



Étude de petits ARNs chez une bactérie: *Helicobacter pylori*

Hélène Arnion

► To cite this version:

Hélène Arnion. Étude de petits ARNs chez une bactérie: *Helicobacter pylori*. Biochimie, Biologie Moléculaire. 2011. hal-01462031

HAL Id: hal-01462031

<https://ephe.hal.science/hal-01462031>

Submitted on 8 Feb 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

présenté

par

ARNION Hélène

pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

TITRE : Étude de petits ARNs chez une bactérie : *Helicobacter pylori*

soutenu le 25 novembre 2011 devant le jury suivant :

Lagroye Isabelle – Président

Darfeuille Fabien – Tuteur scientifique

Lasbleiz Christelle – Tuteur pédagogique

Clouet d'orval Beatrice – Rapporteur

Hajnsdorf Eliane – Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

***DARFEUILLE Fabien* (fabien.darfeuille@inserm.fr)**

Laboratoire INSERM U869, ARN : régulation naturelle et artificielle

Bât 3A, 1^{er} étage, site Carreire,

146, rue Léo Saignat

33046 Bordeaux cedex

Directeur : MERGNY Jean-Louis.

et de

***LASBLEIZ Christelle* (christelle.lasbleiz@uvsq.fr)**

Laboratoire de génétique et de biologie moléculaire (FRE3216 UVSQ/ CNRS)

Bât Fermat, Université de Versailles/St-Quentin

45, avenue des Etats Unis

78035 Versailles cedex

Directeur : *MIGNOTTE Bernard*

EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)

**ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE**

Étude de petits ARNs chez une bactérie : *Helicobacter pylori*

Arnion Hélène

25 novembre 2011

RÉSUMÉ

Helicobacter pylori (*H. pylori*) est une bactérie Gram-négative colonisant durablement l'estomac d'une personne sur deux à travers le monde. Sa présence est associée avec la plupart des ulcères et cancers gastriques. Bien que les facteurs protéiques impliqués dans la virulence et l'adaptation de la bactérie à l'environnement gastrique ont été largement étudiés, peu d'informations sont disponibles concernant la régulation de l'expression de ses gènes.

Les récentes techniques de séquençage à haut-débit ont révolutionné l'analyse des transcriptomes bactériens, et donc la compréhension de la régulation des gènes chez les procaryotes. Mon laboratoire d'accueil s'intéresse plus particulièrement à la régulation par les petits ARNs non codant (sARNnc). Chez *H. pylori*, l'analyse du transcriptome de la souche 26695 a révélé une centaine de sARNnc et l'expression de soixante d'entre eux a été confirmée par Northern Blot.

Mon travail s'est inscrit dans l'analyse de ces différents sARNs c'est à dire dans la compréhension du rôle de ces ARNs dans les mécanismes de régulation de la traduction ainsi que dans la physiologie ou la pathogénicité d'*H. pylori*. Pour cela mon étude s'est portée sur un petit ARN très abondant, le HPnc5490 et d'une famille de sARN nommés IsoA.

Des études préliminaires ont montré que le HPnc5490 pourrait être impliqué dans la régulation de la traduction de la protéine TlpB par un mécanisme « trans » antisens. La protéine TlpB étant un récepteur membranaire impliqué dans le pH-tactisme de la bactérie, le sARN HPnc5490 serait lui aussi impliqué dans ce processus physiologique via la régulation de TlpB. Les résultats obtenus lors de cette étude confirment cette hypothèse.

Par ailleurs, la famille des IsoA compte 6 membres homologues dans la souche 26695. Ils régulent de manière « cis » antisens la traduction de petits peptides de 30 acides aminés codés par des ARNs messagers nommés aapA. Ce duo aapA/IsoA est très similaire aux cassettes toxine-antitoxine (TA) de type I décrites dans la littérature. Une partie de notre étude a permis de confirmer l'appartenance de ces cassettes aux TA de type I. Une autre partie de notre travail, une étude bioinformatique, nous a permis de montrer la grande conservation de ces cassettes au sein de nombreuses souches d'*H. pylori*. Une dernière partie nous a permis de monter l'implication de la RNase III dans la maturation des ARNs d'*H. pylori*.

Ce travail a donc permis d'apporter de nouvelles données dans la compréhension de la régulation de l'expression des gènes de *H. pylori*.

Mots clés : *Helicobacter pylori*, petits ARNs non codants, cassettes toxine-antitoxine, régulation post transcriptionnelle

Sommaire

Première partie : Introduction	8
Chapitre 1 : <i>Helicobacter pylori</i> (<i>H. pylori</i>)	9
a) Généralités	9
b) Adaptation, colonisation et virulence	10
c) Le génome d' <i>H. pylori</i>	11
d) Régulation de l'expression des gènes chez <i>H. pylori</i>	12
e) La compétence naturelle et la recombinaison homologue	13
Chapitre 2 : Les petits ARNs régulateurs	14
a) Origine	14
b) Mode d'action	15
c) Leurs rôles	19
d) Les modules toxines/antitoxines	20
e) Les sARNs chez <i>H. pylori</i>	25
1. sARN HPnc5490	26
2. Famille des sARNs aapA/IsoA	27
Chapitre 3 : Objectifs du projet	32
a) Le petit ARN HPnc5490	32
b) Les cassettes AapA/IsoA	33
Deuxième partie : Matériels et méthodes	35
Chapitre 1 : Matériels et milieux microbiologiques	36
a) Souches bactériennes et plasmides	36
b) Milieux et conditions de culture	37
c) Détermination de la CMI	38
Chapitre 2 : Techniques de biologie moléculaire	38
a) Technique de PCR	38
b) Construction des cassettes de modification génétique par PCR et insertion dans le génome	39
c) Séparation des acides nucléiques par électrophorèse	41
d) Purification d'un produit obtenu par PCR	41
e) Extraction de l'ADN génomique d' <i>H. pylori</i>	41
f) Extraction des ARNs totaux d' <i>H. pylori</i> : technique du phénol chaud	41
g) Mutagenèse dirigée	42
h) La transcription <i>in vitro</i> et promoteur T7	43
i) Gels d'empreintes ou foot print	44
j) Northern blot	45
k) Révélation des gels d'empreinte, de traduction et des membranes de nylon.	45
l) La RT-qPCR	45
Chapitre 3 : Clonage d'un plasmide dans une souche d' <i>Escherichia coli</i>	46
a) Bactéries électrocompétentes	46
b) Électroporation d'un plasmide	46
c) Extraction de plasmide	46
Chapitre 4 : Transformation d' <i>H. pylori</i>	47
a) Avec un fragment d'ADN	47
b) La conjugaison	47
Chapitre 5 : Outils d'analyse informatique	47

Troisième partie : Résultats.....	49
Chapitre 1 : Étude du HPnc5490.....	50
a) Étude de l'expression du HPnc5490.....	50
b) Étude de l'effet du HPnc5490 sur le gène TlpB.....	51
c) Implication du HPnc5490 dans la colonisation de l'estomac de souris par <i>H. pylori</i> . 54	
Chapitre 2 : Études des cassettes AapA/IsoA.....	55
a) Étude générale des cassettes aapA/IsoA.....	55
1. Étude bioinformatique des cassettes aapA/IsoA.....	55
2. Étude générale de l'expression des cassettes.....	62
b) Caractérisation des cassettes aapA/IsoA.....	68
1. Stabilité des ARNs : Test à la rifampicine.....	68
2. Étude de la maturation de l'ARNm AapA1 et du sARN IsoA1.....	69
3. Rôle de la RNase III dans la maturation des ARNs de la cassette aapA1/IsoA1.....	72
4. Toxicité du peptide.....	74
c) Rôle de ces cassettes AapA/IsoA : Détermination de l'implication des cassettes dans la persistance.....	79
d) Étude in vitro des cassettes : mécanisme d'interaction entre aapA et IsoA.....	82
Quatrième partie : Conclusion et perspectives.....	92
Chapitre 1 : Projet HPnc5490.....	93
Chapitre 2 : Les cassettes aapA/IsoA.....	94
a) Étude générale des aapA/IsoA.....	94
b) Caractérisation des cassettes aapA/IsoA.....	96
c) Rôle des cassettes.....	97
Cinquième partie : Références bibliographiques.....	100
Annexes.....	106
Amorces utilisées.....	107
Cartes des plasmides utilisés lors de l'étude.....	111

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique d' <i>H. pylori</i> dans l'estomac.....	10
Figure 2 : Principaux facteurs de colonisation d' <i>H. pylori</i>	11
Figure 3 : Systèmes de sécrétions chez <i>H. pylori</i>	13
Figure 4 : Représentation schématique des régions intergéniques.....	15
Figure 5 : Représentation schématique des mécanismes de transcription et de traduction.	16
Figure 6 : Régulation négative de la traduction par le sARNs.....	17
Figure 7 : Régulation positive de la traduction par le petit ARNs	17
Figure 8 : Définition des sRNA codés en cis (A) ou en trans (B) en fonction de leur localisation par rapport à une ORF.....	18
Figure 9 : Organisation génomique et mécanisme d'action des modules toxine-antitoxine chromosomiques chez les bactéries.....	22
Figure 10 : Représentations schématiques du cycle de vie de bactéries « persister ».	25
Figure 11 : Structure du petit ARN HPnc5490 et interaction avec sa cible.....	26
Figure 12 : Représentation schématique d'une cassette : AapA1/IsoA1.....	27
Figure 13 : Distribution des différentes cassettes de la famille des aapA sur le génome de la souche <i>H. pylori</i> 26695.....	28
Figure 14 : Représentation en roue de l'hélice- α prédite pour les peptides A1-A6 de la souche d' <i>H. pylori</i> 26695.....	29
Figure 15 : Alignement ClustalW2 des cassettes A1 à A6.....	30
Figure 16 : Prédiction informatique de la structure de aapA et de IsoA.....	31
Figure 17 : Structure et mécanisme d'interaction de CopA/CopT.....	32
Figure 18 : Représentation schématique de la construction des cassettes.....	40
Figure 19 : Représentation schématique de l'événement de recombinaison homologue.....	40
Figure 20 : Expression du HPnc5490 dans différentes souches.....	51
Figure 21 : Expression relative de différents ARNm dans plusieurs souches d' <i>H.pylori</i> ..	52
Figure 22 : Représentation de la charge bactérienne présente dans l'estomac des souris infectées avec la souche X47 2AL sauvage et Δ HPnc5490.....	55
Figure 23 : Conservation de la séquence des peptides aapA s'exprimant chez <i>H. pylori</i>	56
Figure 24 : Analyse de l'expression de la cassette aapA1/IsoA1 dans le temps, par Northern Blot.....	63
Figure 25 : Analyse de l'expression de la cassette aapA1/IsoA1 dans quatre souches <i>H. pylori</i> et du aapA3 dans trois souches d' <i>H. pylori</i> , par Northern Blot.....	64
Figure 26 : Analyse de l'expression de la cassette aapA1/IsoA1 dans deux souches d' <i>H. pylori</i> délétées puis complémentées, par Northern Blot.....	65
Figure 27 : Alignement par Clustalw2 de la séquence du aapA1 dans quatre souches d' <i>H. pylori</i> , 26695, P12, J99, B128.....	67
Figure 28 : Analyse du test à la rifampicine, par Northern Blot.....	69
Figure 29 : Analyse de l'expression des différents transcrits maturés de aapA1, par Northern Blot.....	71
Figure 30 : A : Analyse de l'expression des deux transcrits de la cassette aapA1/IsoA1 dans la souche B128 Δ RNase III, par Northern Blot. B : Modèle de maturation de la cassette aapA1/IsoA1 par la RNase III.....	73
Figure 31 : Séquence de l'IsoA1 de la souche 26695, sauvage et mutée dans promoteur.....	75
Figure 32 : Représentation schématique clonage de la séquence de AapA1 dans le pILL2157 bis.....	75
Figure 33 : Schématisation de la complémentation de la souche B128 Δ aapA1/IsoA1 avec les plasmides pWT et pmut.....	76
Figure 34 : Vérification de la complémentation de la cassette aapA1/IsoA1	77

Figure 35 : Suivi de culture des souches B128 délétées et complémentées en <i>aapA1</i> /IsoA1 avec ou sans IPTG.	78
Figure 36 : Antibiotogrammes des souches B128 sauvages et mutées vis-à-vis de la ciprofloxacine.	79
Figure 37 : Dénombrements des bactéries persistance après traitement à la ciprofloxacine. .	80
Figure 38 : Suivi de croissance en fonction de la concentration en IPTG.	81
Figure 39 : Empreintes sur gel de l'interaction du <i>aapA1</i> avec IsoA1 ou IsoA3.	83
Figure 40 : Empreintes de l'interaction d'IsoA1 et A3 sur <i>aapA1</i> en présence de néomycine.	85
Figure 41 : Structures secondaires de <i>aapA1</i> et de IsoA1, et visualisation des boucles L1 et L2 ainsi que des mutations apportées.	86
Figure 42 : Alignement des séquences sauvages et muté du <i>aapA1</i> utilisé pour cette étude..	87
Figure 43 : Visualisation de l'insertion des mutations et de la structure secondaire des séquences sauvages et mutées.	88
Figure 44 : Interaction entre les ARN IsoA/ <i>aapA</i> WT ou mutés.	90

Liste des tableaux

Tableau 1 : Exemple de sARNnc codés en « <i>trans</i> » régulateur impliqué dans différents processus cellulaires.....	19
Tableau 2 : Présentation des différents mutants utilisés lors des projets présentés.	36
Tableau 3 : Protocole de la PCR enzyme Expand hight fidely.....	39
Tableau 4 : Protocole de la PCR enzyme Pfu turbo.	43
Tableau 5 : Classification des peptides en fonction de leur localisation génomique et de leur sous groupe.....	59
Tableau 6 : Amorces utilisées pour la construction des mutants aapA/IsoA pour l'étude <i>In Vitro</i>	107
Tableau 7 : Amorces utilisées pour la qPCR	107
Tableau 8 : Amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée du promoteur de IsoA1.	108
Tableau 9 : Amorces utilisées pour construire et vérifier l'insertion de toutes les cassettes de délétion et de complémentation.	108
Tableau 10 : Séquences des sondes utilisées pour les Northern Blot.....	110
Tableau 11 : Séquences des sondes utilisées pour identifier les différents transcrits aapA1/IsoA1.....	110

Liste des abréviations

AA :	Acide Aminé
AapA :	Antisens RNA-Associated Peptide family A
ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc :	ADN complémentaire
ARN :	Acide RiboNucléique
sARN :	Petit (small)ARN
ARNnc :	ARN non codant
ARNm :	ARN messenger
b :	Bases
BHI :	Brain heart infusion = bouillon cœur-cerveille
CAB :	Columbia Agar Base
CMI :	Concentration Minimale Inhibitrice
DO :	Densité Optique
EDTA :	Acide Éthylène Diamine Tétracétique
IsoA° :	Inhibitor of Small ORF family A
IM :	Intern membran= membrane interne
IPTG	IsoPropyl- β -D-ThioGalactoside
Kb :	Kilo bases
KDa	Kilo Dalton
LB :	Luria Broth
μ g :	Microgramme
μ L	Microlitre
Mb :	Méga bases
mg :	Milligramme
min :	Minute
mL :	Millilitre
mM :	Millimolaire
nb :	Nombre
nm :	Nanomètre
nt :	Nucléotides
OM :	Outer membran= membrane externe
ORF :	Open reading frame = cadre ouvert de lecture
PAM :	peptide antimicrobien
pb :	Paires de bases
PCR :	Polymerase Chain Reaction = réaction en chaîne par polymérase
Qsp :	quantité suffisante pour
RBS :	Ribosome binding site = site de fixation du ribosome
RPM :	Rotations Par Minute
RTqPCR :	Reverse Tanscription quantitative Polymerase Chain Reaction
S :	Secondes
SD :	Shine Dalgarno
SDS :	Sodium Dodécyl Sulfate
SOC :	Super Optimal broth with Catabolite repression
SVF :	Sérum de Veau Fœtal
TA :	Toxine-Antitoxine
TBE :	Tris Borate EDTA
TCA :	TriChloroAcetate

T_m : melting temperature= température de fusion moléculaire
U_{fc} : Unité formant colonie
UTR : UnTranslated Region = région non traduite
Δ Delta = délété

Première partie : Introduction

Chapitre 1 : *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)

a) Généralités

Au début des années 80, deux chercheurs australiens, Barry Marshall et Robin Warren, isolent la bactérie *H. pylori*, à partir de biopsies de patients souffrants d'ulcères gastriques (Marshall and Warren 1984). Ces travaux leur valurent le prix Nobel de médecine en 2005.

H. pylori est un petit bacille Gram négatif d'environ 3 µm de long et 0,75 µm de large (de Korwin, 2010). Elle appartient aux *Epsilonproteobacteria*, à l'ordre des *Camyllobacteriales* et à la famille des *Helicobacteriaceae*. Cette bactérie est microaérophile, possède 5 à 6 flagelles engainés et une morphologie spiralée. Elle colonise exclusivement l'estomac humain, et c'est d'ailleurs le seul micro-organisme connu à pouvoir survivre dans cette niche hostile, du fait de son acidité. Environ 50% de la population mondiale est infectée par cette bactérie. Cependant, la prévalence de l'infection diffère selon les pays. En effet, l'hygiène et la promiscuité jouent un grand rôle dans la transmission de cette bactérie, qui se fait principalement de manière oro-orale au cours la petite enfance (de Korwin, 2010).

Une fois acquise et en absence de traitement, la bactérie est capable de se développer et de persister dans l'estomac de son hôte tout au long de sa vie. Bien que l'infection passe inaperçue dans 70% des cas, il est aujourd'hui admis que *H. pylori* est l'agent causal de pathologies gastriques telles que les gastrites chroniques et les ulcères. Chez les personnes atteintes d'ulcères, le contexte infectieux et inflammatoire lié à l'infection persistante par *H. pylori* peut conduire, dans 1% des cas, à l'apparition d'un cancer de la muqueuse gastrique ou des tissus lymphoïdes associés (lymphome du MALT). Le cancer gastrique est le quatrième cancer le plus fréquent dans le monde, et le deuxième le plus meurtrier après le cancer du poumon, faisant de l'infection à *H. pylori* un problème de santé publique majeur (site de référence : <http://www.helicobacter.fr>).

b) Adaptation, colonisation et virulence

H. pylori infecte généralement la région inférieure de l'estomac, appelée le pylore, où elle se développe au contact des cellules de la paroi gastrique. La survie et la persistance de la bactérie sont liées à l'expression de plusieurs facteurs de colonisation et de virulence.

Lors de son arrivée dans l'estomac, *H. pylori* doit s'adapter à ce milieu hostile. Pour cela, elle va fuir le pH très acide (environ pH 2) de la lumière stomacale pour se rapprocher des cellules épithéliales de la paroi gastrique, où le pH est moins agressif (environ pH 7). Afin d'atteindre ces cellules, la bactérie va traverser l'épaisse couche de mucus sécrété par les cellules gastriques en utilisant sa forme spiralée et ses flagelles (Croxen *et al.*, 2006). À ce niveau, la bactérie va se fixer aux cellules gastriques par l'intermédiaire de ces adhésines (BabA/B, SabA), protéines appartenant à la famille des protéines de la membrane externe. Ces adhésines sont des facteurs de colonisation essentiels (Guruge *et al.*, 1998).

Grâce à la forte activité de son enzyme uréase, la bactérie est capable de produire des ions ammoniacs (par hydrolyse de l'urée présente dans l'estomac) afin de tamponner son pH périplasmique (Scott *et al.*, 1998; Stingl *et al.*, 2002). Ce processus permet à la bactérie de résister à long terme à l'acidité gastrique.

Les souches les plus virulentes, associées aux ulcères et au cancer gastrique, possèdent sur leur génome un îlot de pathogénicité CagPAI (*cytotoxin associated gene pathogenicity island*) d'une trentaine de gènes, impliqué dans sa virulence. Il code notamment pour un système de sécrétion de type IV et la toxine CagA (Censini *et al.*, 1996). Une fois la bactérie

fixée aux cellules, CagA est injectée dans le cytoplasme de la cellule hôte par ce système de sécrétion de type IV, où elle va pouvoir interférer avec de nombreuses voies de signalisation, altérant l'état physiologique de la cellule. La toxine vacuolisante VacA est également impliquée dans la virulence d'*H. pylori*. Elle est sécrétée dans le milieu extérieur puis se fixe à la surface des cellules humaines, dans lesquelles la toxine est internalisée et induit la formation de pores, anion-sélectifs, au niveau des membranes de la mitochondrie et des endosomes tardifs. Ceci provoque dans un premier temps la formation de vacuoles puis dans un deuxième temps l'apoptose cellulaire (Rudi *et al.*, 1998).

La destruction des cellules épithéliales gastriques, associée à la réponse immunitaire dirigée contre *H. pylori* sont à l'origine de l'inflammation de la muqueuse gastrique et du développement des pathologies gastro-duodénales.

c) Le génome d'*H. pylori*

En raison de sa petite taille (1.6 Mb environ), le génome d'*H. pylori* fut l'un des premiers génomes bactériens séquencés, grâce aux travaux de l'équipe du Dr Venter (Tomb *et al.*, 1997). Ces derniers ont travaillé sur la souche 26695, provenant d'un patient anglais souffrant de gastrite chronique (Tomb *et al.*, 1997). Dès lors, cette souche est devenue la souche de référence. Malheureusement les nombreux passages qu'elle a subis *in vitro* ont fait de la 26695 une souche adaptée à la culture en laboratoire. Notamment, elle a acquis des mutations au niveau des gènes codant pour ses flagelles, la rendant immobile et non compétente pour la colonisation *in vivo*. C'est pour cela que, pour les tests de colonisation chez la souris, d'autres souches sont utilisées, comme, la souche X47 2 AL (Ermak *et al.*, 1998).

Désormais une vingtaine de génomes, issus de souches originaires de différentes zones géographiques, ont été publiés.

L'analyse du génome d'*H. pylori* montre une grande disparité avec ceux d'autres souches bactériennes Gram négatif, ainsi qu'entre les souches d'*H. pylori* elles-mêmes. Ces divergences reflètent l'adaptation d'*H. pylori* à l'estomac et sa longue évolution isolée des autres espèces bactériennes.

d) Régulation de l'expression des gènes chez *H. pylori*

L'expression des gènes de virulence et d'adaptation à l'environnement gastrique nécessite une régulation fine et rapide en fonction des conditions environnantes, parfois très hostiles (comme l'acidité ou la réponse immunitaire).

Cependant, les études par génomique comparative, montrent qu'*H. pylori* ne possède qu'un nombre restreint de facteurs protéiques (facteur de transcription, systèmes à deux composants) impliqués dans la régulation de la réponse au stress et communément rencontrés chez les autres bactéries (Alm *et al.*, 1999; Tomb *et al.*, 1997). Ce faible nombre de protéines régulatrices ne permet pas de comprendre avec précision comment *H. pylori* adapte l'expression de ses gènes en fonction des différentes conditions environnementales rencontrées dans l'estomac.

Récemment, des travaux publiés par mon laboratoire d'accueil en collaboration avec deux équipes allemandes (Max Planck Institut et Leipzig University, Berlin) ont révélé l'existence de très nombreux petits ARN non codants, des petites molécules connues pour intervenir également dans la régulation de l'expression des gènes (Sharma *et al.*, 2010).

Pour identifier ces petits ARN, ils ont adapté une technique récente de séquençage à haut débit (pyroséquençage 454, Sharma *et al.*, 2010) pour séquencer le transcriptome complet d'*H. pylori* souche 26695, c'est-à-dire l'ensemble des ARN exprimés par la bactérie, en

fonction des conditions de culture (Sharma *et al.*, 2010). Ce séquençage a permis de découvrir une centaine de candidats ARNs non codant potentiellement régulateurs.

Au regard du faible nombre de facteurs de régulation protéiques découverts chez *H. pylori*, ces petits ARN régulateurs, qui seront plus précisément décrits dans le Chapitre 2 de l'Introduction, constituent une piste intéressante pour mieux comprendre la régulation de l'expression des gènes chez cette bactérie.

e) La compétence naturelle et la recombinaison homologue

La diversité de séquences au sein de l'espèce est due à une capacité de haute fréquence de recombinaison et à une compétence naturelle à l'assimilation d'ADN, c'est-à-dire à incorporer des fragments d'ADN présents dans le milieu extracellulaire. Différentes manières de modifier le génome existent chez d'*H. pylori*, mais la recombinaison homologue sur son propre génome est l'événement le plus fréquent. Il faut savoir que les échanges génétiques horizontaux sont plus fréquents chez *H. pylori* que dans les autres espèces. Le transfert de gènes horizontal se fait grâce aux systèmes de sécrétion de type IV dont toutes les espèces d'*H. pylori* sont pourvues (Pyndiah *et al.*, 2005, Humbert *et al.*, 2011). En effet, *H. pylori* possède deux systèmes de type IV : l'un codé dans l'îlot de pathogénicité *cag* PAI, composé de sous unités nommés VirB et impliqué dans l'injection de la protéine CagA dans les cellules eucaryotes hôtes. Le deuxième, composé de sous unités nommés comB est impliqué dans l'export d'ADN, la sécrétion de protéines, ainsi que dans la compétence naturelle d'*H. pylori*, (Smeets *et al.*, 2002, Hofreuter *et al.*, 2001) et est aussi impliqué dans la conjugaison bactérienne (Hofreuter *et al.*, 2001), qui consiste au transfert d'un plasmide d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse.

Bien que les outils disponibles pour réaliser des manipulations génétiques chez *H. pylori* soient encore très restreints, sa compétence naturelle et ses capacités de recombinaison homologue s'avèrent très utiles pour générer des mutants de délétion d'un gène.

Chapitre 2 : Les petits ARNs régulateurs

Pendant longtemps, la communauté scientifique pensait que les phénomènes de régulation de l'expression des gènes étaient uniquement assurés par des protéines dites régulatrices telles que les facteurs de transcription notamment.

Cependant, depuis une dizaine d'années, un nombre croissant de travaux rapportent l'implication de petites molécules d'ARNs dans la régulation de l'expression des gènes, et ce dans tous les organismes du règne vivant.

Chez les eucaryotes, ces molécules sont connues sous le nom de microARN, et ils sont impliqués dans le contrôle d'une grande variété de processus cellulaires. À l'instar des eucaryotes, il apparaît que les bactéries disposent également de nombreux régulateurs d'origine ribonucléique impliqués dans des réseaux de régulation complexes et essentiels dans la physiologie ou la virulence. Ces molécules sont qualifiées de petits ARNs régulateurs ou sRNA/sARN (pour « *small* » RNA).

a) Origine

La synthèse des ARNs est effectuée par le mécanisme de transcription, à partir de l'ADN. Seul un des deux brins de l'ADN est copié. La synthèse de l'ARN se fait dans le sens 5' à 3', de façon complémentaire. Le début de la transcription se fait par l'appariement de

l'ARN polymérase au promoteur : région d'environ 40 nucléotides située en 5' (soit juste avant) la partie transcrite. Ce promoteur est composé de deux séquences conservées : la boîte -35 et la boîte -10. Par convention, on appelle le 1^{er} nucléotide à partir duquel la transcription commence +1. La fin de la transcription, chez les procaryotes, se fait au niveau d'une région dite Rho dépendante (riche en U) ou d'une région Rho indépendante (structure en tige-boucle suivie d'une région riche en U), où l'enzyme se décroche de l'ADN.

Plusieurs types d'ARN sont transcrits, les ARNs messagers (ARNm, codant pour les protéines), les ARNs de transfert (emmenant les acides aminés aux ribosomes), les ARNs ribosomiques (acteur majeur de la synthèse protéique) et les ARNs non codant (impliqués dans la régulation de la traduction).

Dans la famille des ARNs non codant (ARNnc), on retrouve les petits ARNnc nommés sARNs. Les sARN sont des transcrits qui ont une taille pouvant varier de 30 à 500 nucléotides et ne codent pas pour des protéines, dans la très large majorité des cas. La plupart des sARNs étudiés à ce jour sont transcrits à partir des régions intergéniques, autrement dit, des régions d'ADN comprises entre deux gènes codant pour des protéines.

Les ARNnc régulateurs affectent directement l'expression des protéines. Les sARNs exercent leur activité régulatrice au niveau post-transcriptionnel selon deux modes d'actions différents, dépendants de la nature des molécules cibles : par liaison ARN-ARN, ou par liaison ARN-protéine, (Repoila & Darfeuille, 2009). Ce deuxième mode d'action ne sera pas développé ici.

b) Mode d'action

Au cours du mécanisme de la traduction, les ARNm sont traduits en protéines. La traduction d'un ARNm débute au niveau du codon initiateur de la traduction (ou codon « start »), composé du tri-nucléotides AUG, et se termine au codon « stop ». La séquence entre ces deux codons est dite codante. Cette séquence codante est entourée de régions non traduites. La région en amont, nommée région 5' non traduite (5'UTR) contient notamment une séquence conservée, site de fixation du ribosome, nommée Shine Dalgarno (SD), ou RBS (*ribosome binding site*). Composé de deux sous unités, le ribosome se lie à la séquence SD. La lecture de la séquence codante conduit à l'assemblage des acides aminés (AA) selon le code génétique (trois bases = un codon = un AA).

Les séquences non traduites des ARNm procaryotes sont connues pour contenir des éléments de régulation importants, tel que les sites de fixation des sARNs.

La plupart des sARNs caractérisés, régulent la traduction ou la stabilité de leur ARNm cible par appariement de bases avec la région 5'UTR (Beisel and Storz, 2010). L'appariement du sARN à sa cible entraîne une inhibition de la traduction, suivie très souvent d'une dégradation de l'ARNm (Repoila and Darfeuille, 2009). Cette dégradation est effectuée par la RNase E ou la RNase III. La RNase E est une endoribonucléase qui coupe des régions d'ARN simple brin et qui est présente dans un complexe multiprotéique de dégradation de l'ARN, appelé le dégradosome (Carpousis, 2002). La RNase III est une endoribonucléase dégradant les duplex d'ARN double brin (Nicholson, 1999).

La régulation de la traduction effectuée par les ARNnc se fait de manière antisense, c'est-à-dire par appariement de bases entre deux brins antiparallèles. Ils régulent l'étape d'initiation de la traduction et ont donc une action au niveau post transcriptionnel. Il existe deux types de régulation : la régulation négative et la régulation positive. Cette dernière est encore très peu décrite.

La traduction est initiée par l'appariement séquence spécifique de la sous unité 30S du ribosome à la région RBS. La fixation du sARN à l'ARNm masque le site de fixation du ribosome, empêchant ainsi l'association de la sous unité 30S du ribosomes et par conséquent l'initiation de la traduction (Frohlich and Vogel, 2009).

Lors de la régulation positive, l'ARNnc vient libérer la séquence Shine Dalgarno séquestrée par la structure secondaire de l'ARNm, en s'hybridant par complémentarité de bases en amont de la séquence SD dans la région 5'UTR de l'ARNm (Frohlich and Vogel, 2009).

Pour ces deux types de régulation, les sARN régulateurs peuvent être codés à partir du même locus génomique que l'ARNm cible (dit codé en « *cis* ») ou à un locus différent (dit codé en « *trans* ») :

La régulation en « *cis* » : le sARN et sa cible sont sur le même locus génomique, l'un sur le brin sens, l'autre sur le brin antisens de l'ADN. Ces deux ARNs se chevauchent, et sont donc parfaitement complémentaires (Storz *et al.*, 2005). Seulement 30 locus *cis*-antisens étaient identifiés chez les procaryotes en 2009 (Sorek *et al.*, 2010).

La régulation en « *trans* » : le sARN et sa cible sont sur des locus génomiques distincts. Les deux ARNs ne se chevauchent pas et sont partiellement complémentaires (Storz *et al.*, 2005).

Il faut savoir que les sARNs sont présents dans toutes les proteobacterias. Cependant il existe des différences entre les subdivisions de la taxonomie. En effet, aucune homologie de séquence des sARNs présents chez de nombreuses bactéries, comme celles appartenant à l'ordre des enterobacteriales (γ proteobacteria), n'est retrouvée chez *H. pylori* (ϵ proteobacteria) (Sharma *et al.*, 2010).

De plus, même entre deux ordres de la même subdivision, comme les Pseudomonadales et les Enterobacteriales, certains sARNs ont des séquences différentes (Sonnleitner and Hass, 2011).

Des différences apparaissent également dans la conservation de la protéine Hfq au sein des proteobacterias. Cette protéine chaperone intervient dans la reconnaissance et dans l'appariement du sARN et de sa cible. Très conservée au sein des γ proteobacteria ainsi que dans les α proteobacteria (Sobrero and Valverde, 2011), elle est absente des ϵ proteobacteria (Valentin-Hensen *et al.*, 2004).

c) Leurs rôles

Les travaux récents ont montré que les sARNs ont un rôle clé dans la physiologie des procaryotes, notamment lors de leur adaptation aux changements environnementaux (Repoila & Darfeuille, 2009).

Ce sont des modulateurs de l'expression des gènes au niveau post transcriptionnel (Frohlich and Vogel, 2009). Ils ont été décrits jouant un rôle dans des processus biologiques tel que la virulence, la réponse au stress et le *quorum sensing* (Papenfort *et al.*, 2010) (tableau 1). Les exemples cités dans le tableau 1, sont des sARNs codés en *trans* de leur cible ARNm.

➤ Régulation du *quorum sensing* (Papenfort *et al.*, 2010) :

Le *quorum sensing* est considéré comme une forme de communication bactérienne se faisant au travers de la production, la sécrétion et la détection d'une petite molécule appelée *autoinducer* (AI). L'augmentation de la concentration en AI dans l'environnement des cellules induit un changement physiologique. Ceci peut également affecter la formation de biofilm, la sporulation ou la virulence. Chez *Vibrio cholerae* le sARN Qrr est impliqué dans le rétrocontrôle du *quorum sensing*.

➤ Régulateur des gènes de virulence (Papenfort *et al.*, 2010):

Chez *Clostridium perfringens*, le sARN VR-RNA fait partie de la voie de régulation par VirR/S, un système majeur de contrôle de la production de toxine. Il agit comme activateur de la synthèse de l' α -toxine, de la collagénase (K-toxine) et de la β 2-toxine par des mécanismes encore inconnus.

Chez *Staphylococcus aureus*, le sARN RNAIII est impliqué dans la régulation de la synthèse de l' α -hémolysine. En effet, son appariement à l'ARNm *hla*, codant l' α -hémolysine, induit la formation d'une structure secondaire inhibitrice de la traduction de ce dernier.

Les sARNs sont également impliqués dans la régulation de l'expression de toxines, comme le sARN RNAIII chez *Staphylococcus aureus*. En effet, ce sARN est un répresseur traductionnel de l'ARNm *rot* (*repressor of toxin*) (tableau 1) (Papenfort *et al.*, 2010). La toxine régulée par le RNAIII est une toxine nocive pour l'homme.

Sur le génome des procaryotes on retrouve des sARN régulant la traduction d'une toxine nocive pour la bactérie elle-même. Ces sARN et leurs ARNm associés entrent dans une classe particulière nommées : modules ou cassettes toxines-antitoxines.

d) Les modules toxines/antitoxines

➤ Description

Les modules toxine-antitoxine (TA) sont de petits modules génétiques composés en général de deux éléments : un gène codant pour une toxine (une petite protéine avec des propriétés bactériostatiques ou bactéricides) et un gène codant pour une antitoxine (une protéine ou un ARNnc) contrecarrant les effets de la toxine. Ces modules sont abondants dans les génomes bactériens et pourraient jouer un rôle dans la réponse au stress et le contrôle de l'expression des gènes. Cependant, leur rôle biologique est encore débattu (Repoila & Darfeuille, 2009).

Il existe trois types de cassettes toxines-antitoxines décrites jusqu'à présent, dépendant chacune de la nature de l'antitoxine.

- Les antitoxines du système de type I sont des ARNs: le gène codant pour la protéine, généralement toxique et hydrophobe (dans ce cas un petit peptide <60 acides aminés), et l'ARN antitoxine sont localisés sur les brins opposés. L'ARN antitoxine, codé en *cis*, vient donc s'apparier à la région 5' ou 3' UTR de l'ARNm de la toxine pour prévenir la synthèse de la protéine (Fozo *et al.*, 2008).

- Les antitoxines du système de type II sont des protéines : elles viennent se fixer aux toxines et ainsi inhibent leurs activités. En général, ces deux protéines sont cosynthétisées et leur expression est autorégulée au niveau transcriptionnel par le complexe toxine-antitoxine. Ce sont les plus abondants dans les génomes bactériens (van der Melder, 2010).

- Les antitoxines du système de type III sont des ARNs : ce système est encore très peu décrit. Cet ARN est composé d'un motif de 36 nucléotides, répété 5,5 fois et il précède le gène codant pour la toxine. Les deux gènes sont cotranscrits. L'ARN antitoxine interfère avec l'activité de la toxine au lieu de prévenir son expression. Cependant le mécanisme précis reste inconnu. (van der Melder, 2010).

Ici nous nous intéresserons plus particulièrement aux systèmes toxines/antitoxines de type I.

➤ Découverte

Les systèmes de type I et de types II ont été découverts dans les années 80 sur des plasmides où ils participent à la stabilisation de ces derniers. La compréhension du mécanisme moléculaire de ce phénomène repose sur la différence de stabilité des deux composés, toxine et antitoxine. En effet, lorsque la copie du plasmide n'est pas transmise à la bactérie fille, le pool de toxine et d'antitoxine n'est pas renouvelé. L'antitoxine étant moins stable que la toxine, elle est donc plus vite dégradée, la toxine n'est alors plus inhibée ce qui conduit à la mort des bactéries ne possédant pas la copie du plasmide (van der Melder, 2010). Ces systèmes génétiques retrouvés sur des éléments extrachromosomiques comme les plasmides ou les phages sont appelés éléments génétique mobiles, à la différence des systèmes TA chromosomiques non mobile (Hazan *et al.*, 2004)

Le premier système TA de type I, codé sur un plasmide, découvert a été le système Hok/Sok chez *E. coli* (Gerdes *et al.*, 1985). Le peptide codé par le gène Hok est hydrophobe et est capable de tuer les bactéries et le gène Sok code pour un sARN antisens inhibant la toxicité associée à Hok (Gerdes *et al.*, 1986 ; Gerdes *et al.*, 1990). Par la suite, plusieurs homologues furent découverts dans différents organismes Gram négatif et positif comme le système RNA I/RNA II chez *Enterococcus faecalis* (Greenfield *et al.*, 2000).

La découverte de ces modules TA de type I sur le chromosome bactérien est arrivée que plus tard. La encore, cette première s'est faite chez *E. coli*, en 1999 (Pedersen *et al.*, 1999), où des modules TA homologues au système Hok/Sok ont été retrouvés en plusieurs copies (Pedersen *et al.*, 1999).

Les modules TA de type III ont été découverts en 2009, cependant un seul exemple a été publié jusqu'à présent (Fineran *et al.*, 2009)

Aujourd'hui, des modules TA sont retrouvés aussi bien chez les bactéries Gram positives que Gram négatives.

➤ Rôles

Ces modules toxines/antitoxines peuvent avoir des rôles très variés. Ils peuvent être impliqués dans la réponse aux stress (manque de nutriments, hautes températures ou stress oxydatif). L'activité de la toxine ralentit les processus cellulaires tels que la traduction ou la croissance, induisant l'entrée d'une partie de la population bactérienne dans une phase de dormance, dite phase de stase. Ce mécanisme aiderait la cellule à répondre de manière appropriée au stress, lui permettant de reprendre sa croissance lors du retour de conditions environnementales favorables (Gerdes *et al.*, 2005, Hazan *et al.*, 2004, Finbar *et al.*, 2003).

Les effets de ces cassettes seraient donc plus bactériostatiques que bactéricides. (Unoson *et al.*, 2008, van der Melder 2010). En effet, plusieurs travaux ont montré que la plupart des toxines avaient un effet bactériostatique, entraînant la formation de cellules dormantes (Kawano *et al.*, 2009, Dörr *et al.*, 2010).

Cependant, certaines toxines issues de ces modules toxines/antitoxines seraient impliquées dans la mort cellulaire programmée d'une grande partie de la population cellulaire, comme le système de type II *mazEF* décrit par l'équipe de Engelberg-Kulka (Hazan *et al.*, 2004). Ce phénomène de mort cellulaire programmée requiert une molécule du *quorum-sensing* appelée facteur de mort extracellulaire (extracellular death factor, EDF), qui est un pentapeptide (Kolodkin-Ga *et al.*, 2007).

Le nouveau module de type III est lui aussi impliqué dans la mort cellulaire des bactéries infectées par un phage, limitant ainsi la réplication de ce dernier (Fineran *et al.*, 2009).

Des études ont également révélé l'implication des modules TA dans l'apparition de bactéries persistantes, c'est-à-dire tolérantes, mais pas résistantes, aux antibiotiques (Lewis 2007, Dorr *et al.*, 2010). De plus, certains de ces modules TA sont impliqués dans la réponse SOS (Singletary *et al.*, 2009, Dorr *et al.*, 2010). Cette dernière est une réponse à un stress subit par les bactéries, qui leur permet de rentrer dans une forme de latence afin de se protéger et de survivre. Ces modules apparaissent donc clairement impliqués dans l'adaptation des bactéries à leur environnement.

Les modules TA peuvent donc être impliqués dans le système de réponse SOS en formant des cellules dormantes. Il a été montré qu'un ou plusieurs composés de la réponse SOS induisent la formation de cellules persistantes, « persisters », après une exposition à des antibiotiques entraînant des dommages à l'ADN (Lewis 2007, Dorr *et al.*, 2009).

Ces « persisters », formes cellulaires dormantes, sont hautement tolérantes aux antibiotiques et jouent un rôle important dans la récalcitrance des infections. Ces cellules ne se multiplient pas ou très lentement et leur synthèse protéique diminue. Réinoculées, les cellules survivantes produisent une nouvelle culture avec une nouvelle sous population de « persisters », montrant que ces cellules ne sont pas des mutants, mais seulement des variants phénotypiques de la souche sauvage. Exposer à nouveau les cellules persistantes à des

antibiotiques bactéricides résulte en une faible ou inexistante addition de cellules mortes, montrant que les cellules persistantes sont des cellules « *multidrug* » tolérantes. Il a été montré que dans ces cellules persistantes, l'expression des gènes TA chromosomiques augmente, ceci pouvant les relier aux formes bactériennes persistantes (Lewis 2007, Dorr *et al.*, 2010).

e) Les sARNs chez *H. pylori*

Comme évoqué précédemment, les sARNs ont une grande importance dans la régulation de l'expression des gènes chez les bactéries pathogènes. Cependant, lors de la recherche de sARN chez *H. pylori*, aucun n'a été retrouvé par homologie de séquences avec les sARNs présents chez d'autres bactéries Gram négative. On peut donc penser que les processus de régulation de la traduction chez *H. pylori* seraient d'un nouveau type. Cette observation rend l'étude des sARNs chez cette bactérie d'un grand intérêt. Pour cela, mon laboratoire d'accueil a entrepris le séquençage du transcriptome d'*H. pylori*. Lors de cette étude, une centaine de sARN potentiellement régulateurs a été identifiés. L'expression d'une soixantaine d'entre eux a été validée par Northern Blot. Ils seront nommés HPnc (Sharma *et al.*, 2010). L'objectif de mon travail a donc été de i) de comprendre le rôle de ces sARNs dans les mécanismes de régulation de la traduction et ii) de comprendre le ou le(s) rôle(s) de ces sARNs dans la physiologie ou la pathogénicité d'*H. pylori*.

Pour cela, mon laboratoire d'accueil a commencé des études préliminaires de sARNs particulièrement abondants en phase normale de croissance, le HPnc5490 ainsi qu'une famille de sARNs appelé aapA/IsoA.

1. sARN HPnc5490

Des études préliminaires menées au laboratoire ont permis de prédire une interaction entre la boucle du sARN HPnc5490 (structure du HPnc5490) et la région 5'UTR du gène codant pour une protéine : TlpB impliquée dans le chimiotactisme de la bactérie. Cette prédiction a été réalisée grâce à l'utilisation du programme de prédiction des cibles des sARNs (TargetRNA) (Sharma *et al.*, 2010).

Le génome d'*H. pylori* code pour trois chimiorécepteurs protéiques (TlpA, TlpB et TlpC) localisés dans la membrane, et un chimiorécepteur protéique soluble (TlpD). TlpB, aussi nommé HP0103, a été identifié comme nécessaire à la réponse au pH-tactisme (Croxen *et al.*, 2006). La localisation de *H. pylori* dans la muqueuse gastrique des mammifères est définie par le gradient de pH naturel dans le mucus gastrique. Il est plus proche de la neutralité dans la zone environnante des cellules épithéliales et, plus acide au niveau de la lumière de l'estomac. La bactérie se niche à l'endroit le moins acide de l'estomac. Grâce à la protéine TlpB, *H. pylori* pourrait ressentir et répondre à des changements temporaires de l'acidité locale (Croxen *et al.*, 2006).

Afin d'étudier l'interaction du HPnc5490 avec la région 5'UTR de l'ARNm de TlpB, un mutant délété pour HPnc5490, a été construit dans mon laboratoire d'accueil. Chez ce mutant, on a observé une augmentation de la production de la protéine TlpB pesant environ 60 kDa, ainsi que de l'ARNm portant l'opéron tlpB-HP0102. Cependant, l'expression des gènes tlpA et tlpC reste inchangée. Ces deux gènes sont également impliqués dans le chimiotactisme de la bactérie. Ces résultats suggèrent que HPnc5490 régulerait l'expression de tlpB par un mécanisme ARN antisens (Sharma *et al.*, 2010).

2. Famille des sARNs aapA/IsoA

Une famille de six sARNs d'environ 80 nucléotides a été identifiée. Ces sARNs sont codés en « *cis* », de façon antisens à de petites ORF (open reading frame) homologues d'environ 200 nucléotides qui codent pour de petits peptides d'environ 22 à 30 acides aminés

potentiellement toxiques. Ces sARNs seront nommés IsoA pour « RNA *inhibitor of small ORF family* » et numérotés de 1 à 6. Les gènes codants pour les peptides sont nommés AapA pour « *antisens RNA-associated peptide family A* » numérotés de 1 à 6 (Sharma *et al.*, 2010).

Grâce à la localisation génomique de ces six modules nous avons pu placer les six locus (A1, A2, A3, A4, A5, A6) sur une représentation schématique du génome d'*H. pylori* 26695.

Des études menées au laboratoire sur la souche 26695 ont montré qu'*in vivo*, cinq de ces aapA produisent des ARNm stables et les gènes aapA1 à 6 pouvaient être transcrits puis traduits *in vitro* (excepté pour l'aapA2 et l'aapA4).

La prédiction de structure des petits peptides de la famille A montre qu'ils adopteraient une structure en hélice α . Ils présentent de nombreux acides aminés hydrophobes, suggérant une interaction avec la membrane (Sharma *et al.*, 2010).

Cette configuration de sARN localisé en « cis » d'un ARNm codant pour un peptide potentiellement toxique, ressemble beaucoup à celle des cassettes toxine-antitoxine de type I, retrouvé chez de nombreux microorganismes. De plus, la courte taille, la région très hydrophobe du peptide et la prédiction d'un domaine transmembranaire, replié en hélice α rappellent les toxines LdR, TpxA et Ibs issues de nombreux génomes bactériens (Fozo *et al.*, 2010).

En parallèle, des études menées au laboratoire ont montré que les IsoA1 à 6 inhibaient fortement la traduction de leur aapA correspondant, mais n'affectaient aucunement la traduction des autres aapA, pourtant très similaire en terme de séquence.

De plus un alignement de plus séquences nucléotidiques de aapA nous montre aussi une grande conservation des promoteurs des gènes de aapA et des IsoA.

Ce ne serait donc pas un défaut de complémentarité qui empêcherait un IsoA de s'hybrider avec un autre aapA que celui qui lui ai associé, mais ce problème pourrait avoir lieu en amont, au niveau des étapes précoces de l'interaction entre un IsoA et sa cible. En effet, ces ARNs aapA/IsoA sont très structurés, on peut donc penser que l'appariement de ces deux derniers passe d'abord par une étape de reconnaissance sur de courtes séquences complémentaires simple brin, qui initierait la formation d'un duplex plus étendu.

Afin d'expliquer une telle spécificité d'interaction entre les IsoA et leurs ARNm cible respectif, on peut émettre l'hypothèse d'une implication de la structure secondaire de ces deux partenaires. En effet, des études préliminaires ont montré que les deux ARNs adoptent un repliement en double tige boucle : une conformation où seules les boucles (5 à 15 bases de long), simple brin, sont disponibles pour interagir avec une boucle complémentaire. Un alignement de 22 séquences nucléotidiques de différentes cassettes extraites de huit souches d'*H. pylori*, les régions les plus variables de ces séquences entre les différentes cassettes (1 à 7) sont les deux régions des boucles ainsi que la région de l'espaceur des boucles ou « linker ».

Ce type d'interaction entre deux boucles d'ARN, bien connu *in vivo*, est appelé « kissing complex ». La reconnaissance de l'ARNm cible par son sARN régulateur s'effectue tout d'abord par les quelques bases libres aux extrémités des boucles, puis s'étend au reste de la structure pour former très rarement un duplex étendu.

Chapitre 3 : Objectifs du projet

Le projet réalisé au laboratoire a été de comprendre le ou le(s) rôle(s) des sARNs dans la physiologie ou la pathogénicité d'*H. pylori*. Cette étude s'est portée sur le sARN très abondant, HPnc5490, ainsi que sur la famille des sARNs appelé aapA1/IsoA1.

f) Le petit ARN HPnc5490

Afin d'approfondir l'étude préliminaire et de confirmer l'implication du HPnc5490 dans la régulation de la traduction de TlpB, des complémentations en HPnc5490 seront réalisées sur le mutant Δ HPnc5490 des souches 26695, X47 2AL et P12. La souche X47 2AL pourra être utilisée afin d'observer une éventuelle implication du sARN dans l'infection, et plus particulièrement dans la colonisation, de la souris.

Pour cette étude, des tests de RT-qPCR seront entrepris sur les souches sauvages et mutantes dans le but de déterminer la quantité des ARNm de TlpB, TlpA, HP0102 présente dans les bactéries (TlpB et HP0102 étant en opéron). La RT-qPCR est une technique qui permet de quantifier le taux d'ARNm codant une protéine, présent, ici, dans les bactéries. Pour cela, les ADNc complémentaires (ADNc) aux ARNm sont obtenus par transcription inverse (Reverse Transcription, RT), à partir des ARNs totaux extraits des bactéries.

De plus, des tests d'infection de la souris par la souche X47 2AL sauvage et mutante seront réalisés.

g) Les cassettes AapA/IsoA

Ce projet s'est divisé en différentes parties:

- **Le premier objectif était de confirmer l'hypothèse du module toxine/antitoxine.**

Pour cela, nous nous sommes appuyés sur deux critères définissant un module TA : le peptide codé par l'ARNm est toxique pour la bactérie et son ARNm est très stable, alors que le sARN ne l'est pas.

Afin d'explorer la toxicité du peptide A1, nous avons construit des mutants délétés pour la cassette aapA1/IsoA1. Ces mutants seront ensuite complétés avec un plasmide portant une construction de la cassette aapA1/IsoA1 mutée, afin de supprimer l'expression de l'antitoxine et pouvoir exprimer la toxine seule.

De plus, toujours dans le même but, nous avons voulu déterminer la stabilité, soit la demi-vie, de chaque transcrit, l'ARN messager *aapA1* et le sARN IsoA1, respectivement.

- **Le deuxième objectif était de déterminer le rôle physiologique des cassettes aapA/IsoA.**

Dans cette partie, une étude *in vivo* a été réalisée. Nous avons voulu étudier le rôle de ces cassettes chez *H. pylori*. En effet, ces cassettes ont une forte ressemblance avec les modules toxine/antitoxine de type I. La bactérie porterait ainsi dans son génome un « poison » (le peptide A) et un « antidote » (l'IsoA), abondamment exprimé et prévenant constamment la production de ce poison. Peu de cassettes ont été décrites à ce jour et leurs mécanismes d'action, ainsi que leurs rôles, sont largement inconnus chez la plupart des bactéries.

Afin d'explorer les fonctions du/des peptide(s) codé(s) par les *aapA* nous avons envisagé que ces cassettes seraient impliquées dans la formation de bactéries persistantes, comme précédemment décrit chez *E. coli* avec le système toxine-antitoxine de type I *tisAB/istR* (Dörr *et al.*, 2010).

- **Le troisième objectif était de montrer le mécanisme de régulation de la traduction du peptide A1 par l'IsoA1.**

Comme évoqué dans l'introduction, des études préliminaires ont montré une spécificité d'interaction entre chaque IsoA et leurs *aapA* associés (IsoA1 régule spécifiquement le *aapA1* et pas d'autre *aapA*). Cette spécificité vient de la particularité des ARNs à interagir via leurs boucles et ainsi former un complexe boucles-boucles.

Afin d'étudier cette hypothèse de *kissing complex*, nous avons sélectionné un couple aapA/IsoA dont la séquence nucléotidique des boucles sera mutée par mutagenèse dirigée. Grâce à ces matrices mutées et sauvages, des transcriptions *in vitro* seront réalisées. Les

ARNs ainsi générés seront utilisés pour des gels d'empreintes (digestion enzymatique différentielle d'un *aapA*, marqué radioactivement, en présence ou non du IsoA), afin de déterminer le rôle de la complémentarité de séquence des boucles dans l'interaction entre l'IsoA et l'*aapA*.

Cinquième partie : Références bibliographiques

- Aizenman, E., Engelberg-Kulka, H., Glaser, G. (1996) An *Escherichia coli* chromosomal “addiction module” regulated by guanosine [corrected] 30,50-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:6059-6063.
- Alm, R.A., Ling, L.S., Moir, D.T., King, B.L., Brown, E.D., Doig, P.C., Smith, D.R., Noonan, B., Guild, B.C., deJonge, B.L., Carmel, G., Tummino, P.J., Caruso, A., Uria-Nickelsen, M., Mills, D.M., Ives, C., Gibson, R., Merberg, D., Mills, S.D., Jiang, Q., Taylor, D.E., Vovis, G.F. and Trust, T.J. (1999) Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, **397**, 176-180.
- Boneca, I.G., Ecobichon, C., Chaput, C., Mathieu, A., Guadagnini, S., Prevost, M.C., Colland, F., Labigne, A. and de Reuse, H. (2008) Development of inducible systems to engineer conditional mutants of essential genes of *Helicobacter pylori*. *Appl Environ Microbiol*, **74**, 2095-2102.
- Beisel, C. L. and Storz, G.(2010) Base pairing smallRNAs and their roles in global regulatory networks. *FEMS Microbiol Rev* **34** : 866–882
- Boneca, I.G., Ecobichon, C., Chaput, C., Mathieu, A., Guadagnini, S., Prevost, M.C., Colland, F., Labigne, A. and de Reuse, H. (2008) Development of inducible systems to engineer conditional mutants of essential genes of *Helicobacter pylori*. *Appl Environ Microbiol*, **74**, 2095-2102.
- Carpousis, A.J. (2002) The *Escherichia coli* RNA degradosome: structure, function and relationship in other ribonucleolytic multienzyme complexes. *Biochem Soc Trans.* **30** (2):150-5.
- Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J.E., Ghiara, P., Borodovsky, M., Rappuoli, R. and Covacci, A. (1996) *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 14648-14653.
- Croxen, M.A., Sisson, G., Melano, R., Hoffman, P.S. (2006) The *Helicobacter pylori* chemotaxis receptor TlpB (HP0103) is required for pH taxis and for colonization of the gastric mucosa. *J Bacteriol* **188**: 2656-2665.
- De Korwin, J. –D., Lehours, P. (2010) *Helicobacter pylori*: notions fondamentales, épidémiologie, méthodes diagnostiques. *Encycl Med Chir* 9-000-B-60
- de Sablet, T., Piazzuelo, M.B., Shaffer, C.L., Schneider, B.G., Asim, M., Chaturvedi, R., Bravo, L.E., Sicinschi, L.A., Delgado, A.G., Mera, R.M., Israel, D.A., Romero-Gallo, J., Peek, R.M. Jr, Cover, T.L., Correa, P., Wilson, K.T. (2011) Phylogeographic origin of *Helicobacter pylori* is a determinant of gastric cancer risk. *Gut*. **60**(9):1189-95
- Dorr T, Vulic M, Lewis K (2010) Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biol* **8**: e1000317.
- Dörr T, Lewis K, Vulić M.(2009) SOS response induces persistence to fluoroquinolones in *Escherichia coli*. *PLoS Genet* **5**:e1000760.
- Douillard, F.P., Ryan, K.A., Caly, D.L., Hinds, J., Witney, A.A., Husain, S.E., O'Toole, P.W. (2008) Posttranscriptional regulation of flagellin synthesis in *Helicobacter pylori* by the RpoN chaperone HP0958. *J Bacteriol* **190** (24):7975-84

- Ennifar, E., Paillart, J.C., Marquet, R., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Dumas, P. and Walter, P. (2003) HIV-1 RNA dimerization initiation site is structurally similar to the ribosomal A site and binds aminoglycoside antibiotics. *J Biol Chem*, **278**, 2723-2730
- Ermak TH, Giannasca PJ, Nichols R, Myers GA, Nedrud J, et al. (1998) Immunization of mice with urease vaccine affords protection against *Helicobacter pylori* infection in the absence of antibodies and is mediated by MHC class II-restricted response. *J Exp Med* **188**: 2277–2288.
- Ferrero, R.L., Thiberge, J.-M., Huerre, M., Labigne, A. (1998) Immune responses of specific-pathogen-free mice to chronic *Helicobacter pylori* (strain SS1) infection. *Infect Immun*. **66**:1349–1355.
- Finbarr, H. (2003) Toxins-Antitoxins: Plasmid Maintenance, Programmed Cell Death, and Cell Cycle Arrest. *Science* **301**, 1496
- Fineran, P.C., Blower, T.R., Foulds, I.J., Humphreys, D.P., Lilley, K.S., Salmond, G.P. (2009) The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(3):894-899.
- Fozo, E.M., Hemm, M.R. and Storz, G. (2008) Small toxic proteins and the antisense RNAs that repress them. *Microbiol Mol Biol Rev*, **72**, 579-589, Table of Contents.
- Fozo, E.M., Makarova, K.S., Shabalina, S.A., Yutin, N., Koonin, E.V. and Storz, G. (2010) Abundance of type I toxin-antitoxin systems in bacteria: searches for new candidates and discovery of novel families. *Nucleic Acids Res*, **38**, 3743-3759.
- Frohlich, K.S., Vogel, J. (2009) Activation of gene expression by small RNA. *Curr Opin Microbiol* **12**: 674-682.
- Gerdes, K., Larsen, J.E. and Molin, S. (1985) Stable inheritance of plasmid R1 requires two different loci. *J Bacteriol*, **161**, 292-298.
- Gerdes, K., Rasmussen, P.B. and Molin, S. (1986b) Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 3116-3120.
- Gerdes, K., Thisted, T. and Martinussen, J. (1990) Mechanism of post-segregational killing by the hok/sok system of plasmid R1: sok antisense RNA regulates formation of a hok mRNA species correlated with killing of plasmid-free cells. *Mol Microbiol*, **4**, 1807-1818.
- Gerdes, K., Christensen, S.K., Løbner-Olesen, A. (2005) Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat Rev Microbiol*. **3**: 371-82.
- Greenfield, T.J., Ehli, E., Kirshenmann, T., Franch, T., Gerdes, K., Weaver, K.E. (2000) The antisense RNA of the par locus of pAD1 regulates the expression of a 33-amino-acid toxic peptide by an unusual mechanism. *Mol Microbiol*. **37**(3):652-60.
- Guruge, J.L., Falk, P.G., Lorenz, R.G., Dans, M., Wirth, H.P., Blaser, M.J., Berg, D.E. and Gordon, J.I. (1998) Epithelial attachment alters the outcome of *Helicobacter pylori* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 3925-3930.

- Hazan, R., Sat, B., Engelberg-Kulka, H. (2004) Escherichia coli mazEF-mediated cell death is triggered by various stressful conditions. *J Bacteriol.* **186**: 3663-9.
- Heuermann, D., Haas, R. (1998) A stable shuttle vector system for efficient genetic complementation of Helicobacter pylori strains by transformation and conjugation. *Mol Gen Genet.* **257**(5):519-28.
- Hofreuter, D., Odenbreit, S., Haas, R. (2001) Natural transformation competence in Helicobacter pylori is mediated by the basic components of a type IV secretion system. *Molecular Microbiology* **41**(2): 379–391.
- Humbert, O., Dorer, M.S., Salama, N.R. (2011) Characterization of Helicobacter pylori factors that control transformation frequency and integration length during inter-strain DNA recombination. *Mol Microbiol* **79**(2):387-401.
- Jenssen, H., Hamill, P, Hancock R., E., W. (2006) Peptide Antimicrobial Agents. *Clin Microbiol Rev* **19**(3): 491–511.
- Kawano, H., Hirokawa, Y., Mori, H. (2009) Long-term survival of Escherichia coli lacking the HipBA toxin-antitoxin system during prolonged cultivation. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**: 117-123.
- Kim, Y., Wang, X., Ma, Q., Zhang, X.S., Wood, T.K. (2009) Toxin-antitoxin systems in Escherichia coli influence biofilm formation through YjgK (TabA) and fimbriae. *J Bacteriol* **191**(4):1258-1267.
- Kolb, F.A., Engdahl, H.M., Slagter-Jager, J.G., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Westhof, E., Wagner, E.G. and Romby, P. (2000) Progression of a loop-loop complex to a four-way junction is crucial for the activity of a regulatory antisense RNA. *Embo J*, **19**, 5905-5915.
- Kolodkin-Gal, I., Hazan, R., Gaathon, A., Carmeli, S., Engelberg-Kulka, H. (2007) A linear pentapeptide is a quorum-sensing factor required for mazEF-mediated cell death in Escherichia coli. *Science*.**318**: 652-5.
- Lewis, K. (2005) Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature* **5** : 48-56.
- Marshall B, Warren J (1984) Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet.* **16**(1):1311-5.
- Menard, R., Sansonetti, P.J. and Parsot, C. (1993) Nonpolar mutagenesis of the ipa genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of Shigella flexneri entry into epithelial cells. *J Bacteriol*, **175**, 5899-5906.
- Michel, A. S. (2010) A la découverte des peptides antimicrobiens. Thèse de Doctorat de l'université de Nancy 1.
- Moore, J.M., Salama, N.R. (2005) Mutational analysis of metronidazole resistance in Helicobacter pylori. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 1236-7.

- Nicholson, A.W. (1999) Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases. *FEMS Microbiol Rev*, **23** (3):371-90
- Papenfort, K., Said, N., Welsink, T., Lucchini, S., Hinton, J.C., Vogel, J. (2009) and pleiotropic patterns of mRNA regulation by ArcZ, a conserved, Hfq-dependent small RNA. *Mol Microbiol*. **74**:139-58.
- Papenfort, K., Vogel, J. (2010) Regulatory RNA in bacterial pathogens. *Cell Host Microbe* **8**: 116-127.
- Pedersen, K. and Gerdes, K. (1999) Multiple hok genes on the chromosome of Escherichia coli. *Mol Microbiol*, **32**, 1090-1102.
- Pyndiah, S., Ménard, A., Zerbib, F., Mégraud, F. (2005) Evaluation of the homologous recombination in Helicobacter pylori. *Helicobacter* **10**(3):185-92.
- Repoila, F., Darfeuille, F. (2009) Small regulatory non-coding RNAs in bacteria: physiology and mechanistic aspects. *Biol Cell* **101**: 117-131.
- Rudi, J., Kuck, D., Strand, S., von Herbay, A., Mariani, S.M., Krammer, P.H., Galle, P.R. and Stremmel, W. (1998) Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand system in Helicobacter pylori-induced gastric epithelial apoptosis. *J Clin Invest*, **102**, 1506-1514.
- Scarlato, V., Delany, I., Spohn, G., Beier, D. (2001) Regulation of transcription in Helicobacter pylori: simple systems or complex circuits? *Int J Med Microbiol* **291**: 107-117.
- Scott, D.R., Weeks, D., Hong, C., Postius, S., Melchers, K. and Sachs, G. (1998) The role of internal urease in acid resistance of Helicobacter pylori. *Gastroenterology*, **114**, 58-70.
- Selinger, D.W., Mukherjee Saxena, R., Cheung, K. J., Church, G. M., Rosenow, C. (2003) Global RNA Half-Life Analysis in Escherichia coli Reveals Positional Patterns of Transcript Degradation. *Genome Research* **13**:216–223
- Shai, Y. and Oren, Z. (2001) From “carpet” mechanism to de-novo designed diastereomeric cellselective antimicrobial peptides. *Peptide*, **22**, 1629–1641
- Sharma, C.M., Hoffmann, S., Darfeuille, F., Reignier, J., Findeiss, S., et al. (2010) The primary transcriptome of the major human pathogen Helicobacter pylori. *Nature* **464**: 250-255.
- Singletary, L.A., Gibson, J.L., Tanner, E.J., McKenzie, G.J., Lee, P.L., Gonzalez, C., Rosenberg, S.M. (2009) An SOS-regulated type 2 toxin-antitoxin system. *J Bacteriol*. **191**: 7456-65.
- Smeets, L., Kusters, J. (2002) Natural transformation in Helicobacter pylori: DNA transport in an unexpected way. *TRENDS in Microbiology* **10**(4): 159-162
- Sobrero, P., Valverde, C. (2011) Evidences of autoregulation of hfq expression in Sinorhizobium meliloti strain 2011. *Arch Microbiol*. **193**(9):629-39

- Sonnleitner, E., Haas, D. (2011) Small RNAs as regulators of primary and secondary metabolism in *Pseudomonas* species. *Appl Microbiol Biotechnol.* **91**(1):63-79.
- Sorek, R., Cossart, P. (2010) Prokaryotic transcriptomics: a new view on regulation, physiology and pathogenicity. *Nat Rev Genet* **11**: 9-16.
- Stingl, K., Altendorf, K. and Bakker, E.P. (2002) Acid survival of *Helicobacter pylori*: how does urease activity trigger cytoplasmic pH homeostasis? *Trends Microbiol*, **10**, 70-74.
- Stingl, K., Brandt, S., Uhlemann, E.M., Schmid, R., Altendorf, K., Zeilinger, C., Ecobichon, C., Labigne, A., Bakker, E.P. and de Reuse, H. (2007) Channel-mediated potassium uptake in *Helicobacter pylori* is essential for gastric colonization. *Embo J*, **26**, 232-241.
- Storz, G., Altuvia, S., Wassarman, K.M. (2005) An abundance of RNA regulators. *Annu Rev Biochem* **74**: 199-217.
- Tomb, J.F., White, O., Kerlavage, A.R., Clayton, R.A., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Ketchum, K.A., Klenk, H.P., Gill, S., Dougherty, B.A., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E.F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H.G., Glodek, A., McKenney, K., Fitzgerald, L.M., Lee, N., Adams, M.D., Hickey, E.K., Berg, D.E., Gocayne, J.D., Utterback, T.R., Peterson, J.D., Kelley, J.M., Cotton, M.D., Weidman, J.M., Fujii, C., Bowman, C., Watthey, L., Wallin, E., Hayes, W.S., Borodovsky, M., Karp, P.D., Smith, H.O., Fraser, C.M. and Venter, J.C. (1997) The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, **388**, 539-547. *Erratum in: Nature* (1997) **389**(6649):412.
- Unoson, C., Wagner, E.G. (2008) A small SOS-induced toxin is targeted against the inner membrane in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **70**(1):258-70.
- Valentin-Hensen, P., Eriksen, M., Udesen, C. (2004) The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions. *Mol. Microbiol.* **51**, 1525-1533.
- Van Melder, L. (2010) Toxin-antitoxin systems: why so many, what for?. *Curr Opin Microbiol* **13**(6):781-785.
- Wang, Q., Frye, J.G., McClelland, M., Harshey, R.M. (2004) Gene expression patterns during swarming in *Salmonella typhimurium*: genes specific to surface growth and putative new motility and pathogenicity genes. *Mol Microbiol.* **52**:169-87.
- Wroblewski, L.E., Peek, R.M. Jr, Wilson, K.T. (2010) *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol Rev.* **23**: 713-39.
- Yonezawa, H., Osaki, T., Kurata, S., Fukuda, M., Kawakami, H., Ochiai, K., Hanawa, T., Kamiya, S. (2009) Outer membrane vesicles of *Helicobacter pylori* TK1402 are involved in biofilm formation. *BMC Microbiol* **9**:197.
- Yonezawa, H., Osaki, T., Kurata, S., Zaman, C., Hanawa, T., Kamiya, S. (2010) Assessment of in vitro biofilm formation by *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol Hepatol* **25** Suppl 1:S90-4.