

**Année 2017-2018 - Demande d'allocation doctorale
ED Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant (SSBCV) n°549**

1. Informations administratives :

Nom de l'encadrant responsable de la thèse : Marie-Frédérique LARTIGUE
Unité : UMR1282, Infection et santé publique
Equipe (*si unité multi-équipes*): Equipe Bactéries et risque materno-foetal
Filière de rattachement : B
Email de l'encadrant : lartigue@med.univ-tours.fr

Co-encadrant éventuel (NB : limité à 1 seul co-encadrant(e)) : xxx

2. Titre de la thèse :

Rôle de l'ARN régulateur Srn073 chez le pathogène *Streptococcus agalactiae*

3. Résumé :

Les bactéries s'adaptent à leur environnement et à leurs hôtes par des régulations rapides et finement contrôlées impliquant des réseaux complexes. Les régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles impliquent, entre autres, de petits ARN régulateurs non codants qui affectent la stabilité des ARN messagers et/ou leur traduction. Hormis chez quelques organismes modèles (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*), le rôle des ARN régulateurs a été peu étudié : c'est le cas des streptocoques, en particulier de *Streptococcus agalactiae*, premier agent bactérien responsable d'infections néonatales (Zorgani *et al.*, 2016). Nous avons décrit par séquençage à haut débit (RNA-seq) le RNome de *S. agalactiae*, et identifié 125 ARN régulateurs potentiels (Rosinski-Chupin *et al.*, 2015). Nous avons construit des mutants de délétion de plusieurs ARN régulateurs identifiés précédemment et un plasmide permettant l'induction régulée de gènes chez *S. agalactiae* (Lartigue et Bouloc, 2014). Nous avons montré que l'inactivation d'un ARN régulateur, particulièrement grand (680 nucléotides), appelé Srn073, est responsable d'une modification de la morphologie bactérienne se manifestant par un raccourcissement des chaînettes, et par conséquent, d'une absence de sédimentation des cellules bactériennes cultivées en milieu liquide.

L'objectif de la thèse est de déterminer le rôle biologique de l'ARN régulateur Srn073 en identifiant ses cibles et de découvrir les mécanismes moléculaires de la régulation basés sur l'action de cet ARN régulateur chez ce pathogène.

Methodologie

1. Construction des outils génétiques (M1-6)

Le rôle de Srn073 sera étudié dans la souche de référence NEM316 (Glaser *et al.*, 2002). Le mutant Δ srn073 et la souche surexprimant Srn073 sont déjà construits. Le doctorant construira des souches permettant la complémentation du mutant Δ srn073 (en position plasmidique et chromosomique) et une souche pour l'étude de l'expression de Srn073 (fusion transcriptionnelle β -galactosidase).

2. Recherche et validation des cibles potentielles de Srn073 (M7-30)

Afin de déterminer les cibles de Srn073, différentes approches pourront être développées :

- Identification des ARNm dont la quantité est affectée par l'absence ou la surproduction de Srn073 par analyse des profils transcriptionnels. Des études par micro-array ou RNA-seq seront réalisées (Bohn *et al.*, 2010).
- Identification des ARNm s'associant avec Srn073 par une méthode de capture de cibles *in vitro*

(Douchin *et al.*, 2006)

L'expression des différents ARNm cibles ainsi prédits sera validée par RT-qPCR, puis Northern blot dans les différentes constructions et dans la souche sauvage.

3. Caractérisation des mécanismes moléculaires d'action (M13-M36)

Les interactions spécifiques entre Srn073 et ses cibles seront confirmées par :

- Expériences de retard sur gel
- Mutagenèses dirigées sur les sites putatifs impliqués dans les appariements

4. Analyse phénotypique (M7-30)

- Recherche des phénotypes en fonction de(s) cible(s) identifiée(s)
- Rôle de Srn073 dans la virulence :
 - ✓ Survie dans les macrophages humains RAW264.7
 - ✓ Survie chez un modèle murin d'infection (collaboration C. Poyart)

5. Structure de Srn073 (collaboration D. Fourmy) (M19-M24)

Elle sera déterminée par l'analyse par probing chimique et enzymatique de Srn073 seul et en interaction avec ses substrats.

6. Rédaction du/des article(s) de la thèse (M25-M36)

Ce travail contribuera à la compréhension des réseaux de régulation bactériens sous le contrôle des ARN régulateurs. A plus long terme, ces données pourraient servir au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, en alternative aux anti-infectieux, pour la prise en charge des infections à *S. agalactiae*.

4. Résumé en anglais:

Regulatory RNAs in the pathogen *Streptococcus agalactiae*

Bacteria adapt to their environment (including potential hosts) by rapid and tightly-controlled regulations involving complex networks. Many small non-coding regulatory RNAs (sRNAs) base-pair with target mRNAs to modulate translation or RNA stability. Except in a few model organisms (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*), the role of regulatory RNAs has been little studied: this is the case of streptococci, in particular of *Streptococcus agalactiae*, the leading cause of invasive infections in neonates (Zorgani *et al.*, 2016). We described by high-throughput sequencing (RNA-seq) the RNome of *S. agalactiae*, and identified 125 potential regulatory RNAs (Rosinski-Chupin *et al.*, 2015). We constructed deletion mutants of several previously identified regulatory RNAs and a plasmid allowing regulated gene induction in *S. agalactiae* (Lartigue and Boulloc, 2014). We have shown that the inactivation of a particularly large regulatory RNA of 680 nucleotides, named Srn073, is responsible for morphological change. Indeed, the Δ srn073 mutant forms shorter chains, mainly diplococci, than the parental strain. Consequently, reduced sedimentation was observed in broth culture for the Δ srn073 mutant as compared to the parental strain.

The aim of the PhD is to determine the biological role of Srn073 regulatory RNA by identifying its target mRNAs and to discover the molecular mechanisms of regulation based on the action of this regulatory RNA in this pathogen.

Methodology

1. Construction of genetic tools (M1-6)

The role of Srn073 will be studied in the reference strain NEM316 (Glaser *et al.*, 2002). The Δ srn073 mutant and the strain overexpressing Srn073 are already constructed. The PhD student will construct strains allowing the complementation of the Δ srn073 mutant.

2. Research and validation of potential targets of Srn073 (M7-30)

In order to determine the targets of Srn073, different approaches can be developed:

- Identification of mRNAs whose amount is affected by the absence or overproduction of Srn073 by analyzing transcriptional profiles. Micro-array or RNA-seq studies will be conducted (Bohn *et al.*, 2010).
- Identification of mRNAs associating with Srn073 by an *in vitro* target capture method (Douchin *et al.*, 2006)

The potential targets identified previously will be validated by RT-qPCR, then by Northern blot.

3. Characterization of Molecular Mechanisms of Action (M13-M36)

The specific interactions between Srn073 and its targets will be confirmed by:

- Gel shift experiments
- Mutagenesis directed at putative sites involved in base-pairing

4. Phenotypic analysis (M7-30)

- Phenotypes research based on identified target(s)
- Role of Srn073 in virulence:
 - Survival in human macrophages RAW264.7
 - Survival in mouse infection model (collaboration C. Poyart)

5. Structure of Srn073 (D. Fourmy collaboration) (M19-M24)

Analysis by chemical and enzymatic probing of Srn073 alone and in interaction with its substrates.

6. Writing of the article (s) and of the PhD manuscript (M25-M36)

This work will contribute to the understanding of bacterial regulatory networks under the control of regulatory RNAs. Later, these data may be used to develop new therapeutic strategies for the management of *S. agalactiae* infections.