

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(10) Numéro de publication internationale
WO 2011/128445 A1

(43) Date de la publication internationale
20 octobre 2011 (20.10.2011)

(51) Classification internationale des brevets :
C12N 15/113 (2010.01) **C07K 14/31** (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) **A61P 31/04** (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2011/056052

(22) Date de dépôt international :
15 avril 2011 (15.04.2011)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1052933 16 avril 2010 (16.04.2010) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :
UNIVERSITE DE RENNES 1 [FR/FR]; 2, rue du
Thabor, F-35000 Rennes (FR). **INSTITUT NATIONAL**
DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE
MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac,
F-75013 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :
CHABELSKAYA, Svetlana [RU/FR]; 3 Lot de l'Eglise,
F-35137 La Nouaye (FR). **FELDEN, Brice** [FR/FR]; Le
presbytère, F-35360 Le Lou Du Lac (FR).

(74) Mandataire : **FAIVRE PETIT, Frédérique**; Cabinet
Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex
17 (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

— avec la partie de la description réservée au listage des
séquences (règle 5.2.a))

(54) Title : INHIBITORS OF THE ACCUMULATION OF SPRD TRANSCRIPTS IN *S. AUREUS*

(54) Titre : INHIBITEURS DE L'ACCUMULATION DE TRANSCRITS SPRD CHEZ *S. AUREUS*

(57) Abstract : The invention relates in particular to an inhibitor of the accumulation of sprD transcripts and/or of the transcription of the sprD gene and to a method for the *in vitro* or *ex vivo* selection or identification of compounds for preventing and/or treating a staphylococcus infection.

(57) Abrégé : L'invention concerne notamment un inhibiteur de l'accumulation des transcrits sprD et/ou de la transcription du gène sprD et un procédé pour la sélection ou l'identification *in vitro* ou *ex vivo* de composés pour la prévention et/ou le traitement d'une infection staphylococcique.



WO 2011/128445 A1

INHIBITEURS DE L'ACCUMULATION DE TRANSCRITS SPRD CHEZ *S. AUREUS*

La présente invention est relative à des inhibiteurs de l'accumulation et/ou de la transcription de petits ARN situés et exprimés à partir du génome de bactéries (notamment Staphylocoques dorés), appelés Spr pour «small pathogenicity island rNAs» et à leur applications notamment pour la détection, la prévention et/ou le traitement d'une infection staphylococcique. La présente invention concerne également une méthode de sélection ou d'identification de composés utiles pour la prévention et/ou le traitement d'une infection staphylococcique, lesdits composés étant capables de complexer avec les transcrits *sprD* et/ou d'inhiber la transcription du gène *sprD*.

Les infections staphylococciques sont très répandues dans le monde aussi bien communautaire qu'hospitalier, affectant aussi bien l'homme que les animaux.

Les bactéries du genre *Staphylococcus* ont été découvertes par Louis Pasteur en 1880. À ce jour, une vingtaine d'espèces ont été identifiées. Parmi celles-ci, les plus rencontrées en pathologie humaine et/ou animale sont *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus intermedius* et *Staphylococcus aureus*.

Ces espèces commensales sont dites pathogènes opportunistes puisqu'elles peuvent entraîner des infections dans des conditions particulières.

Ainsi, *Staphylococcus epidermidis* peut être responsable d'infections de la peau, nasales et aussi d'endocardites et d'infections localisées chez les patients immunodéprimés. *Staphylococcus saprophyticus* a été identifiée comme responsable de certaines infections urinaires. *Staphylococcus hyicus* et *Staphylococcus intermedius* peuvent être responsables d'infections diverses chez l'animal telles que la dermite exsudative du porcelet (*S. hyicus*) ou encore la furonculose du chien (*S. intermedius*).

L'espèce la plus pathogène des bactéries du genre *Staphylococcus* est *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). *S. aureus* est un membre de la flore commensale humaine chez une fraction de la population. Cependant, si des barrières mucosales sont franchies ou si les défenses immunes de l'hôte sont altérées, *S.aureus* peut devenir un pathogène opportuniste et l'une des principales causes des infections nosocomiales et des infections acquises en communauté chez l'homme et les animaux (Lowy, 1998). La pathogénèse de la maladie associée à *S.aureus* débute habituellement par une infection locale (par exemple, infection d'une blessure, furoncle, cellulite), puis peut se poursuivre par une diffusion systémique (bactériémie), puis par des infections métastatiques (par exemple endocardite, ostéomyélite et arthrite septique).

S. aureus est également l'un des agents pathogènes isolés le plus fréquemment lors de mammites bovines aussi bien aux Etats-Unis qu'en Europe. Les vaches atteintes présentent alors une chute de production laitière qui entraîne de lourdes conséquences économiques sur les exploitations agricoles.

5 L'étude des mécanismes moléculaires permettant à l'infection staphylococcique de se mettre en place et de perdurer dans l'organisme colonisé a permis de montrer qu'une des causes principales de succès des infections staphylococciques, en particulier à *S. aureus*, est leur capacité à produire un grand nombre de facteurs de virulence. Certains de ces facteurs sont exportés à la surface des cellules et d'autres sont excrétés.

10 Ainsi, par exemple, *S. aureus* est capable de contourner les défenses de l'hôte par la production de pièges de la réponse immunitaire de l'hôte infecté telles que la protéine SpA (« Staphylococcal protein A », Moks *et al.*, 1986) et la protéine Sbi (« *S. aureus* IgG binding protein » Zhang L, Jacobsson K, Vasi J, Lindberg M and Frykberg L (1998) A second IgG-binding protein in *Staphylococcus aureus*. Microbiology 145: 985–991).

15 Jusqu'à présent, le traitement le plus répandu à une infection staphylococcique est à base d'antibiotiques tels que les pénicillines (pénicilline G, méthicilline, oxacilline céphalosporines) les macrolides et les tétracyclines.

Cependant, avec l'utilisation répandue des antibiotiques, la diffusion de souches de bactéries du genre *Staphylococcus*, en particulier *S. aureus*, fortement résistantes aux
20 antibiotiques, notamment à la méthicilline (SARM), a considérablement augmenté ces dernières années et constitue un défi clinique et épidémiologique mondial, notamment dans les hôpitaux.

Dans une optique de traitement mais également de prévention d'infection staphylococcique, il existe un besoin, tant chez l'homme que chez l'animal de disposer de nouvelles classes d'agents antistaphylococcique comme alternatives aux antibiotiques et de
25 nouveaux outils diagnostiques.

Les inventeurs ont à présent mis en évidence que l'ARN *SprD* a un rôle majeur dans la virulence de *Staphylococcus aureus*. Ils ont notamment montré que la délétion du gène *SprD*, dans au moins trois souches différentes de *Staphylococcus aureus* (les souches N315 (agr-), Newman (agr+) et RN1 (agr+)), est responsable de la diminution voire de la perte de virulence
30 par les bactéries sur un modèle d'infection septicémique. Ils ont en outre montré par des expériences de complémentation que la virulence des bactéries délétées du gène *SprD* peut être au moins partiellement rétablie lorsqu'un vecteur exprimant le transcrit *SprD* est introduit dans les bactéries mutantes.

Ainsi, ces résultats des travaux de recherche menés par les inventeurs indiquent que la virulence des souches bactériennes exprimant le gène *sprD*, notamment les souches appartenant au genre *Staphylococcus* et tout particulièrement à l'espèce *Staphylococcus aureus*, peut être diminuée voire supprimée par l'inhibition ou la suppression des effets de l'ARN *sprD*.

5 L'inhibition ou la suppression des effets de l'ARN *SprD* sur la virulence des bactéries *Staphylococcus aureus* pourra être obtenue par :

- l'inhibition de la transcription du gène *SprD* en agissant sur la séquence transcrite du gène (délétion de tout ou partie de la séquence transcrite, mutagenèse dirigée pour modifier la reconnaissance par la machinerie de transcription) ou via des molécules empêchant la
10 transcription du gène en se fixant sur sa séquence promotrice bloquant l'initiation de la transcription du gène *sprD*.

- les inhibiteurs de l'activité des transcrits *SprD*, notamment les inhibiteurs susceptibles d'empêcher la reconnaissance entre le transcrit *SprD* et ses cibles.

- la mutagenèse dirigée du gène *SprD* pour modifier la reconnaissance entre le transcrit
15 *SprD* et sa cible.

- les agents affectant la stabilité des transcrits *SprD* et/ou les inhibiteurs de l'accumulation des transcrits *SprD*.

On entend par « bactéries du genre *Staphylococcus* » au sens de la présente invention, l'ensemble des souches bactériennes du genre *Staphylococcus*.

20 En particulier, les bactéries du genre *Staphylococcus* selon l'invention sont choisies dans le groupe comprenant les souches bactériennes du genre *Staphylococcus* dont le génome contient un gène codant un ARN comprenant la séquence SEQ ID N°1 ou une séquence homologue de la séquence SEQ ID N°1 et les fragments de celles-ci.

Ces souches peuvent être aisément identifiées par l'Homme du Métier, par exemple, par
25 des techniques de criblage de banques (d'ADN génomique ou d'ADNc de bactéries du genre *Staphylococcus*) à l'aide de sondes ou d'amorces spécifiques d'une séquence appartenant à des souches bactériennes du genre *Staphylococcus* telle que définies ci-dessus. De telles sondes ou amorces peuvent être sélectionnées à partir des séquences de polynucléotides selon l'invention.

Tout particulièrement, les bactéries du genre *Staphylococcus* selon l'invention sont des
30 souches de *Staphylococcus aureus*.

Selon un premier aspect, l'invention a pour objet, un inhibiteur de l'accumulation des transcrits *sprD* (tels que les inhibiteurs de la stabilité des transcrits *sprD*) et/ou de la transcription du gène *sprD*.

On entend par « transcrit *sprD* » ou « transcrit du gène *sprD* », un produit de transcription, c'est-à-dire un ARN synthétisé lors de la transcription du gène *sprD*.

L'expression « inhibiteur de l'accumulation des transcrits *sprD* » ou « agent inhibiteur de l'accumulation des transcrits *sprD* » est utilisée ici pour désigner une molécule capable d'induire une diminution d'au moins 20 %, en particulier d'au moins 35 % et tout particulièrement d'au moins 50 % du taux de transcrits du gène *sprD* accumulés en particulier dans le temps dans une souche bactérienne exprimant *sprD*, par rapport au taux de transcrits du gène *sprD* accumulés, en particulier dans le temps dans ladite souche bactérienne exprimant *sprD* en l'absence de ladite molécule. L'inhibition de l'accumulation de transcrits *sprD* peut être déterminée par des techniques bien connues de l'Homme du Métier telles que par « Northern Blot », utilisant au moins une sonde spécifique dudit transcrit ou par « RT-PCR » utilisant au moins deux amorces spécifiques dudit transcrit, notamment en étudiant l'accumulation du taux de transcrit *sprD* dans une souche bactérienne en culture exprimant *sprD*, dans des conditions d'expression du gène *sprD*. En particulier, l'inhibition de l'accumulation des transcrits peut être déterminée par la technique telle que décrite au point I.2 des exemples ci-après (« Isolation de l'ARN et Northern Blots ») et dont les résultats sont présentés sur la figure 1A.

L'expression « inhibiteur de la transcription du gène *sprD* » ou « agent inhibiteur de la transcription du gène *sprD* » est utilisée ici pour désigner une molécule capable d'inhiber d'au moins 20%, en particulier d'au moins 35 % et tout particulièrement d'au moins 50% la transcription du gène *sprD*, par rapport au taux de transcription du gène *sprD* en l'absence de ladite molécule. On entend par « inhibition de la transcription du gène *sprD* » une diminution d'au moins 20%, en particulier d'au moins 35 % et tout particulièrement d'au moins 50% de la transcription du gène *sprD*. L'inhibition de la transcription du gène *sprD* peut être déterminée par des techniques bien connues de l'Homme du Métier telles qu'exemplifiées ci-dessous.

De manière préférentielle, un tel inhibiteur comprend un polynucléotide isolé dont la séquence comprend ou consiste en une séquence choisie dans le groupe consistant en :

- la séquence SEQ ID N°4, les séquences dérivées ayant au moins 70 %, en particulier au moins 80 %, au moins 90 %, au moins 95 %, au moins 96%, au moins 97 %, au moins 98% et tout particulièrement au moins 99% d'identité avec la séquence SEQ ID N°4 et les fragments d'au moins 5 nucléotides de celles-ci, en particulier la séquence SEQ ID N°8 ; et

- les séquences d'ADN correspondantes, en particulier les séquences SEQ ID N°5 et SEQ ID N°9;

lesdites séquences dérivées et lesdits fragments ayant la capacité de s'hybrider spécifiquement avec la séquence SEQ ID N°2.

5 La présente invention concerne également un premier polynucléotide isolé dont la séquence comprend ou consiste en une séquence choisie dans le groupe consistant en :

a) la séquence SEQ ID N°4, les séquences dérivées ayant au moins 70%, en particulier au moins 80%, au moins 90 %, au moins 95 %, au moins 96%, au moins 97 %, au moins 98% et tout particulièrement au moins 99% d'identité avec la séquence SEQ ID N°4 et les fragments
10 d'au moins 5 nucléotides de celles-ci, de préférence la séquence SEQ ID N°4 et la séquence SEQ ID N°8 et tout préférentiellement la séquence SEQ ID N°4 ; et

b) les séquences d'ADN correspondantes, en particulier la séquence SEQ ID N°5 et la séquence SEQ ID N°9 et tout particulièrement la séquence SEQ ID N°5 ;

lesdites séquences dérivées et lesdits fragments ayant la capacité de s'hybrider
15 spécifiquement avec la séquence SEQ ID N°2.

On entend par « polynucléotide » au sens de la présente invention, un polymère composé de plusieurs nucléotides liés par des liaisons phosphodiester, tel que l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) et l'ARN (Acide RiboNucléique). L'ADN présente l'avantage d'être plus stable que l'ARN.

20 On entend par « séquence dérivée d'une deuxième séquence », une séquence ayant au moins 70 % d'identité, en particulier au moins 80 %, au moins 85%, au moins 90 %, au moins 95 %, au moins 96%, au moins 97 %, au moins 98 % et tout particulièrement au moins 99% d'identité avec une deuxième séquence.

Le terme « identité » se réfère à l'identité existant entre deux séquences de
25 polynucléotides. L'identité peut être déterminée par la comparaison des nucléotides présents à une position dans chacune des séquences de polynucléotide alignées dans ce but. Lorsque, à une position donnée un nucléotide est identifié comme identique sur les deux séquences alignées, lesdites séquences sont dites identiques à cette position. Le pourcentage d'identité entre deux séquences de polynucléotides est fonction du nombre de nucléotides identiques aux différentes
30 positions sur les deux séquences de nucléotides alignées. Les pourcentages d'identité auxquels il est fait référence dans le cadre de l'exposé de la présente invention sont déterminés sur la base d'un alignement global des séquences à comparer, c'est-à-dire sur un alignement des séquences prises dans leur intégralité, en utilisant l'algorithme de NEEDLEMAN et WUNSCH (J. Mol.

Biol. 48, 443-453, 1970). Cette comparaison de séquences peut être effectuée par exemple à l'aide du logiciel needle en utilisant le paramètre "Gap open" égal à 10.0, le paramètre "Gap Extend" égal à 0.5, et une matrice « Blosum 62 ». Le logiciel needle est par exemple disponible sur le site internet ebi.ac.uk world wide, sous la dénomination « Align ».

5 On entend notamment par séquence d'ADN correspondant à la séquence d'un ARN, ladite séquence d'ARN dans laquelle les ribonucléotides comprenant une base uracile ont été remplacées par des désoxyribonucléotides comprenant une base thymine.

En particulier, lesdits fragments selon l'invention peuvent comprendre au moins 5 nucléotides, en particulier au moins 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85,
10 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140 nucléotides.

Lesdits fragments selon l'invention peuvent comprendre au maximum 140, en particulier au maximum 135, 130, 125, 120, 115, 110, 105, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 nucléotides.

La capacité d'hybridation spécifique d'une première séquence de polynucléotide avec une
15 deuxième séquence de polynucléotide peut être déterminée *in vitro*, par des tests bien connus de l'Homme du Métier. À titre d'exemple, on peut citer le test décrit dans C. Pichon & B. Felden (2005 ; avec l'exemple de l'ARN régulateur *SprA* et sa cible ARNm SA2216), qui comprend les étapes suivantes :

- une première séquence de polynucléotide est marquée radioactivement, purifiée et des
20 quantités croissantes d'une deuxième séquence de polynucléotide non marquée sont ajoutées et analysées par gel d'électrophorèse en conditions natives. L'obtention d'un retard de migration sur ce gel implique la formation d'un complexe entre ces deux séquences de polynucléotides, par hybridation ;

- l'effet de l'ajout d'un excès de 100 à 2000 fois, en rapports molaires, d'une troisième
25 séquence de polynucléotide (par exemple un mélange d'ARN de transfert) sur la formation dudit complexe entre les deux premières séquences, est analysé ;

- l'effet de l'ajout d'un excès de 100 à 2000 fois, en rapports molaires, de la première séquence de polynucléotide non marqué sur la formation dudit complexe entre les deux premières séquences, est analysé ;

30 - l'hybridation entre les deux premières séquences de polynucléotides sera considérée comme spécifique si (i) ledit complexe préformé entre les deux premières séquences de polynucléotide reste stable en présence de cet excès de troisième séquence de polynucléotide

(ex : ARNt) et si (ii) ledit complexe préformé est déstabilisé en présence de faibles quantités de la première séquence de polynucléotide non marquée.

L'Homme du Métier pourra aisément déterminer les séquences dérivées et les fragments du premier polynucléotide isolé selon l'invention qui ont la capacité de s'hybrider spécifiquement à la séquence ID N°2, en mettant en œuvre un test d'hybridation spécifique tel que décrit ci-dessus.

En particulier, les séquences dérivées et les fragments du premier polynucléotide isolé selon l'invention qui ont la capacité de s'hybrider spécifiquement à la séquence ID N°2 ont en outre la capacité d'inhiber l'accumulation des transcrits *sprD* et/ou d'inhiber la transcription du gène *sprD*.

En particulier, les polynucléotides isolés selon la présente invention peuvent être capables de s'hybrider spécifiquement à l'ARN *SprD* et d'induire la dégradation de l'ARN *sprD* par un mécanisme de dégradation lié au recrutement de ribonucléases sur le duplex ARN-ARN, l'exemple décrit expérimentalement chez *Staphylococcus aureus* étant la ribonucléase III (pour la dégradation des cibles ARNm de l'ARNIII). Dans ce cas, l'ARN *SprD* est donc dégradé et ne peut donc plus produire ses effets. De tels polynucléotides sont donc particulièrement utiles pour la prévention et/ou le traitement d'infections staphylococciques, en particulier de souches résistantes aux antibiotiques. En outre, les polynucléotides selon l'invention présentent l'avantage contrairement à des traitements putatifs, d'avoir une action ciblée sur les bactéries du genre *Staphylococcus* optimisant ainsi leur action et limitant les risques d'effets secondaires.

La présente invention concerne également l'utilisation *in vitro* ou *ex vivo* du premier polynucléotide isolé selon l'invention en tant qu'agent inhibiteur de l'accumulation des transcrits *sprD* et/ou de la transcription du gène *sprD*, en particulier ledit polynucléotide isolé selon l'invention ayant une séquence comprenant ou consistant en une séquence choisie dans le groupe consistant en :

a) la séquence SEQ ID N°4, les séquences dérivées ayant au moins 70 % d'identité avec la séquence SEQ ID N°4 et les fragments d'au moins 5 nucléotides de celles-ci, de préférence la séquence SEQ ID N°4 et la séquence SEQ ID N°8 et tout préférentiellement la séquence SEQ ID N°4 ; et

b) les séquences d'ADN correspondantes, en particulier les séquences SEQ ID N°5 et SEQ ID N°9 et tout particulièrement la séquence SEQ ID N°5 ;

lesdites séquences dérivées et lesdits fragments ayant la capacité de s'hybrider spécifiquement avec la séquence SEQ ID N°2 et en particulier ayant en outre la capacité d'inhiber l'accumulation des transcrits *sprD* et/ou d'inhiber la transcription du gène *sprD*.

L'invention a également pour objet un deuxième polynucléotide isolé comprenant à ses
5 extrémités 5' et 3' respectivement les séquences nucléotidiques SEQ ID N°6 et SEQ ID N°7 (correspondant respectivement à la séquence de l'ADN génomique en amont du gène *sprD* et à la séquence de l'ADN génomique en aval du gène *sprD*). En particulier, ledit deuxième polynucléotide a une taille inférieure à 10 000 nucléotides, tout particulièrement inférieure à 5 000 nucléotides, 2 500 nucléotides, 1 500 nucléotides, 1000 nucléotides, 750 nucléotides, 500
10 nucléotides, 450 nucléotides, 250 nucléotides, 150 nucléotides, 100 nucléotides, 50 nucléotides, 25 nucléotides.

En particulier, ledit deuxième polynucléotide a une taille comprise entre 5 et 10 000 nucléotides, tout particulièrement entre 10 et 5 000 nucléotides, 25 et 2 500 nucléotides, 50 et 1 500 nucléotides, 75 et 1 000 nucléotides, 100 et 750 nucléotides, 150 et 500 nucléotides.

15 Ce deuxième polynucléotide peut être utile notamment pour déléter totalement le gène *sprD* du génome de bactérie appartenant au genre *Staphylococcus*, en particulier dont le génome contient la séquence SEQ ID N°1, en particulier, appartenant à l'espèce *Staphylococcus aureus*.

L'invention a également pour objet un inhibiteur de l'accumulation des transcrits *sprD* qui comprend un vecteur comprenant les séquences nucléotidiques SEQ ID N°6 et SEQ ID N°7 et
20 un vecteur recombinant comprenant un deuxième polynucléotide selon l'invention. Ledit vecteur recombinant (tel que pBT2Δ*sprD*) ainsi généré peut être transformé par exemple dans les souches RN4220 puis N315 pour permettre l'intégration du gène *ermB* dans le génome par recombinaison homologue. La délétion du gène *sprD* peut être validée par Northern blots, avec absence du transcrit *sprD*. Les inventeurs ont montré sur un modèle murin de septicémie que les
25 bactéries dans lesquelles le gène *sprD* est délété perdent leur virulence.

La présente invention englobe également les polynucléotides conformes à l'invention, synthétiques, hémi-synthétiques, recombinants et leurs analogues. Les analogues des polynucléotides selon l'invention ont la capacité de s'hybrider spécifiquement avec la séquence SEQ ID N°2 ou d'être transcrits en polynucléotides ayant la capacité de s'hybrider
30 spécifiquement avec la séquence SEQ ID N°2. En particulier, les analogues des polynucléotides selon l'invention ont en outre la capacité d'inhiber l'accumulation des transcrits *sprD* et/ou d'inhiber la transcription du gène *sprD*.

On entend par « analogue » au sens de la présente invention, des polynucléotides comprenant au moins une modification chimique au niveau de leur sucre, phosphate, de leur base ou de leurs extrémités 5' et 3' ; ladite modification pouvant être réalisée par synthèse chimique ou enzymatique.

5 En effet, les polynucléotides selon l'invention peuvent comprendre au moins une modification chimique destinée notamment à augmenter leur stabilité, leur résistance à la dégradation par les endo et exonucléases, favoriser leur capacité à entrer dans une cellule d'intérêt et/ou dans le cas du premier polynucléotide selon l'invention à augmenter sa capacité à réguler négativement l'accumulation de transcrits *sprD*. L'augmentation de la capacité du
10 premier polynucléotide (en particulier de séquence SEQ ID N°4) selon l'invention à réguler négativement l'accumulation de transcrits *sprD* peut être obtenu, par exemple, par une modification chimique permettant l'augmentation de la formation et/ou de la stabilité d'un complexe entre le premier polynucléotide selon l'invention et la séquence SEQ ID N°2, par hybridation spécifique. Ainsi, les polynucléotides selon l'invention peuvent comprendre des
15 nucléotides modifiés au niveau de leur sucre, phosphate, de leur base et/ou peuvent présenter des modifications, notamment post-transcriptionnelles, aux niveaux de leurs extrémités 5' et 3'. De tels nucléotides modifiés peuvent être choisis dans le groupe comprenant : les 2'-O-methylnucléotides, les 2'-O-methoxyethylnucléotides, les déoxynucléotides tels que les 2'-déoxynucléotides et les 2'-deoxy-2'-fluoronucléotides, les nucléotides à liaisons peptidiques, des
20 fluorochromes, des éléments radioactifs.

Les polynucléotides selon l'invention peuvent également comprendre en outre, à leurs extrémités 5' et/ou 3' des éléments structuraux (tels que des hélices d'ARN ou d'ADN stables) renforçant leur stabilité et/ou leur résistance aux dégradations.

Les polynucléotides selon l'invention peuvent être obtenus par des méthodes bien connues
25 de l'Homme du Métier telles que par des techniques de criblage de banques (d'ADN génomique ou d'ADNc de bactéries du genre *Staphylococcus*) par des sondes ou des amorces spécifiques desdits polynucléotides (sélectionnés par exemple à partir des séquences de polynucléotides selon l'invention), mais également, par synthèses chimiques (Beaucage SL., 2008) ou par réactions enzymatiques (Sherlin LD *et al.*, 2001).

30 L'invention a également pour objet une cassette d'expression comprenant une séquence d'ADN telle que définie au point b) ci-dessus, en particulier ladite séquence d'ADN correspondant à une séquence comprise dans le groupe consistant en :

- la séquence SEQ ID N°4, les séquences dérivées ayant au moins 70 % d'identité avec la séquence SEQ ID N°4 et les fragments d'au moins 5 nucléotides de celles-ci, en particulier la séquence SEQ ID N°4 et la séquence SEQ ID N°8 et tout particulièrement la séquence SEQ ID N°4 ;

5 lesdites séquences dérivées et lesdits fragments ayant la capacité de s'hybrider spécifiquement avec la séquence SEQ ID N°2 et en particulier ayant en outre la capacité d'inhiber l'accumulation des transcrits *sprD* et/ou d'inhiber la transcription du gène *sprD*.

En particulier, la présente invention concerne une cassette d'expression comprenant la séquence d'ADN de séquence SEQ ID N°5 ou SEQ ID N°9, tout particulièrement de séquence
10 SEQ ID N°5.

L'invention a également pour objet une cassette d'expression comprenant une séquence d'ADN selon l'invention pouvant être transcrite en séquence SEQ ID N°4.

On entend par « cassette d'expression » au sens de la présente invention, une cassette comprenant un promoteur et une région de terminaison de la transcription dans laquelle une
15 séquence d'ADN d'intérêt est liée de manière opérationnelle au promoteur afin de permettre la transcription de ladite séquence d'ADN.

Il peut s'agir de tout promoteur ou séquence dérivée, inductible ou non, permettant la transcription d'un polynucléotide selon l'invention. En particulier, le promoteur est choisi parmi les promoteurs permettant la transcription d'un polynucléotide selon l'invention dans au moins
20 une souche bactérienne du genre *Staphylococcus*. À titre d'exemple de tels promoteurs, on peut citer le promoteur du bactériophage T7 (Milligan JF *et al.*, 1989) ou des promoteurs naturels constitutifs.

L'invention a également pour objet un vecteur recombinant comprenant :

- un polynucléotide isolé choisi parmi le groupe de polynucléotides isolés selon
25 l'invention, en particulier parmi le premier et le deuxième polynucléotide isolé selon l'invention ; ou

- une cassette d'expression selon l'invention.

Les vecteurs utilisables peuvent être des vecteurs viraux, tels que des bactériophages, ou non viraux, tels que des vecteurs plasmidiques.

30 À titre d'exemples de vecteurs plasmidiques utilisables selon l'invention, on peut citer l'ensemble des vecteurs dérivés de pCN décrits dans Charpentier *et al.* (2004). Certains de ces

vecteurs, par exemple pCN51, permettent la transcription d'une séquence d'ADN d'intérêt en ARN par l'utilisation d'un promoteur inductible au Cadmium.

En particulier, le vecteur plasmidique peut être choisi dans le groupe comprenant les plasmides pCN35 et pCN38 décrits dans Charpentier *et al.* (2004). Ces plasmides présentent l'avantage d'être maintenus et ainsi de permettre l'expression de polynucléotides selon l'invention, dans des bactéries transformées du genre *Staphylococcus*.

Le plasmide pBT2 (Brückner, 1997, *FEMS Microbiol Lett.* 151: 1-8) pourra être mis en œuvre pour la délétion de tout ou partie du gène SprD par recombinaison homologue.

En particulier, le vecteur selon l'invention est un bactériophage.

De préférence, ledit bactériophage est capable d'infecter au moins une souche bactérienne du genre *Staphylococcus*. On entend par « bactériophage capable d'infecter une souche bactérienne du genre *Staphylococcus* », tout virus de bactéries capable d'introduire une partie de son matériel génétique dans le génome d'une souche bactérienne du genre *Staphylococcus* (prophage) ou de permettre l'expression transitoire de ce matériel génétique dans la bactérie réceptrice sans intégration chromosomique.

Les bactéries du genre *Staphylococcus* sont infectées par trois types de phages : lytiques obligatoires, tempérés et chroniques (Nicholas H. Mann, 2008). L'ensemble de ces phages est utilisable en tant que vecteur selon l'invention.

Dans le cadre de la prévention et/ou du traitement d'infection staphylococcique, les phages utilisables comme vecteur selon l'invention sont de préférence à large spectre et capable d'infecter le plus grand nombre possible de souches bactériennes du genre *Staphylococcus* responsables d'infections chez l'homme et/ou l'animal. À titre d'exemple de tels bactériophages, on peut citer le phage lytique obligatoire ϕ 812, les phages K et ϕ MR11.

L'utilisation de bactériophages comme vecteur selon l'invention présente l'avantage d'optimiser la prévention et/ou le traitement d'une infection staphylococcique ou d'un trouble lié à au moins une bactérie du genre *Staphylococcus*. En outre, l'utilisation de bactériophage comme vecteur selon l'invention présente l'avantage que le bactériophage utilisé soit potentiellement efficace contre différentes souches bactériennes du genre *Staphylococcus*, même celles résistantes aux antibiotiques (Nicholas H. Mann, 2008) et de ne pas présenter d'effets secondaires, notamment en étant dénués d'effets néfastes sur les cellules eucaryotes de l'hôte infecté.

Selon un autre aspect, l'invention a pour objet une cellule hôte transformée par une cassette d'expression selon l'invention ou un vecteur recombinant selon l'invention. La cellule

hôte peut être en particulier un procaryote tel que *E. coli* notamment la souche DH5 α et avantageusement un bactériophage tel que décrit ci-dessus.

L'invention a également pour objet une composition comprenant au moins un composant choisi dans le groupe consistant en un inhibiteur de l'accumulation des transcrits *sprD* selon l'invention, un polynucléotide isolé selon l'invention, une cassette d'expression selon l'invention, un vecteur selon l'invention et une cellule hôte selon l'invention. Avantageusement, ladite composition selon l'invention est une composition pharmaceutique.

L'invention a également pour objet une composition pharmaceutique comprenant un vecteur pharmaceutiquement acceptable et au moins un composant choisi dans le groupe consistant en un polynucléotide isolé selon l'invention, une cassette d'expression selon l'invention, un vecteur selon l'invention et une cellule hôte selon l'invention.

Les vecteurs pharmaceutiquement acceptables utilisables dans les compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent être des vecteurs bien connus de l'Homme du Métier.

Les compositions pharmaceutiques ou médicaments selon l'invention présentent l'avantage contrairement aux médicaments putatifs d'avoir une action ciblée sur les bactéries du genre *Staphylococcus*, y compris les souches résistantes aux antibiotiques, optimisant ainsi leur action et limitant les risques d'effets secondaires.

En particulier, lesdits composants sont présents dans la composition pharmaceutique ou médicament selon l'invention en quantités thérapeutiques (quantités actives et non toxiques). De telles quantités thérapeutiques peuvent être déterminées par l'Homme du Métier par des tests de routine comprenant l'évaluation de l'effet de l'administration desdits composants susmentionnés sur des pathologies et/ou des troubles que l'on cherche à prévenir et/ou à traiter par l'administration de ladite composition pharmaceutique ou médicament selon l'invention, par exemple une infection staphylococcique et sur la toxicité. Par exemple, de tels tests peuvent être mis en œuvre en analysant de manière quantitative et qualitative l'effet de l'administration de différentes quantités desdits composants susmentionnés sur un ensemble de marqueurs (biologiques et/ou cliniques) caractéristiques de ces pathologies et/ ou de ces troubles, ainsi que par comptage bactériens dans des échantillons de prélèvements biologiques.

En outre, l'index thérapeutique de la composition pharmaceutique ou médicament selon l'invention peut être déterminé par des tests bien connus de l'Homme du Métier.

Les inhibiteurs et les compositions, en particulier les compositions pharmaceutiques ou médicaments selon l'invention peuvent être administrés directement, de préférence à l'aide d'un véhicule pharmaceutiquement acceptable approprié permettant de faciliter leur entrée dans la

cellule d'intérêt et/ou de les protéger de leur dégradation chimique ou enzymatique. À titre d'exemples de tels véhicules pharmaceutiquement utilisables, on peut citer des microsphères, des liposomes, des nanoparticules.

Les inhibiteurs selon l'invention peuvent également être administrés via un vecteur tel qu'avantageusement un bactériophage comme décrit ci-dessus.

Les compositions pharmaceutiques ou médicaments selon l'invention peuvent être administrées par différentes voies compatibles avec l'effet recherché et de préférence par voie orale, parentérale, sous-cutanée, topique, intra-oculaire, sublinguale et tout préférentiellement intra-oculaire.

Les compositions pharmaceutiques ou médicaments selon l'invention peuvent être administrées en une ou plusieurs fois ou en libération continue.

Les compositions pharmaceutiques ou médicaments selon l'invention peuvent se présenter sous différentes formes bien connues de l'Homme du Métier et adaptées aux voies et modes d'administration utilisés. En particulier lorsque les compositions pharmaceutiques sont administrées à des animaux, elles peuvent être incluses dans des compositions alimentaires (par exemple sous forme de poudres ou de granulés).

Selon un autre aspect, l'invention a également pour objet un inhibiteur de l'accumulation des transcrits *sprD* selon l'invention, ou une cassette d'expression selon l'invention, ou un vecteur selon l'invention ou une cellule hôte selon l'invention, pour son application en tant que médicament pour la prévention et/ou le traitement d'une infection staphylococcique.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'au moins un composant choisi dans le groupe consistant en un inhibiteur de l'accumulation des transcrits *sprD* selon l'invention, un polynucléotide isolé selon l'invention, une cassette d'expression selon l'invention, un vecteur selon l'invention, une cellule hôte selon l'invention, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement d'une infection staphylococcique.

L'invention a également pour objet une composition pharmaceutique selon l'invention pour son utilisation pour la prévention et/ou le traitement d'une infection staphylococcique.

L'invention a également pour objet une méthode de prévention et/ou de traitement d'une infection staphylococcique comprenant l'administration à un sujet d'une quantité thérapeutique d'au moins un composant choisi dans le groupe consistant en un polynucléotide isolé selon l'invention, une cassette d'expression selon l'invention, un vecteur selon l'invention, une cellule hôte selon l'invention.

La quantité thérapeutique peut être aisément déterminée par des tests bien connus de l'Homme du Métier.

De préférence, on entend par « sujet » un mammifère et tout particulièrement l'Homme. En particulier, ledit sujet est atteint d'une infection staphylococcique.

5 Selon un autre aspect, l'invention a également pour objet un produit contenant :

- au moins un composant choisi dans le groupe comprenant un polynucléotide isolé selon l'invention, une cassette d'expression selon l'invention, un vecteur selon l'invention, une cellule hôte selon l'invention; et

- au moins un autre agent antistaphylococcique, comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée et/ou étalée dans le temps, pour la prévention et/ou le traitement d'une infection staphylococcique.

Les infections staphylococciques comprennent l'ensemble des infections dont sont responsables les bactéries du genre *Staphylococcus*. Ces infections comprennent l'ensemble des pathologies et/ou des troubles pouvant être améliorés et/ou évités par la réduction de l'accumulation et/ou par la réduction de la transcription des transcrits *sprD*.

En particulier, les infections staphylococciques comprennent les infections à *Staphylococcus aureus* parmi lesquelles on peut citer les folliculites superficielles ou profondes (tels que les furoncles, l'anthrax et le sycosis staphylococcique), le syndrome staphylococcique des enfants ébouillantés, les infections de blessures, un furoncle, une bactériémie, une endocardite, une ostéomyélite ou encore une arthrite septique.

On entend par « agent antistaphylococcique » au sens de la présente invention, un agent destiné à lutter contre au moins une souche bactérienne du genre *Staphylococcus*, en particulier contre au moins une souche bactérienne du genre *Staphylococcus* choisie dans le groupe comprenant les souches bactériennes du genre *Staphylococcus* dont le génome contient : un gène codant un ARN comprenant la séquence SEQ ID N°1 ou une séquence homologue de la séquence SEQ ID N°1 et les fragments de celles-ci, et tout particulièrement un agent destiné à lutter contre au moins une souche de *Staphylococcus aureus*.

Ledit agent antistaphylococcique peut être choisi dans le groupe comprenant :

- des antibiotiques destinés à prévenir et/ou à traiter des infections locales tels que l'acide fusidique, la mupirocine ;

- des antibiotiques destinés à prévenir et/ou traiter des infections systémiques tels que la rifampicine, les fluoroquinolones, l'acide fusidique, le trimethoprim-sulfaméthoxazole, les glycopeptides ; et
- des bactériophages tels que ϕ 812, K et ϕ MR11.

5 Les produits de combinaison selon l'invention comprenant un autre agent antistaphylococcique présentent les avantages d'optimiser la prévention et/ou le traitement d'une infection staphylococcique et de pouvoir réduire la quantité thérapeutique de chaque composant.

La présente invention a également pour objet un procédé d'obtention d'une souche bactérienne non virulente ou dont la virulence (pathogénicité) est diminuée, en particulier non
10 virulente, ladite souche appartenant au genre *Staphylococcus*, en particulier à l'espèce *Staphylococcus aureus*, ledit procédé comprenant une étape de délétion totale ou partielle du gène *sprD* dans le génome d'une souche bactérienne du genre *Staphylococcus*, en particulier une délétion totale du gène *sprD*. La diminution de la virulence ou pathogénicité d'une souche bactérienne, en particulier appartenant au genre *Staphylococcus*, peut être déterminée par toute
15 technique bien connue de l'Homme du Métier, en particulier telle que par la méthode décrite dans les exemples ci-dessous.

La délétion totale ou partielle du gène *sprD* peut être réalisée par recombinaison homologue, de préférence par l'introduction dans ladite souche d'un polynucléotide isolé comprenant à ses extrémités 5' et 3' respectivement les séquences nucléotidiques SEQ ID N°6 et
20 SEQ ID N°7. Une telle introduction peut être réalisée par exemple par électroporation.

La présente invention concerne également un procédé pour la sélection ou l'identification *in vitro* ou *ex vivo* de composés pour la prévention et/ou le traitement d'une infection staphylococcique, comprenant les étapes suivantes ;

- a) l'introduction ou la mise en contact d'un composé test dans ou avec une souche
25 bactérienne exprimant le gène *sprD* ou avec des transcrits *sprD* ;
- b) La détermination de la capacité du composé test à complexer, en particulier à s'hybrider, avec les transcrits *sprD* ; et/ou
- c) la détermination de la capacité du composé test à inhiber la transcription du gène *sprD* ; et éventuellement en outre
- 30 d) la sélection des composés capables de complexer avec les transcrits *sprD* et/ou d'inhiber la transcription du gène *sprD* ; et éventuellement en outre

e) la mise en contact ou l'introduction du composé test sélectionné à l'étape d) avec ou dans une souche bactérienne virulente appartenant au genre *Staphylococcus* ;

f) la détermination de la capacité du composé test à diminuer ou à supprimer la virulence de ladite souche ; et éventuellement en outre

5 g) la sélection des composés tests capables de diminuer ou supprimer la virulence de ladite souche.

On entend par « composé capable de complexer » avec des transcrits *sprD*, tout composé capable de former un complexe avec les transcrits *sprD*, en particulier capable de s'hybrider avec lesdits transcrits. Lesdits composés peuvent être notamment des protéines, des polynucléotides
10 tels qu'une molécule d'ADN ou une molécule d'ARN. En particulier, ledit composé peut être un ARN antisens, un siRNA, un shRNA, LNA, PNA. La capacité d'un composé à former un complexe, en particulier à s'hybrider avec les transcrits *sprD* peut être déterminée par toute technique bien connue de l'Homme du Métier, telle que par la détection du complexe susceptible d'être formé entre ledit composé et les transcrits *sprD*. A titre d'exemple de telle technique, on
15 peut citer les techniques de retard sur gel, northern-blot, RT-PCR.

On entend par « composé capable d'inhiber la transcription du gène *sprD* », toute molécule capable d'inhiber d'au moins 20%, en particulier d'au moins 35 % et tout particulièrement d'au moins 50% la transcription du gène *sprD*, par rapport au taux de transcription du gène *sprD* en l'absence dudit composé. L'inhibition des transcrits *sprD* peut être déterminée par des tests bien
20 connus de l'Homme du Métier telle que par Northern blot en utilisant au moins une sonde spécifique dudit transcrit *sprD* ou par RT-PCR en utilisant aux moins deux amorces spécifiques dudit transcrit *sprD*.

La capacité du composé test à diminuer ou à supprimer la virulence d'une souche peut-être déterminée en utilisant des techniques bien connues de l'Homme du Métier et notamment par la
25 technique telle que décrite au point I.3 des exemples ci-après, en utilisant un modèle murin par exemple de septicémie intraveineuse. Par exemple, il est possible d'inoculer à des souris une suspension bactérienne comprenant une souche virulente du genre *Staphylococcus* dans laquelle a été introduite ledit composé test et en observant l'état (notamment survie ou non) des souris dans le temps en comparaison avec des souris inoculée avec une composition non pathogène
30 comme témoin.

L'introduction du composé test dans une souche bactérienne peut être effectuée par toute technique classiquement connue de l'Homme du Métier telle que par transformation, transfection, par exemple par un électroporateur.

On entend par souche virulente du genre *Staphylococcus*, une souche pathogène, notamment qui exprime le gène *sprD*, en particulier de séquence SEQ ID N°1.

Ledit procédé selon l'invention présente l'avantage de permettre la sélection ou l'identification de composés pour la prévention et/ou le traitement d'une infection staphylococcique qui contrairement aux médicaments putatifs permettent d'avoir une action ciblée sur les bactéries du genre *Staphylococcus*, y compris les souches résistantes aux antibiotiques, optimisant ainsi leur action et limitant les risques d'effets secondaires.

La présente invention concerne également un procédé pour la sélection ou l'identification *in vitro* ou *ex vivo* de composés capables d'inhiber l'accumulation des transcrits *sprD* et/ou la transcription du gène *sprD*, comprenant les étapes suivantes :

i) l'introduction ou la mise en contact d'un composé test dans ou avec une souche bactérienne exprimant le gène *sprD* ou avec des transcrits *sprD* ;

ii) La détermination de la capacité du composé test à complexer, en particulier à s'hybrider, avec les transcrits *sprD* ; et/ou

iii) la détermination de la capacité du composé test à inhiber la transcription du gène *sprD* ; et éventuellement

iv) la sélection des composés capables de complexer avec les transcrits *sprD* et/ou d'inhiber la transcription du gène *sprD* ; et éventuellement

v) la mise en contact ou l'introduction du composé test sélectionné à l'étape d) avec ou dans une souche bactérienne virulente appartenant au genre *Staphylococcus* ;

vi) la détermination de la capacité du composé test à diminuer ou à supprimer la virulence de ladite souche ; et éventuellement

vii) la sélection des composés tests capables de diminuer ou supprimer la virulence de ladite souche.

Ladite souche bactérienne exprimant le gène *sprD* dans les étapes a) et i) des procédés selon l'invention peut être notamment une souche appartenant au genre *Staphylococcus* dont le génome comprend le gène *sprD* notamment de séquence SEQ ID N°1, de préférence une souche appartenant à l'espèce *Staphylococcus aureus*. Ladite souche bactérienne exprimant le gène *sprD* dans les étapes a) et i) des procédés selon l'invention peut être également une souche bactérienne n'appartenant pas au genre *Staphylococcus* et par exemple qui a été transformée avec le gène *sprD*, notamment de séquence SEQ ID N°1.

La présente invention concerne également un composé susceptible d'être obtenu par au moins l'un des procédés de sélection ou d'identification selon l'invention, en particulier en tant que médicament et tout particulièrement pour la prévention et/ou le traitement d'une infection staphylococcique.

5 D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront au regard des exemples qui suivent.

Ces exemples sont donnés à titre illustratif et non limitatif.

La Figure 1A représente l'accumulation du transcrit *sprD* à différentes phases de croissance pour une culture de *S. aureus* N315 (agr-) et pour une culture de *S. aureus* RN1 (agr+). L'accumulation de l'ARNr 5S est utilisée comme témoin de charge. Pour la culture de *S. aureus* N315 (agr-) les ARN totaux ont été extraits lorsque la DO à 600 nm est égale 0,25 ; 0,7 ; 1,8 ; 4,5 ; 8,9 ; 12 ; 20 et 21. Pour la culture de *S. aureus* RN1 (agr+) les ARN totaux ont été extraits lorsque la DO à 600 nm est égale à 0,2 ; 0,7 ; 1,1 ; 4,0 ; 8,8 ; 14,3 et 17,2. Cinq µg d'ARN totaux est chargé par puit. La sonde utilisée est une sonde spécifique du transcrit *sprD*.

15 La Figure 1B illustre l'accumulation du transcrit *sprD* pour une culture de *S. aureus* N315 (agr-), pour une culture de *S. aureus* RN1 (agr+), pour une culture de *S. aureus* N315 (agr-) délétée du gène *sprD*, pour une culture de *S. aureus* RN1 (agr+) délétée du gène *sprD* et pour une culture de *S. aureus* N315 (agr-) délétée du gène *sprD* complémentée. L'accumulation de l'ARNr 5S est utilisée comme témoin de charge. Cinq µg d'ARN totaux est chargé par puits. La sonde utilisée est une sonde spécifique du transcrit *sprD*.

La Figure 2(A-B) illustre :

Figure 2A : la virulence d'une culture de *S. aureus* N315 (agr-), la virulence d'une culture de *S. aureus* N315 (agr-) délétée du gène *sprD* et la virulence d'une culture de *S. aureus* N315 (agr-) délétée du gène *sprD* complémentée. Ce graphique donne le pourcentage d'animaux vivants en fonction du temps écoulé à partir de l'infection des animaux par une culture de *S. aureus* N315 (agr-), culture de *S. aureus* N315 (agr-) délétée du gène *sprD* ou une culture de *S. aureus* N315 (agr-) délétée du gène *sprD* complémentée.

Figure 2B : la virulence d'une culture de *S. aureus* RN1 (agr+) et la virulence d'une culture de *S. aureus* RN1 (agr+) délétée du gène *sprD*. Ce graphique donne le pourcentage d'animaux vivants en fonction du temps écoulé à partir de l'infection des animaux par une culture de *S. aureus* RN1 (agr+) ou culture de *S. aureus* RN1 (agr+) délétée du gène *sprD*.

La figure 3 représente les résultats du comptage bactérien réalisé sur les reins prélevés chez des animaux infectés par une culture de *S. aureus* N315 (agr-), une culture de *S. aureus* N315 (agr-) délétée du gène *sprD* ou une culture de *S. aureus* N315 (agr-) délétée du gène *sprD*

complémentée. Le prélèvement des reins et le comptage bactérien sont réalisés 6 jours après l'infection des animaux.

EXEMPLES

5 I. Matériels et méthodes

I.1 Souches et plasmides

Les souches de *S. aureus* et les plasmides utilisés dans cette étude sont énumérés dans le tableau 1. Les souches de *S. aureus* ont été cultivées de manière habituelle à 37 °C dans un
10 bouillon d'infusion de cerveau et de cœur (BHI, Oxoid). Si nécessaire, les inventeurs ont utilisé du chloramphénicol et de l'érythromycine à raison de 10 µg/ml. La souche DH5α d'*E. Coli* a été utilisée en tant qu'hôte bactérien pour la construction du plasmide. Les souches d'*E. Coli* ont été cultivées dans un milieu de Luria-Bertani (LB).

Dans le plasmide pCN38-sprD, le gène codant pour sprD est exprimé sous le contrôle de
15 son propre promoteur. Pour construire ce plasmide, sprD avec 40 nucléotides en amont et 35 nucléotides en aval a été amplifié par une PCR à partir de l'ARN génomique de la souche N315 de *S. aureus* en tant que fragment de 217 paires de bases avec des sites de restriction flanquants *Pst* I et *Eco*R I. Le produit de la PCR a été cloné entre ces deux sites dans le vecteur pCN38 à faible nombre de copies (Charpentier *et al*, 2004).

20 Dans le plasmide pBT2ΔsprD, le gène de résistance à l'érythromycine est cloné en 3' d'une séquence nucléotidique de 1010 pb correspondant aux 1010 pb en amont du gène sprD et en 5' d'une séquence nucléotidique de 813 pb correspondant aux 813 pb en aval du gène sprD. Pour construire ce plasmide, le fragment d'ADN de 1010 pb en amont du gène SprD et le fragment d'ADN de 813 pb en aval du gène SprD ont été amplifiés par une PCR à partir de
25 l'ADN génomique de la souche N315 de *S. aureus*. Les amorces sens et antisens utilisées pour la PCR permettent d'obtenir un amplicon d'environ 1000 pb présentant respectivement à ses extrémités 5' les sites de restriction XbaI.

Les amorces utilisées sont les suivantes :

Amorce sens : TCGCTCTAGAGAATTCGTGGACAACGTCGTTATATAGCG
30 Amorce antisens : GCCCGGATCCAAGGTAATATTAACATAAAATGGCTAC
et un amplicon d'environ 800 pb présentant respectivement à ses extrémités 5' les sites de restrictions EcoRI.

Les amorces utilisées sont les suivantes :

Amorce sens : GCGGCGCTCGAGTCTATAAATACAATAAGGTATGTCAATTTG
35 Amorce antisens : AGCGGAGCTCGAATTCGAAGGGTGTGTATTGTTATTACCTA

La cassette erythromycine a été amplifiée par PCR avec les amorces suivantes :

Amorce

sens :GCAATAGTAGCCATTTTATGTTAATATTACCTTGGATCCGGGCCCCACCTAGGAA
TTGAAT

Amorce

5 antisens :ATCAAATTGACATACCTTATTGTATTTATAGACTCGAGCGCCGCGGAAAAC
TGGT

Pour obtenir le fragment d'environ 3kb constitué du 5' sprD/cassette erythromycine/3' sprD, les trois produits de PCR (5' sprD, cassette erythromycine et 3' sprD) obtenus
10 précédemment ont été mélangées et amplifiées avec les amorces suivantes :

Amorce sens : TCGCTCTAGAGAATTCGTGGACAACGTCGTTATATAGCG

Amorce antisens : AGCGGAGCTCGAATTCGAAGGGTGTGTATTGTTATTTACCTA

Les amplicons obtenus sont clonés dans le vecteur pGEM-T (PROMEGA), ce vecteur est
15 déjà préparé avec une thymidine (T) aux extrémités 3' terminales permettant ainsi de cloner les produits de PCR pour lesquels un A est ajouté par la DNA polymérase pendant la PCR. Après digestion avec les enzymes de restriction XbaI et EcoRI, le fragment digéré et purifié est cloné entre les sites XbaI-EcoRI du vecteur plasmidique pBT2.

Le plasmide pBT2ΔsprD est utilisé pour transformer une souche bactérienne de *S. aureus*,
20 la souche RN44220, qui est utilisée comme une cellule hôte intermédiaire puisqu'elle va favoriser l'intégration du gène de résistance à l'érythromycine par recombinaison homologue dans le génome de bactéries *S. aureus* N315 ou RN1, à la place du gène *sprD*.

Le remplacement du gène *sprD* par la cassette d'expression du gène de résistance à
25 l'érythromycine est testé par PCR pour les colonies sensibles au chloramphénicol (résultats non présentés). La délétion du gène *sprD* dans ces bactéries est confirmée par l'analyse par Northern Blot de l'accumulation du transcrit SprD.

<i>E. coli</i> DH5α		Sambrook et al. 1989
<i>S.aureus</i>		
RN4220	Dérivé défectueux de restriction de 8325-4	Kreiswirth et al. 1983
N315		
RN1		
<i>Plasmides</i>		
pCN51pCN38	Vecteur à faible nombre de copies (Amp ^r dans <i>E coli</i> et Em ^r dans <i>S. aureus</i>)	Charpentier et al. 2004
pCN38-sprD	pCN38 avec le gène SprD sous le contrôle de son promoteur endogène	Cette étude
pBT2	Vecteur à faible nombre de copies (Amp ^r dans <i>E coli</i> et répllication thermo-sensible et Cm ^r dans <i>S. aureus</i>)	(Brückner, 1997, <i>FEMS Microbiol Lett.</i> 151: 1-8)
pBT2ΔsprD	pBT2 avec une cassette d'expression du	Cette étude

gène de résistance à l'érythromycine cloné
entre une région de 1000 pb en amont du
gène *sprD* et une région de 800 pb en aval
du gène *sprD*

Tableau 1

I.2 Isolation de l'ARN et Northern blots

Les ARN totaux ont été préparés à partir des phases de croissance exponentielle (DO600 = 2,0) ou stationnaire (DO600 = 5,0) de diverses souches de *S. aureus* comme décrit dans Oh et So (2003). Pour l'ARN 5S et d'autres ARN, des Northern blots ont été effectués avec 5 µg d'ARN totaux dénaturés et purifiés sur gel PAGE 8 % dénaturant, comme décrit dans Pichon et Felden (2005).

*I.3 Étude de la délétion du gène *sprD**

La virulence de la souche *S. aureus* N315 (agr-), de la souche *S. aureus* N315 (agr-) délétée du gène *sprD* et de la souche *S. aureus* N315 (agr-) délétée du gène *sprD* complémentée ont été analysées en utilisant un modèle murin de septicémie intraveineuse.

Des lots de 10 souris suisses femelles âgées de 6 à 8 semaines (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) ont été inoculés avec 300 µL d'une suspension bactérienne contenant 10⁹ cellules de *S. aureus* dans 0,9 % de NaCl. Les souris ont été infectées avec la souche *S. aureus* N315 (agr-), avec la souche *S. aureus* N315 (agr-) délétée du gène *sprD* ou avec la souche *S. aureus* N315 (agr-) délétée du gène *sprD* complémentée. D'autres souris ont été infectées avec la souche *S. aureus* RN1 (agr+) ou avec la souche *S. aureus* RN1 (agr+) délétée du gène *sprD*. La survie des souris infectées a été analysée pendant 21 jours, et la significativité des différences entre les différents groupes infectés a été analysée par le test U de Mann-Withney. Une différence est considérée comme significative lorsque la valeur P est inférieure à 0,05.

Trois autres groupes de 5 souris ont été infectées avec 5 x 10⁹ bactéries. Un groupe de souris a été infecté avec la souche *S. aureus* N315 (agr-), le deuxième groupe de souris a été infecté avec la souche *S. aureus* N315 (agr-) délétée du gène *sprD* et le dernier groupe de souris a été infecté avec la souche *S. aureus* N315 (agr-) délétée du gène *sprD* complémentée. Six jours après inoculation, les souris ont été sacrifiées et leurs reins prélevés. Les organes prélevés ont été ensuite homogénéisés, dilués dans une solution de 0,9 % NaCl et étalés sur un milieu agar sand 5 % pour le comptage bactérien.

II. Résultats

SprD est impliqué dans la virulence des souches bactériennes S.aureus

Pour étudier la fonction de *sprD* chez les bactéries *S. aureus* N315 (*agr*⁻) et RN1 (*agr*⁺), le gène *sprD* a été substitué, par recombinaison homologue, par une cassette d'expression comprenant un gène de résistance à l'érythromycine. Dans les souches mutantes ainsi obtenues (Δ en Fig. 1B), aucun transcrit *SprD* n'a pu être détecté par Northern Blot. L'expression de *SprD* est rétablie dans la souche mutante *S. aureus* N315 (*agr*⁻) délétée par complémentation avec un plasmide capable d'exprimer *SprD* sous le contrôle de son promoteur endogène (Δ + *SprD* en Fig. 1B).

Des souris ont été infectées avec (Fig. 2A et 2B) :

- 10 – la souche *S. aureus* N315 (*agr*⁻) (WT),
- la souche *S. aureus* N315 (*agr*⁻) délétée du gène *SprD* (Δ),
- la souche *S. aureus* N315 (*agr*⁻) délétée du gène *SprD* complémentée (Δ + *SprD*),
- la souche *S. aureus* RN1 (*agr*⁺) (WT),
- 15 – la souche *S. aureus* RN1 (*agr*⁺) délétée du gène *SprD* (Δ).

La survie des souris a été étudiée. Les résultats obtenus montrent que les souris inoculées avec la souche *S. aureus* N315 (*agr*⁻) délétée du gène *SprD* sont tous vivants au 21^{ème} jour post-infection (Δ en Fig. 2A et 2B) alors que les animaux inoculés avec la souche *S. aureus* N315 (*agr*⁻) (WT en Fig. 2A) sont toutes mortes 16 jours après infection. Ainsi, il semble qu'en absence de transcrit *sprD*, la virulence des bactéries est inhibée voire supprimée. Les résultats montrent également que pour les souris inoculées avec la souche *S. aureus* N315 (*agr*⁻) délétée du gène *SprD* complémentée, seulement la moitié des animaux survivent 21 jours après l'infection (Δ + *SprD* en Fig. 2A), indiquant que la virulence peut être rétablie la souche *S. aureus* N315 (*agr*⁻) délétée du gène *SprD* par transfection d'un vecteur plasmidique capable d'exprimer le gène *sprD*.

Les résultats obtenus montrent également que les souris inoculées avec la souche *S. aureus* RN1 (*agr*⁺) délétée du gène *SprD* (Δ en Fig. 2B) survivent plus longtemps à une infection par rapport à des souris inoculées avec la souche *S. aureus* RN1 (*agr*⁺) (WT en Fig. 2B). Les souris inoculées avec la souche *S. aureus* RN1 (*agr*⁺) (WT en Fig. 2B) sont toutes mortes 5 jours après infection tandis que les souris inoculées avec la souche *S. aureus* RN1 (*agr*⁺) délétée du gène *SprD* (Δ en Fig. 2B) sont toutes mortes 11 jours après infection. Ces résultats confirment donc qu'en absence de transcrit *sprD*, la virulence des bactéries est inhibée voire supprimée.

D'autres résultats expérimentaux viennent soutenir ces conclusions. Notamment après 6 jours d'infection, les reins des souris infectées ont été prélevés et un comptage bactérien sur ces

reins a été réalisé. Le comptage des bactéries viables dans les reins des animaux infectés montre qu'il y a moins de bactéries viables dans les reins prélevés chez des souris infectées avec la souche *S. aureus* N315 (agr-) délétée du gène sprD (Δ en Fig. 3), par rapport aux reins prélevés chez des souris infectées avec la souche *S. aureus* N315 (agr-) (WT en Fig. 3) ou chez des souris infectées avec la souche *S. aureus* N315 (agr-) délétée du gène sprD complémentée (Δ + SprD en Fig. 3).

Les inventeurs sont ainsi les premiers à avoir mis en évidence le rôle majeur d'un petit ARN non codant, SprD, dans la virulence de *S. aureus*.

Des expériences ont été réalisées afin d'étudier l'effet de l'expression d'un ARN antisens de SprD sur sa capacité à inhiber l'accumulation *in vivo* de l'ARN SprD, sa capacité à diminuer la virulence de différentes souches de *Staphylococcus* (RN1 et N315) et de déterminer la taille minimale de SprD capable d'inhiber la virulence ainsi que les séquences nécessaires et suffisantes des ARN antisens permettant d'observer une diminution au moins partielle du taux de transcrit SprD *in vivo*.

De manière classique, des plasmides exprimant de manière constitutive ou induite un ARN antisens entier ou tronqué de séquences nucléotidiques plus ou moins étendues sont construits par des techniques connues de l'Homme du métier. Des bactéries hôtes de *Staphylococcus* sont ensuite transformées avec chacune des constructions plasmidiques obtenues. Les bactéries transformées sont sélectionnées et leur capacité à inhiber l'accumulation *in vivo* de l'ARN SprD, sera vérifiée par Northern blots ainsi que sa capacité à diminuer virulence est testée tel que décrit précédemment.

Des lots de souris suisses femelles âgées de 6 à 8 semaines (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) sont inoculés avec 300 μ L d'une suspension bactérienne contenant 10^9 cellules de *S. aureus* dans 0,9 % de NaCl. Les souris sont infectées avec une souche *S. aureus* exprimant l'ARN antisens sprD entier, ou une souche *S. aureus* exprimant l'ARN antisens sprD délété d'un ou plusieurs domaines nucléotidiques ou une souche *S. aureus* exprimant l'ARN antisens sprD entier ou délété d'un ou plusieurs domaines nucléotidiques complémentée. La survie des souris infectées est analysée pendant 21 jours, et la significativité des différences entre les différents groupes infectés a été analysée par le test U de Mann-Whitney. Une différence est considérée comme significative lorsque la valeur P est inférieure à 0,05.

D'autres groupes de souris ont été infectés avec 5×10^9 bactéries. Un groupe de souris a été infecté avec la souche *S. aureus* exprimant l'ARN antisens sprD entier, d'autres groupes de souris ont été infectés avec des souches *S. aureus* exprimant l'ARN antisens sprD délété d'un ou plusieurs domaines nucléotidiques et d'autres groupes de souris ont été infectés avec des souches *S. aureus* exprimant l'ARN antisens sprD entier ou délété d'un ou plusieurs domaines

nucléotidiques complémentées. Six jours après inoculation, les souris ont été sacrifiées et leurs reins prélevés. Les organes prélevés ont été ensuite homogénéisés, dilués dans une solution de 0,9 % NaCl et étalés sur un milieu agar sand 5 % pour le comptage bactérien.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Beaucage SL. 2008, Solid-phase synthesis of siRNA oligonucleotides, *Curr Opin Drug Discov Devel.* **11**:203-216
- Brückner R. 1997 Gene replacement in *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus xylosus*, FEMS Microbiol Lett. 1997 Jun 1;151(1):1-8.
- Charpentier, E., Anton, A.I., Barry, P., Alfonso, B., Fang, Y., and Novick, R.P. 2004. Novel cassette-based shuttle vector system for gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 6076-6085.
- Kreiswirth, B.N., Lofdahl, S., Betley, M.J., O'Reilly, M., Schlievert, P.M., Bergdoll, M.S., and Novick, R.P. 1983. The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. *Nature* **305**: 709–712.
- Lowy FD. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* **339**: 520-532.
- Milligan JF, Uhlenbeck OC. 1989, Synthesis of small RNAs using T7 RNA polymerase. *Methods Enzymol.* 180:51-62.
- Moks, T., Abrahmsen, L., Nilsson, B., Hellman, U., Sjoquist, J., and Uhlen, M. 1986. Staphylococcal protein A consists of five IgG-binding domains. *Eur. J. Biochem.* **156**: 637-643.
- Nicholas H. Mann, 2008 The potential of phages to prevent MRSA infections, *Research in Microbiology*
- 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. USA.* **102**: 14249-14254
- Sherlin LD, Bullock TL, Nissan TA, Perona JJ, Lariviere FJ, Uhlenbeck OC, 2001 Scaringe SA. Chemical and enzymatic synthesis of tRNAs for high-throughput crystallization. *RNA.* **7**:1671-1678
- Zhang, L., Jacobsson, K., Vasi, J., Lindberg, M., and Frykberg L. 1998. A second IgG-binding protein in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* **145**: 985–991.

REVENDICATIONS

1. Polynucléotide isolé dont la séquence consiste en une séquence choisie dans le groupe consistant en :

5 - la séquence SEQ ID N°4, les séquences dérivées ayant au moins 90 % d'identité avec la séquence SEQ ID N°4 et les fragments d'au moins 25 nucléotides de la séquence SEQ ID N°4 ; et

- les séquences d'ADN correspondantes ;

lesdites séquences dérivées et lesdits fragments ayant la capacité de s'hybrider
10 spécifiquement avec la séquence SEQ ID N°2.

2. Utilisation *in vitro* ou *ex vivo* d'un polynucléotide isolé en tant qu'agent inhibiteur de l'accumulation des transcrits *sprD* et/ou de la transcription du gène *sprD*, ledit polynucléotide isolé ayant une séquence comprenant ou consistant en une séquence choisie dans le groupe
15 consistant en :

a) la séquence SEQ ID N°4, les séquences dérivées ayant au moins 90 % d'identité avec la séquence SEQ ID N°4 et les fragments d'au moins 10 nucléotides de celles-ci ; et

b) les séquences d'ADN correspondantes ;

lesdites séquences dérivées et lesdits fragments ayant la capacité de s'hybrider
20 spécifiquement avec la séquence SEQ ID N°2.

3. Polynucléotide isolé caractérisé en ce qu'il comprend à ses extrémités 5' et 3' respectivement les séquences nucléotidiques SEQ ID N°6 et SEQ ID N°7, ledit polynucléotide ayant une longueur inférieure à 10 000 nucléotides.

25

4. Cassette d'expression comprenant une séquence d'ADN telle que définie selon la revendication 1.

5. Vecteur recombinant comprenant un polynucléotide isolé tel que défini selon l'une
30 des revendications 1 ou 3 ou une cassette d'expression selon la revendication 4.

6. Cellule hôte transformée par une cassette d'expression selon la revendication 4 ou un vecteur selon la revendication 5.

5 7. Composition pharmaceutique comprenant un vecteur pharmaceutiquement acceptable et au moins un composant choisi dans le groupe consistant en un polynucléotide isolé selon l'une des revendications 1 ou 3, une cassette d'expression selon la revendication 4, un vecteur selon la revendication 5 et une cellule hôte selon la revendication 6.

10 8. Composition pharmaceutique pour son utilisation pour la prévention et/ou le traitement d'une infection staphylococcique, ladite composition comprenant un vecteur pharmaceutiquement acceptable et au moins un composant choisi dans le groupe consistant en :

- un polynucléotide isolé tel que défini selon l'une des revendications 2 ou 3 ;
- une cassette d'expression comprenant une séquence d'ADN telle que définie selon la revendication 2 ;
- 15 - un vecteur recombinant comprenant ledit polynucléotide isolé ou ladite cassette d'expression ; et
- une cellule hôte transformée par ladite cassette d'expression ou ledit vecteur.

20 9. Procédé d'obtention d'une souche bactérienne non virulente ou dont la virulence est diminuée, ladite souche appartenant au genre *Staphylococcus*, ledit procédé comprenant une étape de délétion totale ou partielle du gène *sprD* dans le génome d'une souche bactérienne du genre *Staphylococcus*.

25 10. Procédé pour la sélection ou l'identification *in vitro* ou *ex vivo* de composés pour la prévention et/ou le traitement d'une infection staphylococcique, comprenant les étapes suivantes ;

- a) l'introduction ou la mise en contact d'un composé test dans ou avec une souche bactérienne exprimant le gène *sprD* ou avec des transcrits *sprD* ;
- b) la détermination de la capacité du composé test à complexer, en particulier à
30 s'hybrider, avec les transcrits *sprD* ; et/ou

c) la détermination de la capacité du composé test à inhiber la transcription du gène *sprD*.

11. Procédé pour la sélection ou l'identification *in vitro* ou *ex vivo* de composés capables
5 d'inhiber l'accumulation des transcrits *sprD* et/ou la transcription du gène *sprD*, comprenant les étapes suivantes ;

i) l'introduction ou la mise en contact d'un composé test dans ou avec une souche bactérienne exprimant le gène *sprD* ou avec des transcrits *sprD* ;

ii) la détermination de la capacité du composé test à complexer, en particulier à
10 s'hybrider, avec les transcrits *sprD* ; et/ou

iii) la détermination de la capacité du composé test à inhiber la transcription du gène *sprD*.

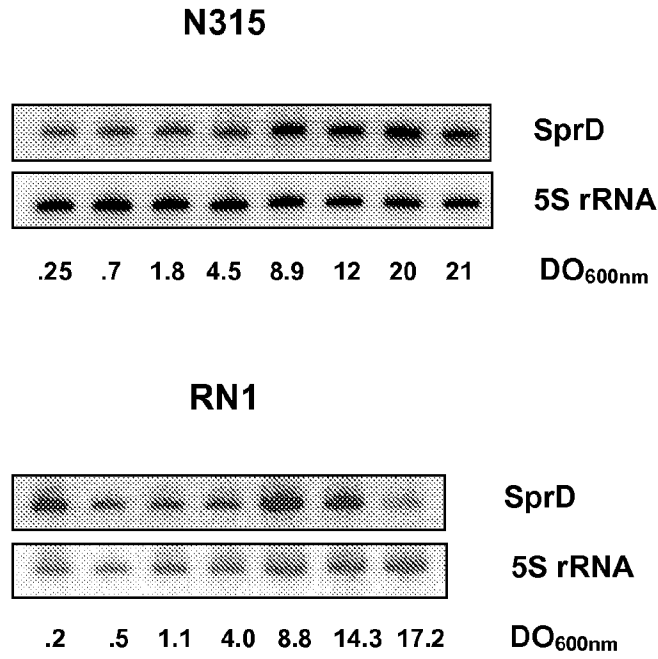


Figure 1A

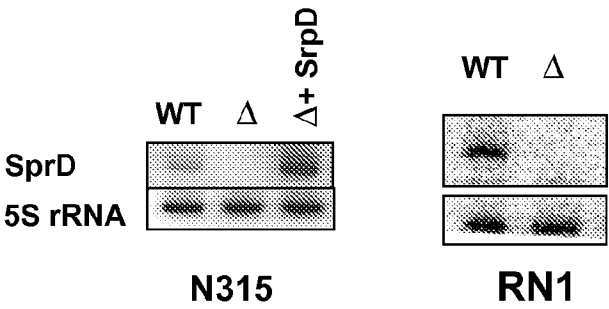


Figure 1B

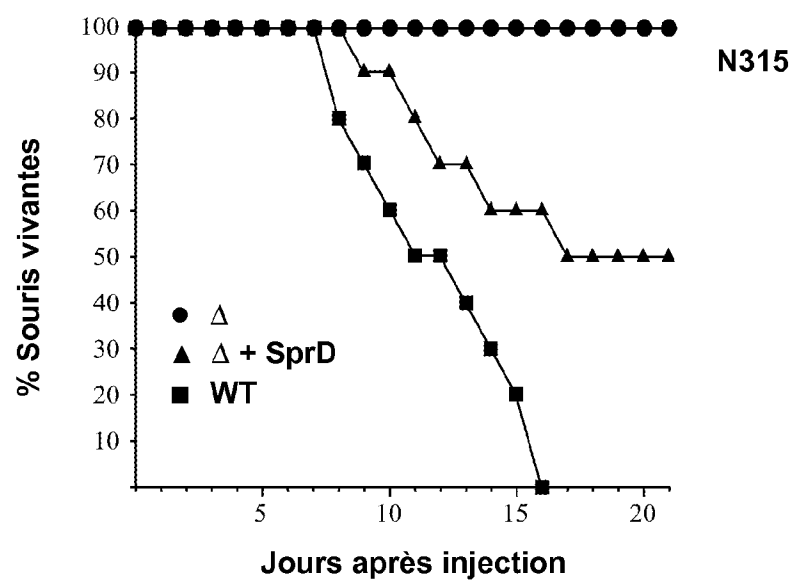


Figure 2A

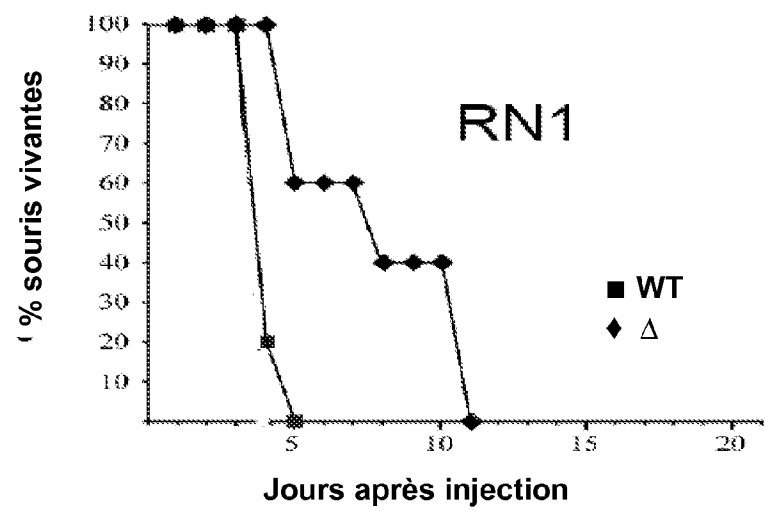


Figure 2B

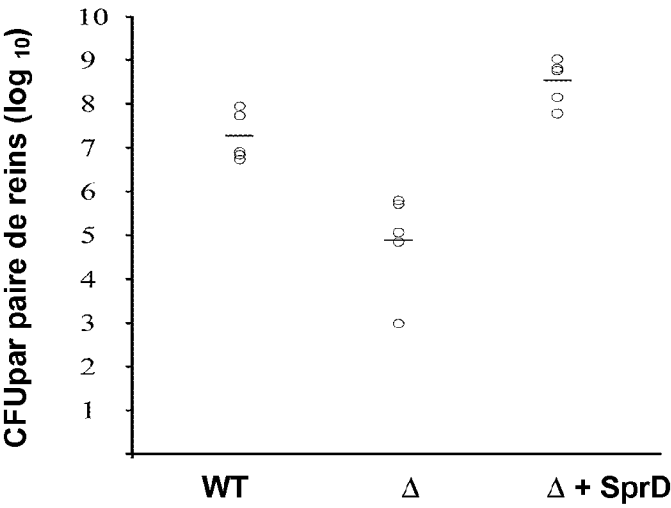


Figure 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/056052

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N15/113 A61K31/7088 C07K14/31
ADD. A61P31/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EP0-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/014857 A2 (WYETH [US]; MOUNTS WILLIAM MARTIN; WHITLEY MARYANN ZINNI; MURPHY ELLEN) 17 February 2005 (2005-02-17) sequences 6817, 14669	1,7
X	-& DATABASE EMBL [Online] 26 May 2009 (2009-05-26), Mounts W.M. et al.: "Nucleic acid arrays for detecting multiple strains of non-viral species", XP002643451, Database accession no. HA180999 the whole document -/--	1

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 June 2011

Date of mailing of the international search report

01/07/2011

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Macchia, Giovanni

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/056052

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	-& DATABASE EMBL [Online] 26 May 2009 (2009-05-26), Mounts W.M. et al.: "Nucleic acid arrays for detecting multiple strains of non-viral species", XP002643452, Database accession no. HA164052 the whole document	1
X,P	----- CHABELSKAYA SVETLANA ET AL.: "A Staphylococcus aureus small RNA is required for bacterial virulence and regulates the expression of an immune-evasion molecule", PLOS PATHOGENS, vol. 6, no. 6, E1000927, June 2010 (2010-06), pages 1-11, XP002616232, the whole document	3,5-7
X,P	-& CHABELSKAYA SVETLANA ET AL.: "Supporting Information:A Staphylococcus aureus Small RNA Is Required for Bacterial Virulence and Regulates the Expression of an Immune-Evasion Molecule", , June 2010 (2010-06), XP002620114, PLOSPATHOGENS Retrieved from the Internet: URL:http://www.plospathogens.org/article/i nfo%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.1000927 > the whole document	3,5-7
A	----- WO 2010/020694 A1 (UNIVERSITE DE RENNES I [FR]; INSERM [FR]) 25 February 2010 (2010-02-25) the whole document	1,2
A	----- PICHON CHRISTOPHE ET AL.: "Small RNA genes expressed from Staphylococcus aureus genomic and pathogenicity islands with specific expression among pathogenic strains", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 102, no. 40, October 2005 (2005-10), pages 14249-14254, XP002616228, ISSN: 0027-8424 the whole document	1,2
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/056052

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	-& "Supporting Information", 23 September 2005 (2005-09-23), XP002616229, Retrieved from the Internet: URL:http://www.pnas.org/content/102/40/142 49/suppl/DC1> [retrieved on 2011-01-11] page 3/3	1,2
A	-& PICHON CHRISTOPHE ET AL.: "Small RNA genes expressed from Staphylococcus aureus genomic and pathogenicity islands with specific expression among pathogenic strains (vol 102, pg 14249, 2005)", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 102, no. 46, November 2005 (2005-11), page 16905, XP002616230, ISSN: 0027-8424 the whole document	1,2
A	----- DATABASE EMBL [Online] 21 December 2007 (2007-12-21), Aoki K., Oguchi A., Hosoyama A., Nagai Y., Kuroda M., Hiramatsu K., Kikuchi H.: "Staphylococcus aureus subsp. aureus N315 DNA, complete genome", XP002616231, Database accession no. BA000018 nt.2006210 - 2008188 -----	3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/056052

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005014857 A2	17-02-2005	AU 2004263824 A1	17-02-2005
		CA 2528025 A1	17-02-2005
		EP 1629124 A2	01-03-2006
		NZ 543855 A	30-04-2008

WO 2010020694 A1	25-02-2010	FR 2935146 A1	26-02-2010

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2011/056052

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

INV. C12N15/113 A61K31/7088 C07K14/31
ADD. A61P31/04

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

C12N A61K C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 2005/014857 A2 (WYETH [US]; MOUNTS WILLIAM MARTIN; WHITLEY MARYANN ZINNI; MURPHY ELLEN) 17 février 2005 (2005-02-17) séquences 6817, 14669	1,7
X	-& DATABASE EMBL [Online] 26 mai 2009 (2009-05-26), Mounts W.M. et al.: "Nucleic acid arrays for detecting multiple strains of non-viral species", XP002643451, Database accession no. HA180999 le document en entier -/--	1

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

21 juin 2011

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

01/07/2011

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Macchia, Giovanni

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2011/056052

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	-& DATABASE EMBL [Online] 26 mai 2009 (2009-05-26), Mounts W.M. et al.: "Nucleic acid arrays for detecting multiple strains of non-viral species", XP002643452, Database accession no. HA164052 le document en entier	1
X,P	----- CHABELSKAYA SVETLANA ET AL.: "A Staphylococcus aureus small RNA is required for bacterial virulence and regulates the expression of an immune-evasion molecule", PLOS PATHOGENS, vol. 6, no. 6, E1000927, juin 2010 (2010-06), pages 1-11, XP002616232, le document en entier	3,5-7
X,P	-& CHABELSKAYA SVETLANA ET AL.: "Supporting Information:A Staphylococcus aureus Small RNA Is Required for Bacterial Virulence and Regulates the Expression of an Immune-Evasion Molecule", juin 2010 (2010-06), XP002620114, PLOSPATHOGENS Extrait de l'Internet: URL:http://www.plospathogens.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.1000927 > le document en entier	3,5-7
A	----- WO 2010/020694 A1 (UNIVERSITE DE RENNES I [FR]; INSERM [FR]) 25 février 2010 (2010-02-25) le document en entier	1,2
A	----- PICHON CHRISTOPHE ET AL.: "Small RNA genes expressed from Staphylococcus aureus genomic and pathogenicity islands with specific expression among pathogenic strains", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 102, no. 40, octobre 2005 (2005-10), pages 14249-14254, XP002616228, ISSN: 0027-8424 le document en entier -/--	1,2

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2011/056052

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	-& "Supporting Information", 23 septembre 2005 (2005-09-23), XP002616229, Extrait de l'Internet: URL:http://www.pnas.org/content/102/40/142 49/suppl/DC1> [extrait le 2011-01-11] page 3/3	1,2
A	-& PICHON CHRISTOPHE ET AL.: "Small RNA genes expressed from Staphylococcus aureus genomic and pathogenicity islands with specific expression among pathogenic strains (vol 102, pg 14249, 2005)", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 102, no. 46, novembre 2005 (2005-11), page 16905, XP002616230, ISSN: 0027-8424 le document en entier -----	1,2
A	DATABASE EMBL [Online] 21 décembre 2007 (2007-12-21), Aoki K., Oguchi A., Hosoyama A., Nagai Y., Kuroda M., Hiramatsu K., Kikuchi H.: "Staphylococcus aureus subsp. aureus N315 DNA, complete genome", XP002616231, Database accession no. BA000018 nt.2006210 - 2008188 -----	3

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2011/056052

Cadre N° I Séquence(s) de nucléotides ou d'acides aminés (suite du point 1.c de la première feuille)

1. En ce qui concerne la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande internationale, le cas échéant, la recherche internationale a été effectuée sur la base des éléments suivants:
 - a. (support)
☐ sur papier
☒ sous forme électronique
 - b. (moment)
☒ dans la demande internationale telle que déposée
☐ avec la demande internationale, sous forme électronique
☐ ultérieurement à la présente administration aux fins de la recherche
2. ☐ De plus, lorsque plus d'une version ou d'une copie d'un listage des séquences ou d'un ou plusieurs tableaux y relatifs a été déposée, la déclarations requises selon lesquelles les informations fournies ultérieurement ou au titre de copies supplémentaires sont identiques à celles initialement fournies et ne vont pas au-delà de la divulgation faite dans la demande internationale telle que déposée initialement, selon le cas, ont été remises.
3. Commentaire complémentaires:

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2011/056052

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2005014857 A2	17-02-2005	AU 2004263824 A1	17-02-2005
		CA 2528025 A1	17-02-2005
		EP 1629124 A2	01-03-2006
		NZ 543855 A	30-04-2008

WO 2010020694 A1	25-02-2010	FR 2935146 A1	26-02-2010
