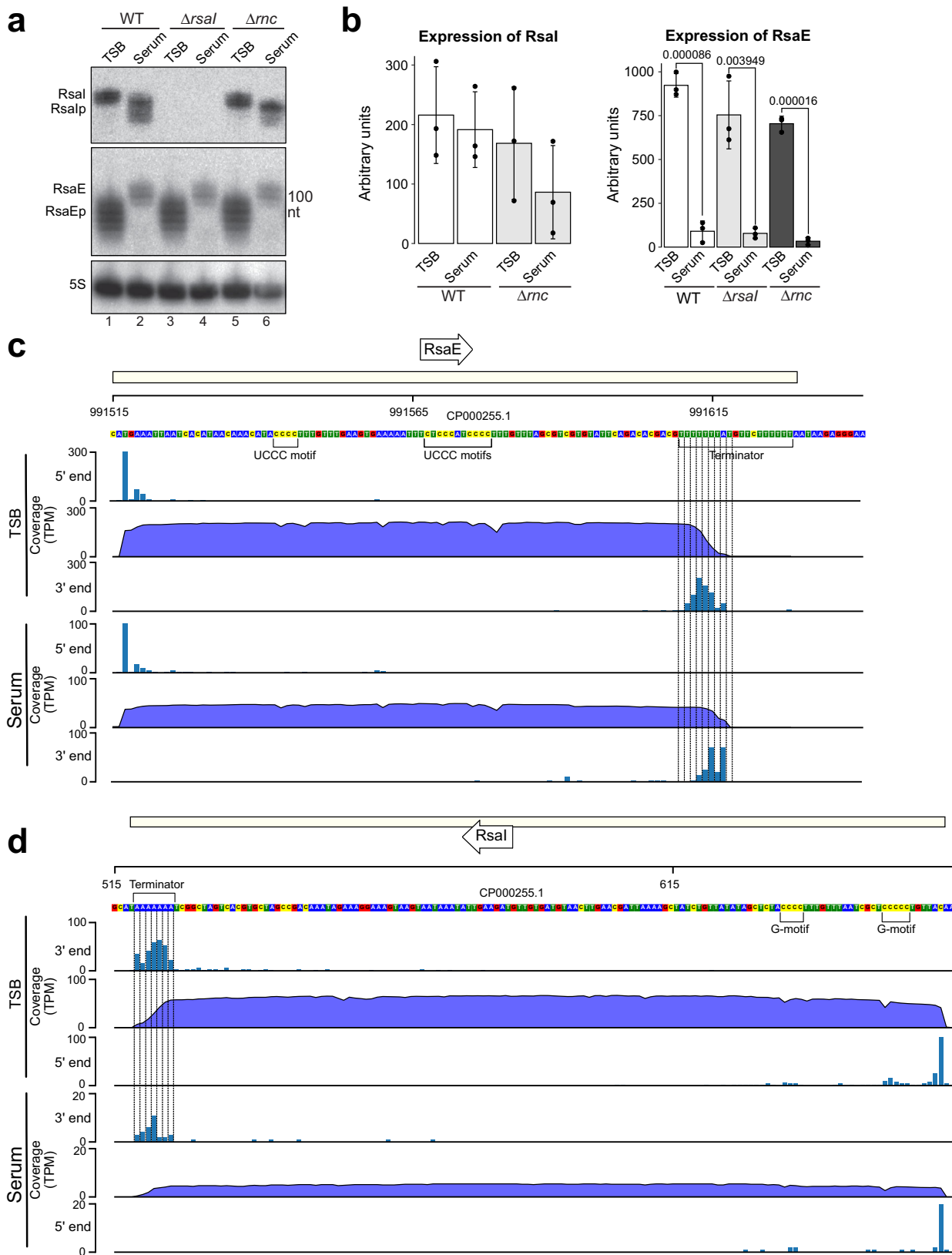
Like RsaE, RsaI shows differential 3'-end trimming in TSB and human serum. We found RsaI to exhibit a terminator of 7 Us. In TSB, terminator lengths between 2 and 5 Us were most prominent, although the full-length subspecies was also observed at significant levels. In comparison, RsaI in human serum was most prominently 4 Us in length, although other subspecies were also observed (Fig. 4d).

RsaI and RNase III primarily regulate RsaE activity, not stability, under host infection conditions. Because RsaI directly binds RsaE and this duplex can be cleaved by RNase III in vitro, we next asked whether these molecules regulate the stability of RsaE in human serum. Deleting RsaI (Δ rsaI) or RNase III (Δ rnc) in USA300 did not significantly influence RsaE processing or steady state levels in TSB or human serum (Fig. 4a, b, lanes 3–6). This was also observed in a double Δ rsaI- Δ rnc mutant (Supplementary Fig. 13a, lanes 1–4). We conclude that RsaI and RNase III do not significantly impact RsaE stability.

Do RsaI and RNase III then regulate RsaE activity? Deleting RsaI or RNase III led to a strong and significant reduction in several tested RsaE targets, but only when the cells were grown in human serum (Fig. 5a). This implies that deleting RsaI or RNase III results in increased RsaE activity under infection-mimicking conditions. The abundance of RsaE target mRNAs in the WT strain did not differ significantly between TSB and human serum (Supplementary Fig. 13b), further supporting the conclusion that the decrease in target mRNA stability observed in the Δ rsaI and Δ rnc strains is due to the removal of RsaI and RNase III expression respectively, and not the effect of the growth in human serum. Overall, these data suggest that binding of RNase III to the RsaI-RsaE duplex is necessary and sufficient to regulate the levels of RsaE targets in human serum.

The observation that the RsaI and RNase III-dependent regulation of RsaE targets was only observed in human serum implies that high levels of RsaI relative to RsaE are required to regulate RsaE targets. To test this hypothesis, we overexpressed RsaI in cells grown in TSB. Consistent with our predictions, very high levels of RsaI (Fig. 5b, lanes 3 and 4, quantified in Fig. 5c) increased the expression of RsaE targets (Fig. 5d). This was independent of the presence of RNase III as equivalent results were obtained when RsaI was overexpressed in the Δ rnc strain (Fig. 5b–d).

Vice versa, to examine if RsaE can regulate RsaI, we overexpressed RsaE in the WT and Δ rnc background and



examined the stability of RsaI. First, RsaE was overexpressed using the constitutive *amiA* promoter. No significant changes in RsaI levels were observed in TSB or human serum conditions (Supplementary Fig. 13c, compare lanes 3, 4, 7 and 8 with lanes 1 and 2 and the quantification of the results below the image). However, there was only a modest overexpression of RsaE using

this constitutive promoter, indicating that RsaE levels are tightly controlled. Supporting this idea, previous attempts to overexpress RsaE have resulted in decreased cell viability in rich media conditions¹⁵. We therefore decided to use a previously described tetracycline-inducible RsaE construct¹⁷. After a 15-min induction, RsaE levels were substantially upregulated in TSB

Fig. 4 RsaI and RsaE medium-dependant expression and processing. **a** Northern blot analysis of USA300 parental (WT), Δ rsaI and Δ rnc strains grown in TSB and human serum. Cells were grown to exponential phase in TSB, diluted in 10 mL of human serum to OD₆₀₀ 0.05 and grown for another 3 h. RsaIp and RsaEp indicates processed forms of the corresponding sRNAs. Three independent biological replicate experiments were performed, with a representative experiment shown here. **b** Quantification of the RsaE and RsaI levels represented in **a**. Arbitrary units indicate the signal intensities of the bands as measured by the Fuji AIDA software. Shown are the averages and standard deviation calculated from three independent replicate experiments. Values above bars display respective *p* value, obtained from Student's unpaired, two-tailed *t* test. Images and raw data used to generate figures (**a**, **b**) are provided in the Source Data file. **c** Genome browser visualisation of RsaE and its mapped 5'- and 3'-ends. Total RNA was extracted from cells grown in TSB or human serum and then the exact sequence of RsaE was identified through Nanopore cDNA sequencing. Reads are expressed as transcripts per million (TPM). DNA nucleotides are coloured, A in blue, T in green, C in yellow and G in red. **d** As in **c** but for RsaI.

(Supplementary Fig. 13d, lanes 3, 7). However, the cell was still able to strongly repress RsaE overexpression in serum (Supplementary Fig. 13d, lanes 4, 8). Note that RsaE expressed from this inducible plasmid accumulates as a longer species in USA300. The fact that we observed strong suppression of RsaE expression in human serum using two different promoters suggests that post-transcriptional regulation plays an important role in suppressing RsaE levels under these conditions. Despite this large increase in RsaE in TSB, we could not detect significant changes in RsaI levels (Supplementary Fig. 13d, lanes 3 and 7) or RsaE mRNA targets (Supplementary Fig. 13e). It therefore seems that we were unable to express RsaE to sufficiently high levels in USA300 to impose changes on these interacting RNAs, possibly because RsaE levels are very tightly controlled.

Collectively, these data suggest that when RsaI is expressed at sufficiently high levels relative to RsaE in human serum, RsaI can sponge RsaE and prevent it from downregulating its targets in an RNase III-dependent manner. However, this dependency on RNase III can be overcome by expressing very high levels of RsaI. We therefore hypothesise that the main function of RNase III here is to act as an RNA chaperone by stabilising the RsaI-RsaE base-pairing interactions.

Toxin expression in *S. aureus* is under extensive sRNA-mediated regulation. Strikingly, we identified many sRNAs fused to fragments of toxin-encoding mRNAs, including phenol-soluble modulins (PSMs) (Fig. 6a, Supplementary Fig. 14). In JKD6009, we identified RsaE interacting with members of both the alpha and beta PSMs (α / β PSMs), *psma2*, *psma3* and *psm β 2*, during growth in TSB (Supplementary Fig. 7). These cytolytic peptides⁶⁵ are crucial for *S. aureus* virulence⁶⁶ through inducing blood cell lysis^{66,67}, phagosomal escape^{68,69} and detachment from biofilms^{70,71}. The stability of the α PSM operon RNA transcript is known to be regulated by the sRNA Teg41, which is predicted to bind within the coding sequence of *psma4*⁷². Our CLASH data indicate that RsaE uses its 3' UCCCC motif to base-pair with the Shine-Dalgarno (SD) sequences of *psma2* and *psma3* mRNAs (Fig. 6b and Supplementary Fig. 14a). However, similar base-pairing interactions can also be drawn with the SD sequences of the *psma1* and *psma4* transcripts and with the 5' UCCCC motif of RsaE (Fig. 6c).

We also found an interaction between RNAIII and *psma4* in both JKD6009 and USA300, primarily found after the shift to both LPM media (Fig. 6a, Supplementary Fig. 14b). In silico analyses predict that RNAIII binds to a sequence in *psma4* that normally sequesters the SD sequence. This suggests RNAIII could stimulate PSMa4 production by liberating the SD sequence from a stem structure, making it more accessible to ribosomes, in a similar way as it regulates α -toxin⁷³.

Finally, we also identified sRNA-toxin interactions with the PSMs. We identified an interaction between helix 9 of RNAIII and *esxA* (Fig. 6a), which is important for the intracellular survival of *S. aureus* in infected epithelial cells through interfering with apoptosis⁷⁴. Finally, after shifting JKD6009 to RPMI, we

identified RsaX28 interacting with the *hld* coding sequence of RNAIII, and RNAIII interacting with *sei*, encoding for enterotoxin I (Supplementary Fig. 14c). Thus, the expression of *S. aureus* toxins appears to be under extensive sRNA-mediated regulation.

RsaE regulates haemolytic activity by enhancing phenol-soluble modulins production. Given RsaE's roles in metabolic regulation, we hypothesised that regulation of PSMs by RsaE could represent a direct link between metabolism and virulence at the post-transcriptional level. Because the α PSMs (in particular PSMa3) display greater cytotoxicity than the β PSMs⁷⁵ we decided to further characterize the predicted interaction between RsaE and α PSMs. Consistent with our CLASH data, our EMSAs showed that RsaE can interact with *psma3* in vitro, although complex formation is inefficient (Fig. 6d). This suggests that a chaperone may be required to stabilize these duplexes. Nevertheless, the interaction was specific as mutations in RsaE's C-rich motifs abrogated duplex formation. Interestingly, although RsaE's two UCCCC motifs can act independently to regulate several mRNA targets¹⁷, we found that mutation of just the 3' UCCCC motif can completely abolish binding to *psma3*. However, we were unable to verify the predicted interactions between RsaE and *psma1* and *psma4* by EMSA.

The observation from CLASH that RsaE interacts with the SD sequences of the *psma2* and *psma3* suggests that RsaE base-pairing would inhibit the translation of these toxins as it would block the association of the 30S ribosomal subunit. To address this, we attempted to validate these interactions in *S. aureus* using a GFP-reporter assay⁷⁶. Here, the RBS and a portion of the coding sequence of each PSM was fused to GFP. However, none of the *psma*-GFP fusions were expressed at sufficiently high levels in vivo. Therefore, as an alternative approach for testing the functional significance of this interaction in vivo, we investigated the role of RsaE in regulating cytotoxic activity. We performed these validation experiments in the USA300 background as this strain is known to secrete high levels of PSMs compared to other clinical strains⁷⁷. As the secreted α PSMs are involved in the lysis of host blood cells^{66,67,78}, we reasoned that deleting RsaE would increase haemolytic activity, whereas overexpression should decrease it. Culture supernatants were incubated with whole human blood and the degree of lysis was measured by optical absorbency.

Much to our surprise, overexpression of RsaE using the constitutive *amiA* promoter resulted in a 1.5 to 2-fold increase in haemolytic activity, whereas deletion of RsaE reduced haemolytic activity by approximately 40% relative to the wild type (Fig. 6e). The defect in haemolytic activity of the Δ rsaE strain could be restored (and even increased) by overexpressing RsaE from a plasmid (Fig. 6e). Identical results were obtained with butanol extracts of culture supernatants, which enriches for PSMs⁷² (Fig. 6f). As we uncovered this interaction using RNase III as a bait protein for CLASH, we also tested the haemolytic activity in

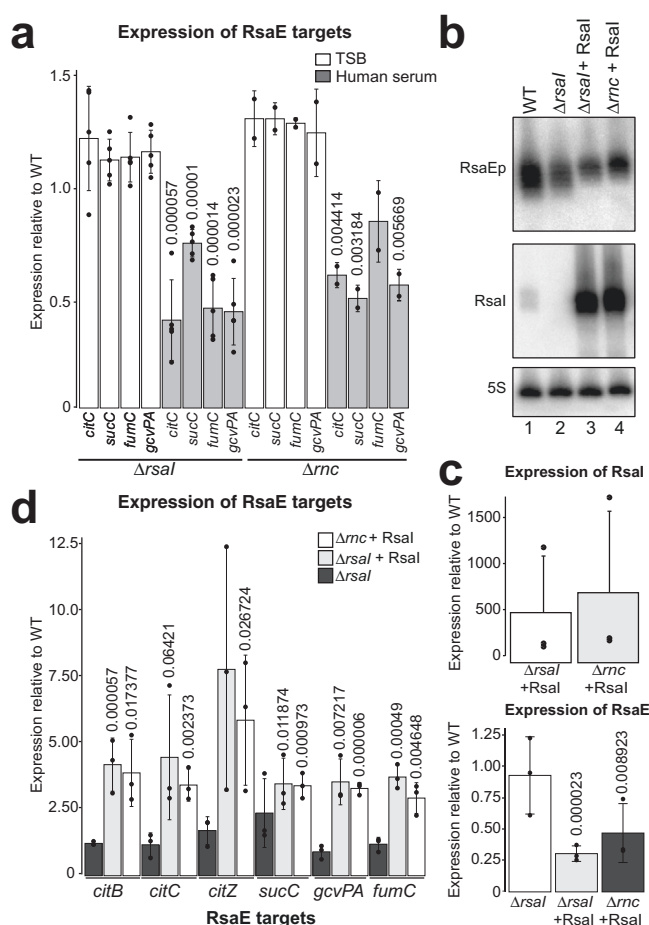


Fig. 5 RsaI and RNase III regulate RsaE activity in human serum. **a** RsaI and RNase III regulate RsaE activity in human serum. Shown is the expression of RsaE targets in TSB and human serum in the Δ rsaI and Δ rnc strains relative to the parental strain (USA300) as measured by RT-qPCR. Averages and standard deviation were calculated from five (Δ rsaI) or two (Δ rnc) experimental replicates and three technical replicates. Values above bars display respective *p* value (mutant vs WT), obtained from Student's two-tailed, unpaired *t* test. The bar fill denotes the condition tested, white for TSB, grey for human serum. **b** Overexpression of RsaI and impact on the levels of RsaE. Strains (WT, Δ rsaI and Δ rsaI complemented with a plasmid expressing RsaI) were grown to OD₆₀₀ ~3.0 in TSB and RNA was analysed by Northern blot analyses to detect RsaE, RsaI and 5S rRNA. RsaEp indicates processed RsaE. Shown is a representative Northern blot results from three independent experiments. **c** Quantification of RsaI and RsaE Northern blot results described in **b**. Shown are the averages and standard deviations calculated from three independent experiments. **d** Expression of RsaE targets in Δ rnc and Δ rsaI strain complemented with a plasmid expressing RsaI. Shown are the averages and standard deviations calculated from three independent experiments. Values are represented as relative to the WT. Values above bars display respective *p* value (mutant vs WT), obtained using Student's two-tailed, unpaired *t* test. The bar fill denotes the tested strain; dark grey for Δ rsaI, light grey for Δ rsaI pIC53:RsaI and white for Δ rnc pIC53:RsaI. Images and raw data used to generate these results are provided in the Source Data file.

an RNase III deletion mutant (Δ rnc). Deleting RNase III almost completely abolished haemolytic activity (Fig. 6e).

Finally, we also performed label-free quantitative mass-spectrometry on culture supernatants from Δ rsaE and Δ rsaE complemented with RsaE on a plasmid (triplicate experiments; Supplementary Fig. 15a). This showed that deleting RsaE substantially reduced the expression of PSMa1 and PSMa4 levels

in Δ rsaE culture supernatants (Supplementary Fig. 15b-c). We identified two unique PSMa2 peptides in our data, however, the intensities were too low to be able to do a reliable quantification. The level of PSMa3 and β PSM toxins were not significantly affected, whereas reduced δ -toxin levels were found in supernatants of the Δ rsaE strain (Supplementary Fig. 15b). Importantly, toxin production was restored to roughly wild-type levels when RsaE was reintroduced in the Δ rsaE strain from a plasmid (Supplementary Fig. 15d).

Taken together, these data imply that RsaE positively regulates the expression of α PSM-mediated haemolysis. We propose that RsaE acts to couple metabolic pathways to virulence through post-transcriptional regulation of its target mRNAs.

RNase III is required for optimal *esxA* toxin production. We applied numerous approaches to validate the interaction identified between helix 9 of RNase III and *esxA* (Fig. 7a). Firstly, we recapitulated the interaction in vitro using an EMSA. The CLASH data suggested that RNase III's ninth helix makes extensive base-pairing interactions with the *esxA* coding sequence just after the SD sequence (Fig. 7a); our EMSAs demonstrated that the interaction was specific to this region of RNase III (Fig. 7b, c).

We were also able to confirm the interaction in vivo using a GFP reporter assay⁷⁶. Here, a fragment of the *esxA* 5'-UTR and coding sequence was fused to GFP and expressed constitutively from a plasmid using the *amiA* promoter. The impact of ectopic RNase III expression on the translation of *esxA* could then be inferred by fluorescence. Importantly, this system uncouples *esxA* expression from its endogenous promoter, thus facilitating interrogation of only post-transcriptional effects of RNase III. RNase III overexpression led to a ~12-fold increase in expression of an EsxA-sfGFP fluorescent reporter, indicating that, as with α -haemolysin⁷³, RNase III base-pairing enhances *esxA* translation (Fig. 7d). We also created an *esxA* seed mutant in which each G or C nucleotide predicted to interact with RNase III was complemented. Although this *esxA* mutant-sfGFP construct was less stable than the wild type, expressing an RNase III mutant containing compensatory mutations increased the levels of this GFP reporter ~4-fold (Fig. 7d). As controls, we confirmed that the expression of RNase III did not affect fluorescence of GFP alone nor GFP fused to the 5' UTR of a transcript that is not regulated by RNase III (*gyrB*; Supplementary Fig. 16). We conclude that RNase III directly binds the *esxA* mRNA to enhance its translation.

To investigate the significance of this interaction at the protein level, we created a Δ rnaseIII mutant and examined EsxA expression through Western blotting (Fig. 7e, f). EsxA levels were almost undetectable in the RNase III deletion mutant but were completely restored when RNase III was expressed from a plasmid. Deletion of RNase III also reduced the levels of *esxA* mRNA (Fig. 7e, f), suggesting that RNase III binding to *esxA* stabilises the mRNA. Deletion of RNase III, the bait protein used for the CLASH experiments, did not strongly impact *esxA* mRNA levels, suggesting that the endonuclease does not play a significant role in regulating the stability of the *esxA* mRNA (Fig. 7g, h). We conclude that RNase III directly controls the levels of the EsxA toxin.

Discussion

Microorganisms must constantly adapt their transcriptome to respond to changes in their environment. When pathogenic bacteria systematically infect their host, they must derive essential nutrients from the bloodstream; an environment that is usually depleted of crucial cofactors such as iron. To overcome this problem, *S. aureus* has a wide array of virulence factors that enable the bacterium to extract nutrients through host cell

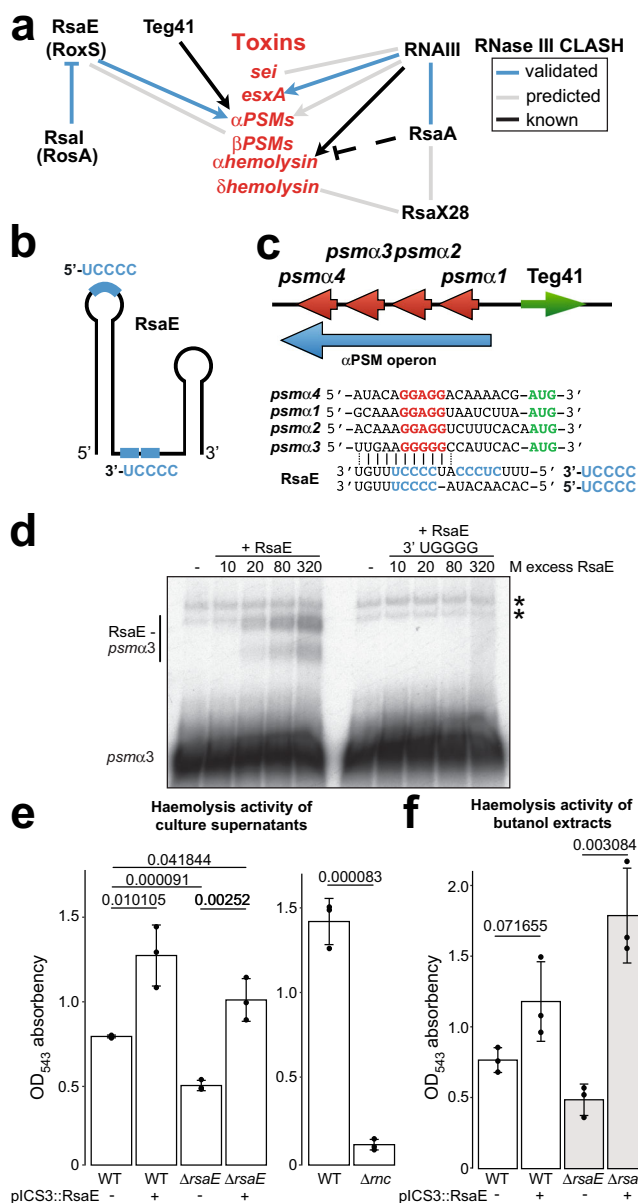


Fig. 6 CLASH predicts toxin production is extensively regulated by sRNAs. **a** Predicted interactions between sRNAs and sRNAs, and sRNAs with mRNAs encoding for toxins (indicated in red). Black line indicates interactions experimentally verified by previous groups. Grey lines indicate interactions predicted by CLASH and blue lines indicate interactions predicted by CLASH that we experimentally verified. Dashed lines indicate indirect regulation. **b** Schematic representation of the structure of the RsaE sRNA. Blue lines and blue text indicate the RsaE UCCCC seed sequences. **c** Schematic representation of the αPSM operon (blue arrow), the location of the four αPSM genes in the operon (red arrow) and the location of the Teg41 sRNA in this genomic location. Below that, a multiple sequence alignment of *psmA*1-4 Shine-Dalgarno (red) and translational start codon (green) regions aligned to the RsaE seed sequence motifs. CLASH detected interactions between the 3' UCCCC motif (light blue) of RsaE with the *psmA*2 and *psmA*3 transcripts but similar base-pairing interactions can also be drawn with all the PSM transcripts and with the 5' UCCCC motif (light blue). **d** The 3' UCCCC motif of RsaE is involved in base-pairing with *psmA*3. EMSA between radiolabelled RsaE and *psmA*3 transcript containing the binding sites predicted by CLASH. As a negative control, an RsaE fragment was used in which the 3' UCCCC motif was mutated to UGGGG. Asterisks (*) indicate self-oligomerisation of the *psmA*3 RNA as these are produced in the absence of RsaE and do not increase in abundance when increasing amounts of RsaE is added. Results from a single experiment is shown and the raw data is provided in the Source Data file. **e** Haemolytic activity of supernatants from USA300 LAC WT, RsaE overexpressing strains, Δ*rsaE* and Δ*mnc* (RNase III) deletion mutants. Supernatant from overnight cultures was mixed with human blood and the degree of blood cell lysis was measured through optical absorbency. Shown are the averages and standard deviations calculated from three independent experiments. Values above bars display respective *p* value, obtained using Student's two-tailed, unpaired *t* test. **f** As in **e** but after performing butanol extraction on supernatants to enrich for PSMs. Raw images and data used to generate (**d-f**) are provided in the Source Data file.

disruption. Considering the importance of nutrients for survival within the host, the coupling of nutrient sensing to the expression of virulence genes offers an elegant means to respond to such conditions (reviewed in⁷⁹).

Several *S. aureus* sRNAs have already been found to regulate metabolism. One of the better understood sRNAs, RsaE, is known to regulate the TCA cycle, carbon flux, amino acid metabolism and biofilm formation^{15–17,19}. In *B. subtilis*, RsaE is involved in regulating the redox state of the cell in response to nitric oxide stress¹⁷. RsaI, which regulates RsaE activity, is activated when glucose is scarce and subsequently inhibits genes involved in glucose catabolism¹⁹. Connections between changes in the TCA cycle and virulence have previously been identified in *S. aureus*, which mainly involves controlling the activity of transcription factors^{79–83}. For example, the transcriptional regulator CcpE has been shown to drive expression of the TCA cycle whilst also regulating many virulence-associated genes⁸⁴. Additionally, deletion of CcpA, a transcriptional regulator that can repress the TCA cycle⁸⁵, lowers RNAIII levels⁸⁶. However, how sRNAs directly connect metabolism to virulence is not well explored in

Gram-positive bacteria. Given the roles of RsaE and RsaI in regulating the carbon state of the cell, we speculated that these sRNAs could also contribute to the virulent capacity of *S. aureus*. Indeed, we found that RsaE not only regulates metabolic genes but also regulates expression of cytolytic toxins. To the best of our knowledge, RsaE is the first Gram-positive sRNA that impacts significantly both metabolism and the production of clinically relevant toxins.

Our data suggest that RsaI base-pairing with RsaE induces some cleavage by RNase III in vitro but does not significantly affect RsaE steady state levels in vivo. This was unexpected as if the RsaI-RsaE duplex is indeed a substrate of RNase III, one would expect to see an increase in RsaE levels in Δ*mnc*, Δ*rsaI* or the Δ*mnc*-Δ*rsaI* double mutant. This was not the case. However, it is possible that in vivo only a small fraction of the RsaI-RsaE duplex is cleaved by RNase III. It has been proposed that RNase III can function as a non-catalytic RNA-binding protein⁸⁷. Thus, it is possible that the RsaE-RsaI duplex is largely resistant to degradation and that the main function of RNase III here is to stabilise the RsaI-RsaE interaction in vivo or by preventing RsaE from base-pairing with other targets. Thus, RsaI acts as a true sponge for RsaE, where RsaE is inactivated without alteration in its stability. This is mechanistically similar to the regulation of *S. aureus* RNAIII by SprY⁵⁸ and *Salmonella* MicF by OppX⁸⁸.

One surprising finding was that several different species of RsaE and RsaI accumulate in the tested media, with shorter RsaE species accumulating in rich TSB and shorter RsaI species appearing in human serum, independent of RNase III activity. Processing of RsaI was not previously observed in *S. aureus*,

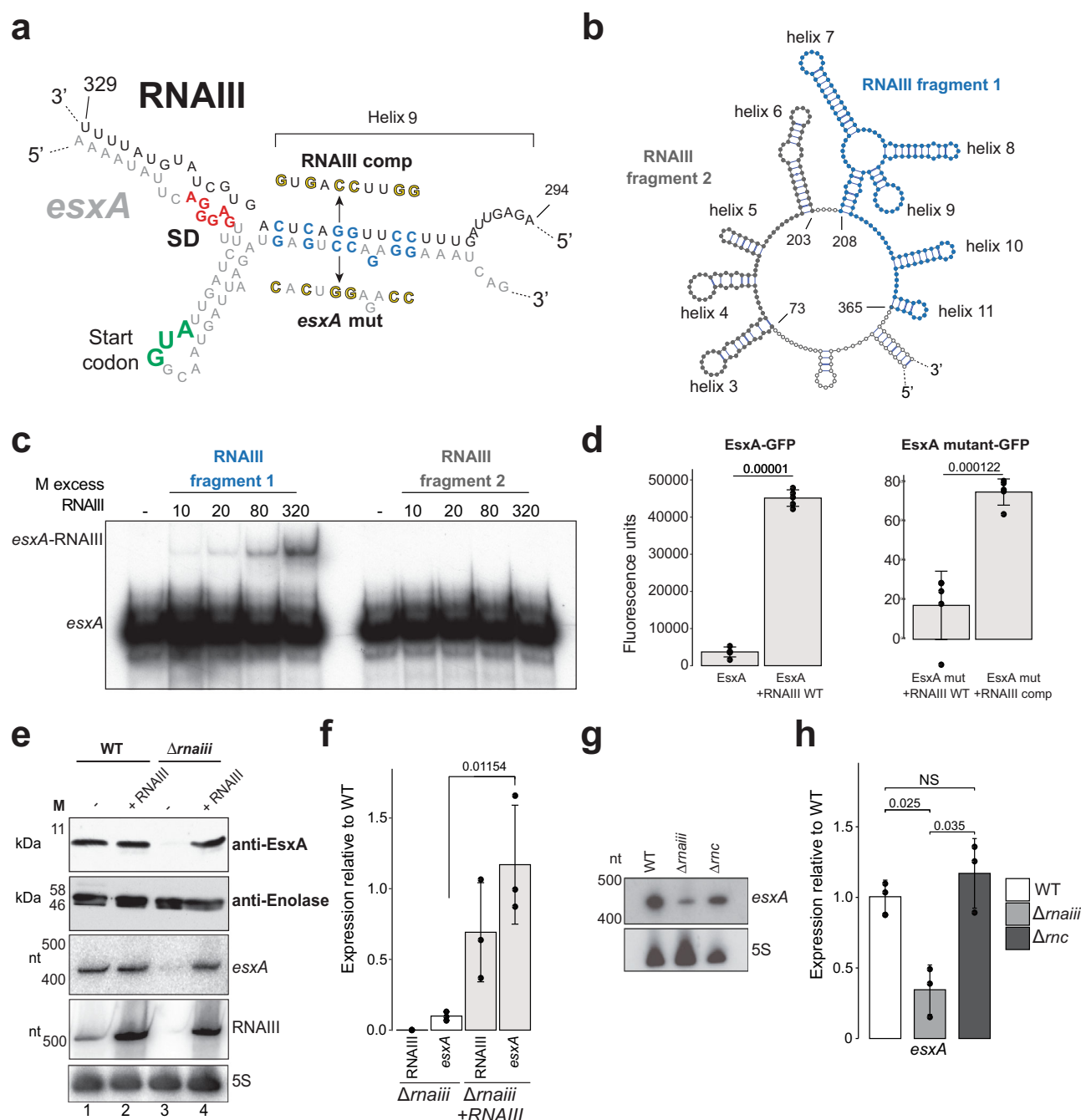


Fig. 7 RNAIII base-pairing with the *esxA* mRNA is required for EsxA production. **a** Predicted base-pairing interactions between RNAIII and *esxA* as found through CLASH. Green text: translational start codon; red text: Shine-Dalgarno (SD) sequence, blue text: nucleotides that were mutated (yellow) to generate the seed and the compensatory mutants. **b** Secondary structure of the region containing RNAIII fragments 1 (blue) and 2 (dark grey) that were used for in vitro binding assays. **c** EMSA between radiolabelled *esxA* and RNAIII fragment 1 (blue text; containing helix 9) and RNAIII fragment 2 (grey text). Results from a single experiment is shown. **d** In vivo GFP-fusion reporter assay⁷⁶. A portion of the 5' UTR and CDS of *esxA* was fused to sfGFP and expressed in RN4220. FACS was used to measure GFP fluorescence of WT and *esxA* seed mutant upon RNAIII overexpression. "RNAIII comp": mutant predicted to base-pair with the *esxA* seed mutant. Shown are the averages and standard deviations for five independent biological replicate experiments. Values above bars display *p*-value (mutant vs WT; student's two-tailed, unpaired *t* test). **e** Stability of EsxA protein and mRNA upon RNAIII deletion and restoration. The Enol1 protein signal was used as a loading control. Northern blotting was performed to detect *esxA*, RNAIII and 5S rRNA levels. Shown are representative results from three independent experiments. Statistical significance was measured through Student's unpaired, two-tailed *t* test. **f** Quantification of the results in **e**. Shown are averages and standard deviations. Values above bars display *p* value (mutant vs WT; student's two-tailed, unpaired *t* test). **g** Stability of *esxA* mRNA upon deletion of RNase III. Shown are northern blot results from one of three independent biological replicate RNA samples that were analysed by RT-qPCR (**h**). **h** Expression of *esxA* in WT, RNAIII and RNaseIII mutants. Shown are the mean and standard deviation of three independent biological replicates. Values above bars display *p* values (mutant vs WT) obtained using Student's two-tailed, unpaired *t* test. Strains tested: WT (white), Δ rnaiii (light grey) and Δ rnc (dark grey). Raw images and data used to generate (**c-h**) are provided in the Source Data file.

presumably because different growth conditions were used. Additionally, we also used high resolution acrylamide gels. In *B. subtilis*, RNase Y is known process RoxS by cleaving around 20 nucleotides from the 5' end and processing of RsaE has also been previously observed in *Staphylococcus epidermidis*. These cleavage events expand RsaE base-pairing potential with other mRNA targets, presumably by enhancing base-pairing potential with the UCCCC motif in the 5' end of RsaE^{18,89} that is normally sequestered in a stem-loop structure. However, our Nanopore sequencing revealed that in the conditions tested here, RsaE and RsaI undergo differential trimming of U-rich terminator sequence at the 3'-end. This was particularly prominent for RsaE in TSB versus human serum. Investigation into the regulatory outcome of this is beyond of scope of this manuscript, but previous studies show that the U-tail of sRNAs is important in dictating their regulatory potential. In *E. coli*, shortening the U-tails of SgrS, RhyB, MicA and MicF inhibits their ability to silence their mRNA targets as they are no longer bound by Hfq^{90,91}. As such, we hypothesise that 3'-end trimming of RsaE and RsaI observed here may impact their regulation of target mRNAs in response to specific environment conditions, perhaps by altering the stability of the sRNA. Our EMSAs were performed with RsaE transcripts that lacked the terminator sequences. Therefore, this element is not required in vitro for forming stable base-pairing interactions. The shorter form of RsaE appears to be an active form as overexpression of RsaI in TSB resulted in increased levels of RsaE mRNA targets, likely because RsaE was sponged by RsaI (Fig. 5b–d). However, in vivo it may be the case that trimming of the RsaE U-tract in TSB prevents binding of specific proteins that contribute to the formation or stabilisation of RsaE base-pairing interactions. *S. aureus* PNPase, RNase R and YhaM have been shown to exhibit 3'–5' exonuclease activity, and future studies will aim to identify the RNase responsible for RsaI and RsaE 3' trimming. We hypothesise that the impact of an sRNA on gene expression is not only dictated by its expression levels but also by its maturation and processing.

Several sRNAs were shown to have a role in regulating post-transcriptionally the production of toxins in *S. aureus*. Currently, RNAIII⁷³ and SSR42⁹² are known to regulate the translation of α -toxin and Teg41 is known to stimulate production of α PSMs⁷². The work presented here adds several additional sRNA players to this growing list. We identified RsaE interacting with both α - and β -PSMs; RNAIII interacting with *esxA*, *sei* and *psma4*; and RsaX28 interacting with *hld*. We further validated several of these interactions. Of particular interest was the observed interactions identified between RsaE and α PSM transcripts. Our CLASH analyses identified base-pairing interactions between RsaE and the Shine-Dalgarno sequences (SD) of *psma2* and *psma3*. Using EMSAs, we were able to verify that RsaE can base-pair with the *psma3* toxin mRNA in vitro, albeit inefficiently. Consistent with our CLASH data, this interaction required the 3' UCCCC motif of RsaE. The base-pairing of RsaE with *psma* SD sequences suggests a canonical mode of sRNA-mediated regulation where the sRNA prevents translation of the toxins by blocking the 30 S subunit access to the ribosome binding site. We therefore predicted that deleting RsaE would result in increased expression of these cytolytic toxins. Instead, culture supernatants from cells lacking RsaE showed significantly reduced cytolytic activity in our haemolysis assay. Additionally, our mass-spectrometry data showed that RsaE deletion reduced substantially the accumulation of PSMa1 and PSMa4 in culture supernatants, providing an explanation for the observed decrease in haemolytic activity in this strain. However, since the levels of the δ -toxin were also significantly reduced in this mutant, we cannot exclude the possibility that at least some of the changes in haemolysis activity was the result of changes in the level of this toxin. Regardless,

these data suggest that RsaE has a positive influence on PSM expression.

The observation that there were no differences in the levels of PSMa3 in culture supernatants of the WT and Δ *rsaE* strain implies that RsaE does not impact the expression of this specific toxin. It is possible that base-pairing of RsaE with the α PSM operon only directly impacts a subset of the PSMa toxins, such as PSMa1 and PSMa4 that were significantly reduced in the RsaE deletion mutant. The fact that we identified the interaction between RsaE and *psma2* and *psma3* when using RNase III as a bait protein indicates that RsaE base-pairing could trigger RNase III-dependent cleavage of the mRNAs. The four α PSMs are produced as a single polycistronic mRNA that is highly structured and the SD and/or translational start codon are predicted to be sequestered within stem or stem-loop structures for all the *psma* transcripts (Supplementary Fig. 17). Interestingly, even though these toxins are encoded on a single operon, they are differentially expressed at the protein level; in USA300, PSMa1 and PSMa4 are expressed the highest. As such, RNase III may be guided to particular *psma* transcripts to cleave near the SD sequence, which would liberate the individual toxin mRNAs from the operon and offer a way of differentially regulating the translation of the individual toxins. We are currently testing this hypothesis.

Previous RNA capture and sRNA overexpression experiments on RsaE did not identify any toxin mRNAs as putative binding partners, and instead identified targets mostly involved in the TCA cycle and amino acid metabolism¹⁷. Such a discrepancy could be explained by the different strains and growth conditions used. We performed our analyses on cells grown in late exponential phase (OD₆₀₀ 3.0) when several virulence factors in *S. aureus* (such as RNAIII and α -toxins) are highly expressed, increasing the likelihood of detecting such interactions. Additionally, α PSMs tend to be expressed at elevated levels in clinical strains, especially in the USA300 isolate that we used⁷⁷. Alternatively, the number of interactions between RsaE and *psma* transcripts may be low relative to RsaE and its metabolic targets, thus requiring the capture of a bait protein (e.g., RNase III) for enrichment.

Although RsaE was previously hypothesised to play an indirect role in regulating virulence²², our findings suggest a direct and central role. We hypothesise that RsaE acts as a molecular switch, balancing TCA cycle activity with virulence. Collectively, our data reinforce that toxin production, virulence and metabolism are interconnected tightly.

RNAIII is known to regulate a wide variety of targets, including immune evasion proteins, pro-virulence transcription factors, toxins and a regulator of cell wall integrity¹¹. Through RNase III CLASH, we identified novel targets pertaining to several of these classes. In particular, we showed that RNAIII stimulates the production of *EsxA*, a toxin involved in bacterial persistence and spread during infection^{74,93,94}. Interestingly, the *agr* locus is known to contribute to *esxA* transcription⁹⁵, and therefore *agr* and RNAIII are likely to act in tandem to regulate *EsxA* production at both the mRNA and protein level as part of a coherent feed forward loop. This type of regulatory network ensures that target genes (*esxA* in this case) are rapidly induced. Overall, this interaction further expands RNAIII's involvement in *S. aureus* invasion and expansion. Future mechanistic studies will be required to investigate exactly how RNAIII stimulates *esxA* translation and how RNase III contributes towards this.

We also identified RNAIII as interacting with *psma4* and staphylococcal enterotoxin I (*sei*), classical toxins that mediate cytotoxicity and T-cell activation respectively, and *saeR*, which is part of a 2-component system involved in up regulation of virulence factors in response to phagocyte-derived stimuli⁹⁶ (Supplementary Figs. 6, 12). Future experiments will be necessary

to further interrogate the functional outcomes of these, but it is likely that RNAIII is even more deeply integrated into the virulence networks of *S. aureus* than previously thought.

Although RNase III in *S. aureus* has been found to bind several sRNAs, including RsaA, RsaE, RsaI and RNAIII²⁷, we were surprised by the plethora of sRNA-target interactions identified through RNase III CLASH. This is because deletion of RNase III does not affect the growth of *S. aureus* in culture^{27,97}, in contrast to its essentiality in *B. subtilis*⁹⁸. However, the diverse set of interactions we have identified as being targeted by RNase III imply that this enzyme may play important roles in non-standard laboratory conditions, such as during infection. Indeed, our observation that removal of RNase III activity led to an almost complete loss of the haemolytic capacity of culture supernatant strongly supports this idea. Further exploration into this idea may place RNase III as a potential drug target.

Remarkably, we observed little overlap between the captured RNase III interactomes of USA300 and JKD6009. This is best exemplified by our identified interaction between RsaA and RNAIII, which was by far the most abundant sRNA-sRNA interaction in JKD6009. Yet, we did not detect this interaction in the USA300 CLASH data. Although CLASH is a stochastic method, we were able to identify interactions common to both strains, such as that between RsaA and *mgrA*. One potential explanation for the difference in RNase III interactomes is that these strains exhibit different growth dynamics; we observed that USA300 grows faster and to higher optical densities than JKD6009 (Supplementary Data 5). Although CLASH was performed on these strains at the same optical density ($OD_{600} \sim 3.0$), the difference in growth rates, and therefore the time required to reach this density, may have a strong effect on sRNA expression or activity. This may, at least in part, explain the differences between the JKD6009 and USA300 RNA-RNA interactomes. As such, the growth rate of different *S. aureus* isolates may be an underappreciated contributing factor when examining sRNA-target interactions. Future studies could seek to perform RNase III capture across different growth stages and compare these between strains.

In this manuscript we have mostly focused on interactions involving verified, trans-acting sRNAs as well as interactions that involve base-pairing with ribosome binding sites. However, it is important to note that our CLASH data contains many other classes of RNA-RNA interactions. For example, our focus on trans-acting sRNAs excludes several experimentally verified interactions, such as toxin-antitoxin systems involving anti-sense sRNAs^{8,99}. Interestingly, interactions between two different mRNAs were the most abundant class within our CLASH data, and we identified an increased number of mRNA-mRNA interactions after exposure to RPMI and LPM versus TSB, suggesting that these contribute to stress adaptation. It is unclear why mRNA-mRNA interactions were predominant, however, there is evidence suggesting that these could be biologically meaningful. Mediati et al.⁶¹ demonstrated that an mRNA-mRNA interaction in *S. aureus* regulates resistance to vancomycin, one of the last drugs available to battle multidrug-resistant *S. aureus* infections. Similarly, in *Listeria monocytogenes*, it has been found that the 3' UTR of an mRNA encoding a haemolysin binds the 5' UTR of an mRNA encoding a protein chaperone. This interaction prevents nuclease-mediated decay of the chaperone, promoting its translation, and this subsequently contributes to virulence¹⁰⁰. Our data may contain other such examples of regulatory mRNA-mRNA interactions, which may form a greater component of the stress adaptation apparatus than previously thought.

It is also possible that many of the interactions that were labelled as mRNA-mRNA intermolecular interactions in our data may in fact represent interactions between processed sRNAs

and their mRNA substrates. In *E. coli* and *Salmonella*, many mRNA transcripts undergo cleavage to generate functional sRNAs^{34,59,101–103}. With regards to *S. aureus*, the sRNA Teg49 was originally thought to be an independently expressed sRNA that has a role in regulating virulence, but further study revealed Teg49 to be a cleavage product of the *sarA* 5' UTR^{104,105}. Such processing events may be a widespread phenomenon in *S. aureus*, and a portion of our mRNA-mRNA interactions may represent interactions between mRNAs and processed sRNAs that have been derived from mRNAs.

We also identified many mRNA transcripts bound to their cognate anti-sense RNA. This confirms previous observations of RNase III being a major player in controlling sense-anti-sense mRNA duplexes²⁷ and expands the list of genes regulated in such fashion in *S. aureus*. Finally, we have identified intergenic regions interacting with both mRNAs and sRNAs. Intergenic regions have long been used as a resource for discovering novel sRNAs, and these interactions may yield similar results. We therefore believe that our CLASH data will be a rich resource for the identification of novel sRNAs, potentially involving unique regulatory methods.

Methods

Bacterial strains and culture conditions. An overview of all *E. coli* and *S. aureus* strains used in this study is provided in Supplementary Data 1. *S. aureus* USA300 and JKD6009 strains served as parental strains. *S. aureus* RN4220 served as an intermediate for transducing plasmids into USA300 and JKD6009. The RN450 strain was used to produce and harvest 80α phage for transduction of USA300 and JKD6009. The *E. coli* DH5α strain was used for general plasmid propagation. *S. aureus* strains were grown in tryptic soy broth (TSB; Oxoid) under aerobic conditions at 37 °C with shaking at 180 rpm, while *E. coli* was grown in lysogeny broth under the same conditions. The media was supplemented with antibiotics when appropriate at the following concentrations: ampicillin, 100 µg/mL; chloramphenicol, 15 µg/mL; erythromycin, 10 µg/mL. For inducing sRNA expression from the pRMC2 vector, anhydrotetracycline was used at 1 µg/mL. CLASH was performed in *S. aureus* JKD6009 *rnc::HTF* and USA300 *rnc::HTF* alongside the untagged parental strains. Tagged and sRNA deletion strains were generated through allelic exchange using the pIMAY plasmid¹⁰⁶. RsaE inducible pRMC2 with P_{tyx/tetO} promoter was kindly provided by Philippe Boulouc.

Construction of sRNA and mRNA-GFP expression vectors. All oligonucleotides and DNA fragments used for cloning are listed in Supplementary Data 2 and were purchased from Integrated DNA Technologies (IDT). For inducible sRNA expression, the pRMC2 expression vector was used¹⁰⁷. The sRNAs were synthesised as gBlocks with flanking 5' KpnI and 3' EcoRI sites. These gBlocks were cloned into the pJET 1.2 cloning vector (Thermo Fisher) through blunt-end ligation and the insert confirmed through Sanger sequencing (Edinburgh Genomics, Edinburgh, UK). Positive inserts were then excised through KpnI and EcoRI digestion and ligated into digested pRMC2 overnight at 16 °C using T4 DNA ligase (NEB). For constitutive sRNA expression, the pICS3 vector was used⁷⁶. Here, sRNAs were cloned under the control of the *amiA* promoter from *Streptococcus*. sRNAs were synthesised as gBlocks (IDT) in the form of 5' KpnI—*PamiA*—sRNA—EcoRI 3'. These sRNAs were inserted into pICS3 in the manner described above. For the FACS analyses, the 5' UTR and a small portion of the coding sequence of *esxA* were synthesised as gBlocks (IDT), flanked by 5' PstI and 3' EcoRV restriction sites. These were verified using pJET 1.2 as above and then cloned into the pCN33 shuttle vector containing sfGFP^{76,108}.

Western blotting. Strains for western blotting were lysed as described in the CLASH protocol. Forty mg of protein was resolved on 8% or 15% polyacrylamide gels and transferred to a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked for 1 h in blocking solution (5% non-fat milk, 0.1% Tween-20 in PBS). Primary antibody probing was performed overnight at 4 °C using anti-EsxA¹⁰⁹ (1/500) or the anti-TAP antibody (1/5000, ThermoFisher) to detect tagged RNases. The membrane was then washed three times in PBST (PBS with 0.1% Tween-20) and visualised using an HRP-linked goat anti-rabbit antibody (1/500, Abcam) and Pierce enhanced chemiluminescence solutions (ThermoFisher).

Reverse-transcription quantitative PCR. The qRT-PCR analyses were performed on RNA samples extracted from cells that had underwent nutrient shift and on various strains grown to OD_{600} 3. Total RNA was extracted using a guanidium thiocyanate, acidic phenol:chloroform-based extraction^{34,110}. Briefly, cells were resuspended in 550 µL of GTC phenol buffer (4 M guanidium thiocyanate, 50 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA, 100 mM beta mercaptoethanol, 2% sarcosyl, 100 mM

sodium acetate pH 5.2, 50% acidic phenol pH 4.3). Zirconia beads were added, and the cells lysed by vortexing. Afterwards, 300 μ L of chloroform was added and the mixture centrifuged. A second phenol:chloroform extraction was then performed on the aqueous layer for further clean-up and the RNA precipitated using ethanol and glycogen.

Isolated RNA was treated with DNase I (TURBO DNase; Thermo Fisher) for 1 h at 37 °C in the presence of 2 U of SUPERasin. RNA was subsequently purified using RNAClean XP beads (Beckmann Coulter) diluted to a concentration of 5 μ g/ μ L. The qPCRs were then performed using the Luna Universal One-Step RT-qPCR kit (NEB) according to the manufacturer's instructions using 5 ng of RNA. The PCR was run on a LightCycler 480 (Roche). Analysis of the qPCR data was performed as previously described³⁴. Briefly, the IDEAS2.0 software was used to calculate Ct values using the absolute quantification/fit points method with default parameters, and the fidelity of the PCR was examined through melt curve genotyping analyses. To calculate the relative fold-change of genes, the $2^{-\Delta(\Delta C_t)}$ method was employed using 5S rRNA as a control. Each qPCR experiment was performed in technical triplicate. For final data analyses, the mean and standard error of the mean of three biological triplicates was calculated and plotted. All oligonucleotides used for qPCR analyses are listed in Supplementary Data 2.

RNase III activity assay. Over-expression and purification of RNase III from *E. coli* were performed as described with the following modifications⁵⁴. After clearing of bacterial lysate, nucleic acids were removed by digestion with the addition of 500 U of Micrococcal Nuclease S7 (Sigma) for 1 h at 25 °C. The Ni-NTA beads were washed three times with buffer A (25 mM Tris HCl pH 8, 8% ammonium sulfate, 0.1 mM EDTA) containing 50 mM imidazole before elution with buffer B (25 mM Tris HCl pH 8, 1 M NH₄Cl, 1 mM DTT) in the presence of 100 mM imidazole or 200 mM imidazole. After dialysis and concentration, the RNase III was stored in 30 mM Tris HCl, 500 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT and 50% glycerol, and was used directly for activity assay with 5'-end radiolabelled RNAs⁵⁴. In these assays, 10 mM MgCl₂ or 10 mM CaCl₂ was used to modulate RNase III activity.

Media shifts and UV cross-linking. *S. aureus* was grown overnight, diluted into fresh TSB the day after and grown to an OD₆₀₀ value of 3. For CLASH, 65 mL of OD₆₀₀ 3 cells were then cross-linked with 250 mJ of 254 nm UV using a Vari-X-Linker and harvested using vacuum filtration⁴³. The cells were then flash-frozen in liquid nitrogen. The remaining cells in TSB were harvested through vacuum filtration and resuspended in an identical volume of either preheated RPMI 1640 (Gibco), LPM pH 7.6 or LPM pH 5.4. The cells were then incubated at 37 °C, shaking at 180 rpm. After 15 min, 65 mL of cells were cross-linked and harvested as before. For RNAtag-seq, 65 mL of OD₆₀₀ 3 cells were harvested and flash-frozen. The remaining cell suspension was harvested through vacuum filtration and resuspended in an identical volume of either RPMI 1640, LPM pH 7.6 or LPM pH 5.4 (or back into the original TSB medium as a control). Samples were taken and vacuum harvested after 5, 10, 15 and 30 min before being flash-frozen.

CLASH. Cells were removed from the filters through two washes with 10 mL of phosphate buffered saline (PBS) and pelleted through centrifugation at 4600 g for 10 min, 4 °C. The supernatant was discarded, and the cell pellets weighed. The pellets were then resuspended in 2 volumes of TN150-lysostaphin (50 mM Tris pH 7.8, 150 mM NaCl, 100 mg/mL lysostaphin, 0.1% NP-40, 0.5% Triton X-100), and 60 U of DNase RQ1 (Promega) and 200 U of SUPERasin (Invitrogen) were added. The cells were incubated for 1 h at 20 °C for the lysostaphin to degrade the outer cell wall. The cells were then transferred to 15 mL conical tubes and lysed through bead beating with 0.1 mm zirconia beads (Biospek Products) for 5 min. Afterwards, 2 volumes of TN150-antipeptidase (50 mM) Tris pH 7.8, 150 mM NaCl, 0.1% NP-40, 0.5% Triton X-100, 10 mM EDTA, 1 mini cOmplete protease inhibitor per 10 mL (Roche) was added. The beads were then separated from the lysate by centrifugation at 4600 $\times$ g for 20 min at 4 °C and then the lysate transferred to 1.5 mL tubes. The insoluble and soluble fractions of the lysate were then separated through centrifugation at 20,000 $\times$ g for 20 min at 4 °C. Magnetic anti-FLAG M2 beads (Sigma Aldrich) were washed three times in TN150 (50 mM Tris pH 7.8, 150 mM NaCl, 0.1% NP-40, 0.5% Triton X-100), with 75 μ L taken for each sample. The washed beads were then distributed equally between the cleared lysates and incubated for 2 h at 4 °C with rotation. Following capture, the beads were washed three times in TN1000 (50 mM Tris pH 7.8, 1 M NaCl, 0.1% NP-40, 0.5% Triton X-100) for 10 min at 4 °C with rotation. The beads were then rinsed three times in TN150 and then resuspended in a final volume of 250 μ L TN150. To cleave the RNases from the FLAG beads, homemade TEV protease was added, and the samples incubated for 2 h at room temperature with rotation. Following cleavage, an extra 350 μ L of TN150 was added to the samples and the eluate collected following separation from the beads using a magnetic rack. The eluates were then RNase digested with 1 μ L of a 1:100 dilution of RNase-It (Agilent) for 7 min at 20 °C. The RNase digestion was stopped with the addition of 0.4 g of guanidium hydrochloride (GuHCl; Sigma Aldrich). Following digestion, 100 μ L of nickel-NTA agarose beads (Qiagen) was added, prewashed in wash buffer 1 (50 mM Tris pH 7.8, 0.1% NP-40, 5 mM β -mercaptoethanol, 0.5% Triton X-100, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, 6 M GuHCl) and the proteins were captured overnight. The capture solutions were then transferred to Pierce SnapCap spin columns (Thermo

Fisher, 69725). The harvested beads were washed three times with wash buffer 1 and three times with NP-PNK (50 mM Tris pH 7.8, 0.1% NP-40, 5 mM β -mercaptoethanol, 0.5% Triton X-100, 10 mM MgCl₂). Afterwards, the RNAs were dephosphorylated on-column using 4 U of TSAP (Promega) in the presence of 80 U of rRNasin (Promega) in 1X PNK buffer (50 mM Tris pH 7.8, 10 mM MgCl₂, 10 mM β -mercaptoethanol, 0.1% Triton X-100) for 1 h at 20 °C. The beads were then washed once with wash buffer 1 to inactivate the enzyme and then three times with NP-PNK to remove residual guanidium. The RNAs were then radiolabelled at the 5' end using 30 U of T4 PNK and 3 μ L of ³²P-ATP in 1X PNK buffer for 100 min at 20 °C. 1 mM of cold ATP was then added, and the reaction left to proceed for another 40 min to ensure complete 5' phosphorylation of the RNAs. The beads were then washed three times with wash buffer 1 and three times with NP-PNK. Sequencing adaptors were then ligated to the ends of the RNAs. First, an L5 adaptor (Supplementary Data 2) was ligated to the 5' end using 200 mmoles of App_{PE} adaptor (Supplementary Data 2) was ligated onto the 3' end using 600 U of T4 RNA Ligase 2 truncated K227Q (NEB). This reaction was carried out in 1X PNK buffer with 10% PEG-8000 and 30 U of rRNasin for 6 h at 25 °C. Afterwards, the beads were washed once in wash buffer 1 and three times in wash buffer two (50 mM Tris pH 7.8, 10 mM β -mercaptoethanol, 0.1% NP-40, 0.5% Triton X-100, 50 mM NaCl, 10 mM imidazole). The protein-RNA complexes were then eluted from the beads through addition of 200 μ L of elution buffer (wash buffer two with 250 mM imidazole), repeated for a total of two times. The proteins were then pooled and precipitated through addition of trichloroacetic acid (Sigma Aldrich) to a final concentration of 20% and left to precipitate on ice for 20 min. The samples were then centrifuged at 20,000 $\times$ g for 20 min at 4 °C. The pellets were then washed with 800 μ L of acetone, dissolved in 20 μ L of loading buffer (Novex) and resolved on a 4-12% Bis-Tris gel. The protein-RNA complexes were visualised through autoradiography and the gel piece containing these was excised. The RNAs were then extracted through incubation in 4 mL of extraction buffer (50 mM Tris pH 7.8, 0.1% NP-40, 5 mM β -mercaptoethanol, 1% SDS, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 60 mg/mL proteinase K) at 55 °C for 2 h. Following this, the RNAs were purified through phenol:chloroform extraction and then resuspended in 20 μ L of DEPC-treated water. The RNAs were reverse transcribed using the PE_{reverse} primer and SuperScript IV according to the manufacturer's instructions. The template RNA was subsequently degraded through addition of 10 U of RNase H (NEB). Afterwards, the cDNA was purified through RNAClean XP beads (Beckmann Coulter) and resuspended in a final volume of 11 μ L. Half of this cDNA was then used as a template for PCR with Pfu polymerase, using BC reverse and P5 forward primers. The cycling conditions were as follows: 95 °C for 2 min; 24 cycles of 95 °C for 20 s, 52 °C for 30 s and 72 °C for 1 min; final extension of 72 °C for 5 min. The PCR product was treated with 40 U of Exonuclease I (NEB) to degrade free primer and the DNA library purified using RNAClean XP beads. The library was then resolved on a 2% MetaPhor (Lonza) gel and 175-300 bp fragments were excised and gel extracted through a MinElute column. The library was quantified using a 2100 Bioanalyzer and a DNA HS assay (Agilent). Individual libraries were then pooled together to produce an equimolar solution and sequenced through 75 bp paired-end sequencing on an Illumina HiSeq 4000 or NovaSeq 6000 platform (Edinburgh Genomics).

Flow cytometry. Overnight cultures of strains expressing pCN33-*target-gfp* and pIC33-*sRNA* were diluted 1:40 into 2 mL of PBS. Translation of GFP fusions was monitored on the LSRFortessa Special Order Research Product (BD) from a 500 μ L aliquot of PBS-diluted samples on a 530/30 nm bandpass filter. Sample acquisition of 100,000 events was performed on the built-in Diva (LSRFortessa SORP) software. Median fluorescence intensities (MFI) were determined from the entire population (no gating) using the flowJo software where FSC and SSC were used to gate any fluorescence attributed to cellular background. The average MFI and standard deviations were calculated and plotted. To determine significant differences, a two-sample student's *t*-test (assuming unequal variance) was used.

Northern blotting. Total RNA was then extracted through acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction as described above. Total RNA was resolved on an 8% polyacrylamide TBE-urea gel, transferred to a nitrocellulose membrane via electroblotting and then crosslinked to the membrane through exposure to 1200 mJ of 254 nm radiation.

For hybridisation, membranes were firstly prehybridised in 10 mL of UltraHyb (Am- bion). Membranes were then probed with a ³²P-labelled DNA oligonucleotide (Supplementary Data 2) at 42 °C for 20 h. Membranes were washed twice in 2 $\times$ SSC with 0.5% SDS for 10 min. Membranes were then imaged using a phosphorimager screen and FujiFilm FLA-5100 scanner using the IP-S filter. For 5S rRNA, imaging was also performed through autoradiography.

Electrophoretic mobility shift assays. In vitro transcription and radiolabelling of RNA was carried out using a MEGAscript T7 transcription kit (ThermoFisher) as per the manufacturer's instructions. The RNAs were refolded in structure buffer (25 mM Tris, 150 mM KCl, 1 mM MgCl₂) using a thermal cycler by heating to

95 °C for 1 min, slowly cooled to 25 °C for 5 min and finally incubated at 25 °C for 20 min. Binding reactions between the radiolabelled RNA and cold RNA were then set up in 1:0, 1:10, 1:20, 1:80 and 1:320 molar ratios and incubated at 25 °C for 20 min. Native loading buffer was added to a 1X concentration (10% sucrose, 0.1X TBE, 0.04% bromophenol blue) and then RNA complexes were resolved on an 6% acrylamide TBE gel. The gel was dried under vacuum for 1 h at 80 °C and imaged as described above.

RNAtag-Seq. Total RNA was extracted from cells shifted to RPMI or TSB as described above. The cDNA libraries were generated utilising the RNAtag-Seq protocol⁴⁵. Briefly, 500 ng of total RNA from each tested condition was fragmented by incubation at 92 °C for 6 min in 2X FastAP buffer and then snap chilled on ice. Eight units of TURBO DNase (Thermo Fisher), 10 units of FastAP (Thermo Fisher) and 40 units of rRNasin (Promega) were then added and the mixture and incubated at 37 °C for 30 min. The RNA was purified using RNAClean XP beads (Beckman Coulter) and eluted in 10 µL of water. To this, 2 µL of a unique barcoded RNAtag-Seq RNA primer (100 µM) was added and the sample was heat denatured at 70 °C for 2 min. The rRNA adaptor was then ligated onto the sample by mixing with ligation buffer (final concentration in reaction: 1X T4 RNA ligase buffer, 9% DMSO, 1 mM ATP, 20% PEG 8000, 36 units T4 RNA ligase). Reactions were incubated for 90 min at 22 °C and the reaction inactivated by the addition of 80 µL RLT buffer. RNA was subsequently purified using phenol:chloroform extraction. rRNA was then depleted from the sample using a MICROBexpress kit (Invitrogen). Following elution, RNA was again purified using RNAClean XP beads. cDNA was produced using the AM2 primer and SuperScript IV (Invitrogen) as per manufacturer's instructions. The remaining RNA was degraded by addition of 100 mM sodium hydroxide and incubated at 70 °C for 12 min. The solution was then neutralised with addition of 100 mM acetic acid. The cDNA was purified using RNAClean XP beads and eluted in 11 µL. For addition of the 3' linker, 1 µL of 80 µM 3Tr3 primer was added and ligated onto the cDNA using CircLigase (Lucigen) as per manufacturer's instructions for 5 h at 60 °C. cDNA was purified again using RNAClean XP beads and eluted in 15 µL of water. The cDNA libraries were then amplified using AccuPrime polymerase (ThermoFisher) as per manufacturer's instructions using the 2 P primers. Afterwards, 40 units of exonuclease I (NEB) were added, and the reaction incubated at 37 °C for 1 h to degrade the PCR primers. Amplified libraries were then separated on a 6% TBE polyacrylamide gel and fragments above the primer-dimer band purified.

Libraries were sequenced on an Illumina HiSeq 4000. The adaptor and oligonucleotide sequences are provided in Supplementary Data 2.

Haemolytic activity assays. For comparative analysis of supernatants, culture growth was synchronized. Overnight cultures of each strain were diluted 1:100 in 10 mL of fresh TSB and grown for 3 h. These 3-h cultures were subsequently diluted into 25 mL of fresh TSB to a starting OD₆₀₀ of 0.05. The cultures were then grown for 15 h. Culture supernatants were extracted by centrifugation of the cell suspension at 20,000 × g. Supernatants were then diluted 1:2 in haemolysis assay buffer (40 mM CaCl₂, 1.7% NaCl). In total, 200 µL of diluted supernatant was incubated at 37 °C in a tube revolver with 25 µL of whole human blood for 10 min. The samples were centrifuged at 5500 × g and 100 µL of the supernatant was transferred to a 96-well plate. The degree of erythrocyte lysis was determined by reading the absorbance of the samples at OD₅₄₃. Butanol extractions of PSMs from *S. aureus* supernatants were performed¹¹¹. Overnight cultures were centrifuged, and the supernatant collected. Afterwards, 1-butanol was added to a final concentration of 25% and the mixture centrifuged. The upper phase was finally collected. Extractions were then incubated with human blood and the degree of haemolysis measured as described above.

Proteomics

Sample preparation. Cultures of parental USA300 pICS3, *ΔrsaE* pICS3 and *ΔrsaE* pICS3-RsaE were grown overnight in TSB at 37 °C with 180 rpm shaking. The following day, each culture was diluted 1:100 into 25 mL of fresh TSB and grown for 3 h. Cultures were then re-inoculated into another 25 mL of fresh TSB for a starting OD₆₀₀ of 0.05 and grown for 15 h at 37 °C with shaking. Samples were grown in biological triplicates.

The following day, 1 mL of culture was centrifuged at 10,000 × g for 1 min and 500 µL of culture supernatant was moved to a new tube. 2 mL of freezing-cold acetone was added, and solutions were incubated at -20 °C for 1 h to precipitate the proteins. Precipitated proteins were then pelleted through centrifugation at 13,000 × g for 30 min at 4 °C. Pellets were washed with 70% ethanol and then resuspended in resuspension buffer (50 mM Tris pH 7.8, 150 mM NaCl, 0.5% SDS, 5 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂). Protein concentrations were measured using a Qubit system and then 50 µg of protein placed into a new tube and samples made up to identical volumes through addition of resuspension buffer.

Protein extracts were treated with 10 mM DTT at 56 °C for 30 min and then diluted 1:8 with UA buffer (8 M urea, 100 mM Tris pH 8). Extracts were passed through a FASP column (Expedeon) through centrifugation at 20,000 × g and washed with 200 µL of UA buffer. In total, 100 µL of IAA buffer (50 mM iodoacetamide in UA buffer) was then added, and the samples stored in darkness for 10 min at room temperature. Afterwards, the IAA buffer was passed through

the column by centrifugation and the column was washed twice with 100 µL of UA buffer. The column was then washed twice with 100 µL of ABC buffer (50 mM ammonium bicarbonate in water). The column was transferred to a new 2 mL tube and 40 µL of TWR buffer was added (1 µg trypsin in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)), and the samples left to digest overnight at 37 °C. The following day, 40 µL of ABC buffer was added and the peptides were collected through centrifugation before being acidified with 10% TFA. Peptides were then desalted using C18-StageTips¹¹². Briefly, two pieces of C18 filters (Empore 2215) were placed on the tips and activated with 15 µL methanol, followed by an equilibration step with 50 µL 0.1% TFA. Samples were passed through the StageTips and washed with 50 µL 0.1% TFA on the tips and subsequently eluted with 40 µL 80% acetonitrile (ACN), 0.1% TFA.

The tryptic peptides eluted from StageTips were lyophilised and resuspended in 0.1% TFA. Samples were analysed on a Q Exactive Plus mass spectrometer connected to an Ultimate Ultra3000 chromatography system (Thermo Scientific, Germany) incorporating an autosampler. Five µL of each tryptic peptide sample was loaded on an Aurora column (IonOptiks, Australia, 250 mm length), and separated by an increasing ACN gradient, using a reverse-phase 120 min gradient (from 3%–40% ACN) at a flow rate of 400 nL/min. Data was acquired with the mass spectrometer using the following settings: MS 70k resolution in the Orbitrap, 350 to 1500 precursor scan, 1.4 m/z Quad isolation; MS/MS obtained by HCD fragmentation (26% HCD collision energy), read out in the orbitrap with a resolution of 17.5k with a cycle-time of 2 seconds.

Nanopore cDNA sequencing. Nanopore cDNA libraries were prepared using total RNA isolated from wild type USA300 grown in TSB or human serum. Total RNA was DNase I (TURBO DNase; Thermo Fisher) treated for 1 h at 37 °C in the presence of 2 U of SUPERasin. RNA was subsequently poly(A) tailed using *E. coli* poly(A) polymerase (NEB) as per manufacturer's instructions. Afterwards, rRNA was removed using the NEBNext rRNA Depletion Kit (Bacteria) according to the manufacturer's instructions. After each enzymatic step, RNA was purified using RNAClean XP beads (Beckmann Coulter). cDNA barcoded libraries were prepared with Nanopore cDNA-PCR Sequencing kit (SQK-PCS109). The cDNA was purified without size selection in order not to exclude sRNAs. The pooled barcoded libraries were sequenced on MinION using an R9 flow cell.

Computational analyses

Pre-processing of raw sequencing data. Raw sequencing data were first processed using the pyCRAC package¹¹³. In particular, the CRAC_Pipeline_PE.py script was used that automates almost the entire processing pipeline. The pipeline firstly demultiplexed the raw sequencing data based on the in-read barcode sequences found in the L5 adaptors using pyBarcodeFilter.py. Flexbar (version 3.5.0) was used to then remove the 3' adaptor sequences and any flanking nucleotides with a Phred score below 23. The reads were then collapsed to remove PCR duplicates and then aligned to either the *S. aureus* JKD6009 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_900607245.1/) or USA300 genome (https://bacteria.ensembl.org/Staphylococcus_aureus_subsp_aureus_usa300_fpr3757_gca_000013465/Info/Index/) using Novoalign (version 2.07). To improve the annotations of the USA300 genome, a Gene Transfer Format (GTF) file was generated. This file describes the start and end positions of all annotated sequences and what RNA class they belong to. In order to generate this file, a minimal GTF was obtained from ENSEMBL and UTR annotations were added by analysing the RNAtag-seq data with the Rockhopper2 software⁴⁸ (version 2.0.3). The pyReadCounters.py script then used the output from Novoalign to quantify the number of reads for each transcriptional unit.

Identification of hybrids. The hyb pipeline (version 0.0)⁴⁶ was used to detect chimeric reads as previously described³⁴. Briefly, FLASH2¹¹⁴ was used to merge overlapping paired reads into a single read. These merged reads were then analysed using hyb. The -anti option for the hyb pipeline was used to allow use of a genomic database. Only the uniquely annotated hybrids (.ua_hyb file) were used in subsequent analyses. When visualising hybrids using a genome browser, the.ua_hyb output file was converted to a GTF file using custom scripts. GTF files could then be converted to.sgr files using pyCRAC's pyGTF2sgr.py.

Filtering hybrids. To filter the list of produced hybrids for high confidence, multiple approaches were taken. To estimate the false discovery rate of any given RNA-RNA interaction, each interaction was compared to the probability that the same interaction could be generated through spurious, background ligation³³. Briefly, the probability that a hybrid-half was matched with its pair at random, $P(gx)$, was estimated by dividing its read depth by the total number of mapped reads (N). The background probability for any given interaction, $pdf(gx, gy)$, was estimated by multiplying the probabilities $P(gx)$ and $P(gy)$. The background probability of observing any number of interactions between gx and gy , termed k , was modelled using a binomial distribution: $k \sim \text{binomial}(p = pdf(gx, gy), N)$. These calculations were used to assign a p -value (i.e., $P(X = k)$) to each experimentally observed interaction, which were then adjusted using Benjamini-Hochberg multiple testing corrections. All interactions with a Benjamini-Hochberg adjusted p -value higher than 0.05 were discarded. Afterwards, the Vienna 2 package⁵³ (version 2.5.0) was

used to calculate the minimum folding energy (MFE) of each intermolecular interaction. We then created cumulative distribution plots of the CLASH data to visualise the MFE distribution. As a control, each RNA fragment was shuffled randomly over its partner RNA, or over genes belonging to the same class. Comparing the CLASH data to the shuffled control was then used to generate an MFE cut-off value for which all interactions that did not meet this minimum energy threshold were discarded. Additionally, we also utilised a list of highly curated, trans-acting sRNAs¹⁰. This allowed us to filter our data for interactions that contain verified sRNAs. These sRNAs are termed bona fide sRNAs. To calculate enriched structural motifs in the CLASH data, the minimum free energy structures of chimeric reads and randomly shuffled chimeric reads were calculated using hybrid-min (UNAFold) with default settings (NA = RNA, t = 37). The structures were converted into the Vienna dot-bracket notation and double-stranded structural motifs of length between 5 and 10 base pairs were extracted. Enrichment of motifs in the chimera set, compared with the shuffled chimera set, was quantified with a Fisher's exact test, and Benjamini-Hochberg correction was applied to account for multiple tests.

Hybrid distribution plots. Only statistically significant interactions that contained a bona fide sRNA and had an MFE of less than -10 kcal/mol were considered. pyBinCollector.py was then used to plot the mRNA reads within each interaction relative to the start codon. Each interaction was counted only once to avoid biasing the output for abundant interactions.

RNase binding to target transcripts. To calculate where the RNase bound its target transcripts, the pyBinCollector tool from the pyCRAC package (version 1.5.0) was used. Here, each target transcript was divided into 100 equally sized bins and the nucleotide read density for each bin was calculated and the total plotted.

Interactome plots. Only statistically significant interactions that contained a bona fide sRNA and had an MFE of less than -10 kcal/mol were considered. These were visualised using the iGraph Python package.

GO term analysis. Gene ontology analysis was performed on upregulated and downregulated genes, defined as displaying a log₂ fold change of 1.5 and *p* value below 0.05, 30 min after the shift to RPMI, LPM pH 7.6 or LPM pH 5.4. KEGG pathway and keyword analysis were performed in R with STRINGdb package¹¹⁵.

RNA-seq analysis. Following pre-processing of the data using the pyCRAC_pipeline_PE (version 0.6.1), the output from pyReadCounters.py for each experimental condition was merged. In order to normalise the data and to account for variations in sequencing depth, the data was normalised using DESeq2¹¹⁶. Data could then be normalised to the t0 sample when desired to examine relative fold change. In order to cluster genes into common expression patterns, the 'Short Time-series Expression Miner' (STEM, version 1.3.13) was used¹¹⁷. Data was log₂ normalised and clustered using the STEM clustering method with 50 model profiles to examine which genes showed changed expression following shift to RPMI or LPM.

Mass spectrometry analysis. MaxQuant¹¹⁸ (version 1.6.17.0) was used for mass spectra analysis and peptide identification via Andromeda search engine¹¹⁹. Match between runs and LFQ were chosen. Trypsin was chosen as protease with a minimum peptide length of 7 and a maximum of two missed cleavage sites. Carbamidomethyl of cysteine was set as a fixed modification and methionine oxidation and protein N-terminal acetylation as variable modifications. Proteome databases were made using 31 toxin sequences. The first search peptide tolerance was 20 ppm, and the main search peptide tolerance was set at 4.5. Peptide spectrum match (PSM) was filtered to 1% FDR. Protein intensities were log transformed and missing values imputed. Moderate t-test was performed on log₂ transformed protein intensities using the limma package¹²⁰.

Nanopore cDNA data analysis. Basecalling, demultiplexing and quality analysis were done with guppy. Reads with mean quality above 7 were kept for further analysis. Next, the orientation of the reads was determined with cdna.classifier.py (pychopper, <https://github.com/nanoporetech/pychopper.git>) and mapped to the USA300 genome with minimap2¹²¹ (version 2.24; <https://github.com/lh3/minimap2>). After mapping, sam files were converted into sorted bam files and then to bedgraphs with normalized coverage using Samtools¹²² (version 1.9; <http://www.htslib.org>) and bedtools¹²³ (version 2.27.1; <https://github.com/arq5x/bedtools2>) respectively.

Reporting summary. Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

The next generation sequencing data have been deposited on the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) with accession number [GSE166151](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE166151). The mass spectrometry proteomics

data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE¹²⁴ partner repository with the dataset identifier PXD025122. Source data are provided with this paper.

Code availability

The python pyCRAC¹¹³, GenomeBrowser packages (version 1.6.3) and the CRAC⁴³ and CLASH²⁴ pipelines used for analysing the data are available from <https://git.ecdf.ed.ac.uk/sgrannem/> and pypi (https://pypi.org/user/g_ronimo/). The hyb pipeline used for identifying chimeric reads is available from <https://github.com/gkudla/hyb> (version 0.0). The structural motifs (version 0.1) code used for identifying enriched structural motifs (Fig. 2d) can be obtained from https://github.com/gkudla/structural_motifs. The scripts for statistical analysis of hyb data³³ is available from https://bitbucket.org/jaitree/hyb_stats/. The FLASH2 algorithm (version 1.2.11) for merging paired reads is available from <https://github.com/dstreett/FLASH2>. The code used for has also been uploaded to Zenodo¹²⁵ and is provided as Supplementary Software.

Received: 6 May 2021; Accepted: 3 June 2022;

Published online: 22 June 2022

References

- Balleza, E. et al. Regulation by transcription factors in bacteria: Beyond description. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**, 133–151 (2009).
- Sedlyarova, N. et al. sRNA-Mediated Control of Transcription Termination in *E. coli*. *Cell* **167**, 111–121.e13 (2016).
- Papenfort, K. & Vogel, J. Regulatory RNA in bacterial pathogens. *Cell Host Microbe* **8**, 116–127 (2010).
- Waters, L. S. & Storz, G. Regulatory RNAs in bacteria. *Cell* **136**, 615–628 (2009).
- Storz, G., Vogel, J. & Wassarman, K. M. Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. *Mol. Cell* **43**, 880–891 (2011).
- Beisel, C. L. & Storz, G. Base pairing small RNAs and their roles in global regulatory networks. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**, 866–882 (2010).
- Pinel-Marie, M. L., Brielle, R. & Felden, B. Dual Toxic-Peptide-Coding Staphylococcus aureus RNA under Antisense Regulation Targets Host Cells and Bacterial Rivals Unequally. *Cell Rep.* **7**, 424–435 (2014).
- Sayed, N., Jousselin, A. & Felden, B. A cis-antisense RNA acts in trans in Staphylococcus aureus to control translation of a human cytolytic peptide. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 105–113 (2012).
- Sassi, M. et al. SRD: a Staphylococcus regulatory RNA database. *RNA* **21**, 1005–1017 (2015).
- Liu, W. et al. Assessment of bona fide sRNAs in Staphylococcus aureus. *Front. Microbiol.* **9**, 228 (2018).
- Bronsky, D. et al. Staphylococcus aureus RNAPIII and Its Regulon Link Quorum Sensing, Stress Responses, Metabolic Adaptation, and Regulation of Virulence Gene Expression. *Annu. Rev. Microbiol.* **70**, 299–316 (2016).
- Boisset, S. et al. Staphylococcus aureus RNAPIII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism. *Genes Dev.* **21**, 1353–1366 (2007).
- Chevalier, C. et al. Staphylococcus aureus RNAPIII binds to two distant regions of coa mRNA to arrest translation and promote mRNA degradation. *PLoS Pathog.* **6**, e1000809 (2010).
- Huntzinger, E. et al. Staphylococcus aureus RNAPIII and the endoribonuclease III coordinately regulate spa gene expression. *EMBO J.* **24**, 824–835 (2005).
- Bohn, C. et al. Experimental discovery of small RNAs in Staphylococcus aureus reveals a riboregulator of central metabolism. *Nucleic Acids Res.* **38**, 6620–6636 (2010).
- Geissmann, T. et al. A search for small noncoding RNAs in Staphylococcus aureus reveals a conserved sequence motif for regulation. *Nucleic Acids Res.* **37**, 7239–7257 (2009).
- Rochat, T. et al. The conserved regulatory RNA RsaE down-regulates the arginine degradation pathway in Staphylococcus aureus. *Nucleic Acids Res.* **46**, 8803–8816 (2018).
- Durand, S. et al. A Nitric Oxide Regulated Small RNA Controls Expression of Genes Involved in Redox Homeostasis in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genet* **11**, 1–31 (2015).
- Bronsky, D. et al. A multifaceted small RNA modulates gene expression upon glucose limitation in Staphylococcus aureus. *EMBO J.* **38**, e99363 (2019).
- Christopoulou, N. & Granneman, S. The role of RNA-binding proteins in mediating adaptive responses in Gram-positive bacteria. <https://doi.org/10.1111/febs.15810> (2021).
- Guillet, J., Hallier, M. & Felden, B. Emerging Functions for the Staphylococcus aureus RNome. *PLoS Pathog.* **9**, 1–13 (2013).

22. Tomasini, A. et al. The importance of regulatory RNAs in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Genet. Evol.* **21**, 616–626 (2014).
23. Geisinger, E., Adhikari, R. P., Jin, R., Ross, H. F. & Novick, R. P. Inhibition of rot translation by RNAIII, a key feature of agr function. *Mol. Microbiol.* **61**, 1038–1048 (2006).
24. Gupta, R. K., Luong, T. T. & Lee, C. Y. RNAIII of the *Staphylococcus aureus* agr system activates global regulator MgrA by stabilizing mRNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **112**, 14036–14041 (2015).
25. Lioliou, E. et al. In vivo mapping of RNA-RNA interactions in *Staphylococcus aureus* using the endoribonuclease III. *Methods* **63**, 135–143 (2013).
26. Romilly, C. et al. A Non-Coding RNA Promotes Bacterial Persistence and Decreases Virulence by Regulating a Regulator in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog.* **10**, e1003979 (2014).
27. Lioliou, E. et al. Global regulatory functions of the *Staphylococcus aureus* endoribonuclease III in gene expression. *PLoS Genet* **8**, e1002782 (2012).
28. Malachowa, N. et al. Global changes in *Staphylococcus aureus* gene expression in human blood. *PLoS ONE* **6**, e18617 (2011).
29. Mäder, U. et al. *Staphylococcus aureus* transcriptome architecture: from laboratory to infection-mimicking conditions. *PLoS Genet* **12**, e1005962 (2016).
30. Howden, B. P. et al. Analysis of the small RNA transcriptional response in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* after antimicrobial exposure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 3864–3874 (2013).
31. Helwak, A., Kudla, G., Dudnakova, T. & Tollervey, D. Mapping the human miRNA interactome by CLASH reveals frequent noncanonical binding. *Cell* **153**, 654–665 (2013).
32. Kudla, G., Granneman, S., Hahn, D., Beggs, J. D. & Tollervey, D. Cross-linking, ligation, and sequencing of hybrids reveals RNA-RNA interactions in yeast. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108**, 10010–10015 (2011).
33. Waters, S. A. et al. Small RNA interactome of pathogenic *E. coli* revealed through crosslinking of RNase E. *EMBO J.* **36**, 374–387 (2017).
34. Iosub, I. A. et al. Hfq CLASH uncovers sRNA-target interaction networks linked to nutrient availability adaptation. *eLife* **9**, 1–33 (2020).
35. Figueroa-Bossi, N. & Bossi, L. Sponges and Predators in the Small RNA World. in *Regulating with RNA in Bacteria and Archaea* 441–451 (American Society of Microbiology, 2018). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec-rwr-0021-2018>.
36. Headley, V. L. & Payne, S. M. Differential protein expression by *Shigella flexneri* in intracellular and extracellular environments. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **87**, 4179–4183 (1990).
37. Coombes, B. K., Brown, N. F., Valdez, Y., Brummell, J. H. & Finlay, B. B. Expression and secretion of *Salmonella* pathogenicity island-2 virulence genes in response to acidification exhibit differential requirements of a functional type III secretion apparatus and SsaL. *J. Biol. Chem.* **279**, 49804–49815 (2004).
38. Beuzón, C. R., Banks, G., Deiwick, J., Hensel, M. & Holden, D. W. pH-dependent secretion of SseB, a product of the SPI-2 type III secretion system of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **33**, 806–816 (1999).
39. Allenby, N. E. et al. Genome-wide transcriptional analysis of the phosphate starvation stimulon of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **187**, 8063–8080 (2005).
40. Kröger, C. et al. An infection-relevant transcriptomic compendium for *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Cell Host Microbe* **14**, 683–695 (2013).
41. Ellis, M. J. et al. A macrophage-based screen identifies antibacterial compounds selective for intracellular *Salmonella Typhimurium*. *Nat. Commun.* **10**, 197 (2019).
42. Richards, J., Sundermeier, T., Svetlanov, A. & Karzai, A. W. Quality control of bacterial mRNA decoding and decay. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* **1779**, 574–582 (2008).
43. Van Nues, R. et al. Kinetic CRAC uncovers a role for Nab3 in determining gene expression profiles during stress. *Nat. Commun.* **8**, 12 (2017).
44. McKellar, S. W. et al. Monitoring Protein-RNA Interaction Dynamics in vivo at High Temporal Resolution using χ CRAC. *J. Vis. Exp.* <https://doi.org/10.3791/61027> (2020).
45. Shishkin, A. A. et al. Simultaneous generation of many RNA-seq libraries in a single reaction. *Nat. Methods* **12**, 323–325 (2015).
46. Travis, A. J., Moody, J., Helwak, A., Tollervey, D. & Kudla, G. Hyb: A bioinformatics pipeline for the analysis of CLASH (crosslinking, ligation and sequencing of hybrids) data. *Methods* **65**, 263–273 (2014).
47. Sharma, E., Sterne-Weiler, T., O'Hanlon, D. & Blencowe, B. J. Global Mapping of Human RNA-RNA Interactions. *Mol. Cell* **62**, 618–626 (2016).
48. Tjaden, B. De novo assembly of bacterial transcriptomes from RNA-seq data. *Genome Biol.* **16**, (2015).
49. Tomasini, A. et al. The RNA targetome of *Staphylococcus aureus* non-coding RNA RsaA: impact on cell surface properties and defense mechanisms. *Nucleic Acids Res.* **45**, 6746–6760 (2017).
50. Lloyd, C. R., Park, S., Fei, J. & Vanderpool, C. K. The small protein SgrT controls transport activity of the glucose-specific phosphotransferase system. *J. Bacteriol.* **199**, e00869–16 (2017).
51. Bischoff, M. et al. Microarray-based analysis of the *Staphylococcus aureus* sigmaB regulon. *J. Bacteriol.* **186**, 4085–4099 (2004).
52. Altuvia, Y. et al. In vivo cleavage rules and target repertoire of RNase III in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **46**, 10380–10394 (2018).
53. Lorenz, R. et al. ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms Mol. Biol.* **6**, 26 (2011).
54. Chevalier, C. et al. Chapter 16 *Staphylococcus aureus* Endoribonuclease III. Purification and Properties. *Methods Enzymol.* **447**, 309–327 (2008).
55. Bonnin, R. A. & Boulou, P. RNA degradation in *Staphylococcus aureus*: Diversity of ribonucleases and their impact. *Int. J. Genomics* **2015**, 395712–395753 (2015).
56. Durand, S., Tomasini, A., Braun, F., Condon, C. & Romby, P. sRNA and mRNA turnover in gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**, 316–330 (2015).
57. Felden, B., Vandenesch, F., Boulou, P. & Romby, P. The *Staphylococcus aureus* RNome and its commitment to virulence. *PLoS Pathog.* **7**, e1002006 (2011).
58. Le Huyen, K. B. et al. A small regulatory RNA alters *Staphylococcus aureus* virulence by titrating RNAIII activity. *Nucleic Acids Res.* **49**, 10644–10656 (2021).
59. Chao, Y., Papenfort, K., Reinhardt, R., Sharma, C. M. & Vogel, J. An atlas of Hfq-bound transcripts reveals 3' UTRs as a genomic reservoir of regulatory small RNAs. *EMBO J.* **31**, 4005–4019 (2012).
60. Ren, G. X., Guo, X. P. & Sun, Y. C. Regulatory 3' untranslated regions of bacterial mRNAs. *Front. Microbiol.* **8** (2017).
61. Mediati, D. G. et al. RNase III-CLASH of multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* reveals a regulatory mRNA 3'UTR required for intermediate vancomycin resistance. *Nat. Commun.* <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31177-8> (2022).
62. Bouvier, M., Sharma, C. M., Mika, F., Nierhaus, K. H. & Vogel, J. Small RNA Binding to 5' mRNA Coding Region Inhibits Translational Initiation. *Mol. Cell* **32**, 827–837 (2008).
63. Eyraud, A., Tattevin, P., Chabelskaya, S. & Felden, B. A small RNA controls a protein regulator involved in antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res.* **42**, 4892–4905 (2014).
64. Durand, S. et al. Identification of an RNA sponge that controls the RoxS riboregulator of central metabolism in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* **49**, 6399–6419 (2021).
65. Mehlin, C., Headley, C. M. & Klebanoff, S. J. An inflammatory polypeptide complex from *Staphylococcus epidermidis*: Isolation and characterization. *J. Exp. Med.* **189**, 907–917 (1999).
66. Wang, R. et al. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat. Med.* **13**, 1510–1514 (2007).
67. Surewaard, B. G. J. et al. *Staphylococcal* alpha-phenol soluble modulins contribute to neutrophil lysis after phagocytosis. *Cell. Microbiol.* **15**, 1427–1437 (2013).
68. Grosz, M. et al. Cytoplasmic replication of *Staphylococcus aureus* upon phagosomal escape triggered by phenol-soluble modulins. *Cell. Microbiol.* **16**, 451–465 (2014).
69. Geiger, T. et al. The Stringent Response of *Staphylococcus aureus* and Its Impact on Survival after Phagocytosis through the Induction of Intracellular PSMs Expression. *PLoS Pathog.* **8**, e1003016 (2012).
70. Jiang, Q., Jin, Z. & Sun, B. MgrA Negatively Regulates Biofilm Formation and Detachment by Repressing the Expression of psm Operons in *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **84**, AEM.01008–18 (2018).
71. Ferenci, T. Adaptation to life at micromolar nutrient levels: The regulation of *Escherichia coli* glucose transport by endoinduction and cAMP. *FEMS Microbiol. Rev.* **18**, 301–317 (1996).
72. Zapf, R. L. et al. The small RNA Teg41 regulates expression of the alpha phenol-soluble modulins and is required for virulence in *Staphylococcus aureus*. *mBio* **10**, 1–19 (2019).
73. Morfeldt, E., Taylor, D., Von Gabain, A. & Arvidson, S. Activation of alpha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the trans-encoded antisense RNA, RNAIII. *EMBO J.* **14**, 4569–4577 (1995).
74. Korea, C. G. et al. *Staphylococcal* Exs proteins modulate apoptosis and release of intracellular *Staphylococcus aureus* during infection in epithelial cells. *Infect. Immun.* **82**, 4144–4153 (2014).
75. Cheung, G. Y. C., Joo, H. S., Chatterjee, S. S. & Otto, M. Phenol-soluble modulins - critical determinants of staphylococcal virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**, 698–719 (2014).
76. Ivain, L. et al. An in vivo reporter assay for sRNA-directed gene control in Gram-positive bacteria: Identifying a novel sRNA target in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res.* **45**, 4994–5007 (2017).
77. Berlon, N. R. et al. Clinical MRSA isolates from skin and soft tissue infections show increased in vitro production of phenol soluble modulins. *J. Infect.* **71**, 447–457 (2015).
78. Cheung, G. Y. C. C., Duong, A. C. & Otto, M. Direct and synergistic hemolysis caused by *Staphylococcus* phenol-soluble modulins: Implications for diagnosis and pathogenesis. *Microbes Infect.* **14**, 380–386 (2012).

79. Somerville, G. A. & Proctor, R. A. At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in *Staphylococcus*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73**, 233–248 (2009).
80. Sheldon, J. R., Marolda, C. L. & Heinrichs, D. E. TCA cycle activity in *Staphylococcus aureus* is essential for iron-regulated synthesis of staphyloferrin A, but not staphyloferrin B: The benefit of a second citrate synthase. *Mol. Microbiol.* **92**, 824–839 (2014).
81. Somerville, G. A. et al. *Staphylococcus aureus* aconitase inactivation unexpectedly inhibits post-exponential-phase growth and enhances stationary-phase survival. *Infect. Immun.* **70**, 6373–6382 (2002).
82. Zhu, Y. et al. Tricarboxylic acid cycle-dependent attenuation of *Staphylococcus aureus* in vivo virulence by selective inhibition of amino acid transport. *Infect. Immun.* **77**, 4256–4264 (2009).
83. Schurig-Briccio, L. A. et al. Role of respiratory NADH oxidation in the regulation of *Staphylococcus aureus* virulence. *EMBO Rep.* **21**, 1–15 (2020).
84. Ding, Y. et al. Metabolic sensor governing bacterial virulence in *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111**, E4981–E4990 (2014).
85. Seidl, K. et al. Effect of a glucose impulse on the CcpA regulon in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* **9**, 95 (2009).
86. Seidl, K. et al. *Staphylococcus aureus* CcpA affects biofilm formation. *Infect. Immun.* **76**, 2044–2050 (2008).
87. Calin-Jageman, I. & Nicholson, A. W. RNA structure-dependent uncoupling of substrate recognition and cleavage by *Escherichia coli* ribonuclease III. *Nucleic Acids Res.* **31**, 2381–2392 (2003).
88. Matera, G. et al. Global RNA interactome of *Salmonella* discovers a 5' UTR sponge for the MicF small RNA that connects membrane permeability to transport capacity. *Mol. Cell* **82**, 629–644.e4 (2022).
89. Schoenfelder, S. M. K. et al. The small non-coding RNA RsaE influences extracellular matrix composition in *Staphylococcus epidermidis* biofilm communities. *PLoS Pathog.* **15**, e1007618 (2019).
90. Otake, H., Ishikawa, H., Morita, T. & Aiba, H. PolyU tail of rho-independent terminator of bacterial small RNAs is essential for Hfq action. *Proc. Natl Acad. Sci.* **108**, 13059–13064 (2011).
91. Morita, T., Nishino, R. & Aiba, H. Role of the terminator hairpin in the biogenesis of functional Hfq-binding sRNAs. *RNA* **23**, 1419–1431 (2017).
92. Horn, J. et al. Long noncoding RNA SSR42 controls *Staphylococcus aureus* alpha-toxin transcription in response to environmental stimuli. *J. Bacteriol.* **200**, (2018).
93. Sundaramoorthy, R., Fyfe, P. K. & Hunter, W. N. Structure of *Staphylococcus aureus* EsxA suggests a contribution to virulence by action as a transport chaperone and/or adaptor protein. *J. Mol. Biol.* **383**, 603–614 (2008).
94. Burts, M. L., Williams, W. A., DeBord, K. & Missiakas, D. M. EsxA and EsxB are secreted by an ESAT-6-like system that is required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 1169–1174 (2005).
95. Schulthess, B., Bloes, D. A. & Berger-Bächi, B. Opposing roles of σ^b and σ^b -controlled SpoVG in the global regulation of *esxA* in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* **12**, 11 (2012).
96. Liu, Q., Yeo, W. S. & Bae, T. The SaeRS two-component system of *Staphylococcus aureus*. *Genes* vol. 7 (2016).
97. Liu, Y. et al. The production of extracellular proteins is regulated by ribonuclease III via two different pathways in *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* **6**, (2011).
98. Herskovitz, M. A. & Bechhofer, D. H. Endoribonuclease RNase III is essential in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **38**, 1027–1033 (2000).
99. Sayed, N., Nonin-Lecomte, S., Réty, S. & Felden, B. Functional and structural insights of a *Staphylococcus aureus* apoptotic-like membrane peptide from a toxin-antitoxin module. *J. Biol. Chem.* **287**, 43454–43463 (2012).
100. Ignatov, D. et al. An mRNA-mRNA interaction couples expression of a virulence factor and its chaperone in *Listeria monocytogenes*. *Cell Rep.* **30**, 4027–4040.e7 (2020).
101. Chao, Y. et al. In vivo cleavage Map Illuminates the central role of RNase E in coding and non-coding RNA pathways. *Mol. Cell* **65**, 39–51 (2017).
102. Melamed, S. et al. Global mapping of small RNA-target interactions in bacteria. *Mol. Cell* **63**, 884–897 (2016).
103. Miyakoshi, M., Chao, Y. & Vogel, J. Cross talk between ABC transporter mRNA via a target mRNA-derived sponge of the GcvB small RNA. *EMBO J.* **34**, 1478–1492 (2015).
104. Manna, A. C. et al. Small RNA teg49 Is Derived from a sarA Transcript and Regulates Virulence Genes Independent of SarA in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **86**, e00635-17.
105. Beaume, M. et al. Cartography of Methicillin-Resistant *S. aureus* transcripts: detection, orientation and temporal expression during growth phase and stress conditions. *PLOS ONE* **5**, e10725 (2010).
106. Monk, I. R., Shah, I. M., Xu, M., Tan, M. W. & Foster, T. J. Transforming the untransformable: Application of direct transformation to manipulate genetically *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *mBio* **3**, e00277–11 (2012).
107. Corrigan, R. M. & Foster, T. J. An improved tetracycline-inducible expression vector for *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* **61**, 126–129 (2009).
108. Charpentier, E. et al. Novel cassette-based shuttle vector system for gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 6076–6085 (2004).
109. Cao, Z., Casabona, M. G., Kneuper, H., Chalmers, J. D. & Palmer, T. The type VII secretion system of *Staphylococcus aureus* secretes a nuclease toxin that targets competitor bacteria. *Nat. Microbiol.* **2**, 16183 (2016).
110. Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156–159 (1987).
111. Joo, H. S. & Otto, M. The isolation and analysis of phenol-soluble modulins of *Staphylococcus epidermidis*. *Methods Mol. Biol.* **1106**, 93–100 (2014).
112. Rappsilber, J., Ishihama, Y. & Mann, M. Stop And Go Extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal. Chem.* **75**, 663–670 (2003).
113. Webb, S., Hector, R. D., Kudla, G. & Granneman, S. PAR-CLIP data indicate that Nrd1-Nab3-dependent transcription termination regulates expression of hundreds of protein coding genes in yeast. *Genome Biol.* **15**, R8 (2014).
114. Magoč, T. & Salzberg, S. L. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* **27**, 2957–2963 (2011).
115. Szklarczyk, D. et al. STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* **47**, D607–D613 (2019).
116. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 550 (2014).
117. Ernst, J. & Bar-Joseph, Z. STEM: A tool for the analysis of short time series gene expression data. *BMC Bioinforma.* **7**, 191 (2006).
118. Tyanova, S., Temu, T. & Cox, J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat. Protoc.* **11**, 2301–2319 (2016).
119. Cox, J. et al. Andromeda: A peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J. Proteome Res.* **10**, 1794–1805 (2011).
120. Ritchie, M. E. et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* **43**, e47 (2015).
121. Li, H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics* **34**, 3094–3100 (2018).
122. Li, H. et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **25**, 2078–2079 (2009).
123. Quinlan, A. R. & Hall, I. M. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **26**, 841–842 (2010).
124. Perez-Riverol, Y. et al. The PRIDE database and related tools and resources in 2019: Improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res.* <https://doi.org/10.1093/nar/gky1106> (2019).
125. McKellar, S. W. et al. RNase III CLASH in MRSA uncovers sRNA regulatory networks coupling metabolism to toxin expression. *Zenodo* <https://doi.org/10.5281/zenodo.6557838> (2022).

Acknowledgements

We are grateful to Wei Gao, Tim Stinear and Benjamin Howden for providing the JKD6009 RNase III-HTF strain, Philippe Bouloc for the RsaE over-expression plasmid and Tracy Palmer for the polyclonal EsxA antibody. We would like to thank Pascale Romby and Emma Denham for fruitful discussions and helpful suggestions. We also thank Julia Wong for help with the FACS analyses, Lucas Herrgott for producing recombinant RNase III and Jimi-Carlo Wills and Alexander von Kriegsheim from the proteomics facility at the Institute of Genetics and Molecular Medicine (IGMM) at the University of Edinburgh for performing the mass-spectrometry analyses. Finally, we would like to thank the members of the Granneman lab for critically reading the manuscript. This work was supported by a Medical Research Council Non-Clinical Senior Research Fellowship (MR/R008205/1 to S.G.), a Wellcome Trust grant (109093/Z/15/A to S.W.M.), a Wellcome Trust Senior Research Fellowship (207507 to G.K.), the labEx NetRNA framework (ANR-10-LABX-0036) and the French investment for the future framework (ANR-17-EURE-0023). J.J.T. and D.G.M. were supported by a grant from the National Health and Medical Research Council Australia (GNT1139313). J.R.F. was funded by institute strategic grant funding ISP2: BBS/E/D/20002173 and BBS/E/D/20002174 from the Biotechnology and Biological Sciences Research Council (United Kingdom), SHIELD grant MR/N02995X/1 from the Medical Research Council (United Kingdom) and a Wellcome Trust collaborative award 201531/Z/16/Z. R.K.C. and R.L.Z. were supported in part by grant A1128376 from the US National Institute of Allergy and Infectious Diseases (to R.K.C.). The proteomics facility at the IGMM is supported by a Wellcome Trust Multiuser Equipment grant (208402/Z/17/Z to Alexander von Kriegsheim). For the purpose of open access, the corresponding author has applied a creative commons attribution (CC BY) licence to any author accepted manuscript version arising.

Author contributions

S.W.M., J.J.T., R.J.F. and S.G. initiated the project and S.W.M., J.J.T., R.K.C., I.C., R.J.F. and S.G. designed the experiments. S.W.M., I.I., P.A., R.L.Z., N.M., L.C., D.G.M. and A.C.P. performed the experiments and analysed the data. R.F. and G.K. developed the software for analysis of enriched structural motifs in the RNase III CLASH data. S.G. developed the data analysis

pipelines for processing paired-end CLASH data. S.W.M and S.G drafted the manuscript, and all the authors reviewed the manuscript and approved the final version.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31173-y>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Sander Granneman.

Peer review information *Nature Communications* thanks Yoann Augagneur, Stephanie Kreis, and the other, anonymous, reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. Peer reviewer reports are available.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022, corrected publication 2022

Supplementary Information

RNase III CLASH in MRSA uncovers sRNA regulatory networks coupling metabolism to toxin expression

Stuart W. McKellar¹, Ivayla Ivanova¹, Pedro Arede¹, Rachel L. Zapf², Noémie Mercier³,
Liang-Cui Chu¹, Daniel G. Mediat⁴, Amy C. Pickering⁵, Paul Briaud², Robert Foster⁶,
Grzegorz Kudla⁶, J. Ross Fitzgerald⁵, Isabelle Caldelari³, Ronan K. Carroll^{2,7}, Jai J. Tree⁴
and Sander Granneman^{1*}

Affiliations:

¹Centre for Synthetic and Systems Biology, University of Edinburgh, Edinburgh EH9 3BF, UK.

²Department of Biological Sciences, Ohio University, Athens, OH 45701, USA.

³Université de Strasbourg, CNRS, Architecture et Réactivité de l'ARN, UPR9002, F-67000-Strasbourg, France.

⁴School of Biotechnology and Biomolecular Sciences, University of New South Wales, Sydney 2052, NSW, Australia.

⁵The Roslin Institute and Edinburgh Infectious Diseases, University of Edinburgh, Easter Bush Campus, Edinburgh, Scotland, United Kingdom.

⁶MRC Human Genetics Unit, University of Edinburgh, Edinburgh EH4 2XU, United Kingdom.

⁷The Infectious and Tropical Disease Institute, Ohio University, Athens, OH 45701, USA.

*To whom correspondence should be addressed:

Sander Granneman

e-mail: Sander.Granneman@ed.ac.uk

Tel: +44 131 6519082

Content:

Supplementary Data: 2-5

Supplementary Figures: 6-29

Supplementary References: 30-32

Supplementary Data

Optimizing the CLASH protocol for *Staphylococcus aureus*

The CLASH protocol (Supplementary Fig. 5a) has been successfully performed in *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* and cultured human cells^{1–4}. Unfortunately, the cell disruption and immunoprecipitation conditions used for CLASH in these species resulted in poor cell lysis and significant RNA degradation in *S. aureus*. As a result, we further optimised the protocol. Briefly, cells were lysed in the presence of lysostaphin to break down the peptidoglycan cell wall. DNase RQ1 was included during the lysis to degrade the extracellular DNA and reduce viscosity of the lysate. The addition of Triton X-100, Superase-In and EDTA after cell lysis substantially increased the recovery of cross-linked RNPs. Additionally, we also reduced the primary, anti-FLAG capture time from overnight to just 2 hours and compensated by increasing the quantity of anti-FLAG beads. Collectively, these optimisations enhanced the solubility of the bait protein and reduced RNA degradation through both inactivating and reducing the contact time with endogenous RNases. To quantify the recovery of UV cross-linked RNA, we radiolabelled the RNA cross-linked to the bait protein after the purification steps and resolved the RNP complex by SDS-PAGE. The effectiveness of RNA capture was measured through autoradiography. Using the standard CLASH protocol, very long (>50 hours) exposure times were needed to detect the radiolabelled RNA cross-linked to purified RNase III, indicating a paucity of captured RNA (Supplementary Fig. 5b). The optimized protocol reduced exposure times to roughly 3 hours, an almost 19-fold improvement. We also examined RNase III cross-linking to its target RNAs during RPMI and LPM stress. We observed a strong increase in the degree of RNA capture in these stresses in comparison to TSB, suggesting that RNase III plays an active role in the adaptation process (Supplementary Fig. 5c). Encouragingly, no radioactive signal was observed for a parental, untagged control, indicating that the cross-linking is specific to RNase III. Overall, we anticipate that our modifications will facilitate the application of CLASH to Gram-positive bacteria in general.

Known interactions identified by CLASH

Supplementary Fig. 8 shows the structures of RNA-RNA interactions detected through CLASH that have been previously identified. These structures were obtained by extracting the corresponding reads found through CLASH and folding them *in silico* through RNADuplex.

RsaA targets

RsaA contains a distinctive 3' UCCC nucleotide tract; a motif which is utilised by other sRNAs, e.g., RNAIII and RsaE, to bind to the Shine Dalgarno (SD) sequence of targets. RsaA

is known to repress the translation of a global transcription factor, *mgrA*, in order to stimulate biofilm formation and inhibit capsule synthesis⁵. We identified this interaction in both USA300 and JKD6009, primarily in RPMI but also in TSB. Previous structural work has elucidated that RsaA can interact with two regions of *mgrA*. The first of these involves the 3' C-rich motif of RsaA binding to the SD sequence of *mgrA*, creating a target site for RNase III. CLASH of RNase III perfectly recapitulated this interaction and all the involved nucleotides. The second interaction site involves the fourth hairpin loop of *mgrA*, around 200 nucleotides within the coding sequence, but this is not thought to recruit RNase III⁵. We did not recover this site using RNase III CLASH, and as such, our results confirm that only the interaction around the start codon is an RNase III target.

Targetome-capture of RsaA via 'MS2 affinity purification coupled to RNA sequencing' (MAPS) revealed that RsaA can bind *HG001_01977*⁶ (annotated here as *JKD6008_01954* and *SAUSA300_1921*), a protein of unknown function. We identified this interaction in both JKD6008 in TSB and in USA300 in RPMI. Previous work found that mutating the 3' C-rich motif of RsaA had no effect on binding to *HG001_01977*, we found the 5' region of RsaA (as is also known to bind hairpin 4 of *mgrA*) as binding to *HG001_01977*. This is further evidence for a second seed sequence in RsaA at its 5' end.

RsaE targets

RsaE is an sRNA known to be involved in the citric acid cycle⁷, amino acid catabolism⁸, folate metabolism⁹ and oligopeptide transport⁷. It has been found to bind *oppB*, an oligopeptide transporter from the *opp-3* operon, at the SD sequence to prevent ribosomal binding. CLASH perfectly recovered this interaction, showing that this RNA-RNA duplex also acts to recruit RNase III and so maybe also control RNA stability^{7,9}. MAPS capture of RsaE also revealed *purH* as a target, although no detailed structural work was performed⁸. We captured this interaction in JKD6009 in TSB, although it did not utilise one of RsaE's canonical UCCC motifs nor the 5' UTR of *purH*.

SprX - *spoVG*

The translational efficiency of a protein involved in antibiotic resistance and capsule formation, *spoVG*, is known to be negatively regulated by SprX¹⁰. Again, SprX is thought to utilise a UCCC motif to interact with the SD sequence of *spoVG*¹⁰. RNase III CLASH perfectly recapitulated this interaction. Overexpression of SprX also led to a decrease in the stability of *spoVG*¹⁰, and so our CLASH data puts RNase III as a contributor towards this regulation. This interaction was found both in the JKD6009 and USA300 CLASH data and was highly reproducible.

Toxin-antitoxin systems

Several type I toxin-antitoxin systems are well characterised in *S. aureus*, where an unstable antisense RNA represses the translation of a more stable, toxic mRNA. The most well characterised of these is between *sprA1*, encoding for the toxic PepA1 peptide, and *SprA1_{AS}*¹¹. Here, the antisense *SprA1_{AS}* represses the translation of *SprA1* by covering the ribosomal binding site¹¹. We consistently identified this interaction in both tested strains and in all tested conditions, and *in silico* folding of the CLASH reads revealed *SprA1_{AS}* binding to the 5' UTR and start codon, as expected.

Previously linked pathways are directly connected by CLASH

1. RNAIII – *saeR*

The *sae* ('*S. aureus* exoprotein expression') locus encodes for a two-component system that is critical for production of virulence-related transcripts. SaeS, a sensor histidine kinase, autophosphorylates in response to external signals such as human neutrophil peptides¹². Phosphorylated SaeS can then activate SaeR, a transcription factor that stimulates the transcription of haemolysins (including α PSMs), leukocidins, superantigens, surface proteins and proteases¹³.

The *sae* system has been linked to the *agr* quorum sensing network. Firstly, these two networks have similar functionalities. The effector molecule of *agr*, RNAIII, is a major post-transcriptional regulator that also promotes the production of virulence-related transcripts, and AgrA, the transcription factor component of the *agr* system, can induce the transcription of cytolytic PSMs such as α PSMs¹⁴. Additionally, deletion of the *agr* locus strongly diminishes production of the *sae* operonic mRNA¹⁵. We observed direct interactions between RNAIII and *saeR* and so the *agr* system may also regulate *sae* at the post-transcriptional level by regulating *saeR* translation and/or RNA stability via RNAIII.

2. The *agr* and *dlt* operons

The *agr* quorum sensing network has been linked to the *dlt* operon, which is involved in D-alanine modification of teichoic acids to confer resistance to human antimicrobial peptides¹⁶. Deletion of the *agr* locus led to an increase in *dlt* expression in stationary phase (when *agr* is expressed most strongly). Although a role for *agrA*, the transcriptional regulator of the *agr* locus, was proposed, here we observed direct interactions between RNAIII and *dltA* and *dltD*. Thus, these two pathways may also be connected at the post-transcriptional level.

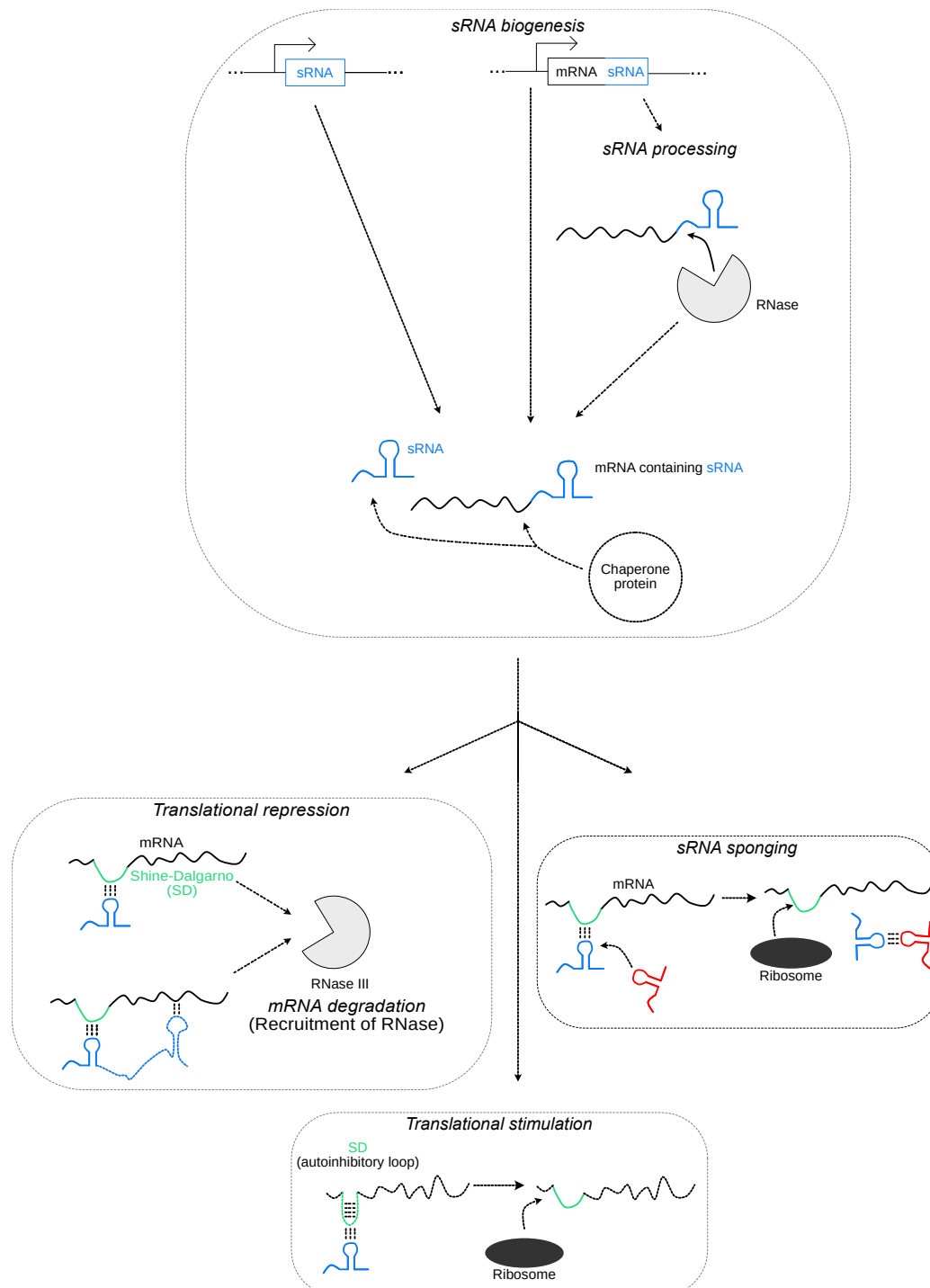
RNAIII and RsaA

One of the most abundant interactions that we identified in the JKD6009 CLASH data was the interaction between RNAIII and RsaA (Supplementary Fig. 9a). This interaction was almost exclusively detected in the JKD6009 CLASH data (Supplementary Fig. 9b), implying it is strain specific or regulated differently in the strains tested. The idea that RsaA is connected to the *agr* pathway, and therefore RNAIII, has been previously suggested: RsaA is positively regulated by σ^B and strains that have a fully functional σ^B also express lower levels of RNAIII¹⁷. Additionally, MAPS-capture of RsaA identified RNAIII as a putative binding partner, although this was suggested as being due to indirect co-purification with *mgrA*⁶.

We firstly recapitulated this interaction using EMSAs. *In silico* folding of the CLASH reads revealed that RNAIII utilised helices 9, 10 and 11 to interact with RsaA (Supplementary Fig. 9c; “RNAIII fragment 1”). Because the interaction between RsaA and RNAIII involved many base-pairs (Supplementary Fig. 9a), as a control we *in vitro* transcribed an RNAIII fragment that had a similar *in silico* base-pairing potential with RsaA but was not recovered in our chimeras (“RNA fragment 2”; Supplementary Fig. 9c). The EMSA revealed that only RNAIII fragment 1 could form a stable duplex with RsaA, with no significant binding observed between RNAIII fragment 2 and RsaA (Supplementary Fig. 9d). As such, we conclude that these two sRNAs interact *in vivo* and this interaction can be recapitulated specifically *in vitro*.

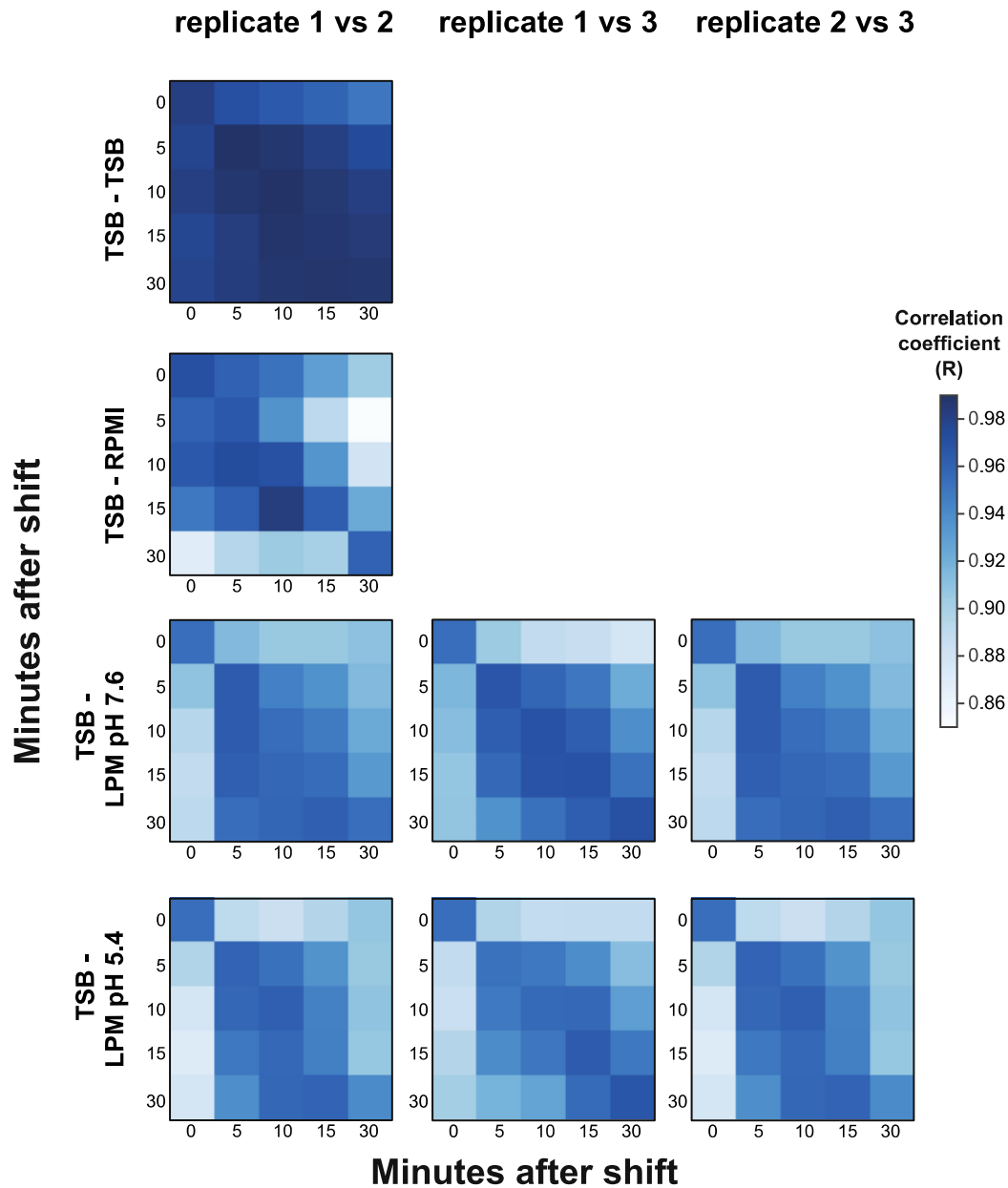
To determine the biological significance of this interaction, we firstly examined if deletion of either RsaA or RNAIII induced stability changes in the partner RNA. Although we found that deletion of RNAIII resulted in reduced levels of the unprocessed RsaA transcript, the levels of the processed RsaA were similar to the WT. Similarly, deletion of RsaA had no significant effect on RNAIII levels (Supplementary Fig. 9e). We then examined if pulse-overexpression of either RsaA or RNAIII induced stability changes in the partner. Each sRNA was put under the control of an anhydrotetracycline promoter¹⁸ and induced for 5 and 10 minutes at OD₆₀₀ ~3, and expression was compared to a strain carrying an empty plasmid control. Again, no significant expression changes were observed (Supplementary Fig. 9f). Interestingly, we found that the levels of RNAIII were rapidly and strongly reduced following the shift to RPMI (Supplementary Fig. 9g, upper panel). This led us to hypothesise that RsaA may bind to RNAIII during stress, marking RNAIII for degradation. As such, we compared the stability of RNAIII following the shift to RPMI in both USA300 WT and a Δ rsaA strain. However, no differences were observed, indicating the RsaA does not play a role in regulating RNAIII stability under the tested conditions. Overall, we are unsure of the directionality of this sRNA-sRNA interaction or its functional outcome.

Supplementary Figures and Figure legends



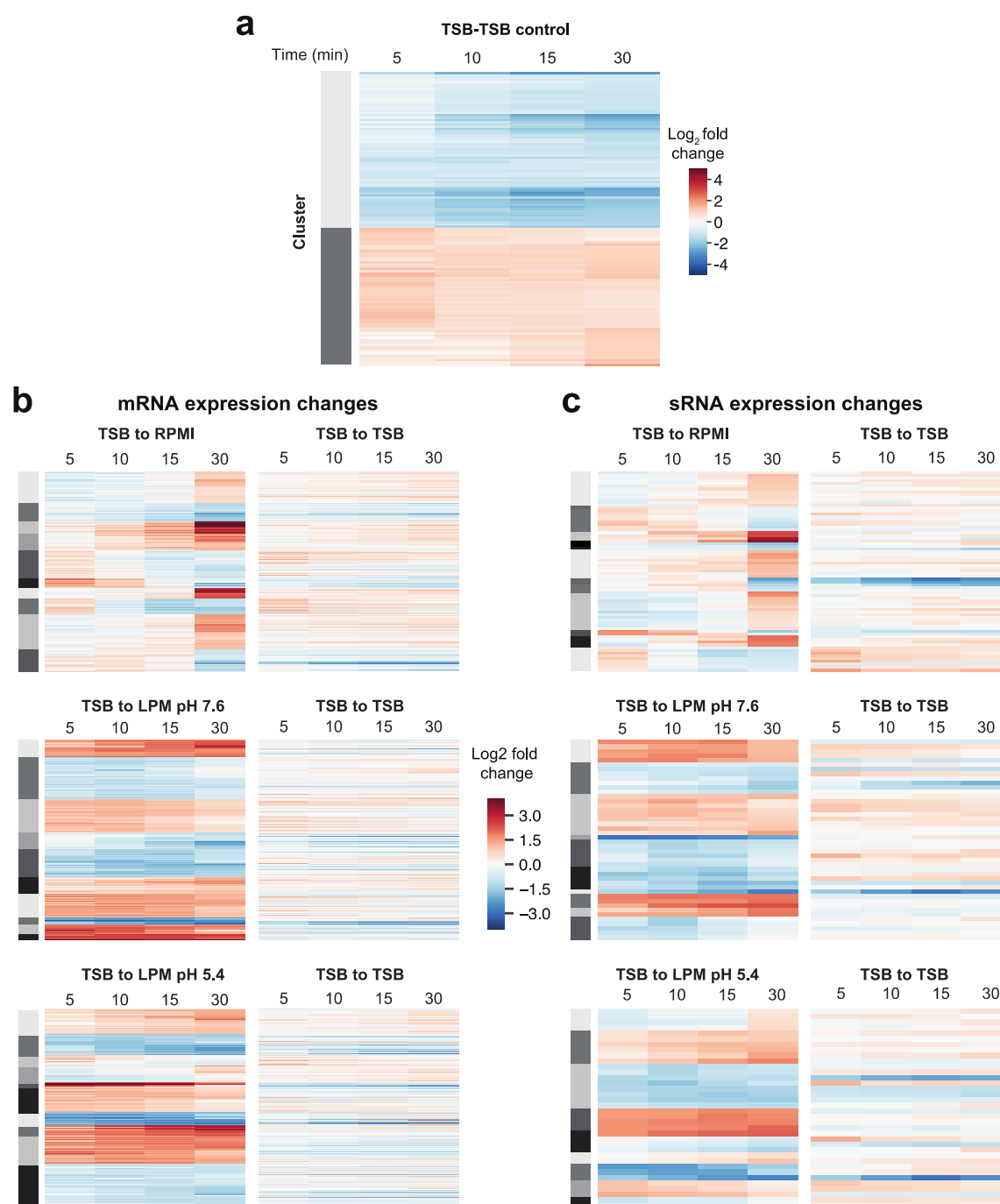
Supplementary Figure 1. sRNA biogenesis and functionality.

sRNAs can stimulate or repress mRNA translation and antagonise the activity of other sRNAs ('sponging').



Supplementary Figure 2. Correlation of RNA-seq replicates.

The number of reads for all transcripts in common between replicates were TPM (Transcripts Per Million) and log2-normalised and Pearson correlation coefficients (R) were calculated by comparing each individual timepoint. For TSB-TSB and TSB-RPMI, two independent biological replicates were used. For TSB-LPM pH 5.4 and TSB-LPM pH 7.6, three independent biological replicates were used.

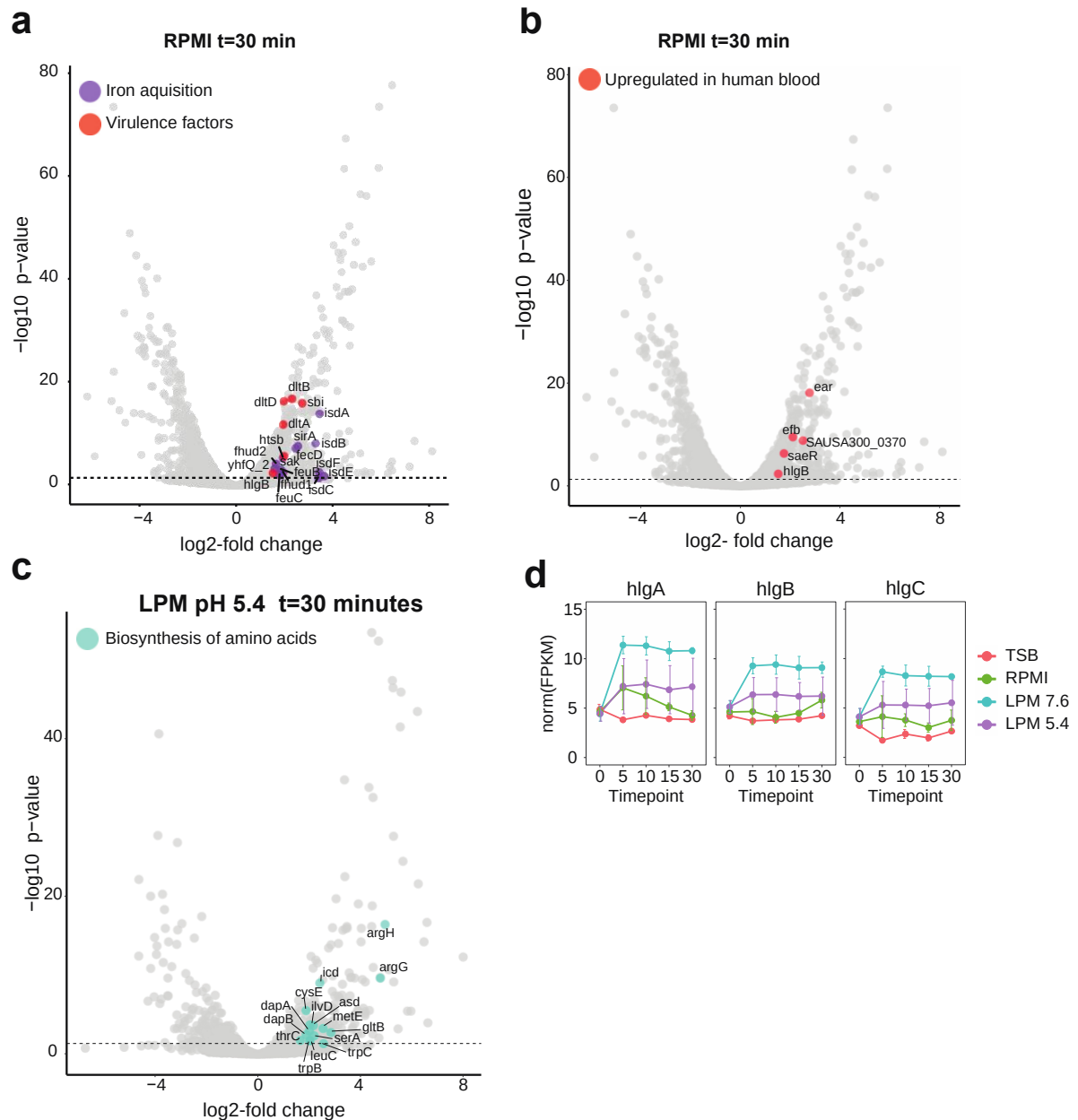


Supplementary Figure 3. Transcript expression after shift to TSB, RPMI, LPM pH 5 and LPM pH 7.

(a) Expression of all significantly changed transcripts (t30 vs t0) in the TSB-shifted control. Time indicates time (minutes) after the shift. Cluster indicates a group of genes that shows similar gene expression behaviour. Log₂ fold-change indicate log₂-fold normalised Transcripts Per Million (TPM) normalised read counts.

(b) Left: expression of all significantly changed mRNAs (t30 vs t0) in RPMI, LPM pH 5 and LPM pH 7. Right: TSB expression of the transcripts shown on the left, in the same order.

(c) As in (b) but for all sRNAs.

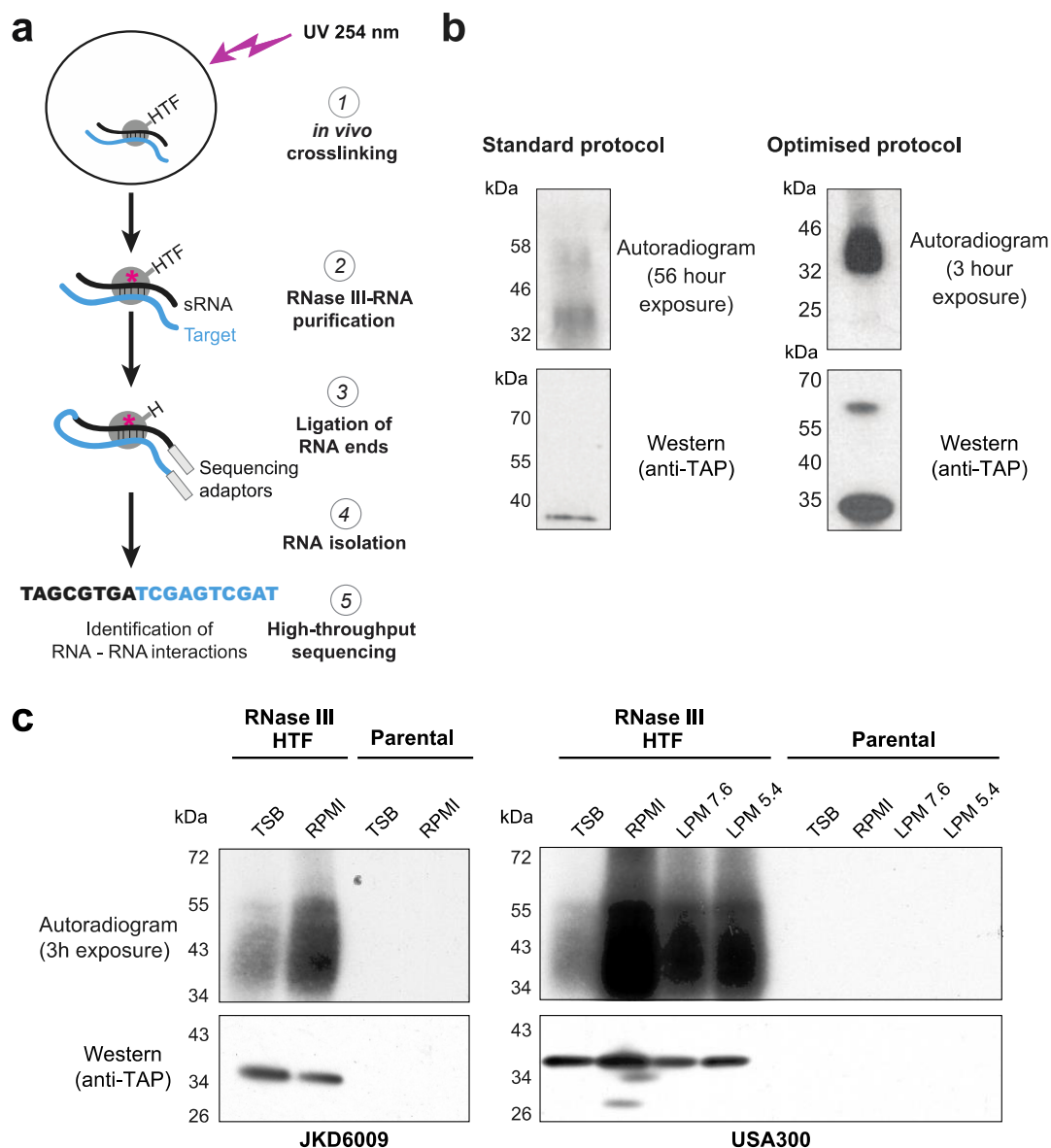


Supplementary Figure 4. Gene expression dynamics after the shift to RPMI and LPM.

(a) Volcano plot showing the upregulation of genes involved in virulence and iron-acquisition, many of which have also been demonstrated to be upregulated during growth in human plasma¹⁹. Fold-changes and p-values were calculated using DESeq2²⁰.

(b) Volcano plot showing genes upregulated in RPMI in this study that were previously observed to be upregulated in human blood²¹.

(c) Volcano plot showing upregulation of genes involved in amino acid biosynthesis after shifting to LPM pH 5.4 medium. (d) Expression of haemolysin gamma subunits after stress.



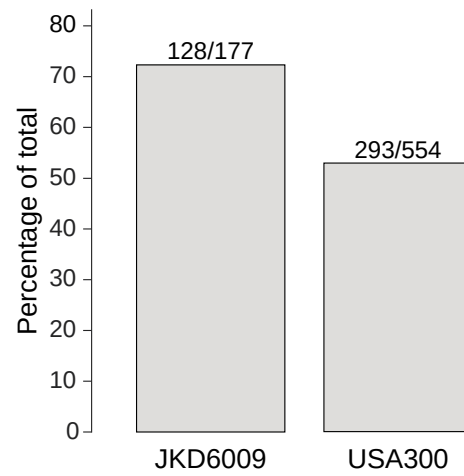
Supplementary Figure 5. Optimisation of CLASH for *S. aureus*.

(a) Schematic representation of the CLASH methodology¹. HTF: HIS6-TEV cleavage site-3xFLAG tag.

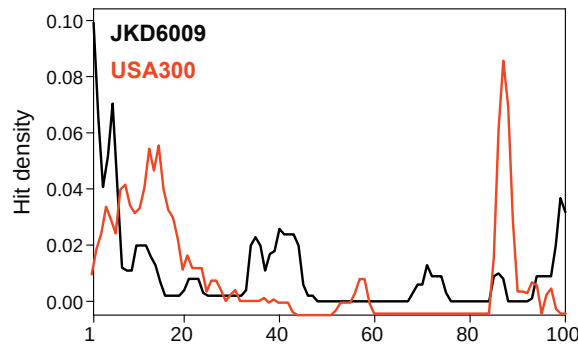
(b) Autoradiogram showing amount of captured RNA when using the original, published CLASH protocol for *E. coli*⁴ (left) and after optimisation (right) using RNase III tagged with HTF as bait. RNase III protein was detected using the anti-TAP antibody (see Methods for details) that recognizes the spacer between the HIS6 tag and the TEV protease cleavage site of the RNase III-HTF protein (bottom).

(c) Degree of cross-linked RNA capture following RNase III CLASH in TSB and after the shift to RPMI, LPM7 or LPM5 medium. The untagged parental strain was used as a negative control. RNase III was detected by Western blot using the anti-TAP antibody. Images used to generate figures (b) and (c) are provided in the Source Data file.

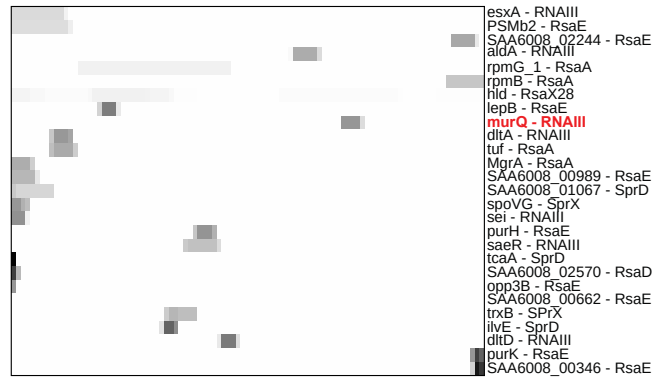
a Number of mRNA-mRNA_{AS} hybrids
belonging to the same gene



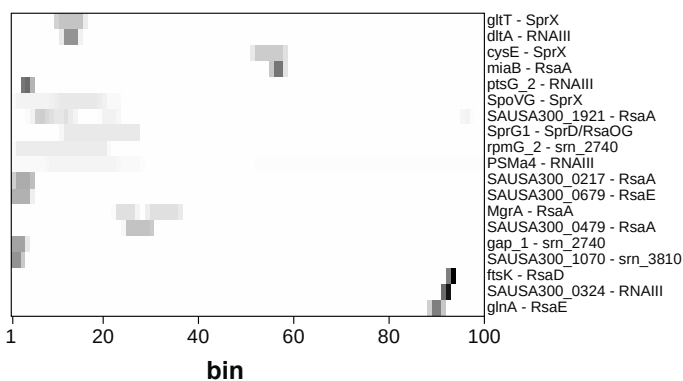
b mRNA reads in *bona-fide* sRNA-targets



JKD6009



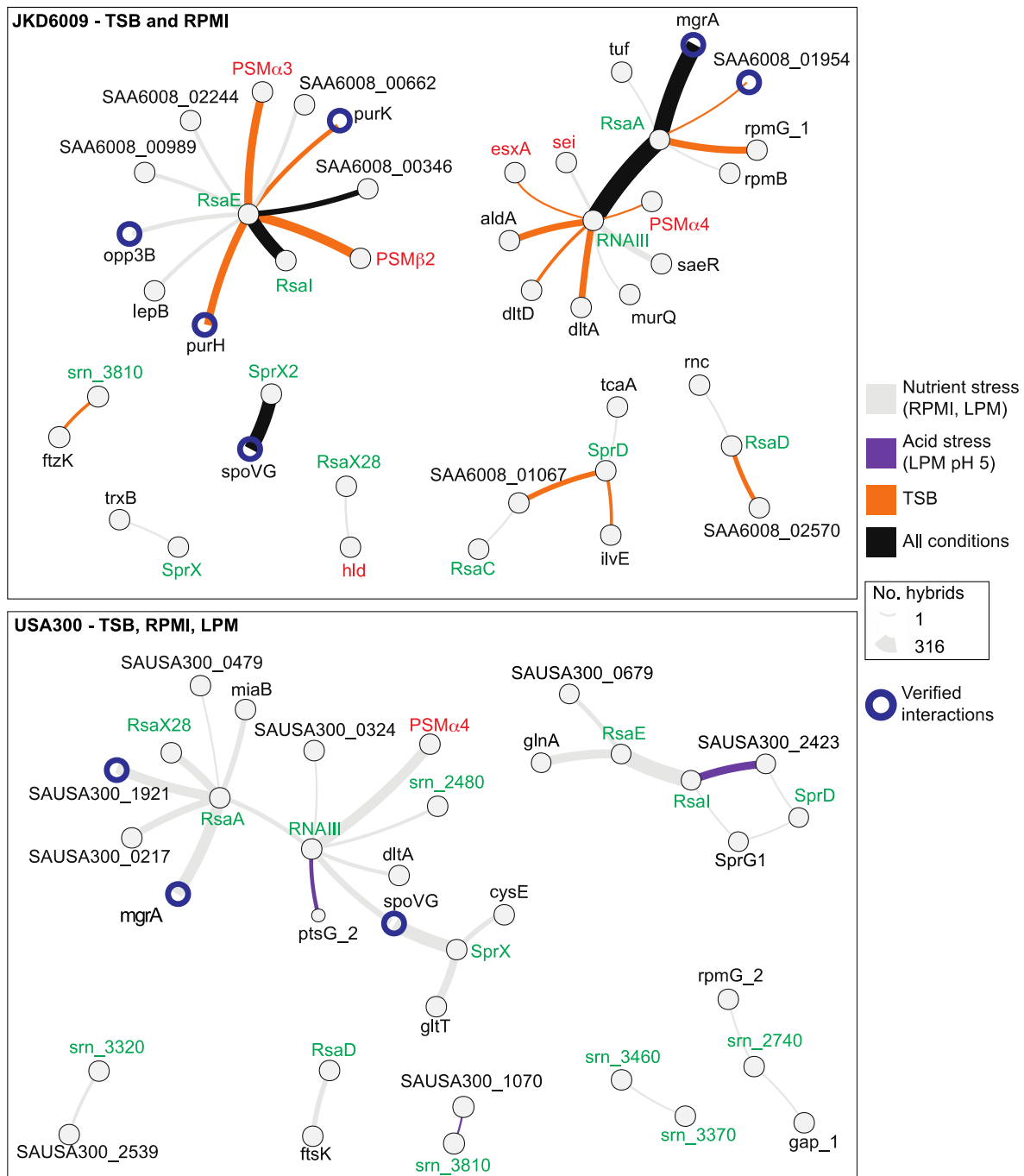
USA300



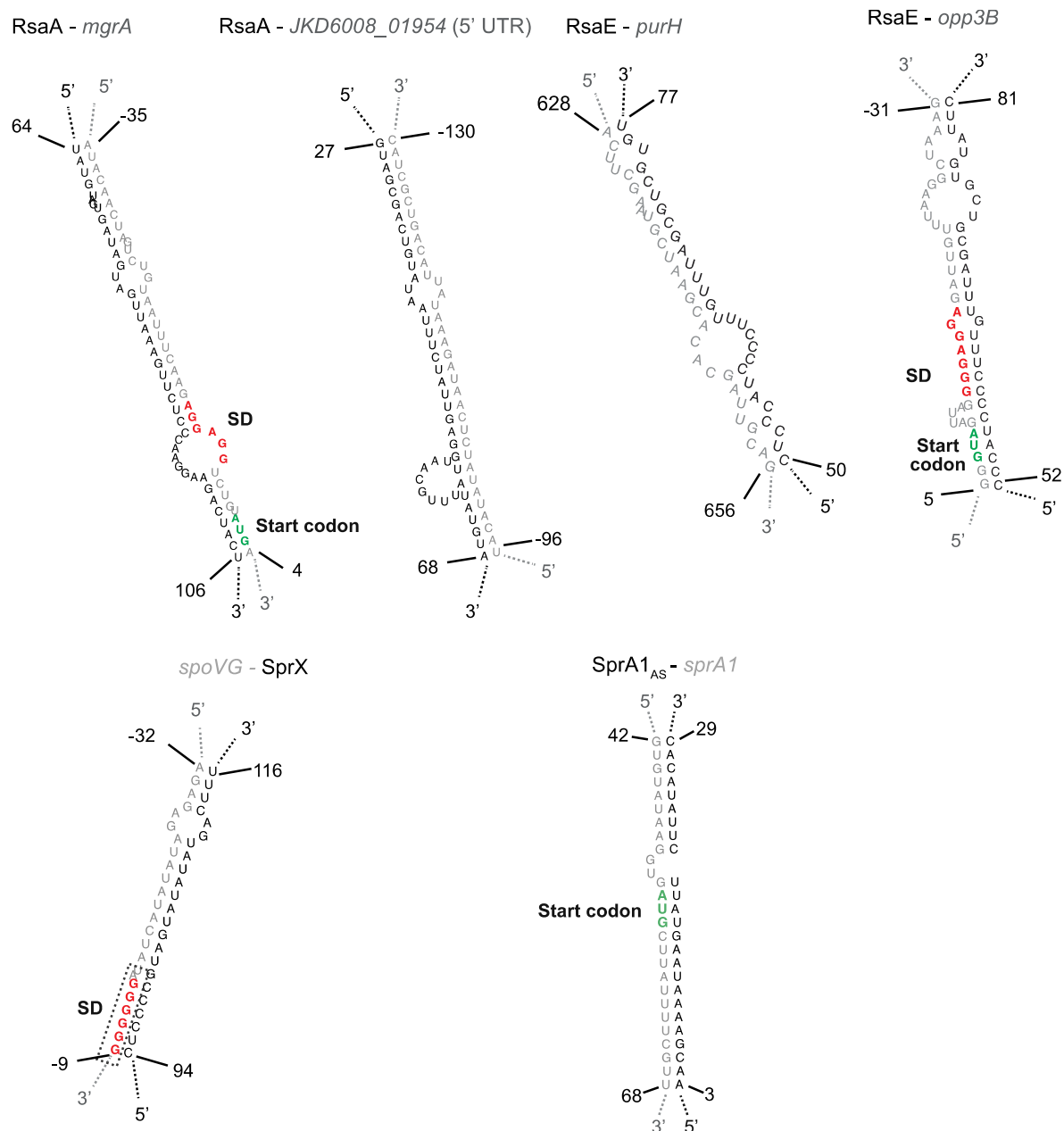
Supplementary Figure 6. Sense-anti-sense mRNA interactions and distribution of mRNA fragments in protein-coding genes.

(a) Number of mRNA-mRNA_{AS} fragments that contain cognate mRNAs in JKD6009 and USA300 compared to total number of mRNA-mRNA_{AS} chimeras identified in the CLASH data.

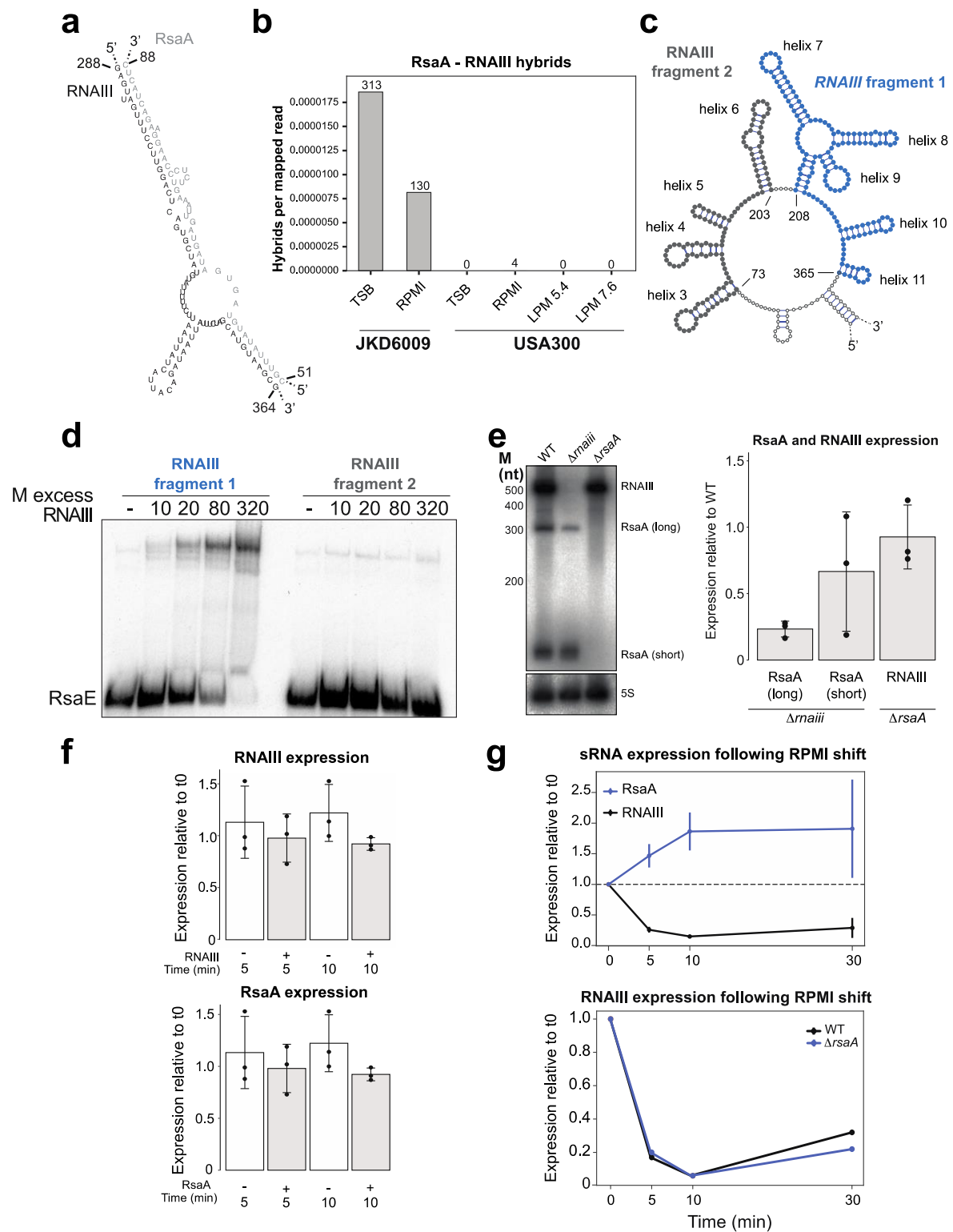
(b) Top: Distribution of the mRNA fragments over coding sequences in bona fide sRNA-mRNA interactions. Target mRNAs were separated into 100 equally sized bins and reads were mapped relative to each bin. Bottom: heatmaps showing the read distribution for each individual interaction. The darker the colour, the higher number of chimeras that were detected. The interaction highlighted in red was validated in an accompanying manuscript by Mediati *et al.*



Supplementary Figure 7. CLASH identifies many novel *bona fide* sRNA-target interactions. sRNA interactome plots were generated after filtering the data for statistical significance, presence of a *bona fide* sRNA and MFE < -10 kcal/mol. sRNAs are coloured in green and toxins in red. Interactions which have already been identified are marked with a blue spoke. The thickness of the edges is proportional to the $\log_2$ hybrid count, and the colour represents the condition in which an interaction was found (minimum 1, maximum 316). Note that some previously described interactions are not shown, e.g. between SprA1_{AS}-sprA1, as the sRNAs are not trans-acting, independent transcriptional units²².



Supplementary Figure 8: Experimentally verified sRNA-mRNA interactions uncovered through CLASH. CLASH reads were folded *in silico* through RNAcofold²³ and the interacting regions extracted. The sRNAs are shown in grey and the mRNAs in black. Where appropriate, Shine Dalgarno sequences (SD; red) and translational start codons (AUG; green) of mRNAs are indicated.



Supplementary Figure 9. RsaA and RNAIII interact *in vivo*.

(a) *In silico* predicted structure of RsaA-RNAIII as determined from the CLASH data. The CLASH reads were folded using RNAcofold²³.

(b) Overview of the number of unique RsaA-RNAIII chimeras identified in the JKD6009 and USA300 CLASH data.

(c) Secondary structure of the region containing the two RNAIII fragments 1 (blue) and 2 (grey) used for *in vitro* binding assays.

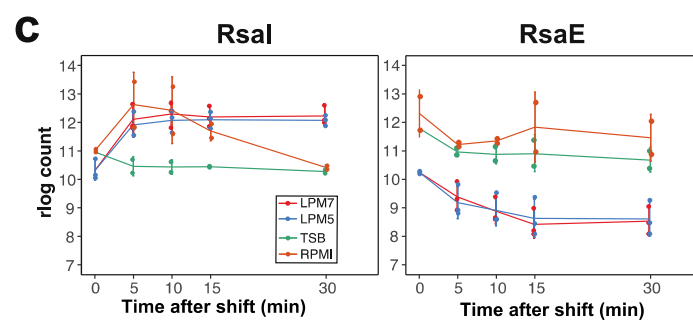
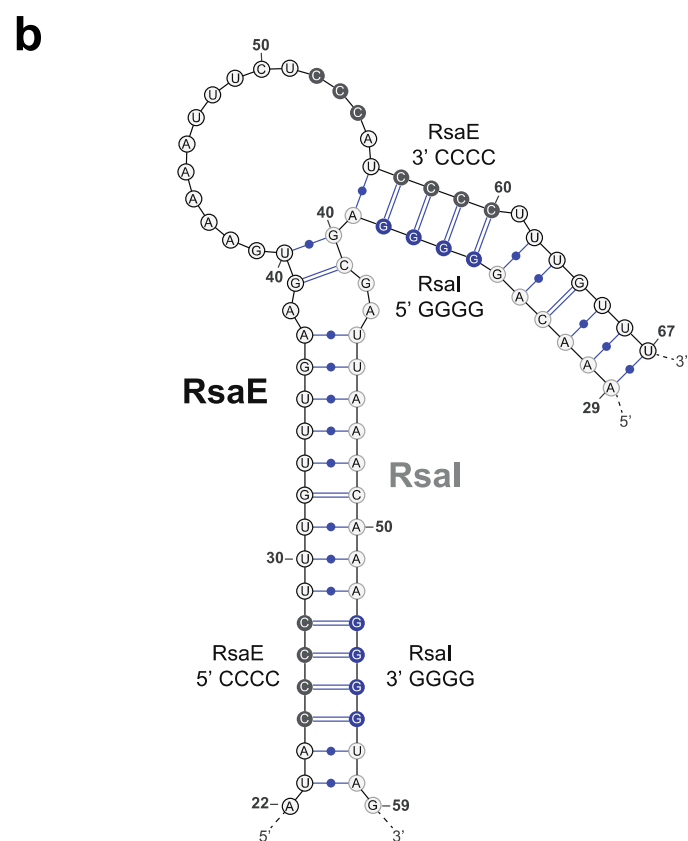
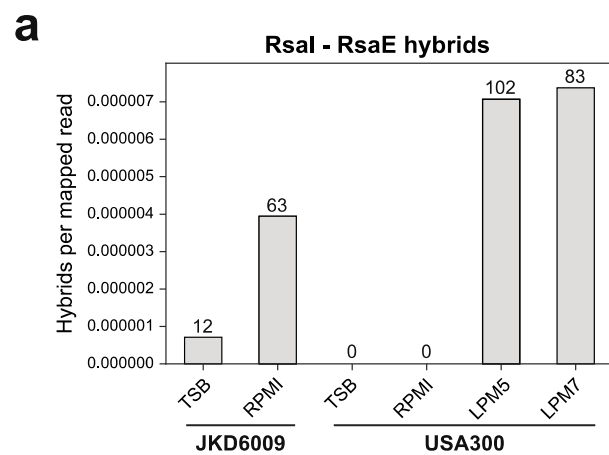
(d) EMSA between radiolabelled RsaA, RNAIII fragment 1 (containing helix 9) and RNAIII fragment 2.

(e) Northern blot analysis of RNAII and RsaA expression in USA300 RNAIII and RsaA knock-out strains, respectively (left) and quantification of the results (right). The bar chart shows average signals and standard deviations generated from Northern blot results obtained from three independent experiments.

(f) Over-expression of RNAIII or RsaA does not impact the expression levels of each other. Examination of RNAIII (top) and RsaA (bottom) expression after RsaA and RNAIII overexpression. Each sRNA was placed under a pTetO promoter¹⁸ and induced through addition of 1 µg/mL of anhydrotetracycline at OD₆₀₀ ~3. Samples were taken after 5 and 10 minutes and the expression of each sRNA was measured using qPCR. Data represents results from three independent biological replicates.

(g) Top line plot: expression of RsaA and RNAIII after shifting to RPMI as measured by qPCR. Data represents results from three independent biological replicates. Bottom line plot: expression of RNAIII after the shift to RPMI in WT and an Δ rsaA mutant.

Images and raw data used to generate figures (d-g) are provided in the Source Data file.



Supplementary Figure 10. RsaE and RsaI interactions are abundantly detected under acid and nutrient stress conditions.

(a) Number of hybrids identified for RsaE-RsaI (left) and RsaA-RNAIII (right) across tested experimental conditions. The number above each bar is the total number of identified interactions for that condition.

(b) The RNADuplex predicted interaction between RsaI and RsaE based on the CLASH data. The figure was generated using VARNA²⁴.

(c) Expression of RsaI and RsaE after shifting the cells to RPMI, LPM medium or back to TSB as measured by RNAseq. Samples were harvested before the shift (0) and 5, 10, 15 and 30 minutes after the shift. The results that are plotted are averages and standard deviations from three independent biological replicates for the LPMs and two independent biological replicates for RPMI and TSB data. The raw data used to generate these plots is provided in the Source Data file.

Supplementary Figure 11: RsaE and RsaI physically interact in vitro using C- and G-rich motifs.

(a) EMSAs using radiolabelled RsaI and increasing amount of RsaE (mutant) transcripts. The location of the mutations in the RsaE mutants is indicated with a blue X in the secondary structures of RsaE on the right side of the EMSA results. The red regions in the secondary structures indicate the RsaE UCCCC motifs. RsaE values represent molar excess.

(b) EMSAs using radiolabelled RsaE and increasing amount of RsaI (mutant) transcripts. The location of the mutations in the RsaI mutants is indicated with a blue X in the secondary structures of RsaI on the right side of the EMSA results. The red regions in the secondary structures indicate the RsaI G-rich motifs. RsaI values represent molar excess.

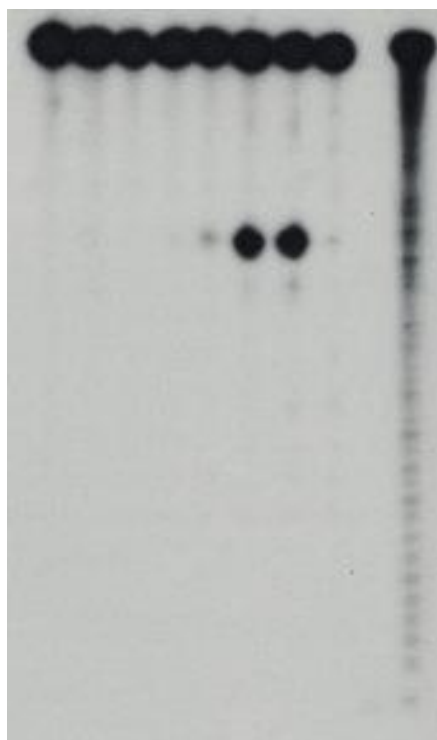
(c) Mutations in RsaI that block base-pairing with RsaE can be restored by compensatory mutations in the 3'-UCCCC motifs of RsaE. Shown are of EMSAs using radiolabelled RsaI mut3 transcript (with both G-rich motifs mutated) and increasing amount of RsaE mut3, which has the C's in the 3'UCCCC motifs mutated to G's. RsaI values represent molar excess.

For all the results the uncropped images are shown.

a

RNase III	-	+	-		+	
RsaE	+	+	+	+	+	+
RsaI	-	-	+	+	+	+
Mg ²⁺	+	+	+	+	+	+
Ca ²⁺	-	-	-	-	-	+
						OH

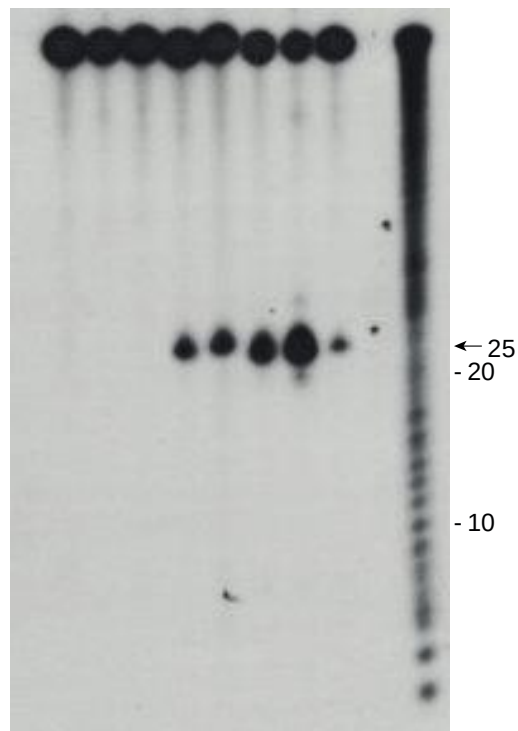
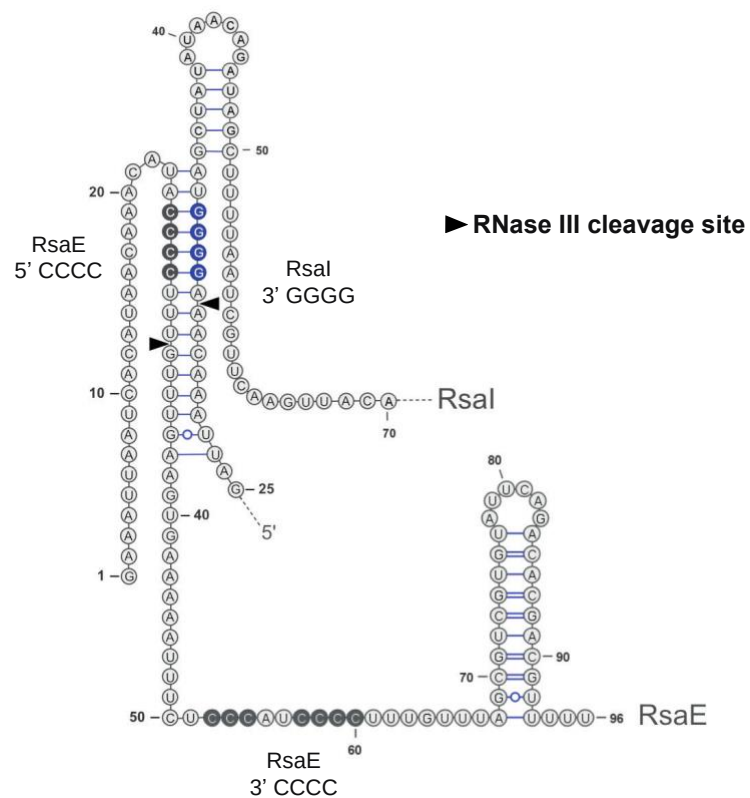
OH

**b**

RNase III	-	+	-		+			
RsaE	-	-	+	+	+	+	+	+
RsaI	+	+	+	+	+	+	+	+
Mg ²⁺	+	+	+	+	+	+	+	-
Ca ²⁺	-	-	-	-	-	-	-	+

OH

OH

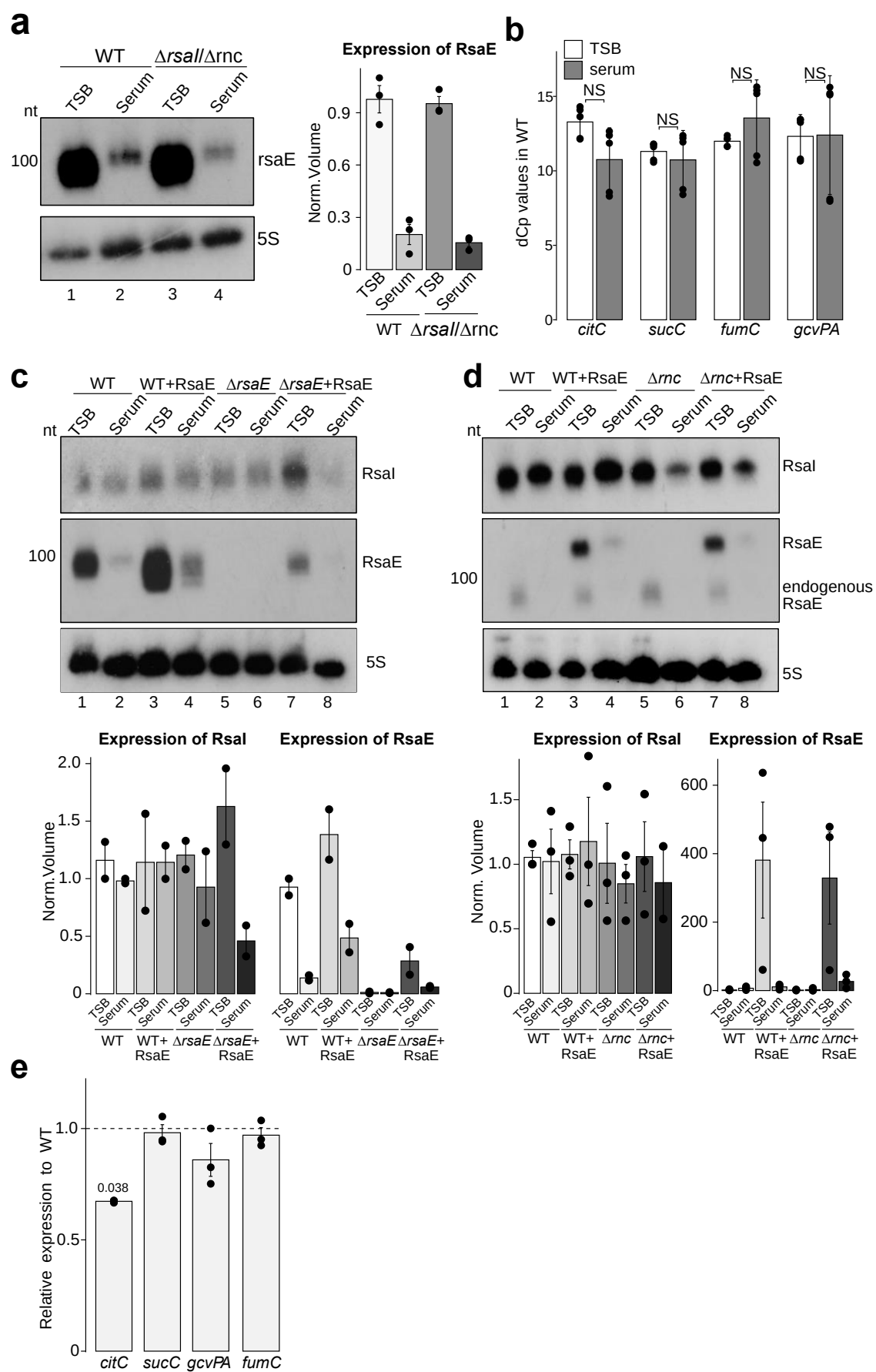
**c**

Supplementary Figure 12: RNase III cleaves the RsaI-RsaE duplex in vitro.

(a) In vitro cleavage assay performed using ^{32}P -RsaE, RsaI and ^{32}P -RsaE-RsaI duplex in the presence or absence of recombinant RNase III. As RNase III does not cleave dsRNA substrates in the presence of Ca^{2+} , this divalent ion was used as a negative control for non-specific cleavage of the RNA-duplex. An uncropped image is shown.

(b) Same as in (a) but now using ^{32}P -labeled RsaI. An uncropped image is shown.

(c) Secondary structure model of the RsaI-RsaE duplex that is cleaved by RNase III in vitro. The triangles indicate the RNase III cleavage sites in the duplex. The RsaE CCCC and RsaI GGGG motifs are also indicated.



Supplementary Figure 13. Complementary analysis of RsaI on RsaE interaction.

(a) Northern blot analysis of USA300 parental (WT) and $\Delta rsaI/\Delta rnc$ double mutant grown in TSB and human serum. Cells were grown as previously described to exponential phase in TSB and then diluted to OD₆₀₀ 0.05 in TSB or human serum and grown for another three hours. Three independent biological replicate experiments were performed, with a representative experiment shown here. The right panel shows the expression of RsaE as measured by ImageQuant software from the autoradiography signal of the Northern blot. The y-axis represents the volume values normalised to the first sample on the blot.

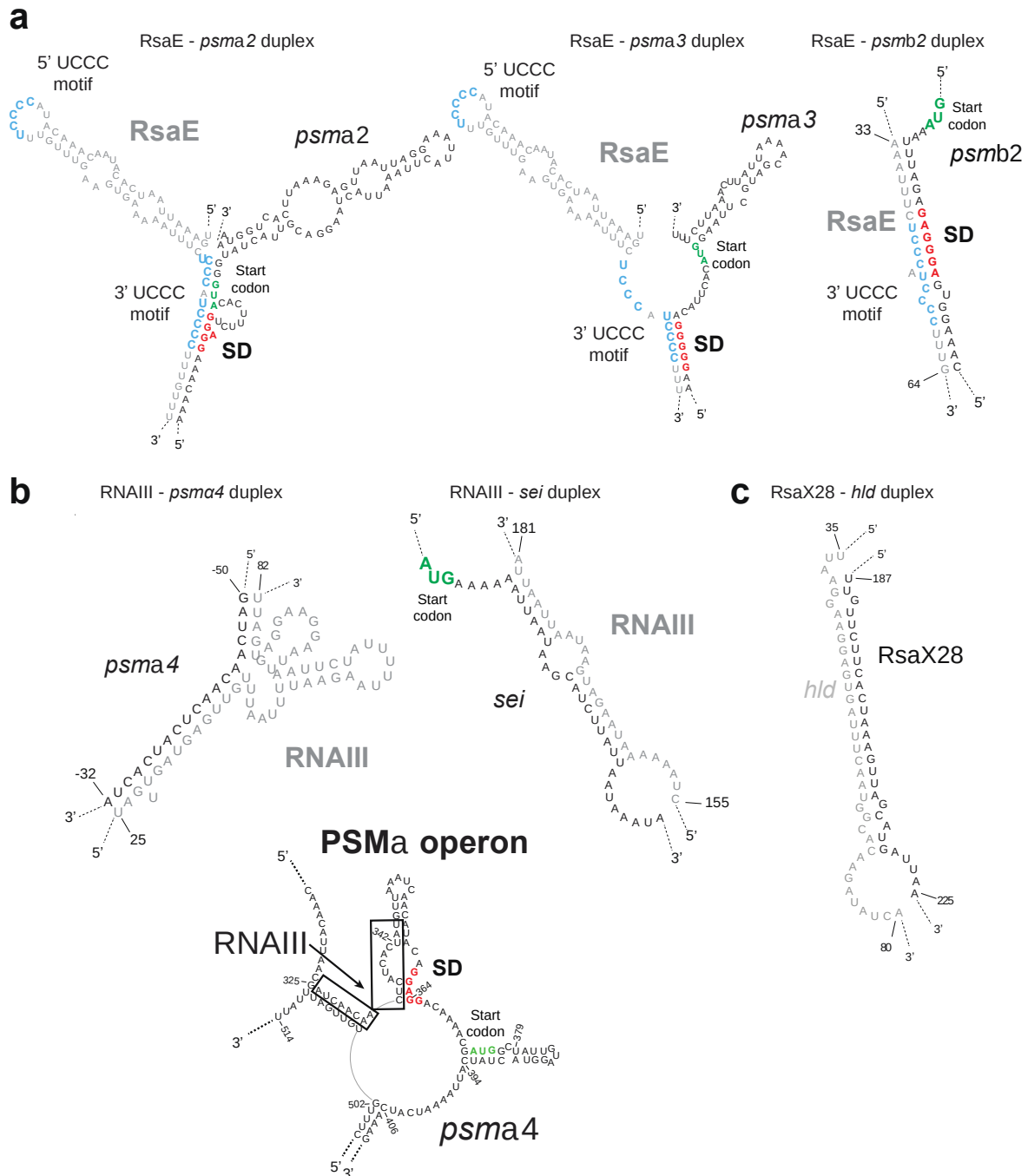
(b) Growth in human serum does not change the expression of metabolic genes targets of RsaE. Shown is the dCp value which represents Cp values normalised by Cp value of 5S used as a reference gene. 'NS' indicates no significant difference between samples (Student's unpaired, two-tailed t-test). For the qPCR analyses RNA from five independent biological replicate experiments was analysed.

(c) Northern blot analysis of USA300 parental (WT), WT with pICS3::RsaE expression under the pAmiA promoter, *rsaE* and *rsaE* with pICS3::RsaE grown in TSB and human serum. Cells were grown as in (a). Two independent replicate experiments were performed, with a representative experiment shown here. Below are shown the expression of RsaI and RsaE overexpression from pICS3 vector as quantified from the above Northern blot.

(d) Northern blot analysis of USA300 parental (WT), WT with pRMC2::RsaE expression under the $P_{xyl/tetO}$ promoter, *rnc* and *rnc* with pRMC2::RsaE grown in TSB and human serum. Cells were grown as in (a) and RsaE expression from the plasmid was induced by addition of anhydrotetracycline (aTc, 1 μ M) to the culture media for 15 minutes. Three independent replicate experiments were performed, with a representative experiment shown here. Below are shown the expression of RsaI and RsaE overexpression from pRMC2 as quantified from the above Northern blot. No significant difference was detected between samples in the quantification of Northern blots (a), (c) and (d).

(e) Expression of RsaE targets in TSB in the WT strain with induced expression of RsaE from pRMC2 as described in (d) relative to the parental USA300 (WT) strain and measured by qPCR. The mean and standard deviation were calculated from three independent experimental replicates (shown as black dots) and three technical replicates. The value in the plot displays a p-value (RsaE over-expression vs WT), obtained using Student's unpaired, two-tailed t-test.

Images and raw data used to generate figures (a-e) are provided in the Source Data file.

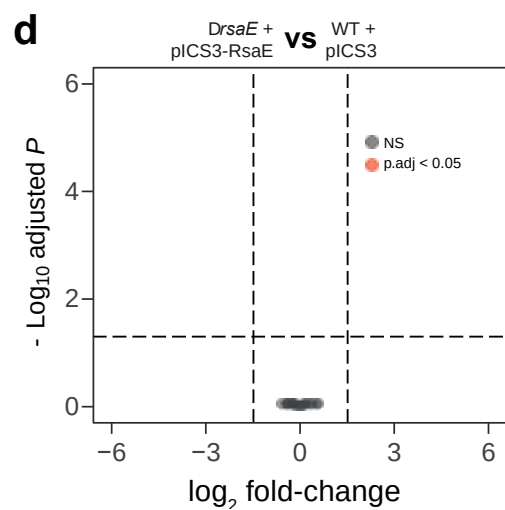
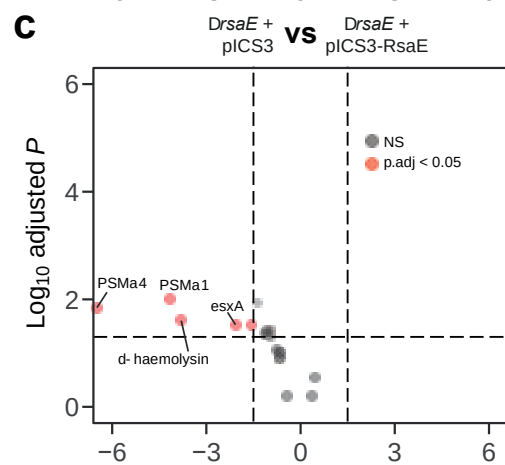
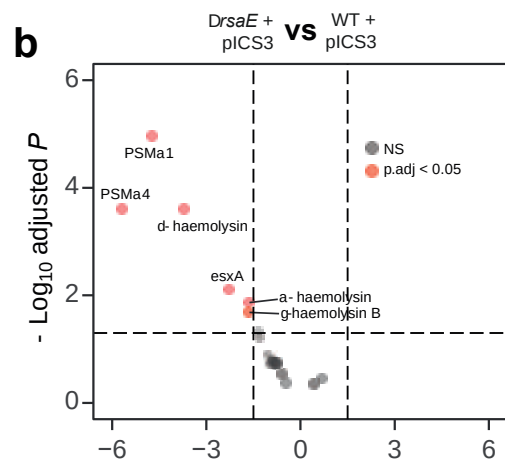
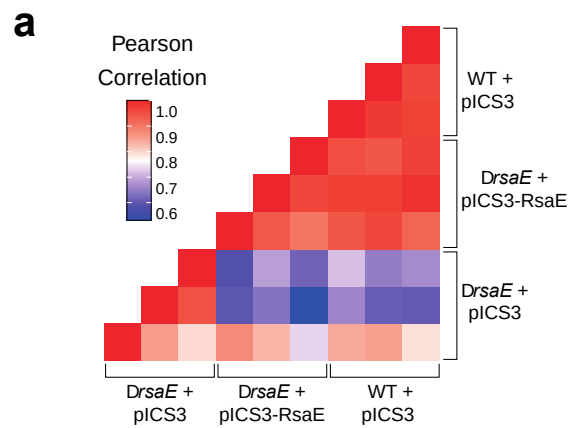


Supplementary Figure 14: The sRNA-toxin interactions identified with RNase III CLASH.

(a) *In silico* predicted interactions between RsaE and α/β PSM transcripts. Chimeras identified in the CLASH data were folded using RNADuplex²³. The UCCC motifs indicate the known seed sequences of RsaE. The red coloured nucleotides in *psm* mRNA transcripts are the Shine-Dalgarno sequences. The translational start codon is highlighted in green.

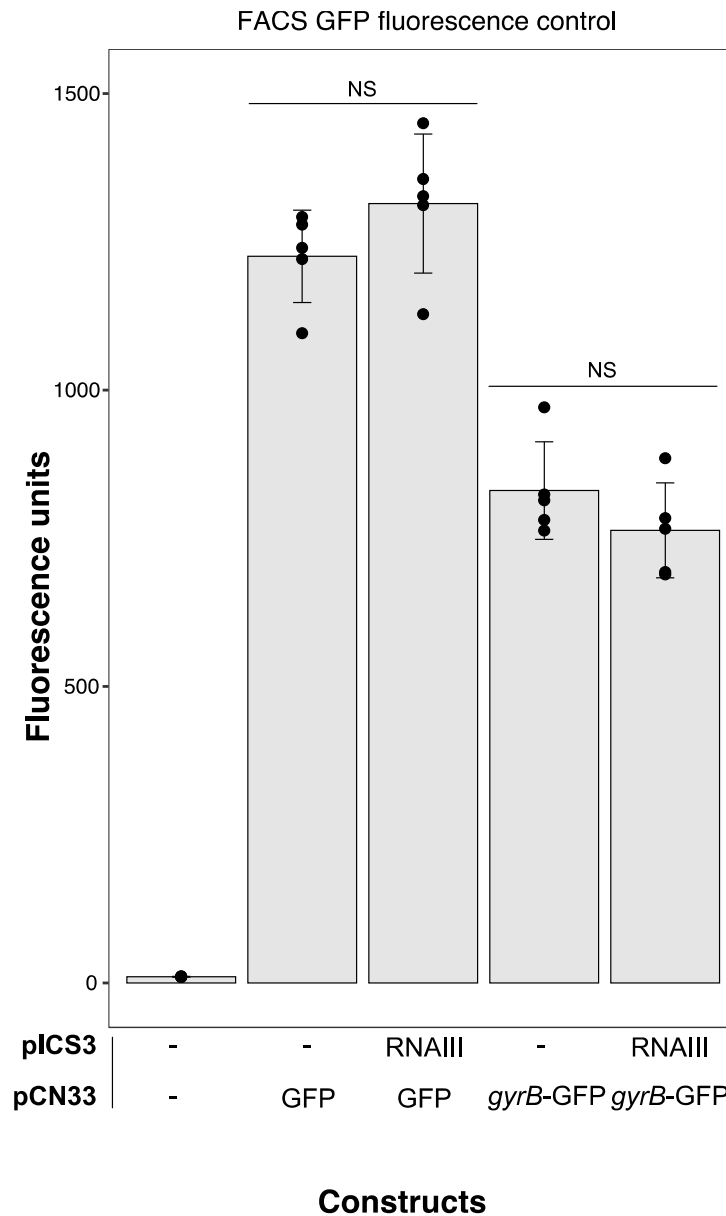
(b) As in (a), but now for RNAIII interactions with toxin mRNAs. The bottom structure shows where RNAIII base-pairs in the PSM α operon.

(c) Interaction between RsaX28 and the haemolysin δ mRNA based predicted by the CLASH data.

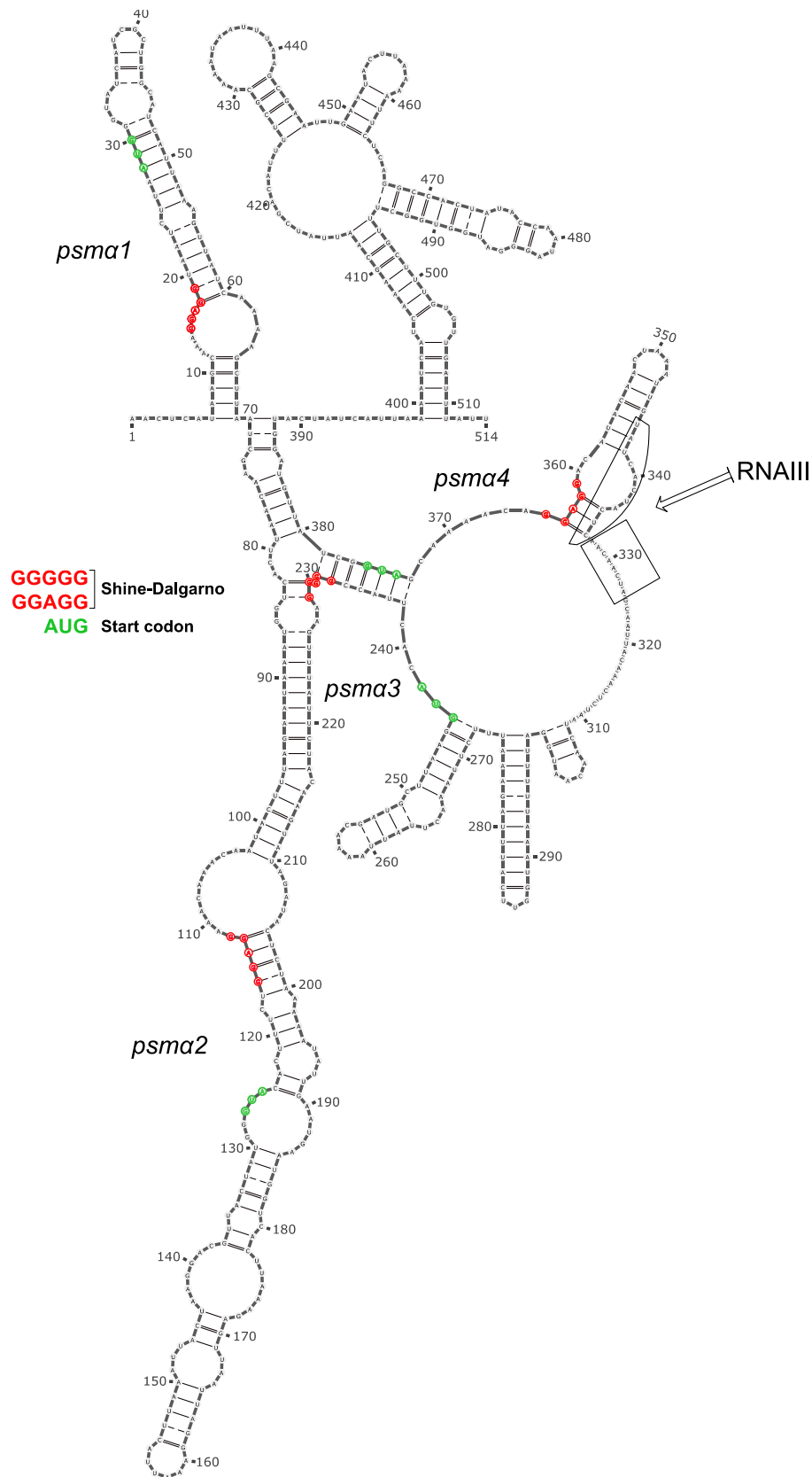


Supplementary Figure 15. Mass spectroscopy of culture supernatants from WT, Δ rsaE and Δ rsaE complemented with pICS3-RsaE.

- (a) Pearson correlation coefficients between experiments and biological replicates. Note the strong correlation between individual replicates of one experiment, indicating reproducibility. When RsaE is deleted, the correlation with WT decreases substantially. This effect is reversed when RsaE expression is restored with a plasmid.
- (b) Protein levels of indicated toxins in the Δ rsaE strain versus the WT. Note the decreased levels of PSM α 1 and PSM α 4 upon RsaE deletion.
- (c) As in (b). but for Δ rsaE versus Δ rsaE pICS3:RsaE. Note how PSM α 1 and PSM α 4 levels are largely restored.
- (d) As in (b). but for Δ rsaE pICS3:RsaE versus the WT. Note that there are no significant changes in protein expression, indicating that RsaE expression is effectively restored by the plasmid. The p-values were generated by empirical Bayes moderated t-test in limma and adjusted by Benjamini-Hochberg method. Only proteins with a log-fold change > 1.5 and log₁₀ adjusted p-values of 1.3 or higher (indicated with dashed lines) were considered.



Supplementary Figure 16. Control for FACS analysis. GFP fluorescence is unaffected by RNAIII expression and RNAIII control of *esxA*-GFP is specific, as RNAIII has no effect on an unrelated mRNA-GFP fusion, *gyrB*-GFP. Significant differences between the samples were calculated using a student's two-tailed, unpaired t-test. 'NS' indicates no significant difference (p -value > 0.05). The raw data and representative FACS images are provided in the Source Data File (Figure 7d).



Supplementary Figure 17. Predicted secondary structure of the *psmA* operon transcript. This structure was generated using RNAfold²³. The red nucleotides indicate Shine-Dalgarno (SD) sequences, whereas the green nucleotides indicate translation start codons.

References

1. Kudla, G., Granneman, S., Hahn, D., Beggs, J. D. & Tollervey, D. Cross-linking, ligation, and sequencing of hybrids reveals RNA-RNA interactions in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 10010–10015 (2011).
2. Helwak, A., Kudla, G., Dudnakova, T. & Tollervey, D. Mapping the human miRNA interactome by CLASH reveals frequent noncanonical binding. *Cell* **153**, 654–665 (2013).
3. Waters, S. A. *et al.* Small RNA interactome of pathogenic *E. coli* revealed through crosslinking of RNase E. *EMBO J.* **36**, 374–387 (2017).
4. Iosub, I. A. *et al.* Hfq CLASH uncovers sRNA-target interaction networks linked to nutrient availability adaptation. *eLife* **9**, 1–33 (2020).
5. Romilly, C. *et al.* A Non-Coding RNA Promotes Bacterial Persistence and Decreases Virulence by Regulating a Regulator in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog.* **10**, e1003979 (2014).
6. Tomasini, A. *et al.* The RNA targetome of *Staphylococcus aureus* non-coding RNA RsaA: Impact on cell surface properties and defense mechanisms. *Nucleic Acids Res.* **45**, 6746–6760 (2017).
7. Geissmann, T. *et al.* A search for small noncoding RNAs in *Staphylococcus aureus* reveals a conserved sequence motif for regulation. *Nucleic Acids Res.* **37**, 7239–7257 (2009).
8. Rochat, T. *et al.* The conserved regulatory RNA RsaE down-regulates the arginine degradation pathway in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res.* **46**, 8803–8816 (2018).
9. Bohn, C. *et al.* Experimental discovery of small RNAs in *Staphylococcus aureus* reveals a riboregulator of central metabolism. *Nucleic Acids Res.* **38**, 6620–6636 (2010).
10. Eyraud, A., Tattevin, P., Chabelskaya, S. & Felden, B. A small RNA controls a protein regulator involved in antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res.* **42**, 4892–4905 (2014).

11. Sayed, N., Jousselin, A. & Felden, B. A cis-antisense RNA acts in trans in *Staphylococcus aureus* to control translation of a human cytolytic peptide. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 105–113 (2012).
12. Geiger, T., Goerke, C., Mainiero, M., Kraus, D. & Wolz, C. The virulence regulator *sae* of *Staphylococcus aureus*: Promoter activities and response to phagocytosis-related signals. *J. Bacteriol.* **190**, 3419–3428 (2008).
13. Liu, Q., Yeo, W. S. & Bae, T. The *SaeRS* two-component system of *Staphylococcus aureus*. *Genes* vol. 7 (2016).
14. Queck, S. Y. *et al.* RNAIII-Independent Target Gene Control by the *agr* Quorum-Sensing System: Insight into the Evolution of Virulence Regulation in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Cell* **32**, 150–158 (2008).
15. Norvick, R. P. & Jiang, D. The staphylococcal *saeRS* system coordinates environmental signals *agr* quorum sensing. *Microbiology* **149**, 2709–2717 (2003).
16. Lloyd, C. R., Park, S., Fei, J. & Vanderpool, C. K. The Small Protein *SgrT* Controls Transport Activity of the Glucose-Specific Phosphotransferase System. *J. Bacteriol.* **199**, e00869-16 (2017).
17. Bischoff, M. *et al.* Microarray-based analysis of the *Staphylococcus aureus* σ B regulon. *J. Bacteriol.* **186**, 4085–4099 (2004).
18. Corrigan, R. M. & Foster, T. J. An improved tetracycline-inducible expression vector for *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* **61**, 126–129 (2009).
19. Mäder, U. *et al.* *Staphylococcus aureus* Transcriptome Architecture: From Laboratory to Infection-Mimicking Conditions. *PLoS Genet.* **12**, e1005962 (2016).
20. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 550 (2014).
21. Malachowa, N. *et al.* Global changes in *staphylococcus aureus* gene expression in human blood. *PLoS ONE* **6**, e18617 (2011).
22. Liu, W. *et al.* Assessment of bona fide sRNAs in *Staphylococcus aureus*. *Front. Microbiol.* **9**, 228 (2018).

23. Lorenz, R. *et al.* ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms Mol. Biol.* **6**, 26 (2011).
24. Darty, K., Denise, A. & Ponty, Y. VARNA: Interactive drawing and editing of the RNA secondary structure. *Bioinformatics* **25**, 1974–1975 (2009).

Chapitre 3 : Dynamique des interactions liant RsaE, RsaI et RsaA dans la régulation de la formation de biofilm

Lors du **chapitre 1**, il a été montré que RsaE se lie à l'ARNm *icaR* au niveau de la séquence SD, entraînant l'inhibition de sa traduction et le clivage par la RNase III. Concernant RsaI, les études menées par Bronesky *et al.* (2019) ont démontré que le sARN se lie à la région 3'UTR d'*icaR* et active la production de PIA/PNAG par un mécanisme inconnu. Au sein du **chapitre 2**, les résultats présentés montrent que RsaI et RsaE forment un duplexe qui est la cible de la RNase III, impactant les réseaux de régulations dépendant de ces deux sARN. Enfin, le MAPS de RsaA, qui réprime le répresseur des biofilm MgrA, a révélé qu'*icaR* serait un partenaire potentiel de ce sARN mais cette interaction n'a pas été validée (Tomasini *et al.*, 2017). Ce chapitre se focalise sur les mécanismes de régulation qui relieraient les trois sARN RsaE, RsaA et RsaI, et leur impact sur la formation de biofilm.

Résultats

I. Les partenaires ARN potentiels de l'ARNm *icaR* révélés par la méthode du MAPS

La méthode du MAPS a été utilisée pour révéler les partenaires ARN de l'ARNm d'*icaR* (**tableau 8**). Cette expérience a été réalisée lors d'une culture en BHI, avec l'ARNm entier (**tableau 8A**) ou seulement avec l'extrémité 3'UTR d'*icaR* (**tableau 8B-C**). Parmi les ARN identifiés, on retrouve trois ARN régulateurs qui se lieraient à l'ARNm *icaR* : RsaI, la version longue de RsaA, et RsaE. Concernant la partie 3', on retrouve RsaI dans les deux réplicats, et RsaA dans un seul réplicat. L'implication de RsaE dans la régulation de l'expression de l'ARNm d'*icaR* a été étudiée lors du **chapitre 1**. Cette partie s'orientera sur la caractérisation de l'interaction 3' UTR/RsaA et les dynamiques de la régulation d'*icaR* liant les trois sARN.

Tableau 8 : Partenaires ARN potentiels de l'ARNm *icaR* identifiés par la méthode du MAPS

Les résultats sont exprimés en FoldChange des échantillons MS2-*icaR* par rapport aux contrôles MS2. Les détails de l'analyse bio-informatique associée à cette expérience sont amplement décrits dans le Jove (Mercier et al., 2021). Les sARNs dont ce manuscrit fait l'objet sont surlignés : *RsaI*, *RsaA* et *RsaE*. **A)** Résultats obtenus en utilisant l'ARNm *icaR* entier comme appât. **B,C)** Résultats obtenus en utilisant seulement l'extrémité 3' d'*icaR* en appât, en deux répliques distincts. Les cibles de *RsaI* sont indiquées en **VERT**.

A

ID	gène	Produit	foldChange_MS 2.icaR/MS2	log10FoldCh ange	pval
HG001_02704	<i>icaR</i>	IcaR	1349,171	3,130	6,07E-05
HG001_03170	-	3' <i>icaR</i>	110,967	2,045	3,52E-03
HG001_03203	<i>hly</i>	Hemolysine alpha	83,014	1,919	1,98E-02
HG001_02882	<i>RsaA</i>	<i>RsaA</i> 3' long	74,592	1,873	9,50E-03
HG001_03243;HG001_00847; HG001_00848	<i>RsaE</i>	<i>RsaE</i>	51,775	1,714	1,33E-02
HG001_01049	<i>pyrR</i>	Bifunctional protein PyrR	45,116	1,654	5,69E-02
HG001_03229	-	srn_4940_sRNA396	32,484	1,512	6,89E-02
HG001_02347;HG001_03272	<i>RsaI</i>	<i>RsaI</i>	28,080	1,448	2,92E-02
HG001_00259	<i>nanA</i>	N-acetylneuraminate lyase	26,168	1,418	7,88E-02
HG001_02393	<i>tcaR_1</i>	HTH-type transcriptional regulator TcaR	25,265	1,403	2,62E-01
HG001_01009	<i>hly</i>	Alpha-hemolysin precursor	23,214	1,366	4,05E-02
HG001_00990	<i>zapA</i>	Cell division protein ZapA	22,859	1,359	1,19E-01

B

ID	gène	Produit	foldChange_MS 2-3icaR/MS2	log10FoldChang e	pval
HG001_03170	-	3' <i>icaR</i>	2869,08	3,458	2,82E-30
HG001_02552	-	ABC-2 family transporter protein	10,55	1,023	0,0131
HG001_00157	<i>ugpC</i>	sn-glycerol-3-phosphate import ATP-binding protein UgpC	9,07	0,958	0,0435
HG001_03234;HG001_00303	<i>RsaOB</i>	<i>RsaOB</i> , T-box riboswitch	8,25	0,916	0,0071
HG001_01973	<i>hly_1</i>	Phospholipase C precursor	6,78	0,831	0,0052
HG001_01192	-	hypothetical protein	6,65	0,823	0,0003
HG001_00875	<i>comK</i>	Competence transcription factor	6,2	0,792	0,0008
HG001_02551	<i>yxjF_5</i>	putative ABC transporter ATP-binding protein YxjF	6,18	0,791	0,0201
HG001_02347;HG001_03272	<i>RsaI</i>	<i>RsaI</i>	5,43	0,735	0,0005
HG001_02497	-	Plasmid encoded toxin Tx	4,55	0,658	0,0032
HG001_02756	<i>RsaG</i>	<i>RsaG</i>	4,53	0,656	0,0047
HG001_02097	<i>mazE</i>	Antitoxin MazE	4,34	0,637	0,0047

C

ID	gène	Produit	foldChange_MS 2-3icaR/MS2	log10FoldChange	pval
HG001_03170	-	3' <i>icaR</i>	915,7	2,96	1,8E-05
HG001_01192	-	hypothetical protein	62,6	1,8	0,0035
HG001_01301	-	PepSY-associated TM helix	42,8	1,63	0,0084
HG001_00890	-	TM2 domain protein	33,2	1,52	0,0443
HG001_02347;HG001_03272	<i>RsaI</i>	<i>RsaI</i>	29,1	1,46	0,0102
HG001_02517	-	hypothetical protein	28,2	1,45	0,0186
HG001_00552	<i>dehH1</i>	Haloacetate dehalogenase H-1	26,5	1,42	0,0143
HG001_00555	<i>pip</i>	Proline iminopeptidase	23,5	1,37	0,0149
HG001_02424	<i>narT</i>	putative nitrate transporter NarT	22,2	1,35	0,0247
HG001_02497	-	Plasmid encoded toxin Tx	21,4	1,33	0,0272
HG001_02882	<i>RsaA</i>	<i>RsaA</i> 3' long	20,1	1,3	0,0368
HG001_00551	<i>hdl IVa</i>	(S)-2-haloacid dehalogenase 4A	19,8	1,3	0,0269
HG001_00557	-	hypothetical protein	18,1	1,26	0,0420

II. Caractérisation de l'interaction RsaA/*icaR*

a) La version longue de RsaA interagit avec l'ARNm *icaR*

Selon les prédictions *in silico* (**figure 39**), le site potentiel d'interaction de RsaA sur l'ARNm *icaR* se localise au niveau de la séquence anti-SD de l'extrémité 3'UTR. Des expériences de retard sur gel ont été réalisées et confirment l'interaction de RsaA avec la région 3' d'*icaR* (**figure 40**). Il faut noter que seule la version longue de RsaA interagirait avec *icaR* et que plus de 400 nM de RsaA sont requis pour que 50 % des molécules forment un complexe avec *icaR*.

Afin d'identifier la RNase responsable du clivage de la version longue de RsaA, des expériences de rifampicine ont été effectuées (**figure 41**). Cette méthode repose sur l'arrêt de la transcription d'ARN *de novo* par la visualisation de la quantité de l'ARN cible après ajout de l'antibiotique. Par conséquent, en l'absence de l'acteur responsable du clivage ou de la dégradation de l'ARN cible, on s'attend à observer une stabilisation de l'ARN lors de sa révélation par Northern Blot. Cette expérience a été effectuée au sein de la souche HG001 WT et mutante Δrny délétée du gène codant pour la RNase Y (Marincola *et al*, 2011). Les résultats montrent que l'absence de la RNase Y permet de stabiliser la forme longue de RsaA après ajout de l'antibiotique. Néanmoins, l'absence de cette endonucléase n'abolit pas la présence de la version courte du sARN.

b) Le duplexe 3'-*icaR*/RsaA est clivé par la RNase III

Comme il a été montré par l'équipe de Ruiz de los Mozos (2013), le duplexe 5'/3' d'*icaR* est clivé par la RNase III (cf **chapitre 1**). Etant donné que RsaI et RsaA se lierait à la région 3'UTR de l'ARNm *icaR*, l'hypothèse est que la formation de ces duplexes induisent un clivage par la RNase III. C'est pourquoi des expériences de clivage à la RNase III ont été réalisées avec le fragment 3' d'*icaR* radiomarké en présence du fragment 5' *icaR*, de RsaI ou de RsaA (**figure 42**). De façon surprenante, et bien qu'un site de clivage ait été déterminé sur la région 5' lorsque le duplexe 5'*icaR*/3'*icaR* est formé, aucun site spécifique n'est détecté sur la partie 3'. La région 3' semble clivée en présence de RsaI mais elle est située trop haute sur le gel pour être localisée précisément grâce aux échelles alcaline et T1. Concernant RsaA, un site de clivage est présent au niveau de la région d'interaction prédite *in silico*.

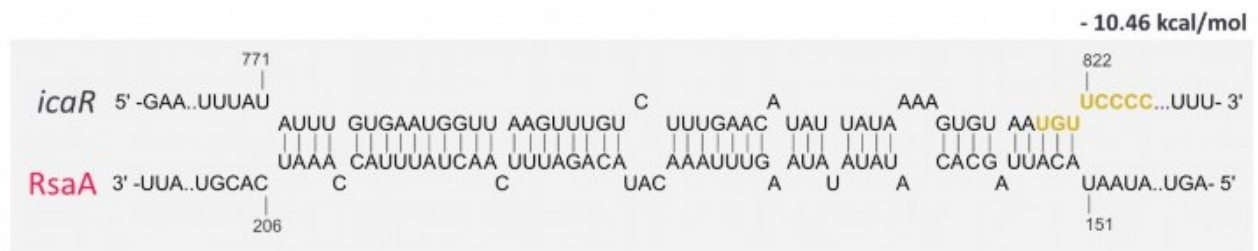


Figure 39 : Régions d'interactions entre l'ARNm *icaR* et RsaA

Les prédictions sont réalisées en utilisant le logiciel IntaRNA, la séquence anti-SD de l'ARNm *icaR* est indiquée en **ORANGE**.

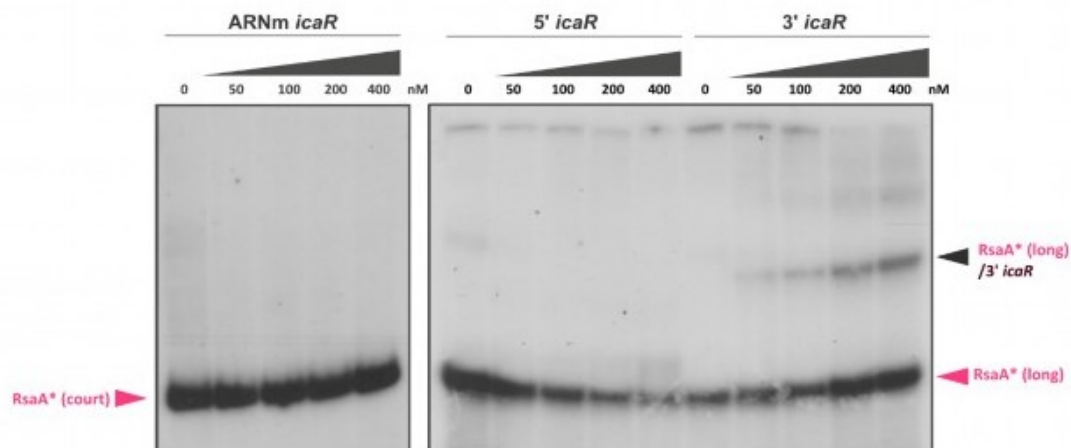


Figure 40 : RsaA interagit avec l'ARNm *icaR* au niveau de l'extrémité 3' du messager

Les expériences de retard sur gel sont réalisées avec le sARN **RsaA** (court ou long) radiomarqué (*) qui est incubé avec des concentrations croissantes de l'ARNm *icaR* ou de ses extrémités 3' et 5'. La quantité des ARNs sont indiquées au dessus des radiographies des gels.

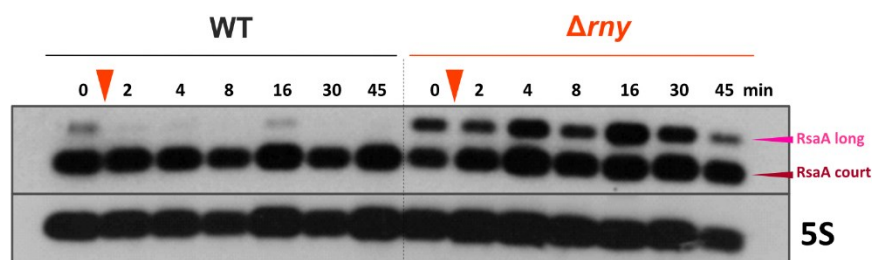


Figure 41 : La RNase Y est impliquée dans la production du version courte de RsaA

La souche sauvage (WT) et délétée du gène de la RNase Y (**Δrny**) sont cultivées dans du TSB à 37 °C sous agitation. Après 6 H d'incubation, la fraction (0) est collectée. La rifampicine (300 µg/ml) est ajoutée à la culture sous agitation, indiqué par une **▶**. Par la suite, des échantillons sont prélevés 2, 4, 8, 16, 30 et 45 min après ajout de l'antibiotique. Les ARN sont extraits puis visualisés par Northern Blot. Une sonde spécifique à la version courte de RsaA permet d'observer les deux formes du sARN. L'observation de l'ARN 5S est utilisé comme témoin de charge.

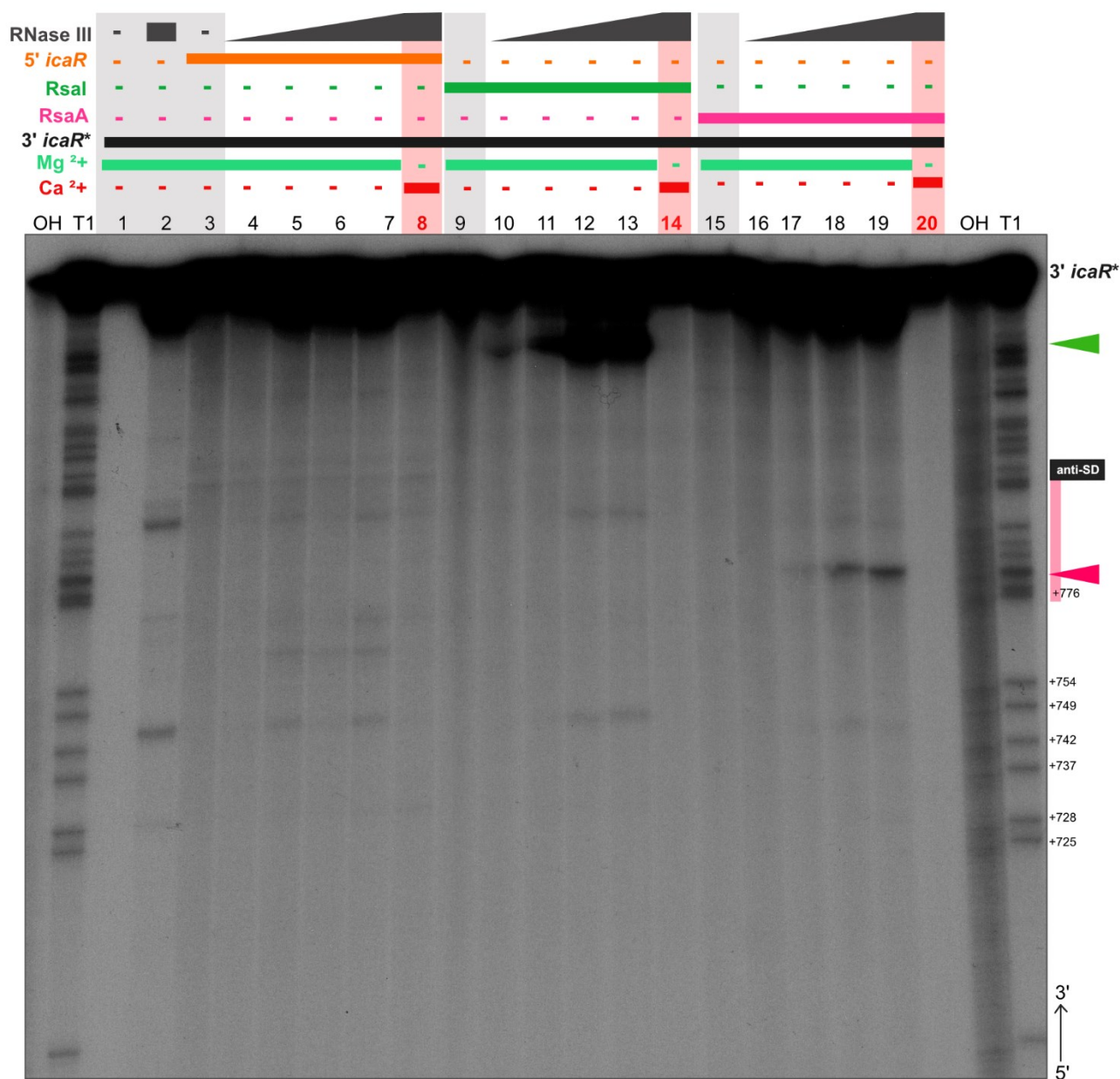


Figure 42 : Le duplexe *RsaA/3'icaR* est clivé par la RNase III

Les expériences *in vitro* de clivage par la RNase III sont effectuées en incubant le fragment 3' d'*icaR* radiomarké (*) avec des concentrations croissantes de la RNase III de *S. aureus* purifiée, en présence de la région 5'*icar*, de *RsaI* ou de *RsaA*. Le magnésium est essentiel à l'activité de la RNase III. A l'inverse, le calcium inhibe l'activité de cette RNase. L'échelle alcaline (OH) coupe entre chaque nucléotide et l'échelle T1 après chaque G. Elles permettent d'identifier et de localiser les séquences nucléotidiques impliquées. Les sites de clivages issus sont représentés par des . Le site de liaison potentiel de *RsaA* sur le 3'*icaR* est indiqué par un .

III. Etude de la liaison conjointe des sARN sur l'ARNm *icaR*

a) Caractérisation *in vitro* des interactions

D'après les prédictions *in silico*, RsaI, RsaA et RsaE ne possèdent pas le même site de fixation sur *icaR*. Afin de vérifier l'influence de la fixation d'un sARN sur la liaison des autres sARN sur l'ARNm *icaR*, des expériences de compétition par la méthode de retard sur gel ont été réalisées. La première étape reposait sur l'étude de l'influence de la formation du duplexe RsaI/RsaE sur leur fixation à l'ARNm *icaR* (**figure 43**). Dans cet objectif, RsaI radiomarké a été incubé avec RsaE et des concentrations croissantes de l'extrémité 3' d'*icaR* (**figure 43A**) et inversement (**figure 43B**). Les résultats montrent que dans les deux cas le complexe ternaire RsaI/RsaE/3'*icaR* se forme. Il n'y a donc pas de compétition entre RsaI et le fragment 3' d'*icaR* quant à la fixation sur le sARN RsaE. La formation du duplexe RsaI/RsaE n'empêche donc pas RsaI d'interagir avec *icaR*, en revanche l'addition de RsaI ne déplace pas RsaE du SD de *icaR* (voir **Chapitre 1**). Les expériences de compétition ont également été réalisées avec RsaE radiomarké incubé avec l'ARNm *icaR* en entier (1026 nucléotides), en présence de concentrations croissantes de RsaA ou RsaI (**figure 44**). Les résultats montrent que la présence de RsaA (**figure 44A**) ou RsaI (**figure 44B**) n'empêchent pas la liaison de RsaE sur l'ARNm *icaR*. La résolution de l'expérience ne permet probablement pas de distinguer l'apparition d'un complexe ternaire, on ne peut donc pas exclure que les complexes *icaR*/RsaI/RsaE et *icaR*/RsaA/RsaE soient également formés. Ainsi l'interaction de RsaI et RsaA avec la région 3' de l'ARNm n'entraverait pas la régulation de RsaE sur la traduction d'*icaR*.

b) La régulation de l'opéron *icaADBC* dépend d'une dynamique entre les trois sARN RsaI, RsaA et RsaE

Afin de caractériser l'influence et les répercussions des trois sARN sur la régulation de l'ARNm *icaR*, les souches mutantes simples $\Delta rsaI$, $\Delta rsaA$ et $\Delta rsaE$; doubles $\Delta rsaI\Delta rsaA$, $\Delta rsaI\Delta rsaE$, $\Delta rsaA\Delta rsaE$; et le triple mutant $\Delta rsaI\Delta rsaA\Delta rsaE$ ont été construits. Le plasmide pCN52-PicaA-GFP (Valle *et al.*, 2019) a été utilisé comme système rapporteur afin d'analyser l'expression de l'opéron *icaADBC*, au sein de toutes ces souches. Concernant les mutants simples (**figure 45**), l'opéron *icaADBC* est activé seulement dans les souches complémentées

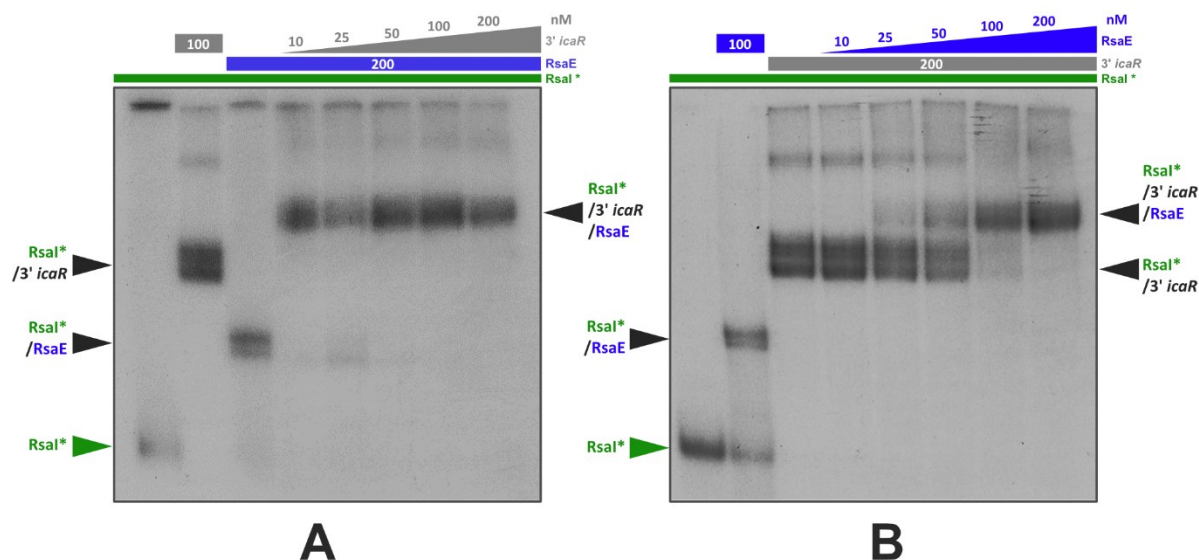


Figure 43 : L'interaction RsaI/RsaE n'empêche pas la liaison de RsaI au 3'icaR

Les expériences de retard sur gel sont réalisées avec le sARN **RsaI** radiomarké (*) qui est incubé **A)** avec des concentrations croissantes de l'extrémité 3' de l'ARNm *icaR* et une concentration constante du sARN **RsaE** ou **B)** avec des concentrations croissantes du sARN **RsaE** et une concentration constante du fragment 3' *icaR*.

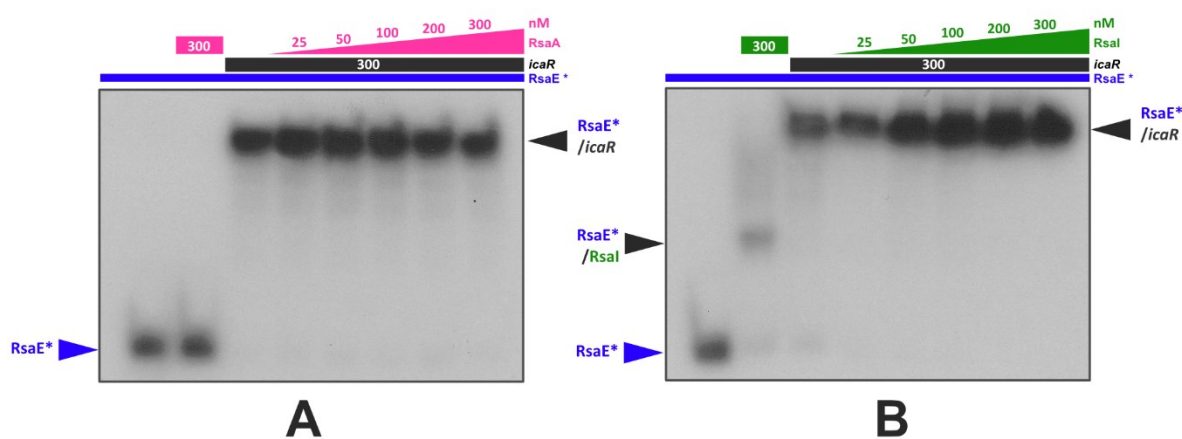


Figure 44 : La présence de RsaA ou RsaI n'empêche pas la liaison de RsaE à l'ARNm icaR

Les expériences de retard sur gel sont réalisées avec le sARN **RsaE** radiomarké (*) qui est incubé **A)** avec des concentrations croissantes de la version longue du sARN **RsaA** et une concentration constante de l'ARNm *icaR* ou **B)** avec des concentrations croissantes du sARN **RsaI** et une concentration constante de l'ARNm *icaR*.

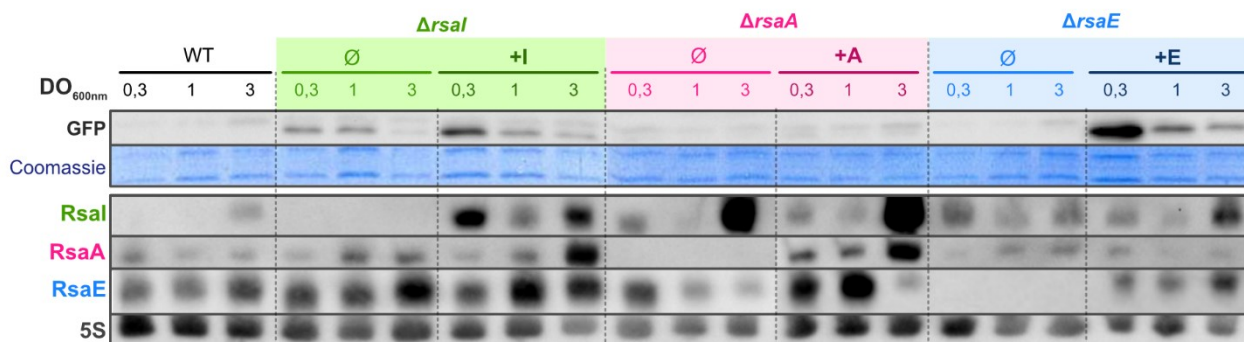


Figure 45 : RsaI et RsaE activent l'expression de l'opéron *icaADBC*

La souche sauvage (WT), délétée de RsaI (*Δrsal*), RsaA (*ΔrsaA*) et RsaE (*ΔrsaE*), et les souches complémentées respectives (*Δrsal+rsal*, *ΔrsaA+rsaA*, *ΔrsaE + rsaE*) contenant les plasmides pCN52-*PicaA*-GFP et pCN38 ou pCN38-*RsaI/RsaA/RsaE* sont cultivées à 37°C dans du TSB supplémenté d'érythromycine et de chloramphénicol. Des échantillons de la culture sont récoltés aux DO_{600nm} suivantes : 0,3, 1 et 3. Les protéines et les ARN sont extraits. Une expérience de Western Blot est réalisée sur la fraction protéique afin d'analyser l'expression de la GFP. La membrane est colorée au bleu de coomassie afin de vérifier la quantité de protéines chargées. Une expérience de Northern Blot est effectuée sur la fraction ARN pour visualiser chacun des trois sARN. La révélation de l'ARN 5S est utilisé comme témoin de charge.

Δrsal+rsal et *ΔrsaE+rsaE*, mais également plus faiblement en l'absence de RsaI (*Δrsal*)

L'analyse de l'expression de l'opéron *ica* dans les doubles mutants (**figure 46**) révèle qu'en absence de RsaA/RsaI et RsaA/RsaE, l'expression de l'opéron est activée probablement respectivement par RsaE et RsaI. Enfin, l'analyse du triple mutant (**figure 47**) dévoile que l'absence des trois sARN n'active pas l'expression de l'opéron *ica* et que seuls les mutants complémentés de RsaI et particulièrement de RsaE induisent l'opéron. Ces résultats sont à interpréter avec précaution, car les profils des sARN ne sont pas toujours ceux attendus aussi bien dans le WT que dans certaines souches mutantes ou complémentées : RsaA et RsaI s'accumulent en fin de phase exponentielle (Romilly *et al*, 2014, Bronesky *et al*, 2019), alors que RsaE s'exprime principalement en phase exponentielle (Geissmann *et al*, 2009). Cependant nous pouvons observer que l'activation de l'opéron *ica* dépend de la densité bactérienne de la culture et non de la quantité d'ARN constatée au niveau des Northern Blots. En effet, la régulation positive des sARN sur *icaADBC* est maximale à une DO_{600nm} de 0.3. En conclusion, RsaI et RsaE activent indirectement l'expression de l'opéron *icaADBC* en levant l'inhibition exercée sur cet opéron par IcaR, lorsque la concentration cellulaire est faible, en début de phase exponentielle de croissance. RsaA n'agirait pas sur la modulation de l'expression de cet opéron. Considérant l'effet « éponge » de RsaI sur RsaE décrits au **chapitre 2**, il est tentant de suggérer qu'*in vivo* en absence de RsaI (**figure 45**), RsaE favoriserait l'activation de l'opéron en inhibant *icaR*. Dans ce cas, cet effet ne serait pas lié à l'interaction RsaI/*icaR*.

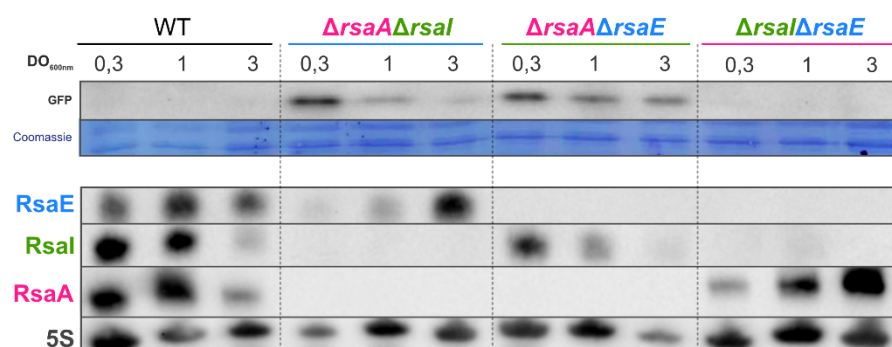


Figure 46 : L'effet activateur de RsaI et RsaE sur l'opéron *icaADBC* dépend de l'absence de certains sARN
La souche sauvage (WT), délétée de RsaA et RsaI ($\Delta\text{rsaA}\Delta\text{rsaI}$), RsaA et RsaE ($\Delta\text{rsaA}\Delta\text{rsaE}$), RsaI et RsaE ($\Delta\text{rsaI}\Delta\text{rsaE}$) contenant les plasmides pCN52-PicaA-GFP et pCN38 sont cultivées à 37°C dans du TSB supplémenté d'érythromycine et de chloramphénicol. Des échantillons de la culture sont récoltés aux $\text{DO}_{600\text{nm}}$ suivantes : 0.3, 1 et 3. Les protéines et les ARN sont extraits. Une expérience de Western Blot est réalisée sur la fraction protéique afin d'analyser l'expression de la GFP. La membrane est colorée au bleu de coomassie afin de vérifier la quantité de protéines chargées. Une expérience de Northern Blot est effectuée sur la fraction ARN pour visualiser chacun des trois sARN. La révélation de l'ARN 5S est utilisé comme témoin de charge.

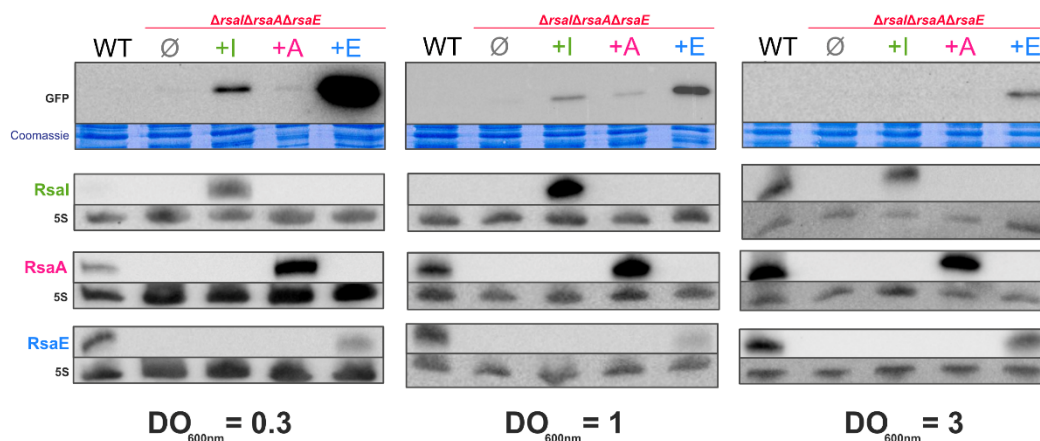


Figure 47 : RsaI et RsaE activent l'expression de l'opéron *icaADBC*

La souche sauvage (WT) et le triple mutant délété de RsaI, RsaA et RsaE ($\Delta\text{rsaI}\Delta\text{rsaA}\Delta\text{rsaE}$) et les souches complémentées respectives ($\Delta\text{rsaI}\Delta\text{rsaA}\Delta\text{rsaE}+\text{rsaI}$, $\Delta\text{rsaI}\Delta\text{rsaA}\Delta\text{rsaE}+\text{rsaA}$ et $\Delta\text{rsaI}\Delta\text{rsaA}\Delta\text{rsaE}+\text{rsaE}$) contenant les plasmides pCN52-PicaA-GFP et pCN38 ou pCN38-RsaI/RsaA/RsaE sont cultivées à 37°C dans du TSB supplémenté d'érythromycine et de chloramphénicol. Des échantillons de la culture sont récoltés aux $\text{DO}_{600\text{nm}}$ suivantes : 0.3, 1 et 3. Les protéines et les ARN sont extraits. Une expérience de Western Blot est réalisée sur la fraction protéique afin d'analyser l'expression de la GFP. La membrane est colorée au bleu de coomassie afin de vérifier la quantité de protéines chargées. Une expérience de Northern Blot est effectuée sur la fraction ARN pour visualiser chacun des trois sARN. La révélation de l'ARN 5S est utilisé comme témoin de charge.

c) Impact de la dynamique liant les trois sARN sur la formation de biofilm ica-indépendant

1. L'absence des trois sARN induisent une diminution de l'adhérence des cellules et impacte la composition de la matrice du biofilm

Afin d'évaluer l'impact des trois sARN RsaI, RsaA et RsaE sur la production de biofilm, des expériences de formation de biofilms ont été réalisées en culture statique dans des plaques en polystyrène 96 puits : les cellules adhérentes ont été dénombrées (**figure 48A**) et colorées au crystal violet (**figure 48B**). Concernant le dénombrement, les biofilms formés par les souches $\Delta rsaE$ et $\Delta rsaI\Delta rsaA\Delta rsaE$ présentent significativement moins de cellules adhérentes que la souche WT ($p < 0.001$). Quant au cristal violet, comme décrit lors du **Chapitre 1**, la délétion de *rsaE* provoque une diminution de la quantité de biofilm, alors que la délétion de *rsaA* ou *rsaI* n'a pas d'effet.

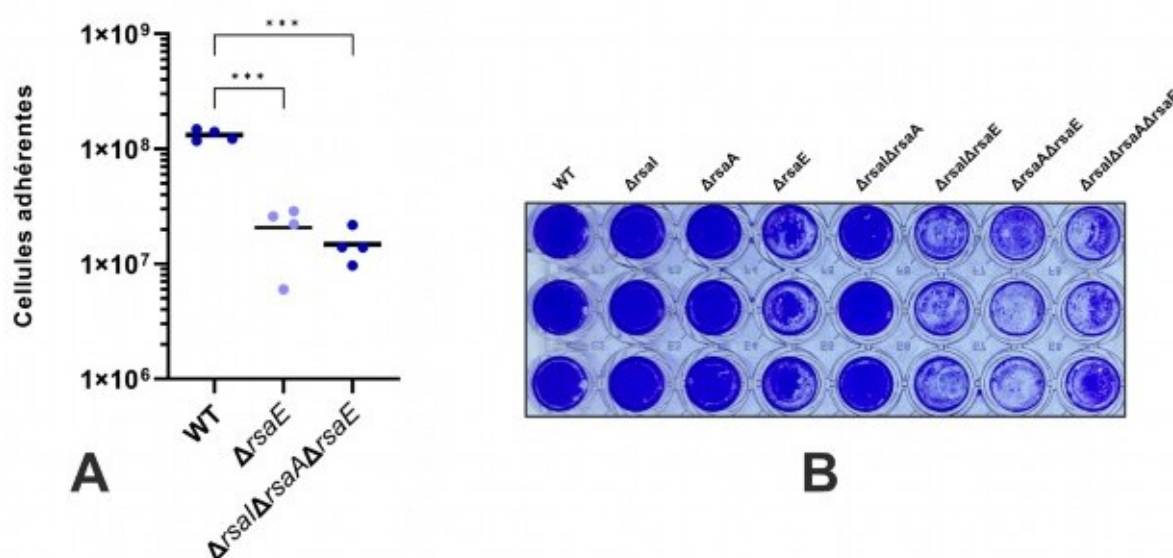


Figure 48 : La souche $\Delta rsaI\Delta rsaA\Delta rsaE$ produit moins de biofilm que la souche WT. La souche sauvage (WT) et le triple mutant déleté des trois sARN ($\Delta rsaI\Delta rsaA\Delta rsaE$) sont cultivées en TSB pendant 18 h à 37 °C sans agitation, au sein d'une plaque en polystyrène 24 puits (A) ou 96 puits (B). **A**) Les bactéries adhérentes sont récoltées à partir des coverslips placés au fond des puits. Le dénombrement repose sur des dilutions successives des bactéries et comptage des colonies sur gélose TSB. Les statistiques reposent sur un test *one-way* ANOVA. Les valeurs significatives sont indiquées par des astérisques : *** $p < 0.001$ **B**) Les bactéries adhérentes sont colorées au crystal violet.

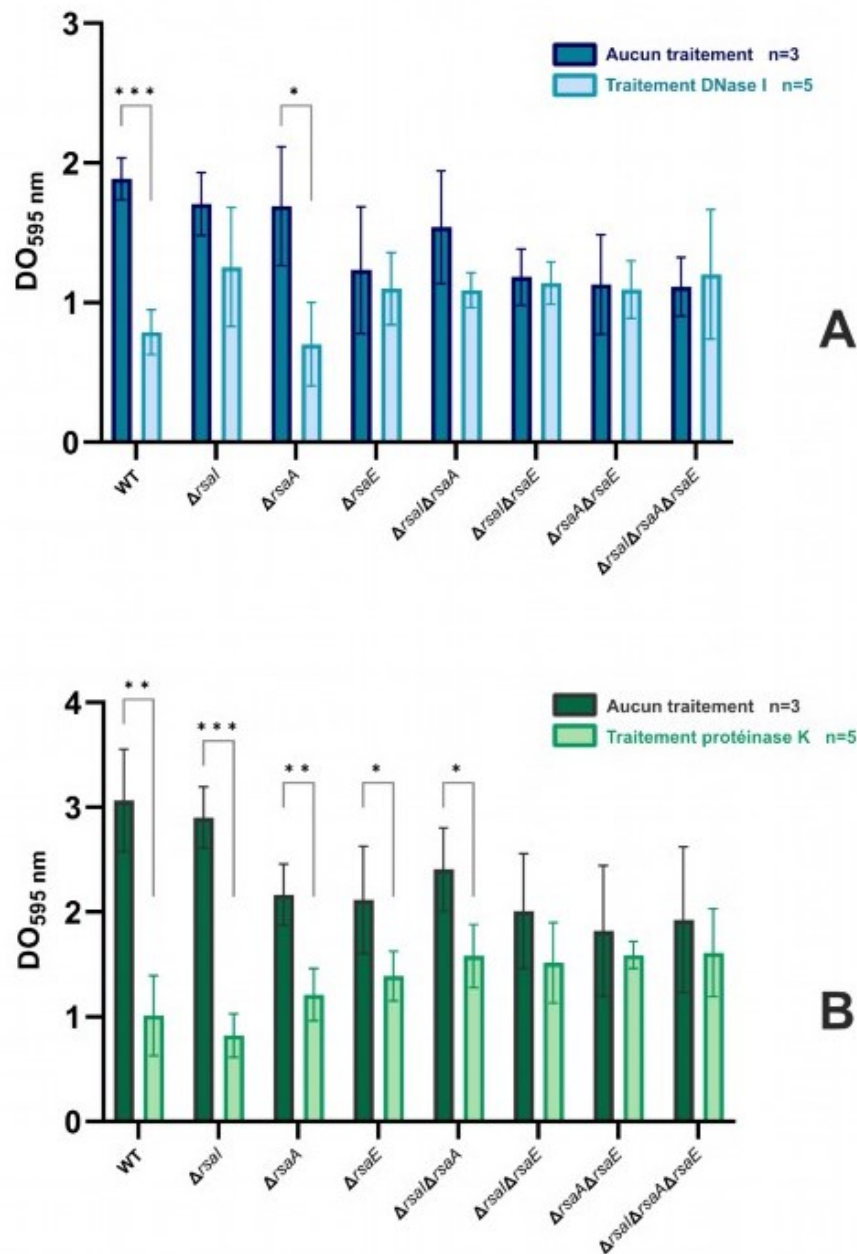


Figure 49 : La composition de la matrice du biofilm diffère entre les mutants

La souche sauvage (WT), délétée de RsaI (Δ rsaI), RsaA (Δ rsaA), RsaE (Δ rsaE), les doubles mutants délétés de RsaI et RsaA (Δ rsaI Δ rsaA), RsaI et RsaE (Δ rsaI Δ rsaE), RsaA et RsaE (Δ rsaA Δ rsaE) et le triple mutant délété des trois sARN (Δ rsaI Δ rsaA Δ rsaE) sont cultivées à 37 °C dans une plaque 96 puits en polystyrène sans agitation. Après 3 H, 28 U de DNase I (A) ou 10 ng de protéinase K (B) Après 18 H d'incubation au total, les biofilms formés au fond des puits sont colorés au crystal violet. La coloration est dissoute et resuspendue dans de l'éthanol, avant d'être mesurée à la DO de 595 nm. Les écarts types sont représentés par les barres d'erreurs sur les histogrammes. Les statistiques sont effectuées par un *multiple unpaired* T-TEST. Les valeurs significatives sont indiquées par des astérisques : *** p < 0.001, ** p < 0.002, * p < 0.033

Afin d'évaluer les différences de composition globale de la matrice du biofilm, des traitements à la DNase I et à la protéinase K ont été effectués sur des biofilms cultivés pendant 3 H puis colorés au cristal violet après 15 H d'incubation supplémentaires (**figure 49**). Contrairement à la souche WT, tous les biofilms produits par les mutants présentent une résistance à l'action de la DNase I (**figure 49A**), sauf pour le mutant $\Delta rsaA$ qui conserve une certaine sensibilité à la DNase ($p < 0.033$) suggérant que RsaA n'a pas d'effet sur la sécrétion d'ADN, au contraire de RsaI et plus particulièrement de RsaE (cf **chapitre 1**). Concernant le traitement à la protéinase K (**figure 49B**), les biofilms produits par les mutants $\Delta rsaI$ ($p < 0.001$) et $\Delta rsaA$ ($p < 0.002$) restent sensibles au traitement comme la souche WT, ce qui est moins le cas pour les souches $\Delta rsaE$ et $\Delta rsaI\Delta rsaA$ ($p < 0.033$). Concernant les souches $\Delta rsaI\Delta rsaE$, $\Delta rsaA\Delta rsaE$ ou le triple mutant $\Delta rsaI\Delta rsaA\Delta rsaE$, les biofilms produits par ces souches sont insensibles à l'exposition à la protéinase K. Le résultat pour le mutant $\Delta rsaA$ n'est pas surprenant sachant que RsaA inhibe la traduction de *mgrA* codant pour un répresseur des protéines d'adhésion (Tomasini *et al*, 2017). Globalement, l'impact de l'absence de RsaE sur la résistance des biofilms au traitement DNase reste inchangé au sein des doubles et triples mutants. Néanmoins il semblerait que l'absence de RsaI et de RsaA potentialise la capacité de résistance à la protéinase K des biofilms formés en absence de RsaE.

2. Le triple mutant possède un phénotype particulier en présence de plasma désactivé

Lors de la caractérisation de la souche triple mutante, j'ai observé un phénotype particulier lorsque les bactéries sont cultivées en TSB supplémenté avec 10 % de plasma désactivé (**figure 50**) : les cellules cultivées sous agitation s'agrègent ce qui n'est pas le cas pour la souche sauvage. Cette caractéristique s'intensifie lorsque le plasma désactivé représente 50 % du milieu de culture : les bactéries s'assemblent en une masse unique dont le diamètre croît au cours du temps. Afin de visualiser le contenu de ces agrégats, des portions ont été observés au microscope photonique. Les amas produits en présence de plasma désactivé sont bien constitués de bactéries rassemblées sous forme d'agrégats. Dans l'objectif de lier l'observation de ce phénotype atypique avec l'expression des protéines, des extraits cellulaires de cultures en TSB (**figure 51A**) et TSB-10 % plasma désactivé (**figure 51B**) ont été analysés par spectrométrie de masse par la plateforme de protéomique de l'IBMC.

Concernant la culture en TSB (**figure 51A**), on retrouve une répression significative ($FC > 2$) des protéines d'adhésion TarM, SasG et SdrD dans le triple mutant. A l'inverse, on observe l'activation ($FC < -2$) de l'expression de nombreuses cibles retrouvées dans le MAPS de RsaE et impliquées dans le métabolisme (RocF, NdhF (ou YjID), Mqo1). De façon surprenante, aucune des protéines dont les messagers ont leur traduction inhibée par RsaA ou RsaI ne sont retrouvées différentiellement exprimées dans le triple mutant. Le niveau des facteurs de transcription MgrA et IcaR réprimés respectivement par RsaA (Romilly *et al*, 2014) et RsaE (cf **chapitre 1**) apparaissent légèrement activés dans le mutant, mais de façon non significative. Pour les cultures supplémentées en plasma désactivé (**figure 51B**), on observe dans le triple mutant une diminution significative ($FC > 2$) de la protéine AlsS et une augmentation significative de YjID ($FC < -2$). Pour les cultures supplémentées en plasma désactivé, on observe une diminution de la production d'autres protéines de surface ou sécrétées : HlgCB, FnbA et B, Fib-2 dans le triple mutant. IcaR n'est pas exprimé dans ces conditions et MgrA est activé de manière non significative. Des enzymes impliquées dans le métabolisme rédox (Als, HG001_00517, YghA) sont réprimées.

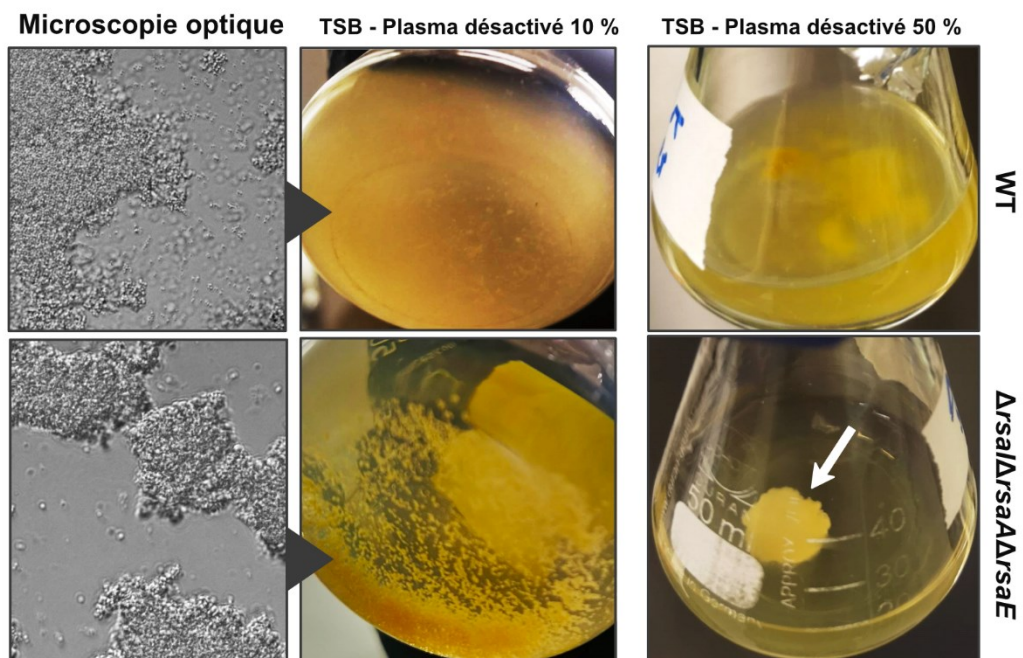


Figure 50 : La souche *ArsaIΔrsaAΔrsaE* présente un phénotype particulier en présence de plasma désactivé. La souche sauvage (WT) et le triple mutant déleté des trois sARN (*ΔrsaIΔrsaAΔrsaE*) sont cultivés dans du TSB supplémenté de plasma désactivé pendant 6 H, à 37 °C sous agitation. Les images de microscopie optique sont obtenues après récolte de "fragments" des agrégats qui sont écrasés entre lame et lamelle puis scellés et observés à la lumière blanche.

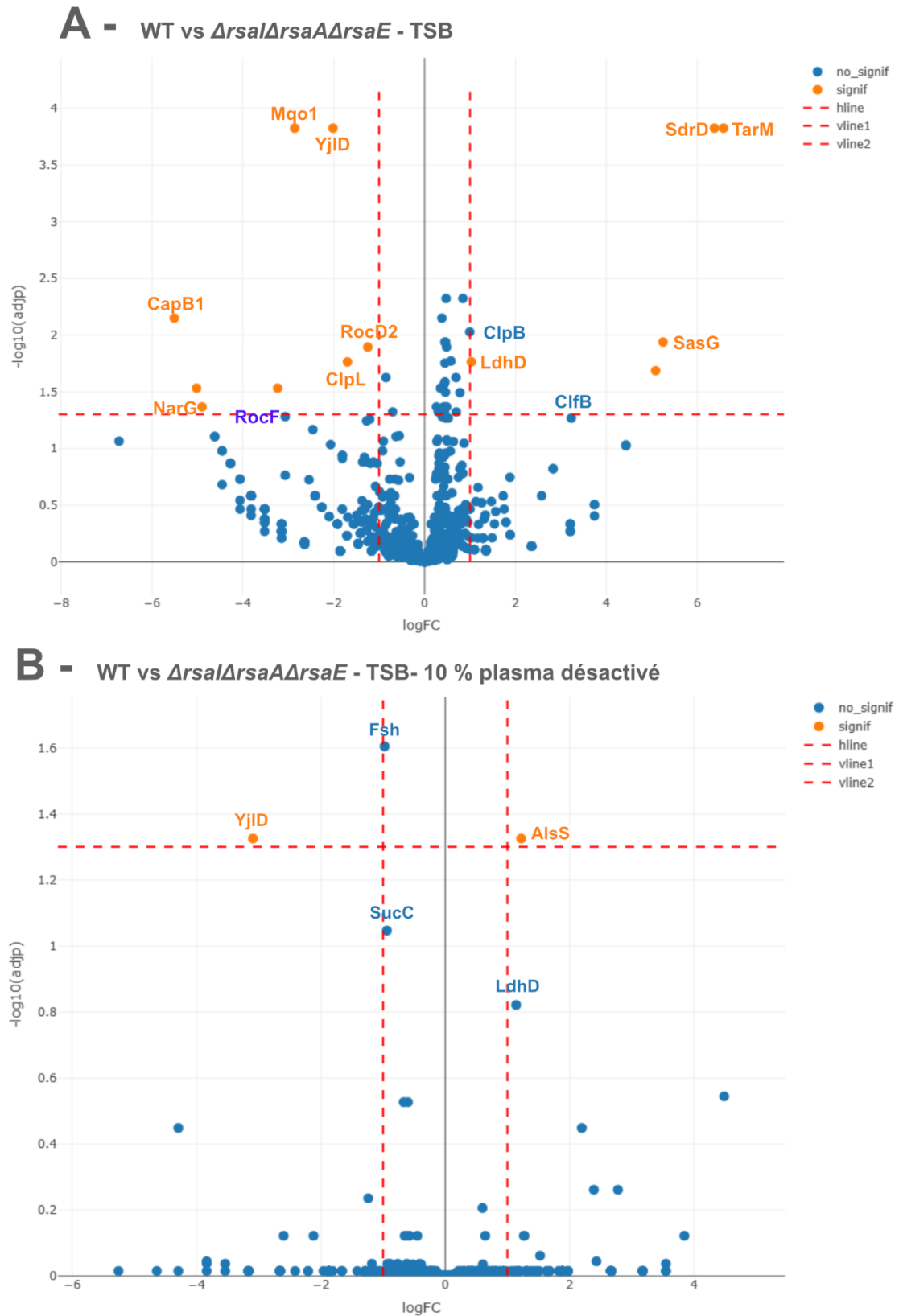


Figure 51 : Protéomique comparative des extraits cellulaires de la souche HG001 WT et Δ rsaI Δ rsaA Δ rsaE. La souche sauvage (WT) et le triple mutant délété des trois sARN (Δ rsaI Δ rsaA Δ rsaE) sont cultivées en TSB (A) ou TSB - 10 % plasma désactivé (B). Les échantillons sont collectés lorsque la DO à 600 nm atteint 3. L'absorbance ne peut être mesurée pour la culture supplémentée de plasma désactivé, les bactéries sont donc collectées en même temps que celles cultivées en TSB. Les protéines dont l'expression est significativement différente entre les deux souches sont indiquées par un point orange.

Discussion & perspectives

Ce chapitre se focalise sur les relations qui existeraient entre les trois sARN RsaI, RsaA et RsaE dans la régulation de l'expression de l'ARNm *icaR*. En effet, les expériences de MAPS révèlent que ces trois sARN interagiraient avec l'ARNm *icaR* : RsaI et RsaA se lient à la région 3'UTR, RsaE au niveau de la séquence SD de la région 5'UTR (cf **chapitre 1**). Les expériences *in vitro* confirment ces interactions, dont les régions d'interactions indépendantes ne semblent pas empêcher la fixation des trois sARN sur le même ARNm *icaR*. Un schéma global des interactions exposées lors de la régulation d'*icaR* est présenté en **figure 52**. L'expression de l'opéron *icaADBC* est activée indirectement par RsaI (Bronesky *et al*, 2019) et RsaE (cf **chapitre 1**), probablement par la répression d'*icaR*.

La liaison de RsaA sur l'ARNm *icaR* n'active pas l'expression de l'opéron *ica*

Les résultats montrent que RsaA interagit avec l'extrémité 3' d'*icaR*, ce qui entraîne un clivage par la RNase III *in vitro* mais ne module pas l'expression de l'opéron *icaADBC*. Le système rapporteur utilisé ne permet pas de visualiser une baisse de la production de GFP puisqu'aucun signal n'est détecté au sein de la souche WT. On ne peut donc pas exclure que RsaA modulerait la production d'IcaR par exemple en empêchant la liaison de la séquence anti-SD sur la séquence SD de l'ARNm (Los Mozos *et al*, 2013). Afin de visualiser l'éventuel effet activateur de RsaA sur la traduction d'*icaR*, il faudra réaliser des expériences d'empreintes de ribosome sur l'ARNm entier. Cette expérience permettra de mettre en évidence l'éventuelle augmentation de la formation du complexe d'initiation de la traduction en présence de RsaA. Lorsque les conditions de détection seront établies dans la souche HG001, il sera intéressant d'observer l'impact potentiellement négatif de RsaA sur la production de PIA/PNAG.

Impact de la formation du duplexe RsaI/RsaE sur la régulation d'*icaR*

Les expériences de retard sur gel *in vitro* mettent en lumière l'absence de compétition entre RsaI et RsaE quant à leur fixation sur l'ARNm *icaR*. Même si la formation du duplexe RsaI/RsaE n'empêche pas la liaison de RsaE sur *icaR*, on ne peut exclure que cette interaction entraîne des conséquences sur la régulation d'*icaR*, surtout si les deux sites d'interaction entre les deux ARN sont nécessaires (cf **chapitre 1**). En effet, les résultats obtenus grâce au système rapporteur *icaA*-GFP laissent supposer que l'absence de RsaI potentialise l'action inhibitrice de

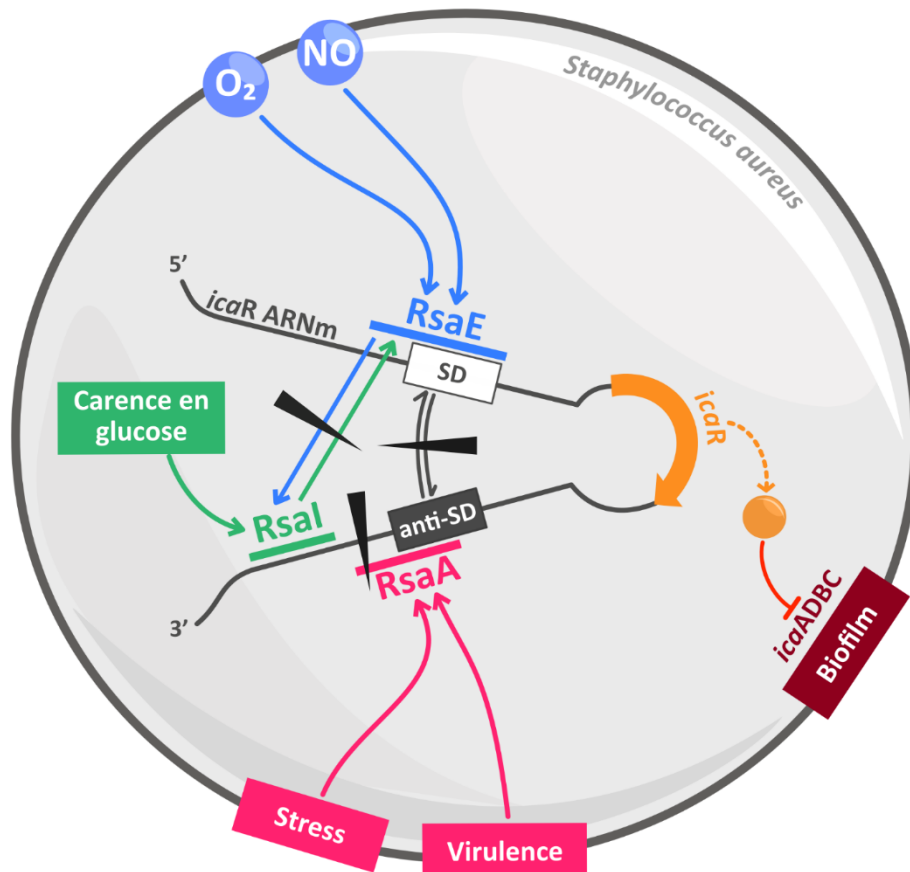


Figure 52 : Réseau global des interactions localisées sur l'ARNm *icaR* liant RsaI, RsaA et RsaE.

Chaque sARN répond à des signaux environnementaux distincts et interagit au niveau de l'ARNm *icaR* à des localisations différentes : RsaI se lie à l'extrémité 3'UTR, RsaA chevaucherait la séquence anti-SD et RsaE se fixe au niveau de la séquence SD localisée en 5'UTR. Par ailleurs, RsaE et RsaI forment également un duplexe qui n'empêche pas la fixation de RsaE sur l'ARNm *icaR*. Néanmoins, la fixation de RsaE sur la séquence SD entrave la formation du duplexe 5'/3' d'*icaR*. Les interactions conduisant à un clivage par la RNase III sont indiquées par des **triangles**. ◀

RsaE sur l'expression d'*icaR*. Pourtant nous ne pouvons pas infirmer l'hypothèse que RsaI régulerait un facteur de *icaR*, autre que RsaE.

Par ailleurs, RsaE peut à la fois se lier à RsaI et à *icaR* : cette observation suggère que les deux motifs riches en cytosine de RsaE sont impliqués dans la formation du complexe ternaire RsaI/RsaE/5' *icaR*. Puisque ces motifs sont issus d'une duplication, on ne peut exclure qu'ils soient interchangeables c'est-à-dire que le 1^{er} motif riche en cytosine de RsaE soit impliqué dans l'interaction avec RsaI et le 2nd motif pour l'interaction avec *icaR*, et inversement. La question se pose donc sur la conséquence non pas de la liaison de RsaI sur RsaE mais sur le clivage du duplexe par la RNase III. À la suite de la publication présentée **chapitre 2**, on estime que le clivage de RsaE produirait une forme courte RsaEp possédant un seul site riche en cytosine, comme c'est le cas chez *B. subtilis* et *S. epidermidis* (voir **Introduction §3.II.b.3**). En effet, chez *B. subtilis*, RoxS (l'équivalent de RsaE) est clivé par la RNase Y au niveau de la première tige-boucle ; chez *S. epidermis*, RsaE est clivé au niveau de cette même tige-boucle. Les deux formes tronquées respectivement RoxS (D) et RsaEp possèdent des cibles ARNm différentes de la forme longue. On peut donc imaginer que la liaison et/ou le clivage issu du duplexe RsaI/RsaE limiterait l'interaction de RsaE avec l'ARNm *icaR* à un seul site, soit au niveau du SD soit au niveau du cadre de lecture (cf **chapitre 1**). Afin de vérifier cette hypothèse, il faudrait produire la potentielle forme courte de RsaE et réaliser des expériences de retard sur gel et d'empreinte du ribosome avec l'ARNm *icaR*. L'objectif sera de déterminer si RsaEp est capable d'inhiber la traduction d'*icaR*. Dans le modèle *in vivo*, nous pourrions compléter la souche Δ *rsaE* exprimant le système rapporteur *ica*-GFP avec cette version courte de RsaE et tester son activité.

Dans ce contexte, la question se pose sur le taux de l'expression de RsaE à partir d'un plasmide. En effet, l'effet d'activation de l'expression de l'opéron *icaADBC* est particulièrement visible lorsque RsaE est exprimé depuis le pCN38, sous son propre promoteur, alors que la quantité du sARN visualisé par Northern Blot n'atteint pas celle de la souche WT. Ces résultats suggèrent que le plasmide de complémentation conduirait à une production réduite de RsaE due à une boucle d'auto-régulation négative.

Les sARN RsaE, RsaA et RsaI affectent la production de biofilms

Lors du **chapitre 1**, les expériences de Dot Blot qui ont été effectuées afin d'analyser la production de PIA/PNAG n'ont pas permis de mettre en évidence l'action de RsaE sur la régulation de l'expression de l'ARNm *icaR* dans la souche HG001. Comme les résultats de ces

expériences n'étaient pas concluants, l'analyse de la production de PIA/PNAG devra être effectuée au sein d'une souche sauvage hyper-productrice de l'exopolysaccharide, comme *S. aureus* 15981 (Los Mozos *et al*, 2013) ou *S. aureus* 132 (Bronesky *et al*, 2019) ; ou dans des conditions de cultures qui induiront la production de biofilm *ica*-dépendant. Concernant les résultats obtenus par la coloration des biofilms au crystal violet et le traitement à la DNase I et à la protéinase K, nous pouvons conclure que RsaE a un impact majeur sur la formation des biofilms *ica*-indépendants (cf **chapitre 1**) et que RsaA y contribue, probablement en activant indirectement les protéines de surface (Tomasini *et al*, 2017). RsaI ne semble pas jouer un rôle prépondérant. D'ailleurs le MAPS de RsaI ne montrait pas de cibles évidentes pouvant intervenir dans les constituants de la matrice *ica*-indépendante (Bronesky *et al*, 2019).

Les études de protéomique différentielle en milieu TSB entre la souche sauvage et le triple mutant présentent une augmentation de la quantité de certaines cibles de RsaE : la malate déshydrogénase Mqo1, NdhF (ou YjID) qui est une NADH déshydrogénase impliquée dans la chaîne respiratoire, et l'arginase RocF. Ces protéines sont sous-exprimées dans la souche WT par rapport au triple mutant : en l'absence de RsaE l'expression de ses cibles est activée, comme attendu.

Le triple mutant est associé à la diminution de l'expression de la protéine de surface SdrD qui est essentielle à l'adhésion puis à la colonisation de la bactérie au niveau des cellules épithéliales désquamées (Askarian *et al.*, 2016) et impliquée dans l'échappement immunitaire (Askarian *et al.*, 2017). On observe également une diminution de l'expression de TarM, une enzyme essentielle dans le processus de glycosylation des acides téichoïques qui sont responsables de l'encrage du peptidoglycane à la membrane bactérienne (Xia *et al.*, 2010). Il a été montré que l'absence d'acides téichoïques augmente l'hydrophobicité de la surface bactérienne et abolit la capacité de la bactérie à former des biofilms selon les caractéristiques physiques de la surface testée (Fedtke *et al.*, 2007). Puisque les acides téichoïques sont au centre des propriétés physicochimiques de la surface bactérienne, l'hypothèse est que la diminution de la quantité de TarM serait associée à une chute de la proportion d'acides téichoïques glycosylés encrés au niveau du peptidoglycane. Ce changement induirait une modification de la charge nette présente à la surface des cellules, impactant à la fois les interactions intra-cellulaires et l'adhésion à une surface. Par ailleurs, la glycosylation des acides téichoïques est associée à une résistance à la vancomycine (Hort *et al.*, 2021), il serait donc pertinent d'analyser la résistance à la vancomycine des souches sauvage et triple mutante. On observe une troisième

protéine de surface dont l'expression est réprimée dans le triple mutant : SasG qui favorise les interactions intra-cellulaires (cf **Introduction §2.IV.a.1**) et promeut la formation de biofilm (Corrigan *et al.*, 2007).

De manière globale, la modification de l'expression de protéines de surfaces (ici SdrD, TarM et SasG) peut entraîner des conséquences drastiques sur les caractéristiques hydrophobes de la cellule bactérienne et par conséquent impacter ses capacités à adhérer à une surface biologique ou abiotique. En plus d'interférer avec l'étape d'adhésion du biofilm, les protéines de surface sont au cœur des interactions intra-cellulaires à l'origine de la cohésion et de la structure du biofilm. À noter que les PSMs n'ont pas été visualisées lors de cette analyse puisque ces peptides sont sécrétés et ont dû être éliminés après les multiples lavages du culot bactérien. Il serait pertinent d'effectuer ces analyses protéomiques pour la souche mutante $\Delta rsaE$ en culture, sous agitation et statique en biofilm, afin d'expliquer au niveau de l'expression de l'ensemble des protéines la diminution de la formation de biofilm observée. Ces analyses devront être effectuées sur le culot bactérien mais également au niveau du sécrétome afin d'intégrer les PSMs aux données.

Le mutant $\Delta rsaI\Delta rsaA\Delta rsaE$ présente un phénotype particulier en présence de plasma désactivé

L'ensemble des mutants ont été cultivés en présence de plasma désactivé et le triple mutant présentait un phénotype particulier : l'incubation conduit à la formation d'une boule compacte. Les doutes se portaient sur sa composition, qui pouvait provenir de l'aggrégation des composants du plasma, de débris cellulaires ou de bactéries viables. Les observations au microscope ont montré essentiellement des amas bactériens, qui seraient alors le résultat d'une aggrégation des cellules qui continuent tout de même à se multiplier. Nous avons supposé que cette observation pourrait être une conséquence directe des changements au niveau de l'expression des protéines régulées par RsaI, RsaA et RsaE. Afin de dévoiler des pistes qui pourraient expliquer le phénotype observé en plasma désactivé, les extraits cytoplasmiques de cultures obtenues en TSB-10 % plasma désactivé de la souche sauvage et du triple mutant ont été analysées par spectrométrie de masse.

En présence de plasma désactivé, il est possible que l'extraction des protéines effectuée sur l'amas de cellules eût été difficile et peu efficace, expliquant le nombre limité de protéines exprimées différemment dans l'analyse. Ce résultat confirme le comportement du triple mutant cultivé en culture statique en présence de plasma désactivé et en plaque de biofilm, où

les agrégats observés n'adhéraient pas au support en polystyrène et étaient évacués avec le surnageant (résultats non montrés).

Nous observons l'inhibition significative d'une seule enzyme nommée AlsS, une acétolactate synthase dont l'expression est activée suite à un stress NO afin d'activer le cycle de Krebs et de prévenir de l'acidification cellulaire (Carvalho *et al.*, 2017). L'opéron *alsSD* est lié aux mécanismes d'apoptose cellulaire puisque le mutant $\Delta alsSD$ est associé à la hausse de la mort cellulaire mais sans lyse cellulaire. A noter que la souche mutante $\Delta alsSD$ présente un phénotype d'agrégation cellulaire dit de « *clumping* » en culture liquide (Yang *et al.*, 2006). La répression de AlsS pourrait donc expliquer le phénotype observé en plasma désactivé qui serait associée à l'inhibition de la lyse des cellules (en phase stationnaire ?). Dans ce contexte, la sphère de bactéries agrégées serait composée d'un mélange de bactéries mortes et vivantes qui s'accumulent mais dont les cellules restent intègres. Néanmoins ce phénotype n'est visible qu'en présence de plasma désactivé, il y aurait donc un ou plusieurs composants de ce milieu qui induirait l'inhibition de l'expression de AlsS et conduirait au phénotype décrit précédemment.

Actuellement, ces données ne nous permettent pas de conclure si les sARN RsaI, RsaA et RsaE régulent des messagers essentiels à la survie de *S. aureus* dans le plasma, et si le phénotype d'agrégation observé est en lien avec la diminution de la formation de biofilm.

Chapitre 4 : Application de la
technique DBRI « *Direct determination*
of Bacterial RNA-RNA Interactome »

La méthode du DBRI s'inspire de la technique du LIGR-Seq (Sharma *et al.*, 2016 ; Durand *et al.*, 2019), qui a été mise au point au sein de notre laboratoire par Emma Desgranges (thèse de doctorat) et que j'ai reproduit et adapté dans le but d'améliorer la spécificité. L'objectif de la méthode est d'identifier toutes les interactions ARN-ARN qui ont lieu *in vivo* au sein de la cellule, notamment les duplexes sARN-ARNm en réponse à des stimuli extracellulaires. Le DBRI ne dépend pas de la participation d'une protéine dans la formation de duplexes, comme c'est le cas avec la méthode du RIL-seq (Melamed *et al.*, 2018) ou du CLASH (Waters *et al.*, 2017) qui reposent sur l'implication de protéines chaperonnes ou de RNases. Par ailleurs, le DBRI ne se focalise pas sur les interactions liées à un seul ARN, comme le MAPS (Mercier *et al.*, 2020) : c'est une technique de visualisation globale des interactomes ARN-ARN s'acquittant de l'addition d'une étiquette qui pourrait avoir des conséquences sur la fonction ou la stabilité de l'ARN. Les principales étapes du protocole du DBRI sont présentées dans la **figure 53** et décrites à la suite de ce manuscrit, selon les conditions de culture utilisées pour les résultats qui sont présentés.

La particularité de la méthode du DBRI repose sur le pontage aux UV *in vivo* de toutes les interactions ARN-ARN par l'utilisation d'un composé chimique : le psoralène TEG-azide (PTA ; **figure 54**). Le psoralène est un acide nucléique qui pénètre les cellules dont l'exposition aux UV enclenche une réaction photochimique à l'origine de la formation d'un adduit entre deux pyrimidines de la molécule d'ARN ou d'ADN (Kanne *et al.*, 1982). En conséquence, le PTA stabilise toutes les interactions ARN-ARN après une première exposition aux UV à 365 nm au sein de cellules vivantes. L'un des avantages de cette molécule est que son action est réversible puisque le PTA se détache de sa cible et libère les structures stabilisées après une seconde exposition aux UV à 254 nm. Ce composé permet donc d'effectuer à la fois un pontage *in vivo* temporaire et également une purification des interactions pontées par la présence d'un résidu azide. En effet, la réaction chimique *click* permet de lier de manière covalente un résidu alkyne de la biotine DIBO avec le résidu azide du PTA. De cette manière, seules les interactions ARN/ARN pontées par le PTA seront récupérées suite à l'étape de purification qui repose sur des billes magnétiques couplées à la streptavidine. C'est cette étape d'enrichissement des complexes ARN/ARN pontés qui caractérise tout particulièrement la méthode du DBRI.

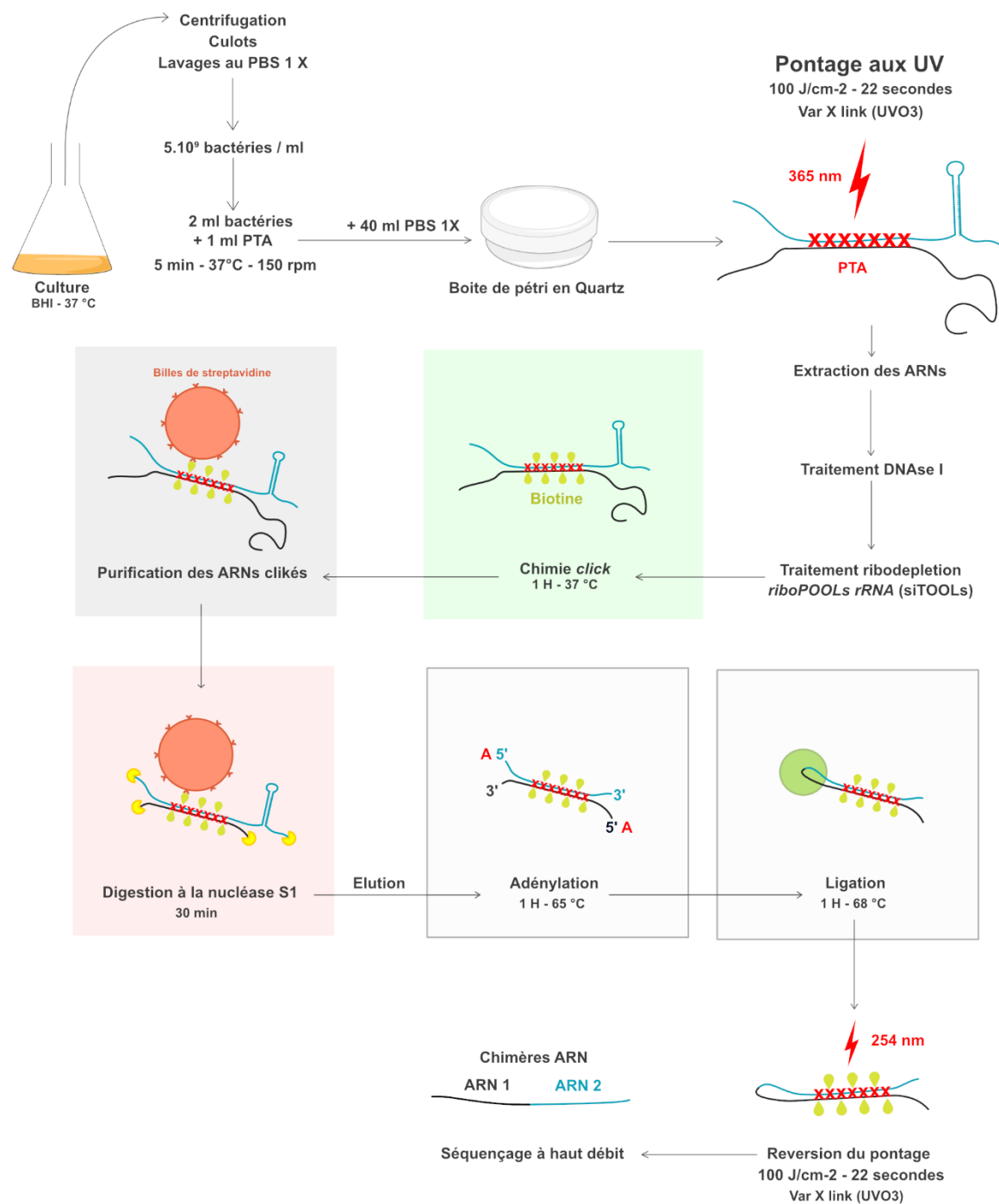


Figure 53 : Protocole du DBRI, *Direct determination of Bacterial RNA-RNA Interactome*
PTA : Psoralène TEG-azide

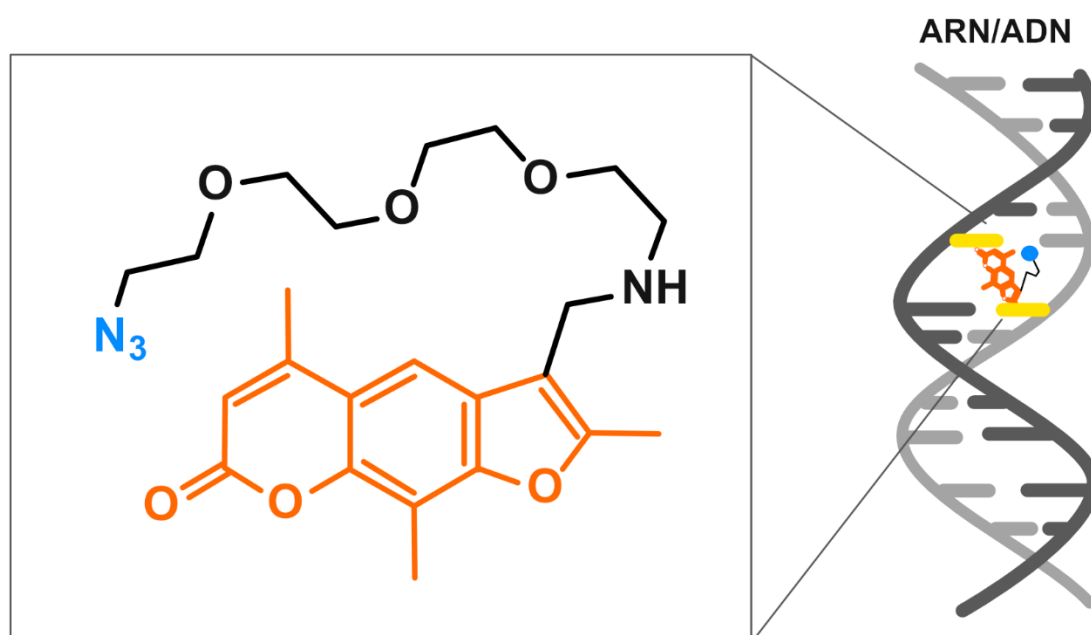


Figure 54 : Structure du psoralène-triethylene glycol azide (PTA).

La région de la molécule correspondant au psoralène est indiquée en **ORANGE**, et le résidu azide ciblé par la "*click reaction*" en **BLEU**. Le PTA permet de former un adduit entre **deux bases pyrimidiques** de molécules d'ADN ou d'ARN après une exposition aux UV à 365nm.

Matériel & Méthodes

I. Collecte des ARNs totaux

a) Culture des bactéries

Une pré-culture de 2 ml de *S. aureus* HG001 en BHI est incubée une nuit à 37 °C sous agitation. Cette pré-culture est utilisée pour ensemençer deux erlenmeyers contenant 50 ml de BHI à une $DO_{600nm} = 0.05$. Ils sont incubés sous agitation à 37 °C jusqu'à atteindre une DO_{600nm} d'environ 2, soit plus de 4 H de culture. Le volume de la culture est divisé en deux afin d'obtenir au total quatre tubes contenant 25 ml de culture qui sont centrifugés (15 min, 3 750 rpm, 4 °C). Chaque culot bactérien est lavé avec 20 ml de PBS 1X froid avant une nouvelle centrifugation (15 min, 3 750 rpm, 4 °C). Par la suite, les culots de bactéries correspondant à la même culture sont resuspendus ensemble dans du PBS 1X froid afin d'atteindre une concentration finale de 5.10^9 bactéries/ml. Deux répliques biologiques sont effectuées. Toutes les étapes sont effectuées en conservant les échantillons sur glace afin d'éviter toute dégradation.

b) Pontage des interactions ARN/ARN *in vivo*

Un volume de 2 ml de bactéries est prélevé (soit 1.10^{10} bactéries), auquel on ajoute 1 ml de Psoralen TEG azide (500 µg/ml ; PTA, Berry & Associates). Ce mélange est incubé 5 min à 37 °C sous agitation 150 rpm. A la fin de cette incubation, 40 ml de PBS 1X est ajouté, puis la suspension est transférée dans une boîte de pétri en quartz (ø 9cm) qui a préalablement été refroidie à - 20 °C et disposée sur glace. Le pontage *in vivo* s'effectue en exposant la boîte de pétri aux UV (100 J/cm^{-2} , 22 secondes à 365 nm) au sein du Vari X Link (UVO3). Puis le liquide est collecté et centrifugé (15 min, 3 750 rpm, 4 °C).

c) Extraction des ARNs

Les ARNs totaux sont extraits en utilisant le kit *Fast RNA Pro Blue* (MP Biomedicals) : 1 ml de la solution Fast RNA Pro est ajouté au culot bactérien qui est resuspendu. Le liquide est transféré dans des tubes contenant des billes de verre (FastPrep® 2mL Lysing Matrix tubes)

essentiels à la lyse mécanique des bactéries. Cette lyse est effectuée en plaçant ces tubes dans l'appareil de *FastPrep*® (MP Biomedicals) et en réalisant deux cycles de 40 secondes. Les tubes sont ensuite centrifugés (10 min, 3 750 rpm, 4 °C) et les surnageants contenant les ARN sont transvasés dans des tubes Eppendorf. Les ARNs sont purifiés en ajoutant 300 µl du mélange phénol/chloroforme, suivi d'une centrifugation (10 min, 3 750 rpm, 4 °C). Le surnageant est récupéré dans un nouveau tube Eppendorf, auquel est ajouté 300 µl du mélange chloroforme/alcool iso-amylque (19 :1 vol), suivi d'une dernière centrifugation (10 min, 3 750 rpm, 4 °C). Enfin, la phase aqueuse est supplémentée de 3 volumes d'éthanol 100 % contenant 1 µl de co-précipitant (GlycoBlue, Invitrogen). Les ARNs totaux sont précipités durant une nuit à – 20 °C puis centrifugés (15 min, 3 750 rpm, 4 °C). Les culots d'ARN sont lavés à l'éthanol 80 %, ils sont séchés à l'air libre et resuspendus dans 50 µl d'eau Milli-Q (Merck).

II. Traitements des ARNs

a) Elimination de l'ADN

Environ 20 µg d'ARN extraits sont incubés (30 min, 37 °C) avec 5 U de DNase I (Sigma) de 10 µl du tampon 10 X correspondant et d'H₂O Milli-Q afin d'atteindre un volume final de 100 µl. A la fin du traitement, les ARNs sont purifiés en utilisant le kit *RNA Clean & Concentrator-5* (Zymo Research). Brièvement, les ARNs à purifier sont supplémentés de 100 µl de tampon de liaison et de 200 µl d'éthanol 100 %. Le mélange est transféré dans une colonne Zymo-Spin puis centrifugé. La colonne subit un lavage de 400 µl du tampon de préparation puis 700 µl de tampon de lavage. Finalement, les ARNs purifiés sont élués avec 17 µl d'H₂O Milli-Q par centrifugation.

b) Elimination des ARN ribosomaux

Les ARN ribosomaux sont exclus des ARN totaux en utilisant le kit *riboPOOLS rRNA Depletion S. aureus* (siTOOLS Biotech). Le kit est limité au traitement de 5 µg d'ARN par colonne, c'est pourquoi deux colonnes sont utilisées par échantillons afin de maximiser les quantités finales d'ARN obtenues. Succinctement, 5 µg d'ARN sont mélangés à 1 µl de tampon RP et 5 µl de tampon HB pour un volume final de 20 µl. Les ARNs sont dénaturés pendant 10 min à 68 °C. Les billes préalablement lavées sont ajoutées aux ARNs et incubés 15 min à 37

°C puis 5 min à 50 °C. L'utilisation d'un rack magnétique (Amersham Biosciences) permet de séparer les billes du liquide, et le surnageant contenant les ARN déplétés des ARNr est transvasé dans un nouveau tube Eppendorf. Finalement les ARNs sont purifiés selon le protocole du kit : 10 µl de la solution SA, 1 µl de la solution LA et 333 µl d'éthanol 100 % sont ajoutés et les ARN précipitent une nuit à – 20 °C. Après centrifugation (15 min, 3 750 rpm, 4 °C), les culots d'ARN sont lavés à l'éthanol 80 %, puis séchés à l'air libre et resuspendus dans 10 µl d'eau Milli-Q (Merck).

III. Sélection & traitements des ARNs pontés

a) Réaction de chimie *click*

Cette réaction s'applique à une quantité maximale de 5 µg d'ARN. Néanmoins, la quantité d'ARN obtenue à la fin de la ribodéplétion atteint au maximum 1 µg, même en assemblant les ARN issus de deux colonnes de ribodéplétion différentes. C'est pourquoi la totalité des ARN obtenus en **II.b** sont utilisés, soit 20 µl par échantillon. A ces 20 µl d'ARN sont ajoutés 15 mM de Biotine Dibenzocyclooctyne Alkyne (Fisher Scientific) et 1 µl de Tris-HCl (0.25 M, pH 7.5) pour un volume final de 100 µl. Après une heure d'incubation à 37 °C, les ARN sont purifiés en utilisant le kit *RNA Clean & Concentrator-5* (Zymo Research). Les ARN sont élués avec 200 µl d'eau Milli-Q et conservés sur glace jusqu'à la prochaine étape.

b) Purification des ARN « *clickés* »

Les billes qui vont être utilisées pour la purification des ARN « *clickés* » doivent être préparées au préalable. Pour ce faire, 20 µl de billes (Streptavidin Mag Sepharose, GE Healthcare) sont équilibrée avec 500 µl de Tris-HCl (10 mM, pH 7.5). Afin de limiter les interactions aspécifiques avec les acides nucléiques, les billes sont bloquées avec 40 µl d'oligonucléotides à 100 pmol/µl (AGAGA... 33 nts, IDT) pendant 15 min en utilisant l'agitateur PTR35 Rotator (Grant Instruments ; 100 rpm-10s, 80°-10s, vortex 5°-5s). Par la suite les billes subissent deux lavages de 500 µl de Tris-HCl (10 mM, pH 7.5) et sont finalement resuspendues dans 500 µl de Tris-HCl (10 mM, pH 7.5).

Les ARN biotinylés obtenus en **III.a** sont incubés avec 200 µl de billes de streptavidine bloquées et 400 µl de tampon BW 2X (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, NaCl 2 M). Ce mélange est incubé 30 min en utilisant l'agitateur PTR35 Rotator (Grant Instruments ; 100 rpm-10s, 80°-10s, vortex 5°-5s). Les ARN fixés aux billes subissent trois lavages de 500 µl de tampon BW 1X en utilisant le rack magnétique.

c) Digestion des ARN par la nucléase S1

Les ARN fixés aux billes sont incubés avec 25 U de nucléase S1 (Thermofisher), 20 µl du tampon 5 X associé pour un volume final de 100 µl pendant 30 min sous agitation utilisant l'agitateur PTR35 Rotator (Grant Instruments ; 100 rpm-10s, 80°-10s, vortex 5°-5s). A la fin du traitement, les billes subissent trois lavages de 500 µl de Tris-HCl (10 mM, pH 7.5).

d) Elution des ARN pontés

Les ARN fixés aux billes sont resuspendus dans 400 µl de tampon d'élution (SDS 2 %, urée 6 M, biotine 30 mM) puis agités pendant 5 min (100 rpm-10s, 80°-10s, vortex 5°-5s). Finalement les billes sont incubées pendant 5 min à 90 °C puis le surnageant contenant les ARNs est récupéré en utilisant un rack magnétique (Amersham Biosciences). Les ARN contenus dans le surnageant sont purifiés en utilisant le kit *RNA Clean & Concentrator-5* (Zymo Research, et sont finalement élués avec 12 µl d'eau Milli-Q.

e) Adénylation des ARN

Les 12 µl d'ARN sont incubés 1 h à 65 °C avec 200 pmol de *Mth* RNA ligase (NEB), 10 µl du tampon 10 X associé, et 10 mM d'ATP pour un volume final de 20 µl. La réaction est stoppée après 5 min d'incubation à 90 °C et les ARN sont purifiés en utilisant le kit *RNA Clean & Concentrator-5* (Zymo Research), ils sont finalement élués par 12 µl d'eau Milli-Q.

f) Ligation des ARN adénylés

A ce stade, deux cultures ont été effectuées puis traitées ce qui équivaut à deux réplicas (Lig 1 et Lig 2) qui ont subi tous les traitements décrits précédemment. Chaque échantillon va être divisé en deux afin de produire un contrôle sans ligation (Lig -) pour chaque réplicat. Ainsi, 6 µl des ARN adénylés sont incubés 1 h à 68 °C en présence (Lig+) ou absence (Lig-) de 80

pmol de *Thermostable 5'App DNA/RNA Ligase* (NEB) et de 2 µl du tampon 10 X associé pour un volume final de 20 µl. La réaction est stoppée après 5 min d'incubation à 90 °C et les ARN sont purifiés en utilisant le kit *RNA Clean & Concentrator-5* (Zymo Research), et sont finalement élués par 12 µl d'eau Milli-Q.

IV. Réversion du pontage aux UV

Les gouttes de 12 µl des ARN pontés et ligués sont déposées à la surface d'une boîte de pétri en quartz (ø 9cm) qui a préalablement été refroidie à – 20 °C et disposée sur glace. Ces gouttes subissent une exposition aux UV (100 J/cm², 22 secondes à 254 nm) au sein du Vari X Link (UVO3). Chaque goutte est transvasée dans un tube Ependorf et la qualité des ARN est analysée par le Bioanalyzer Agilent 2100 avant séquençage à haut débit des chimères.

V. Séquençage & Analyse bio-informatique

La préparation de la librairie puis le séquençage sont effectués par la Plateforme Epitranscriptomique et Séquençage (EpiRNA-Seq, Nancy). La librairie est préparée suivant le kit spécifique aux petits ARN suivi d'un séquençage *paired-end* 2x50 bases (NextSeq 2000, Illumina), reposant sur la ligation d'adaptateurs au niveau de chaque extrémité et sans fragmentation du matériel biologique. Les analyses bio-informatiques permettant d'identifier et de compter les chimères obtenues pour chaque échantillon ont été réalisées par R. Schaefer et B. Voos (Université de Stuttgart, Allemagne). Succinctement, chaque ARN composant la chimère est identifié par alignement des séquences sur le génome de *S. aureus* HG001. Ces séquences doivent être suffisamment éloignées au niveau de leur localisation sur le génome afin de considérer qu'il s'agisse d'une interaction entre deux ARN et pas une interaction intramoléculaire. Toutes les séquences qui s'alignent une seule fois sur le génome et qui ne sont donc pas des chimères sont exclues des résultats.

Résultats

I. Caractérisation des échantillons

a) Profils des ARNs obtenus

L'expérience de DBRI a été effectuée en deux répliques biologiques (échantillons 1 et 2) avec la présence de ligase (1+ et 2+) ou l'absence de l'enzyme (1- et 2-) lors de l'étape de ligation. Les chimères produites doivent être suffisamment longues et équitablement répartie entre les deux partenaires ARN pour permettre l'identification spécifique des séquences appartenant à chaque ARNs. L'analyse des échantillons par le Bioanalyzer (**figure 55**) indiquent que les quatre échantillons contiennent des ARN dont la taille est comprise entre 40 et 80 nucléotides, correspondant à environ 20 à 40 nucléotides impliqués dans la formation du duplexe par partenaire ARN, ce qui est attendu pour les chimères. On remarquera que les échantillons n'ayant pas subi le traitement de ligation (1- et 2-) possèdent un profil identique à ceux qui ont subi le traitement (1+ et 2+). Cette observation suggère que des chimères sont produites malgré l'absence de la ligase lors de l'étape de ligation. Par ailleurs, même si les échantillons correspondant au réplica 1 sont plus concentrés en ARN que ceux du réplica 2, les quantités d'ARN obtenus à la fin du protocole du DBRI sont faibles : on retrouve moins de 4 ng/μl pour les ARNs du réplica 2 et moins de 1 ng/μl pour le réplica 1. Malgré ces faibles quantités, le kit utilisé pour préparation des libraires pour le séquençage requiert un minimum de 50 pg de biomasse totale : la quantité d'ARN obtenu à la fin de la méthode du DBRI ne sera pas une limite au séquençage du matériel biologique.

b) Caractérisation des chimères

Au total des quatre échantillons, plus de 320 000 chimères ont été identifiées (**tableau 9A**) pour près de 524 000 lectures. Concernant les échantillons, ceux qui n'ont pas été exposés à la ligase (1- et 2-) présentent un nombre de chimères et de lectures plus important. Néanmoins cette différence reste limitée et laisse supposer que le contrôle sans ligase ne semble pas efficace pour visualiser les interactions non spécifiques. On remarquera que la proportion de chimères qui contiennent des ARNt ou ARNr reste sensiblement la même avec ou sans ligase. En

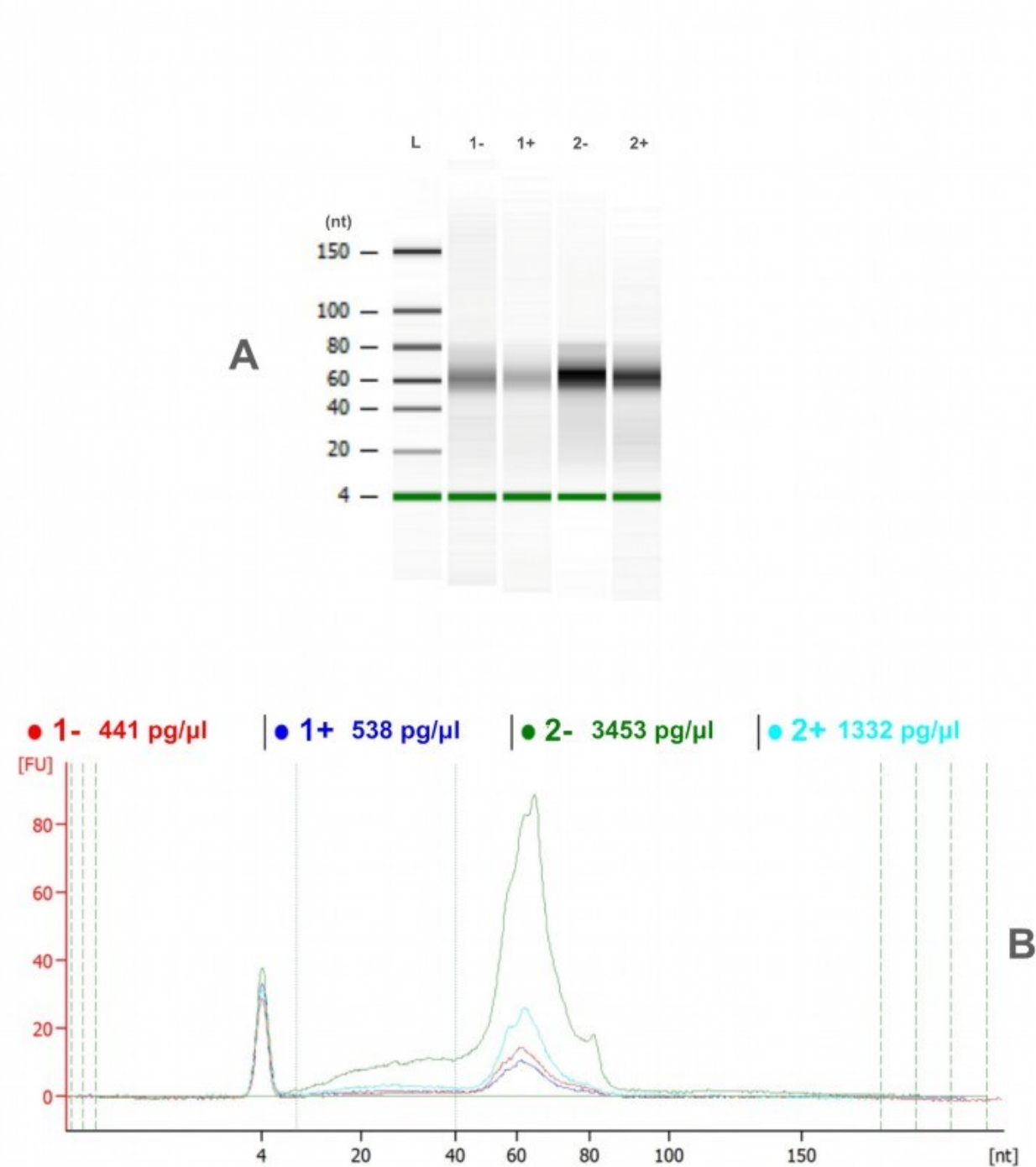


Figure 55 : Profil des ARNs analysés par le Bioanalyzer (Agilent 2100). Les ARNs sont issus du protocole du DBRI décrit précédemment. L'analyse des ces échantillons au Bioanalyzer permet d'obtenir le profil des ARNs par électrophorèse (**A**) dont la taille est estimée en comparant les échantillons à une échelle. L'analyse permet également d'estimer la concentration des échantillons (**B**).

revanche, les chimères composées d'ARNt ou d'ARNr ne dépassent pas 35 % pour les échantillons du réplica 1, mais atteignent jusqu'à 98 % pour le replica 2. Ces différences dépendent donc de l'échantillon en lui-même et non de l'étape de ligation, et semblent associées à l'efficacité du traitement de ribodépletion. Cette observation peut également être liée aux quantités d'ARN obtenus à la fin du protocole : les grandes quantités d'ARN issus du réplica 2 seraient liées à la présence des ARNr.

Tableau 9 : Dénombrement des chimères obtenues pour chaque échantillon. Ces données ont été obtenues après séquençage à haut débit des réplica 1 et 2 du protocole du DBRI, traité avec (+) ou sans (-) ligase. **A)** Nombre de chimères différentes identifiées par échantillons et lectures associées. Au niveau du panel droit est indiquée la proportion de chimères ou de lectures comportant au moins un ARNr ou ARNt. **B)** Parmi les chimères identifiées, celles composées de l'ARN III et des sARN RsaI, RsaA et RsaE ont été analysées. Le nombre de chimères comportant l'ARN spécifié et les lectures associées sont indiquées. La proportion de chimères composée de l'ARN spécifié et d'un ARNr ou ARNt est indiquée. Les autres chimères sont donc composées d'ARNm et/ou de sARN. Le panel à droite indique le nombre de lectures totales associé à cet ARN qui sont retrouvées dans les quatre échantillons.

A	Total		ARNt/ARNr	
	Chimères	Lectures	Chimères	
1-	117697	137963	36134	
			31%	
1+	80891	95199	28462	
			35%	
2-	99332	180192	97550	
			98%	
2+	76146	110748	56145	
			74%	

B	Total		ARNt/ARNr		Lectures / échantillons			
	Chimères	Lectures	Chimères	Lectures				
Total	321964	524102	81957	218291	1-	1+	2-	2+
			25%	42%				
ARN III	3168	9225	1518	3632	1181	436	1904	789
			48%	39%				
RsaI	1018	2751	99	1152	171	91	641	486
			10%	42%				
RsaA	318	406	76	127	53	25	93	27
			24%	31%				
RsaE	265	343	64	116	13	4	155	20
			24%	34%				

II. Analyse de chimères impliquant les sARN

Afin d'évaluer l'efficacité du protocole du DBRI, certains sARN ont été choisis pour étudier et analyser les chimères associées. Parmi eux, l'ARN III dont les interactions avec d'autres ARNs ont été amplement décrites et dont l'expression sera favorisée dans les conditions de cultures choisies. L'analyse s'est également orientée vers les sARN RsaI, RsaA et RsaE dont l'activité régulatrice de multiples ARNm a été étudiée précédemment et qui font l'objet des chapitres présentés au sein de ce manuscrit. Toutes ces interactions sARN-ARNm permettront de vérifier si le protocole du DBRI permet de retrouver des duplexes ARN déjà connus et décrits. Le tableau **9B** indique le nombre de chimères et de lectures, au total et par échantillons, dont l'un des ARN a été identifié parmi les quatre sARN nommés ci-dessus. Les chimères comportant l'ARN III sont beaucoup plus nombreuses que celles associées aux Rsa. Cette observation doit être liée à la forte expression de l'ARN III au niveau de la cellule. Le lien entre le taux d'expression d'un ARN avec la proportion de chimères produites composées de ce même ARN pourra être confirmé en réalisant des analyses transcriptomiques sur les échantillons issus de la culture de bactérie à l'origine de l'expérience du DBRI. Par ailleurs, dans les échantillons sans ligase (1- et 2-) on retrouve majoritairement deux fois plus de chimères associées à l'ARN III ou aux Rsa que les échantillons traités avec ligase (1+ et 2+). La question se pose alors sur une éventuelle circularisation après ligation des extrémités 5' A des deux partenaires ARN ou d'une ligation qui aurait eu lieu durant la préparation des bibliothèques destinées au séquençage à haut débit.

Parmi les chimères obtenues, on retrouve quatre chimères RsaI/RsaE (**figure 56**) dont les séquences suggèrent que l'interaction entre ces deux sARN s'établit entre le second motif riche en G de RsaI et le second riche en C de RsaE. Ces données concordent avec les résultats obtenus lors du **chapitre 2**, qui montrent que la mutation du second motif riche en C de RsaE annule l'interaction avec RsaI. On retrouve également deux chimères PSM β /RsaE : l'une comporte une région de l'ORF de *psm β 1* et la seconde identifie la région 5'UTR de *psm β 2*. Cette dernière tend à valider que l'interaction de RsaE/*psm β 2* caractérisée lors du **chapitre 1** a lieu également dans le contexte cellulaire *in vivo*. Concernant les interactions sARN/*mgrA* déjà décrites, on retrouve une chimère RsaA/*mgrA* et ARN III/*mgrA*. L'interaction de l'ARNm *mgrA* avec RsaA a été caractérisée par Romilly *et al.* (2014) dont les résultats montrent que ces deux ARNs possèdent deux sites d'interactions essentiels à l'inhibition de la traduction de

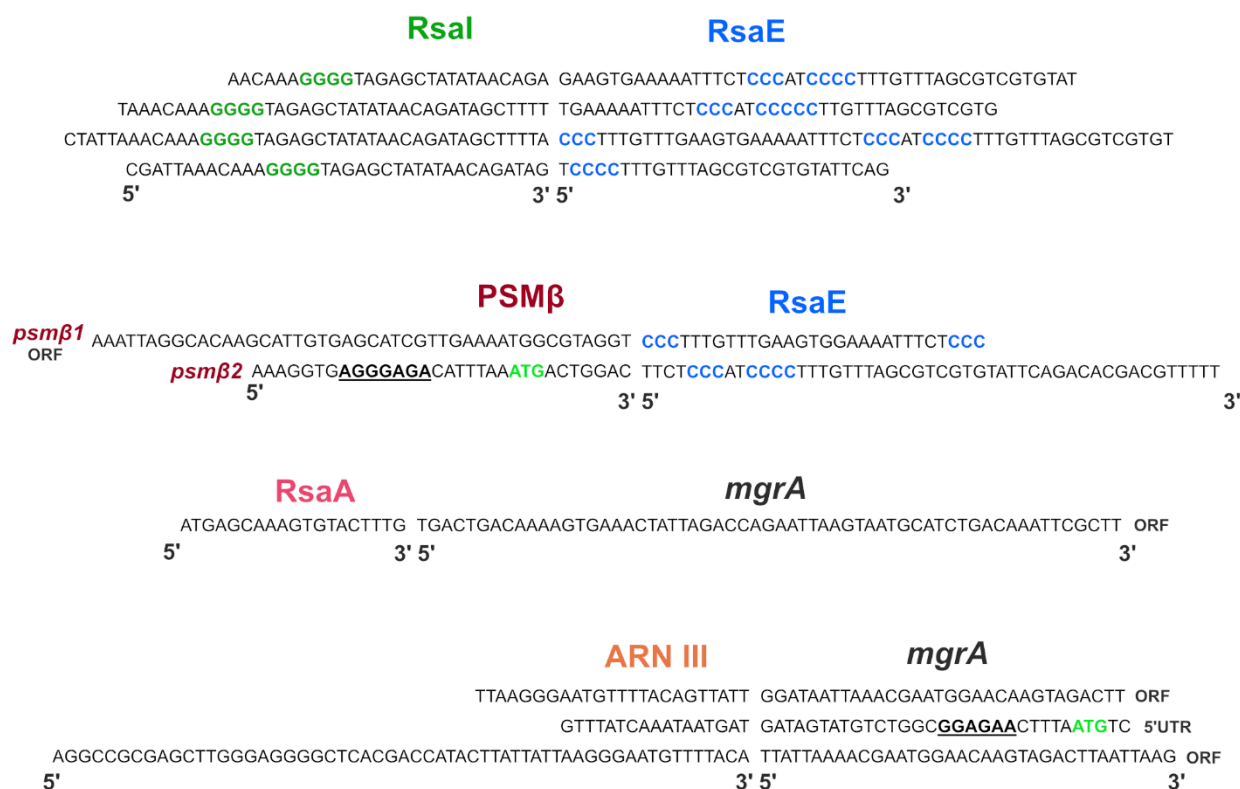


Figure 56 : Exemples de chimères obtenues à l'issu du protocole du DBRI. La séquence SD, les motifs riches en **G** de RsaI et riches en **C** de RsaE sont indiqués. La première séquence de l'ARNm de l'opéron PSMβ correspond à la séquence codante (**ORF**) de *psmβ1*, la seconde séquence correspond à la région 5'UTR de *psmβ2*. Deux des séquences de l'ARNm *mgrA* identifiées dans les chimères appartiennent à la région codante, une correspond à la région 5'UTR de l'ARNm et comporte la séquence SD et le **codon START**.

	ARN cible	Lectures		ARN cible	Lectures
ARN III	<i>hla</i>	4	RsaA	<i>mgrA</i>	1
	<i>sbi</i>	3		<i>ebh</i>	1
	<i>map</i>	1	SSR42	<i>spa</i>	1
	<i>rot</i>	1		<i>hla</i>	1
	<i>SprY</i>	17	Teg49	<i>psmA</i>	1
	<i>spa</i>	1		RsaE <i>RsaI</i>	8

Tableau 10 : Exemples d'interactions ARN/ARN déjà décrites dans la littérature.
Les chimères ont été produites par la méthode du DBRI.

mgrA. Néanmoins aucun de ces deux sites localisés sur *mgrA* ne correspondent à la séquence identifiée au sein de la chimère. Plusieurs chimères ARN III/*mgrA* ont été identifiées, cette interaction a été décrite par Gupta *et al.* (2015) dont les données montrent que la liaison de l'ARN III au niveau de la région 5'UTR de *mgrA* stabilise le messager. Selon cette étude, l'interaction aurait lieu à plus de 50 nt du codon START de *mgrA* et donc ne correspond pas à la chimère comportant la séquence SD.

Concernant les chimères liées à l'ARN III, cet ARN est à l'origine de nombreuses chimères, par conséquent de nombreuses cibles ont été retrouvées comme *hla*, *sbi*, *rot* et particulièrement SprY (**tableau 10** ; Le Huyen *et al.*, 2021). D'autres chimères issues d'interactions sARN/ARNm connues ont été produites comme SSR42/*hla*. En conclusion, la technique de DBRI permet de produire des chimères ARN qui reflètent des interactions sARN/ARNm déjà décrites et étudiées, et mettant en lumière l'efficacité de la méthode.

Discussion & perspectives

L'étape de ribodépletion est cruciale mais limite la quantité d'ARN obtenu

Le principal inconvénient du protocole du DBRI est la quantité limitée d'ARN obtenue. En effet, l'étape de déplétion des ARNr repose sur l'utilisation d'un kit dont les instructions spécifient que la quantité maximale d'ARN traitée ne doit pas dépasser 5 µg. Etant donné l'écrasante quantité d'ARNr que l'on retrouve dans les échantillons d'ARN extrait, 98 % des ARNs sont perdus après la déplétion. De ce fait, la suite du protocole du DBRI s'effectue avec 100 ng d'ARN, et la succession d'étapes amplifie progressivement la perte des ARN. C'est pourquoi deux traitements de déplétion des ARNr ont été effectués par échantillon ce qui a permis de doubler les quantités finales d'ARN obtenus. Cette étape de ribodépletion est essentielle puisque ces ARNr représentent une énorme proportion des ARN totaux qui risquerait à la fois de diminuer l'efficacité des étapes du DBRI et de polluer le séquençage des chimères. La faible quantité d'ARN obtenue est donc à la fois un bon indice du succès de la déplétion des ARNr qui potentialise l'efficacité et la réussite du protocole, mais également une limite évidente quant au séquençage final qui devra être effectué à partir d'une infime quantité de matériel biologique. A noter que le kit de ribodépletion développé par SiTOOLS et utilisé

lors de cette expérience de DBRI repose sur l'utilisation de plus de 30 à 350 sondes spécifiques des ARNr de *S. aureus*. Par conséquent, les ARNr qui échappent à l'étape de ribodépletion et qui sont présents dans les échantillons sont conservés intacts : ces ARNr présentent de nombreuses interactions intramoléculaires qui seront purifiées et qui conduiront à la formation de chimères ARNr/ARNr.

Comme il a été mentionné précédemment, la quantité d'ARN obtenue n'a pas été limitante pour la préparation de la librairie du séquençage à haut débit. Néanmoins l'idéal serait d'obtenir une quantité de chimères suffisante pour pouvoir couvrir l'étendue des interactions ARN/ARN dans sa globalité. L'objectif est d'identifier toutes les interactions ARN/ARN et celles qui sont majoritaires dans les conditions de culture seront logiquement plus représentées au sein des chimères. La quantité d'ARN obtenue sera un aspect limitant de la couverture globale des partenaires ARN/ARN identifiés : si la quantité d'ARN est limitée, on ne pourra identifier que les interactions ultra-majoritaires. On remarquera que la moindre différence d'efficacité de l'étape de ribodépletion se visualise directement au niveau des échantillons, comme il a été le cas entre le réplica 1 et le réplica 2 avec une différence notable de la quantité d'ARN récupérée à la fin de l'expérience. En effet, la grande proportion de chimères composées d'ARNr était également associée à une grande quantité d'ARN obtenus à la fin du protocole DBRI. Il est important de préciser que l'étape de ribodépletion ne permet pas d'éliminer complètement les ARNr mais qu'elle permet de réduire drastiquement la présence de ces ARN. Les ARNr sont particulièrement structurés et seront pontés par le PTA : s'ils ne sont pas éliminés lors de la ribodépletion, ils seront sélectionnés et purifiés comme tous les autres duplexes ARN/ARN pontés par la molécule.

L'étape de ligation des extrémités adénylées pourrait produire des chimères circulaires

Comme il a été observé après séquençage des chimères, les échantillons sans ligase comportent une plus grande quantité de chimères notamment celles impliquant les sARN ARN III et Rsa. L'hypothèse serait que la ligation pourrait conduire à la formation de chimères circulaires qui ne pourraient pas être séquencées suite à l'impossibilité d'ajouter les adaptateurs requis lors de la préparation de la librairie. Evidemment, la fragmentation n'est pas envisageable puisqu'elle interférerait avec l'identification des chimères. Une solution serait alors de diminuer le temps de ligation ou la quantité de ligase ajoutée afin de limiter la production de ces ARN circulaires. Il semblerait également que les chimères soient produites même en l'absence de ligase, remettant en question la nécessité de cette étape.

Le témoin négatif ne doit pas reposer sur la ligation mais sur l'étape de pontage

Les profils des échantillons ARNs obtenus par le Bioanalyzer sont les mêmes, que ce soit avec ou sans étape de ligation. Ces observations suggèrent que les chimères sont produites avec ou sans la ligase. En effet, les résultats des séquençages des chimères dévoilent que l'absence de ligase n'impacte aucunement la production puis l'identification de chimères. La question se pose donc sur le choix du témoin négatif : l'objectif est de visualiser toutes les interactions non spécifiques qui sont récoltées à la fin du protocole du DBRI. Seule la ligase manquait à la production des témoins négatifs, ce qui signifie que les ARNs qui interagissent ont tout de même été pontés, sélectionnés, digérés, adénylés, et visiblement séquencés en l'état de chimères. La précédente expérience de DBRI effectuée par Emma Desgranges (thèse, non publié) reposait sur l'absence de ligase comme témoin négatif, et les résultats obtenus montrent un nombre réduit de chimères en l'absence de ligase, comme attendu. La ligation des extrémités auraient donc eu lieu lors de la préparation des librairies pour le séquençage à haut débit, notamment les traitements liés à la fixation des adaptateurs.

Au vu des artefacts générés dans la condition contrôle sans ligation, l'approche envisagée serait de cibler une autre étape cruciale : le pontage *in vivo* des ARNs. En effet, les témoins négatifs devront être réalisés selon le protocole détaillé précédemment mais sans ajout de PTA au sein de la culture. De cette manière, les ARN issus de ces échantillons seront exclusivement issus d'interactions ARN/ARN qui ont été sélectionnés et identifiés de manière non spécifique, c'est-à-dire indépendamment du pontage, de la réaction *click* et de la sélection par la biotine. Néanmoins l'efficacité du pontage par le PTA est difficile à mesurer : les ARNs non pontés ne seront ni purifiés ni séquencés. Par ailleurs, une autre possibilité de témoin négatif serait l'absence de *réaction click*, où on obtiendrait des ARNs pontés mais sans biotine ajoutée. Dans ce cas, les chimères produites seraient issues d'une purification aspécifique de duplexes ARN. En conclusion, les résultats issus des échantillons sans ligase ont été analysés comme les autres échantillons puisque les chimères ont été tout de même obtenues. Les résultats sont donc une bonne indication sur l'efficacité de la procédure mais ne permettent pas encore de déterminer quelles sont les interactions spécifiquement enrichies dans les conditions de culture choisies.

La méthode de DBRI permet de produire des chimères ARN issues d'interactions sARN/ARNm déjà connues

Afin d'évaluer la pertinence et l'efficacité de la méthode du DBRI, les chimères issues d'interactions ARN/ARN déjà décrits ont été analysées. Parmi toutes les interactions sARN/ARNm, on retrouve des chimères comportant l'ARN III en grandes quantités. L'ARN III est un régulateur majeur de la virulence chez *S. aureus*, et abondant dans les conditions de croissance utilisées pour l'expérience. De ce fait, l'abondance de l'ARN III augmente la probabilité de retrouver des chimères ARN III/cibles ARNm si le protocole du DBRI s'avère efficace. En effet, on retrouve de nombreuses cibles de l'ARN III, spécifiquement la chimère ARN III/SprY. Ce dernier agirait comme une « éponge » à ARN III et inhiberait son action (Le Huyen *et al.*, 2021). La présence de ces chimères qui reflètent des interactions ARN/ARN déjà étudiées tendent à confirmer l'efficacité de la technique du DBRI dans la visualisation de l'interactome. Néanmoins, on remarquera que certains sARN comme RsaI et RsaE ne présentent aucune chimère avec les cibles déjà étudiées (cf **Introduction**), hormis leur propre interaction, c'est-à-dire la chimère RsaI/RsaE. Cette observation remet en lumière certaines difficultés à obtenir une couverture suffisante, une quantité de chimères suffisamment élevée pour s'affranchir des taux d'expression des ARNs. Comme il a déjà été évoqué, si RsaI n'est pas assez exprimé au sein de la cellule alors la quantité de chimère associée sera diminuée et la vision de l'interactome associé à ce sARN sera limitée. Pour autant, l'aspect global de l'interactome ARN/ARN est logiquement associée à une vision moins précise de chaque interactome spécifique à un ARN en particulier. La détermination de l'interactome ARN/ARN de la méthode du DBRI dépend beaucoup des conditions de culture associées aux profils d'expressions spécifiques à chaque ARN dont la quantité jouera sur le nombre de chimères produites.

Prochaines étapes dans le développement de la technique du DBRI

Outre le changement des témoins négatifs sans PTA, le séquençage du transcriptome peut être réalisé en parallèle de la méthode du DBRI. Ces données de transcriptomes permettraient d'évaluer si l'enrichissement particulier d'un ARN dans les chimères obtenues était dû à une forte expression de cet ARN ou s'il reflète une forte implication de cet ARN dans les interactions. Par ailleurs, la technique de DBRI devra être appliquée dans différentes conditions. Dans le cas présenté ci-dessus, les cultures des bactéries ont eu lieu dans un milieu riche, lors de la phase post-exponentielle de croissance. Le protocole pourra être effectué dans

des conditions particulières comme lors de stress (NO, anaérobie, carences) ou même lors de la formation des biofilms en plaque de polystyrène. Concernant les biofilms, un des points limitants sera la diffusion du PTA à travers la matrice qui, comme c'est le cas pour les antibiotiques, risque d'être limitée. Des essais devront être effectués au préalable afin de s'assurer de la pénétration du PTA les cellules composant le biofilm, et pas seulement celles présentes aux périphéries. L'objectif à terme est de comparer les résultats obtenus entre une culture en BHI et des cultures spécifiques. L'interactome obtenu pour ces cultures devra mettre en évidence l'enrichissement de certains couples ARNs. Par exemple, lors de la culture en biofilm on s'attend à retrouver des chimères qui n'apparaîtront pas lors de la culture en BHI, c'est-à-dire des couples ARN-ARN impliqués dans la régulation de la formation des biofilms. Dans ce cas précis, on s'attendrais à obtenir un enrichissement des chimères RsaE-PSM ou alors sARN-*icaR*, ou tout autre chimère incluant les ARNm des composants de la matrice des biofilms comme les protéines de surfaces ou les ARNm impliqués dans la sécrétion d'ADNe. Une autre condition de culture qui paraît intéressante est la carence de glucose, qui devrait conduire à un enrichissement spécifique des chimères comportant RsaI et ses ARNm cibles liés au métabolisme du glucose. Toutes ces expériences de DBRI devront permettre de retrouver des chimères reflétant des interactions sARN-ARNm déjà décrites dans la littérature et prouvant la spécificité et l'efficacité du protocole de DBRI. Après la finalisation de la méthode, notamment la confirmation de la pertinence des témoins négatifs, cette technique permettra de dévoiler toutes les interactions ARN-ARN qui ont lieu au sein de la bactérie. Le DBRI permettra alors d'identifier à large échelle de nouveaux acteurs impliqués dans les réseaux de régulations médiés par les sARN.

Comparaison avec la méthode du LIGR-seq appliquée chez *B. subtilis*

La méthode du LIGR-seq développée par Sharma *et al.* en 2016 a été appliquée chez une bactérie à coloration de Gram positive, *B. subtilis* par l'équipe de Durand *et al.* (2021). Leur protocole correspond à celui du LIGR-seq, c'est-à-dire à un pontage réalisé *in vivo* par l'AMT, une étape de ribodépletion, la ligation des extrémités à la circRNA ligase, la digestion des extrémités 3'OH à la RNase R et enfin le séquençage à haut débit des chimères. A la différence du DBRI, le protocole n'inclut pas d'étape de purification des ARNs pontés par l'association d'une réaction click d'ajout de biotine et d'une purification de ces complexes biotinylés par les billes de streptavidines. Comme il a été le cas dans notre expérience de DBRI, aucune des trois cibles caractérisées de RoxS (l'équivalent de RsaE chez *B. subtilis*) n'ont été

identifiées par LIGR-seq. Cette observation semble également être liée aux conditions de cultures choisies qui ne favorisent pas l'expression du sARN. Concernant le choix du témoin négatif, l'identification des interactions aspécifiques reposent sur la réalisation du protocole en l'absence d'AMT et a permis de déterminer un enrichissement significatif des interactions pontés par l'AMT. L'absence de la molécule à l'origine du pontage *in vivo* des duplexes ARN/ARN semble donc être une bonne stratégie pour identifier des duplexes ARN/ARN spécifiques.

Conclusion générale

Les ARN régulateurs sont au cœur des systèmes de régulation bactériens et sont des acteurs essentiels du contrôle de l'expression de la virulence, de la résistance aux stress, des changements métaboliques et de la formation de biofilm. Mes travaux de thèse se focalisent sur la régulation de la formation de biofilm chez *S. aureus* médiée par les ARN régulateurs, sur la caractérisation des interactions ARN-ARN associées et des mécanismes moléculaires déployés dans ce contexte. Le sARN RsaE joue un rôle dans la formation de biofilm *ica*-dépendant : il inhibe l'expression du répresseur majeur des biofilms IcaR et active l'expression de l'opéron *icaADBC*, mais l'effet sur la production de PIA/PNAG doit encore être démontré. La formation du duplexe RsaE/*icaR* implique le premier motif riche en C de RsaE et entraîne le clivage de la région 5'UTR *icaR*. D'un autre côté, RsaE module la production de composés de la matrice de biofilm *ica*-indépendant notamment les PSMs et l'ADNe. L'absence de RsaE diminue la production de biofilms dont la sensibilité aux traitements DNase I et protéinase K est réduite ; en parallèle RsaE semble activer l'expression de PSM β 2 mais l'action régulatrice et les mécanismes moléculaires de RsaE envers l'expression des PSM α doivent encore être démontrés.

En agissant sur les deux types de biofilms formés par *S. aureus* mais également en ciblant directement des acteurs du métabolisme central, ce sARN est un exemple passionnant des liens étroits et complexes tissés entre les différents réseaux de régulations. De plus, il a été montré par des expériences de CLASH que la RNase III non seulement reconnaît les duplexes RsaE/*psm* mais également RsaE/RsaI. Ces interactions entraînent respectivement une activation de l'activité hémolytique de la bactérie et une dérégulation des cibles de RsaE (par exemple *citC* et *gcvPA*) suggérant un effet d'éponge de RsaI envers RsaE. Ces expériences ajoutent un partenaire supplémentaire au système de régulation médié par RsaE mais le rôle de la RNase III reste à définir dans la régulation post-transcriptionnelle des cibles à l'origine de la production de biofilms. Des sites de clivage ont été identifiés *in vitro* du côté de RsaE en présence du transcrit *psma* mais également avec RsaI. Nous pouvons nous demander si RsaE subit une maturation *in vivo* par la RNase III, en présence de RsaI, afin d'activer les biofilms par la stimulation de la production des PSM ou par l'inhibition de la traduction d'*icaR*. Pourtant, *in vitro*, l'affinité de RsaE semble suffisante pour se lier à la région RBS d'*icaR* en présence de RsaI, ce qui suggère que dans ces conditions RsaI n'interviendrait pas.

La liaison de RsaI avec RsaE connecte la régulation du métabolisme central et de la formation de biofilm avec les réseaux liés à RsaI c'est-à-dire la modulation du métabolisme des sucres. Le schéma global de la régulation de la production de biofilm *ica*-dépendant s'étend davantage puisque les expériences de MAPS révèlent la présence de trois partenaires potentiels à l'ARNm *icaR* : RsaE et RsaI mais également RsaA. Ces deux dernier sARN agissent indépendamment l'un de l'autre sur *icaR* : RsaI entraîne l'augmentation de la production de PIA/PNAG en se liant à la région 3'UTR d'*icaR* (Bronesky *et al*, 2019) et RsaA hybride partiellement la région anti-SD mais son effet sur le messager demeure incertain. La présence seule de RsaA ne suffit pas à réguler l'ARNm *icaR* mais semble influencer l'action de RsaI et/ou RsaE sur la régulation de l'expression de l'opéron *icaADBC*. Comment ce sARN s'intègre dans la relation établit entre *icaR*, RsaI et RsaE ? L'impact de RsaA sur la formation des duplexes RsaI/*icaR* et RsaE/*icaR* et donc sur la régulation de l'expression d'*icaR* reste une question en suspens. RsaA coordonne les systèmes de régulation de la formation de la capsule et de l'expression de protéines de surfaces en inhibant *mgrA* (Romilly *et al*, 2014) à celui de la production de biofilm *ica*-dépendant. La liaison de ces trois sARN au niveau d'une zone distincte de l'ARNm *icaR* apporte une dynamique à la régulation de la production de biofilm *ica*-dépendant en réponse à divers stimuli extra-cellulaires : les stress dépendant du facteur sigma B pour RsaA, l'anoxie et la concentration en NO pour RsaE et la carence en glucose pour RsaI. Les résultats obtenus laissent imaginer une incidence de la présence de chacun de ces sARN sur la régulation de l'expression de *icaR* mais la dynamique mise en place reste à identifier et à caractériser avec précision.

C'est pourquoi le développement des techniques d'analyse à large échelle des interactions ARN-ARN sont cruciales dans la compréhension et la caractérisation des interactomes bactériens. Dans cet objectif, le développement de la méthode du DBRI représente un enjeu majeur dans la modélisation des interactions sARN/ARNm spécifiques à des conditions données, notamment celles rencontrées lors d'une infection (carences en nutriments, stress, biofilms). L'expérience de DBRI présentée dans ce manuscrit a été réalisée en milieu de culture riche lors de la phase exponentielle de croissance de la bactérie afin d'optimiser et de valider la méthode. Les résultats issus de cette expérience mettent en évidence des interactions sARN/ARNm déjà décrites et étudiées comme le duplexe ARN III/*mgrA*, ARN III/*SprY* ou encore SSR42/*spa*. On retrouve également des chimères RsaE/RsaI et *psmβ*/RsaE confirmant que les interactions décrites **chapitre 1** et **chapitre 2** ont lieu *in vivo* et sont détectées par le DBRI. En plus d'identifier les partenaires des interactions ARN/ARN, les chimères obtenues

permettent de visualiser les zones de chaque ARN impliquées dans les interactions. De ce fait, le DBRI pourrait permettre de confirmer l'interaction de l'ARNm *icaR* avec RsaI, RsaA et RsaE mais également de valider à la fois la localisation des liaisons de ces sARN à *icaR* mais aussi les motifs impliqués dans la formation de duplexe. Ces interactions avec *icaR* n'ont pas été mise en évidence lors de cette expérience, il sera donc crucial de reproduire le protocole du DBRI en condition de formation de biofilm *ica*-dépendant afin de caractériser *in vivo* la régulation d'*icaR* par ces sARN ; mais également en condition de formation de biofilm *ica*-indépendant afin de valider et caractériser les interactions RsaE/*psmA* et RsaE/*psmβ*. Ces données seront capitales afin de confirmer les sites de fixation de RsaE sur l'opéron *psmA* et *psmβ*. D'un autre côté, ces résultats pourront valider la formation des duplexes RsaE/*lrgAB* et RsaE/*pnfB* ou encore d'autres interactions encore inconnues impliquant RsaE, RsaI ou RsaA. De manière globale, le DBRI est un outil complémentaire d'étude à large échelle de l'étude des réseaux de régulation de la formation de biofilm. La méthode pourra être appliquée dans de multiples conditions de culture et mettre en lumière les interactions ARN/ARN spécifiques aux signaux environnementaux exposés à la bactérie. En conclusion, la **figure 57** présente tous les acteurs protéiques et ARN reliant RsaA, RsaI et RsaE qui sont placés au cœur de la régulation du métabolisme, de l'expression des facteurs de virulence et bien évidemment de la formation de biofilm.

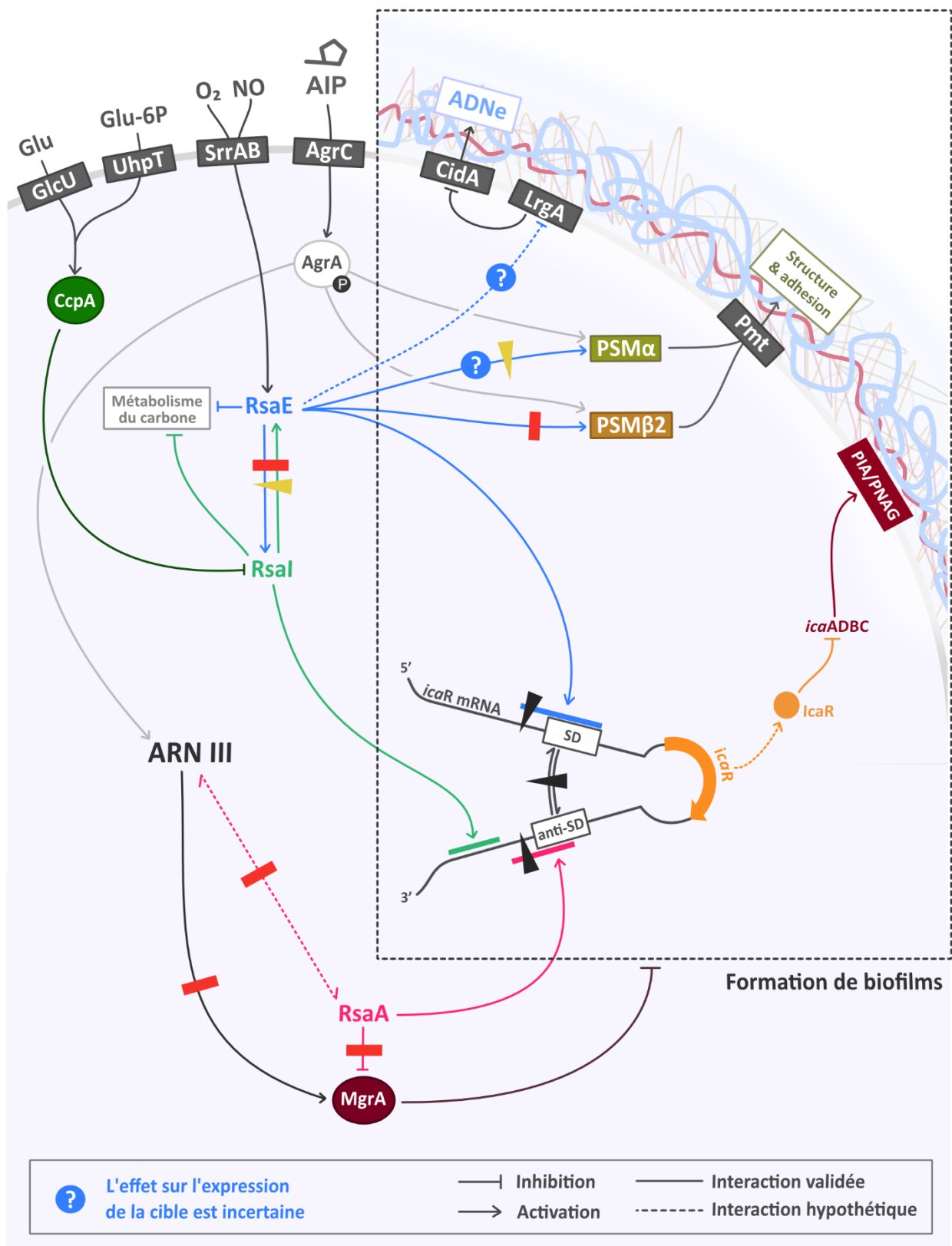


Figure 57 : Mécanismes de régulations liant les sARN *RsaI*, *RsaA* et *RsaE* et la formation de biofilm
 Les triangles représentent les interactions qui sont ciblées par la RNase III et confirmé expérimentalement par des expériences de clivage réalisées *in vitro* ◀ ou par les données de CLASH obtenues *in vivo* ▶ (McKellar et al. 2022). Les ■ sont les interactions ARN/ARN validées *in vivo* par la méthode de DBRI.

Matériel & Méthodes

I. Liste des oligonucléotides

Tableau 9 : Oligonucléotides utilisés lors des expériences. Le promoteur de la T7 polymérase, les sites de restrictions des enzymes sont indiqués. fw : *forward*, rv : *reverse*

Nom	Séquence	Expérience
T7 fw 5' <i>icaR</i>	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> AAATATTTGTAATTGCCAACTTAATTT	Transcription <i>in vitro</i>
rv 5' <i>icaR</i>	TCAAAACAACATTTAACACTTTG	
T7 fw 3' <i>icaR</i>	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> CTTTATATTTGTGAATGGTTAAGTTTGTCTTTGAAC	
rv 3' <i>icaR</i>	AAAAAGCGCCTATGTCATGATTTACCATCA	
T7 fw <i>RsaE</i>	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> TGAAATTGATCACAAAC	
rv <i>RsaE</i>	AAAAAAACGTCGTGTCTGAATAC	
T7 fw <i>RsaI</i>	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> GGTAACAGGGGGAGCGATTA	
rv <i>RsaI</i>	AAAAAAATCGGCTAGTCACG	
T7 fw <i>RsaA</i>	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> AGTTAACCATTACAAAAATTGTATAGAG	
rv <i>RsaAT1</i>	AAAGTACACTTTGCTCATAG	
rv <i>RsaAT2</i>	CGCCTGCAGAATAAAAAATTCCAAGCTTATCGG	
T7 fw <i>psmA</i>	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> AACTCATAAGCAAAGGAGGTAATC	
rv <i>psmA</i>	TTATTTTGCGAAAATGTCGATAATTG	
rv <i>psmA1</i>	CTTATTTACCAGTGAATTGTTTCG	
T7 fw <i>psmA2</i>	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> ATTTCATAACAAACAAAGGAG	
rv <i>psmA2</i>	CTTACTTACCAGTGAATTTCTC	
T7 fw <i>psmA3</i>	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> TTATAAAAAATCTCATAGATATG	
rv <i>psmA3</i>	TTAGTTGTTACCTAAAAATTTACC	
T7 fw <i>psmβ</i>	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> CAACAAAACGTTAAGCGAAT	
rv <i>psmβ</i>	CACCCAGTTTATTTTAAAGAATATT	

Nom	Séquence	Expérience
fw RsaI	TAACAGGGGGAGCGATTAAA	Production de la sonde DIG par transcription <i>in vitro</i>
T7 rv RsaI	TAATACGACTCACTATAGGG GCACGTGCTAGCCGACAAATA	
fw RsaE	GAAATTAATCACATAACAAACATA	
T7 rv RsaE	TAATACGACTCACTATAGG CGTCGTGTCTGAATACACGA	
fw RsaA	CCATTACAAAAATTGTATAG	
T7 rv RsaA	TAATACGACTCACTATAGGG GCAAAGTACACTTTGCTCATAGC	
T7 rv 5S	TAATACGACTCACTATAGGG GATTTGTCATTGCGCTGGC	
fw 5S	GTAAGTTATTTGTCTGGTGGCTATAGC	

Nom	Séquence	Expérience
<i>icaR</i> toe	CACTTTTAGCTATATCATCAAG	Empreinte du ribosome
psma1 toe	CTTTGTTTGTTATGAAATCTTATTACC	
psmβ2 toe	CCGTTAGCAACGATGTCTACGA	

Nom	Séquence	Expérience
BAMHI-Fw-Up-RsaE	CGC GGATCC GTTTCAGAGCTACATTATTCCG	Construction pMAD -RsaE
SPHI-Rev-Up-RsaE	CATA GCATGC GTTTCATAATATAACATGCTATCTCTAC	
SPHI-Fw-Down-RsaE	CATA GCATGC TTATGTTCTTTTAAATAAGGGAAG	
SAMI-Rev-Down-RsaE	CGC CCCGGG GGGTAAACCTATCGAAAAGAATC	
BAMHI-Fw-Up-RsaA	CGC GGATCCC CAAGTTGCGTTTTTGCTTCGG	Construction pMAD -RsaA
SPHI-Rev-Up-RsaA	CATA GCATGC AATATTATTTAACTATTGAAATATTGAAAC	
SPHI-Fw-Down-RsaA	CATA GCATGC CGTACCAATGTATTAAGAAATCGC	
BGLII-Rev-Down-RsaA	CGC AGATCT GTTATTATGGTCTTACGTCCTG	
PSTI-Fw-RsaE	CGC CTGCAG GTCATCAAATTTAACAGAAGGTAAGCC	Construction pCN38-RsaE
SPHI-Rv-RsaE	CGC GCATGC AAAAAACGTCGTGTCTGAATACACGAC	
BAMHI-Fw-PSMB	CGC GGATCC CAGGCAACTTAATTGTGTTAAATAC	Construction pCN38-PSMB-3XF
ECORI-Rv-PSMB-3XF	CGCC GAATTC TTATTTATCATCATCATCTTTATAATCTTTAT	
	CATCATCATCTTTATAATCTTTATCATCATCATCTTTATAATCGAATCCAAATAATTTACCTAGTAAACCC	

II. Souches & plasmides

a) Liste des souches et des plasmides

Tableau 10 : Liste des souches bactériennes utilisées lors des expériences

	Souche	Caractéristiques	Références
<i>E. coli</i>	DH5α	Mutation des gènes <i>recA1</i> , <i>endA1</i> et <i>lacZΔM15</i> afin de favoriser la transformation de plasmides	Taylor (1993)
	IM08B	Dérivée de <i>E. coli</i> K12 DH10B, absence du gène <i>dcm</i> (méthylation de cytosine)	Monk <i>et al.</i> (2015)
<i>S. aureus</i>	HG001	Dérivée de <i>S. aureus</i> 8325-4, <i>rsbU</i> restauré RN1, agr +	Herbert <i>et al.</i> (2010)
	HG001Δ <i>rsal</i>	Déletion de <i>rsal</i>	Bronesky <i>et al.</i> (2019)
	HG001Δ <i>rsaA</i>	Déletion de <i>rsaA</i>	Cette étude
	HG001Δ <i>rsaE</i>	Déletion de <i>rsaE</i>	Cette étude
	HG001Δ <i>rsal</i> Δ <i>rsaA</i>	Déletion de <i>rsal</i> et <i>rsaA</i>	Cette étude
	HG001Δ <i>rsal</i> Δ <i>rsaE</i>	Déletion de <i>rsal</i> et <i>rsaE</i>	Cette étude
	HG001Δ <i>rsaA</i> Δ <i>rsaE</i>	Déletion de <i>rsaA</i> et <i>rsaE</i>	Cette étude
	HG001Δ <i>rsal</i> Δ <i>rsaA</i> Δ <i>rsaE</i>	Déletion de <i>rsal</i> , <i>rsaA</i> et <i>rsaE</i>	Cette étude

Tableau 11 : Liste des plasmides utilisés lors des expériences

Nom	Description	Références
pCN38	Vecteur vide , Amp ^R <i>E.coli</i> - Cam ^R <i>S. aureus</i>	Charpentier <i>et al.</i> (2004)
pCN38-PSMβ2-3XF	pCN38 exprimant l'opéron PSMβ sous son propre promoteur, ajout de l'étiquette 3XF à l'extrémité 3' du gène PSMβ2	Cette étude
pCN38-RsaA	pCN38 exprimant RsaA sous son propre promoteur	Tomasini <i>et al.</i> (2017)
pCN38-RsaE	pCN38 exprimant RsaE sous son propre promoteur	Cette étude
pCN38-Rsal	pCN38 exprimant Rsal sous son propre promoteur	Cette étude
pCN52-PicaA-GFP	Promoteur de l'opéron <i>icaA</i> fusionné au gène codant pour la GFP, Amp ^R <i>E.coli</i> - Ery ^R <i>S. aureus</i>	Valle <i>et al.</i> (2019)
pCN-PSMα1-3XF	pCN exprimant l'opéron PSMα sous son propre promoteur, ajout de l'étiquette 3XF à l'extrémité 3' du gène PSMα1	Menendez-Gill <i>et al.</i> , non publié
pCN-PSMα2-3XF	pCN exprimant l'opéron PSMα sous son propre promoteur, ajout de l'étiquette 3XF à l'extrémité 3' du gène PSMα2	Menendez-Gill <i>et al.</i> , non publié

pMAD	Utilisé pour la génération de mutants, discrimination bleu/blanc (<i>lacZ</i>) par ajout de X-gal, Amp ^R <i>E.coli</i> - Ery ^R <i>S. aureus</i>	Arnaud <i>et al.</i> (2004)
pMAD-RsaA	Vecteur suicide pour la deletion du gène <i>ΔrsaA</i>	Cette étude
pMAD-RsaE	Vecteur suicide pour la deletion du gène <i>ΔrsaE</i>	Cette étude
pMAD-RsaI	Vecteur suicide pour la deletion du gène <i>ΔrsaI</i>	Bronesky <i>et al.</i> (2019)

b) Construction des plasmides

Tous les oligonucléotides nécessaires à la construction des plasmides sont indiqués **tableau 9**. La souche de *E. coli* DH5α est utilisée pour amplifier les plasmides, dont la transformation dans cette souche est réalisée par choc thermique §II.c.1.

1. Plasmide de mutagenèse pMAD-RsaA & pMAD-RsaE

Des mutants de délétion du gène *rsaA* et *rsaE* sont effectués par recombinaison homologue §II.c.3. en utilisant le plasmide pMAD (Arnaud *et al.*, 2004). La région de 568 nt et 556 nt respectivement en amont et en aval de *rsaA* a été amplifiée par PCR (cf §V) en utilisant les oligonucléotides : BAMHI-Fw-Up-RsaA-SPHI-Rev-Up-RsaA et SPHI-Fw-Down-RsaA-BGLII-Rev-Down-RsaA. La région de 560 nt et 483 nt respectivement en amont et en aval de *rsaE* a été amplifiée par PCR (cf §V) en utilisant les oligonucléotides : BAMHI-Fw-Up-RsaE-SPHI-Rev-Up-RsaE et SPHI-Fw-Down-RsaE-SAMI-Rev-Down-RsaE. Le vecteur pCN38 et chaque fragment généré par PCR ont été digérés 2 h à 37 °C avec 10 U des enzymes citées puis purifiés avec le kit nucleospin gel & PCR clean-up (*Macherey-Nagel*). Les fragments PCR digérés sont incubés une nuit à 18 °C, avec le vecteur pCN38 digéré, 100 U de T4 DNA ligase (*New England's*) dans du tampon associé 1 X pour un volume final de 20 µl. Le produit de ligation est transformé dans la souche *E. coli* DH5α et les clones sont sélectionnés sur gélose LB supplémentée d'ampicilline (100 µg/ml). Les plasmides construits sont vérifiés par PCR et séquencé (*GATC biotech*) avant la transformation des plasmides dans *E. coli* IM08B, extraction puis transformation dans *S. aureus* (§II.c.2.).

2. Plasmide de complémentation pCN38-RsaE et plasmide d'expression pCN38-PSM β 2-3XF

La région comportant la région promotrice et le gène *rsaE* a été amplifiée par PCR (cf §V) en utilisant les oligonucléotides : PSTI-Fw-RsaE-SPHI-Rv-RsaE ; BAMHI-Fw-PSMB-ECORI-Rv-PSMB-3XF. Le vecteur pCN38 et le fragment généré par PCR ont été digérés 2 h à 37 °C avec 10 U des enzymes associées puis purifiés avec le kit nucleospin gel & PCR clean-up (Macherey-Nagel). Les fragments PCR digérés sont incubés une nuit à 18 °C, avec le vecteur pCN38 digéré, 100 U de T4 DNA ligase (*New England's*) dans du tampon associé 1 X pour un volume final de 20 μ l. Le produit de ligation est transformé dans la souche *E. coli* DH5 α et les clones sont sélectionnés sur gélose LB supplémentée d'ampicilline (100 μ g/ml). Les plasmides construits sont vérifiés par PCR et séquencé (*GATC biotech*) avant la transformation des plasmides dans *E. coli* IM08B, extraction puis transformation dans *S. aureus* (§II.c.2.).

c) Transformation des souches

1. Transformation de *E. coli*

La transformation nécessite 100 μ l de cellules chimio-compétentes qui ont été préparées au laboratoire. Les bactéries sont incubées 20 min dans la glace avec 100 ng de plasmide. Les cellules subissent un choc thermique (1 min à 42 °C). Puis 900 μ l de LB sont ajoutés et les bactéries sont cultivées durant 30 min à 37 °C sous agitation. Après centrifugation (15 min, 780 g, 4° C), le culot est repris dans 100 μ l de LB et est étalé sur milieu solide LB contenant de l'ampicilline (100 μ g/ml).

2. Transformation de *S. aureus*

Les plasmides ont été transformés dans la souche *E. coli* IM08B puis, après une nouvelle extraction plasmidique, sont transformés dans la souche *S. aureus* HG001. Afin d'obtenir des cellules compétentes, les souches de *S. aureus* sont cultivées dans 20 ml de BHI (37 °C, sous agitation) Quand les cultures atteignent la DO_{600nm} = 0,3-0,4, les bactéries sont centrifugées (15 min, 780 g, 4 °C) et les culots sont lavés dans 4 ml de sucrose 0,5 M puis dans 2 ml de sucrose 0,5 M. Enfin, les bactéries sont resuspendues dans 200 μ l de sucrose 0,5 M Ces cellules sont immédiatement utilisées pour la transformation par électroporation.

100 µl de cellules compétentes de *S. aureus* sont incubées 30 min dans la glace en présence de 5 à 10 µg de plasmide. Puis les cellules sont transvasées dans une cuvette (*Biorad*) avant de subir l'électroporation (1,8 kV, 2,5 ms) en utilisant l'appareil Micropulser (*Biorad*). Ensuite, 900 µl de milieu BHI sont ajoutés et les cellules sont cultivées 2 h à 37 °C, sous agitation. Après centrifugation, le culot bactérien est repris dans 100 µl de BHI puis étalé sur une gélose BHI contenant l'antibiotique de sélection et incubée jusqu'à 48 h à 37°C

3. Construction de souches mutantes par pMAD

Les souches mutantes décrites §II.a ont été produites en utilisant le vecteur navette pMAD (Arnaud *et al.*, 2004). Les plasmides ont été transformés dans la souche *E. coli* IM08B (cf §II.c.1) et les colonies bleues sont sélectionnées sur une gélose LB supplémentée d'ampicilline (100 µg/ml) et de X-gal (50 µg/ml). Après une nouvelle extraction plasmidique, les plasmides sont transformés dans la souche *S. aureus* HG001 (cf §II.c.2). Après électroporation, les cellules sont cultivées 2 h à 28 °C sous agitation. Le culot bactérien est repris dans 100 µl de BHI puis étalé sur une gélose BHI contenant de l'érythromycine (1,5 µg/ml) et du X-gal (50 µg/ml) incubée 48 h à 28 °C. Entre une à trois colonies de couleur bleue sont sélectionnées et incubées dans 5 ml de BHI supplémenté d'érythromycine (1,5 µg/ml) pendant 24 h à 42 °C sans agitation. Après resuspension des bactéries, entre 10 µl à 100 µl de la culture est étalé sur une gélose BHI contenant de l'érythromycine (1,5 µg/ml) et du X-gal (50 µg/ml), puis incubée 48 h à 42 °C. Les colonies isolées dont la couleur tend vers le vert clair sont sélectionnées : ce sont celles dont le plasmide pMAD se serait intégré dans le génome. Cette étape peut être vérifiée par PCR par l'utilisation d'une amorce s'hybridant spécifiquement au pMAD et une amorce s'hybridant à la périphérie de la séquence d'ADN génomique à modifier. Les colonies sont incubées dans 5 ml de BHI pendant 24 h à 28 °C sans agitation. Les cultures sont diluées (10^{-6} à 10^{-8}) et 100 µl de ces dilutions sont étalées sur une gélose BHI contenant du X-gal (50 µg/ml) incubée 48 h à 37 °C. Les colonies blanches isolées sont sélectionnées : ce sont celles dont le plasmide aurait été éliminé. Chaque colonie testée est cultivée sur une gélose BHI contenant du X-gal (50 µg/ml) et une gélose BHI contenant de l'érythromycine (1,5 µg/ml) et du X-gal (50 µg/ml), incubées O/N à 37 °C. Les colonies sélectionnées sont celles qui sont de couleur blanche et qui sont sensibles à l'érythromycine.

La délétion du gène est vérifiée par PCR en utilisant deux amorces PCR en amont et en aval du gène à déléter, en comparaison avec l'amplification PCR effectuée sur la souche WT.

III. Tampons & solutions

Tableau 12 : Liste des tampons et solutions utilisés lors des expériences

Nom	Composition	Expérience
Tampon hydrolyse alcaline 1 X (Ambion)	50 mM carbonate de sodium pH 9.2, 1 mM EDTA	Clivage RNase III
Tampon de séquençage 1 X (Ambion)	20 mM citrate de sodium pH 5, 1 mM EDTA, 7 M urée	
Tampon de chargement 10 X (Ambion)	95 % formamide, 18 mM EDTA, 0.025 % SDS, xylène cyanol, bleu de bromophénol	
TMK	Tris-HCl 100 mM pH7, MgCl ₂ 100 mM, KCl 1 M	
TCK	Tris-HCl 100 mM pH7, CaCl ₂ 100 mM, KCl 1 M	
Tampon FastAP 10 X (Thermo Scientific)	MgCl ₂ 50 mM, Tris HCl 100 mM pH 8, KCl 1 M, Triton X-100 0.2 %, BSA 1 g/L	Déphosphorylation
Tampon de dilution 10 X	TrisHCl 20 mM, NaCl 150 mM, bleu de bromophénol 0,01 %, pH 7,4	Dot blot
Tampon A 10X PNK T4 (Thermo Scientific)	EDTA 1 mM, spermidine 1mM, DTT 50 mM, MgCl ₂ 100 mM, Tris-HCl 500 mM pH 7,6	Marquage radioactif
TBE 10 X - Tris Borate EDTA	Tris-borate 890 nM pH 8.2, EDTA 20 mM	Migration de gel
SSC 20 X	NaCl 3 M, citrate trisodium 300 mM, pH 7	Northern blot
Solution de blocage 10 %	Acide maléique 1 X, agent bloquant 10 % (Roche)	
Tampon détection	Tris-HCl 100 mM pH 9.5, NaCl 100 mM	
Tampon de lavage	Acide maléique 1 X, Tween 20 0.3 %	
Solution d'hybridation	Formamide 50 %, SSC 5 X, sodium phosphate 50 mM, SDS 7 %, solution de blocage 1 %, N-lauryl sarcosine 0.2 %	
Tampon B	SDS 0.1 %, SSC 2 X	
Solution de blocage 10 X	Acide maléique 1 X, solution de blocage 1 %	
Tampon C	SDS 0.1 %, SSC 0.2 X	Retard sur gel
TB 10 X	Tris-borate 890 nM pH 8.3	
Tampon B 10 X - MgCl₂	Tris HCl 200 mM pH 7,5, NH ₄ Cl 400 mM, KCl 600 nM	
Tampon B 10 X + MgCl₂	MgCl ₂ 100 mM, Tris HCl 200 mM pH 7,5, NH ₄ Cl 400 mM, KCl 600 nM	Traitement DNase
Tampon d'incubation 10X DNase I (Roche)	CaCl ₂ 10 mM, MgCl ₂ 60 mM, NaCl 100 mM, Tris-HCl 400 mM	
Tampon T7 ARN polymérase 10 X	MgCl ₂ 150 mM, tris HCl 400 mM pH 8, NaCl 500 mM	Transcription <i>in vitro</i>

TGS 10 X - Tris Glycine SDS	Tris base 250 mM, glycine 2 M, SDS 1 %	Western blot
TBS 10 X - Tris Buffered Saline	NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7.5	
Laemmli	Tris HCl 60 mM pH 6.8, glycérol 25 %, SDS 2 %, bleu de bromophénol 0.1 %, β -mercaptoéthanol 0.7 M	
Bleu de coomassie	Bleu de coomassie R-250 0.25 g/L (<i>Sigma</i>), acide acétique 10 %, éthanol 25 %	
Solution de décoloration	Acide acétique 30 %, éthanol 10 %	
Bleu urée	Bleu de bromophénol 0.025 %, xylène cyanol 0.025 %, sucrose 20 %, urée 8 M	
Bleu glycérol	Bleu de bromophénol 0.025 %, xylène cyanol 0.025 %, glycérol 40 %	

Tableau 13 : Composition des milieux de culture

Nom	Composition	Référence
BHI - Brain Heart Infusion	Cerveau de veau (12.5 g/L), cœur de bœuf (5 g/L), phosphate disodique (2.5 g/L), glucose (2 g/L)	Sigma
LB - Luria Bertani	Bactotryptone (10 g/L), NaCl (10 g/L), extraits de levures (5 g/L)	
TSB - Tryptic Soy Broth	Tryptone (17 g/L), soytone (3 g/L), NaCl (5 g/L), K_2HPO_4 (2.5 g/L), glucose (2.5 g/L)	

IV. Transcription *in vitro*

a) Production des ARN

La transcription s'effectue à partir de 1 μ g de produits PCR incubé en présence de 4 nM de chaque nucléotide, 5 mM DTE, 1 mM spermidine, 0,1 mg/ml BSA, 100 U de RNAsine (*Promega*), 1 X de tampon T7 et 40 U de polymérase T7, O/N à 37 °C. La matrice ADN est ensuite éliminée à la suite de l'ajout de 100 U de DNase I (*Roche*) dans le tampon 1 X associé, incubé 15 minutes à 37 °C.

b) Extraction des ARN

Les ARN sont extraits par l'ajout d'un volume de *Roti*-Phénol-Chloroforme-Alcool Isoamylique (P/C/I) (*Carl Roth*, pH 4,5-5) puis sont précipités par l'addition d'1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M pH 5,5 et de 3 volumes d'éthanol 100 %. Ces échantillons sont incubés une nuit à -20 °C ou 2 h à -80 °C. Après centrifugation (15'700g, 15 min, 4 °C), les culots sont lavés par l'ajout d'éthanol 80 % puis séchés 10 min à l'air libre. Enfin, les culots sont repris selon leur volume dans 15 à 50 µl d'eau ultrapure.

c) Purification des ARN

Un même volume de bleu urée est ajouté aux échantillons, qui sont ensuite dénaturés (3 min, 90 °C) avant d'être déposés sur un gel (6 % acrylamide, 8 M urée, 1 X TBE) dans du tampon TBE 1 X. Après migration (3-4 h, 300 V) le gel est disposé sur une plaque de silice et les ARN sont révélés par exposition aux UV. Les bandes correspondantes aux ARN d'intérêts sont découpées et incubées (O/N, 4 °C, sous agitation) dans le tampon d'élution supplémenté d'1/10 de volume de *Roti*®-Phenol (*Carl Roth*). Les ARN sont précipités par l'addition d'1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M et de 3 volumes d'éthanol 100 %. Après lavage et séchage comme décrit précédemment, les ARN sont resuspendus dans 15 µl d'eau ultrapure. La concentration des échantillons est mesurée en utilisant le spectrophotomètre NanoDrop ND-100 (*ThermoFisher*) (1 DO_{260nm} = 40 µg d'ARN/ml).

V. Polymerase chain reaction (PCR)

Les produits PCR sont amplifiés à partir de 10 ng de plasmide ou 50 ng d'ADN génomique de *S. aureus* HG001. Les différents ADN ont été incubé avec 0,1 µM de chaque amorce spécifique (cf **Tableau X**), 1 U de Phusion High-Fidelity DNA polymerase (*ThermoFisher*), 10 µL de tampon HF 5X, et 0,25 mM de chaque désoxyribonucléotide dans un volume final de 50 µL. La première étape de la PCR consiste en une étape de dénaturation (3 min à 98°C), puis une étape d'amplification a été réalisée en 34 cycles (30 s à 98°C ; 30 s au T_m-5 °C ; 45 s à 72 °C), enfin une étape de terminaison a été effectuée 5 minutes à 72°C. Les produits de PCR ont été purifiés avec le kit nucleospin gel & PCR clean-up (*Macherey-Nagel*) et sont resuspendus dans un volume final de 30 µL d'eau ultrapure.

VI. Visualisation des ARNs par Northern blot

a) Extraction des ARNs totaux

Les cultures des souches de *S. aureus* sont prélevées puis centrifugées (10 min, 780 g). Le culot de cellules est repris dans 1 ml de *FastRNA PRO™* (MP BIOMEDICALS). Les bactéries sont alors lysées mécaniquement dans des tubes (MP BIOMEDICALS) contenant des billes en verre. Ensuite les ARN sont purifiés par l'ajout de 300 µl de chloroforme/alcool-isoamylique. Après centrifugation (10 min, 15'700 g), le surnageant est transféré dans un nouveau tube puis les ARN sont précipités (cf §IV.b). La concentration des échantillons est mesurée en utilisant le spectrophotomètre NanoDrop ND-100 (1 DO_{260nm} = 40 µg/ml).

b) Production des sondes DIG

Les sondes DIG ont été obtenues par transcription *in vitro*, à partir d'un produit PCR. Dans un premier temps, un minimum de 50 nucléotides de la région complémentaire du sARN ont été amplifiés par PCR avec les amorces décrites §I. L'oligonucléotide sens porte la séquence du promoteur de la T7 ARN polymérase à son extrémité 5' pour permettre la transcription *in vitro*. Les PCR ont été réalisées avec l'ADN polymérase à haute-fidélité Phusion polymérase (*Fermentas*) et de l'ADN chromosomique de *S. aureus* HG001 comme matrice selon les recommandations du fournisseur. Les produits de PCR ont été purifiés avec le kit nucleospin gel & PCR clean-up (*Macherey-Nagel*). 100 ng de produits PCR ont été transcrit *in vitro* dans un volume final de 20 µL contenant 2 µL de DIG-RNA labelling mix 10x (*Roche*), 0,1 mg/mL BSA, 5 mM DTT, 1 mM spermidine, 40 mM Tris-HCl pH 8, 15 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, et 5 µL de T7 ARN polymérase (purifié au laboratoire). La réaction de polymérisation a été réalisée à 37°C pendant 3 heures. La matrice ADN est ensuite éliminée à la suite de l'ajout de 100 U de DNase I (*Roche*) dans le tampon 1 X associé, incubé 15 minutes à 37 °C. La sonde ARN-DIG obtenue est extraite et purifiée comme décrit §III.b.

c) Séparation des ARNs & transfert sur membrane

1. Gel d'agarose

Les ARN sont dilués afin d'obtenir 10 µl d'échantillon contenant 5-10 µg d'ARN et 1 volume de bleu urée est ajouté à la dilution. Les échantillons sont dénaturés (3 min, 90 °C) puis déposés sur un gel d'agarose 1 % supplémenté de 20 mM de guanidium thiocyanate, dans du tampon TBE 1 X. A la fin de la migration (2-3 h, 130 V, 4 °C), le gel est incubé avec du tampon SSC 2 X. Puis les ARN sont transférés sur membrane de nitrocellulose *Amersham Hybond-N+* (*GE Healthcare*) par transfert sous vide (1 h, *Biometra Vacu-Blot*). Enfin les ARN sont fixés à la membrane suite à leur exposition aux UV ($\lambda = 254$ nm, 120 mJ) au sein de l'appareil *Stratalinker® UV Crosslinker* (*Stratagene*).

2. Gel d'acrylamide

Les ARN sont dilués afin d'obtenir 5 µl d'échantillon contenant 5-10 µg d'ARN et 1 volume de bleu urée est ajouté à la dilution. Les échantillons sont dénaturés (3 min, 90 °C) puis déposés sur un gel d'acrylamide 8 % dans du tampon TBE 1X. A la fin de la migration (1-2 h, 150 V) les ARN sont transférés sur membrane de nitrocellulose *Amersham Hybond-N+* (*GE Healthcare*) pendant 1 h à 100 mA. Enfin les ARN sont fixés à la membrane suite à leur exposition aux UV ($\lambda = 254$ nm, 120 mJ) au sein de l'appareil *Stratalinker® UV Crosslinker* (*Stratagene*).

d) Révélation des ARNs par le système DIG

La membrane est insérée dans un tube à hybridation en verre, dans la solution d'hybridation (A) et pré-hybridée (30 min, 68 °C) dans un four à système rotatif (*Hybrigen*). La sonde ARN marquée à la digoxygénine spécifique à l'ARN d'intérêt (cf §V.b) est dénaturée à 68 °C dans de la solution A (2 µl sonde/10 ml de A) puis est incubée avec la membrane (O/N, 68 °C). A la fin de l'étape d'hybridation, la membrane est lavée avec du tampon B (deux fois, 5 min), puis avec du tampon C (deux fois, 15 min). Les étapes suivantes se déroulent à 20 °C. La membrane est ensuite saturée par la solution de blocage durant 30 min, permettant ainsi de masquer les sites de fixation aspécifiques. La solution est remplacée par la solution de blocage contenant les anticorps couplés à la phosphatase alcaline et dirigés contre les groupements DIG (*Roche*)

(concentration de 1/1'000). Après 30 min d'incubation, la membrane est lavée avec le tampon de lavage (E) (deux fois, 15 min), suivi de 5 min avec le tampon de détection (F). Enfin, la membrane est placée sur un film plastique puis est imbibée du substrat de l'enzyme (CDP Star, Roche). La membrane est scellée dans un film plastique et placée dans une cassette avant sa révélation suite à une exposition à un film autoradiographique (*FujiFilm*). Les membranes peuvent également être directement visualisées avec le système d'imagerie ChimiDoc (*Biorad*).

VII. Expérience de rifampicine

a) Culture des bactéries

Après une préculture de chaque souche bactérienne en BHI O/N à 37 °C sous agitation, une dilution a été effectuée afin d'obtenir 200 ml de culture en BHI dont la DO finale correspond à 0,05. Après 6 h de culture à 37 °C sous agitation, des échantillons sont récoltés pour chaque souche correspondant au temps 0. Puis, la rifampicine (300 µg/mL) a été ajoutée à la culture qui est immédiatement remise à incuber sous agitation à 37 °C. Des échantillons sont prélevés à 2, 4, 8, 15, 30 et 45 min après ajout de l'antibiotique.

b) Préparation des échantillons

Les ARNs issus des échantillons (cf §VII.a) sont extraits selon les étapes décrites §VI.a et sont visualisés par Northern Blot dont les ARNs sont séparés par gel d'agarose (cf §VI.c.1).

VIII. Visualisation des protéines par Western blot

a) Extraction des protéines

Les cultures des souches de *S. aureus* sont prélevées puis centrifugées (10 min, 780 g). Le culot de bactéries est lavé dans 1 ml de PBS 1 X puis est resuspendu dans 1 ml de PBS 1 X. Les bactéries sont transvasées dans des tubes contenant des billes de verres et sont lysées mécaniquement (2 cycles de 40 s, force 4) en utilisant l'instrument *FastPrep®* (MP BIOMEDICALS). Après centrifugation (15'700g, 10 min, 4 °C), le surnageant est prélevé et

conservé sur glace. La concentration en protéines de chaque échantillon est déterminée en utilisant la méthode de Bradford. Une gamme étalon est réalisée en préparant des tubes contenant de 0 à 30 mg/ml de BSA et chaque échantillon de protéines est dilué au 1/200 et 1/400^{ème}. Pour chaque dilution, 200 µl de réactif (*Biorad*) sont ensuite ajoutés. Les échantillons sont déposés en triplicata dans une plaque en polystyrène 96 puits. L'absorbance à 595 nm de chaque dépôt est lue par le spectrophotomètre iMarkTM (*Biorad*). La concentration en protéines de chaque échantillon est calculée par rapport à la droite de régression linéaire obtenue avec l'absorbance et les concentrations des échantillons de la gamme étalon.

b) Séparation des protéines & transfert sur membrane

Les échantillons sont dilués dans du tampon Laemmli 5 X pour un volume final de 10 µl, correspondant à 5 à 10 µg de protéines par dépôt. Par la suite les échantillons sont dénaturés (5 min, 90 °C) et chargés sur un gel SDS-PAGE 12 % dans du TGS 1 X. Les protéines sont concentrées suite à leur migration (1 h à 60 V) dans le gel de concentration (5 % acrylamide, 127 mM Tris pH 6,8, 0,30 % SDS) puis sont séparées selon leur poids moléculaire après migration (2 h, 150 V) dans le gel de résolution (12 % acrylamide, 375 mM Tris pH 8,8, 0,1 % SDS). Par la suite, les protéines sont transférées (10 min, 25 V) sur membrane de nitrocellulose (*Biorad*) par l'appareil *Trans-Blot® Turbo™* (*Biorad*). La membrane, saturée dans 5 % de lait en poudre, TBS 1 X, 0,1 % Tween 20 (1 h, 20 °C, sous agitation) est hybridée (O/N, 4 °C sous agitation) avec des anticorps monoclonaux de souris dirigés contre la GFP (*Takara Bio*) ou l'étiquette 3XF à la concentration de 1/5'000. Ensuite, la membrane est lavée (3 fois 10 min, sous agitation) dans du TBS 1 X, Tween 20 0,1 %. La membrane est incubée (1 h, 20 °C, sous agitation) avec l'anticorps secondaire dirigé contre les anticorps de souris à une concentration de 1/5'000 dans du tampon d'hybridation. La membrane subit une dernière étape de lavage (3 fois 10 min, sous agitation) dans du TBS 1 X. Enfin, 1 ml de chacun des deux réactifs ECLTM (*GE Healthcare*) sont ajoutés sur la membrane qui est scellée dans un film plastique et est révélée par un film auto radiographique (*FujiFilm*) ou par dépôt des membranes au sein du système d'imagerie ChimiDoc (*Biorad*).

Après révélation de la membrane, celle-ci est colorée (30 min-2 h, sous agitation) avec une solution de Bleu de Coomassie. Puis la membrane est traitée avec une solution de décoloration (5 min-, sous agitation), séchée à l'air libre et visualisée par le système d'imagerie ChimiDoc (*Biorad*).

IX. Formation de duplexes ARN par retard sur gel

a) Marquage radioactif des ARNs à l'extrémité 5'

Avant le marquage radioactif, l'ARN doit être déphosphorylé. La déphosphorylation nécessite 20 µg d'ARN auquel on ajoute 1 U d'alcaline phosphatase *FastAP* (*Thermo Scientific*) et son tampon 1 X associé. L'échantillon est incubé 10 min à 37 °C puis les ARN sont extraits et précipités (cf §IV.b). Le culot d'ARN déphosphorylé est repris dans 20 µl d'eau ultrapure correspondant à une concentration théorique de 1 µg/µl.

5 µg d'ARN déphosphorylé sont marqués avec 50 µCi de [γ -³²P]-ATP (*Hartmann Analytic*), 10 U de T4 Polynucléotide Kinase (*Thermo Scientific*) et le tampon A 1 X associé. Le mélange est incubé 1 h à 37 °C puis les ARN radiomarqués sont purifiés sur gel d'acrylamide (cf §IV.b), extraits puis précipités (cf §IV.c). Un compteur à scintillation (*Beckman*) est utilisé pour mesurer les émissions beta, en coups par minute (cpm), de chaque échantillon. Toutes les manipulations impliquant la radioactivité sont réalisées dans la pièce dédiée en respectant les mesures de sécurité imposées.

b) Formation des complexes ARN/ARN

Dans un premier temps, l'ARN radiomarqué (15'000 cpm/puit) et les ARN froids (1 µM final) sont dilués dans du tampon B - MgCl₂ 1 X, puis sont dénaturés (1 min, 90 °C) avant d'être directement plongés dans la glace pendant 1 min. Les ARN sont renaturés séparément (10 min, 20 °C) après l'ajout de MgCl₂ (10 mM final). Finalement, l'ARN radiomarqué est incubé 15 min à 37 °C en présence des ARN froids selon les concentrations indiquées, dans du tampon B 1 X + MgCl₂.

Un même volume de bleu glycérol est ajouté et les échantillons sont déposés sur un gel natif de polyacrylamide 6 % (rapport acrylamide:bis-acrylamide 1 :30). Les échantillons migrent en conditions non dénaturantes (6 h, 4 °C, 300 V) dans du tampon TB 1 X contenant 1 mM de MgCl₂. Après démoulage, le gel est scellé dans un film plastique. Enfin un film auto radiographique (*FujiFilm*) est exposé au gel O/N à -80 °C en utilisant un écran amplificateur.

X. Empreinte du ribosome

a) Préparation des séquences

Dans un premier temps, 2,5 μM de l'ARNm est dénaturé (1 min, 90 °C) en présence de l'amorce radio marquée (100'000 cpm). Le mélange est immédiatement placé 1 min dans la glace puis incubé 5 min à 20 °C. Ensuite du tampon 1 X de la Reverse Transcriptase AMV (AMV RT) est ajouté à la solution, puis le tout est incubé 10 min à 20 °C. Dans un second temps, un mix de dNTP et de ddNTP correspondant à chaque base azotée est ajouté au mélange, avec du tampon AMV RT 1 X et 4 U d'AMV RT. A titre d'exemple, pour la séquence Guanine, le mix se compose de 100 μM de dATP, dCTP et dTTP, 25 μM de dGTP et 1,67 μM de ddGTP. La transcription réverse est réalisée pendant 30 min à 37 °C. Dans un dernier temps, la matrice ARN est dégradée par l'ajout de 9 μmol de KOH et 1 volume de tampon DESTROY. Cette étape nécessite la dénaturation de l'ARN (3 min, 90 °C) puis sa dégradation (1 h, 37 °C). Finalement, l'ADN complémentaire est extrait puis précipité (cf §IV.b). Le culot est repris dans 20 μl de bleu urée. Un compteur à scintillation (Beckman) est utilisé pour mesurer les émissions beta, en cpm, de chaque échantillon.

b) Préparation des échantillons

La sous-unité ribosomique 30 S de *S. aureus* a été préparé précédemment au laboratoire. La solution contenant les ribosomes est plongée dans la glace pendant 5 min, puis incubé 10 min à 37 °C avant utilisation. Par la suite, 1,25 μM de cette solution de sous-unité 30 S est incubé 15 min à 37 °C dans du tampon T 1 X + MgCl_2 . Pour commencer, 0,25 μM de l'ARNm complet ou de l'extrémité 5'-UTR d'icaR est incubé (1 min, 90 °C) avec l'équivalent de 400'000 cpm d'amorce radiomarquée (cf §IX.a) dans un volume final de 26 μl . Puis le mélange est plongé directement dans la glace durant 1 min. Ensuite, du tampon T 1 X + MgCl_2 est ajouté et ce mélange est incubé 15 min à 20 °C. La même manipulation est réalisée avec 1 μM de l'ARN RsaE seul.

Par la suite, 2 μl du mix ARNm/amorce radiomarquée est incubé (10 min, 37 °C) avec la concentration finale déterminée du mix RsaE, 1 X de tampon T 10 X - MgCl_2 et du MgCl_2 . Puis 0,25 μM du mix de sous-unité 30 S de ribosome est ajouté, et le mélange est incubé de nouveau 10 min à 37 °C. Ensuite 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ d'ARNt initiateur est ajouté. Après 5 min

d'incubation à 37 °C, 2 µl du mix AMV sont ajoutés et la transcription réverse est réalisée (30 min, 37 °C). L'ADN complémentaire est extrait et précipité (cf §IV.b, Roti-P/C/I pH 7,5-8) et le culot est repris dans 5 µl de bleu urée. Un compteur à scintillation (Beckman) est utilisé pour mesurer les émissions beta, en cpm, de chaque échantillon.

Enfin, l'équivalent de 10'000 cpm de chaque échantillons et 15'000 cpm des séquences ATGC (cf §X.a) sont déposés sur un gel d'acrylamide 10 % dans du tampon TBE 1 X. Après migration (3 h, 75 W), le gel enveloppé de plastique est mis en contact d'un film auto radiographique (FujiFilm) puis stocké à -80 °C dans une cassette équipée d'un écran amplificateur. Le film est révélé le lendemain ou après deux jours selon l'exposition souhaitée.

XI. Clivage à la RNase III

a) Préparation des échelles alcalines (OH) et RNase T1 (T1)

1 µl d'ARN radiomarké (cf §IX.a) est incubé 10 min à 37 °C avec 9 µl du tampon d'hydrolyse alcaline 1 X (50 mM carbonate de sodium pH 9.2, 1 mM EDTA ; *Ambion*). Après ajout de 10 µl de tampon de chargement (95 % formamide, 18 mM EDTA, 0.025 % SDS, xylène cyanol, bleu de bromophénol ; *Ambion*) l'échelle alcaline (OH) ainsi produite est conservée sur glace jusqu'à utilisation ou conservée à -20 °C.

1 µl d'ARN radiomarké (cf §IX.a) est dénaturé pendant 1 min à 37 °C avec 9 µl du tampon de séquençage 1 X (20 mM citrate de sodium pH 5, 1 mM EDTA, 7 M urée ; *Ambion*). Après 1 min à température ambiante, 1 U de RNase T1 (*Thermo Fisher*) est ajoutée et le mélange est incubé 5 min à 37 °C. Le clivage est stoppé par l'ajout de 10 µl de tampon de chargement (95 % formamide, 18 mM EDTA, 0.025 % SDS, xylène cyanol, bleu de bromophénol ; *Ambion*) et l'échelle RNase T1 (T1) ainsi produite est conservée sur glace jusqu'à utilisation ou conservée à -20 °C.

b) Préparation des échantillons

La RNase III de *S. aureus* a été purifiée au laboratoire. Les expériences de clivage sont réalisées à partir d'ARN radiomarké (cf §IX.a) et d'ARN froid qui ont été dénaturés (1 min à 90 °C) puis placés sur glace pendant 1 min et restructurés dans du tampon TMK 1 X à température ambiante pendant 10 min. Selon l'échantillon, l'ARN froid est ajouté au mélange en concentration croissante (15 à 400 nM). Les complexes ARN-ARN sont formés en incubant l'ARN radiomarké seul ou en présence de l'ARN froid pendant 15 min à 37 °C. Par la suite, les ARNs sont incubés avec la RNase III purifiée (25 – 200 nM) en présence de Mg^{2+} ou Ca^{2+} (respectivement avec une concentration finale de tampon TMK ou TCK 1 X) et 1 µg d'ARNt de levures. Après 5 min d'incubation à 37 °C, les ARNs sont extraits selon §IV.b et le culot d'ARN est repris dans 5 µl de bleu urée. Un compteur à scintillation (Beckman) est utilisé pour mesurer les émissions beta, en cpm, de chaque échantillon.

Enfin, l'équivalent de 10'000 cpm de chaque échantillon et 30'000 cpm des séquences T1 et OH (cf §XI.a) sont déposés sur un gel d'acrylamide 12 % dans du tampon TBE 1 X. Après migration (2 h, 75 W), le gel enveloppé de plastique est mis en contact d'un film auto radiographique (FujiFilm) puis stocké à -80 °C dans une cassette équipée d'écran amplificateur. Le film est révélé le lendemain ou après deux jours selon l'exposition souhaitée.

XII. Formation de biofilms

a) Coloration au crystal violet

Après une préculture de chaque souche bactérienne en BHI O/N à 37 °C sous agitation, une dilution a été effectuée afin d'obtenir une culture en TSB dont la DO finale correspond à 0,05. Pour chaque souche, 200 µl de la culture en TSB est répartie dans une plaque 96 puits en polystyrène (*Thermofisher*) dont les lignes verticales périphériques sont complétées de 200 µl de TSB. La plaque est incubée à 37 °C sans agitation pendant 18 h. Le surnageant de chaque puit est transvasé avec précautions dans une nouvelle plaque 96 puits en polystyrène (*Thermofisher*) et la densité optique à 600 nm correspondant aux cellules planctoniques est mesurée au sein du lecteur de plaque Multiskan Skyhigh (*Thermo*). Les biofilms formés au fond des puits sont lavés une fois par 200 µl de PBS 1X puis ils sont fixés par l'ajout de 200 µl de

méthanol. Après 10 min d'incubation à température ambiante, les biofilms fixés sont séchés 5 min à l'air libre. Par la suite, les biofilms sont colorés par 200 µl de crystal violet 0.1 % (Sigma) pendant 1 h à température ambiante. Ils sont lavés deux fois par 200 µl d'eau ultrapure puis séchés 5 min à l'air libre. La coloration est dissoute par l'ajout de 200 µl d'éthanol 96 %. Après 1 h d'incubation à température ambiante, et chaque puit est resuspendu avec précaution avant la mesure de la coloration à une DO de 595 nm avec le lecteur de plaque Multiskan Skyhigh (Thermo).

b) Traitements à la DNase I et protéinase K

Après une préculture de chaque souche bactérienne en BHI O/N à 37 °C sous agitation, une dilution a été effectuée afin d'obtenir une culture en TSB dont la DO finale correspond à 0,05. Pour chaque souche, 200 µl de la culture en TSB est répartie dans une plaque 96 puits en polystyrène (*Thermofisher*) dont les lignes verticales périphériques sont complétées de 200 µl de TSB. La plaque est incubée à 37 °C sans agitation pendant 3 h puis 28 U de DNase I (*Sigma*) ou 10 ng de protéinase K (*Thermo Scientific*) sont ajoutés à chaque puit. Après 15 h supplémentaire d'incubation à 37 °C sans agitation, les biofilms sont colorés au crystal violet comme indiqué §XII.a.

c) Dénombrement des bactéries adhérentes

Après une préculture de chaque souche bactérienne en BHI O/N à 37 °C sous agitation, une dilution a été effectuée afin d'obtenir une culture en TSB dont la DO finale correspond à 0,05. Pour chaque souche, 5 ml de la culture en TSB est répartie dans une plaque 6 puits en polystyrène (*Thermofisher*) contenant des disques stériles en verre (*Thermo Scientific*) dans le fond de chaque puit. Les plaques sont incubées pendant 18 h à 37 °C sans agitation. Les biofilms sont lavés une fois par 5 ml de PBS 1 X puis les disques en verres colonisés sont placés dans 2 ml de PBS 1 X. Les bactéries adhérentes sont détachées par pipetage suivie de l'incubation des échantillons dans un bain à ultra-sons (5 min, 40 kHz). Le surnageant contenant les bactéries adhérentes est dilué (10^{-5} à 10^{-8}) et 100 µl de chaque dilution est étalée, en duplica, sur une gélose TSB. Les géloses sont incubées O/N à 37 °C et les bactéries sont dénombrées.

d) Détection de PIA/PNAG par Dot blot

1. Extraction du PIA/PNAG des biofilms

Après une préculture de chaque souche bactérienne en BHI O/N à 37 °C sous agitation, une dilution a été effectuée afin d'obtenir une culture en TSB dont la DO finale correspond à 0,05. Pour chaque souche, 200 µl de la culture en TSB est répartie dans une plaque 96 puits en polystyrène (*Thermofisher*) dont les lignes verticales périphériques sont complétées de 200 µl de TSB. La plaque est incubée à 37 °C sans agitation pendant 18 h. Les biofilms sont lavés une fois par 200 µl de PBS 1 X puis resuspendus dans 100 µl d'EDTA (0.5 M pH 8). Pour chaque échantillon, le même nombre de puit est resuspendu. Les bactéries sont bouillies pendant 10 min à 100 °C. Après centrifugation (12'000 rpm, 10 min), le surnageant est collecté et incubé avec 200 µg de protéinase K, pendant 30 min à 37 °C.

2. Révélation par la méthode de Dot Blot

Un quart de volume de tampon de dilution (TrisHCl 20 mM, NaCl 150 mM, bleu de bromophénol 0,01 %, pH 7,4) est ajouté aux échantillons et une cascade de dilution est effectuée (1/2 à 1/64). Par la suite, 5 µl de chaque dilution est déposée sur une membrane de nitrocellulose (Cytiva AmershamTM ProtranTM) qui est séchée 5 min à l'air libre. La membrane est incubée 1 h à température ambiante dans du tampon de blocage (PBS 0,1 %, lait 5 %, Tween 20 0,1 %). Après 3 lavages de 10 min dans la solution de lavage (PBS 0,1 %, Tween 20 0,1 %), la membrane est incubée avec les anticorps anti-PIA/PNAG (1:25'000) O/N à 4 °C sous agitation. Les étapes qui suivent sont réalisées sous agitation à température ambiante : la membrane subit 3 lavages de 10 min, une incubation avec les anticorps secondaires de chèvre anti-lapin couplés à la peroxydase de raifort (HRP ; 1:5'000 ; *Biorad*) dans du tampon de blocage pendant 1 h. Après 3 derniers lavages dans la solution associée, la membrane est incubée dans les solutions de révélation ECL (GE Healthcare) et révélée avec le système d'imagerie ChemiDoc (*Biorad*).

XIII. Culture en plasma désactivé

Le sérum a été produit par une autre équipe de recherche. Les protéines de la cascade du complément sont désactivées par incubation du plasma pendant 30 min à 56 °C avant utilisation. Une préculture des bactéries est réalisée en TSB, O/N à 37 °C sous agitation. Des cultures en TSB et TSB supplémenté en plasma désactivé sont effectuées en diluant les bactéries pour obtenir une DO à 600 nm de 0.05. Après une incubation de 6 h à 37 °C sous agitation, les cultures des souches de *S. aureus* sont prélevées puis centrifugées (10 min, 780 g). Les culots de bactéries sont utilisés pour l'analyse protéomique.

XIV. Expérience de MAPS

Le protocole du MAPS est décrit avec précision lors de l'introduction, voir §3.III

Références bibliographiques

- Abraham, N.M., Jefferson, K.K., 2012. Staphylococcus aureus clumping factor B mediates biofilm formation in the absence of calcium. *Microbiol. Read. Engl.* 158, 1504–1512. <https://doi.org/10.1099/mic.0.057018-0>
- Andreassen, P.R., Pettersen, J.S., Szczerba, M., Valentin-Hansen, P., Møller-Jensen, J., Jørgensen, M.G., 2018. sRNA-dependent control of curli biosynthesis in *Escherichia coli*: McaS directs endonucleolytic cleavage of csgD mRNA. *Nucleic Acids Res.* 46, 6746–6760. <https://doi.org/10.1093/nar/gky479>
- Apostolidi, M., Saad, N.Y., Drainas, D., Pournaras, S., Becker, H.D., Stathopoulos, C., 2015. A glyS T-box riboswitch with species-specific structural features responding to both proteinogenic and nonproteinogenic tRNA^{Gly} isoacceptors. *RNA* 21, 1790–1806. <https://doi.org/10.1261/rna.052712.115>
- Arnaud, M., Chastanet, A., Débarbouillé, M., 2004. New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6887–6891. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6887-6891.2004>
- Asai, K., Yamada, K., Yagi, T., Baba, H., Kawamura, I., Ohta, M., 2015. Effect of incubation atmosphere on the production and composition of staphylococcal biofilms. *J. Infect. Chemother. Off. J. Jpn. Soc. Chemother.* 21, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2014.10.001>
- Assefa, M., Amare, A., 2022. Biofilm-Associated Multi-Drug Resistance in Hospital-Acquired Infections: A Review. *Infect. Drug Resist.* 15, 5061–5068. <https://doi.org/10.2147/IDR.S379502>
- Attaiech, L., Glover, J.N.M., Charpentier, X., 2017. RNA Chaperones Step Out of Hfq's Shadow. *Trends Microbiol.* 25, 247–249. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.01.006>
- Aw, J.G.A., Shen, Y., Wilm, A., Sun, M., Lim, X.N., Boon, K.-L., Tapsin, S., Chan, Y.-S., Tan, C.-P., Sim, A.Y.L., Zhang, T., Susanto, T.T., Fu, Z., Nagarajan, N., Wan, Y., 2016a. In Vivo Mapping of Eukaryotic RNA Interactomes Reveals Principles of Higher-Order Organization and Regulation. *Mol. Cell* 62, 603–617. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.04.028>
- Aw, J.G.A., Shen, Y., Wilm, A., Sun, M., Lim, X.N., Boon, K.-L., Tapsin, S., Chan, Y.-S., Tan, C.-P., Sim, A.Y.L., Zhang, T., Susanto, T.T., Fu, Z., Nagarajan, N., Wan, Y., 2016b. In Vivo Mapping of Eukaryotic RNA Interactomes Reveals Principles of Higher-Order Organization and Regulation. *Mol. Cell* 62, 603–617. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.04.028>
- Bai, X., Nakatsu, C.H., Bhunia, A.K., 2021. Bacterial Biofilms and Their Implications in Pathogenesis and Food Safety. *Foods* 10, 2117. <https://doi.org/10.3390/foods10092117>
- Barber, K.E., Smith, J.R., Ireland, C.E., Boles, B.R., Rose, W.E., Rybak, M.J., 2015. Evaluation of Ceftaroline Alone and in Combination against Biofilm-Producing Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* with Reduced Susceptibility to Daptomycin and Vancomycin in an In Vitro Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 4497–4503. <https://doi.org/10.1128/AAC.00386-15>
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., Horvath, P., 2007. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science* 315, 1709–1712. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>
- Beavers, W.N., Skaar, E.P., 2016. Neutrophil-generated oxidative stress and protein damage in *Staphylococcus aureus*. *Pathog. Dis.* 74, ftw060. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw060>
- Beisel, C.L., Storz, G., 2011. The base-pairing RNA spot 42 participates in a multioutput feedforward loop to help enact catabolite repression in *Escherichia coli*. *Mol. Cell* 41, 286–297. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.12.027>

- Bhatti, G.K., Khullar, N., Sidhu, I.S., Navik, U.S., Reddy, A.P., Reddy, P.H., Bhatti, J.S., 2021. Emerging role of non-coding RNA in health and disease. *Metab. Brain Dis.* 36, 1119–1134. <https://doi.org/10.1007/s11011-021-00739-y>
- Bohn, C., Rigoulay, C., Boulloc, P., 2007. No detectable effect of RNA-binding protein Hfq absence in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* 7, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-10>
- Bohn, C., Rigoulay, C., Chabelskaya, S., Sharma, C.M., Marchais, A., Skorski, P., Borezée-Durant, E., Barbet, R., Jacquet, E., Jacq, A., Gautheret, D., Felden, B., Vogel, J., Boulloc, P., 2010. Experimental discovery of small RNAs in *Staphylococcus aureus* reveals a riboregulator of central metabolism. *Nucleic Acids Res.* 38, 6620–6636. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq462>
- Boles, B.R., Horswill, A.R., 2008. agr-Mediated Dispersal of *Staphylococcus aureus* Biofilms. *PLOS Pathog.* 4, e1000052. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000052>
- Briaud, P., Zapf, R.L., Mayher, A.D., McReynolds, A.K.G., Frey, A., Sudnick, E.G., Wiemels, R.E., Keogh, R.A., Shaw, L.N., Bose, J.L., Carroll, R.K., 2022. The Small RNA Teg41 Is a Pleiotropic Regulator of Virulence in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 90, e00236-22. <https://doi.org/10.1128/iai.00236-22>
- Bronesky, D., Desgranges, E., Corvaglia, A., François, P., Caballero, C.J., Prado, L., Toledo-Arana, A., Lasa, I., Moreau, K., Vandenesch, F., Marzi, S., Romby, P., Caldelari, I., 2019. A multifaceted small RNA modulates gene expression upon glucose limitation in *Staphylococcus aureus*. *EMBO J.* 38, e99363. <https://doi.org/10.15252/embj.201899363>
- Bronesky, D., Wu, Z., Marzi, S., Walter, P., Geissmann, T., Moreau, K., Vandenesch, F., Caldelari, I., Romby, P., 2016. *Staphylococcus aureus* RNAIII and Its Regulon Link Quorum Sensing, Stress Responses, Metabolic Adaptation, and Regulation of Virulence Gene Expression, in: Gottesman, S. (Ed.), *Annual Review of Microbiology*, Vol 70. Annual Reviews, Palo Alto, pp. 299–316. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095708>
- Brooks, J.L., Jefferson, K.K., 2014. Phase Variation of Poly-N-Acetylglucosamine Expression in *Staphylococcus aureus*. *PLOS Pathog.* 10, e1004292. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004292>
- Cao, P., Fleming, D., Moustafa, D.A., Dolan, S.K., Szymanik, K.H., Redman, W.K., Ramos, A., Diggle, F.L., Sullivan, C.S., Goldberg, J.B., Rumbaugh, K.P., Whiteley, M., 2023. A *Pseudomonas aeruginosa* small RNA regulates chronic and acute infection. *Nature* 618, 358–364. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06111-7>
- Castiblanco, L.F., Sundin, G.W., 2016. New insights on molecular regulation of biofilm formation in plant-associated bacteria. *J. Integr. Plant Biol.* 58, 362–372. <https://doi.org/10.1111/jipb.12428>
- Chabelskaya, S., Gaillot, O., Felden, B., 2010. A *Staphylococcus aureus* small RNA is required for bacterial virulence and regulates the expression of an immune-evasion molecule. *PLoS Pathog.* 6, e1000927. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000927>
- Chatterjee, S.S., Joo, H.-S., Duong, A.C., Dieringer, T.D., Tan, V.Y., Song, Y., Fischer, E.R., Cheung, G.Y.C., Li, M., Otto, M., 2013. Essential *Staphylococcus aureus* toxin export system. *Nat. Med.* 19, 364–367. <https://doi.org/10.1038/nm.3047>
- Chevalier, C., Boisset, S., Romilly, C., Masquida, B., Fechter, P., Geissmann, T., Vandenesch, F., Romby, P., 2010. *Staphylococcus aureus* RNAIII binds to two distant regions of coa mRNA to arrest translation and promote mRNA degradation. *PLoS Pathog.* 6, e1000809. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000809>
- Chevalier, C., Huntzinger, E., Fechter, P., Boisset, S., Vandenesch, F., Romby, P., Geissmann, T., 2008. Chapter 16 *Staphylococcus aureus* Endoribonuclease III: Purification and

- Properties, in: *Methods in Enzymology, RNA Turnover in Bacteria, Archaea and Organelles*. Academic Press, pp. 309–327. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)02216-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)02216-7)
- Conlon, K.M., Humphreys, H., O’Gara, J.P., 2002. *icaR* Encodes a Transcriptional Repressor Involved in Environmental Regulation of *ica* Operon Expression and Biofilm Formation in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Bacteriol.* 184, 4400–4408. <https://doi.org/10.1128/JB.184.16.4400-4408.2002>
- Crick, F.H., 1958. On protein synthesis. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 12, 138–163.
- Cucarella, C., Tormo, M.A., Ubeda, C., Trotonda, M.P., Monzon, M., Peris, C., Amorena, B., Lasa, I., Penades, J.R., 2004. Role of biofilm-associated protein *bap* in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 72, 2177–2185. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.4.2177-2185.2004>
- Cue, D., Lei, M.G., Lee, C.Y., 2013. Activation of *sarX* by *Rbf* Is Required for Biofilm Formation and *icaADBC* Expression in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 195, 1515–1524. <https://doi.org/10.1128/JB.00012-13>
- Delauné, A., Poupel, O., Mallet, A., Coic, Y.-M., Msadek, T., Dubrac, S., 2011. Peptidoglycan Crosslinking Relaxation Plays an Important Role in *Staphylococcus aureus* *WalKR*-Dependent Cell Viability. *PloS One* 6, e17054. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017054>
- Desgranges, E., Barrientos, L., Herrgott, L., Marzi, S., Toledo-Arana, A., Moreau, K., Vandenesch, F., Romby, P., Caldelari, I., 2022. The 3’UTR-derived sRNA *RsaG* coordinates redox homeostasis and metabolism adaptation in response to glucose-6-phosphate uptake in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 117, 193–214. <https://doi.org/10.1111/mmi.14845>
- dos Santos, R.F., Arraiano, C.M., Andrade, J.M., 2019. New molecular interactions broaden the functions of the RNA chaperone *Hfq*. *Curr. Genet.* 65, 1313–1319. <https://doi.org/10.1007/s00294-019-00990-y>
- Doudna, J.A., Charpentier, E., 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346, 1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Durand, S., Braun, F., Lioliou, E., Romilly, C., Helfer, A.-C., Kuhn, L., Quittot, N., Nicolas, P., Romby, P., Condon, C., 2015a. A Nitric Oxide Regulated Small RNA Controls Expression of Genes Involved in Redox Homeostasis in *Bacillus subtilis*. *PLOS Genet.* 11, e1004957. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004957>
- Durand, S., Callan-Sidat, A., McKeown, J., Li, S., Kostova, G., Hernandez-Fernaund, J.R., Alam, M.T., Millard, A., Allouche, D., Constantinidou, C., Condon, C., Denham, E.L., 2021. Identification of an RNA sponge that controls the *RoxS* riboregulator of central metabolism in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* 49, 6399–6419. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab444>
- Durand, S., Tomasini, A., Braun, F., Condon, C., Romby, P., 2015b. sRNA and mRNA turnover in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 39, 316–330. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv007>
- Fang, B., Liu, B., Sun, B., 2020. Transcriptional regulation of virulence factors *Hla* and phenol-soluble modulins α by *AraC*-type regulator *Rbf* in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* 310, 151436. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2020.151436>
- Felden, B., Vandenesch, F., Boulloc, P., Romby, P., 2011. The *Staphylococcus aureus* *RNome* and Its Commitment to Virulence. *PLOS Pathog.* 7, e1002006. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002006>
- Ferrara, S., Carloni, S., Fulco, R., Falcone, M., Macchi, R., Bertoni, G., 2015. Post-transcriptional regulation of the virulence-associated enzyme *AlgC* by the $\sigma(22)$ -

- dependent small RNA ErsA of *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* 17, 199–214. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12590>
- Flemming, H.-C., Neu, T.R., Wozniak, D.J., 2007. The EPS matrix: the “house of biofilm cells.” *J. Bacteriol.* 189, 7945–7947. <https://doi.org/10.1128/JB.00858-07>
- Formosa-Dague, C., Speziale, P., Foster, T.J., Geoghegan, J.A., Dufrêne, Y.F., 2016. Zinc-dependent mechanical properties of *Staphylococcus aureus* biofilm-forming surface protein SasG. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 410–415. <https://doi.org/10.1073/pnas.1519265113>
- Foucault, M.-L., Courvalin, P., Grillot-Courvalin, C., 2009. Fitness cost of VanA-type vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 2354–2359. <https://doi.org/10.1128/AAC.01702-08>
- Fuchs, M., Lamm-Schmidt, V., Lenče, T., Sulzer, J., Bublitz, A., Wackenreuter, J., Gerovac, M., Strowig, T., Faber, F., 2023. A network of small RNAs regulates sporulation initiation in *Clostridioides difficile*. *EMBO J.* 42, e112858. <https://doi.org/10.15252/emboj.2022112858>
- Geissmann, T., Chevalier, C., Cros, M.-J., Boisset, S., Fechter, P., Noiro, C., Schrenzel, J., François, P., Vandenesch, F., Gaspin, C., Romby, P., 2009. A search for small noncoding RNAs in *Staphylococcus aureus* reveals a conserved sequence motif for regulation. *Nucleic Acids Res.* 37, 7239–7257. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp668>
- Georg, J., Lalaouna, D., Hou, S., Lott, S.C., Caldelari, I., Marzi, S., Hess, W.R., Romby, P., 2020. The power of cooperation: Experimental and computational approaches in the functional characterization of bacterial sRNAs. *Mol. Microbiol.* 113, 603–612. <https://doi.org/10.1111/mmi.14420>
- Giuliodori, A.M., Di Pietro, F., Marzi, S., Masquida, B., Wagner, R., Romby, P., Gualerzi, C.O., Pon, C.L., 2010. The cspA mRNA Is a Thermosensor that Modulates Translation of the Cold-Shock Protein CspA. *Mol. Cell* 37, 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.11.033>
- Gorwitz, R.J., Kruszon-Moran, D., McAllister, S.K., McQuillan, G., McDougal, L.K., Fosheim, G.E., Jensen, B.J., Killgore, G., Tenover, F.C., Kuehnert, M.J., 2008. Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001–2004. *J. Infect. Dis.* 197, 1226–1234. <https://doi.org/10.1086/533494>
- Graille, M., Stura, E.A., Corper, A.L., Sutton, B.J., Taussig, M.J., Charbonnier, J.B., Silverman, G.J., 2000. Crystal structure of a *Staphylococcus aureus* protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: Structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 5399–5404. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.10.5399>
- Gupta, R.Kr., Luong, T.T., Lee, C.Y., 2015. RNAIII of the *Staphylococcus aureus* agr system activates global regulator MgrA by stabilizing mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 14036–14041. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509251112>
- Hao, Z., Guo, Y., Rao, L., Yu, J., Zhan, Q., Xu, Y., Wang, B., Wu, X., Yu, F., 2021. Deletion of *SarX* Decreases Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus* in a Polysaccharide Intercellular Adhesin (PIA)-Dependent Manner by Downregulating *spa*. *Infect. Drug Resist.* 14, 2241–2250. <https://doi.org/10.2147/IDR.S305650>
- He, L., Le, K.Y., Khan, B.A., Nguyen, T.H., Hunt, R.L., Bae, J.S., Kabat, J., Zheng, Y., Cheung, G.Y.C., Li, M., Otto, M., 2019. Resistance to leukocytes ties benefits of quorum sensing dysfunctionality to biofilm infection. *Nat. Microbiol.* 4, 1114–1119. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0413-x>
- Heilmann, C., Schweitzer, O., Gerke, C., Vanittanakom, N., Mack, D., Götz, F., 1996. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus*

- epidermidis. *Mol. Microbiol.* 20, 1083–1091. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02548.x>
- Hiltunen, A.K., Savijoki, K., Nyman, T.A., Miettinen, I., Ihalainen, P., Peltonen, J., Fallarero, A., 2019. Structural and Functional Dynamics of *Staphylococcus aureus* Biofilms and Biofilm Matrix Proteins on Different Clinical Materials. *Microorganisms* 7, 584. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120584>
- Hodgson, A.E., Nelson, S.M., Brown, M.R., Gilbert, P., 1995. A simple in vitro model for growth control of bacterial biofilms. *J. Appl. Bacteriol.* 79, 87–93. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb03128.x>
- Holmqvist, E., Berggren, S., Rizvanovic, A., 2020. RNA-binding activity and regulatory functions of the emerging sRNA-binding protein ProQ. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* 1863, 194596. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2020.194596>
- Howden, B.P., Beaume, M., Harrison, P.F., Hernandez, D., Schrenzel, J., Seemann, T., Francois, P., Stinear, T.P., 2013. Analysis of the Small RNA Transcriptional Response in Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* after Antimicrobial Exposure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 3864–3874. <https://doi.org/10.1128/AAC.00263-13>
- Hsu, C.-Y., Lin, M.-H., Chen, C.-C., Chien, S.-C., Cheng, Y.-H., Su, I.-N., Shu, J.-C., 2011. Vancomycin promotes the bacterial autolysis, release of extracellular DNA, and biofilm formation in vancomycin-non-susceptible *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 63, 236–247. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00846.x>
- Hsu, C.-Y., Shu, J.-C., Lin, M.-H., Chong, K.-Y., Chen, C.-C., Wen, S.-M., Hsieh, Y.-T., Liao, W.-T., 2015. High Glucose Concentration Promotes Vancomycin-Enhanced Biofilm Formation of Vancomycin-Non-Susceptible *Staphylococcus aureus* in Diabetic Mice. *PLOS ONE* 10, e0134852. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134852>
- 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, 824–835. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600572>
- Hussein, H., Fris, M.E., Salem, A.H., Wiemels, R.E., Bastock, R.A., Righetti, F., Burke, C.A., Narberhaus, F., Carroll, R.K., Hassan, N.S., Mohamed, S.A., Fahmy, A.S., Murphy, E.R., 2019. An unconventional RNA-based thermosensor within the 5' UTR of *Staphylococcus aureus* *cidA*. *PloS One* 14, e0214521. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214521>
- Ibrahim, E.S., Arafa, A.A., Dorgam, S.M., Eid, R.H., Atta, N.S., El-Dabae, W.H., Gaber, E.S., 2022. Molecular characterization of genes responsible for biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. *Vet. World* 15, 205–212. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.205-212>
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., Nakata, A., 1987. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* 169, 5429–5433. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>
- Ito, T., Hiramatsu, K., 1998. Acquisition of methicillin resistance and progression of multiantibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Yonsei Med. J.* 39, 526–533. <https://doi.org/10.3349/ymj.1998.39.6.526>
- Jacob, F., Monod, J., 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* 3, 318–356. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(61\)80072-7](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(61)80072-7)
- Jefferson, K.K., Cramton, S.E., Götz, F., Pier, G.B., 2003. Identification of a 5-nucleotide sequence that controls expression of the *ica* locus in *Staphylococcus aureus* and

- characterization of the DNA-binding properties of IcaR. *Mol. Microbiol.* 48, 889–899. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03482.x>
- Jefferson, K.K., Pier, D.B., Goldmann, D.A., Pier, G.B., 2004. The Teicoplanin-Associated Locus Regulator (TcaR) and the Intercellular Adhesin Locus Regulator (IcaR) Are Transcriptional Inhibitors of the *ica* Locus in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 186, 2449–2456. <https://doi.org/10.1128/JB.186.8.2449-2456.2004>
- Jeng, W.-Y., Ko, T.-P., Liu, C.-I., Guo, R.-T., Liu, C.-L., Shr, H.-L., Wang, A.H.-J., 2008. Crystal structure of IcaR, a repressor of the TetR family implicated in biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *Nucleic Acids Res.* 36, 1567–1577. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm1176>
- Jiang, Q., Jin, Z., Sun, B., 2018. MgrA Negatively Regulates Biofilm Formation and Detachment by Repressing the Expression of *psm* Operons in *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, e01008-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01008-18>
- Johansson, J., Mandin, P., Renzoni, A., Chiaruttini, C., Springer, M., Cossart, P., 2002. An RNA Thermosensor Controls Expression of Virulence Genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell* 110, 551–561. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00905-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00905-4)
- Kateete, D.P., Kimani, C.N., Katabazi, F.A., Okeng, A., Okee, M.S., Nanteza, A., Joloba, M.L., Najjuka, F.C., 2010. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 9, 23. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-9-23>
- Kavanagh, N., Ryan, E.J., Widaa, A., Sexton, G., Fennell, J., O'Rourke, S., Cahill, K.C., Kearney, C.J., O'Brien, F.J., Kerrigan, S.W., 2018. Staphylococcal Osteomyelitis: Disease Progression, Treatment Challenges, and Future Directions. *Clin. Microbiol. Rev.* 31, e00084-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00084-17>
- Kim, M.-K., 2019. *Staphylococcus aureus* Toxins: From Their Pathogenic Roles to Anti-virulence Therapy Using Natural Products. *Biotechnol. BIOPROCESS Eng.* 24, 424–435. <https://doi.org/10.1007/s12257-019-0059-9>
- Kinkel, T.L., Roux, C.M., Dunman, P.M., Fang, F.C., 2013. The *Staphylococcus aureus* SrrAB two-component system promotes resistance to nitrosative stress and hypoxia. *mBio* 4, e00696-00613. <https://doi.org/10.1128/mBio.00696-13>
- Kreutzberger, M.A.B., Wang, S., Beltran, L.C., Tuachi, A., Zuo, X., Egelman, E.H., Conticello, V.P., 2022. Phenol-soluble modulins PSM α 3 and PSM β 2 form nanotubes that are cross- α amyloids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 119, e2121586119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2121586119>
- Lalaouna, D., Prevost, K., Eyraud, A., Masse, E., 2017. Identification of unknown RNA partners using MAPS. *Methods* 117, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.11.011>
- Lasa, I., Penadés, J.R., 2006. Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res. Microbiol.* 157, 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.11.003>
- Lasa, I., Toledo-Arana, A., Dobin, A., Villanueva, M., de los Mozos, I.R., Vergara-Irigaray, M., Segura, V., Fagegaltier, D., Penadés, J.R., Valle, J., Solano, C., Gingeras, T.R., 2011. Genome-wide antisense transcription drives mRNA processing in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 20172–20177. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113521108>
- Le, K.Y., Otto, M., 2015. Quorum-sensing regulation in staphylococci—an overview. *Front. Microbiol.* 6.
- Lee, J.-S., Bae, Y.-M., Lee, Sook-Young, Lee, Sun-Young, 2015. Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus* on Various Surfaces and Their Resistance to Chlorine Sanitizer. *J. Food Sci.* 80, M2279–M2286. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13017>

- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V., 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-y)
- Lee, S., Choi, K.-H., Yoon, Y., 2014. Effect of NaCl on Biofilm Formation of the Isolate from *Staphylococcus aureus* Outbreak Linked to Ham. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* 34, 257–261. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2014.34.2.257>
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., Kim, V.N., 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415–419. <https://doi.org/10.1038/nature01957>
- Le Huyen, K.B., Gonzalez, C.D., Pascreau, G., Bordeau, V., Cattoir, V., Liu, W., Bouloc, P., Felden, B., Chabelskaya, S., 2021. A small regulatory RNA alters *Staphylococcus aureus* virulence by titrating RNase III activity. *Nucleic Acids Res.* 49, 10644–10656. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab782>
- Lerche, C.J., Schwartz, F., Theut, M., Fosbøl, E.L., Iversen, K., Bundgaard, H., Høiby, N., Moser, C., 2021. Anti-biofilm Approach in Infective Endocarditis Exposes New Treatment Strategies for Improved Outcome. *Front. Cell Dev. Biol.* 9.
- Li, S., Huang, H., Rao, X., Chen, W., Wang, Z., Hu, X., 2014. Phenol-soluble modulins: novel virulence-associated peptides of staphylococci [WWW Document]. <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.13.153>. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.153>
- Lim, Y., Jana, M., Luong, T.T., Lee, C.Y., 2004. Control of Glucose- and NaCl-Induced Biofilm Formation by *rbf* in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 186, 722–729. <https://doi.org/10.1128/JB.186.3.722-729.2004>
- Lioliou, E., Sharma, C.M., Caldelari, I., Helfer, A.-C., Fechter, P., Vandenesch, F., Vogel, J., Romby, P., 2012. Global Regulatory Functions of the *Staphylococcus aureus* Endoribonuclease III in Gene Expression. *PLoS Genet.* 8, e1002782. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002782>
- Liu, Y., Dong, J., Wu, N., Gao, Y., Zhang, X., Mu, C., Shao, N., Fan, M., Yang, G., 2011. The Production of Extracellular Proteins Is Regulated by Ribonuclease III via Two Different Pathways in *Staphylococcus aureus*. *PLOS ONE* 6, e20554. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020554>
- Loveday, H.P., Wilson, J.A., Kerr, K., Pitchers, R., Walker, J.T., Browne, J., 2014. Association between healthcare water systems and *Pseudomonas aeruginosa* infections: a rapid systematic review. *J. Hosp. Infect.* 86, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2013.09.010>
- Lu, Z., Gong, J., Zhang, Q.C., 2018. PARIS: Psoralen Analysis of RNA Interactions and Structures with High Throughput and Resolution. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 1649, 59–84. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7213-5_4
- Lu, Z., Zhang, Q.C., Lee, B., Flynn, R.A., Smith, M.A., Robinson, J.T., Davidovich, C., Gooding, A.R., Goodrich, K.J., Mattick, J.S., Mesirov, J.P., Cech, T.R., Chang, H.Y., 2016. RNA Duplex Map in Living Cells Reveals Higher-Order Transcriptome Structure. *Cell* 165, 1267–1279. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.028>
- Mann, E.E., Rice, K.C., Boles, B.R., Endres, J.L., Ranjit, D., Chandramohan, L., Tsang, L.H., Smeltzer, M.S., Horswill, A.R., Bayles, K.W., 2009. Modulation of eDNA Release and Degradation Affects *Staphylococcus aureus* Biofilm Maturation. *PLOS ONE* 4, e5822. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005822>
- Manna, A.C., Leo, S., Girel, S., González-Ruiz, V., Rudaz, S., Francois, P., Cheung, A.L., 2022. Teg58, a small regulatory RNA, is involved in regulating arginine biosynthesis and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Sci. Rep.* 12, 14963. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18815-3>

- Marincola, G., Schäfer, T., Behler, J., Bernhardt, J., Ohlsen, K., Goerke, C., Wolz, C., 2012. RNase Y of *Staphylococcus aureus* and its role in the activation of virulence genes. *Mol. Microbiol.* 85, 817–832. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08144.x>
- Martí, M., Trotonda, M.P., Tormo-Más, M.A., Vergara-Irigaray, M., Cheung, A.L., Lasa, I., Penadés, J.R., 2010. Extracellular proteases inhibit protein-dependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Microbes Infect.* 12, 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.10.005>
- Masters, E.A., Ricciardi, B.F., Bentley, K.L. de M., Moriarty, T.F., Schwarz, E.M., Muthukrishnan, G., 2022. Skeletal infections: microbial pathogenesis, immunity and clinical management. *Nat. Rev. Microbiol.* 20, 385–400. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00686-0>
- Matera, G., Altuvia, Y., Gerovac, M., El Mouali, Y., Margalit, H., Vogel, J., 2022. Global RNA interactome of *Salmonella* discovers a 5' UTR sponge for the MicF small RNA that connects membrane permeability to transport capacity. *Mol. Cell* 82, 629–644.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.12.030>
- Maurice, N.M., Bedi, B., Sadikot, R.T., 2018. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Host Response and Clinical Implications in Lung Infections. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 58, 428–439. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0321TR>
- McCarthy, H., Rudkin, J.K., Black, N.S., Gallagher, L., O'Neill, E., O'Gara, J.P., 2015. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5.
- McKellar, S.W., Ivanova, I., Arede, P., Zapf, R.L., Mercier, N., Chu, L.-C., Mediati, D.G., Pickering, A.C., Briaud, P., Foster, R.G., Kudla, G., Fitzgerald, J.R., Caldelari, I., Carroll, R.K., Tree, J.J., Granneman, S., 2022. RNase III CLASH in MRSA uncovers sRNA regulatory networks coupling metabolism to toxin expression. *Nat. Commun.* 13, 3560. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31173-y>
- Mehlin, C., Headley, C.M., Klebanoff, S.J., 1999. An Inflammatory Polypeptide Complex from *Staphylococcus epidermidis*: Isolation and Characterization. *J. Exp. Med.* 189, 907–918.
- Melamed, S., Adams, P.P., Zhang, A., Zhang, H., Storz, G., 2020. RNA-RNA Interactomes of ProQ and Hfq Reveal Overlapping and Competing Roles. *Mol. CELL* 77, 411–+. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.10.022>
- Melamed, S., Faigenbaum-Romm, R., Peer, A., Reiss, N., Shechter, O., Bar, A., Altuvia, Y., Argaman, L., Margalit, H., 2018. Mapping the small RNA interactome in bacteria using RIL-seq. *Nat. Protoc.* 13, 1–33. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.115>
- Menendez-Gil, P., Caballero, C.J., Catalan-Moreno, A., Irurzun, N., Barrio-Hernandez, I., Caldelari, I., Toledo-Arana, A., 2020. Differential evolution in 3'UTRs leads to specific gene expression in *Staphylococcus*. *Nucleic Acids Res.* 48, 2544–2563. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa047>
- Mercier, N., Prévost, K., Massé, E., Romby, P., Caldelari, I., Lalaouna, D., 2021. MS2-Affinity Purification Coupled with RNA Sequencing in Gram-Positive Bacteria. *JoVE J. Vis. Exp.* e61731. <https://doi.org/10.3791/61731>
- Merino, N., Toledo-Arana, A., Vergara-Irigaray, M., Valle, J., Solano, C., Calvo, E., Lopez, J.A., Foster, T.J., Penadés, J.R., Lasa, I., 2009. Protein A-Mediated Multicellular Behavior in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 191, 832–843. <https://doi.org/10.1128/JB.01222-08>
- Mizuno, T., Chou, M.Y., Inouye, M., 1984. A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 1966–1970.

- Moormeier, D.E., Bose, J.L., Horswill, A.R., Bayles, K.W., 2014. Temporal and Stochastic Control of *Staphylococcus aureus* Biofilm Development. *mBio* 5, e01341-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01341-14>
- Moormeier, D.E., Endres, J.L., Mann, E.E., Sadykov, M.R., Horswill, A.R., Rice, K.C., Fey, P.D., Bayles, K.W., 2013. Use of Microfluidic Technology To Analyze Gene Expression during *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation Reveals Distinct Physiological Niches. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 3413–3424. <https://doi.org/10.1128/AEM.00395-13>
- Mozos, I.R. de los, Vergara-Irigaray, M., Segura, V., Villanueva, M., Bitarte, N., Saramago, M., Domingues, S., Arraiano, C.M., Fechter, P., Romby, P., Valle, J., Solano, C., Lasa, I., Toledo-Arana, A., 2013. Base Pairing Interaction between 5'- and 3'-UTRs Controls *icaR* mRNA Translation in *Staphylococcus aureus*. *PLOS Genet.* 9, e1004001. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004001>
- Mulcahy, M.E., Geoghegan, J.A., Monk, I.R., O'Keeffe, K.M., Walsh, E.J., Foster, T.J., McLoughlin, R.M., 2012. Nasal Colonisation by *Staphylococcus aureus* Depends upon Clumping Factor B Binding to the Squamous Epithelial Cell Envelope Protein Loricrin. *PLoS Pathog.* 8, e1003092. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003092>
- Mulhbachter, J., Brouillette, E., Allard, M., Fortier, L.-C., Malouin, F., Lafontaine, D.A., 2010. Novel Riboswitch Ligand Analogs as Selective Inhibitors of Guanine-Related Metabolic Pathways. *PLOS Pathog.* 6, e1000865. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000865>
- Murray, C.J.L., Ikuta, K.S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G.R., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S.C., Browne, A.J., Chipeta, M.G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Hamadani, B.H.K., Kumaran, E.A.P., McManigal, B., Achalapong, S., Agarwal, R., Akech, S., Albertson, S., Amuasi, J., Andrews, J., Aravkin, A., Ashley, E., Babin, F.-X., Bailey, F., Baker, S., Basnyat, B., Bekker, A., Bender, R., Berkley, J.A., Bethou, A., Bielicki, J., Boonkasidecha, S., Bukosia, J., Carneiro, C., Castañeda-Orjuela, C., Chansamouth, V., Chaurasia, S., Chiurchiù, S., Chowdhury, F., Donatien, R.C., Cook, A.J., Cooper, B., Cressey, T.R., Criollo-Mora, E., Cunningham, M., Darboe, S., Day, N.P.J., Luca, M.D., Dokova, K., Dramowski, A., Dunachie, S.J., Bich, T.D., Eckmanns, T., Eibach, D., Emami, A., Feasey, N., Fisher-Pearson, N., Forrest, K., Garcia, C., Garrett, D., Gastmeier, P., Giref, A.Z., Greer, R.C., Gupta, V., Haller, S., Haselbeck, A., Hay, S.I., Holm, M., Hopkins, S., Hsia, Y., Iregebu, K.C., Jacobs, J., Jarovsky, D., Javanmardi, F., Jenney, A.W.J., Khorana, M., Khusuwan, S., Kisson, N., Kobeissi, E., Kostyanov, T., Krapp, F., Krumkamp, R., Kumar, A., Kyu, H.H., Lim, C., Lim, K., Limmathurotsakul, D., Loftus, M.J., Lunn, M., Ma, J., Manoharan, A., Marks, F., May, J., Mayxay, M., Mturi, N., Munera-Huertas, T., Musicha, P., Musila, L.A., Mussi-Pinhata, M.M., Naidu, R.N., Nakamura, T., Nanavati, R., Nangia, S., Newton, P., Ngoun, C., Novotney, A., Nwakanma, D., Obiero, C.W., Ochoa, T.J., Olivas-Martinez, A., Olliaro, P., Ooko, E., Ortiz-Brizuela, E., Ounchanum, P., Pak, G.D., Paredes, J.L., Peleg, A.Y., Perrone, C., Phe, T., Phommasone, K., Plakkal, N., Ponce-de-Leon, A., Raad, M., Ramdin, T., Rattanavong, S., Riddell, A., Roberts, T., Robotham, J.V., Roca, A., Rosenthal, V.D., Rudd, K.E., Russell, N., Sader, H.S., Saengchan, W., Schnall, J., Scott, J.A.G., Seekaew, S., Sharland, M., Shivamallappa, M., Sifuentes-Osornio, J., Simpson, A.J., Steenkeste, N., Stewardson, A.J., Stoeva, T., Tasak, N., Thaiprakong, A., Thwaites, G., Tigoi, C., Turner, C., Turner, P., Doorn, H.R. van, Velaphi, S., Vongpradith, A., Vongsouvath, M., Vu, H., Walsh, T., Walson, J.L., Waner, S., Wangrangsimakul, T., Wannapinij, P., Wozniak, T., Sharma, T.E.M.W.Y., Yu, K.C., Zheng, P., Sartorius, B., Lopez, A.D., Stergachis, A., Moore, C., Dolecek, C., Naghavi, M., 2022. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a

- systematic analysis. *The Lancet* 399, 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- O’Gara, J.P., 2007. *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 270, 179–188. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00688.x>
- Ogston, A., 1881. Report upon Micro-Organisms in Surgical Diseases. *Br. Med. J.* 1, 369.b2-375.
- O’Neill, E., Pozzi, C., Houston, P., Smyth, D., Humphreys, H., Robinson, D.A., O’Gara, J.P., 2007. Association between Methicillin Susceptibility and Biofilm Regulation in *Staphylococcus aureus* Isolates from Device-Related Infections. *J. Clin. Microbiol.* 45, 1379–1388. <https://doi.org/10.1128/JCM.02280-06>
- Oriol, C., Cengher, L., Manna, A.C., Mauro, T., Pinel-Marie, M.-L., Felden, B., Cheung, A., Rouillon, A., n.d. Expanding the *Staphylococcus aureus* SarA Regulon to Small RNAs. *mSystems* 6, e00713-21. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00713-21>
- Otto, M., 2013. Staphylococcal Infections: Mechanisms of Biofilm Maturation and Detachment as Critical Determinants of Pathogenicity. *Annu. Rev. Med.* 64, 175–188. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-042711-140023>
- Periasamy, S., Joo, H.-S., Duong, A.C., Bach, T.-H.L., Tan, V.Y., Chatterjee, S.S., Cheung, G.Y.C., Otto, M., 2012. How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 1281–1286. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115006109>
- Peschel, A., Otto, M., 2013. Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 667–673. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3110>
- Piechota, M., Kot, B., Frankowska-Maciejewska, A., Gruzewska, A., Woźniak-Kosek, A., 2018. Biofilm Formation by Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Strains from Hospitalized Patients in Poland. *BioMed Res. Int.* 2018, 4657396. <https://doi.org/10.1155/2018/4657396>
- Pivard, M., Moreau, K., Vandenesch, F., 2021. *Staphylococcus aureus* Arsenal To Conquer the Lower Respiratory Tract. *mSphere* 6, e00059-21. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00059-21>
- Pozzi, C., Waters, E.M., Rudkin, J.K., Schaeffer, C.R., Lohan, A.J., Tong, P., Loftus, B.J., Pier, G.B., Fey, P.D., Massey, R.C., O’Gara, J.P., 2012. Methicillin Resistance Alters the Biofilm Phenotype and Attenuates Virulence in *Staphylococcus aureus* Device-Associated Infections. *PLOS Pathog.* 8, e1002626. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002626>
- Que, Y.-A., Haeffliger, J.-A., Piroth, L., François, P., Widmer, E., Entenza, J.M., Sinha, B., Herrmann, M., Francioli, P., Vaudaux, P., Moreillon, P., 2005. Fibrinogen and fibronectin binding cooperate for valve infection and invasion in *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis. *J. Exp. Med.* 201, 1627–1635. <https://doi.org/10.1084/jem.20050125>
- Quinn, J.D., Weening, E.H., Miner, T.A., Miller, V.L., 2019. Temperature Control of *psaA* Expression by *PsaE* and *PsaF* in *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* 201, e00217-19. <https://doi.org/10.1128/JB.00217-19>
- Rani, S.A., Pitts, B., Beyenal, H., Veluchamy, R.A., Lewandowski, Z., Davison, W.M., Buckingham-Meyer, K., Stewart, P.S., 2007. Spatial Patterns of DNA Replication, Protein Synthesis, and Oxygen Concentration within Bacterial Biofilms Reveal Diverse Physiological States. *J. Bacteriol.* 189, 4223–4233. <https://doi.org/10.1128/JB.00107-07>

- Redelman, C.V., Maduakolam, C., Anderson, G.G., 2012. Alcohol treatment enhances *Staphylococcus aureus* biofilm development. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 66, 411–418. <https://doi.org/10.1111/1574-695X.12005>
- Rochat, T., Bohn, C., Morvan, C., Le Lam, T.N., Razvi, F., Pain, A., Toffano-Nioche, C., Ponien, P., Jacq, A., Jacquet, E., Fey, P.D., Gautheret, D., Boulloc, P., 2018. The conserved regulatory RNA RsaE down-regulates the arginine degradation pathway in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res.* 46, 8803–8816. <https://doi.org/10.1093/nar/gky584>
- Rogers, K.L., Rupp, M.E., Fey, P.D., 2008. The Presence of icaADBC Is Detrimental to the Colonization of Human Skin by *Staphylococcus epidermidis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6155–6157. <https://doi.org/10.1128/AEM.01017-08>
- Rohde, H., Burandt, E.C., Siemssen, N., Frommelt, L., Burdelski, C., Wurster, S., Scherpe, S., Davies, A.P., Harris, L.G., Horstkotte, M.A., Knobloch, J.K.-M., Ragunath, C., Kaplan, J.B., Mack, D., 2007. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials* 28, 1711–1720. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.11.046>
- Romilly, C., Lays, C., Tomasini, A., Caldelari, I., Benito, Y., Hammann, P., Geissmann, T., Boisset, S., Romby, P., Vandenesch, F., 2014a. A Non-Coding RNA Promotes Bacterial Persistence and Decreases Virulence by Regulating a Regulator in *Staphylococcus aureus*. *PLOS Pathog.* 10, e1003979. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003979>
- Romilly, C., Lays, C., Tomasini, A., Caldelari, I., Benito, Y., Hammann, P., Geissmann, T., Boisset, S., Romby, P., Vandenesch, F., 2014b. A Non-Coding RNA Promotes Bacterial Persistence and Decreases Virulence by Regulating a Regulator in *Staphylococcus aureus*. *PLOS Pathog.* 10, e1003979. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003979>
- Rosenbach, F.J., 1884. Mikro-organismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen. J.F. Bergmann, Wiesbaden. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.22955>
- Saini, S., Tewari, S., Dwivedi, J., Sharma, V., 2023. Biofilm-mediated wastewater treatment: a comprehensive review. *Mater. Adv.* 4, 1415–1443. <https://doi.org/10.1039/D2MA00945E>
- Santiago-Frangos, A., Woodson, S.A., 2018. Hfq chaperone brings speed dating to bacterial sRNA. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 9, e1475. <https://doi.org/10.1002/wrna.1475>
- Santos, A.P.A., Watanabe, E., Andrade, D. de, 2011. Biofilm on artificial pacemaker: fiction or reality? *Arq. Bras. Cardiol.* 97, e113-120. <https://doi.org/10.1590/s0066-782x2011001400018>
- Schlievert, P.M., Davis, C.C., 2020. Device-Associated Menstrual Toxic Shock Syndrome. *Clin. Microbiol. Rev.* 33, e00032-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00032-19>
- Schoenborn, S., Kroemker, V., 2016. Detection of the biofilm component polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* infected cow udders. *Vet. Microbiol.* 196, 126–128. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.10.023>
- Schoenfelder, S.M.K., Lange, C., Prakash, S.A., Marincola, G., Lerch, M.F., Wencker, F.D.R., Förstner, K.U., Sharma, C.M., Ziebuhr, W., 2019. The small non-coding RNA RsaE influences extracellular matrix composition in *Staphylococcus epidermidis* biofilm communities. *PLoS Pathog.* 15, e1007618. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007618>
- Schwartz, K., Syed, A.K., Stephenson, R.E., Rickard, A.H., Boles, B.R., 2012. Functional Amyloids Composed of Phenol Soluble Modulins Stabilize *Staphylococcus aureus* Biofilms. *PLoS Pathog.* 8, e1002744. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002744>

- Sharma, E., Sterne-Weiler, T., O'Hanlon, D., Blencowe, B.J., 2016. Global Mapping of Human RNA-RNA Interactions. *Mol. Cell* 62, 618–626. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.04.030>
- Silva, V., Almeida, L., Gaio, V., Cerca, N., Manageiro, V., Caniça, M., Capelo, J.L., Igrejas, G., Poeta, P., 2021. Biofilm Formation of Multidrug-Resistant MRSA Strains Isolated from Different Types of Human Infections. *Pathogens* 10, 970. <https://doi.org/10.3390/pathogens10080970>
- Singh, A.K., Prakash, P., Achra, A., Singh, G.P., Das, A., Singh, R.K., 2017. Standardization and Classification of In vitro Biofilm Formation by Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Glob. Infect. Dis.* 9, 93–101. https://doi.org/10.4103/jgid.jgid_91_16
- Singh, R., Ray, P., Das, A., Sharma, M., 2010. Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 1955–1958. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq257>
- Ster, C., Allard, M., Boulanger, S., Lamontagne Boulet, M., Mulhbach, J., Lafontaine, D.A., Marsault, E., Lacasse, P., Malouin, F., 2013. Experimental treatment of *Staphylococcus aureus* bovine intramammary infection using a guanine riboswitch ligand analog. *J. Dairy Sci.* 96, 1000–1008. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5890>
- Stougaard, P., Molin, S., Nordström, K., 1981. RNAs involved in copy-number control and incompatibility of plasmid R1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 6008–6012. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.10.6008>
- Tomasini, A., Moreau, K., Chicher, J., Geissmann, T., Vandenesch, F., Romby, P., Marzi, S., Caldelari, I., 2017. The RNA targetome of *Staphylococcus aureus* non-coding RNA RsaA: impact on cell surface properties and defense mechanisms. *Nucleic Acids Res.* 45, 6746–6760. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx219>
- Tomizawa, J., 1984. Control of colE1 plasmid replication: The process of binding of RNA I to the primer transcript. *Cell* 38, 861–870. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90281-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90281-2)
- Tomizawa, J., Itoh, T., Selzer, G., Som, T., 1981. Inhibition of ColE1 RNA primer formation by a plasmid-specified small RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 1421. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.3.1421>
- Tsompanidou, E., Denham, E.L., Becher, D., de Jong, A., Buist, G., van Oosten, M., Manson, W.L., Back, J.W., van Dijk, J.M., Dreisbach, A., 2013. Distinct Roles of Phenol-Soluble Modulins in Spreading of *Staphylococcus aureus* on Wet Surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 886–895. <https://doi.org/10.1128/AEM.03157-12>
- Tuchscherr, L., Löffler, B., Proctor, R.A., 2020. Persistence of *Staphylococcus aureus*: Multiple Metabolic Pathways Impact the Expression of Virulence Factors in Small-Colony Variants (SCVs). *Front. Microbiol.* 11, 1028. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01028>
- Turlej, A., Hryniewicz, W., Empel, J., 2011. Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec) Classification and Typing Methods: an Overview. *Pol. J. Microbiol.* 60, 95–103. <https://doi.org/10.33073/pjm-2011-013>
- Ulrich, M., Bastian, M., Cramton, S.E., Ziegler, K., Pragman, A.A., Bragonzi, A., Memmi, G., Wolz, C., Schlievert, P.M., Cheung, A., Döring, G., 2007. The staphylococcal respiratory response regulator SrrAB induces ica gene transcription and polysaccharide intercellular adhesin expression, protecting *Staphylococcus aureus* from neutrophil killing under anaerobic growth conditions. *Mol. Microbiol.* 65, 1276–1287. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05863.x>
- Valle, J., Echeverez, M., Lasa, I., 2019. sigma(B) Inhibits Poly-N-Acetylglucosamine Exopolysaccharide Synthesis and Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 201, e00098-19. <https://doi.org/10.1128/JB.00098-19>

- Vázquez-Sánchez, D., Habimana, O., Holck, A., 2013. Impact of Food-Related Environmental Factors on the Adherence and Biofilm Formation of Natural *Staphylococcus aureus* Isolates. *Curr. Microbiol.* 66, 110–121. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0247-8>
- Vergara-Irigaray, M., Valle, J., Merino, N., Latasa, C., García, B., Ruiz de los Mozos, I., Solano, C., Toledo-Arana, A., Penadés, J.R., Lasa, I., 2009. Relevant Role of Fibronectin-Binding Proteins in *Staphylococcus aureus* Biofilm-Associated Foreign-Body Infections. *Infect. Immun.* 77, 3978–3991. <https://doi.org/10.1128/IAI.00616-09>
- Wang, R., Khan, B.A., Cheung, G.Y.C., Bach, T.-H.L., Jameson-Lee, M., Kong, K.-F., Queck, S.Y., Otto, M., 2011. *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 238–248. <https://doi.org/10.1172/JCI42520>
- Wassarman, K.M., Storz, G., 2000. 6S RNA regulates *E. coli* RNA polymerase activity. *Cell* 101, 613–623. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80873-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80873-9)
- Waterhouse, P.M., Graham, M.W., Wang, M.B., 1998. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 13959–13964. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.23.13959>
- Waters, S.A., McAteer, S.P., Kudla, G., Pang, I., Deshpande, N.P., Amos, T.G., Leong, K.W., Wilkins, M.R., Strugnell, R., Gally, D.L., Tollervey, D., Tree, J.J., 2017. Small RNA interactome of pathogenic *E. coli* revealed through crosslinking of RNase E. *EMBO J.* 36, 374–387. <https://doi.org/10.15252/embj.201694639>
- Watson, J.D., Crick, F.H., 1953. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737–738. <https://doi.org/10.1038/171737a0>
- Weilbacher, T., Suzuki, K., Dubey, A.K., Wang, X., Gudapaty, S., Morozov, I., Baker, C.S., 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. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03459.x>
- Wencker, F.D.R., Marincola, G., Schoenfelder, S.M.K., Maaß, S., Becher, D., Ziebuhr, W., 2021. Another layer of complexity in *Staphylococcus aureus* methionine biosynthesis control: unusual RNase III-driven T-box riboswitch cleavage determines met operon mRNA stability and decay. *Nucleic Acids Res.* 49, 2192–2212. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1277>
- Wright, P.R., Georg, J., Mann, M., Sorescu, D.A., Richter, A.S., Lott, S., Kleinkauf, R., Hess, W.R., Backofen, R., 2014. CopraRNA and IntaRNA: predicting small RNA targets, networks and interaction domains. *Nucleic Acids Res.* 42, W119–W123. <https://doi.org/10.1093/nar/gku359>
- Yang, Q., Figueroa-Bossi, N., Bossi, L., 2014. Translation enhancing ACA motifs and their silencing by a bacterial small regulatory RNA. *PLoS Genet.* 10, e1004026. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004026>
- Zaman, M., Andreasen, M., 2020. Cross-talk between individual phenol-soluble modulins in *Staphylococcus aureus* biofilm enables rapid and efficient amyloid formation. *eLife* 9, e59776. <https://doi.org/10.7554/eLife.59776>
- Zapf, R.L., Wiemels, R.E., Keogh, R.A., Holzschu, D.L., Howell, K.M., Trzeciak, E., Caillet, A.R., King, K.A., Selhorst, S.A., Naldrett, M.J., Bose, J.L., Carroll, R.K., 2019. The Small RNA Teg41 Regulates Expression of the Alpha Phenol-Soluble Modulins and Is Required for Virulence in *Staphylococcus aureus*. *mBio* 10, e02484-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.02484-18>
- Zea, L., McLean, R.J.C., Rook, T.A., Angle, G., Carter, D.L., Delegard, A., Denvir, A., Gerlach, R., Gorti, S., McIlwaine, D., Nur, M., Peyton, B.M., Stewart, P.S., Sturman, P., Velez Justiniano, Y.A., 2020. Potential biofilm control strategies for extended spaceflight missions. *Biofilm* 2, 100026. <https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2020.100026>

Zeman, M., Mašlaňová, I., Indráková, A., Šiborová, M., Mikulášek, K., Bendíčková, K., Plevka, P., Vrbovská, V., Zdráhal, Z., Doškař, J., Pantůček, R., 2017. *Staphylococcus sciuri* bacteriophages double-convert for staphylokinase and phospholipase, mediate interspecies plasmid transduction, and package *mecA* gene. *Sci. Rep.* 7, 46319. <https://doi.org/10.1038/srep46319>

Noémie MERCIER

Étude des ARN régulateurs et de leurs réseaux impliqués dans la formation des biofilms chez *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est un pathogène opportuniste capable de produire deux types de biofilms : *ica*-indépendants et *ica*-dépendants. Le premier repose sur l'expression de protéines et la sécrétion d'ADN extracellulaire. Le second dépend de l'expression de l'opéron *icaADBC* qui produit les enzymes nécessaires à la synthèse de l'exopolysaccharide qui compose la matrice. Le régulateur transcriptionnel IcaR conduit à la répression de *icaADBC*. L'ARN messager (ARNm) *icaR* comporte une longue région 3' non traduite contenant une séquence anti-Shine et Dalgarno. Ce motif interagit avec le site de liaison du ribosome entraînant la dégradation et l'inhibition de la traduction de ce transcrit. Trois ARN régulateurs (sARN)- RsaA, RsaI et RsaE - ont été identifiés parmi les partenaires ARN de l'ARNm *icaR* grâce à la technique du MAPS (*MS2-affinity purification coupled with RNA sequencing*). L'enjeu de ce travail de thèse fut de caractériser les mécanismes de régulation impliquant ces trois ARN régulateurs sur la formation de biofilm *ica*-dépendant *via* la régulation de l'expression d'IcaR ; mais également de décrire les cibles de RsaE engagées dans la formation de biofilm *ica*-indépendant. Dans un second temps, le projet a permis de développer un outil d'étude de l'interactome ARN-ARN afin de caractériser les réseaux de régulation médiés par les ARN régulateurs.

Mots clés : *Staphylococcus aureus*, ARN régulateurs, biofilm

Staphylococcus aureus is an opportunistic pathogen capable of producing two types of biofilms: *ica*-independent and *ica*-dependent. The first relies on the expression of proteins and the secretion of extracellular DNA. The second depends on the expression of the *icaADBC* operon, which produces the enzymes necessary for the synthesis of the exopolysaccharide composing the matrix. The transcriptional regulator IcaR leads to *icaADBC* repression. The messenger RNA (mRNA) *icaR* is composed of a long 3' untranslated region containing an anti-Shine and Dalgarno sequence. This motif interacts with the ribosome binding site, leading to the degradation and inhibition of the messenger translation. Three regulatory RNAs (sRNA) - RsaA, RsaI and RsaE - have been identified among the RNA partners of *icaR* mRNA using the MAPS technique (*MS2-affinity purification coupled with RNA sequencing*). The aim of this thesis work was to characterize the regulatory mechanisms involving these three regulatory RNAs in the formation of *ica*-dependent biofilm by regulating the expression of IcaR; and also to describe the targets of RsaE involved in the formation of *ica*-independent biofilm. In a second phase, the project allowed to develop a tool to study the RNA-RNA interactome to characterize the regulatory networks mediated by regulatory RNAs.

Keywords : *Staphylococcus aureus*, regulatory RNA, biofilm