



HAL
open science

Identification et caractérisation fonctionnelle et structurale du système toxine-antitoxine HicA3-HicB3 de *Yersinia pestis*

Sabrina Bibi-Triki

► **To cite this version:**

Sabrina Bibi-Triki. Identification et caractérisation fonctionnelle et structurale du système toxine-antitoxine HicA3-HicB3 de *Yersinia pestis*. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2014. Français. NNT : 2014LIL2S039 . tel-01127407

HAL Id: tel-01127407

<https://theses.hal.science/tel-01127407>

Submitted on 7 Mar 2015

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

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

UNIVERSITE DE LILLE 2 DROIT ET SANTE

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE

THESE DE DOCTORAT

**Identification et caractérisation fonctionnelle et
structurale du système toxine-antitoxine
HicA3-HicB3 de *Yersinia pestis***

Présentée et soutenue publiquement par

Sabrina BIBI-TRIKI

Le 16 octobre 2014, devant le jury composé de :

Pr El Moukhtar ALIOUAT

Pr Laurence VAN MELDEREN

Dr Philippe DELEPELAIRE

Dr Françoise JACOB-DUBUISSON

Dr Laurent DEBARBIEUX

Pr Michel SIMONET

Dr Elizabeth PRADEL

Président

Rapportrice

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Directeur de thèse

Tutrice de thèse

Remerciements

Mes remerciements s'adressent en premier lieu aux membres du jury qui me font l'honneur d'évaluer ce travail de thèse. A Laurence Van Melderen et Philippe Delepelaire qui ont accepté d'en être les rapporteurs et à Françoise Jacob-Dubuisson et Laurent Debarbieux pour leur implication en tant qu'examineurs. Françoise, je te remercie aussi de m'avoir conseillée et d'avoir participé à mes comités de suivi de thèse. Je remercie également El Moukhtar Aliouat qui a accepté de présider ce jury.

Je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements à Elizabeth Pradel, qui a dirigé ce travail depuis mon arrivée en Master. Je vous suis très reconnaissante de m'avoir guidée tout au long de cette longue expérience qu'est la thèse, d'avoir toujours été très disponible, de m'avoir conseillée, soutenue et pour m'avoir fait confiance. Un grand merci également pour tout le temps que vous avez consacré à la correction de ce manuscrit. Tout ce que vous m'avez apporté pendant ces quatre années m'ont permis d'avancer, tant sur le plan scientifique que personnel.

J'adresse toute ma gratitude à Michel Simonet qui a accepté d'être mon directeur de thèse. Je vous remercie de votre soutien et de m'avoir permis de suivre la formation de microbiologie cellulaire qui a été très enrichissante.

Mes remerciements vont également à Florent Sebbane qui m'a accueillie au sein de son équipe et m'a permis d'y effectuer mes travaux de thèse. Je vous remercie d'avoir contribué à ce travail, d'avoir partagé votre expérience et de m'avoir encouragée et conseillée.

J'adresse aussi mes remerciements à Nadine Lemaître, Marie Titecat et Michael Marceau pour m'avoir écouté et conseillé lors de mes réunions de laboratoire. Michael, je te remercie aussi pour ton aide précieuse dans le domaine de la bioinformatique.

A mes supers collègues qui m'ont supporté au quotidien : Amélie Brodel-Dewitte, ta zenitude, ta bonne humeur et ton grain de folie font de toi la Best Collègue Ever. Angéline Reboul, merci beaucoup de m'avoir aidée, écoutée, conseillée et aussi parfois réconfortée. François Pierre, je te dois certainement mes plus gros fous rires au laboratoire, merci pour les bons moments que nous avons passé. Isabelle Ricard, dite Zaza-Gyver, véritable maman au sein de ce laboratoire, « un grand merci à toi » pour tout ce que tu as fait au quotidien. Kevin Quintard, merci pour les bons moments que nous avons passé ensemble et les discussions que nous avons partagés. Maud Merchez, grâce à toi ces quelques années ont été au top. Complice de tous mes délires, nos séances people ou de shoppeuse addict vont me manquer. Nadia Bennaceur, ma voisine de bureau depuis quelques mois, je suis très heureuse d'avoir pu mieux te connaître.

Mes remerciements s'adressent aussi aux membres de l'équipe BLIM et notamment à Benoît Foligné, Colline Ple, Joëlle Dewulf et Jérôme Breton, grâce à qui l'ambiance au déjeuner a toujours été au rendez-vous. Les plaisanteries de Benoît, nos discussions sur l'actualité, le ciné et la vie au labo vont me manquer !

Un grand merci à l'équipe « Locht » pour tous les services que vous m'avez rendus. Je pense vous devoir une bonne centaine de fûts de bière ! Merci Domi pour les nombreux conseils de manips que tu m'as apporté et Marco pour ta bonne humeur. Un énorme merci aussi à Elian, pour toute l'aide que tu m'as apportée (et la liste est longue !).

Je remercie également Arnaud Leroy qui m'a initié aux joies de la biophysique ! Je te remercie pour les manips que tu as réalisés et qui nous ont permis d'avancer grandement dans notre travail et pour ta vision du projet et pour ta pédagogie.

Je remercie aussi l'équipe Fonction et Architecture des Assemblages MacroMoléculaires de m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire d'Orsay et de m'avoir fait découvrir le monde de la cristallographie.

Je souhaite également remercier mes amis de toujours, Amina, Céline, Estelle, Maxime et Mélissa. Un grand merci pour votre aide, vos encouragements et pour toutes les heures passées au téléphone et les soirées mémorables passées ensemble. Je suis très chanceuse de vous avoir à mes côtés.

Je souhaite aussi exprimer toute mon affection et ma gratitude à ma famille et en particulier à ma mère et à ma tante Fouzia à qui je dédie cette thèse. Sans votre soutien et vos encouragements, je n'en serai pas là aujourd'hui. Je vous remercie tous très chaleureusement, sans oublier ma fidèle Jessie.

Enfin, merci à toi Yohan pour les merveilleux moments que nous avons passés ensemble. Toujours très patient et compréhensif, un soutien à toute épreuve, je te remercie pour tout ce que tu m'as apporté ces deux dernières années.

A tous, Merci !

Sommaire

<u>Lexique</u>	4
<u>Liste des figures et tableaux</u>	6
<u>Introduction</u>	8
1^{ère} partie. Les systèmes toxine-antitoxine	8
I. Classification des STA	9
A. STA de type I	9
B. STA de type II	9
C. STA de type III	10
D. STA de type IV	11
E. STA de type V	12
F. STA de type VI	12
II. Propriétés des STA de type II	13
III. Les toxines des STA de type II	14
A. Les toxines ciblant la réplication	14
B. Les toxines ciblant la traduction	15
1. Une majorité d'ARNases	16
2. Quelques toxines inhibitrices de la machinerie de traduction	18
C. Les toxines ciblant la division cellulaire	19
D. Structure des toxines	19
1. La famille structurale RelE	20
2. La famille structurale MazF	20
3. La famille structurale VapC	22
4. La famille structurale Doc	22
5. La famille structurale Zeta	23
6. La famille structurale HipA	23
IV. Les antitoxines des STA de type II	24
A. La neutralisation de la toxine	24
1. Domaine de neutralisation non structuré	24
2. Domaine de neutralisation structuré	26
B. La fixation à l'ADN	27
1. Les quatre types de domaines de fixation à l'ADN	27
2. La régulation coopérative conditionnelle	31

3. Les antitoxines sans domaine régulateur.....	34
V. Rôle des STA	34
A. STA et stabilisation d'éléments génétiques mobiles	35
B. STA et adaptation à l'environnement.....	36
1. Voies d'activation des STA.....	37
2. Phénotypes induits par l'activation des STA.....	38
2^{ème} partie. <i>Yersinia pestis</i>, l'agent étiologique de la peste	45
I. Les pandémies historiques et la situation actuelle de la peste.....	45
II. L'agent pathogène <i>Yersinia pestis</i>	46
III. Hôtes et vecteurs de la maladie.....	47
IV. Les différentes pathologies de peste	48
V. Virulence	48
A. Phase intracellulaire	48
1. Survie dans les macrophages.....	49
2. Survie dans les neutrophiles.....	49
B. Phase extracellulaire	50
1. Dissémination tissulaire	50
2. Inhibition de la phagocytose et de la réponse inflammatoire.....	51
3. Résistance au complément.....	52
4. Résistance aux composés antimicrobiens.....	53
5. Systèmes d'acquisition du fer.....	53
3^{ème} partie. Objectifs de la thèse.....	55
<u>Résultats publiés</u>.....	56
Functional and structural analysis of HicA3-HicB3, a novel toxin-antitoxin system of <i>Yersinia pestis</i>	56
<u>Résultats complémentaires</u>.....	90
I. Régulation du promoteur <i>PhicA3</i>	90
A. Un excès de HicA3-H28A déréprime <i>PhicA3</i>	90
B. L'activité de <i>PhicA3</i> dépend de la température de croissance.....	90
C. La surproduction de la protéase Lon déréprime <i>PhicA3</i>	91
D. La conformation de HicB3 est différente à 20°C et à 37°C.....	92
II. STA et phylogénie de <i>Y. pestis</i>	93

<u>Discussion et perspectives</u>	99
I. <i>hicA3</i> et <i>hicB3</i> forment un opéron.....	99
II. Régulation de l'opéron <i>hicA3-hicB3</i>	99
A. HicB3, un répresseur thermosensible ?.....	100
B. HicA3	100
1. Un corépresseur ?.....	100
2. HicA3 comme antirépresseur ?	102
III. La toxine HicA3.....	104
A. HicA3 est une ARNase	104
B. Le site catalytique de HicA3	104
C. HicA3 adopte un repliement comparable à celui d'un domaine de fixation à l'ARN double brin.....	106
IV. Rôle physiologique du STA HicA3-HicB3	109
<u>Références bibliographiques</u>	111

Lexique

aa = <u>a</u> cide <u>a</u> miné	Hig = <u>h</u> ost <u>i</u> nhibition of <u>g</u> rowth
Abi = <u>a</u> bortive <u>i</u> nfection <u>s</u> ystem	Hip = <u>h</u> igh <u>p</u> ersistence
Ail = <u>a</u> ttachment- <u>i</u> nvasion <u>l</u> ocus	Hms = <u>h</u> aem <u>i</u> n <u>s</u> torage
ApoB = <u>a</u> polipoprotéine B	HTH = <u>h</u> élice- <u>t</u> our- <u>h</u> élice
ARNase = ribonucléase	ICE = <u>i</u> ntegrative and <u>c</u> onjugative <u>e</u> lement
ARNdb = <u>A</u> RN <u>d</u> ouble <u>b</u> rin	IS = <u>i</u> nsertion <u>s</u> equ <u>e</u> nce
ARNm = <u>A</u> RN <u>m</u> essenger	kb = <u>k</u> ilo <u>b</u> ases
ARNnc = <u>A</u> RN <u>n</u> on <u>c</u> odant	kDa = <u>k</u> ilo <u>d</u> alton <u>s</u>
ARNr = <u>A</u> RN <u>r</u> ibosomal	LDL = <u>l</u> ow <u>d</u> ensity <u>l</u> ipoprotein
ARNsb = <u>A</u> RN <u>s</u> imple <u>b</u> rin	LOS = <u>l</u> ipooligosaccharide
ARNt = <u>A</u> RN de <u>t</u> ransfert	LPS = <u>l</u> ipopolysaccharide
ARNtm = <u>A</u> RN <u>t</u> ransfert- <u>m</u> essenger	MazF = « qu'est ce que c'est » en hébreux
aSD = <u>a</u> nti <u>S</u> hine- <u>D</u> algarno	Mb = <u>m</u> éga <u>b</u> ase
ATP = <u>a</u> dénosine <u>t</u> riphosphate	MCP = <u>m</u> ort <u>c</u> ellulaire <u>p</u> rogrammée
BpsHicA = toxine HicA de <i>Burkholderia pseudomallei</i>	Mos = <u>m</u> aintenance of <u>S</u> X <u>T</u>
CbeA = <u>c</u> ytoskeleton <u>b</u> undling- <u>e</u> nhancing factor A	NO = <u>o</u> xide <u>n</u> itrique
CbtA = <u>c</u> ytoskeletal <u>b</u> inding <u>t</u> oxin A	OMS = <u>O</u> rganisation <u>M</u> ondiale de la <u>S</u> anté
Ccd = <u>c</u> ontrol of <u>c</u> ell <u>d</u> eath	ORF = <u>o</u> pen <u>r</u> eading <u>f</u> rame, phase ouverte de lecture
DC = <u>d</u> ichroïsme <u>c</u> irculaire	ParDE = <u>p</u> art <u>i</u> nioning
DL50 = <u>d</u> ose <u>l</u> étale <u>50</u> ou médiane	pb = <u>p</u> aire de <u>b</u> ases
Doc = <u>d</u> eath <u>o</u> n <u>c</u> uring	PE/PPE = protéines comportants un motif Pro-Glu ou Pro-Pro-Glu
dsRBD = <u>d</u> ouble- <u>s</u> tranded <u>R</u> NA <u>b</u> inding <u>d</u> omain	Pez = <u>p</u> neumococcal <u>z</u> eta
EcHicA = toxine HicA d' <i>Escherichia coli</i>	Phd = <u>p</u> reventing <u>h</u> ost <u>d</u> eath
EDF = <u>e</u> xtracellular <u>d</u> eath <u>f</u> actor	ppGpp = <u>g</u> uanosine <u>t</u> étraphosphate
EF-Tu = <u>e</u> longation <u>f</u> actor <u>t</u> hermo <u>u</u> nstable	PIN = <u>p</u> IT- <u>N</u> terminal
Fic = <u>f</u> ilamentation <u>i</u> nduced by <u>c</u> AMP	Psa = <u>p</u> H <u>6</u> <u>a</u> ntigen
FiDo = famille de protéines Fic- <u>D</u> oc	RatA = <u>r</u> ibosome <u>a</u> ssociation <u>t</u> oxin A
GhoT = <u>g</u> host cells- <u>p</u> roducing <u>t</u> oxin	RHH = <u>r</u> uban- <u>h</u> élice- <u>h</u> élice
	sb = <u>s</u> imple <u>b</u> rin

SD = <u>S</u> hine- <u>D</u> algarno	Tc = <u>t</u> oxin <u>c</u> omplex
Soc = <u>s</u> uppressor of <u>C</u> lpXP	ToxI = <u>t</u> oxN <u>i</u> nhibitor
STA = <u>s</u> ystème <u>t</u> oxine- <u>a</u> ntitoxine	UTR = <u>u</u> n <u>t</u> ranslated <u>r</u> egion, région transcrite non traduite
SXT = <u>s</u> ulfamethoxazole – <u>t</u> rimethoprim resistance element	UNAG = <u>U</u> DP- <u>N</u> -acétylglycosamine
SymE = <u>S</u> OS-induced <u>y</u> jiW gene with similarity to <u>m</u> azE	Vap = <u>v</u> irulence <u>a</u> ssociated <u>p</u> rotein
SymR = <u>s</u> ymbiotic <u>R</u> NA	WB = <u>W</u> estern <u>B</u> lot
TA = <u>t</u> oxine- <u>a</u> ntitoxine	Ymt = <u>Y</u> ersinia <u>m</u> urin <u>t</u> oxin
TabA = <u>t</u> oxin- <u>a</u> ntitoxin <u>b</u> iofilm protein A	Yop = <u>Y</u> ersinia <u>o</u> uter <u>p</u> rotein

Abréviations utilisées pour les aa cités

A, Ala = <u>a</u> lanine	P, Pro = <u>p</u> roline
C, Cys = <u>c</u> ystéine	Q, Gln = <u>g</u> lutamine
D, Asp = acide <u>a</u> spartique	R, Arg = <u>a</u> rginine
E, Glu = acide <u>g</u> lutamique	S, Ser = <u>s</u> érine
F, Phe = <u>p</u> hénylalanine	T, Thr = <u>t</u> hréonine
G, Gly = <u>g</u> lycine	V, Val = <u>v</u> aline
H, His = <u>h</u> istidine	W, Trp = <u>t</u> ryptophane
K, Lys = <u>l</u> ysine	Y, Tyr = <u>t</u> yrosine
N, Asn = <u>a</u> sparagine	

Liste des figures et tableaux

Fig. 1. Mécanisme d'élimination post-ségrégationnelle par le STA CcdBA	8
Fig. 2. Schéma représentatif du STA SymER	9
Fig. 3. Schéma représentatif du STA RelEB	9
Fig. 4. Schéma représentatif du STA ToxNI.....	10
Fig. 5. Complexe hétéro-hexamérique ToxNI.	10
Fig. 6. Schéma représentatif du STA CbtA-CbeA.....	11
Fig. 7. Schéma représentatif du STA GhoTS.....	12
Fig. 8. Schéma représentatif du STA SocBA.	12
Tableau 1. Neuf familles de STA.....	13
Fig. 9. La toxine CcdB inhibe la réplication en bloquant l'ADN gyrase.	15
Fig. 10. Mécanismes d'inhibition de la traduction par les toxines.	15
Fig. 11. Le clivage des ARNm et de l'ARNr 16S par la toxine MazF conduit à la formation d'une machinerie alternative de traduction.	17
Fig. 12. L'ARNase RelE s'insère dans le site A du ribosome pour cliver les ARNm en cours de traduction	17
Fig. 13. La kinase HipA inhibe l'élongation de la traduction.....	19
Fig. 14. Mécanisme d'inhibition de la synthèse de peptidoglycane par la toxine PezT.	19
Fig. 15. Structures des toxines de la famille RelE et celles de l'ARNase Sa et de la Barnase.	20
Fig. 16. Structures de (A) CcdB complexé à un fragment de GyrA et (B) Kid lié à un fragment d'ARN....	21
Fig. 17. Structures des toxines de la famille MazF.....	21
Fig. 18. Structure de VapC5 de <i>M. tuberculosis</i>	22
Fig. 19. Structure de Doc du phage P1	22
Fig. 20. Structure de la toxine Zet avec son substrat UNAG	23
Fig. 21. Structure de la toxine HipA fixé à l'ADP.....	23
Fig. 22. Structures des complexes RelE-RelB, Doc-Phd et MazF-MazE.....	25
Fig. 23. La modification allostérique de la toxine CcdB par CcdA l'empêche d'inhiber la gyrase	26
Fig. 24. Structures des complexes MqsR-MqsA, HipA-HipB, Zeta-Epsilon et HigB-HigA.....	26
Fig. 25. Structure d'un domaine HTH lié à l'ADN.....	28
Fig. 26. Structure d'un domaine RHH lié à l'ADN.....	28
Fig. 27. Structure du tétramère NikR.....	29
Fig. 28. Structure du complexe FitB-FitA de <i>N. gonorrhoeae</i>	29
Fig. 29. Structure du domaine AbrB de l'antitoxine VapB2 de <i>R. felii</i>	30
Fig. 30. Structure de l'antitoxine Phd du phage P1 lié à la toxine Doc (non montrée).....	30
Fig. 31. Mécanisme de régulation coopérative conditionnelle de l'opéron <i>relBE</i>	32
Fig. 32. Mécanisme de régulation coopérative conditionnelle de l'opéron <i>ccdAB</i>	32
Fig. 33. Modèle de déstabilisation du complexe répresseur VapC-VapB par la toxine VapC en excès....	33
Fig. 34. (A) Structure de l'antitoxine dimérique MqsA fixée à l'ADN. (B) Modélisation de la structure du complexe MqsR-MqsA fixé à l'ADN montrant les encombrements stériques entre MqsR et l'ADN. (C) Structure du complexe MqsR-MqsA.....	34
Fig. 35. Rôle du ppGpp lors de la réponse stringente.....	37
Fig. 36. L'activation du STA MqsRA induit la persistance chez <i>E. coli</i>	42
Fig. 37. Le STA MqsRA influence la formation de biofilm chez <i>E. coli</i>	43
Fig. 38. La surproduction de HicA3-H28A entraîne la dérégulation du promoteur <i>PhicA3</i>	90
Fig. 39. Effet de la température sur l'activité du promoteur <i>PhicA3</i>	91
Fig. 40. La surproduction de la protéase Lon mais pas celle de ClpPX entraîne la dérégulation du promoteur <i>PhicA3</i>	91
Fig. 41. (A) Spectres DC de HicB3 à différentes températures. (B) Spectres DC de peptides modèles adoptant une structure en hélices α , en feuillets β ou en <i>random coil</i>	92
Fig. 42. Graphique représentant les valeurs d'ellipticités mesurées à 215 nm en fonction de la température.....	93
Fig. 43. Alignement des séquences protéiques de HicB1, HicB2 et HicB3.....	94
Fig. 44. Représentation schématique de l'apparition de certains STA chez les <i>Yersinia</i>	95

Fig. 45. Alignement des séquences protéiques de RelB1 et RelB2.....	95
Fig. 46. Alignement des séquences protéiques de HigB1, HigB2, HigB3, HigB4, HigB5.....	96
Fig. 47. Alignement des séquences protéiques de HigB5 et YERPE_3690 de <i>Y. pestis</i> avec SymE d' <i>E. coli</i> K-12.....	96
Fig. 48. Organisation génomique du locus chromosomique <i>higA5-yerpe_3690-higB5</i> de <i>Y. pestis</i>	96
Fig. 49. Alignement des séquences protéiques de (A) YERPE_3709 de <i>Y. pestis</i> et YafQ d' <i>E. coli</i> K-12 (B) YPO3628 de <i>Y. pestis</i> et DinJ d' <i>E. coli</i> K-12.....	97
Tableau 2. Tableau récapitulatif des STA codés sur le chromosome de <i>Y. pestis</i> CO92.	98
Fig. 50. Superposition d'un monomère HicB3 au domaine N-terminal de HicB3 lié à HicA3.	101
Fig. 51. Modèle de fixation des domaines RHH de Mnt sur l'opérateur du régulateur Arc et structure du domaine C-terminal responsable de la tétramérisation.....	101
Fig. 52. (A) Modèle de fixation du tétramère HicB3 sur l'opérateur du régulateur Arc. (B) Zooms sur les deux domaines RHH de HicB3.....	102
Fig. 53. Modèle de régulation de l'opéron <i>hicA3B3</i>	103
Fig. 54. Superposition des structures de HicA3, BpsHicA-H24A et TTHA1913.	105
Fig. 55. Structure de HicA3.....	106
Fig. 56. Structure du domaine dsRBD2 de XlrpA de <i>X. laevis</i> fixé sur l'ARNdb.....	107
Fig. 57. Structure de HicA3 complexée au domaine N-terminal de HicB3.....	107
Fig. 58. Alignement des séquences protéiques de plusieurs dsRBD.	108

Introduction

1^{ère} partie. Les systèmes toxine-antitoxine

Les systèmes toxine-antitoxine (STA) bactériens sont constitués d'une toxine intracellulaire stable dont l'activité est délétère pour la cellule qui la produit, et d'une antitoxine instable qui neutralise la toxine en interagissant directement avec elle. Pour convention, nous adopterons toujours l'ordre toxine-antitoxine lorsque nous citerons les protéines d'un système, même si l'ordre des gènes est inversé sur le chromosome, et nous utiliserons, le plus souvent dans les figures, la couleur rouge pour la toxine et le vert pour l'antitoxine.

Ogura et Hiraga ont décrit le premier STA, CcdB-CcdA, en 1983 (Ogura and Hiraga, 1983). Ce module de deux protéines cytoplasmiques est codé par l'opéron *ccdAB* (*control of cell death*) sur l'épisode F d'*Escherichia coli*. La toxine CcdB inhibe la réplication en empoisonnant l'ADN gyrase. L'antitoxine CcdA fixe CcdB et la neutralise. CcdA a aussi une activité autorégulatrice : elle réprime l'expression de l'opéron *ccdAB* (Bernard and Couturier, 1991; Salmon et al., 1994). Le STA CcdBA assure le maintien et la transmission de l'épisode F aux cellules filles lors de la division cellulaire, par un mécanisme appelé élimination post-ségrégationnelle (ou *post-segregational killing*) (Jaffé et al., 1985; Ogura and Hiraga, 1983) (Fig. 1). F est présent à une ou deux copies par cellule bactérienne (Lane, 1981). Lors de la division cellulaire, une bactérie qui n'hérite pas d'une copie de F perd les gènes *ccdAB*. L'antitoxine CcdA, encore présente dans le cytoplasme, est rapidement dégradée par la protéase cellulaire Lon. La toxine CcdB, plus stable, est libérée du complexe CcdB-CcdA, elle se fixe à l'ADN gyrase et inhibe la réplication de l'ADN, ce qui entraîne la mort de la cellule (Bernard and Couturier, 1992).

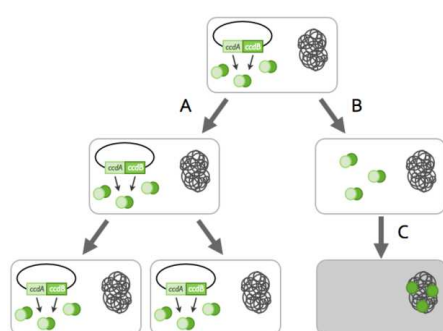


Fig. 1. Mécanisme d'élimination post-ségrégationnelle par le STA CcdBA. (A) La cellule fille ayant hérité du plasmide F portant *ccdAB* (symbolisé en vert) continue à se diviser normalement. (B) La cellule ayant perdu le plasmide ne peut plus produire d'antitoxine. L'antitoxine CcdA instable dont elle a hérité (vert clair) est dégradée par la protéase Lon, ce qui libère la toxine CcdB stable (vert foncé). (C) CcdB inhibe la réplication de l'ADN, ce qui conduit à la mort de la cellule (tiré de Goeders et Van Melderen 2014).

Les STA plasmidiques sont donc des systèmes de stabilisation des plasmides. Ils sont également nommés systèmes de dépendance (ou *addiction systems*) puisque la bactérie dépend de la présence des gènes TA pour survivre (Lehnherr and Yarmolinsky, 1995).

Par la suite, des opérons de STA ont été identifiés sur les chromosomes d'un très grand nombre de bactéries et d'archées (Aizenman et al., 1996; Gotfredsen and Gerdes, 1998; Grønlund and Gerdes, 1999; Masuda et al., 1993; Mittenhuber, 1999). Les STA se

différencient par la nature de l'antitoxine (ARN ou protéique), leur mode d'action et leur rôle physiologique, comme nous le verrons dans cette introduction (Van Melderen, 2010; Wen et al., 2014).

I. Classification des STA

Dans les systèmes identifiés jusqu'à présent, si la toxine est toujours de nature protéique, l'antitoxine peut être une protéine ou un ARN non codant (ARNnc). Six types de STA ont donc été définis en fonction de la nature de l'antitoxine et de son mode de neutralisation de la toxine.

A. STA de type I

Les antitoxines de type I sont de petits ARNnc (ARN non codants) de 50 à 200 nucléotides complémentaires de l'extrémité 5' ou 3' des ARNm codant les toxines. Les gènes de toxine et d'antitoxine de type I sont transcrits de manière divergente à partir de leur propre promoteur. Les ARNnc antitoxiques s'hybrident avec les ARNm des toxines et bloquent ainsi leur traduction ou entraînent leur dégradation.

A titre d'exemple, le gène d'antitoxine *symR* (*symbiotic RNA*) d'*E. coli* est en antisens de la région 5' UTR (*untranslated region*) du gène de toxine *symE* (Kawano et al., 2007) (Fig. 2). L'ARNnc SymR (77 nucléotides) séquestre la séquence Shine Dalgarno (SD) de l'ARNm *symE*, ce qui empêche sa traduction et donc la production de l'ARNase SymE. Autre exemple, dans le STA *bsrG-SR4* de *Bacillus subtilis*, l'ARNnc SR4 (180 nucléotides) est complémentaire de l'extrémité 3' du gène de la toxine membranaire BsrG (Jahn et al., 2012). L'ARNm *bsrG* et l'ARNnc SR4 s'hybrident sur une région de 123 nucléotides et cet ARN duplex est dégradé par l'ARNase III.

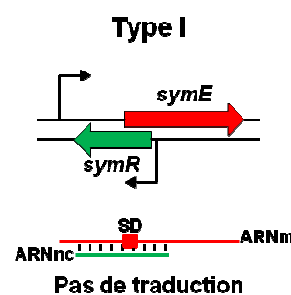


Fig. 2. Schéma représentatif du STA SymER.

B. STA de type II

Les STA de type II sont prévalents dans le monde procaryote. Dans ces systèmes, l'antitoxine est une protéine de 31 à 204 aa. Son gène est généralement transcrit en opéron avec le gène de toxine. L'antitoxine a le plus souvent une double fonction, elle forme un complexe avec la toxine pour inhiber son activité et elle réprime le promoteur de l'opéron TA (Fig. 3). Le complexe TA est généralement aussi un répresseur du promoteur de l'opéron. Les deux fonctions de l'antitoxine sont portées par des domaines protéiques distincts : le domaine

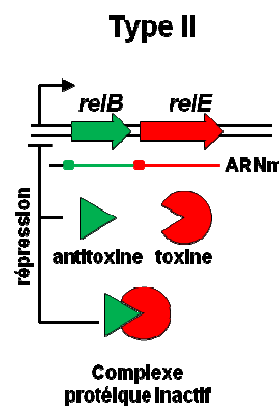


Fig. 3. Schéma représentatif du STA ReIEB.

responsable de la neutralisation de la toxine et le domaine responsable de la fixation à l'ADN (Yamaguchi et al., 2011). A titre d'exemple, le STA ReIEB d'*E. coli* est composé de l'ARNase ReIE (95 aa) et de son antitoxine dédiée ReIB (79 aa). ReIB se complexe à ReIE pour inhiber son activité. De plus, ReIB se fixe sur l'opérateur *reIO*, seule ou complexée à ReIE, pour réprimer l'expression de l'opéron *reIBE* (Gotfredsen and Gerdes, 1998).

C. STA de type III

Les antitoxines des STA de type III sont des ARNnc capables d'interagir directement avec les protéines toxiques pour inhiber leur activité. Le STA ToxNI fut le premier système de ce type identifié. Il est codé par un plasmide du phytopathogène *Pectobacterium atrosepticum* (Fineran et al., 2009). Le gène d'antitoxine *toxI* (*toxN inhibitor*), situé en amont

du gène de la toxine *ToxN*, est constitué de 5,5 répétitions directes d'une séquence de 36 nucléotides (Fig. 4). Ces deux gènes sont sous le contrôle d'un seul promoteur mais sont séparés par un terminateur transcriptionnel rho-indépendant qui permet 10% de fuite de transcription de l'ARNm de la toxine *ToxN* (Fineran et al., 2009). *ToxN* est une ARNase, elle clive non seulement les ARNm de la cellule (comme *ompA*, *dksA* et *lpp*) mais également l'ARNnc *ToxI* entre chaque unité de répétition, en reconnaissant les séquences AA-AU ou A-AG (Short et al., 2012). Ceci conduit à la formation de l'ARNnc *ToxI* (36 bases) dont la structure est en pseudonoeuds. Cet ARNnc inhibe alors l'activité ARNase de *ToxN* en bloquant son site actif (Fig. 5). Le complexe *ToxN-ToxI* est composé de trois pseudonoeuds *ToxI* qui interagissent chacun avec deux monomères *ToxN* pour former une structure triangulaire hétéro-hexamérique composée de trois *ToxN* reliés les uns aux autres via les pseudonoeuds *ToxI* (Fig. 5) (Blower et al., 2011).

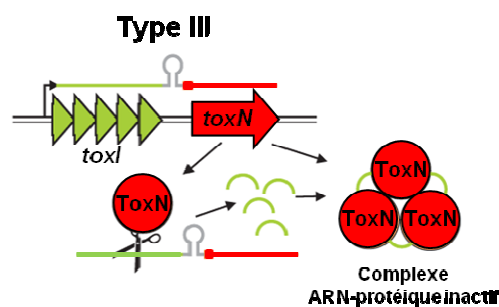


Fig. 4. Schéma représentatif du STA ToxNI (adapté de Unterholzner et al., 2013).

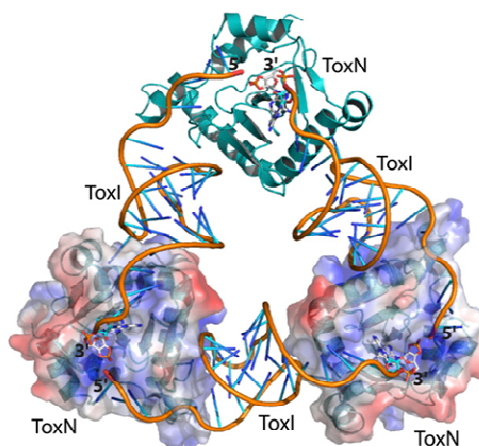


Fig. 5. Complexe hétéro-hexamérique ToxNI (adapté de Short et al., 2012).

D. STA de type IV

L'activité des protéines CbtA (*cytoskeletal binding toxin A*) et CbeA (*cytoskeleton bundling-enhancing factor A*) d'*E. coli* a permis de définir cette catégorie de STA en 2012 (Masuda et al., 2012). La particularité de ce module est que ni le transcrite de l'antitoxine CbeA ni son produit protéique n'interagissent avec l'ARNm de la toxine CbtA ou avec son produit, contrairement aux cinq autres types de STA (Brown and Shaw, 2003). CbtA (124 aa) et CbeA (122 aa) ont des effets antagonistes sur la polymérisation de deux protéines essentielles du cytosquelette : FtsZ et MreB (Fig. 6). FtsZ, une protéine de type tubuline, forme une structure en anneau à l'équateur de la cellule et joue le rôle d'échafaudage pour un grand nombre de protéines impliquées dans la division cellulaire. MreB, une protéine de type actine, est principalement responsable du maintien de la forme et de la polarité de la cellule bactérienne (van den Ent et al., 2001). La toxine CbtA affecte la morphologie et la division cellulaire en bloquant la polymérisation des protéines FtsZ et MreB (Tan et al., 2011). L'antitoxine CbeA empêche l'action de CbtA en se fixant directement aux protéines MreB et FtsZ et en favorisant leur polymérisation en filaments multimériques (Masuda et al., 2012).

Nous pouvons nous interroger sur la pertinence d'étiqueter le module CbtA-CbeA comme STA. En effet, il n'y a pas d'interaction directe entre l'antitoxine et la toxine ou son ARNm. De plus, CbeA contrecarre non seulement l'activité de la toxine CbtA mais également celle d'autres inhibiteurs de la division cellulaire comme l'antibiotique A22, une petite molécule chimique qui inhibe la polymérisation de MreB, et les protéines SulA et DicB qui inhibent la polymérisation de FtsZ (Masuda et al., 2012). A ce titre, les protéines CbtA et CbeA pourraient être simplement considérées comme des modulateurs de la division et de la morphologie cellulaire partageant les mêmes cibles.

Un second STA de type IV a été récemment décrit : il s'agit du système AbiEii-AbiEi (*Abortive infection system*) porté par un élément conjugatif et intégratif (ICE, *integrative and conjugative element*) de *Streptococcus agalactiae* (Dy et al., 2014). La toxine AbiEii (298 aa) serait une nucléotidyltransférase GTP-spécifique mais sa cible n'a pas encore été déterminée. L'antitoxine protéique AbiEi (287 aa) neutralise la toxicité de la toxine AbiEii sans former de complexe protéique avec elle. L'activité antitoxique ainsi que la cible de AbiEi sont encore inconnues.

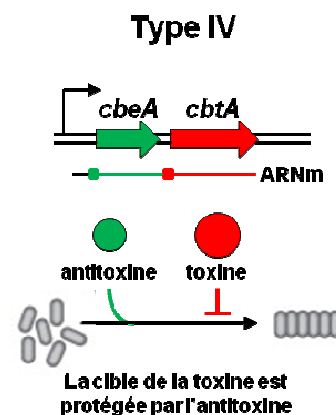


Fig. 6. Schéma représentatif du STA CbtA-CbeA (adapté de Markovski et Wickner, 2013).

E. STA de type V

Le système GhoT-GhoS, décrit en 2012, est actuellement le seul prototype de STA de type V (Wang et al., 2012). Il est codé par l'opéron chromosomique *ghoST* d'*E. coli* (Fig. 7). La toxine GhoT (*ghost cells*) est une protéine (57 aa) qui s'insère dans la membrane aux pôles de la cellule et l'endommage, ce qui provoque une diminution de la force motrice et une réduction de la quantité d'ATP intracellulaire disponible. L'antitoxine GhoS (98 aa) est une ARNase dont l'activité est très stringente. Sa surproduction conduit au clivage d'une vingtaine d'ARNm seulement : celui de la toxine GhoT ainsi que ceux de gènes de biosynthèse ou de transport des purines ou des pyrimidines (Wang et al., 2012). L'antitoxine GhoS clive l'ARNm *ghoS-ghoT* au niveau de cinq sites (de consensus 5'-UNNU(A/C)N(A/G)(A/U)A(A/U)-3'), tous localisés dans la région codant GhoT. GhoS empêche ainsi la synthèse de la toxine GhoT, sans perturber sa propre production (Wang et al., 2012).

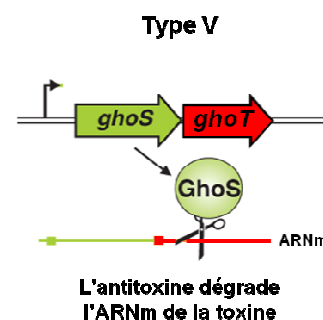


Fig. 7. Schéma représentatif du STA GhoTS (adapté de Unterholzner et al., 2013).

F. STA de type VI

Le système SocB-SocA (*suppressor of ClpXP*) de *Caulobacter crescentus* est actuellement le seul exemple de STA de type VI (Aakre et al., 2013). La toxine SocB bloque la réplication en se fixant à la protéine DnaN, une enzyme du complexe de réplication, et l'empêche d'interagir avec l'ADN polymérase pour augmenter sa processivité. SocB est constitutivement produite et est naturellement instable. Sa neutralisation par l'antitoxine SocA dépend du complexe protéasique ClpX-ClpP (Fig. 8). L'ATPase ClpX reconnaît des régions non structurées dans les protéines, déplie les protéines et les transmet à la peptidase ClpP qui les dégrade. Pour neutraliser SocB, l'antitoxine SocA agit comme un adaptateur protéique de la protéase ClpXP : SocA complexée à SocB se fixe à l'extrémité N-terminale de ClpX et transmet la toxine au complexe ClpXP qui la dégrade.

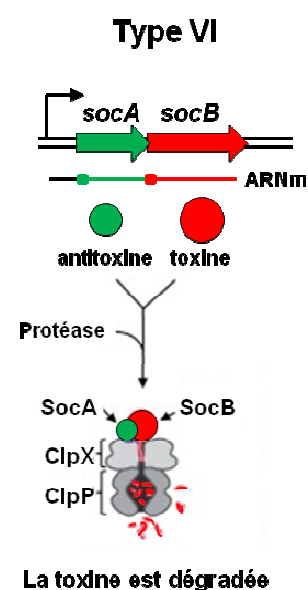


Fig. 8. Schéma représentatif du STA SocBA (adapté de Markovski et Wickner, 2013).

Le système HicA3-HicB3 de *Yersinia pestis* qui a fait l'objet de notre étude est un STA de type II. C'est pourquoi nous nous focaliserons sur ce type de STA dans la suite de cette introduction.

II. Propriétés des STA de type II

Les STA de type II sont présents chez un grand nombre de bactéries et d'archées. Leurs gènes sont localisés sur le chromosome ou sur des éléments génétiques mobiles comme des plasmides, des transposons, des îlots génomiques ou des phages. L'intégration des STA dans les chromosomes bactériens s'est probablement produite suite à des transferts horizontaux de gènes d'éléments mobiles (Leplae et al., 2011).

Les STA de type II sont généralement codés par deux petits gènes organisés en opéron qui peuvent être séparés par une région intergénique courte (30 pb maximum) ou être chevauchants (20 pb maximum) (Leplae et al., 2011; Pandey and Gerdes, 2005). Le premier gène code généralement l'antitoxine (31 à 204 aa) et le second, la toxine (41 à 440 aa). Cependant, il existe quelques exceptions à cette organisation génétique : l'ordre des gènes est inversé pour les opérons *higBA*, *mqsRA*, *mlAB* et *hicAB* d'*E. coli* où le premier gène code la toxine (Christensen-Dalsgaard and Gerdes, 2006; Jorgensen et al., 2008; Kasari et al., 2010; Koga et al., 2010). Par ailleurs, certains gènes de toxine sont orphelins ou sont localisés à distance des gènes d'antitoxine sur le chromosome (Makarova et al., 2009). C'est le cas du gène de toxine *mazF-mx* de *Myxococcus xanthus* : son antitoxine, MprC, est codée par un gène distant de plus de 4,44 Mb de *mazF-mx* (Nariya and Inouye, 2008). Enfin, certains STA se composent de trois protéines, le troisième partenaire étant un régulateur transcriptionnel co-transcrit avec les gènes TA (Zielenkiewicz and Ceglowski, 2005).

Les STA de type II peuvent être classés en fonction de la séquence protéique, de la structure ou de l'activité des toxines et des antitoxines. Pendant longtemps, une famille de toxines a été associée à une seule famille d'antitoxines. Les STA étaient donc classés en tant que paire de toxines et d'antitoxines et 9 familles de STA avaient été répertoriées (Tableau 1 d'après (Gerdes et al., 2005).

Famille	Opéron	Toxine	Antitoxine	Référence
CcdBA	<i>ccdAB</i>	CcdB	CcdA	Ogura et Hiraga 1983
HigBA	<i>higBA</i>	HigB	HigA	Tian et al., 1996
HipAB	<i>hipBA</i>	HipA	HipB	Moyed et Bertrand 1983
MazFE	<i>chpBIK</i>	ChpBK	ChpBI	Masuda et al., 1993
	<i>mazEF</i>	MazF	MazE	Aizenman et al., 1996
	<i>parD</i>	Kid	Kis	Ruiz-Echevarria et al., 1995
	<i>pemKI</i>	PemK	PemI	Tsuchimoto et al., 1988
ParED	<i>parDE</i>	ParE	ParD	Roberts et al., 1990
Doc/Phd	<i>phd-doc</i>	Doc	Phd	Lehnherr et al., 1993
RelEB	<i>dinJ-yafQ</i>	YafQ	DinJ	Gerdes et al., 2005
	<i>relBE</i>	RelE	RelB	Gotfredsen et Gerdes 1998
	<i>yefM-yoeB</i>	YoeB	YefM	Cherny et Gazit, 2003
VapCB	<i>vapBC</i>	VapC	VapB	Zhang et al., 2004
ζ/ϵ (Zeta/Epsilon)	$\zeta-\epsilon$	ζ	ϵ	Meinhart et al., 2003

Tableau 1. Neuf familles de STA.

Par la suite, des analyses bioinformatiques ont révélé que les toxines d'une même famille peuvent être associées à des antitoxines appartenant à des familles différentes (Anantharaman and Aravind, 2003). La modularité des STA a été confirmée par la découverte du STA TasB-TasA de *Bacillus thuringiensis* qui comprend la toxine TasB de la famille Doc et l'antitoxine TasA de la famille MazE (Fico and Mahillon, 2006), puis celle du STA YhaV-PrIF d'*E. coli*, où la toxine YhaV est similaire à RelE et l'antitoxine PrIF à MazE (Schmidt et al., 2007). Les familles de toxines sont donc à présent considérées indépendamment des familles d'antitoxines. L'analyse des séquences de 2181 génomes procaryotes a prédit l'existence de plus de 10 000 STA de type II putatifs classés en 12 familles de toxines et 20 familles d'antitoxines (Leplae et al., 2011). Les études sur l'origine et l'évolution des STA suggèrent que les toxines et les antitoxines ne dérivent pas d'un ancêtre commun mais ont évolué à partir d'un petit nombre de protéines qui se sont associées à de multiples reprises au cours de l'évolution (Anantharaman and Aravind, 2003; Hayes and Van Melder, 2011).

Les génomes bactériens codent généralement plusieurs STA. Le record actuel est détenu par la cyanobactérie *Microcystis aeruginosa* NIES-843 dont le génome contient 97 loci de STA putatifs, soit 1,5% du nombre de phases ouvertes de lecture ou ORF (*open reading frame*) (Leplae et al., 2011). En 2005, une étude a proposé que les STA prédominent chez les bactéries à mode de vie extracellulaire par rapport aux bactéries intracellulaires obligatoires (Pandey and Gerdes, 2005). Cependant, une étude plus récente contredit cette hypothèse puisque dans les génomes des espèces strictement intracellulaires *Rickettsia bellii* et *R. felis*, les STA représentent respectivement 2,2% et 2,6% du nombre total d'ORF (Leplae et al., 2011). Par ailleurs, il semble que le nombre de STA soit plus élevé chez les bactéries hautement pathogènes (Georgiades and Raoult, 2011). Par exemple, le génome de *Mycobacterium tuberculosis* coderait 88 STA, dont 47 homologues du système VapBC, tandis que le génome de *M. smegmatis* ne coderait que trois STA VapBC (Demidenok et al., 2014; Ramage et al., 2009).

III. Les toxines des STA de type II

Les toxines inhibent la croissance des bactéries, voire même entraînent leur mort, en ciblant des processus physiologiques essentiels tels que la réplication, la traduction ou encore la division cellulaire.

A. Les toxines ciblant la réplication

Les toxines CcdB et ParE (*partitioning*), codées respectivement par les plasmides F et RK2, bloquent l'étape d'élongation de la réplication en inhibant l'activité de l'ADN gyrase (Bernard et al., 1993; Jiang et al., 2002). L'ADN gyrase est une topoisomérase de type II (Reece et al., 1991). Elle introduit des supertours négatifs dans l'ADN pour faciliter le passage des complexes de réplication et de transcription. La gyrase est formée de deux sous-unités.

La première, GyrA, constitue le domaine catalytique de l'enzyme. Elle coupe les deux brins de l'hélice d'ADN, entraîne le passage d'un segment d'ADNdb à travers le site de coupure puis religature les extrémités d'ADN clivé. La seconde sous-unité, GyrB, hydrolyse l'ATP et fournit l'énergie nécessaire à l'activité de surenroulement de l'ADN.

La toxine CcdB se fixe sur le domaine de dimérisation de la sous-unité GyrA et inhibe son activité (Fig. 9). Lorsque la gyrase est fixée à l'ADN, CcdB empêche la religature des extrémités de l'ADN clivé par GyrA et bloque le passage des polymérase (Bernard and Couturier, 1992; Dao-Thi et al., 2005).

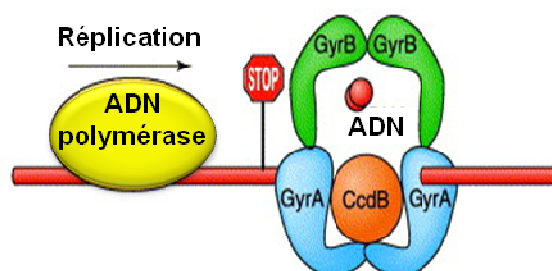


Fig. 9. La toxine CcdB inhibe la réplication en bloquant l'ADN gyrase (adapté de Buts et al., 2005).

La toxine ParE a un effet similaire sur la gyrase. Cependant, la sous-unité ciblée par ParE ainsi que son mode d'action n'ont pas encore été déterminé (Jiang et al., 2002).

B. Les toxines ciblent la traduction

Les toxines ciblent majoritairement la traduction. La plupart des toxines de cette catégorie ont une activité endoribonucléase (ARNase), quelques autres inhibent la traduction en perturbant la machinerie de traduction (Fig. 10).

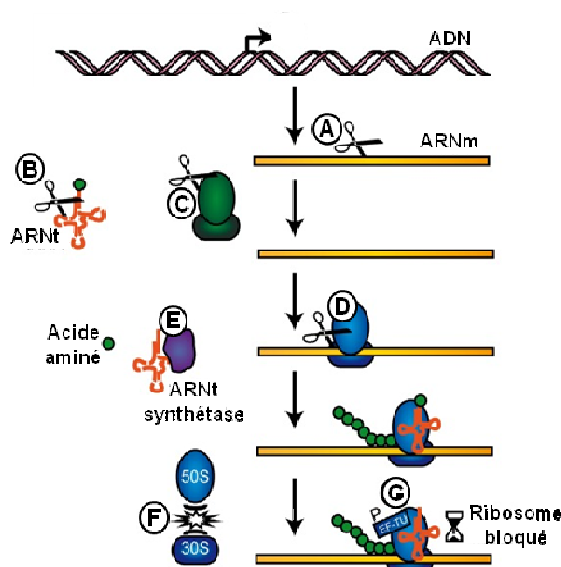


Fig. 10. Mécanismes d'inhibition de la traduction par les toxines. Clivage des ARNm (A), des ARNr (B) et des ARNr (C) par les ARNases indépendantes du ribosome et des ARNm (D) par les ARNases dépendantes du ribosome. (E) Inhibition de l'aminoacylation de l'ARNr. (F) Inhibition de l'association des sous-unités du ribosome (G) Inhibition du facteur d'élongation EF-Tu (adapté de Bertram et Schuster, 2014).

1. Une majorité d'ARNases

Les ARNases sont classées en deux groupes : les ARNases indépendantes des ribosomes (ou ARN interférases) clivent les ARNm, les ARNt ou les ARNr, alors que les ARNases dépendantes des ribosomes clivent les ARNm uniquement lors de leur traduction par le ribosome.

a. Exemples d'ARN interférases

i. MazF

La toxine MazF (maz signifie « qu'est ce que c'est » en hébreux) d'*E. coli* est l'ARN interférase la mieux caractérisée. Son activité ne nécessite pas la présence d'ion métallique. Elle clive les ARNm et l'ARNr 16S au niveau de triplets simples brins (sb) A-CA en 3' du premier A. Elle clive son propre ARNm qui contient 9 sites ACA, ce qui affecte sa production (Zhang et al., 2003). Les orthologues de MazF clivent différentes séquences d'ARNsb de 3, 4 ou 5 bases. A titre d'exemples, YdcE de *B. subtilis* clive la séquence U-AC (Pellegrini et al., 2005), MazF-Sa de *Staphylococcus aureus* clive des séquences du type VU-UV' (où V et V' sont A, C ou G) (Fu et al., 2007) et MazF-mt7 de *M. tuberculosis* clive la séquence U-CGCU (Zhu et al., 2008). Les séquences cibles des toxines MazF sont plus ou moins fréquentes dans les ARN bactériens. Par exemple, 99% des ARNm d'*E. coli* contiennent la séquence ACA (Baik et al., 2009) alors que seuls 20% des ARNm de *M. tuberculosis* contiennent la séquence CU-CCU reconnue par MazF-mt3 (Schifano et al., 2014). Certains gènes ou familles de gènes codent des ARNm plus ou moins sensibles à l'action des toxines MazF. L'ARNm *sraP* de *S. aureus*, qui code un facteur de virulence, est extrêmement sensible à MazF-Sa car il contient 43 sites de clivage (Zhu et al., 2009). Par contre, le site de clivage reconnu par MazF-mt7 de *M. tuberculosis* est sous-représenté dans la famille des gènes PE/PPE. Ces gènes codent des protéines, dont le domaine N-terminal comporte un motif Pro-Glu (PE) ou Pro-Pro-Glu (PPE), qui jouent un rôle dans l'immunopathogénicité de la bactérie (Zhu et al., 2008).

MazF d'*E. coli* clive aussi l'ARNr 16S ce qui entraîne la production d'une machinerie de traduction alternative (Vesper et al., 2011). MazF clive les 43 derniers nucléotides de l'ARNr 16S et élimine donc la séquence anti-Shine Dalgarno (aSD) (Fig. 11). Les ARNr 16S tronqués se complexent aux protéines ribosomales pour former une sous-population de ribosomes nommés ribosomes de stress. Contrairement aux ribosomes canoniques, les ribosomes de stress ne traduisent que les ARNm dont l'extrémité 5'UTR contenant la séquence SD a été éliminée (ARNm décapités ou *leaderless mRNA*) (Fig. 11) (Vesper et al., 2011). Ces ARNm décapités, qui résultent du clivage par MazF d'un site ACA présent entre la séquence SD et le codon AUG, codent environ 10% des protéines d'*E. coli*, une dizaine d'entre-elles est impliquée dans la balance survie/mort cellulaire (Amitai et al., 2009; Vesper et al., 2011).

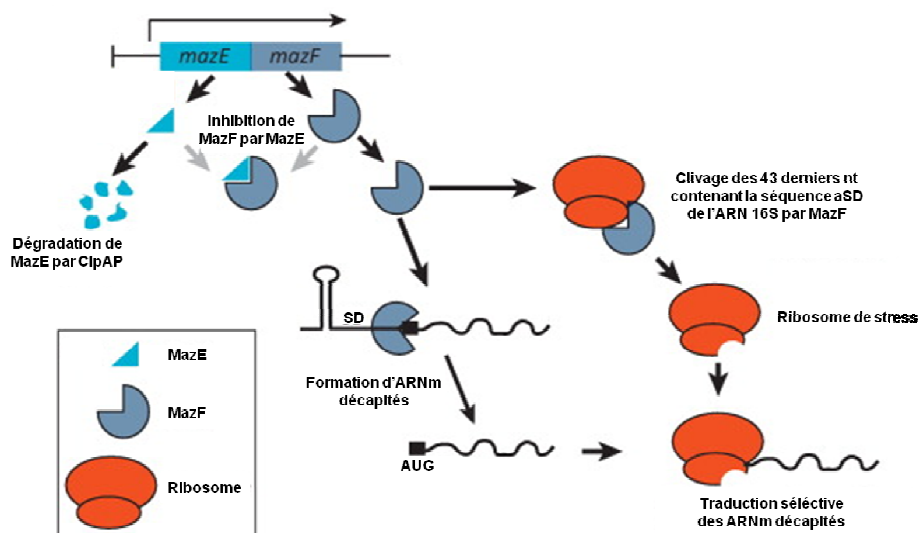


Fig. 11. Le clivage des ARNm et de l'ARNr 16S par la toxine MazF conduit à la formation d'une machinerie alternative de traduction (adapté de Moll et Engelberg-Kulka, 2012).

ii. VapC

A la différence des toxines MazF, les toxines de la famille VapC (*virulence associated protein*) nécessitent la présence de Mg^{2+} pour leur activité. Elles ont différentes spécificités de substrat et clivent soit l'ARNsb, soit l'ARN double brin (db). VapC de *M. smegmatis* ne coupe que les séquences d'ARNsb AU-A (McKenzie et al., 2012), tandis que VapC5 de *M. tuberculosis* serait capable de cliver l'ARNdb (Miallau et al., 2008). Certaines toxines VapC ne reconnaissent qu'un seul type d'ARN : les ARNases VapC de *Shigella flexneri* et de *Salmonella enterica* clivent uniquement l'ARNt d'initiation $ARNt^{Met}$ (Winther and Gerdes, 2012) et VapC20 de *M. tuberculosis* clive l'ARNr 23S au niveau d'une structure spécifique nommée boucle Sarcine-Ricine (Winther et al., 2013). A l'inverse, VapC6 de la bactérie hyperthermophile *Sulfolobus solfataricus* a un large spectre de substrats : elle clive les ARN totaux *in vitro* (Maezato et al., 2011). Enfin, contrairement aux autres toxines de la famille VapC, VapC4 de *M. tuberculosis* n'a qu'une faible activité ARNase, sa fixation aux ARNm contenant la séquence ACGC suffit à inhiber la traduction (Sharp et al., 2012).

b. Exemples d'ARNases dépendantes des ribosomes

RelE d'*E. coli* est l'ARNase dépendante du ribosome la mieux caractérisée (Hurley et al., 2011; Neubauer et al., 2009; Pedersen et al., 2003). Elle se fixe à la sous-unité 30S du ribosome en

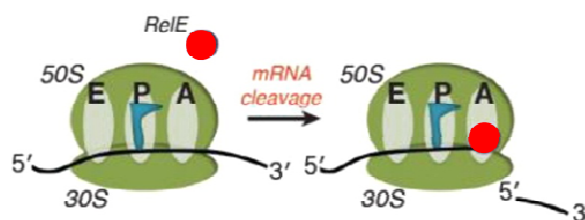


Fig. 12. L'ARNase RelE s'insère dans le site A du ribosome pour cliver les ARNm en cours de traduction (adapté de Griffin et al., 2013).

interagissant essentiellement avec l'ARNr 16S. RelE ne possède aucune activité ARNase en absence du ribosome. Elle clive les ARNm uniquement lorsqu'ils sont positionnés dans le site A du ribosome (Fig. 12). En effet, l'interaction entre l'ARNm et l'ARNr 16S permet à l'ARNm d'être correctement orienté pour qu'il soit clivé par RelE. Le clivage de l'ARNm par RelE se produit préférentiellement entre le 2^e et le 3^e nucléotide d'un codon se terminant par G.

Contrairement à RelE, la toxine YoeB d'*E. coli* est une ARNase capable de cliver les ARNm en absence de ribosome *in vitro* (Kamada and Hanaoka, 2005). Cependant, *in vivo*, son activité ARNase dépend de la présence du ribosome qui, de la même manière que pour la toxine RelE, stabilise la conformation de l'ARNm afin qu'il soit clivé par la toxine YoeB (Feng et al., 2013). YoeB clive les ARNm trois bases en aval du codon d'initiation AUG. Par ailleurs, il a été suggéré que l'activité ARNase de YoeB n'est pas essentielle à sa toxicité. En effet, la mutation de son site actif n'empêche pas l'inhibition de la traduction (Zhang and Inouye, 2009). Il a donc été proposé que la fixation de YoeB à la sous-unité 50S du ribosome et son interaction avec le site A empêche la formation du complexe d'initiation de la traduction et pourrait stimuler l'activité endoribonucléase du ribosome (Hayes and Sauer, 2003).

HigB (*host inhibition of growth*) du plasmide Rts1 de *Proteus vulgaris* et YafQ d'*E. coli* sont d'autres ARNases dépendantes du ribosome. Elles clivent des séquences riches en adénosine. HigB clive des triplets AAA indépendamment du cadre de lecture, alors que YafQ ne clive le codon AAA que lorsque celui-ci est en phase (Hurley and Woychik, 2009; Prysak et al., 2009).

2. Quelques toxines inhibitrices de la machinerie de traduction

Au cours de la traduction, le rôle du facteur d'élongation Tu (EF-Tu, *elongation factor thermo unstable*) est d'amener les ARNt amino-acylés au site A du ribosome afin de permettre l'élongation des produits de traduction. La toxine Doc (*death on curing*) du bactériophage P1 est une thréonine kinase qui phosphoryle EF-Tu, ce qui l'empêche de se lier aux ARNt amino-acylés et bloque l'élongation de la traduction (Castro-Roa et al., 2013; Cruz et al., 2014).

On a d'abord pensé qu'EF-Tu était aussi la cible de la toxine HipA (*high persistence*) d'*E. coli* qui a une activité sérine kinase (Schumacher et al., 2009). Mais il a été récemment montré que HipA phosphoryle la glutamyl-tRNA synthétase GltX, responsable de la fixation du glutamate sur l'ARNt^{Glu} (Fig. 13). Cette phosphorylation empêche l'amino-acylation de l'ARNt^{Glu} et conduit à l'accumulation d'ARNt^{Glu} non chargé et à l'arrêt de la synthèse protéique (Germain et al., 2013; Kaspary et al., 2013).

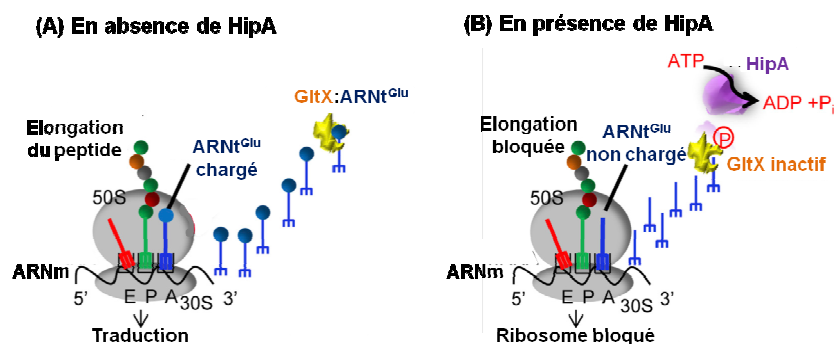


Fig. 13. La kinase HipA inhibe l'élongation de la traduction (adapté de Germain et al., 2013).

La toxine RatA (*ribosome association toxin A*) d'*E. coli* se fixe spécifiquement à la sous-unité 50S du ribosome et empêche son association avec la sous-unité 30S. Les ribosomes 70S ne sont pas formés, ce qui conduit à l'inhibition de l'initiation de la traduction (Zhang and Inouye, 2011).

C. Les toxines ciblent la division cellulaire

La toxine PezT (*pneumococcal zeta toxin*) de *Streptococcus pneumoniae* inhibe la synthèse du peptidoglycane via son activité kinase. La première étape de la synthèse du peptidoglycane est la modification de l'UDP-N-acétylglucosamine (UNAG) en enolpyruvyl-UNAG par l'enzyme MurA (Fig. 14). Or, PezT phosphoryle l'UNAG en UNAG-3'-phosphate qui est un inhibiteur compétitif de MurA. Par ce mécanisme, la toxine PezT bloque la totalité de la voie de biosynthèse du peptidoglycane et conduit à la lyse bactérienne (Mutschler et al., 2011).

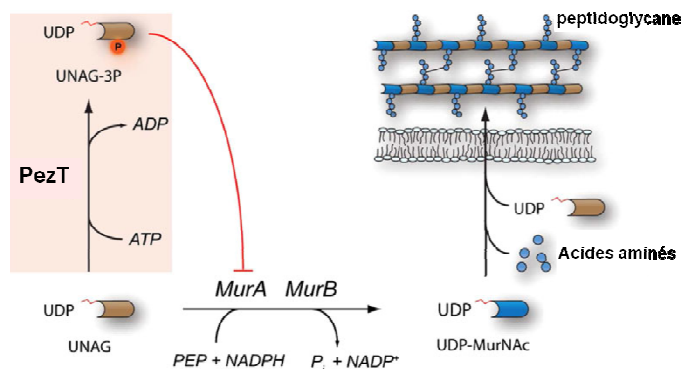


Fig. 14. Mécanisme d'inhibition de la synthèse de peptidoglycane par la toxine PezT (adapté de Mutschler et al., 2011).

D. Structure des toxines

La structure de plusieurs toxines a été résolue et a permis de distinguer six familles structurales. Curieusement, il est apparu que des toxines d'activités différentes, comme l'ARNase Kid et l'inhibiteur de gyrase CcdB, appartiennent à une même famille structurale et ce malgré la faible conservation de leur structure primaire. Ces toxines dériveraient d'un ancêtre commun et auraient ensuite évolué pour interagir avec des cibles cellulaires différentes (Smith et al., 2012).

1. La famille structurale RelE

Elle comprend les ARNases dépendantes du ribosome RelE, MqsR, YafQ et YoeB d'*E. coli*, HigB de *P. vulgaris* et l'inhibiteur de gyrase ParE1 de *C. crescentus*. Ces protéines monomériques sont caractérisées par un feuillet β antiparallèle central flanqué d'hélices α adjacentes. Le nombre, l'orientation et la longueur des hélices sont variables (Fig. 15). Les toxines de la famille RelE présentent des similarités de structure avec les ARNases Sa et Barnase (Fig. 15).

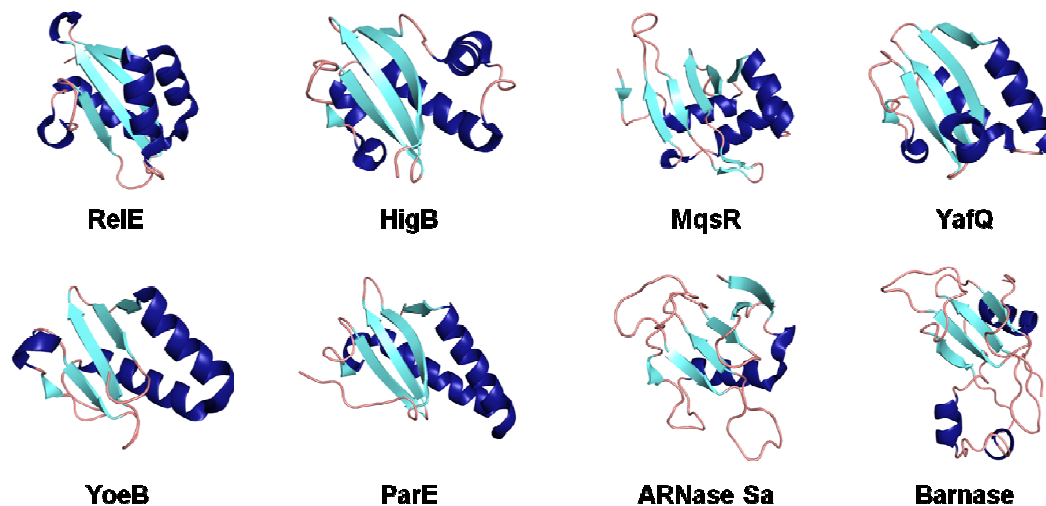


Fig. 15. Structures des toxines de la famille RelE : RelE (PDB 4FXI), YoeB (PDB 2A6S), HigB (PDB 4MCT), YafQ (PDB 2Q2U), MqsR (PDB 3HI2), ParE (PDB 3KXE) et celles de l'ARNase Sa (PDB 3A5E) et de la Barnase (PDB 1BNR).

Le site actif des ARNases de cette famille est localisé au niveau d'une surface concave formée par le feuillet β et l'extrémité C-terminale. Il est essentiellement composé d'un couple acide-base His-Glu pour YoeB et YafQ, d'un triplet Lys, Gln et Tyr pour MqsR, d'un doublet Lys et Arg pour RelE et d'au moins un résidu His pour HigB (Armalyte et al., 2012; Brown et al., 2009; Feng et al., 2013; Neubauer et al., 2009; Schureck et al., 2014).

L'inhibiteur de gyrase ParE1 de *C. crescentus* appartient à la famille structurale RelE bien qu'il n'ait pas d'activité ARNase (Barbosa et al., 2010; Dalton and Crosson, 2010). D'ailleurs, ParE1 ne contient aucun des résidus essentiels à l'activité des ARNases de la famille RelE. Jusqu'à présent, aucune étude structurale de ParE1 complexée à l'ADN gyrase n'a été publiée. Les régions protéiques impliquées dans l'interaction entre ParE1 et l'ADN gyrase sont donc encore inconnues.

2. La famille structurale MazF

Les ARN interférases MazF d'*E. coli*, Kid du plasmide R1, YdcE de *B. subtilis* et l'inhibiteur de gyrase CcdB du plasmide F appartiennent à la famille structurale MazF (Hargreaves et al., 2002; Kamada et al., 2003; Pellegrini et al., 2005). Cette famille est caractérisée par une structure comportant un feuillet coudé de sept brins β antiparallèles entouré d'hélices α (Hargreaves et al., 2002; Kamada et al., 2003). Les protéines de cette

famille sont homodimériques. L'interface du dimère est formée principalement par la longue hélice α C-terminale et les feuillets β de chaque monomère (Fig. 16).

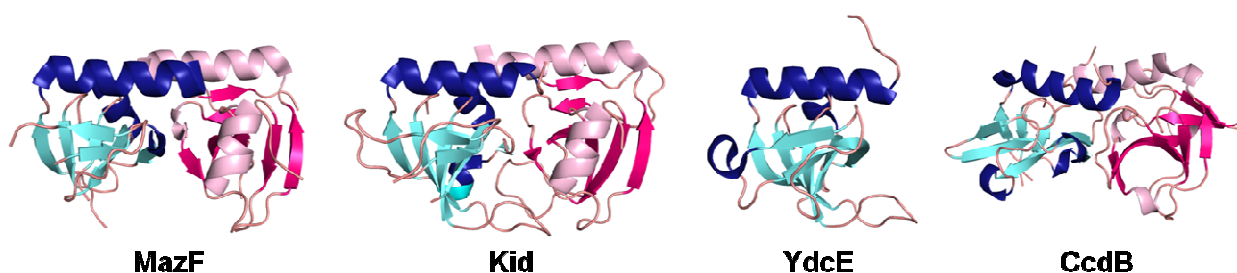


Fig. 16. Structures des toxines de la famille MazF : MazF (PDB 3NFC), Kid (PDB 1M1F), YdcE (PDB 1NE8), CcdB (PDB 1VUB). Chaque monomère est en bleu ou en rose. Rq : YdcE a cristallisé en tant que monomère.

La résolution de la structure des complexes CcdB-GyrA et Kid-ARN a révélé que le domaine protéique de CcdB responsable de l'inhibition de l'ADN gyrase et celui de Kid responsable de l'activité ARNase sont physiquement distincts (Fig. 17) (Kamphuis et al., 2006; Dao-Thi et al., 2005).

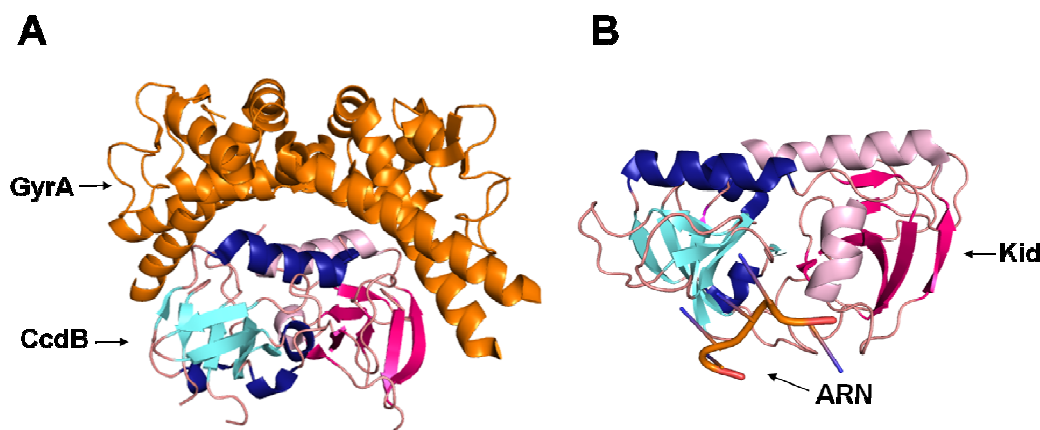


Fig. 17. Structures de (A) CcdB complexé à un fragment de GyrA (PDB 1X75) et (B) Kid lié à un fragment d'ARN (PDB 2C06).

Dans le cas de la toxine CcdB, les deux longues hélices α C-terminales de chaque monomère sont responsables de la fixation de la sous-unité GyrA. Pour la toxine Kid, la fixation et le clivage de l'ARNm se produit dans un canal formé par l'interface du dimère et les boucles β 1- β 2 et β 3- β 4 de chaque monomère. Les résidus présents au niveau de ce canal peuvent différer entre les ARNases de la famille structurale MazF, ce qui permet à chaque ARNase de reconnaître un site de coupure spécifique. Le mécanisme de clivage de l'ARN ressemble à celui des ARNases A et T1 et fait intervenir un couple de résidus catalysant une réaction acide-base (Hargreaves et al., 2002; Kamada et al., 2003; Li et al., 2006; Simanshu et al., 2013).

3. La famille structurale VapC

Les ARNases de la famille VapC sont des protéines homodimériques caractérisées par la présence d'un domaine PIN (*PilT-N terminal*) qui leur confère une activité ARNase Mg^{2+} -dépendante (Fig. 18) (Arcus et al., 2004; Miallau et al., 2008). La structure du domaine PIN (130 aa environ) consiste en un feuillet central de cinq brins β parallèles et de sept hélices α localisées de part et d'autre du feuillet (Fig. 18). Bien que cette structure soit conservée, le nombre de brins β ou d'hélices α peut varier. Ainsi, un long segment de liaison remplace le brin β_3 chez VapC5 de *M. tuberculosis* et VapC2 de *R. felis* ne contient que 6 hélices α (Mate et al., 2011; Miallau et al., 2008).

L'activité ARNase des membres de la famille VapC repose sur quatre résidus acides très conservés qui forment une poche catalytique chargée négativement capable de fixer les ions Mg^{2+} nécessaires à l'activité ARNase. De plus, le premier résidu acide est toujours suivi d'un ou deux résidus polaires (Thr ou Ser) qui permettent d'orienter sa chaîne latérale dans une conformation catalytique (Bunker et al., 2008; Mattison et al., 2006; Miallau et al., 2008).

4. La famille structurale Doc

Les toxines monomériques Doc appartiennent, avec les protéines de type Fic (*filamentation induced by cAMP*), à la famille de protéine FiDo (Fic/Doc) (Kinch et al., 2009). Le domaine FiDo est formé uniquement d'hélices α et contient une boucle comprenant le motif FIC (HXFX(D/E)GNRXXR) responsable de l'activité d'adénylation (ou AMPylation, fixation covalente d'une molécule d'AMP à la chaîne latérale d'un résidu protéique). Les protéines Fic fixent l'ATP au niveau de l'extrémité N-terminale de cette boucle. L'ATP est orienté de manière à être clivé en AMP par le résidu His catalytique du motif FIC.

Contrairement aux protéines FiDo classiques (Fic, AvrB, VopS), les protéines Doc n'ont pas d'activité d'AMPylation mais une activité kinase de par leur motif FIC légèrement dégénéré (HXFX(D/N)(A/G)NKR) (Fig. 19). La présence d'un résidu Lys dans ce motif, au lieu d'une Gly, entraîne un encombrement stérique contraignant l'ATP à se fixer du côté C-terminal de la boucle, ce qui empêche son clivage en AMP. Ce mode de fixation inversé de l'ATP permet à Doc de transférer le γ -phosphate de l'ATP sur sa cible : un résidu Thr du facteur d'élongation EF-Tu. Ainsi, la

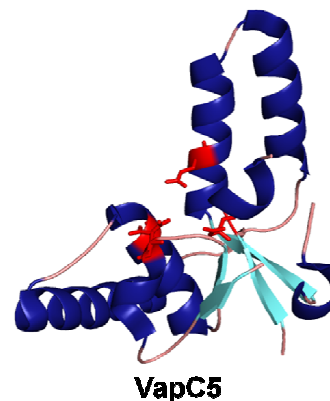


Fig. 18. Structure de VapC5 de *M. tuberculosis* (PDB 3DBO). Les quatre résidus catalytiques (Asp26, Glu57, Asp115, Asp135) sont en rouge.

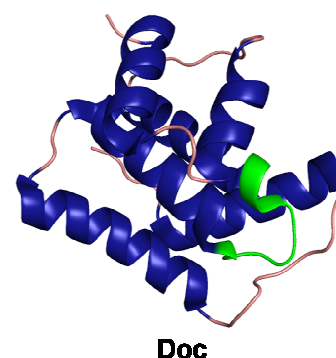
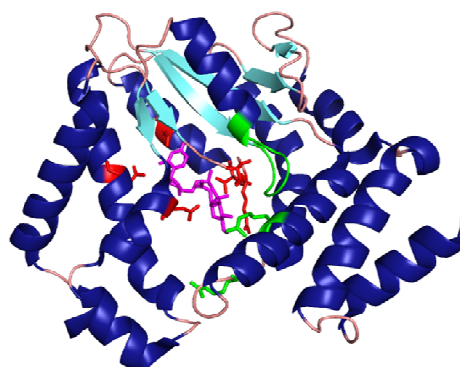


Fig. 19. Structure de Doc du phage P1 (PDB 3K33). La boucle contenant le domaine FIC (HIFNDANKR) est indiquée en vert.

dégénérescence du motif FIC des toxines de type Doc semble avoir conduit à la perte de l'activité AMPylation et au gain d'une activité kinase (Castro-Roa et al., 2013; Cruz et al., 2014; Garcia-Pino et al., 2008).

5. La famille structurale Zeta

La toxine Zeta, codée par un plasmide de *Streptococcus pyogenes*, et son homologue PezT, codé par le chromosome de *S. pneumoniae*, sont des protéines monomériques de 286 et 253 aa, respectivement (Khoo et al., 2007; Meinhart et al., 2003). Elles sont formées d'un feuillet de six brins β . Une à trois hélices α sont insérées entre chaque brin β , excepté entre les brins parallèles β_5 et β_6 , reliés par une petite boucle (Fig. 20). La toxine Zeta contient une hélice α C-terminale supplémentaire par rapport à PezT. Ces toxines sont des phosphoryltransférases. Elles possèdent un site de fixation de l'ATP formé à partir de deux résidus Arg et de la boucle β_1 - α_2 qui contient un motif P-loop dont la séquence consensus est GXXGXGKT (Walker et al., 1982) ainsi qu'un site de fixation du Mg^{2+} essentiel à leur activité. Le substrat de ces toxines, l'UNAG (UDP-N-acétyl-glucosamine), se fixe dans une crevasse à proximité du site de fixation de l'ATP, entre les hélices α_5 et α_6 (Mutschler et al., 2011).

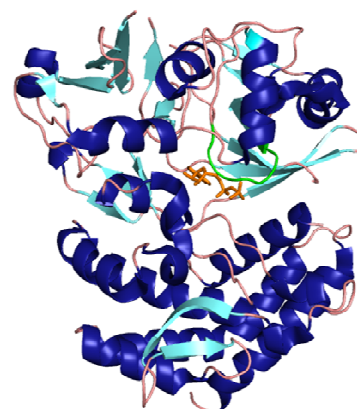


Zeta

Fig. 20. Structure de la toxine Zeta (PDB 3Q8X) avec son substrat UNAG (en rose). Le motif P-loop et les 2 arginines responsables de la fixation de l'ATP sont en vert. Les résidus impliqués dans la fixation du substrat sont en rouge.

6. La famille structurale HipA

La sérine kinase HipA d'*E. coli* est une protéine globulaire de grande taille par rapport aux autres toxines des STA (440 aa). Elle est constituée de 15 brins β et de 15 hélices α , répartis en deux domaines : un domaine N-terminal α/β et un domaine C-terminal presque entièrement hélicoïdal (Fig. 21). HipA fixe l'ATP dans une crevasse formée entre les domaines N et C-terminaux au niveau d'un motif P-loop ($V_{151}AGAQEKT_{158}$) localisé dans une boucle (Schumacher et al., 2009).



HipA

Fig. 21. Structure de la toxine HipA (PDB 3TPT) fixé à l'ADP (en orange). Le motif P-loop est en vert.

IV. Les antitoxines des STA de type II

Les antitoxines de type II sont généralement dimériques. Elles ont deux fonctions : i) elles neutralisent les toxines en interagissant directement avec elles et ii) elles répriment l'expression de l'opéron TA en se fixant sur des régions opératrices, seules ou complexées aux toxines. Ces deux fonctions sont en général portées par des domaines protéiques distincts : le domaine de neutralisation de la toxine et d'autre part, le domaine de fixation à l'ADN qui est aussi le domaine de dimérisation. Le domaine de fixation à l'ADN est le plus souvent du côté N-terminal de la protéine, mais pour les antitoxines MqsA et HicB, il est C-terminal.

On distingue deux catégories de domaines de neutralisation : les domaines non structurés qui acquièrent leur structure secondaire uniquement en présence de la toxine, et les domaines déjà structurés en absence de la toxine. Les domaines de fixation à l'ADN appartiennent à l'un des quatre types structuraux suivants : hélice-tour-hélice (HTH), ruban-hélice-hélice (RHH), AbrB, ou encore Phd/YefM (Anantharaman 2011). L'architecture des antitoxines étant modulaire, l'association de deux domaines fonctionnels génère un large éventail de combinaisons (Anantharaman and Aravind, 2003). A titre d'exemple, les antitoxines VapB3 de *M. tuberculosis* et VapB de *S. flexneri* possèdent toutes deux un domaine de neutralisation de la toxine non structuré, en revanche le domaine de fixation à l'ADN est du type RHH pour VapB3 (Min et al., 2012) et du type AbrB pour VapB (Dienemann et al., 2011). La classification des antitoxines est donc complexe. A cela il faut ajouter le fait que les structures primaires des antitoxines homologues sont peu conservées, mis à part les résidus impliqués dans l'interaction avec la toxine ou avec l'ADN.

A. La neutralisation de la toxine

Les antitoxines se fixent aux toxines en tant que dimères et neutralisent une à deux toxines monomériques ou dimériques. Certaines antitoxines possèdent un domaine de neutralisation non structuré qui acquiert leur structure secondaire en s'enroulant autour de la toxine, alors que d'autres ont un domaine structuré compact qui se plaque contre la toxine. Nous pouvons donc proposer une classification des antitoxines en deux catégories en fonction de la conformation de leur domaine de neutralisation de la toxine.

1. Domaine de neutralisation non structuré

Les antitoxines dimériques RelB, MazE, CcdA et YefM d'*E. coli*, VapB5 de *M. tuberculosis*, ParD du plasmide RK2 et Phd du prophage P1 ont une structure en forme de V (Arbing et al., 2010; Bøggild et al., 2012; Kamada et al., 2003; Madl et al., 2006; Miallau et al., 2008; Oberer et al., 2007). Le domaine responsable de la fixation à l'ADN forme un noyau globulaire au centre de la structure tandis que les deux domaines de neutralisation de la toxine forment les « bras » de la structure en V (Fig. 22).

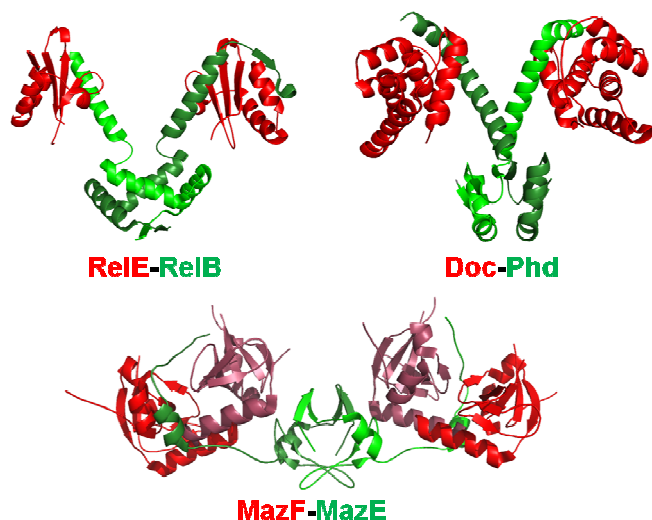


Fig. 22. Structures des complexes RelE-RelB (PDB 4FXE), Doc-Phd (PDB 3KH2) et MazF-MazE (PDB 1UB4). Les antitoxines dimériques sont en vert clair et vert foncé, les toxines monomériques sont en rouge et la toxine dimérique MazF est en rouge et violet.

En absence de toxine, les domaines de neutralisation sont non structurés, ils sont donc très sensibles aux protéases cellulaires Lon et ClpPX. Ces domaines acquièrent leur structure secondaire majoritairement hélicoïdale en présence de la toxine (*disorder to order model*) (Dalton and Crosson, 2010; De Jonge et al., 2009; Li et al., 2009). Chaque domaine s'enroule autour d'une toxine monomérique (ex : RelE) ou dimérique (ex : MazF) en s'insérant dans des sillons à leur surface. En général, la reconnaissance entre la toxine et son antitoxine se fait via des interactions électrostatiques, tandis que l'affinité entre les deux partenaires est majoritairement gouvernée par des interactions hydrophobes. Les résidus hydrophobes sont généralement conservés au sein des domaines de neutralisation d'une même famille (Dalton and Crosson, 2010).

L'inhibition de l'activité de la toxine par l'antitoxine peut s'effectuer par quatre mécanismes. Le complexe TA peut être trop volumineux pour que la toxine interagisse avec sa cible. Par exemple, l'antitoxine ParD se fixe à la toxine ParE et empêche l'interaction de ParE avec l'ADN gyrase par encombrement stérique (Dalton and Crosson, 2010; Oberer et al., 2007). Alternativement, le domaine de neutralisation peut obstruer le site actif de la toxine : l'antitoxine Phd masque le site de fixation de l'ATP de la toxine Doc (Castro-Roa et al., 2013) et l'antitoxine VapB5 empêche la fixation du Mg^{2+} nécessaire à l'activité catalytique de la toxine VapC5 (Miallau et al., 2008). Par ailleurs, le domaine de neutralisation peut provoquer des modifications structurales locales de la toxine et inhiber ainsi son activité. C'est le cas de l'antitoxine RelB qui, en déplaçant l'hélice α C-terminale de RelE, détruit son site actif (Li et al., 2009). Enfin, l'antitoxine CcdA a la capacité de dissocier le complexe préformé entre la toxine CcdB et la gyrase en provoquant une modification allostérique de la toxine (De Jonge et al., 2009; Maki et al., 1996). La toxine CcdB a deux conformations possibles : une lui permettant d'interagir avec la gyrase mais pas avec l'antitoxine, et l'autre lui permettant de se fixer à l'antitoxine mais pas à la gyrase (Fig. 23.1). L'extrémité du domaine de neutralisation de CcdA est capable de se fixer à la toxine CcdB complexée à l'ADN gyrase (Fig. 23.3). Cela provoque

une modification conformationnelle de CcdB qui se décroche de la gyrase et se fixe à la totalité du domaine de neutralisation de CcdA avec une forte affinité (Fig. 23.4 et 5).

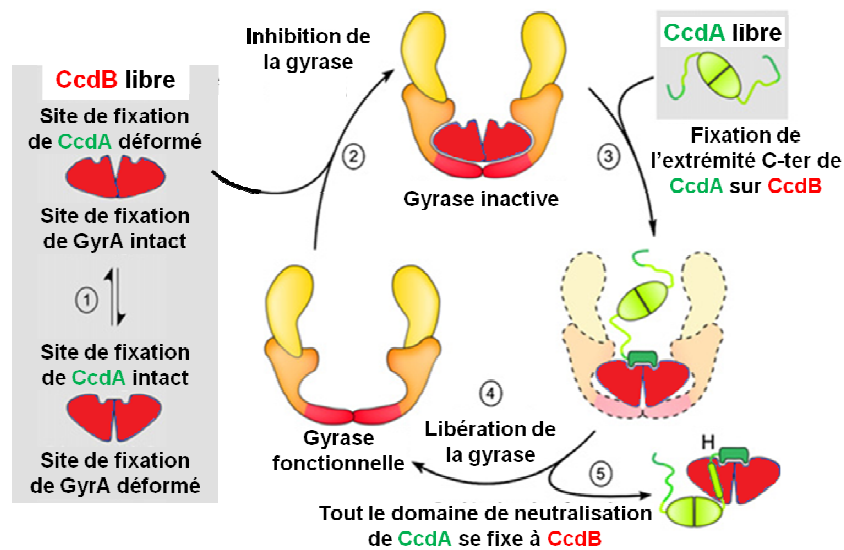


Fig. 23. La modification allostérique de la toxine CcdB par CcdA l'empêche d'inhiber la gyrase (adapté de De Jonge et al., 2009).

2. Domaine de neutralisation structuré

Contrairement aux antitoxines décrites ci-dessus, MqsA et HipB d'*E. coli*, Epsilon d'un plasmide de *S. pyogenes*, et HigA de *P. vulgaris* sont complètement structurées même en absence de leur toxine partenaire (Brown et al., 2009; Meinhart et al., 2003; Schumacher et al., 2009; Schureck et al., 2014). Elles possèdent des domaines de neutralisation plus compacts qui ne s'enroulent pas autour des toxines mais se plaquent contre elles pour les neutraliser (Fig. 24).

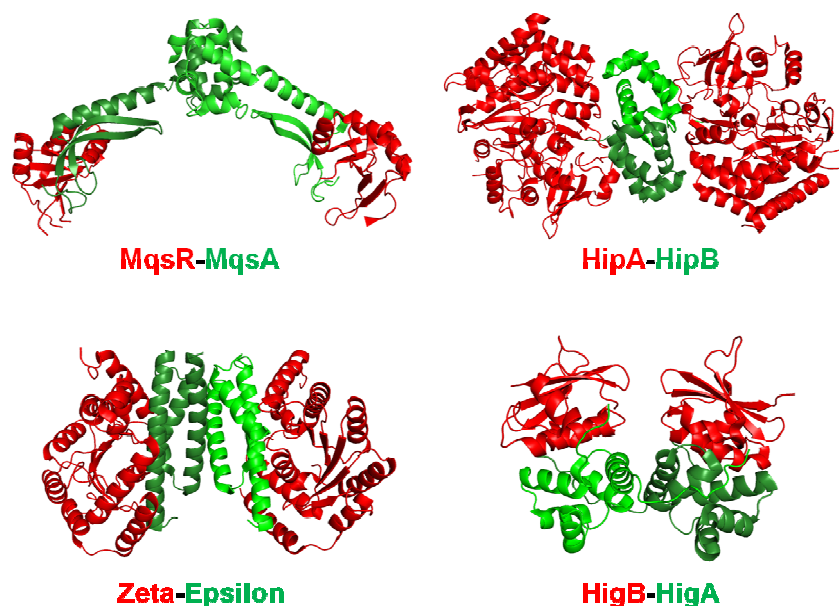


Fig. 24. Structures des complexes MqsR-MqsA (PDB 3GN5 et 3HI2), HipA-HipB (PDB 2WIU), Zeta-Epsilon (PDB 1GVN) et HigB-HigA (PDB 4MCT). Les toxines monomériques sont en rouge, les antitoxines dimériques sont en vert clair et vert foncé.

La structure du domaine de neutralisation de ces antitoxines est spécifique de chacune d'elles. Pour MqsA, le domaine est formé d'une longue hélice α reliée à un feuillet de trois brins β qui est stabilisé par un ion Zn^{2+} lié par quatre cystéines (Brown et al., 2009). Celui de l'antitoxine Epsilon est constitué d'un faisceau de trois longues hélices α (Khoo et al., 2007; Meinhart et al., 2003). Pour les antitoxines HigA et HipB, le domaine de neutralisation n'est pas séparé du domaine de fixation à l'ADN. L'interaction avec la toxine partenaire se fait via des éléments de structure à la fois N- et C-terminaux (Schumacher et al., 2009; Schureck et al., 2014).

Les antitoxines à domaine de neutralisation structuré inhibent l'activité des toxines par des mécanismes semblables à ceux des antitoxines à domaine de neutralisation non structuré. Il a été proposé que les antitoxines HigA et MqsA forment avec leur toxine respective des complexes trop volumineux pour s'insérer dans le site A du ribosome (Brown et al., 2009; Schureck et al., 2014). L'antitoxine Epsilon encombrerait le site de fixation de l'ATP de la toxine Zeta (Meinhart et al., 2003). En ce qui concerne l'antitoxine HipB, elle verrouillerait une conformation de la kinase HipA, empêchant ainsi le rapprochement entre le site de fixation de l'ATP et le site de fixation de GltX nécessaire au transfert du groupement phosphate (Germain et al., 2013; Schumacher et al., 2009).

B. La fixation à l'ADN

L'antitoxine, seule ou complexée à la toxine, autoréprime l'expression de l'opéron TA en se fixant au niveau d'une séquence palindromique pouvant être répétée une ou plusieurs fois dans la région promotrice. Ces séquences opératrices chevauchent généralement les boîtes -10 ou -35 du promoteur ou bien le site d'initiation de la transcription. La fixation de l'antitoxine bloque ainsi l'accès de l'ARN polymérase au promoteur. Le palindrome reconnu peut être divisé en deux demi-sites. La longueur d'un demi-site et celle de la séquence séparant chaque demi-site sont variables d'un STA à l'autre. Par exemple, la région promotrice de l'opéron *hipBA* contient quatre opérateurs de 18 pb, chacun constitué de deux demi-sites palindromiques de 5 pb séparés par 8 pb de séquences variables (Black et al., 1994). En comparaison, la région promotrice de l'opéron *fitAB* contient une séquence de 28 pb où les deux demi-sites palindromiques de 8 pb sont séparés par 12 pb riches en nucléotides AT (Mattison et al., 2006).

1. Les quatre types de domaines de fixation à l'ADN

Le domaine de fixation à l'ADN appartient à l'un des quatre types structuraux suivant : Hélice-Tour-Hélice (HTH), Ruban-Hélice-Hélice (RHH), AbrB, ou Phd/YefM.

a. Le domaine Hélice-Tour-Hélice (HTH)

Le domaine HTH classique est formé de trois hélices α (Fig. 25). L'hélice α_3 est responsable de la reconnaissance spécifique de l'ADN (*recognition helix*). Elle s'insère dans le grand sillon de l'ADN et interagit avec les bases nucléotidiques (Aravind et al., 2005). Les hélices α_2 et α_3 sont orientées à 120° l'une de l'autre et sont reliées par un tour de quatre résidus (Brennan, 1993). L'hélice α_1 stabilise le domaine HTH et lui confère une structure globulaire compacte de forme pyramidale. La boucle séparant α_1 et α_2 peut être plus ou moins longue et des extensions peuvent s'ajouter du côté N- ou C-terminal et participer à l'interaction avec l'ADN. Le domaine HTH est suffisant pour se fixer à l'ADN, toutefois les régulateurs à domaine HTH se lient à l'ADN en tant qu'homo-dimères : chaque domaine HTH se fixe sur un demi-site de la séquence palindromique, ce qui permet une répression efficace du promoteur. Les seules exceptions sont les régulateurs de la famille AraC qui se fixent à l'ADN en tant que monomères, puisqu'ils contiennent deux domaines HTH dans leur séquence (Rodgers and Schleif, 2009).

Les antitoxines HipB et MqsA d'*E. coli*, HigA de *P. vulgaris*, et PezA de *S. pneumoniae* constituent quelques exemples de régulateur à domaine HTH (Brown et al., 2010; Khoo et al., 2007; Schumacher et al., 2009; Schureck et al., 2014).

b. Le domaine Ruban-Hélice-Hélice (RHH)

Les régulateurs à domaine RHH sont toujours dimériques. Le motif RHH se compose d'un brin β suivi de deux hélices α (Fig. 26). Les brins β de deux monomères s'associent et forment un feuillet β antiparallèle, également appelé ruban, qui s'insère dans le grand sillon de l'ADN. Les résidus des brins β sont responsables de la spécificité de reconnaissance du site de fixation. Les hélices α stabilisent la structure du dimère et interagissent avec le squelette phosphate de l'ADN. Des extensions protéiques peuvent également s'ajouter du côté N- ou C-terminal du motif RHH (Gomis-Ruth, 1998; Schreiter and Drennan, 2007).

Bien qu'un domaine RHH soit suffisant pour se fixer à l'ADN, un régulateur de la famille RHH se fixe à l'opérateur en tant que dimère de dimères, chaque domaine RHH s'insérant dans un demi-site de la séquence palindromique. Pour les petites protéines essentiellement composées du domaine RHH, les deux dimères s'associent via les boucles α_1 - α_2 (protéine Arc, (Brown et al., 1990) ou via les hélices α_2 (protéine MetJ, (Rafferty et al., 1989). Pour

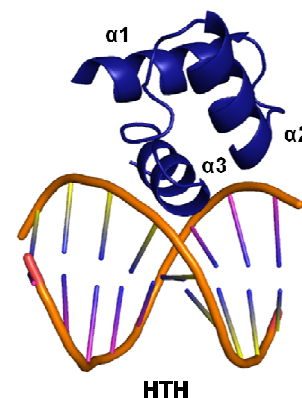


Fig. 25. Structure d'un domaine HTH lié à l'ADN (PDB 1K78).

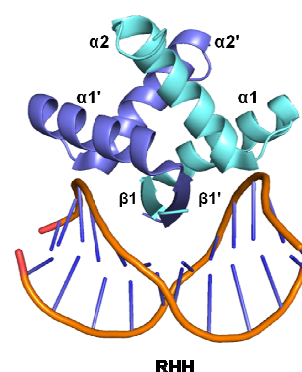


Fig. 26. Structure d'un domaine RHH lié à l'ADN (PDB 1PAR).

d'autres régulateurs, la tétramérisation fait intervenir des domaines indépendants des domaines RHH. Par exemple, le tétramère du régulateur NikR d'*E. coli*, impliqué dans l'assimilation du nickel, est formé de deux domaines RHH reliés par des domaines de type ferredoxine responsables de la tétramérisation (Fig. 27) (Schreiter et al., 2003).

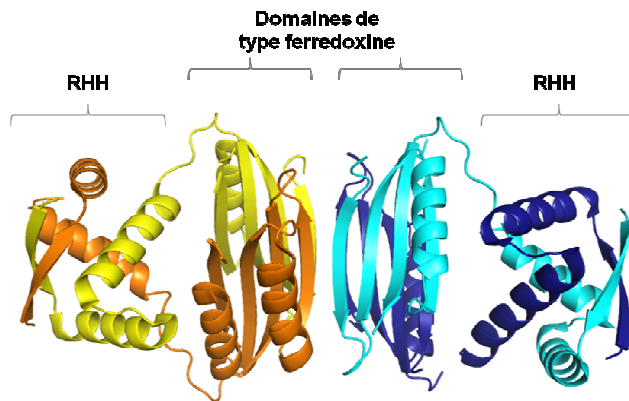


Fig. 27. Structure du tétramère NikR (PDB 1Q5V).

Enfin, certains régulateurs à domaine RHH interagissent par l'intermédiaire d'un co-régulateur protéique. C'est le cas par exemple de l'antitoxine FitA de *N. gonorrhoeae* (Fig. 28). Deux dimères FitA s'insèrent via leur domaine RHH dans deux demi-sites distants de 28 pb et sont connectés l'un à l'autre par l'intermédiaire de deux toxines dimériques FitB (Mattison et al., 2006).

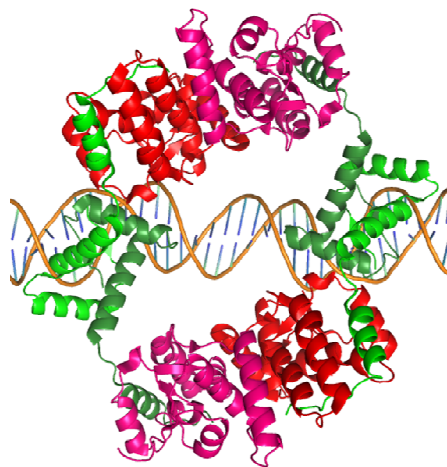


Fig. 28. Structure du complexe FitB-FitA de *N. gonorrhoeae* (PDB 2BSQ). Les monomères de toxine sont en rouge et rose. Les antitoxines dimériques sont en vert clair et vert foncé.

Les antitoxines RelB d'*E. coli* et CcdA du plasmide F sont d'autres exemples d'antitoxines à domaine de fixation à l'ADN du type RHH (Madl et al., 2006; Mattison et al., 2006; Overgaard et al., 2009).

c. Le domaine AbrB

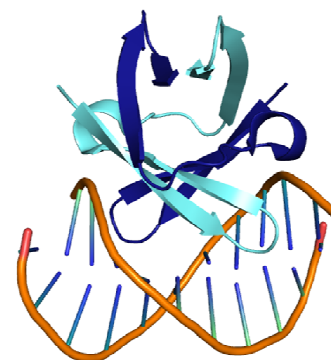
Le nom de ce domaine provient du régulateur transcriptionnel AbrB de *B. subtilis* qui contrôle l'expression de gènes impliqués dans la transition entre la phase de croissance exponentielle et la phase stationnaire ainsi que dans la sporulation (Coles et al., 2005; Strauch and Hoch, 1993). Ce domaine est formé par dimérisation. Chaque monomère apporte quatre brins β formant deux structures en épingle à cheveux (β -*hairpin*) antiparallèles séparées par une petite hélice α . Les structures en épingle à cheveux de chaque monomère sont imbriquées l'une dans l'autre et forment une structure typique en tonneau β avec des structures en épingles à cheveux entrelacées (*swapped-hairpin β barre*) (Fig. 29). Les boucles entre les brins $\beta 1$ et $\beta 2$ de chaque monomère s'insèrent dans le grand sillon de l'ADN et sont en contact avec les bases nucléotidiques. Les petites hélices α séparant les structures en épingle à cheveux de chaque monomère interagissent avec le squelette phosphate de l'ADN (Fig. 29).

Les antitoxines MazE d'*E. coli* et VapB2 de *R. felis* sont des exemples de régulateur à domaine AbrB (Kamada et al., 2003; Mate et al., 2011).

d. Le domaine Phd/YefM

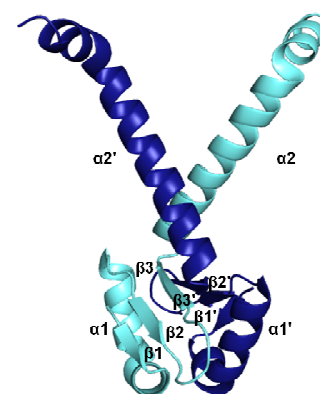
Le nom de ce domaine de fixation à l'ADN provient des antitoxines Phd du bactériophage P1 et YefM d'*E. coli* (Garcia-Pino et al., 2010; Kamada and Hanaoka, 2005). Ce domaine est aussi formé par dimérisation. Chaque monomère apporte un brin $\beta 1$ suivi d'une hélice α coudée, de deux brins β et d'une seconde hélice α coudée (Fig. 30). Les brins β des deux monomères forment un feuillet continu de six brins β antiparallèles. Les hélices $\alpha 1$ contiennent des résidus chargés positivement responsables de la fixation à l'ADN, tandis que les hélices $\alpha 2$ font la jonction entre les domaines N- et C-terminaux du dimère. Les hélices α des protéines Phd et YefM sont totalement déstructurées en absence de toxine et d'ADN.

Seul le feuillet β conserve sa structure secondaire. La fixation de la toxine au domaine C-terminal de l'antitoxine provoque sa stabilisation en une structure hélicoïdale. Cette stabilisation se propage jusqu'au domaine N-terminal où les hélices se forment et le domaine N-terminal devient alors compétent pour se fixer à l'ADN. Le couplage allostérique entre les domaines N- et C-terminaux de l'antitoxine se fait par l'intermédiaire de l'hélice $\alpha 2$ qui agit comme un canal de communication entre les deux domaines (Garcia-Pino et al., 2010).



AbrB

Fig. 29. Structure du domaine AbrB de l'antitoxine VapB2 de *R. felis* (PDB 1MVF).



Phd

Fig. 30. Structure de l'antitoxine Phd du phage P1 (PDB 3KH2) lié à la toxine Doc (non montrée).

2. La régulation coopérative conditionnelle

Les antitoxines sont responsables de la répression transcriptionnelle des opérons TA. En fonction du ratio toxine/antitoxine dans la cellule, l'antitoxine forme avec la toxine des complexes de différentes stœchiométries responsables du mécanisme de régulation coopérative conditionnelle. Lorsque le ratio toxine/antitoxine est faible, la toxine est généralement un co-répresseur : elle augmente l'affinité de l'antitoxine pour l'ADN et le complexe TA formé réprime efficacement le promoteur. En revanche, la toxine en excès devient un anti-répresseur. Elle déstabilise le complexe TA déjà fixé à l'ADN et le décroche de l'opérateur, ce qui entraîne la dérégulation de la transcription de l'opéron TA. Ce mécanisme de contrôle de la répression transcriptionnelle est appelé régulation coopérative conditionnelle. Il sera détaillé plus loin à travers la description des trois exemples : *relBE*, *ccdAB* et *vapBC*. Le ratio toxine/antitoxine est modulé par les conditions environnementales. Dans des conditions de croissance optimale, l'antitoxine est en excès par rapport à la toxine. Elle forme avec elle un complexe répresseur très efficace. Lors d'un stress environnemental, les protéases Lon et ClpPX sont surproduites. Elles dégradent préférentiellement l'antitoxine, plus instable que la toxine. La toxine en excès déstabilise alors les complexes TA fixés à l'ADN ce qui active l'expression de l'opéron TA. La production de la toxine est augmentée, ce qui entraîne la bactériostase. Lorsque les conditions de croissance redeviennent optimales, la production des protéases cellulaires diminue, l'antitoxine est moins rapidement dégradée, elle neutralise la toxine et il s'établit un ratio toxine/antitoxine compatible avec la formation d'un complexe TA répresseur (Cataudella et al., 2012).

Ce mode de régulation n'est toutefois pas universel puisque l'antitoxine MqsA d'*E. coli* agit seule pour réprimer l'expression de l'opéron *mqsRA* et la toxine MqsR agit uniquement en tant qu'anti-répresseur quelque soit le ratio toxine/antitoxine, comme nous l'expliquerons plus loin. Par ailleurs, il existe des antitoxines dépourvues de domaine régulateur. La régulation transcriptionnelle de l'opéron TA est alors assurée par d'autres régulateurs transcriptionnels.

a. Exemples de régulation coopérative conditionnelle

i. L'opéron *relBE*

La région promotrice *relBE* d'*E. coli* contient un seul opérateur *relO* de 24 pb formé de deux demi-sites palindromiques adjacents de 12 pb. L'antitoxine dimérique RelB est capable de se fixer seule sur *relO* mais son affinité pour l'ADN augmente en présence de la toxine monomérique RelE : la constante de dissociation (K_d) du complexe RelB/ADN diminue de 10^{-5} M à 10^{-8} M en présence de RelE (Li et al., 2008). Lorsque RelB est en excès, elle peut fixer RelE via l'un de ses deux domaines de neutralisation, l'autre domaine reste libre (complexe hétéro-trimérique RelE-RelB₂) (Fig. 31). Deux complexes RelE-RelB₂ peuvent se fixer sur *relO*, chaque antitoxine s'insérant dans un demi-site de 12 pb. Les deux domaines de neutralisation ne portant pas RelE interagissent l'un avec l'autre, ce qui permet une fixation

coopérative des deux complexes RelE-RelB₂ sur l'opérateur, soit au final RelE-RelB₂^RelB₂-RelE. En revanche, en présence d'un excès de toxine, deux molécules RelE supplémentaires peuvent se fixer aux domaines de neutralisation encore libres, ce qui conduit à la formation de complexes hétéro-tétramériques RelE-RelB₂-RelE (Fig. 31). L'encombrement stérique entre les nouveaux complexes force l'un des deux à se détacher de l'opérateur. Le deuxième complexe RelE-RelB₂-RelE peut rester fixé sur son demi-site, mais il est insuffisant pour bloquer la transcription, donc le promoteur de l'opéron *relBE* devient actif (Bøggild et al., 2012; Overgaard et al., 2009).

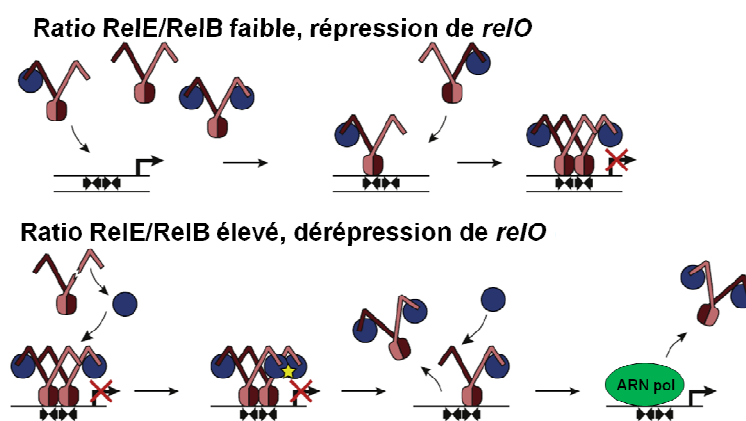


Fig. 31. Mécanisme de régulation coopérative conditionnelle de l'opéron *relBE*. La toxine RelE est en bleu et l'antitoxine dimérique RelB est en rose et violet (adapté de Bøggild et al., 2012).

ii. L'opéron *ccdAB*

La région promotrice de l'opéron *ccdAB* comporte, sur une séquence 113 pb, huit opérateurs d'environ 7 à 10 pb (dont un palindrome de 6 pb) espacés de 3 à 6 nucléotides (Dao-Thi et al., 2002). Lorsque l'antitoxine dimérique CcdA est en excès, elle se fixe sur chacun des opérateurs. La toxine dimérique CcdB connecte les molécules de CcdA entre-elles car elle contient deux sites de fixation de l'antitoxine et peut donc être liée à deux CcdA simultanément (Fig. 32). Il se forme alors une chaîne de CcdA et CcdB alternés, fixée au niveau de la région promotrice (Madl et al., 2006; Dao-Thi et al., 2002). En revanche, lorsque la toxine est en excès, les toxines additionnelles se fixent sur chacun des domaines de neutralisation des antitoxines CcdA. Il se forme alors des complexes hétéro-hexamériques CcdB₂-CcdA₂-CcdB₂ qui, à cause de l'encombrement stérique, ne peuvent rester fixés sur l'ADN. Leur décrochage entraîne la dérégulation du promoteur *ccdAB* (Fig. 32) (De Jonge et al., 2009; Madl et al., 2006).

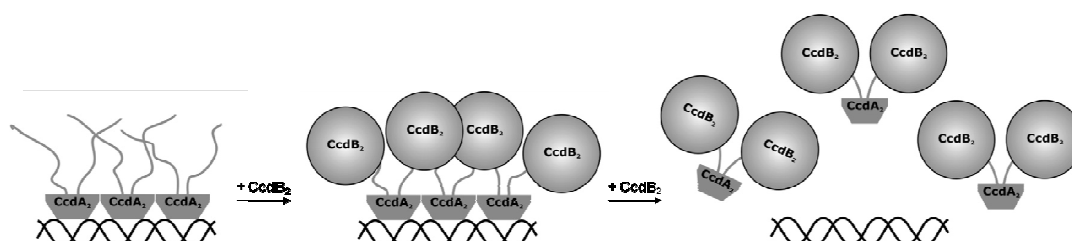


Fig. 32. Mécanisme de régulation coopérative conditionnelle de l'opéron *ccdAB* (adapté de Madl et al., 2006).

iii. L'opéron *vapBC*

La région promotrice de l'opéron du STA VapCB de *S. enterica* serovar Typhimurium LT2 contient deux opérateurs de 23 pb, distants de 16 pb, chevauchant les boîtes -35 et -10 du promoteur. Chaque opérateur contient deux demi-sites de 9 pb séparés par 5 pb (Winther and Gerdes, 2012). Lorsque l'antitoxine VapB est en excès, deux dimères de VapB se fixent de manière coopérative aux demi-sites d'un opérateur à l'aide de deux toxines dimériques VapC qui les relient l'une à l'autre. Il se forme un complexe répresseur hétéro-octamérique circulaire (VapC₂-VapB₂)₂ (Fig. 33 A).

Dans la cellule, la toxine VapC est en équilibre entre les formes monomérique et dimérique (Fig. 33 B). En présence d'un excès de toxine, les monomères VapC se fixent au complexe répresseur pour former deux complexes hétéro-hexamériques VapC₂-VapB₂-VapC₂ incapables d'interagir (Fig. 33 C). L'absence d'interaction entre ces deux complexes déstabilise la liaison à l'ADN et entraîne la dérégulation du promoteur *vapBC* (Winther and Gerdes, 2012).

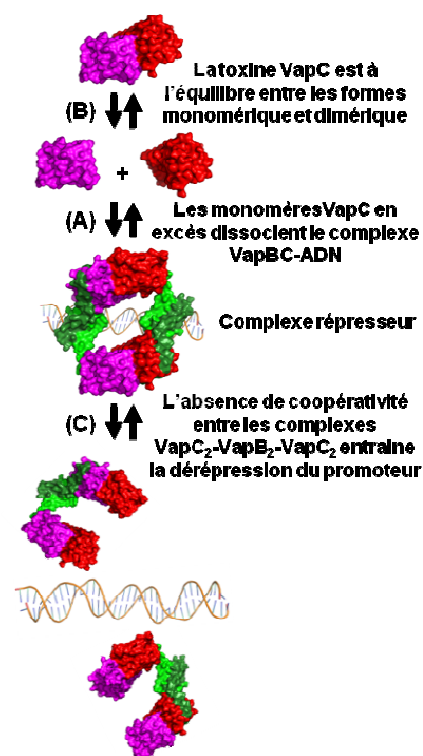


Fig. 33. Modèle de déstabilisation du complexe répresseur VapC-VapB par la toxine VapC en excès. L'antitoxine dimérique VapB est en vert clair et foncé et le dimère VapC est en rouge et rose (adapté de Winther et Gerdes 2012).

b. Le cas particulier de l'opéron *mqsRA*

Contrairement aux autres toxines, la toxine monomérique MqsR d'*E. coli* n'est pas un co-répresseur mais uniquement un anti-répresseur. De plus, l'antitoxine dimérique MqsA se fixe à l'ADN non seulement par son domaine HTH C-terminal qui s'insère dans le grand sillon de l'ADN, mais également par son domaine N-terminal, responsable de la neutralisation de MqsR, qui interagit avec le squelette phosphate en se refermant comme une pince sur l'hélice d'ADN (Fig. 34 A) (Brown et al., 2009). Dans cette conformation, MqsA ne peut pas se complexer à la toxine MqsR à cause de l'encombrement stérique entre MqsR et l'ADN (Fig. 34 B). La toxine MqsR est donc en compétition avec l'ADN pour se fixer à MqsA et agit comme anti-répresseur quelque soit sa concentration dans la cellule. En effet, en présence de la toxine, MqsA se dissocie de l'ADN pour former un complexe avec MqsR (Fig. 34 C). En conséquence, la transcription de l'opéron *mqsRA* est dérégulée (Brown et al., 2013).

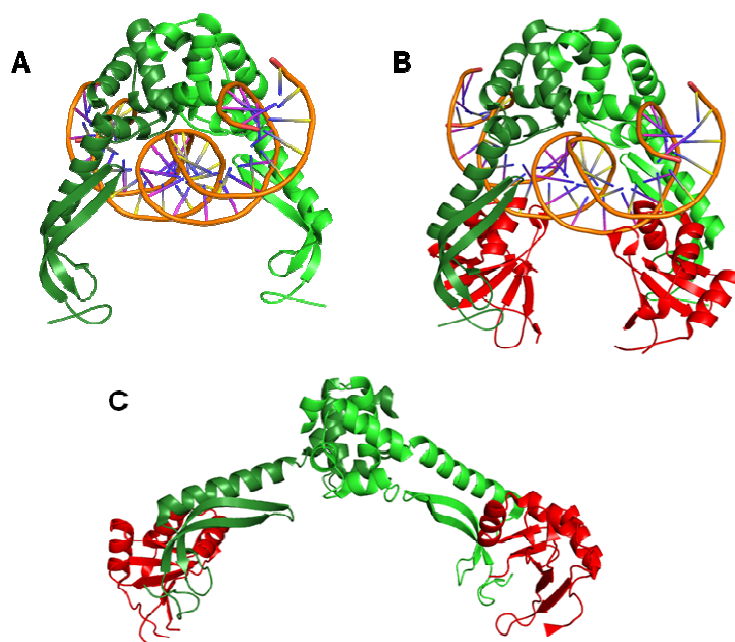


Fig. 34. (A) Structure de l'antitoxine dimérique MqsA fixée à l'ADN (PDB 3O9X). (B) Modélisation de la structure du complexe MqsR-MqsA fixé à l'ADN montrant les encombrements stériques entre MqsR et l'ADN. (C) Structure du complexe MqsR-MqsA (PDB 3GN5 et 3HI2). MqsA est en vert clair et vert foncé, MqsR est en rouge.

3. Les antitoxines sans domaine régulateur

Certaines antitoxines sont dépourvues de domaine de fixation à l'ADN. La régulation de l'opéron TA est alors assurée par un (ou des) régulateur(s) transcriptionnel(s) co-transcrit(s) avec les gènes TA ou même codé(s) ailleurs sur le génome. C'est le cas, par exemple, du STA Zeta-Epsilon codé sur le plasmide pSM19035 de *B. subtilis* et *S. pyogenes*. La répression de l'opéron *epsilon-zeta* est assurée par le régulateur transcriptionnel Omega, dont le gène est situé en amont et en opéron avec les gènes *epsilon* et *zeta*. Omega réprime également l'expression de *copS*, impliqué dans le contrôle du nombre de copies du plasmide, et celle de *delta* qui contrôle la partition du plasmide (Hoz et al., 2000).

Les gènes du STA chromosomique MazFE de *S. aureus* ne sont pas non plus autorégulés par l'antitoxine MazE. En revanche, ils sont réprimés par le facteur sigma alternatif σ^B , contrôlant la transcription de gènes impliqués dans la résistance au stress et dont le gène *sigB* est situé en aval et en opéron avec *mazEF*. Les gènes *mazEF* sont également activés par le régulateur transcriptionnel SarA en réponse à un stress thermique ou à la présence d'antibiotique (Donegan and Cheung, 2009).

V. Rôle des STA

Le rôle des STA dans le maintien de l'intégrité du génome a clairement été établi dans le cas des systèmes d'addiction plasmidique. En revanche, le rôle des STA dans l'adaptation des bactéries à leur environnement est encore débattu mais de nombreuses études attestent

leur implication dans la réponse au stress, la formation de biofilm, la persistance ou encore la défense contre l'infection phagique (Van Melderren and Saavedra De Bast, 2009; Tsilibaris et al., 2007; Wen et al., 2014).

A partir d'une étude phylogénétique comparant la distribution des gènes *ccdAB* sur le chromosome de 395 isolats d'*E. coli*, des auteurs ont proposé que, lors de leur intégration aux génomes bactériens, les gènes de STA sont dépourvus de rôle physiologique et à moins qu'ils ne soient recrutés par la bactérie pour une fonction particulière, ils dégénèrent progressivement jusqu'à être éliminés du génome (Mine et al., 2009).

A. STA et stabilisation d'éléments génétiques mobiles

Il a été proposé que les STA sont des éléments génétiques égoïstes, acquis par transfert horizontal de gènes et qu'ils se maintiennent dans les génomes grâce à leur propriété addictive. Ils stabilisent éventuellement les éléments génétiques qui les portent (plasmides, prophages, superintégrons, éléments intégratifs et conjugatifs) (Hayes and Van Melderren, 2011; Van Melderren and Saavedra De Bast, 2009).

Les STA plasmidiques augmentent la prévalence d'un plasmide dans une population bactérienne. De nombreux STA entraînent la mort post-ségrégationnelle des cellules n'ayant pas hérité d'une copie du plasmide lors de la division bactérienne. C'est le cas par exemple du STA CcdBA porté par le plasmide F d'*E. coli* décrit au début de cette introduction. Le STA Kid-Kis, porté par le plasmide à bas nombre de copies R1 d'*E. coli*, conduit non seulement à la mort post-ségrégationnelle des cellules dépourvues de plasmide mais participe également à la régulation du nombre de copies de R1 (Pimentel et al., 2005). Le nombre de copies de plasmide par cellule est contrôlé par différents systèmes de maintien, de partition et de résolution des dimères de plasmides qui permettent une répartition stable du plasmide lors de la division cellulaire. Ces systèmes ne sont toutefois pas infaillibles et la fréquence de perte de R1 est inférieure ou égale à 10^{-7} par division cellulaire (Nordström and Aagaard-Hansen, 1984). La réplication de R1 est contrôlée par la protéine d'initiation RepA. Le gène *repA*, porté par le plasmide R1, est co-transcrit avec *copB* à partir du promoteur faible constitutif *P_{copB}*, mais peut aussi être transcrit seul à partir du promoteur fort *P_{repA}*. CopB est un répresseur de *P_{repA}*. Ainsi lorsque le nombre de copies de R1 est normal, CopB et RepA sont produites toutes deux en faible quantité car CopB réprime *P_{repA}*, ce qui limite le taux de réplication du plasmide R1. Au cours de la division, lorsque le nombre de copies de R1 diminue dans une cellule fille, un déséquilibre dans le ratio des protéines Kid/Kis se produit en faveur de l'ARNase Kid car l'antitoxine Kis est plus rapidement dégradée par la protéase Lon qu'elle n'est produite à partir du faible nombre de copies du plasmide. La toxine libre en excès clive alors les ARNm cellulaires au niveau de la séquence UUACU, ce qui conduit à la bactériostase. Elle clive également l'ARNm *copB-repA* au niveau de la région intergénique, ce qui provoque sa dégradation par des exonucléases. La protéine CopB n'étant plus synthétisée, le promoteur *P_{repA}* est déréprimé. RepA est alors produite en plus grande

quantité ce qui augmente la réplication du plasmide R1. Lorsque le nombre de copies du plasmide est restauré, le ratio Kid/Kis se stabilise et la croissance bactérienne peut alors reprendre.

Les STA identifiés sur des prophages joueraient aussi un rôle de stabilisateurs. Les STA Doc-Phd, RelE-RelB et ParE2-PaaR2-PaaA2 codés sur les prophages P1 et Qin d'*E. coli* K-12, et CP933P d'*E. coli* O157:H7, participeraient au maintien de ces éléments dans le génome bactérien (Gotfredsen and Gerdes, 1998; Hallez et al., 2010; Lehnherr et al., 1993).

D'autres gènes de STA sont présents dans des super-intégrons. Ces derniers sont constitués de plusieurs cassettes génétiques impliquées dans l'activité métabolique, la virulence ou la résistance aux antibiotiques. Les super-intégrons codent également une intégrase qui catalyse des recombinaisons génétiques entre les différentes cassettes. Les STA peuvent être codés par ces cassettes (Mazel, 2006). Treize opérons de STA ont notamment été identifiés sur le super-intégron du chromosome II de *Vibrio cholerae* (Pandey and Gerdes, 2005). La présence des STA évite la perte des cassettes par le mécanisme de mort post-ségrégationnelle (Rowe-Magnus et al., 2003; Szekeres et al., 2007).

Par ailleurs, il a été montré que le système MosTA (*maintenance of SXT*) empêche la perte de SXT, un ICE d'environ 62 kb présent chez de nombreux isolats cliniques de *V. cholerae* (Waldor et al., 1996). Les ICE sont capables de s'intégrer au chromosome bactérien mais également de s'en exciser. Ils peuvent alors être transmis par conjugaison à une bactérie receveuse. Contrairement aux plasmides, les ICE extrachromosomiques sont incapables de se répliquer de manière autonome. Ils sont donc susceptibles d'être perdus lors de la division bactérienne s'ils ne sont pas intégrés au chromosome. Lorsque SXT est chromosomique, l'opéron *mosAT* est réprimé par l'antitoxine MosA. En revanche, lorsque SXT est extrachromosomique, des protéines participant à l'excision induisent l'expression de *mosAT*. Ainsi le système MosTA est activé lorsque SXT est extrachromosomique. Deux modèles peuvent alors expliquer comment MosTA assure le maintien de SXT dans la cellule. Le premier repose sur l'hypothèse que l'antitoxine MosA produite serait rapidement dégradée par les protéases cellulaires et la toxine MosT serait alors libre de ralentir la croissance cellulaire, ce qui permettrait à SXT de réintégrer le chromosome. Dans le second modèle, MosTA conduirait à la mort post-ségrégationnelle des bactéries n'ayant pas réintégré SXT dans leur chromosome avant de se diviser (Wozniak and Waldor, 2009).

B. STA et adaptation à l'environnement

Les populations bactériennes doivent continuellement s'adapter aux variations de leur environnement. Elles sont notamment soumises à des stress nutritionnels, thermiques, osmotiques et de pH. Elles doivent aussi se protéger contre les substances antimicrobiennes et se défendre contre les infections phagiques. Les STA sont activés en réponse à des conditions environnementales défavorables (Budde et al., 2006; Christensen et al., 2001; Christensen-Dalsgaard et al., 2010; Donegan and Cheung, 2009; Engelberg-Kulka et al.,

2005; Hazan et al., 2004; Hu et al., 2012; Jorgensen et al., 2008; Wang and Wood, 2011). Ils entraînent alors la dormance ou la mort cellulaire programmée des cellules, ils influent sur la persistance, la formation de biofilm, la virulence des bactéries et permettent de combattre les infections phagiques.

1. Voies d'activation des STA

Les STA sont activés en réponse à différents stress. Certains STA, comme MazFE et HipAB d'*E. coli*, sont activés lors de la réponse stringente (Aizenman et al., 1996; Christensen et al., 2001, 2003; Christensen-Dalsgaard et al., 2010; Jorgensen et al., 2008; Maisonneuve et al., 2013). La réponse stringente se produit lors d'une carence en acides aminés. Dans ce cas, des ARNt non chargés s'accumulent, entrent au niveau du site A du ribosome et bloquent la traduction. L'enzyme RelA s'associe alors au ribosome 70S bloqué et synthétise l'alarmone guanosine tétraphosphate (ppGpp) à partir d'ATP et de GTP (Wendrich et al., 2002). Le ppGpp peut également être synthétisé par l'enzyme SpoT en réponse à divers stress comme une carence en carbone, en acide gras ou en fer (Battesti and Bouveret, 2006; Vinella et al., 2005). Le ppGpp se lie à l'ARN polymérase, ce qui affecte l'expression de nombreux gènes. La synthèse des ARN stables (ARNr et ARNt) diminue, tandis que les voies de biosynthèse des acides aminés sont activées (Fig. 35) (Magnusson et al., 2005). Le ppGpp conduit aussi à l'accumulation de PolyP, un polymère linéaire de plusieurs centaines de résidus phosphate. Le PolyP active la protéase Lon en se complexant à elle (Fig. 35) (Kuroda et al., 1997). Lon dégrade alors les antitoxines, comme MazE et HipB, qui sont plus instables que les toxines. Cela entraîne une perturbation des ratios toxines/antitoxines dans la cellule et provoque la dérégulation des opérons TA. En conséquence, les toxines ne sont plus neutralisées et leur concentration dans le cytoplasme augmente ce qui conduit à la bactériostase ou à la mort cellulaire (Maisonneuve et al., 2013).

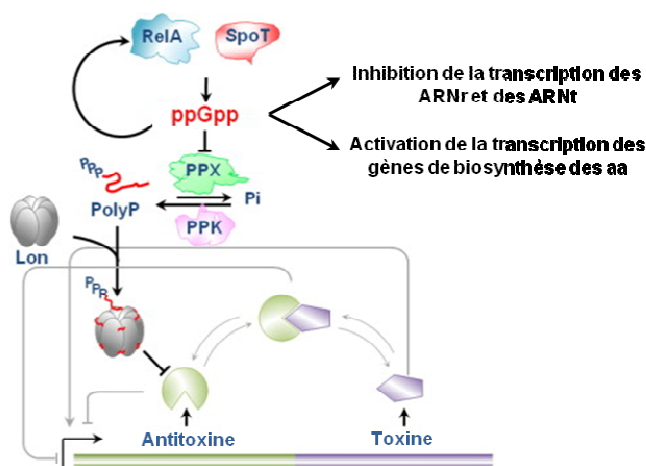


Fig. 35. Rôle du ppGpp lors de la réponse stringente (adapté de Maisonneuve et al., 2013).

Dans le cas du STA HipAB, la kinase HipA contribue à amplifier la réponse stringente. En effet, HipA inhibe la glutamyl-tRNA synthétase GltX, ce qui entraîne l'accumulation d'ARNt^{Glu} non chargé et active l'enzyme RelA. La toxine HipA assure donc un rétrocontrôle positif de la synthèse du ppGpp et augmente l'activation des STA sensibles à la protéase Lon lors de la réponse stringente (Kaspy et al., 2013).

Par ailleurs, il semble exister des voies d'activation des protéases indépendantes du ppGpp (Christensen et al., 2001). Des expériences ont montré qu'en cas de carence en acides aminés, l'expression de l'opéron *relBE* est fortement induite chez *E. coli* délété ou non des gènes *relA* et *spoT*, mais elle ne l'est pas chez un mutant du gène *lon*. Il a également été montré que l'expression de certains STA est activée lors de dommages à l'ADN, de forte température, de stress oxydatif ou de la présence d'antibiotique et qu'elle dépend de la présence des protéases Lon et ClpPX (Christensen-Dalsgaard et al., 2010; Hazan et al., 2004; Prysak et al., 2009; Wang et al., 2011). Il est donc probable que, lors de stress environnementaux, plusieurs voies mènent à l'activation des protéases cellulaires qui, à leur tour, activent les STA.

2. Phénotypes induits par l'activation des STA

Le rôle des STA au cours d'un stress nutritionnel a longtemps été controversé. Il a d'abord été suggéré que l'activation de STA entraîne une inhibition de la croissance cellulaire qui peut être restaurée suite à la néosynthèse des antitoxines. Cette bactériostase est réversible dans une période limitée par un « point de non retour » au delà duquel les effets de la toxine sont irréversibles et conduisent à la mort de la cellule (Amitai et al., 2004). Il semble maintenant admis que lors de conditions défavorables, certains STA entraînent la mort des cellules, alors que d'autres permettent à la bactérie de s'adapter et de survivre.

a. La mort cellulaire programmée

La mort cellulaire programmée (MCP) est un mécanisme actif qui mène au suicide de la cellule. Ce mécanisme est essentiel puisqu'il permet d'éliminer des cellules endommagées ou superflues et de préserver le reste de la population saine. Bien que le terme MCP soit principalement utilisé pour décrire la mort des cellules eucaryotes par apoptose, les populations bactériennes sont également capables de subir ce type de mort.

Chez *E. coli*, le STA MazFE est le principal acteur de la MCP. Lors d'un stress environnemental, MazFE est activé via la protéase Lon. L'ARN interférase MazF libre peut alors dégrader jusqu'à 90% des ARNm et entraîner la synthèse sélective de 10% des protéines grâce à la formation d'une machinerie de traduction alternative composée de ribosomes de stress et d'ARNm décapités (voir le paragraphe III.B.1.a. p. 17) (Vesper et al., 2011). Parmi les protéines produites par la machinerie alternative, six d'entre elles (ClpP, SlyD, YfiD, ElaC, YgcR et YfbU) participent à la mort cellulaire lors de dommages à l'ADN provoqués par un traitement antibiotique (comme l'acide nalidixique) et/ou lors de l'inhibition

de la traduction par la spectinomycine. De manière surprenante, cinq autres protéines produites par la même machinerie (YajQ, RsuA, DeoC, SoxR, SoxS) sont requises pour la survie d'une sous-population bactérienne. Le mode d'action de chacune de ces protéines n'a pas encore été clairement identifié mais il est remarquable que l'activation du système MazFE affecte la totalité de la population bactérienne en provoquant la mort de la majorité des bactéries et en permettant à une petite fraction de survivre (Amitai et al., 2009). Il a été suggéré que la mort des bactéries permet la libération de nutriments et de molécules de signalisation utilisables par les bactéries survivantes (lorsque les conditions environnementales redeviennent plus favorables) pour qu'elles donnent naissance à une nouvelle population (Kolodkin-Gal et al., 2007).

Il est à noter que la MCP ne se produit que lorsque la population bactérienne est suffisamment dense. A partir d'une concentration cellulaire de 10^7 bactéries/mL, sous l'effet d'un stress, *E. coli* sécrète un facteur de *quorum sensing* appelé *Extracellular Death Factor* (EDF) déclenchant la MCP (Kolodkin-Gal et al., 2007). EDF est un pentapeptide linéaire (Asn-Asn-Trp-Asn-Asn) généré par le clivage d'un fragment de la glucose-6-phosphate déshydrogénase par le complexe protéasique ClpXP (Kolodkin-Gal and Engelberg-Kulka, 2008). D'une part, EDF amplifie l'activité ARNase de MazF et d'autre part, il se lie à l'antitoxine MazE, ce qui empêche la formation du complexe MazFE et donc la neutralisation de la toxine (Belitsky et al., 2011).

La MCP peut se produire dans des populations bactériennes planctoniques mais aussi dans les biofilms. Alors que le STA MazFE d'*E. coli* entraîne la MCP quelque soit le mode de vie de la bactérie, le STA YafQ-DinJ d'*E. coli* entraîne la MCP des bactéries uniquement lorsqu'elles sont associées en biofilm (Kolodkin-Gal et al., 2009).

Enfin, la MCP peut également être induite lors d'une infection phagique. Il a été montré que le STA MazFE d'*E. coli* permet d'éliminer le phage P1 de la population bactérienne infectée. En effet, un mutant $\Delta mazEF$ infecté par le phage P1 produit plus de particules virales que la souche sauvage (Hazan and Engelberg-Kulka, 2004). Lors de l'infection, le STA MazFE entraîne la mort des cellules infectées, ce qui empêche la production et la libération de nouveaux virions dans la population bactérienne. La MCP provoquée par le STA MazFE peut être considérée comme un phénomène altruiste puisqu'en se « sacrifiant », la cellule infectée protège l'ensemble de la population bactérienne contre la propagation du phage P1.

b. La dormance bactérienne et la persistance

i. La dormance

La dormance bactérienne est un état physiologique réversible, induit lors de stress environnementaux, dans lequel le métabolisme est ralenti : la bactérie ne se divise pas, mais elle survit. Le STA RelEB d'*E. coli* induit la dormance des bactéries en présence de chloramphénicol ou lors d'une carence en acides aminés ou en glucose (Christensen and Gerdes, 2003; Pedersen et al., 2002). Dans ces conditions, l'antitoxine RelB est dégradée par

la protéase Lon et l'ARNase RelE est libre de cliver les ARNm lors de leur traduction au niveau du site A du ribosome (Neubauer et al., 2009). Les ARNm endommagés restent alors liés aux ribosomes et bloquent leur activité (Christensen and Gerdes, 2003). RelE accentue donc l'inhibition de la traduction induite par le chloramphénicol ou par la carence nutritionnelle. Ce mécanisme permet de réduire la consommation d'énergie et celle des acides aminés libres qui seront utilisés lorsque les conditions de croissance redeviendront favorables (Christensen et al., 2001). Les mécanismes qui conduisent à la reprise de la croissance bactérienne ne sont pas encore élucidés. Il semble toutefois que lorsque le signal conduisant à l'activation des protéases s'arrête, la synthèse des antitoxines reprenne et leur capacité à réprimer l'opéron TA par coopérativité conditionnelle permettrait de restaurer rapidement un ratio toxine/antitoxine bas dans la cellule et de neutraliser les toxines libres (Cataudella et al., 2012; Maisonneuve and Gerdes, 2014).

ii. La persistance

Les bactéries persistantes sont définies comme des cellules qui entrent spontanément en dormance et sont ainsi capables de tolérer des doses bactéricides d'antibiotiques (Lewis, 2010). La persistance est un état réversible. Contrairement aux bactéries résistantes, les persistants n'ont pas acquis de modification génétique leur permettant de survivre en présence d'antibiotiques, il s'agit de variants phénotypiques et leur progéniture reste sensible aux antibiotiques (Allison et al., 2011). Les cellules persistantes sont à l'origine de l'échec de certaines thérapies antibiotiques (Botelho-Nevers et al., 2012). Elles joueraient un rôle majeur dans la chronicité des infections à *Pseudomonas aeruginosa* ou dans la latence de *M. tuberculosis* (Keren et al., 2012). Les persistants représentent une petite fraction de la population (0,001% des bactéries en phase exponentielle de croissance et jusqu'à 1% des bactéries en phase stationnaire) qui apparaissent de manière stochastique pour parer à un éventuel stress qui serait fatal à la population bactérienne (Fasani et Savageau, 2013; Lewis, 2008). La fréquence des persistants augmente en présence de stimuli environnementaux (stress nutritionnel, oxydatif, thermique ou de pH, présence d'antibiotique) (Dörr et al., 2010; Kwan et al., 2013; Vega et al., 2012).

Le STA HipAB fut le premier STA identifié comme étant impliqué dans la persistance d'*E. coli* K-12 (Moyed et Bertrand, 1983). Une double mutation dans le gène de toxine *hipA* (G22S et D291A) entraîne une diminution de l'affinité de fixation de l'antitoxine HipB pour la toxine HipA7 et conduit à un phénotype d'hyper-persistance. La fréquence de persistance du mutant *hipA7* est de 10^{-2} en présence d'ampicilline alors qu'elle est de 10^{-5} à 10^{-6} pour la souche sauvage. De plus, la délétion du STA HipAB diminue drastiquement la persistance d'un facteur 10 à 100 dans une population bactérienne en phase stationnaire ou en biofilm (Keren et al., 2004).

D'autres STA sont également impliqués dans la persistance. Des études transcriptomiques ont montré que les opérons *relBE*, *mazEF*, *higBA*, *dinJ-yafQ*, *yoeB-yefM* et

mqsRA sont fortement induits dans les cellules persistantes d'*E. coli* (Keren et al., 2004; Kohanski et al., 2007; Shah et al., 2006). De plus, la surproduction ectopique des ARNases toxiques RelE, YafQ ou MazF conduit à l'augmentation du nombre de cellules persistantes chez *E. coli* (Falla and Chopra, 1998; Harrison et al., 2009; Keren et al., 2004; Vázquez-Laslop et al., 2006). En revanche, la délétion de chacun de ces STA n'entraîne aucune modification de la fréquence de persistance, ce qui suggère qu'ils ont une activité redondante. Cela a été confirmé par Maisonneuve et al., qui ont remarqué que la délétion de quatre STA contenant des ARNases toxiques n'a aucun effet sur la formation des persistants chez *E. coli* mais qu'au-delà, la délétion successive des STA provoque une diminution progressive de la persistance. La délétion de dix STA contenant des ARNases entraîne ainsi une réduction de 100 à 200 fois du taux de persistance chez *E. coli* (Maisonneuve et al., 2011).

Le système MqsRA d'*E. coli* joue un rôle important dans la formation des persistants. Non seulement, le gène de toxine *mqsR* est le gène le plus surexprimé dans les cellules persistantes (Shah et al., 2006) mais en plus l'absence de toxine affecte la persistance (Kim and Wood, 2010). Le STA MqsRA est atypique puisque l'antitoxine MqsA réprime l'expression de plusieurs gènes en plus de son propre opéron (Kim et al., 2010; Wang et al., 2011; Zhang et al., 2008). Ainsi, lorsque le STA MqsRA est activé, l'expression des gènes réprimés par MqsA est déréprimée (Fig. 36). C'est le cas de *cspD* qui code une protéine inhibant la réplication de l'ADN et qui augmente la persistance (Yamanaka et al., 2001) et de *rpoS* codant le facteur de transcription σ^S , le régulateur majeur de la réponse générale au stress qui influe aussi sur la persistance (Hong et al., 2012). L'activation du système MqsRA permet également l'expression du régulateur transcriptionnel Hha. Ce dernier induit la production des protéases Lon et ClpPX qui activent ensuite les STA contribuant à la persistance (Fig. 36) (García-Contreras et al., 2008; Kim and Wood, 2010). Par ailleurs, la toxine MqsR, qui clive spécifiquement les ARNm aux sites GCU, dégrade l'ARNm de l'antitoxine GhoS, ce qui permet la synthèse de la toxine GhoT (Fig. 36) (Wang et al., 2013; Yamaguchi et al., 2009). Cette toxine membranaire réduit la synthèse d'ATP, ce qui conduit à une réduction du métabolisme cellulaire et permet aux bactéries de survivre en présence d'antibiotiques (Cheng et al., 2014). Ainsi le STA MqsRA est un STA majeur capable d'activer tout un réseau de STA et d'influer sur l'expression de nombreux gènes participant à la réponse au stress chez *E. coli* (Wang et al., 2011).

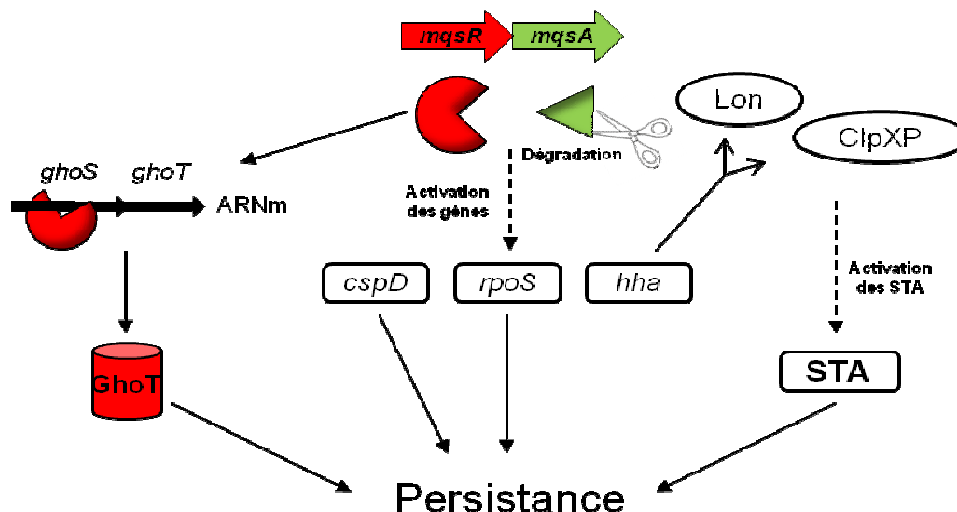


Fig. 36. L'activation du STA MqsRA induit la persistance chez *E. coli*.

c. La formation de biofilm

Un biofilm est une communauté de bactéries agrégées sur une surface et qui sécrètent une matrice extracellulaire polymérique formée d'ADN, d'exopolysaccharides et de protéines. Cette matrice constitue une barrière physico-chimique qui protège les bactéries des agents antimicrobiens. Au sein du biofilm, où les ressources en nutriments sont faibles, les bactéries sont en dormance et sont de ce fait moins susceptibles aux antibiotiques (Costerton et al., 1999).

Certains STA participent aux différentes étapes du cycle de vie du biofilm (l'attachement à une surface, la formation de microcolonies, la maturation du biofilm et la dispersion). Les cinq STA ChpBKI, MazFE, RelEB, YafQ-DinJ et YoeB-YefM d'*E. coli* participent aux étapes de formation et de dispersion du biofilm (Kim et al., 2009). En effet, la perte de l'une ou l'autre des toxines de ces systèmes tout comme la perte simultanée des cinq STA (mutant $\Delta 5$) diminue la formation de biofilm dans les étapes initiales (après 8 h de croissance). En revanche, la dispersion des bactéries $\Delta 5$ à partir d'un biofilm mature est diminuée par rapport à la souche sauvage, après 24 h de croissance, ce qui se traduit par une augmentation de la quantité de biofilm. Ainsi, les cinq STA ont des effets contraires sur la production du biofilm en fonction de la temporalité. La comparaison des transcriptomes des souches $\Delta 5$ et sauvage cultivées en biofilm pendant 8 ou 24 h, a montré qu'en absence des cinq STA, le gène *tabA* (*toxin-antitoxin biofilm protein A*, précédemment nommé *ygjK*) est surexprimé. Ce résultat suggère que les cinq STA contrôlent négativement l'expression du gène *tabA*, bien que les mécanismes conduisant à sa répression ne sont pas encore connus (Kim et al., 2009). Les mêmes auteurs ont montré que le gène *tabA* code un répresseur direct ou indirect des gènes de synthèse des fimbriae de type I (Kim et al., 2009). La perte de TabA augmente la quantité de biofilm produit après 8 h de croissance et augmente la dispersion des bactéries du biofilm après 24 h de croissance, ce qui est l'inverse des observations faites pour le mutant $\Delta 5$. Ainsi, Kim et al. ont proposé que lors des premières étapes de développement du biofilm, les STA

activent l'expression des gènes de synthèse des fimbriae, indispensables à la formation du biofilm. En revanche, lorsque le biofilm est mature, les STA favorisent la dispersion des bactéries, ce qui se traduit par une diminution de la quantité de biofilm (Kim et al., 2009).

L'antitoxine MqsA du STA MqsRA est également très importante puisqu'elle intervient dans le passage des bactéries de l'état planctonique à l'état sessile dans le biofilm (Van Houdt and Michiels, 2005; Wang et al., 2011; Zhang et al., 2008). En absence de stress particulier, MqsA réprime le gène *rpoS*, codant le facteur de transcription σ^S , ce qui permet la synthèse des flagelles qui favorisent la motilité (Fig. 37). MqsA réprime aussi les gènes de régulation *mcbR* et *csgD*, ce qui inhibe la synthèse des curli, qui jouent un rôle dans l'adhérence, et celle de l'acide colanique, un composant de la matrice extracellulaire (Fig. 37). En revanche, en présence du facteur de *quorum sensing* AI-2 ou lors d'un stress oxydatif, l'antitoxine MqsA est dégradée par la protéase Lon (Fig. 37) (Gonzalez Barrios et al., 2005; Wang et al., 2011). La motilité est alors inhibée et l'expression des gènes contrôlant la synthèse des curli et de l'acide colanique est induite, ce qui amplifie la formation de biofilm (Fig. 37).

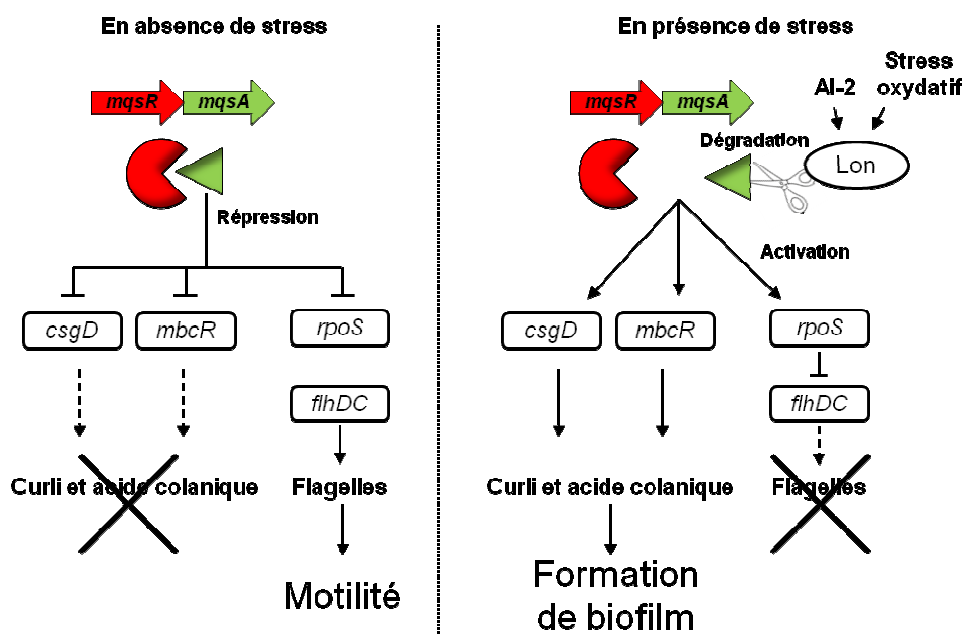


Fig. 37. Le STA MqsRA influence la formation de biofilm chez *E. coli*.

Par ailleurs, un septième STA d'*E. coli*, le module HipAB, est impliqué dans le développement du biofilm. En absence de la toxine HipA, la formation du biofilm est réduite, les cellules sont moins lysées et la quantité d'ADN présente dans la matrice extracellulaire est plus faible que pour la souche sauvage. Ainsi, il a été proposé que la toxine HipA entraîne la lyse des bactéries, ce qui permet de libérer de l'ADN génomique, un composant de la matrice extracellulaire du biofilm (Zhao et al., 2013).

Si le rôle des STA dans la formation de biofilm a été essentiellement mis en évidence chez *E. coli*, il a aussi été établi chez d'autres espèces bactériennes telles que

S. pneumoniae, *Treponema denticola* et *Burkholderia cenocepacia* (Van Acker et al., 2014; Chan et al., 2012; Mitchell et al., 2010).

d. La virulence

Certains STA contribuent à la pathogénicité des bactéries en assurant le maintien des plasmides de virulence qui les portent. C'est le cas du STA MvpTA du plasmide de virulence pMYSH6000 de *S. flexneri* (Sayeed et al., 2000) ou du STA Zeta-Epsilon du plasmide pSM19035 de *S. pyogenes* (Mutschler and Meinhart, 2011).

D'autres STA modulent directement la virulence bactérienne. Par exemple, la toxine MazF-Sa de *S. aureus* contrôle négativement la synthèse de plusieurs facteurs de virulence via son activité ARNase spécifique. L'un des ARNm ciblés par MazF-Sa est *sraP*. La glycoprotéine SraP est impliquée dans l'adhérence des bactéries aux plaquettes sanguines et son ARNm est très sensible à l'activité de MazF-Sa puisqu'il contient 43 sites de reconnaissance de l'ARNase (Zhu et al., 2009). A l'inverse, les ARNm de TcdB et CwpB de *Clostridium difficile*, protéines impliquées respectivement dans la destruction de l'épithélium intestinal et l'adhérence de la bactérie, sont résistants à l'activité ARNase de MazF-Cd (Rothenbacher et al., 2012).

Un autre exemple est celui du STA PezTA de *S. pneumoniae* dont la perte de la toxine PezT réduit la virulence de *S. pneumoniae* chez la souris (Brown et al., 2004). Il a été proposé que la toxine PezT, qui inhibe la synthèse du peptidoglycane, provoque la lyse des cellules et permet la libération de la pneumolysine, une exotoxine qui entraîne l'apoptose, voire la lyse des cellules eucaryotes, active le complément et induit une réaction pro-inflammatoire (Mutschler et al., 2011).

Certains STA sont spécifiquement exprimés lors de l'infection. Par exemple, onze STA de *S. typhimurium* sont exprimés dans les macrophages murins infectés (De la Cruz et al., 2013). L'un de ces STA, SehAB dont la toxine SehA est homologue à la toxine du STA HigBA d'*E. coli*, est spécifiquement impliqué dans la virulence de la bactérie. En effet, la délétion de l'opéron *sehAB* réduit la virulence de *S. typhimurium* chez la souris, mais uniquement lors d'une inoculation par voie orale et non par voie intrapéritonéale. Ainsi les auteurs proposent que le STA SehAB est impliqué dans les étapes précoces de l'infection lorsque la bactérie colonise l'estomac (De la Cruz et al., 2013).

2^{ème} partie. *Yersinia pestis*, l'agent étiologique de la peste

I. Les pandémies historiques et la situation actuelle de la peste

La peste est une maladie hautement mortelle qui a tué des millions de personnes au cours de trois grandes pandémies (Cohn, 2008; Signoli, 2012). La première pandémie, appelée peste de Justinien d'après le nom de l'empereur romain de l'époque (règne de 527 à 565), a débuté en 541 en Egypte. En empruntant les voies maritimes marchandes, la maladie s'est rapidement répandue à travers tout le bassin méditerranéen, atteignant en moins de deux ans la Perse à l'est et l'Irlande au nord. Cette pandémie, qui a duré environ 250 ans, aurait causé cent millions de morts. La seconde pandémie, connue sous le nom de peste noire, a débuté en Asie centrale vers 1330 et s'est propagée au nord de l'Afrique et à travers tout le continent européen. C'est au cours de cette pandémie que le concept de quarantaine est apparu. Des vagues épidémiques ont permis à la peste noire de persister jusqu'au 18^e siècle. Deux épisodes marquants ont été la peste de Londres, en 1665-1666, qui décima environ 20% de la population de la ville, et la peste de Marseille, en 1720-1722, qui causa la mort de presque 50% des Marseillais. Au cours de cette seconde pandémie, la peste aurait tué 30% à 60% de la population européenne avec un nombre de décès estimé à 50 millions en quatre siècles. La troisième pandémie, ou peste moderne, débuta dans la seconde moitié du 19^e siècle en Chine. Elle atteignit Hong-Kong en 1894 et s'étendit rapidement à l'Inde où elle aurait causé 12 millions de morts entre 1898 et 1928. La peste s'est ensuite répandue dans le monde grâce aux échanges commerciaux et à la navigation à vapeur. Elle atteignit l'Arabie Saoudite, la Turquie et Madagascar ainsi que des zones qui avaient été jusque là épargnées comme le sud des continents africain et américain. La pandémie de peste a ainsi perduré jusqu'à la seconde guerre mondiale (Cohn, 2008; Signoli, 2012). C'est en 1894 à Hong-Kong, qu'Alexandre Yersin isola l'agent responsable de la peste (Yersin, 1894). A la même période, Ogata et Simond découvrirent que la puce est le vecteur de la maladie (Simond, 1905). Tout d'abord nommée *Pasteurella pestis*, c'est seulement en 1970 que le nom *Yersinia pestis* fut définitivement attribué à la bactérie responsable de la peste.

De nos jours, la peste menace toujours la population mondiale (WHO, 2000). Elle est présente sur tous les continents, excepté l'Europe et l'Océanie. Des foyers endémiques existent en Afrique, plus particulièrement à Madagascar, en République Démocratique du Congo et en Tanzanie, en Asie et dans les deux sous-continentes américains, notamment aux Etats-Unis et au Pérou. Suite à la recrudescence du nombre de cas de peste dans les années 1980, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a classé cette maladie comme ré-émergente. Entre les années 1987 à 2009, plus de 50 000 cas de peste, dont 3870 décès, ont été déclarés à l'OMS (WHO, 2010).

II. L'agent pathogène *Yersinia pestis*

Y. pestis appartient à la famille des entérobactéries. Parmi les 17 espèces du genre *Yersinia* (Bosák et al., 2012), trois sont pathogènes pour l'Homme : *Y. pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis* et *Yersinia enterocolitica*, les deux dernières étant responsables de maladies gastro-intestinales.

Y. pestis est une bactérie à Gram négatif de forme coccobacillaire, anaérobie facultative, non motile et non sporulée. Elle croît à des températures comprises entre 4°C et 40°C, et dans des milieux de pH allant de 5 à 9,6 (Perry and Fetherston, 1997). Dans des conditions optimales de croissance, où la température est de 28°C et le pH compris entre 7,2 et 7,6, son temps de génération est d'environ deux heures. *Y. pestis* est auxotrophe pour la cystéine, la glycine, la méthionine, l'isoleucine, la phénylalanine et la valine (Almeida and Leal, 2012), de plus sa croissance à 37°C nécessite l'addition de biotine, de thiamine, de panthénate et d'acide glutamique dans le milieu de culture (Perry and Fetherston, 1997). *Y. pestis* a une enveloppe cellulaire et une composition membranaire lipidique typiques des entérobactéries. Son lipopolysaccharide (LPS) est cependant dépourvu d'antigène O, on parle alors de lipooligosaccharide (LOS). Au-delà de 33°C, *Y. pestis* synthétise une pseudo-capsule glycoprotéique formée par l'antigène F1 (Perry and Fetherston, 1997).

Le génome de *Y. pestis* est composé d'un chromosome de 4,6 Mb et de trois plasmides pPCP1 (ou pPla) de 9,5 kb, pCD1 (ou pYV) de 70 kb et pMT1 (ou pFra) de 100 kb.

Y. pseudotuberculosis est l'ancêtre de *Y. pestis*, bien que la pathogenèse de ces deux bactéries soit très différente. La première est responsable d'une maladie entérique rarement fatale, transmise par l'ingestion d'un aliment ou d'une boisson contaminés, alors que la seconde est responsable d'une maladie invasive hautement mortelle, transmise par piqûre de puce infectée (Achtman et al., 1999). L'émergence de *Y. pestis* a eu lieu il y a moins de 6400 ans avant aujourd'hui (Sun et al., 2014), elle a été marquée, entre autre, par l'acquisition des deux plasmides pMT1 et pPCP1. Les protéines codées par ces deux plasmides auraient contribué à augmenter la survie de *Y. pestis* dans la puce et à faciliter sa dissémination dans la peau des mammifères infectés. De plus, l'inactivation de nombreux gènes de *Y. pestis*, notamment par l'insertion de séquences mobiles (IS, *insertion sequence*), aurait favorisé la transmission de la bactérie par la puce et aurait causé la perte de sa capacité à coloniser le tractus gastro-intestinal (Achtman et al., 1999; Cui et al., 2013; Sebbane et al., 2006; Sun et al., 2014).

Y. pestis se serait ensuite différenciée en trois biovars : les souches du biovar Antiqua sont capables de réduire le nitrate en nitrite et de fermenter le glycérol, celles du biovar Medievalis sont incapables de réduire le nitrate, et celles du biovar Orientalis ne fermentent pas le glycérol.

III. Hôtes et vecteurs de la maladie

La peste est une zoonose qui affecte principalement les rongeurs et qui se transmet au sein des populations de mammifères par des piqûres de puces infectées. L'Homme n'est qu'un hôte accidentel. De nos jours la contamination humaine se produit principalement suite à des piqûres de puces infectées ou lors de la manipulation d'animaux morts ou malades, *Y. pestis* pénétrant alors dans l'organisme par des lésions cutanées ou par les muqueuses respiratoires (Dennis et al., 1999).

Plus de 250 espèces de puces sont capables d'être infectées par *Y. pestis* (Gage and Kosoy, 2005). Parmi elles, *Xenopsylla cheopis*, la puce du rat, est l'espèce qui transmet le plus efficacement la bactérie à un nouvel hôte (Burroughs, 1947). Lorsque la puce prélève du sang contaminé sur un hôte en phase septicémique, la moitié des bactéries ingérées est éliminée dans les fèces (Chouikha and Hinnebusch, 2012). L'autre moitié des bactéries persiste dans le tube digestif en formant des agrégats dont la taille volumineuse empêche leur élimination. La survie des bactéries dans la puce dépend de la protéine Ymt (*Yersinia murin toxin*), une phospholipase D codée par le plasmide pMT1. En l'absence de Ymt, les bactéries présentes dans le tube digestif de la puce changent de morphologie et sont lysées. Il a donc été proposé que Ymt protège *Y. pestis* d'un composé cytotoxique dérivé du sang digéré par la puce (Hinnebusch et al., 2002). Les bactéries colonisent ensuite le tube digestif de la puce. Elles se multiplient dans le proventricule, une valve qui connecte l'œsophage à l'intestin, et y forment un biofilm qui obstrue partiellement le tube digestif. La puce est alors qualifiée de bloquée. La formation du biofilm dépend principalement du locus chromosomique *hms* (*haemin storage*), codant les enzymes de synthèse d'un exopolysaccharide de la matrice du biofilm (Bobrov et al., 2008; Hinnebusch et al., 1996). Lorsque la puce bloquée se nourrit sur un hôte sain, le sang aspiré est en partie bloqué par le bouchon bactérien au niveau du proventricule. Le sang contaminé est alors régurgité au niveau du point de piqûre, ce qui infecte l'animal. La puce affamée pique de manière répétée ce qui augmente la probabilité de transmission de la bactérie (Hinnebusch et al., 1996).

La transmission de *Y. pestis* peut également se produire avant même que le biofilm ne soit formé et que la puce ne soit bloquée, généralement dans les quatre jours suivant l'ingestion du repas sanguin contaminé (Eisen et al., 2006). Il a été proposé que du sang contaminé reste piégé dans la cavité buccale de la puce et qu'il est relargué au cours du repas sanguin suivant grâce à la salivation de la puce (Hinnebusch, 2012). Ce mode de transmission précoce est en adéquation avec l'observation que de nombreuses espèces de puces sont capables de transmettre *Y. pestis* sans développer de blocage du proventricule. C'est le cas par exemple de la puce de l'Homme, *Pulex irritans*, qui a probablement joué un rôle majeur lors de la pandémie de peste noire (Beaucournu, 1995).

IV. Les différentes pathologies de peste

La peste humaine existe sous trois formes cliniques : la peste bubonique, la peste septicémique et la peste pulmonaire (Perry and Fetherston, 1997).

La peste bubonique, qui est la forme classique de la maladie, est mortelle dans 40 à 70% des cas en absence de traitement antibiotique. Elle apparaît suite à une piqûre de puce infectée ou par contamination directe d'une plaie ouverte. Les bactéries déposées dans la peau se répandent dans la voie lymphatique, elles atteignent le ganglion lymphatique drainant et s'y multiplient. Le ganglion devient très inflammatoire, hypertrophié et douloureux et on l'appelle alors bubon. Il est caractéristique de la peste bubonique. En deux à sept jours, d'autres symptômes accompagnent l'apparition du bubon : de la fièvre, des céphalées et une sensation de malaise. En absence de traitement antibiotique, la peste évolue vers une forme septicémique terminale. Les bactéries se répandent dans la circulation sanguine, elles atteignent d'abord la rate et le foie, puis le reste des organes. Une forte bactériémie (environ 5.10^8 bactéries/mL de sang) est essentielle pour que la bactérie soit transmise à la puce qui se nourrit sur un hôte infecté (Galvan et al., 2008). La colonisation des poumons par *Y. pestis* permet la transmission de la maladie d'Homme à Homme.

La peste septicémique est un événement rare, se produisant dans 10 à 30% des cas de peste. Elle survient suite à l'injection directe des bactéries dans la circulation sanguine. C'est une forme progressive et foudroyante de la maladie qui se produit sans formation de bubon.

La peste pulmonaire est la forme la plus grave de la maladie. En absence de traitement dans les 24 à 48 h après l'infection, elle est mortelle dans 100% des cas. Elle est provoquée par l'inhalation d'aérosols contenant la bactérie et entraîne une pneumopathie sévère provoquant une détresse respiratoire fatale. Cette pathologie peut générer des transmissions interhumaines.

V. Virulence

Y. pestis est une bactérie hautement pathogène. Chez la souris, la charge bactérienne causant la mort de 50% de la population animale (DL50, dose létale médiane) est de une à dix bactéries par voie sous-cutanée (Perry and Fetherston, 1997). Pour cela, *Y. pestis* déploie tout un arsenal de facteurs de virulence qui lui permet d'envahir les tissus et de se répandre dans l'organisme sans être éliminée par le système immunitaire.

A. Phase intracellulaire

L'expression de nombreux facteurs de virulence de *Y. pestis* est régulée par la température. Lorsque la bactérie est déposée dans le derme par la puce, elle passe subitement d'une température inférieure à 26°C (dans la puce) à une température de 37°C (dans l'hôte mammifère). Ainsi dans les premières heures suivant l'infection, lorsque *Y. pestis*

est dans le derme, elle ne s'est pas encore acclimatée à la température de l'hôte et ne produit pas encore les facteurs de virulence antiphagocytaires dont les gènes sont induits spécifiquement à 37°C (Spinner and Hinnebusch, 2012; Vadyvaloo et al., 2010). *Y. pestis* est donc rapidement phagocytée par les macrophages résidant dans la peau et les polynucléaires neutrophiles recrutés sur le site de l'infection (Cavanaugh and Randall, 1959; Shannon et al., 2013).

1. Survie dans les macrophages

Lors de la phagocytose par les macrophages, les bactéries sont généralement internalisées dans une vacuole de phagocytose, le phagosome. Le phagosome subit ensuite une étape de maturation en fusionnant avec des endosomes et des lysosomes pour former le phagolysosome. C'est un compartiment très acide qui contient des espèces réactives de l'oxygène, des composés antimicrobiens et des enzymes de dégradation qui ont pour but de tuer et de dégrader les bactéries.

Y. pestis possède des facteurs de virulence lui permettant de survivre et de se répliquer à l'intérieur des macrophages (Cavanaugh and Randall, 1959; Janssen and Surgalla, 1969; Pujol and Bliska, 2005). La production de ces facteurs est sous le contrôle de différents régulateurs. L'un de ces régulateurs est le système à deux composants PhoP-PhoQ, constitué de la kinase senseur PhoQ qui est activée en réponse à la faible concentration en Mg^{2+} dans le phagosome, et de sa cible, le régulateur transcriptionnel PhoP (Oyston et al., 2000). En activant des gènes responsables de la modification du lipide A et du core saccharidique du LOS, le système PhoP-PhoQ permet à la bactérie de résister aux composés antimicrobiens tels que la polymixine B (Hitchen et al., 2002; Zhou et al., 2005). Le régulateur post-transcriptionnel Hfq contrôle l'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif (*katA*, *katY*, *sodA*, *sodC*), ce qui permet à *Y. pestis* de résister aux espèces réactives de l'oxygène (Geng et al., 2009). Les enzymes Rip, comprenant la butyryl-CoA transférase RipA, la putative enoyl-CoA hydrolase RipB et la putative citrate lyase β RipC, interviennent dans la survie intracellulaire, en synthétisant probablement du butyrate, un acide gras à effet anti-inflammatoire qui réduit la production d'oxyde nitrique (NO) par le macrophage (Pujol et al., 2005; Torres et al., 2011, 2012). De plus, *Y. pestis* empêche l'acidification du phagosome par un mécanisme encore inconnu indépendant du système PhoP-PhoQ (Pujol et al., 2009).

Le macrophage constitue donc une niche pour *Y. pestis*, un abri dans laquelle elle se multiplie et « fourbit ses armes » en produisant des facteurs de virulence spécifiquement induits à 37°C. Suite à la forte multiplication intracellulaire, *Y. pestis* provoquerait l'éclatement du macrophage et serait libérée dans le milieu extérieur (Janssen and Surgalla, 1969).

2. Survie dans les neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles sont des cellules phagocytaires, au même titre que les macrophages. Lorsque la bactérie est présente dans la vacuole de phagocytose, celle-ci

fusionne avec des granules contenant des enzymes de dégradation des bactéries et des espèces réactives de l'oxygène sont produites.

Seuls 22 à 30 % de la population de *Y. pestis* phagocytée par les neutrophiles sont capables d'y survivre et de s'y répliquer (Spinner et al., 2014). Les mécanismes de survie mis en jeu par la bactérie sont encore largement inconnus. Il semble que le système PhoP-PhoQ et la modification du LOS sont impliqués dans la survie de *Y. pestis* dans le neutrophile (O'Loughlin et al., 2010). Par ailleurs, il a été montré qu'une partie des neutrophiles, contenant des bactéries viables dans la vacuole de phagocytose, présente un marqueur d'apoptose à leur surface. Les macrophages sont capables de reconnaître ce marqueur d'apoptose et d'ingérer les neutrophiles apoptotiques pour les dégrader, c'est le mécanisme d'efférocytose. Or, *Y. pestis* est capable de persister dans la vacuole d'efférocytose. De plus, ce mécanisme permet la libération de cytokines anti-inflammatoires. Ainsi, il a été proposé que l'efférocytose est une voie d'entrée alternative de *Y. pestis* dans le macrophage qui permet d'induire une réponse anti-inflammatoire essentielle à la survie de *Y. pestis* chez l'hôte (Spinner et al., 2014).

B. Phase extracellulaire

Une fois hors des cellules phagocytaires, *Y. pestis* exprime des facteurs de virulence lui permettant de survivre sous une forme extracellulaire. Elle est capable de disséminer dans les tissus, d'inhiber la phagocytose et de résister au système du complément et aux peptides antimicrobiens contenus dans le sérum.

1. Dissémination tissulaire

La protéine Pla, codée par le plasmide pPCP1, est un facteur de virulence essentiel à l'établissement de la peste bubonique. En effet, la délétion du gène *pla* entraîne la perte de la virulence et une absence de colonisation du foie et de la rate lorsque *Y. pestis* est injectée par voie sous-cutanée, alors que la virulence et la colonisation des organes ne sont pas altérées lorsque le mutant Pla⁻ est injecté par voie intraveineuse (Sodeinde et al., 1992). Pla est une protéase ancrée à la membrane externe. Elle dégrade le plasminogène en plasmine, une enzyme capable de dégrader la fibrine et certains composants de la matrice extracellulaire (Lahteenmaki et al., 1998; Sodeinde et al., 1992). Pla inactive également l'inhibiteur de plasmine α 2-antiplasmine augmentant ainsi l'activité de la plasmine (Kukkonen et al., 2001). Ainsi, il a été proposé que lorsque *Y. pestis* est déposée dans la peau, Pla dégrade le caillot de fibrine qui se forme autour de la bactérie pour la piéger. *Y. pestis* peut ainsi s'échapper du site d'infection pour atteindre le système lymphatique. Par ailleurs, sa capacité à dégrader la matrice extracellulaire lui permettrait d'envahir les tissus lors de la colonisation des organes (Lahteenmaki et al., 1998; Sodeinde et al., 1992).

2. Inhibition de la phagocytose et de la réponse inflammatoire

Une fois présente dans les tissus lymphoïdes, *Y. pestis* doit faire face aux cellules immunitaires recrutées en masse. Certains facteurs de virulence inhibent la phagocytose et d'autres induisent une réponse anti-inflammatoire permettant à la bactérie de se multiplier sans être éliminée par le système immunitaire.

a. Le système de sécrétion de type III

Le système de sécrétion de type III est codé par au moins 47 gènes localisés sur le plasmide pCD1 (similaire au plasmide de virulence pYV de *Y. pseudotuberculosis*). L'expression de ces gènes est induite à 37°C, et elle produit une machinerie cellulaire capable d'injecter des protéines effectrices directement dans le cytoplasme des cellules cibles eucaryotes (macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques, cellules épithéliales). Les six protéines effectrices, appelées Yop (*Yersinia outer proteins*), inhibent la phagocytose en bloquant les voies de signalisation impliquées soit dans le remodelage des filaments d'actine nécessaire à l'internalisation des bactéries, soit dans la production des espèces réactives de l'oxygène ou la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires. Les Yop induisent aussi l'apoptose des cellules cibles en activant la voie des caspases et en inhibant la synthèse des protéines anti-apoptotiques (Cornelis et al., 1998; Lemaitre et al., 2006; Peters et al., 2013; Songsungthong et al., 2010; Viboud and Bliska, 2005).

b. L'adhésine Ail

Ail (*attachment-invasion locus*) est une adhésine de 21,5 kDa ancrée à la membrane externe de *Y. pestis*, surproduite à 37°C et qui représente jusqu'à 20 à 30% des protéines membranaires (Pieper et al., 2009). Ail permet à *Y. pestis* d'adhérer aux cellules immunitaires et épithéliales car elle interagit avec la fibronectine et la laminine qui composent la matrice extracellulaire. Cette interaction facilite l'injection des protéines effectrices Yop par le système de sécrétion de type III dans les cellules cibles (Felek and Krukoni, 2009; Tsang et al., 2010).

c. Les pili Psa

L'expression des gènes de synthèse du pilus Psa (*pH 6 antigen*) est induite lors de la phase intracellulaire, dans le phagolysosome du macrophage où se réplique la bactérie, un environnement acide à 37°C. Dès que *Y. pestis* est hors des cellules phagocytaires, les pili Psa présents à la surface de la bactérie fixent les lipoprotéines contenant l'apolipoprotéine B (ApoB) et principalement les LDL (*low density lipoproteins*) présentes dans le plasma sanguin. En se couvrant de lipoprotéines, *Y. pestis* évite d'être reconnue par les cellules phagocytaires et ainsi d'être phagocytée (Huang and Lindler, 2004; Makoveichuk et al., 2003).

d. Le lipide A

De manière générale, le lipide A du LPS ou du LOS est formé de deux glucosamines sur lesquelles se greffent des groupements phosphates et des chaînes acylées. Le lipide A se lie au TLR4, un récepteur à la surface de plusieurs types cellulaires tels que les macrophages et les cellules dendritiques, ce qui conduit à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Lu et al., 2008). Les modifications du lipide A, notamment la variation du nombre de chaînes acylées, modulent l'activation du TLR4. Le lipide A de *Y. pestis* est hexa-acylé à 28°C et tétra-acylé à 37°C (Kawahara et al., 2002). Chez l'hôte mammifère, la forme tétra-acylée n'est pas reconnue par le TLR4 et ne stimule donc pas la sécrétion des cytokines (Matsuura et al., 2010).

e. La pseudo-capsule F1

Y. pestis synthétise une pseudo-capsule glycoprotéique formée par la polymérisation de l'antigène F1, une protéine de 15,5 kDa. Les quatre gènes *caf* de synthèse de la pseudo-capsule sont portés par le plasmide pMT1. Leur expression est induite à 37°C. La pseudo-capsule permet à *Y. pestis* de résister à la phagocytose probablement en masquant les adhésines présentes à la surface de *Y. pestis* qui interagissent et se fixent aux récepteurs à la surface des cellules phagocytaires (Du, 2002).

f. Les protéines de la famille Toxin complex (Tc)

Les cinq protéines de la famille Tc sont localisées dans la membrane externe de *Y. pestis*. Elles sont principalement produites à 21°C lorsque *Y. pestis* est dans la puce et elles persistent de nombreuses heures à 37°C après la transmission de la bactérie au mammifère (Spinner et al., 2012). Leurs homologues présents chez la bactérie entomopathogène *Photorhabdus luminescens* sont des toxines insecticides, mais chez *Y. pestis*, ces protéines n'ont aucun rôle dans la survie de la bactérie dans la puce, ni dans sa transmission de l'insecte au mammifère (Spinner et al., 2012). En revanche, chez l'hôte mammifère, les protéines de la famille Tc inhibent la phagocytose de *Y. pestis* par les neutrophiles via un mécanisme encore inconnu mais indépendant du système de sécrétion de type III (Spinner et al., 2013).

3. Résistance au complément

Le système du complément est un ensemble de 35 protéines sériques participant à la défense contre les infections. Il existe trois voies d'activation du complément : classique, alterne et via les lectines. L'activation de la voie classique dépend de la réponse immunitaire adaptative puisqu'elle débute par la reconnaissance d'un pathogène par les anticorps. Les voies alterne et des lectines, en revanche, appartiennent à l'immunité innée car les protéines du complément sont activées directement au contact des agents pathogènes. Les trois voies

convergent pour aboutir à la lyse des agents pathogènes grâce à la formation du complexe d'attaque membranaire, au recrutement des cellules immunitaires via les propriétés chimiotactiques des protéines du complément, et à l'opsonisation des agents pathogènes. La protéine de membrane externe Ail permet à *Y. pestis* de résister à l'activité bactéricide du complément (Bartra et al., 2008). En effet, un mutant délété du gène *ail* est incapable de résister à l'activité du complément dans le sérum (Bartra et al., 2008). Le mécanisme d'action d'Ail a été récemment décrit (Ho et al., 2014). Ail est capable de fixer à la fois la protéine C4b, une protéine du système du complément activée dans les voies classique et des lectines, et la protéine C4BP, un inhibiteur du système du complément qui dégrade la protéine C4b. En formant un complexe tripartite avec les deux protéines, Ail favorise l'inactivation de C4b par C4BP et empêche ainsi l'activation des voies classique et des lectines du complément (Ho et al., 2014).

4. Résistance aux composés antimicrobiens

Y. pestis est capable de résister aux composés antimicrobiens sécrétés dans les tissus par les macrophages et les neutrophiles. Dans le bubon, les neutrophiles produisent une grande quantité d'oxyde nitrique (NO). Pour résister au NO, *Y. pestis* surexprime de nombreux gènes impliqués dans la détoxification du NO. Parmi ces gènes, ceux codants la pyruvate deshydrogénase AceF, la flavoglobine Hmp et la ribonucléotide réductase NrdHIEF contribuent à la virulence de *Y. pestis* (Pradel et al., 2014; Sebbane et al., 2006). Par ailleurs, *Y. pestis* est capable de résister à de nombreux peptides antimicrobiens. A titre d'exemple, *Y. pestis* produit la protéine périplasmique Ivy qui inhibe l'action du lysozyme produit par les neutrophiles (Derbise et al., 2013).

5. Systèmes d'acquisition du fer

Le fer est un co-facteur impliqué dans de nombreuses réactions enzymatiques. Il est essentiel à la multiplication et à la propagation de *Y. pestis* chez son hôte (puce ou mammifère). *Y. pestis* possède plusieurs systèmes d'acquisition du fer qui lui permettent de capturer le fer libre ou celui présent dans les ferriprotéines de l'hôte (lactoferrine, hémoglobine). Parmi ces systèmes, deux sont requis pour la virulence de *Y. pestis* : le système yersiniabactine (Ybt) et le système Yfe (Bearden and Perry, 1999; Fetherston et al., 2010; Sebbane et al., 2006).

Le système Ybt est codé par douze gènes majoritairement localisés sur l'îlot de pathogénicité HPI (d'environ 36 kb) (Perry and Fetherston, 2011). Certaines protéines Ybt sont impliquées dans la synthèse de la yersiniabactine, un sidérophore libéré dans le milieu extracellulaire qui capte le fer (Fe^{3+}) lié à la transferrine ou à la lactoferrine. D'autres protéines sont responsables de la fixation et du transport de la yersiniabactine chargée en fer du milieu extracellulaire vers le cytoplasme de la bactérie. Enfin, d'autres protéines régulent l'expression

du système en fonction de la concentration en fer extracellulaire et de la disponibilité du sidérophore yersiniabactine (Perry and Fetherston, 2011).

Le système Yfe est un transporteur de type ABC capable de transporter les cations fer (Fe^{2+}) et manganèse du périplasma vers le cytoplasme de la bactérie. Il est formé de la protéine périplasmique YfeA, responsable de la fixation du fer et du manganèse, d'une perméase homodimérique YfeC-YfeD ancrée dans la membrane interne et d'une ATPase YfeB (Bearden and Perry, 1999; Perry et al., 2007).

Un mutant de *Y. pestis* dépourvu du système Ybt est avirulent par voie sous-cutanée mais reste totalement virulent par voie intraveineuse, alors qu'un mutant Yfe⁻ est atténué dans sa virulence par voie sous-cutanée et est avirulent par voie intraveineuse. Un double mutant Ybt⁻ Yfe⁻ est quant à lui avirulent par voie intraveineuse (Bearden and Perry, 1999). Ces résultats suggèrent que le système Ybt est requis pour l'acquisition du fer dans les premières étapes de l'infection, au niveau du site d'injection dans la peau ou dans le système lymphatique. En revanche, le système Yfe serait nécessaire dans les étapes tardives de l'infection, lorsque *Y. pestis* s'est répandue dans le système sanguin et a colonisé le foie, la rate et d'autres organes profonds (Bearden and Perry, 1999).

3^{ème} partie. Objectifs de la thèse

L'ensemble des facteurs de virulence de *Y. pestis* n'étant pas encore connu, une étude visant à identifier des nouveaux gènes impliqués dans la virulence de *Y. pestis* a été menée au laboratoire à partir de 2008 (Pradel et al., 2014). La comparaison des transcriptomes de *Y. pestis* isolée de bubon de rat infecté ou cultivée *in vitro* avait permis de dresser une liste de gènes surexprimé *in vivo* (Sebbane et al., 2006). Chaque gène (ou groupe de gènes) candidat a été délété du chromosome de *Y. pestis* CO92 et les 170 mutants obtenus ont été testés par injection sous-cutanée chez le rongeur afin d'identifier ceux dont la virulence est atténuée. Au cours de cette étude, le gène *ypo3369*, dont la fonction était encore inconnue, a retenu l'attention. Non seulement sa perte entraîne une atténuation de la virulence, mais le mutant Δ *ypo3369* présente aussi un retard de croissance *in vitro*. Nous avons donc voulu déterminer la fonction de ce gène et son rôle dans la virulence de *Y. pestis*.

Notre analyse *in silico* suggérait i) que le gène *ypo3369* code une antitoxine de la famille HicB (nommée HicB3) et ii) qu'un petit gène de 201 pb en amont de *ypo3369* (non annoté sur le génome de *Y. pestis*) code une possible toxine de la famille HicA.

A partir de ces observations, notre objectif visait à caractériser au mieux ce nouveau STA de *Y. pestis* en étudiant sa régulation, en déterminant l'activité de la toxine HicA3, en évaluant son rôle dans la virulence et en résolvant la structure de l'antitoxine HicB3 et celle du complexe HicA3-HicB3.

Résultats publiés

Functional and structural analysis of HicA3-HicB3, a novel toxin-antitoxin system of *Yersinia pestis*

Sabrina Bibi-Triki^{1,2,3,4,5#}, Inès Li de la Sierra-Gallay^{6#}, Noureddine Lazar⁶, Arnaud Leroy⁷, Herman Van Tilbeurgh⁶, Florent Sebbane^{1,2,3,4,5}, and Elizabeth Pradel^{1,2,3,4,5*}

¹ Equipe Peste et *Yersinia pestis*, INSERM U1019, F-59021 Lille, France; ² CNRS UMR 8204, F-59021 Lille, France; ³ Institut Pasteur de Lille, Centre d'Infection et d'Immunité, F-59019 Lille, France; ⁴ Univ Lille Nord de France, Lille, France; ⁵ UDSL, F-59000 Lille, France; ⁶ Equipe Fonction et Architecture des Assemblages MacroMoléculaires, IBBMC, Université Paris-Sud, CNRS UMR 8619, F-91405 Orsay, France, ⁷ EA 4529, UFR de Pharmacie, Université Paris-Sud, F-92296 Châtenay-Malabry, France

these authors contributed equally to this work

Abstract

The mechanisms involved in the virulence of *Y. pestis*, the plague pathogen, are not fully understood. In previous research, we found that a *Yersinia pestis* mutant lacking the HicB3 (YPO3369) putative orphan antitoxin was attenuated for virulence in a murine model of bubonic plague. Toxin-antitoxin systems (TASs) are widespread in prokaryotes. Most bacterial species possess many TASs of several types. In type II TASs, the toxin protein is bound and neutralized by its cognate antitoxin protein in the cytoplasm. Here, we identify the *hicA3* gene encoding the toxin neutralized by HicB3, and show that HicA3-HicB3 constitutes a new functional type II TAS in *Y. pestis*. Using biochemical and mutagenesis-based approaches, we demonstrate that the HicA3 toxin is an RNase with a catalytic histidine residue. HicB3 has two functions: it sequesters and neutralizes HicA3 by blocking its active site and it represses transcription of the *hicA3B3* operon. Gel-shift assays and reporter fusion experiments indicate that the HicB3 antitoxin binds to two operators in the *hicA3B3* promoter region. We solved the X-ray structures of HicB3 and the HicA3HicB3 complex, thus we present the first crystal structure of a TA complex from the HicAB-family.

HicB3 forms a tetramer that can bind two HicA3 toxin molecules. HicA3 is monomeric and folds as a double-stranded-RNA-binding domain. HicB3 N-terminal domain occludes the HicA3 active site, whereas its C-terminal domain folds as a ribbon-helix-helix DNA binding motif.

The Gram-negative enterobacterium *Yersinia pestis* is the causal agent of plague, a disease that is usually transmitted via a fleabite or (more rarely) via the inhalation of aerosols (1). Flea-borne plague leads to bubonic plague or (to a lesser extent) primary septicemic plague, whereas aerosol transmission produces pneumonia (2). To better understand the mechanisms responsible for disease production, we previously screened a library of *Y. pestis* deletion mutants for attenuated virulence in a rat model of bubonic plague (3). Each mutant in the library lacked one or more of the genes identified as being up-regulated *in vivo* in a comparative transcriptome analysis (4). One of the virulence-attenuated mutants lacked the uncharacterized *ypo3369* gene (3). Although it has been suggested that *ypo3369* (also referred to as *hicB3*) encoded an antitoxin from a toxin-antitoxin system (TAS) (5), the associated toxin gene had yet to be identified.

Toxin-antitoxin systems were originally defined as two-component modules encoded by bicistronic operons in a wide range of bacteria (6), with one gene encoding a toxic protein and the other encoding a specific antitoxin. Although most toxins are RNases (7), some can target membranes (8), DNA gyrase (9) or ribosomes (10) or phosphorylate proteins (11, 12). Overall, the toxin's activities interfere with replication or translation and thus lead to growth arrest or even cell death (13). The toxin gene may be located upstream or downstream of the antitoxin gene. Three different classes of TAS have been defined according to the biochemical nature of the antitoxin. In type I TASs, the antitoxin is a non-coding RNA that is able to hybridize with the toxin mRNA and block its translation or target it for degradation (14). In type II TASs, the antitoxin is a small protein that binds to and neutralizes a toxic protein (i.e. through protein-protein interactions). The type II antitoxin is usually also a DNA-binding protein that can block the TA operon's promoter region (15). In type III TASs, the antitoxin is an RNA that directly binds to and neutralizes the toxin protein (16, 17). Most recently, three-component modules have been described and included in the list of type II TASs (18, 19). The third component in these systems is a repressor that regulates transcription of the operon.

In *Y. pestis*, a total of 10 putative type II TAS loci have been identified on the chromosome of the virulent CO92 strain (5, 20, 21). Five of these systems belong to the HigBA family, two other to the HicAB family, and one each to the MqsRA, Phd-Doc, and RelBE families (5). However, Goulard et al. showed that only three toxin candidates (HicA1, HigB2, and RelE) were indeed toxic when over-expressed in *Y. pestis*. Two orphan antitoxin genes (*hicB3* and *relB2*) had also been identified in the CO92 genome (5).

Starting from the candidate virulence gene *hicB3* (*ypo3369*), we used genetic, biochemical and structural approaches to discover and characterize a new TAS in *Y. pestis*: HicA3-HicB3. We also report the first crystal structure of a toxin-antitoxin complex from the HicA-HicB family.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids and growth conditions. Strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *Y. pestis* strain KIM6⁺ was used to analyze *in vitro* phenotypes, since it lacks the pCD1 virulence plasmid present in strain CO92 (22). The sequence of the *hicA3-hicB3* locus is exactly the same in CO92 and KIM6⁺. Strains were cultivated in LB broth or on LB agar plates (at 37°C for *E. coli* or 28°C for *Y. pestis*). Antibiotics and other chemicals were used at the following final concentrations: ampicillin (Ap) 200 µg ml⁻¹, kanamycin (Km) 25 µg ml⁻¹, trimethoprim (Tp) 25 µg ml⁻¹, IPTG 24 µg ml⁻¹, irgasan (Irg) 1 µg ml⁻¹, sucrose 5% (wt/vol), Xgal 40 µg ml⁻¹. Arabinose (Ara, 0.5 or 1 mM) or IPTG (1 mM) were added to the cultures to induce *Para* and *Plac*, respectively.

***Y. pestis* mutant construction.** Mutants were constructed using the Red recombinase technique (23) and pEP1013 (3). Antibiotic-labeled PCR products were generated using pEP1087 or pEP1216 templates. Primers are listed in Table S1.

To delete chromosomal antibiotic resistance cassettes flanked by FRT sites, pFLP2 (24) was electroporated into some constructs. Transformants were selected and checked for loss of the cassette. To generate *Y. pestis* KIM6⁺ *lacZ* reporter strains, the suicide plasmids pSBT30, pSBT36 and pSBT172 were introduced into YPEP430 and its $\Delta hicA3B3$ or $\Delta hicB3$ derivatives by conjugation. Transconjugants were selected on LB-Km-Irg-Xgal plates. Correct integration of the transcriptional fusion at the chromosomal *hicA3B3* locus was assessed by PCR. For all *Y. pestis* mutants, the presence of the instable chromosomal *pgm* locus was verified by streaking onto Congo Red plates (25). Conservation of the endogenous plasmids was checked using multiplex PCR with the primer pairs Ymt1/Ymt2 and Pla1/Pla2 for KIM6⁺ derivatives and the additional YopH3/YopH4 pair for CO92 constructs.

Growth assays. *E. coli* MG1655 bearing both pSBT10 and pSBT41 was grown overnight at 37°C in LB-Ap-Km and used to inoculate three cultures at an OD₆₀₀ of 0.05. In the first culture, 0.5 mM Ara was added after 120 min of growth. In the second culture, 0.5 mM Ara was added after 120 min of growth and 0.5 mM IPTG was added after 195 min. No inducer was added to the third culture. OD₆₀₀ was measured every 30 min after induction.

Y. pestis KIM6⁺(pSBT10) and KIM6⁺(pBAD30) were grown overnight at 28°C in LB-Ap and used to inoculate cultures at an OD₆₀₀ of 0.05. After 180 min of growth, 1 mM Ara was added to the cultures. OD₆₀₀ was measured every hour after induction.

Site-directed mutagenesis. The megaprimer PCR method adapted from (26) was used to replace the *hicA3* His28 codon by an alanine codon. Two 100-bp megaprimers were obtained by PCR amplification of *Y. pestis* KIM6⁺ genomic DNA using the forward external primers 3369aNde or HicA3RI, the mutated internal reverse primer HicA3H28A, and Pfu polymerase (Stratagene). In a second round of PCR, purified megaprimers were used with the reverse

external primers 3369aXho or HicA3Sal to amplify hicA3H28A from the hicA3B3-bearing PCR product obtained with primer pair 3368F1/3369R1. The resulting NdeI-XhoI and EcoRI-SalI fragments were further cloned into pET24a⁺ and pBAD30 to yield pSBT116 and pSBT237, respectively.

Protein production and purification. *E. coli* BL21(DE3) transformants were grown at 37°C until the OD₆₀₀ reached 0.5. Protein overexpression was induced by addition of 0.5 mM IPTG. After 3 hours, cells were harvested, resuspended in buffer A (50 mM Tris pH 8, 300 mM NaCl) and lysed using a French press. His-tagged proteins were purified from cleared lysates on a HisPur Ni-NTA column (Thermo Scientific). Proteins were eluted with 5 ml of buffer A, 300 mM imidazole. Further purification was carried out on a Superdex 75 size exclusion column (GE Healthcare) equilibrated with buffer A. Fractions of interest were pooled and concentrated using an Amicon ultra-4 centrifugal filter unit (molecular weight cutoff 3,000 [3 K] or 10 K ; Merck Millipore). For circular dichroism (CD) measurements, buffer A was replaced with NaP buffer (150 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 7.2) by dialysis.

For crystallization experiments, cells were disrupted by sonication and proteins were purified on a Ni-NTA agarose column (Qiagen) via elution with 100 mM, 200 mM and 300 mM imidazole in buffer A, 5 mM Tris-(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP). Proteins were then injected onto a HiTrap Heparin HP column (GE Healthcare) and eluted with an NaCl gradient. Fractions of interest were concentrated and injected onto a Superdex 75 column equilibrated with buffer A, 5 mM TCEP. These fractions were pooled and concentrated using a Vivaspinn 20 centrifugal concentrator (molecular weight cutoff, 5 K ; GE Healthcare). Se-Met-labeled HicB3 was prepared as described in (27) and purified in the same way as the native protein.

HicA3 was purified from the HicA3HicB3-6His complex via the following “water-shock” procedure, which we applied serendipitously. The complex was purified as described above except that after the first concentration step, fractions containing the HicA3HicB3-6His complex were injected onto a Superdex 75 column equilibrated with water. Proteins that eluted as a single peak in the dead volume were then re-concentrated and re-injected onto a Superdex 75 column equilibrated with buffer A, 5 mM TCEP. The proteins then eluted as two peaks: the first corresponded to a HicA3-depleted HicA3HicB3-6His complex and the second corresponded to HicA3 alone. Analytical size exclusion chromatography revealed that (i) “water shocked” purified HicA3 was dimeric and (ii) HicA3-H28A-6His purified in buffer A was monomeric. The misfolded, “water-shocked” protein was dialyzed against NaP buffer, denatured in 8 M guanidium chloride, and then dialyzed stepwise against NaP buffer. Lastly, HicA3 was purified on a Superdex 75 size exclusion column and concentrated using an Amicon ultra-4 centrifugal filter unit (molecular weight cutoff, 3 K). The same denaturation/renaturation protocol was applied to HicA3-H28A-6His. Circular dichroism spectra of renatured HicA3 and HicA3-H28A-6His were identical to that of native HicA3-H28A-6His.

Protein concentration was determined by absorbance at 280 nm using a Nanovue Plus spectrophotometer (GE Healthcare) or a Bradford assay (Bio-Rad). The proteins' secondary structure content was checked with CD and the integrity of the protein sequence was checked with mass spectrometry.

5' rapid amplification of cDNA Ends. The *hicA3* and *hicB3* TSSs were mapped using 5' RACE, according to the method described in (28). Briefly, total RNA was extracted from a *Y. pestis* 2-ml culture at an OD₆₀₀ of 1 by using an RNeasy mini kit (Qiagen). The RNA concentration was measured with a Nanovue Plus spectrophotometer. A 100 µl reaction volume containing RNA (6 µg), 20 U RNase Out (Invitrogen) and 10 U of tobacco acid pyrophosphatase (TAP, Epicentre) in TAP buffer was incubated for 30 min at 37°C. Control RNA (with no TAP treatment) was incubated under the same conditions. The 38-nt RACE RNA adapter (500 pmol) was added to the tubes prior to phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation. Pellets were dissolved in 13 µl water, denatured at 90°C for 5 min, and then quick-chilled on ice. The RACE adapter was ligated overnight at 17°C in a 20 µl reaction volume containing 10 U T4 RNA ligase (Epicentre), 5 µM ATP, 10% DMSO and 0.4 U RNase Out in T4 RNA ligase buffer. RlacZ primer (2 pmol) was added to RNA prior phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation. Pellets were dissolved into 20 µl of water, and 10 µl were used for reverse transcription with Superscript III (Invitrogen). The cDNA was then amplified by PCR with primers specific for the RNA adapter (B6) and the target mRNA (3369aR1 or 3369R2). Polymerase chain reaction products were purified from 2% agarose gel, cloned into pCRII (Invitrogen) and sequenced. The absence of DNA contamination in the RNA preparation was assessed by PCR.

Gel shift assays. DNA fragments containing either the *hicA3* upstream region (365 bp) or part of the *ymt* gene (517 bp, the control fragment) were amplified by PCR using the primer pair 3368F1/3369aR1 or Ypmt1/Ypmt2, respectively. Polymerase chain reaction products were purified using the NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up kit (Macherey-Nagel). Reaction mixtures (20 µl) containing 50 ng of each DNA fragment and 0, 50, 100 or 150 ng of HicB3-6His or HicA3HicB3-6His complex in gel shift buffer (10 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.5 mM DTT, 1 mM MgCl₂, and 2.5% glycerol) were incubated for 20 min at room temperature (RT) and loaded on a 6% acrylamide-Tris-borate EDTA (TBE) gel (89 mM Tris-borate pH 8, 2 mM EDTA). After migration, DNA was visualized by ethidium bromide staining.

For gel shift assays with smaller DNA fragments, pairs of complementary oligonucleotides (66-mers or 80-mers, Table S1) were annealed by boiling for 5 min in a water bath and slow cooling of the bath to RT. The DNA fragments (1.25 pmol) were incubated with 2.3 pmol of HicB3-6His (corresponding to 150 ng) in a 20 µl final volume of gel shift buffer. Samples were run in a 7% acrylamide-TBE gel.

RNase activity assay. An 11-kb RNA transcript containing part of the hepatitis C virus subgenomic replicon (29) was used as a substrate. In a 10 μ l final volume of DNase I buffer (Ambion), 0.4 pmol of this RNA were incubated for 30 min at 37°C with 50 pmol of HicA3, HicA3-H28A-6His, HicA3HicB3-6His or HicB3-6His. Next, 2 μ l of Gel Loading Buffer II (Ambion) was added to each tube and samples were run in a 1% agarose-TBE gel. The RNA was visualized by ethidium bromide staining.

Virulence assay. Groups of 8- to 9-week-old female OF-1 mice (Charles River, France) were intradermally inoculated with \sim 10 cells of *Y. pestis* CO92 or its Δ *hicA3B3* derivative, as previously described (30). Survival was monitored daily for 15 days after inoculation.

Crystallization and crystal structure resolution. All crystallizations were performed according to the vapor diffusion method at 293K. Crystals of selenium-labeled HicB3 (HicB3-SeMet) were obtained from a 1:1 mixture of 13.5 mg/ml protein in 50 mM Tris pH 8, 0.3 M sodium chloride, 5 mM TCEP buffer and a reservoir solution of 25% polyethylene glycol 3000, 0.1 M MES pH 6.5.

For the HicA3B3 complex, we obtained crystals only in the presence of the subtilisin A protease. In this protocol, 58 μ l of HicA3B3 solution (39 mg/ml in 50 mM Tris pH 8, 0.3 M sodium chloride, 5 mM TCEP) were mixed with 2 μ l of 0.5 mg/ml subtilisin A solution. The mixture was immediately used in the crystallization trials. The best conditions were obtained in 2.4 M disodium malonate solution.

Crystals were flash-frozen in liquid nitrogen in a two-step soaking protocol by using 15% and 30% ethylene glycol as a cryoprotectant for HicB3-SeMet and glycerol for HicA3B3. Diffraction data were collected at 100K on the PROXIMA 1 beamline at the SOLEIL synchrotron (Gif-sur-Yvette, France), using a PILATUS detector. The images were integrated with the XDS program and processed using the Collaborative Computational Project Number 4 (CCP4) suite of programs (31). The initial models were completed and adjusted with the COOT program and then refined using the REFMAC, PHENIX and BUSTER programs.

The positions of the selenium atoms were determined using the automated procedure implemented in the SHELXD program at an optimal resolution of 4.4 Å and refined using PHASER. Non-crystallographic symmetry and density modification were performed using PARROT. Automatic model building was performed using BUCCANEER. SHELXD, PARROT, PHASER and BUCCANEER were all implemented in the CCP4 suite.

The structure of the HicA3B3 complex was solved by applying the molecular replacement method with PHASER. Both the Nt domain of the HicB3 structure (83 aa, our work) and the TTHA1913 structure (PDB code: 1WHZ) were used as search models. The experimental map was improved by solvent modification using the DM program. The resulting map was of very good quality and ARP/wARP automatically built most of the protein model (291 of the 298

residues). The crystal structure at a resolution of 2.12 Å was refined to R and R_{free} crystallographic factors of 18 and 21.8%, respectively (for the statistics, see Table S2). The refined structure consists of residues 1 to 85 for chains A and C (HicB3-Nt), and residues 1 to 66 for chains B and D (HicA3).

Protein Data Bank (PDB) accession codes: 4P7D for HicB3 and 4P78 for HicA3HicB3.

RESULTS

HicA3-HicB3 is a new TAS in *Y. pestis*. We previously reported that *Y. pestis* lacking *ypo3369* is virulence-attenuated (3). *ypo3369* is referred to as *hicB3* by another research group, since its 135 aa product presents homology with the HicB antitoxin in the *Escherichia coli* HicA-HicB TAS (5). We hypothesized that the loss of virulence of the *ypo3369* mutant resulted from a growth defect caused by the absence of toxin neutralization. *In silico* analysis revealed an open reading frame upstream of *hicB3*, it putatively encoded a 66 aa protein sharing 26% and 44% identity with the *E. coli* HicA and *Y. pestis* HicA1 toxins, respectively (Fig. S1). We called this gene *hicA3*. To establish whether or not the HicA3-HicB3 system was a *bona fide* TAS, we monitored the growth of *E. coli* MG1655 containing two plasmids: one harbored *hicA3* under the control of the arabinose-inducible promoter *Para*, and the other harbored *hicB3* under the control of the IPTG-inducible promoter *Plac* (Fig. 1A). Addition of arabinose to the culture medium induced growth arrest, whereas subsequent IPTG addition restored bacterial growth; this result suggests that HicA3 overproduction is bacteriostatic and that HicB3 is able to neutralize this toxicity. In contrast, overproduction of HicA3 with HicB1 or HicB2 (the two other *Y. pestis* HicB-family antitoxins (5)) was bacteriostatic (Fig. 1B). Thus, neither protein is able to neutralize HicA3.

We next evaluated the toxicity of HicA3 in *Y. pestis*. The KIM6⁺ strain transformed with the *Para-hicA3* plasmid was grown in LB medium; upon addition of arabinose, *hicA3* induction triggered bacteriostasis (Fig. 1C). We also constructed KIM6⁺ $\Delta hicB3$ and $\Delta hicA3B3$ mutants and compared their respective growth rates. In the absence of *hicB3*, the presence of *hicA3* conferred a slow growth phenotype that was complemented by a *hicB3*-bearing plasmid (Fig. 1D). In contrast, the deletion of both *hicA3* and *hicB3* did not affect *Y. pestis*' growth rate - confirming that the toxic effect required HicA3 and that HicB3 was an antitoxin (Fig. 1D). Taken as a whole our data indicate that *hicA3* and *hicB3* together constitute a new two-component type II TAS.

***hicA3B3* is an operon and is repressed by HicB3.** A 174 bp intergenic region separates *hicA3* and *hicB3* on the CO92 chromosome (Fig. 2A), suggesting that *hicB3* could be transcribed independently of *hicA3*. DNA fragments containing the putative *hicA3* promoter (*PhicA3*) or encompassing part or whole of the intergenic region were cloned and

transcriptionally fused to the *lacZ* reporter gene (Fig. 2A). A high level of β -galactosidase activity on an Xgal plate was detected only for *E. coli* expressing *lacZ* under the control of *PhicA3* (Fig. 2B). This observation suggested that (i) a promoter is present upstream of *hicA3* and (ii) there is no constitutive promoter in the intergenic region.

Toxin-antitoxin operon promoters are usually repressed by the antitoxin or the TA complex (15). To establish whether HicB3 could repress *PhicA3*, the *PhicA3-lacZ* reporter fusion was introduced into the chromosome of *Y. pestis* $\Delta lacZ$ strains lacking or not lacking *hicA3B3* (Fig. 3A). On Xgal plates, the parental strain bearing *PhicA3-lacZ* was LacZ⁻, whereas the $\Delta hicA3B3$ mutant carrying the same reporter fusion was LacZ⁺ (Fig. 3A). When a plasmid bearing a wild-type copy of *hicB3* or carrying the *hicA3B3* operon was introduced into the $\Delta hicA3B3$ *PhicA3-lacZ* strain, the LacZ⁻ phenotype was restored (Fig. 3A). These observations suggested that *PhicA3* is repressed by HicB3.

To evaluate *hicB3* expression and regulation in *Y. pestis*, we introduced the *hicB3-lacZ* transcriptional fusion into the chromosome of $\Delta lacZ$ strains lacking or not lacking *hicB3* (Fig. 3B). Although both the parental and $\Delta hicB3$ strains expressed *hicB3-lacZ*, the fusion's expression level was higher in the $\Delta hicB3$ background, which agreed with the observed derepression of *PhicA3* in the absence of HicB3. When the reporter strains were transformed with a *hicB3*-bearing plasmid, the chromosomal *hicB3-lacZ* fusion was fully repressed in both strains (Fig. 3B). This observation indicated that either (i) *hicB3* is mainly transcribed from the *PhicA3* promoter or (ii) any alternative *hicB3* promoters are also repressed by HicB3. In order to distinguish between these two possibilities, we deleted 88 bp within the *PhicA3* promoter region upstream of the *hicB3-lacZ* fusion on the chromosome of the HicB3⁺/HicB3⁻ isogenic strains (Fig. 3B). Expression of *hicB3-lacZ* was not detected in the absence of the *PhicA3* promoter - even in the strain lacking the HicB3 repressor (Fig. 3B). Overall, these data indicate that *hicB3* is mainly transcribed from *PhicA3* and that the activity of the *hicB3-lacZ* fusion detected in the HicB3⁺ strain resulted from transcriptional read-through from *PhicA3*.

We then used 5' rapid amplification of cDNA ends (RACE) to identify the transcription start sites (TSSs) for the *hicA3* and *hicB3* genes. Total RNA purified from the reporter strains $\Delta hicA3B3$ *PhicA3-lacZ* (in which *PhicA3* is fully active) and *hicB3-lacZ* was used to localize the TSSs of *hicA3* and *hicB3*, respectively. For *hicA3*, a single TSS was identified 23 bp upstream of the HicA3 initiation codon (Fig. S2A), from which we deduced the -10 (TATGAT) and -35 (TTGACT) boxes of the *PhicA3* promoter (Fig. 4A). For *hicB3*, the longest mRNA was initiated at the *hicA3* TSS - confirming that *hicA3* and *hicB3* form an operon. Several smaller mRNAs initiating between positions +144 and +365 relative to the *hicA3* TSS were also detected (Fig. S2B). In contrast to the longest mRNA, most of these mRNAs were unaffected by the TAP treatment, suggesting they were monophosphorylated and therefore were not primary transcripts. *In silico* analysis of the +144 to +365 region did not reveal any other promoter

candidates, overall the data suggest that these mRNAs are truncated forms of *hicA3B3* mRNA.

HicB3 binds a dyad symmetry DNA motif. We performed gel shift experiments to establish whether HicB3 and/or the HicA3HicB3 complex bind to the *PhicA3* region *in vitro*. Purified HicB3-6His protein or HicA3HicB3-6His complex were incubated with a 365-bp PCR product bearing *PhicA3* or with a control DNA fragment taken from outside the *hicA3B3* region (Fig. 4B). HicB3-6His and the HicA3HicB3-6His complex were both able to bind the DNA fragment encompassing *PhicA3* but not the control fragment.

Sequence analysis of the *PhicA3* region revealed the presence of two 15-bp inverted repeats, corresponding to the dyad symmetry consensus T(G/A)GGT(A/G)TNA(C/T)ACC(T/C)A (Fig. 4A). We named these palindromes BS1 (bases -57 to -42, relative to the *hicA3* TSS) and BS2 (bases -17 to -2) and tested their ability to bind purified HicB3-6His *in vitro*. We used four different DNA fragments containing the -62 to +5 region and bearing either intact BS1 and BS2 sequences or base substitutions in BS1 (MU1-BS2 fragment), in BS2 (BS1-MU2 fragment) or in both (MU1-MU2' fragment) in gel shift assays. The substitutions were chosen so as to affect neither the -35 and -10 boxes of *PhicA3* nor the TSS (Fig. S3). HicB3-6His binding was observed with the DNA fragments bearing either BS1 or BS2 but not when both sites were mutated (Fig. 4C). In the MU1-MU2' fragment, substitutions in MU2' affected only the second half of the consensus - showing that dyad symmetry of the sequence is required for HicB3 binding *in vitro*.

To evaluate the role of the HicB3 binding sites in the regulation of *PhicA3 in vivo*, the BS1-BS2, MU1-BS2, BS1-MU2, and MU1-MU2' DNA fragments were cloned upstream of the *lacZ* reporter gene. The four reporter plasmids conferred a LacZ⁺ phenotype on *E. coli* on Xgal plates, which indicated that each insert contained an active promoter (Fig. 4D). When a second compatible plasmid bearing the *hicB3* gene was introduced into these four strains, the WT BS1-BS2 and mutated MU1-BS2 promoters were fully repressed (giving a LacZ⁻ phenotype), in contrast the mutated BS1-MU2 promoter remained active but at a lower level (LacZ^{+/-} phenotype), while the mutated MU1-MU2' promoter remained fully active (LacZ⁺ phenotype) (Fig. 4D). These *in vivo* data show that although HicB3 is able to bind both the BS1 and BS2 sites, the main operator of *PhicA3* is BS2 which overlaps with the -10 box.

HicA3 is an RNase. We sought to purify HicA3 and thus study its activity. We were initially unable to overproduce HicA3-6His alone (because of its high toxicity in *E. coli*) or to purify HicA3 after denaturation of the HicA3HicB3 complex (presumably because of its very high affinity for HicB3). We serendipitously found a "water shock" and renaturation procedure (described in the Material and Methods section) that enabled us to purify HicA3. As the *E. coli* HicA toxin had been shown to degrade mRNA (21), we tested HicA3's RNase activity on an *in vitro*-transcribed viral mRNA substrate. This mRNA was hydrolyzed by HicA3 but not by

HicB3-6His or the HicA3HicB3-6His complex (Fig. 5). Although the HicA3HicB3-6His complex lacks RNase activity, it is able to bind RNA as indicated by the observed RNA shift. HicA3 was also able to degrade two other *in vitro*-transcribed mRNAs (data not shown), suggesting that it can target various mRNAs *in vivo*.

We hypothesized that the HicA3's histidine 28 (His28) residue is involved in RNase activity because it is conserved in the *E. coli* HicA and *Y. pestis* HicA1 toxins (Fig. S1). Indeed, when we replaced His28 by alanine (H28A) via site-directed mutagenesis, the resulting HicA3-H28A-6His overproduction was not toxic to *E. coli* (data not shown). Furthermore, the purified protein was inactive *in vitro* but was able to aggregate mRNA as indicated by the stacking of the substrate in the well (Fig. 5).

HicA3B3 is not required for virulence in a bubonic plague model. Taken as a whole, our data show that HicB3 is the antitoxin for the HicA3 toxin and also a transcriptional repressor. Thus, the attenuated virulence of the $\Delta hicB3$ mutant described in our previous work (3) could result from either (i) the mutant's inability to grow efficiently *in vivo* when HicA3 is not neutralized or (ii) HicB3's regulation of virulence genes in addition to its role as an antitoxin. To distinguish between these hypotheses, we deleted the whole *hicA3B3* operon from the CO92 chromosome. In contrast to the $\Delta hicB3$ attenuated mutant, the $\Delta hicA3B3$ mutant was fully virulent in the murine model of bubonic plague (Fig. 6). Thus, HicB3 is not required for virulence in the absence of the HicA3 toxin.

The HicB3 antitoxin is a tetramer. We solved the X-ray crystal structure of HicB3 at a resolution of 2.12 Å (Table S2). HicB3 forms a tetramer, the symmetry of which can best be described as a dimer of dimers. The HicB3 monomer consists of two domains connected by a linker (residues 85 to 92) containing a short helical α_4 stretch (Fig. 7A). The N-terminal (Nt) domain adopts an antiparallel $\beta_1\beta_2\beta_3\alpha_1\alpha_2\alpha_3\beta_4$ fold. The long α_1 -helix lies in the cradle formed by the bend in the β -sheet, while the two short α_2 and α_3 helices flank the other face of the β -sheet. The C-terminal (Ct) $\beta_5\alpha_5\alpha_6$ domain (residues 93 to 135) forms a ribbon-helix-helix (RHH) motif. HicB3 dimerizes through this domain (Fig. 7A); the β_5 strands from two RHH motifs form a central antiparallel β -sheet and the pairs of helices form a helical bundle. In one subunit, the α_5 helix of the RHH motif packs against the α_1 helix of the Nt domain of the opposite subunit. In the other subunit, the α_5 helix interacts with the linker situated between the α_1 and α_2 helices. The two dimers bind through their Nt domains to form a ring-type tetramer (Fig. 7B and 7C). This interface is stabilized by the packing of hydrophobic patches (Ile2, Ile78, and Phe81 from one subunit, and Phe31, Ile34, Tyr66, Ile67, Ile78 and Leu79 from the other).

We used size-exclusion chromatography coupled to multi-angle laser light scattering (SEC-MALS) measurements to analyze HicB3. The monodisperse sample in SEC corresponds to a

molecular mass of 63.4 kDa, i.e. close to the value of 65.2 kDa expected for a tetramer (Fig. S4A). These observations were confirmed by analytical ultracentrifugation measurements showing that 95% of the HicB3 species in solution form a globular homotetramer (Fig. S4C).

The HicA3HicB3 complex primarily forms a heterohexamer. We were able to obtain crystals for the HicA3HicB3 complex only when subtilisin A was added during the crystallization process. We collected a complete diffraction dataset at a resolution of 2.12 Å (Table S2). The protease had cleaved off the Ct domain of HicB3 because no electron density was present beyond residue 85. The asymmetric crystal unit obtained under these conditions contains two copies of HicA3 and two copies of the Nt domain of HicB3 (HicB3-Nt), which thus form a heterotetramer (hereafter referred to as HicA3HicB3-Nt). HicB3-Nt has the same structure in the complex and in the unbound HicB3 protein (root mean square deviation for 85 superposed residues: 1.4 Å). The HicA3HicB3-Nt complex is elongated, with a HicA3 subunit binding to each end of the HicB3-Nt dimer interface (Fig. 7D). HicA3 adopts an $\alpha 1\beta 1\beta 2\beta 3\alpha 2$ fold characteristic of a double-stranded RNA (dsRNA)-binding domain. The HicA3 $\alpha 2$ helix packs against the β -sheet of HicB3. The β -sheets of HicA3 and HicB3 juxtapose in the complex but do not form a continuous β -sheet. The $\alpha 1$ helix of HicB3 covers one face of the HicA3 β -sheet. The interface is stabilized both by hydrophobic and polar interactions (10 hydrogen bonds and 5 salt bridges). The His28 residue required for HicA3 RNase activity is situated at the Nt end of the $\beta 2$ strand and is completely buried at the interface with HicB3, suggesting that HicB3 neutralizes HicA3 by blocking its active site. Overall, 28% of the HicA3's available surface area is masked by complex formation.

When using SEC-MALS to determine the stoichiometry of the HicA3HicB3 complex (in the absence of subtilisin processing), we measured a molecular mass of about 78.6 kDa close to the 79.8 kDa value calculated for a hexamer of two HicA3 units and four HicB3 units (Fig. S4B). The analytical ultracentrifugation data are compatible with the presence of 90% of the molecules in solution as a 2:4 heterohexamer (Fig. S4D). Interestingly, the superposition of the structures of the HicA3HicB3-Nt heterotetramer and the HicB3 homotetramer revealed a steric clash between the end of the β -sheet of the two HicA3 subunits and the end of the last α helix ($\alpha 6$) in HicB3 subunits 2 and 4 (Fig. 8A). This observed steric hindrance is thus consistent with the formation of a heterohexamer composed of two subunits of HicA3 bound to opposing subunits of a HicB3 tetramer (Fig. 8B).

DISCUSSION

We have identified HicA3 and characterized HicA3B3, a novel, functional type II TAS in *Y. pestis*. HicA3 is a 66-aa monomeric RNase. The HicB3 antitoxin has two functions: it neutralizes HicA3 through direct binding and represses *hicA3B3* transcription. Type II two-

component TASs are highly modular and can be classified into 11 families as a function of their structure or mode of action (for a recent review, see (32)). The X-ray structures of TA complexes have been solved for seven families. The present report is the first for a HicAB family complex. In the various TASs, some toxins are monomeric and others are homodimeric (33–36). Antitoxins are thought to be dimeric and bind DNA via an N- or C-terminal dimerization domain folding as an RHH-, helix-turn-helix- (HTH), Phd-like-, or AbrB-like domain (37). The antitoxin dimer binds one, two or four toxin monomers (33, 36, 38). HicB3 assembles as a dimer of dimers. Each tetramer possesses two RHH DNA-binding folds and is able to receive two HicA3 molecules. The HicA3B3 complex is therefore the first example of a tetrameric antitoxin that binds two toxin monomers. In the HicA3HicB3 complex, the HicB3 Nt domain binds to one side of the toxin and significantly occludes the catalytic His28. We also showed that both the HicB3 tetramer and the HicA3B3 complex bind to 15-bp operators flanking *PhicA3 in vitro* and repress *PhicA3 in vivo*. As observed for other RHH transcription regulators (39, 40), DNA binding is probably mediated via insertion of the two HicB3 RHH domains into the major groove of the DNA double helix, with each ribbon interacting with one TRGGTRT half-site. *In silico* analysis (<http://www.rsat.eu>, (41)) did not reveal any other occurrences of the operator sequence in the *Y. pestis* CO92 genome - suggesting that *hicA3B3* is the only operon regulated by HicB3.

In canonical, well-studied TASs such as RelBE and Phd-Doc, interaction with DNA primarily consists of antitoxin binding to operator sequences. The toxin acts as either a co-repressor or a de-repressor, depending on the toxin:antitoxin ratio (42). At low toxin concentrations, toxin binding enhances the antitoxin's affinity for the operator. At high toxin concentrations, affinity for the operator decreases. This "conditional cooperativity" mechanism relies on allosteric modification of the antitoxin upon toxin binding (43, 44). In contrast to canonical type II TASs, the dimeric *E. coli* MqsA antitoxin (part of the HTH repressor family) does not exhibit conditional cooperativity (45). MqsA is fully folded and binds DNA alone. The MqsR toxin is not a co-repressor, since the MqsRA complex is unable to bind DNA. However, the toxin destabilizes the MqsA-DNA repression complex via allosteric modification (45). Our data suggest that HicA3 may not have a co-repressor function, since (i) the HicB3 tetramer is already fully folded in the absence of HicA3, and (ii) HicB3 and the HicA3B3 complex bind DNA *in vitro* to the same extent. However, we observed that *PhicA3* repression can be alleviated by overexpression of the non-toxic HicA3-H28A protein *in vivo* (data not shown). This finding suggests that excess HicA3 destabilizes the ternary HicA3-HicB3-operator complex and titrates out the HicB3 repressor. Further research will be required to establish whether HicA3 is solely a de-repressor (like MqsA (45)) or both a co-repressor and a de-repressor.

X-ray crystallography revealed that HicA3 has a dsRNA-binding fold, which suggests that the toxin can cleave mRNA in the vicinity of double-stranded regions. This fits with the observation that *E. coli* HicA degrades both mRNA and transfer-messenger RNA (tmRNA) (21). Targeted

mutagenesis of HicA3 highlighted His28 as being required for RNase activity. While this manuscript was in preparation, Butt et al. reported the solution structure of the *Burkholderia pseudomallei* HicA toxin (BpsHicA) and showed that BpsHicA requires Gly22 and His24 for RNase activity (46). These residues correspond to Gly26 and His28 in HicA3. BpsHicA and HicA3 share the same folding structure.

The fact that we were able to construct a *Y. pestis* Δ *hicB3* mutant indicates that the expression of chromosomal *hicA3* in the absence of the HicB3 antitoxin is not lethal; the mutant grows slowly but it does grow. This observation suggests that the amount of HicA3 RNase produced from *hicA3* mRNA is not highly toxic to *Y. pestis*. Hence, either (i) the cleavage rate of HicA3 is too slow to produce bacteriostasis, (ii) HicA3 is produced in very low quantities (even though *PhicA3* is derepressed) or (iii) HicA3 targets are not essential for growth. These hypotheses will be evaluated in future studies. A comparative analysis of the cleavage rate of the HicA3, HicA1, EcHicA, BpsHicA RNases and mutant HicA3 proteins may help to characterize the catalytic mechanism of these RNases.

A few TASs were shown to be involved in virulence in *Salmonella enterica* (47), *Haemophilus influenzae* (48) and *Mycobacterium tuberculosis* (49). We previously suggested that *hicB3* may be involved in plague pathogenesis (3). Our present results show that a *Y. pestis* Δ *hicA3B3* mutant is fully virulent; hence, the loss of virulence of the Δ *hicB3* mutant is due to inefficient *in vivo* growth caused by the activity of free HicA3 RNase, and not to the lack of HicB3 as a regulator. *Y. pestis* encodes three other active type II TASs and seven putative ones (5) that could compensate for the loss of HicA3B3. The other complete HicAB system (HicA1B1) was a possible candidate for this role. However, we found that a Δ *hicA1B1* Δ *hicA3B3* double mutant was fully virulent in the murine plague model (unpublished data). It is worth noting that in other species, deletion of between three and five TA operons was required before a change in phenotype could be observed (50, 51). Although our data indicate that HicA3B3 is not important for *Y. pestis* virulence in the rodent, one cannot rule out the possibility that the system is required in other environments (e.g. in the flea or for survival in the soil). The *B. pseudomallei* HicAB system was recently shown to play a role in persister cell formation following exposure to ciprofloxacin (46). Future experiments should evaluate the role of the HicA1B1 and HicA3B3 systems in *Y. pestis* persistence.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Laure Marceau for sequencing, Hervé Drobecq for mass spectrometry analysis, Julien Herrou for suggesting the use of subtilisin to crystallize the complex, and Rayan Farhat for the gift of viral mRNA. We thank the BSL-3 Facility staff from the Institut Pasteur de Lille, Karine Blondeau and Seiki Achiedo for the production of SeMet-labeled HicB3, and the staff at PROXIMA 1 for help with synchrotron data collection and processing (and particularly Pierre

Legrand for helpful discussions). We are grateful to Françoise Jacob-Dubuisson, Alain Baulard and Michel Simonet for critical reading of the manuscript.

Work in FS's lab was funded by INSERM, CNRS, Institut Pasteur de Lille, Université Lille Nord de France, and the Région Nord-Pas-de-Calais Arcir Emergence grant 07230045 to FS, and the ANR grant 07-MIME-017-01 IVOTIMP to FS. Work in HVT's lab was funded by the French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI) ANR grant 10-INSB-05-01. The analytical ultracentrifugation measurements were performed at the Imagif facility (Gif-sur-Yvette, France). SBT received a doctoral studentship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

REFERENCES

1. **Butler T.** 2013. Plague gives surprises in the first decade of the 21st century in the United States and worldwide. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **89**:788–793.
2. **Lathem WW, Crosby SD, Miller VL, Goldman WE.** 2005. Progression of primary pneumonic plague: A mouse model of infection, pathology, and bacterial transcriptional activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**:17786–17791.
3. **Pradel E, Lemaître N, Merchez M, Ricard I, Reboul A, Dewitte A, Sebbane F.** 2014. New insights into how *Yersinia pestis* adapts to its mammalian host during bubonic plague. *PLoS Pathog* **10**:e1004029.
4. **Sebbane F, Lemaître N, Sturdevant DE, Rebeil R, Virtaneva K, Porcella SF, Hinnebusch BJ.** 2006. Adaptive response of *Yersinia pestis* to extracellular effectors of innate immunity during bubonic plague. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**:11766–11771.
5. **Goulard C, Langrand S, Carniel E, Chauvaux S.** 2010. The *Yersinia pestis* chromosome encodes active addiction toxins. *J. Bacteriol.* **192**:3669–3677.
6. **Yamaguchi Y, Park J-H, Inouye M.** 2011. Toxin-antitoxin systems in bacteria and archaea. *Annu. Rev. Genet.* **45**:61–79.
7. **Cook GM, Robson JR, Frampton RA, McKenzie J, Przybilski R, Fineran PC, Arcus VL.** 2013. Ribonucleases in bacterial toxin–antitoxin systems. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* **1829**:523–531.
8. **Unoson C, Wagner EGH.** 2008. A small SOS-induced toxin is targeted against the inner membrane in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **70**:258–270.
9. **Bernard P, Kézdy KE, Van Melderen L, Steyaert J, Wyns L, Pato ML, Higgins PN, Couturier M.** 1993. The F plasmid CcdB protein induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by gyrase. *J. Mol. Biol.* **234**:534–541.
10. **Zhang Y, Inouye M.** 2011. RatA (YfjG), an *Escherichia coli* toxin, inhibits 70S ribosome association to block translation initiation. *Mol. Microbiol.* **79**:1418–1429.

11. **Correia FF, D'Onofrio A, Rejtar T, Li L, Karger BL, Makarova K, Koonin EV, Lewis K.** 2006. Kinase activity of overexpressed HipA is required for growth arrest and multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **188**:8360–8367.
12. **Germain E, Castro-Roa D, Zenkin N, Gerdes K.** 2013. Molecular mechanism of bacterial persistence by HipA. *Mol. Cell* **52**:248–254.
13. **Yamaguchi Y, Inouye M.** 2011. Regulation of growth and death in *Escherichia coli* by toxin–antitoxin systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**:779–790.
14. **Fozo EM, Hemm MR, Storz G.** 2008. Small toxic proteins and the antisense RNAs that repress them. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**:579–589.
15. **Hayes F, Van Melder L.** 2011. Toxins-antitoxins: diversity, evolution and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **46**:386–408.
16. **Fineran PC, Blower TR, Foulds IJ, Humphreys DP, Lilley KS, Salmond GP.** 2009. The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein–RNA toxin–antitoxin pair. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**:894–899.
17. **Samson JE, Bélanger M, Moineau S.** 2013. Effect of the abortive infection mechanism and type III toxin/antitoxin system AbiQ on the lytic cycle of *Lactococcus lactis* phages. *J. Bacteriol.* **195**:3947–3956.
18. **Zielenkiewicz U, Cegłowski P.** 2005. The toxin-antitoxin system of the Streptococcal plasmid pSM19035. *J. Bacteriol.* **187**:6094–6105.
19. **Hallez R, Geeraerts D, Sterckx Y, Mine N, Loris R, Van Melder L.** 2010. New toxins homologous to ParE belonging to three-component toxin-antitoxin systems in *Escherichia coli* O157:H7. *Mol. Microbiol.* **76**:719–732.
20. **Pandey DP, Gerdes K.** 2005. Toxin–antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res.* **33**:966–976.
21. **Jorgensen MG, Pandey DP, Jaskolska M, Gerdes K.** 2008. HicA of *Escherichia coli* defines a novel family of translation-independent mRNA interferases in bacteria and archaea. *J. Bacteriol.* **191**:1191–1199.
22. **Sikkema DJ, Brubaker RR.** 1987. Resistance to pesticin, storage of iron, and invasion of HeLa cells by *Yersinia*. *Infect. Immun.* **55**:572–578.
23. **Datsenko KA, Wanner BL.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**:6640–6645.
24. **Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RR, Kutchma AJ, Schweizer HP.** 1998. A broad-host-range Flp-*FRT* recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* **212**:77–86.
25. **Fetherston JD, Schuetze P, Perry RD.** 1992. Loss of the pigmentation phenotype in *Yersinia pestis* is due to the spontaneous deletion of 102 kb of chromosomal DNA which is flanked by a repetitive element. *Mol. Microbiol.* **6**:2693–2704.

26. **Burke E, Barik S.** 2003. Megaprimer PCR, p. 525–531. *In* Bartlett, JMS, Stirling, D (eds.), PCR Protocols. Humana Press.
27. **Quevillon-Cheruel S, Collinet B, Trésaugues L, Minard P, Henckes G, Aufrère R, Blondeau K, Zhou C-Z, Liger D, Bettache N, Poupon A, Aboufath I, Leulliot N, Janin J, Tilbeurgh H van.** 2007. Cloning, production, and purification of proteins for a medium-scale structural genomics project, p. 21–37. *In* Walker, JM, Doublé, S (eds.), Macromolecular Crystallography Protocols. Humana Press.
28. **Argaman L, Hershberg R, Vogel J, Bejerano G, Wagner EGH, Margalit H, Altuvia S.** 2001. Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*. *Curr. Biol.* **11**:941–950.
29. **Lohmann V, Körner F, Koch J-O, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R.** 1999. Replication of subgenomic Hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* **285**:110–113.
30. **Lemaître N, Ricard I, Pradel E, Foligné B, Courcol R, Simonet M, Sebbane F.** 2012. Efficacy of ciprofloxacin-gentamicin combination therapy in murine bubonic plague. *PLoS ONE* **7**:e52503.
31. **Winn MD, Ballard CC, Cowtan KD, Dodson EJ, Emsley P, Evans PR, Keegan RM, Krissinel EB, Leslie AGW, McCoy A, McNicholas SJ, Murshudov GN, Pannu NS, Potterton EA, Powell HR, Read RJ, Vagin A, Wilson KS.** 2011. Overview of the CCP 4 suite and current developments. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **67**:235–242.
32. **Park SJ, Son WS, Lee B-J.** 2013. Structural overview of toxin–antitoxin systems in infectious bacteria: A target for developing antimicrobial agents. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **1834**:1155–1167.
33. **Gazit E, Sauer RT.** 1999. The Doc toxin and Phd antidote proteins of the bacteriophage P1 plasmid addiction system form a heterotrimeric complex. *J. Biol. Chem.* **274**:16813–16818.
34. **Loris R, Dao-Thi M-H, Bahassi EM, Van Melderen L, Poortmans F, Liddington R, Couturier M, Wyns L.** 1999. Crystal structure of CcdB, a topoisomerase poison from *E. coli*. *J. Mol. Biol.* **285**:1667–1677.
35. **Overgaard M, Borch J, Gerdes K.** 2009. RelB and RelE of *Escherichia coli* form a tight complex that represses transcription via the ribbon–helix–helix motif in RelB. *J. Mol. Biol.* **394**:183–196.
36. **Kamada K, Hanaoka F, Burley SK.** 2003. Crystal structure of the MazE/MazF complex: molecular bases of antidote-toxin recognition. *Mol. Cell* **11**:875–884.
37. **Anantharaman V, Aravind L.** 2003. New connections in the prokaryotic toxin-antitoxin network: relationship with the eukaryotic nonsense-mediated RNA decay system. *Genome Biol.* **4**:R81.

38. **Kamphuis M, Chiara Monti M, H. van den Heuvel R, Lopez-Villarejo J, Diaz-Orejas R, Boelens R.** 2007. Structure and function of bacterial Kid-Kis and related toxin-antitoxin systems. *Protein Pept. Lett.* **14**:113–124.
39. **Brown BM, Bowie JU, Sauer RT.** 1990. Arc repressor is tetrameric when bound to operator DNA. *Biochemistry (Mosc.)* **29**:11189–11195.
40. **Bøggild A, Sofos N, Andersen KR, Feddersen A, Easter AD, Passmore LA, Brodersen DE.** 2012. The crystal structure of the intact *E. coli* RelBE toxin-antitoxin complex provides the structural basis for conditional cooperativity. *Structure* **20**:1641–1648.
41. **Van Helden J, André B, Collado-Vides J.** 2000. A web site for the computational analysis of yeast regulatory sequences. *Yeast* **16**:177–187.
42. **Overgaard M, Borch J, Jørgensen MG, Gerdes K.** 2008. Messenger RNA interferase RelE controls *relBE* transcription by conditional cooperativity. *Mol. Microbiol.* **69**:841–857.
43. **Garcia-Pino A, Balasubramanian S, Wyns L, Gazit E, De Greve H, Magnuson RD, Charlier D, van Nuland NAJ, Loris R.** 2010. Allostery and intrinsic disorder mediate transcription regulation by conditional cooperativity. *Cell* **142**:101–111.
44. **Winther KS, Gerdes K.** 2012. Regulation of enteric *vapBC* transcription: induction by VapC toxin dimer-breaking. *Nucleic Acids Res.* **40**:4347–4357.
45. **Brown BL, Lord DM, Grigoriu S, Peti W, Page R.** 2013. The *Escherichia coli* toxin MqsR destabilizes the transcriptional repression complex formed between the antitoxin MqsA and the *mqsRA* operon promoter. *J. Biol. Chem.* **288**:1286–1294.
46. **Butt A, Higman VA, Williams C, Crump MP, Hemsley CM, Harmer N, Titball RW.** 2014. The HicA toxin from *Burkholderia pseudomallei* has a role in persister cell formation. *Biochem. J.* **459**: 333-344.
47. **De la Cruz MA, Zhao W, Farenc C, Gimenez G, Raoult D, Cambillau C, Gorvel J-P, Méresse S.** 2013. A toxin-antitoxin module of *Salmonella* promotes virulence in mice. *PLoS Pathog* **9**:e1003827.
48. **Ren D, Walker AN, Daines DA.** 2012. Toxin-antitoxin loci *vapBC-1* and *vapXD* contribute to survival and virulence in nontypeable *Haemophilus influenzae*. *BMC Microbiol.* **12**:263.
49. **Ramage HR, Connolly LE, Cox JS.** 2009. Comprehensive functional analysis of *Mycobacterium tuberculosis* toxin-antitoxin systems: implications for pathogenesis, stress responses, and evolution. *PLoS Genet* **5**:e1000767.
50. **Kim Y, Wang X, Ma Q, Zhang X-S, Wood TK.** 2009. Toxin-antitoxin systems in *Escherichia coli* influence biofilm formation through YjgK (TabA) and fimbriae. *J. Bacteriol.* **191**:1258–1267.
51. **Frampton R, Aggio RBM, Villas-Bôas SG, Arcus VL, Cook GM.** 2012. Toxin-antitoxin systems of *Mycobacterium smegmatis* are essential for cell survival. *J. Biol. Chem.* **287**:5340–5356.

52. **Studier FW, Moffatt BA.** 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**:113–130.
53. **Herrero M, Lorenzo V de, Timmis KN.** 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **172**:6557–6567.
54. **Grant SG, Jessee J, Bloom FR, Hanahan D.** 1990. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**:4645–4649.
55. **Guyer MS, Reed RR, Steitz JA, Low KB.** 1981. Identification of a sex-factor-affinity site in *E. coli* as gamma delta. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **45 Pt 1**:135–140.
56. **Simon R, Priefer U, Pühler A.** 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Nat. Biotechnol.* **1**:784–791.
57. **Doll JM, Zeitz PS, Ettestad P, Bucholtz AL, Davis T, Gage K.** 1994. Cat-transmitted fatal pneumonic plague in a person who traveled from Colorado to Arizona. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **51**:109–114.
58. **Veiga E, De Lorenzo V, Fernández LA.** 1999. Probing secretion and translocation of a β -autotransporter using a reporter single-chain Fv as a cognate passenger domain. *Mol. Microbiol.* **33**:1232–1243.
59. **Guzman L-M, Belin D, Carson MJ, Beckwith JON.** 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J. Bacteriol.* **177**:4121–4130.
60. **Kalogeraki VS, Winans SC.** 1997. Suicide plasmids containing promoterless reporter genes can simultaneously disrupt and create fusions to target genes of diverse bacteria. *Gene* **188**:69–75.

Table 1. Strains and plasmids

Strains or plasmids	Relevant property	Source or reference
<i>E. coli</i>		
BL21 (DE3)	<i>lon ompT</i> , used for protein production	(52)
CC118 λ pir	Δ lacX74 <i>recA1</i> , used for construction of reporter plasmids bearing pir-dependant R6K replication origin	(53)
DH5 α	<i>recA1 endA1 Δ(argF-lac)U169 ϕ80dlacZΔM15</i> , used for cloning	(54)
MG1655	K-12 WT strain	(55)
S17-1 λ pir	Donor strain in conjugation	(56)
<i>Y. pestis</i>		
CO92	Virulent strain	(57)
CO92 Δ hicA3B3::Tp	<i>hicA3B3</i> deleted and exchanged with the FRT-TpR-FRT cassette from pEP1087	This work
KIM6+	Lacks the pYV (also called pCD) virulence plasmid, attenuated strain	(22)
YPEP430	KIM6+ Δ lacZ	This work
YSBT26	KIM6+ Δ hicB3::Tp, TpR	This work
YSBT34	KIM6+ Δ hicA3B3::Tp, TpR	This work
YSBT54	KIM6+ Δ lacZ Δ hicB3::Tp, derived from YPEP430, TpR	This work
YSBT55	KIM6+ Δ lacZ Δ hicA3B3::Tp, derived from YPEP430, TpR	This work
YSBT59	KIM6+ Δ lacZ <i>P</i> hicA3::lacZ, chromosomal insertion of pSBT30 into YPEP430, KmR	This work
YSBT61	KIM6+ Δ lacZ <i>P</i> hicA3::lacZ Δ hicA3B3::Tp, chromosomal insertion of pSBT30 into YSBT55, KmR TpR	This work
YSBT62	KIM6+ Δ lacZ <i>hicB3</i> ::lacZ, chromosomal insertion of pSBT36 into YPEP430, KmR	This work
YSBT151	KIM6+ Δ lacZ <i>hicB3</i> ::lacZ, chromosomal insertion of pSBT172 into YPEP430, KmR	This work
YSBT152	KIM6+ Δ lacZ <i>hicB3</i> ::lacZ Δ hicB3::Tp, chromosomal insertion of pSBT172 into YSBT54, KmR TpR	This work
YSBT157	KIM6+ Δ lacZ <i>hicB3</i> ::lacZ Δ hicB3-FRT, derived from YSBT152 by deletion of the TpR cassette, KmR	This work
YSBT170	KIM6+ Δ lacZ Δ P <i>hicA3</i> ::Tp-term <i>hicB3</i> ::lacZ, TpR cassette with transcription terminator, KmR	This work
YSBT172	KIM6+ Δ lacZ Δ P <i>hicA3</i> ::Tp-term <i>hicB3</i> ::lacZ Δ hicB3-FRT, TpR cassette with transcription terminator, KmR	This work
YSBT173	KIM6+ Δ lacZ Δ P <i>hicA3</i> -FRT <i>hicB3</i> ::lacZ derived from YSB170 by deletion of the TpR cassette, KmR	This work
YSBT175	KIM6+ Δ lacZ Δ P <i>hicA3</i> -FRT <i>hicB3</i> ::lacZ Δ hicB3-FRT, derived from YSBT172 by deletion of the TpR cassette, KmR	This work
Plasmids		
pAK-Not	Expression vector, <i>P</i> lac promoter, ori colE1, CmR	(58)
pAKK-Not	pSBT41-derivative deleted of the <i>NotI</i> fragment bearing <i>hicB3</i> , <i>P</i> lac promoter, KmR	This work
pBAD30	Expression vector, <i>Para</i> promoter, ori p15A, ApR	(59)
pCRII	Cloning vector, <i>P</i> lac promoter, ApR KmR	Invitrogen
pEP1013	Red recombinase vector, pKD46-derivative bearing <i>sacB</i> , ApR	(3)
pEP1087	Template for the FRT-TpR-FRT cassette amplification, ori R6K, ApR TpR	(3)
pEP1164	pCRII bearing the <i>hicA3</i> promoter region (208 bp insert)	This work
pEP1165	pCRII bearing <i>hicA3-hicB3</i> cloned opposite <i>P</i> lac (939 bp insert)	This work
pEP1216	Template for the TpR-terminator cassette amplification, ori R6K, ApR TpR	This work
pEP1319	pEP1320 bearing <i>hicB3</i> cotranscribed with <i>dfiB</i> , oriR6K, TpR	This work
pEP1320	Cloning vector bearing <i>dfiB</i> , oriR6K, TpR	This work
pEP1336	<i>lacZ</i> reporter plasmid bearing mutated <i>P</i> hicA3 MU1-BS2 DNA fragment, ApR	This work
pEP1339	<i>lacZ</i> reporter plasmid bearing WT <i>P</i> hicA3 BS1-BS2 DNA fragment, ApR	This work
pEP1350	<i>lacZ</i> reporter plasmid bearing mutated <i>P</i> hicA3 BS1-MU2 DNA fragment, ApR	This work
pEP1352	<i>lacZ</i> reporter plasmid bearing mutated <i>P</i> hicA3 MU1-MU2' DNA fragment, ApR	This work
pET24a+	C-terminal 6-Histidine tag expression vector, T7 promoter, KmR	Novagen
pFLP2	FLP recombinase expression vector, ApR	(24)
pSBT7	pCRII bearing <i>hicB3</i> under <i>P</i> lac (151 bp upstream from the <i>hicB3</i> start and 39 bp downstream from the <i>hicB3</i> stop)	This work
pSBT10	pBAD30 bearing <i>hicA3</i> and its SD sequence as an <i>EcoRI-SalI</i> insert	This work
pSBT13	pCRII bearing <i>hicB3</i> flanked by with <i>NotI</i> sites	This work
pSBT18	pAK-Not bearing <i>hicB3</i> under <i>P</i> lac, pSBT13 <i>NotI</i> fragment insertion, CmR	This work
pSBT30	pVIK112 bearing an <i>EcoRI</i> fragment from pEP1164, <i>P</i> hicA3- <i>lacZ</i> fusion, KmR	This work
pSBT36	pVIK112 bearing an <i>EcoRI-EcoRV</i> fragment from pSBT7 cloned into <i>EcoRI</i> and <i>SmaI</i>	This work
pSBT41	pSBT18 derivative in which the CmR cassette is replaced by the KmR cassette from pUC4K	This work
pSBT71	pET24a+ bearing <i>hicA3B3</i> as an <i>NdeI-XhoI</i> insert to produce HicA3 and HicB3-6His	This work
pSBT73	pCRII bearing <i>hicB3</i> with <i>NdeI</i> and <i>XhoI</i> flanking sites	This work
pSBT74	pET24a+ bearing <i>hicB3</i> cloned as an <i>NdeI-XhoI</i> fragment from pSBT73, to produce HicB3-6His	This work
pSBT113	pCRII bearing <i>hicA3-H28A</i> with <i>NdeI</i> and <i>XhoI</i> flanking sites	This work
pSBT116	pET24a+ bearing the <i>hicA3-H28A NdeI-XhoI</i> fragment from pSBT113, to produce HicA3-H28A-6His	This work
pSBT172	pVIK112 bearing the <i>hicA3-hicB3</i> intergenic region (253 bp upstream and 99 bp downstream from the <i>hicB3</i> ATG)	This work
pSBT174	pCRII bearing the 5' end of <i>hicB3</i> (codons 1 to 93) with flanking <i>NotI</i> sites	This work
pSBT230	pCRII bearing <i>hicA3-H28A</i> with flanking <i>EcoRI</i> and <i>SalI</i> sites	This work
pSBT231	pCRII bearing <i>hicB1</i> with flanking <i>NotI</i> and <i>SalI</i> sites	This work
pSBT232	pCRII bearing <i>hicB2</i> with flanking <i>NotI</i> and <i>SalI</i> sites	This work
pSBT237	pBAD30 bearing the <i>hicA3-H28A EcoRI-SalI</i> fragment of pSBT230 cloned under <i>Para</i>	This work
pSBT238	pAKK-Not bearing the <i>hicB1 NotI-SalI</i> fragment of pSBT231 cloned under <i>P</i> lac	This work
pSBT239	pAKK-Not bearing the <i>hicB2 NotI-SalI</i> fragment of pSBT232 cloned under <i>P</i> lac	This work
pUC4K	Source of KmR cassette, ApR KmR	Amersham
pVIK112	ori R6K suicide vector bearing the promoterless <i>lacZ</i> reporter gene, KmR	(60)

Ap, ampicillin; Km, kanamycin; Tp, trimethoprim; Cm, chloramphenicol

Plac, lactose operon promoter; Para, arabinose operon promoter

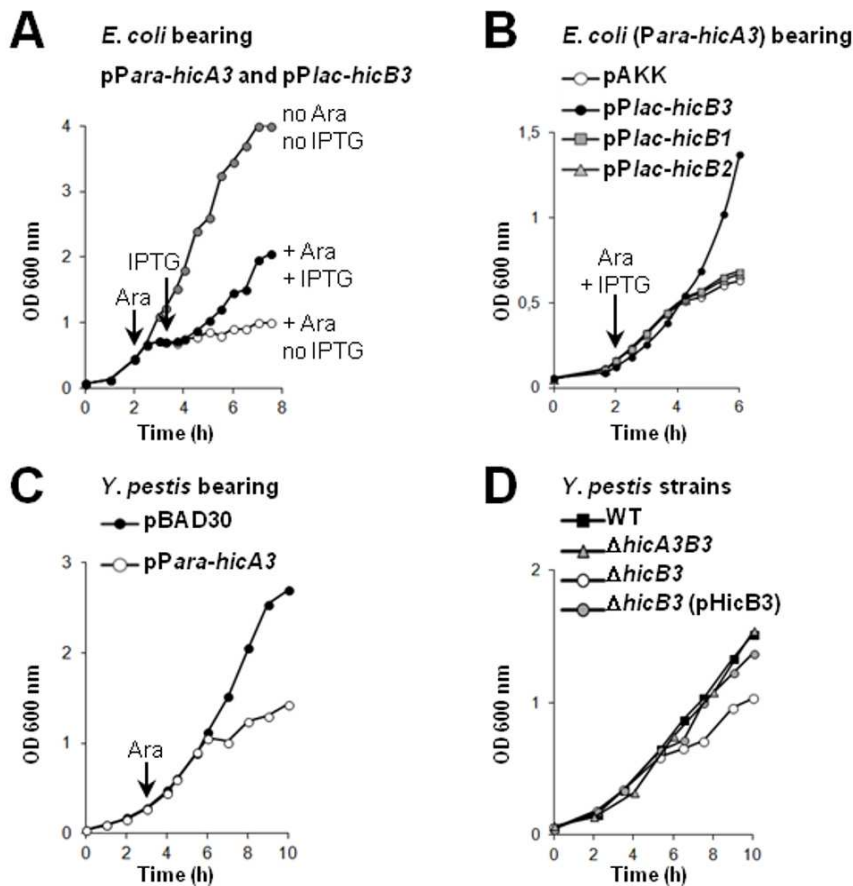


Fig. 1. Growth curves in LB broth. (A) *E. coli* MG1655 bearing both pSBT10 (*Para-hicA3*) and pSBT41 (*Plac-hicB3*) was grown in three flasks in parallel. Arrows indicate the addition of inducers: addition of 0.5 mM arabinose (Ara) to two cultures (black and white circles) or 1 mM IPTG to one culture (black circles). Gray circles correspond to growth in the absence of inducer. (B) *E. coli* DH5 α bearing pSBT10 (*Para-hicA3*) and either pSBT41 (*Plac-hicB3*), pSBT238 (*Plac-hicB1*), pSBT239 (*Plac-hicB2*) or pAKK (empty plasmid). Inducers were added to each of the four cultures. (C) *Y. pestis* KIM6⁺ bearing pBAD30 (empty plasmid) or pSBT10 (*Para-hicA3*). After 180 min, 1 mM Ara was added to both cultures. (D) *Y. pestis* KIM6⁺ and Δ *hicB3* mutants. Plasmid pSBT7 (p*HicB3*) bears the *hicB3* gene. The curves are representative of at least three independent experiments.

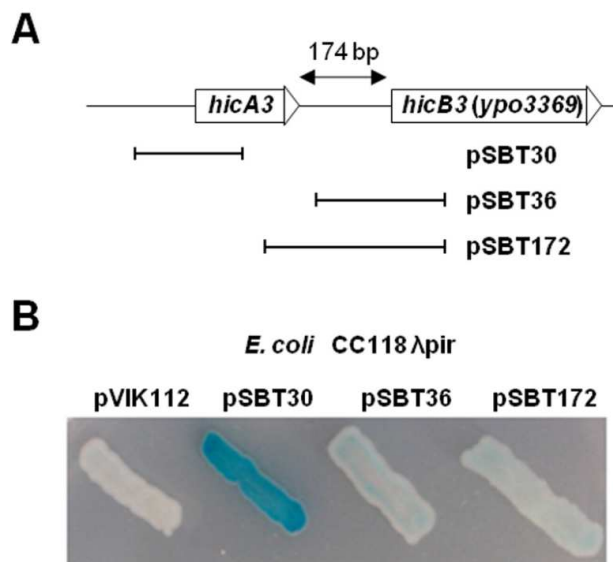


Fig. 2. (A) Genomic organization of the *Y. pestis* CO92 *hicA3-hicB3* locus. This organization is strictly conserved for the KIM6⁺ chromosome. The DNA fragments cloned into pVIK112 to yield *PhicA3-lacZ* and *hicB3-lacZ* reporter fusions are depicted here: the pSBT30 insert encompasses the sequence extending 117 bp upstream and 90 bp downstream of the *hicA3* start codon, while the pSBT36 and pSBT172 inserts encompass the sequence extending 151 or 253 bp upstream of the *hicB3* start codon, and 99 bp downstream. (B) LacZ phenotype of *E. coli* CC118 λ pir bearing pVIK112 (empty plasmid), pSBT30, pSBT36 or pSBT172 on Xgal plates. Transformants were patched onto LB-Km-Xgal plates and incubated at 37°C for 24 h. The intensity of the blue color reflects the β -galactosidase activity level.

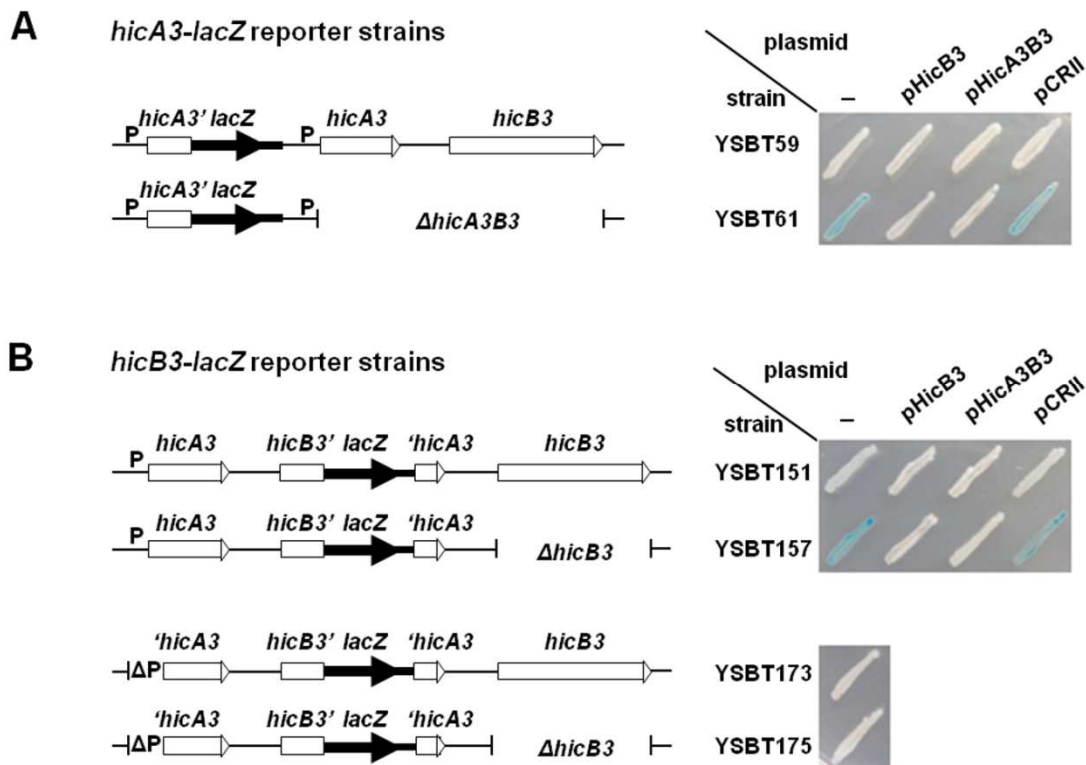


Fig. 3. Schematic representation of the *hicA3B3* region in the different *Y. pestis* KIM6⁺ Δ *lacZ* reporter strains and the associated LacZ phenotypes on Xgal plates. P indicates the *hicA3* promoter. Strains were patched onto LB-Km-Xgal plates and incubated at 28°C for 48 h. (A) *hicA3'-lacZ* fusions generated by chromosomal integration of pSBT30. YSBT61 transformed with pSBT7 (indicated as pHicB3) or pEP1165 (indicated as pHicA3B3) turned LacZ⁻, while the pCR11 (empty plasmid) transformant remained LacZ⁺. (B) *hicB3'-lacZ* fusions generated by chromosomal integration of pSBT172. YSBT151 is LacZ^{+/-}, whereas YSBT157 is LacZ⁺. YSBT151 and YSBT157 were also transformed with the above-mentioned plasmids: pHicB3 and pHicA3B3 generate full repression on both strains (LacZ⁻ phenotype), while the empty plasmid does not. Derivatives of YSBT151 and YSB157 bearing an 88-bp deletion around *P**hicA3* (Δ P) do not present any β -galactosidase activity.

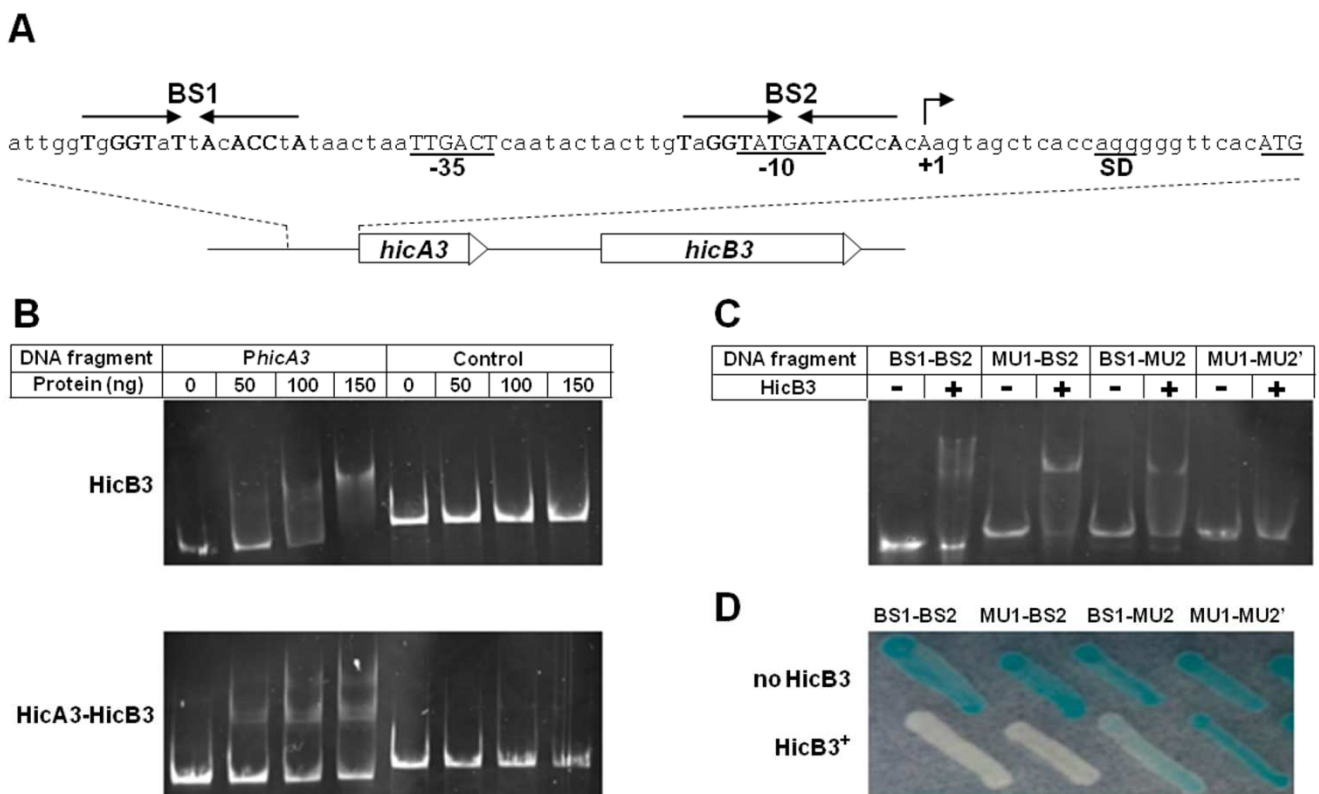


Fig. 4. (A) Nucleotide sequence of the *hicA3* upstream region. The -10 and -35 promoter sequences, the ribosome binding site (SD) and the HicA3 initiation codon (ATG) are underlined. The BS1 and BS2 palindromic sequences are depicted as converging arrows. Block letters in bold correspond to bases conserved in the repeat. The TSS (+1) is indicated by an arrow. (B) Gel shift assay of DNA fragments bearing *PhicA3* (365 bp) or part of *ymt* (control sequence, 517 bp) incubated with HicB3-6His or HicA3HicB3-6His for 20 min at RT. (C) Gel shift assay of the DNA fragments BS1-BS2, MU1-BS2, BS1-MU2 and MU1-MU2' (1.25 pmol), incubated in the presence (+) or absence (-) of 2.3 pmol of HicB3-6His for 20 min at RT. (D) Promoter activities of the BS1-BS2, MU1-BS2, BS1-MU2 and MU1-MU2' DNA fragments cloned upstream of *lacZ*. The four recombinant plasmids were introduced into *E. coli* CC118 λ pir carrying a compatible plasmid bearing the *hicB3* gene (HicB3⁺) or an empty vector (no HicB3). Transformants were patched onto LB-Ap-Tp-Xgal plates.

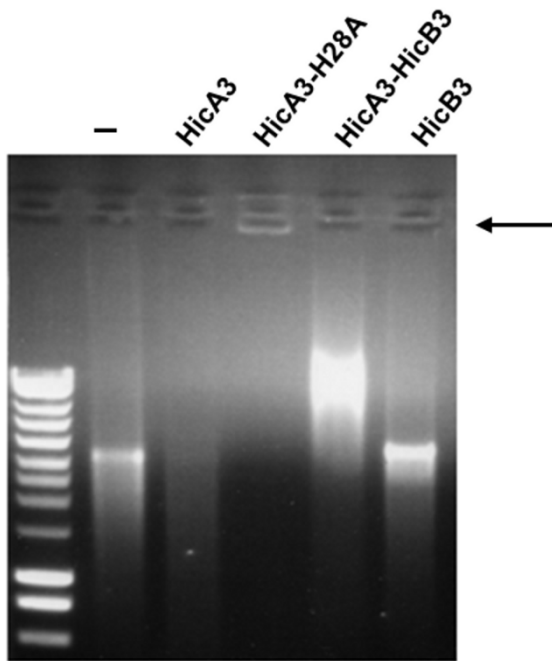


Fig. 5. RNase activity of HicA3, HicA3-H28A-6His, HicA3HicB3-6His and HicB3-6His. The arrow indicates the stacking of the mRNA-HicA3-H28A-6His complex in the well.

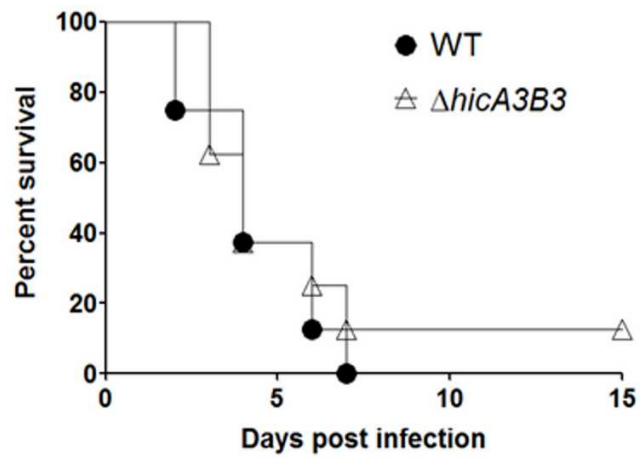


Fig. 6. Survival rate (%) of OF-1 mice injected intradermally with 10 CFU of *Y. pestis* CO92 wild-type (black circles) or $\Delta hicA3B3$ (white triangles).

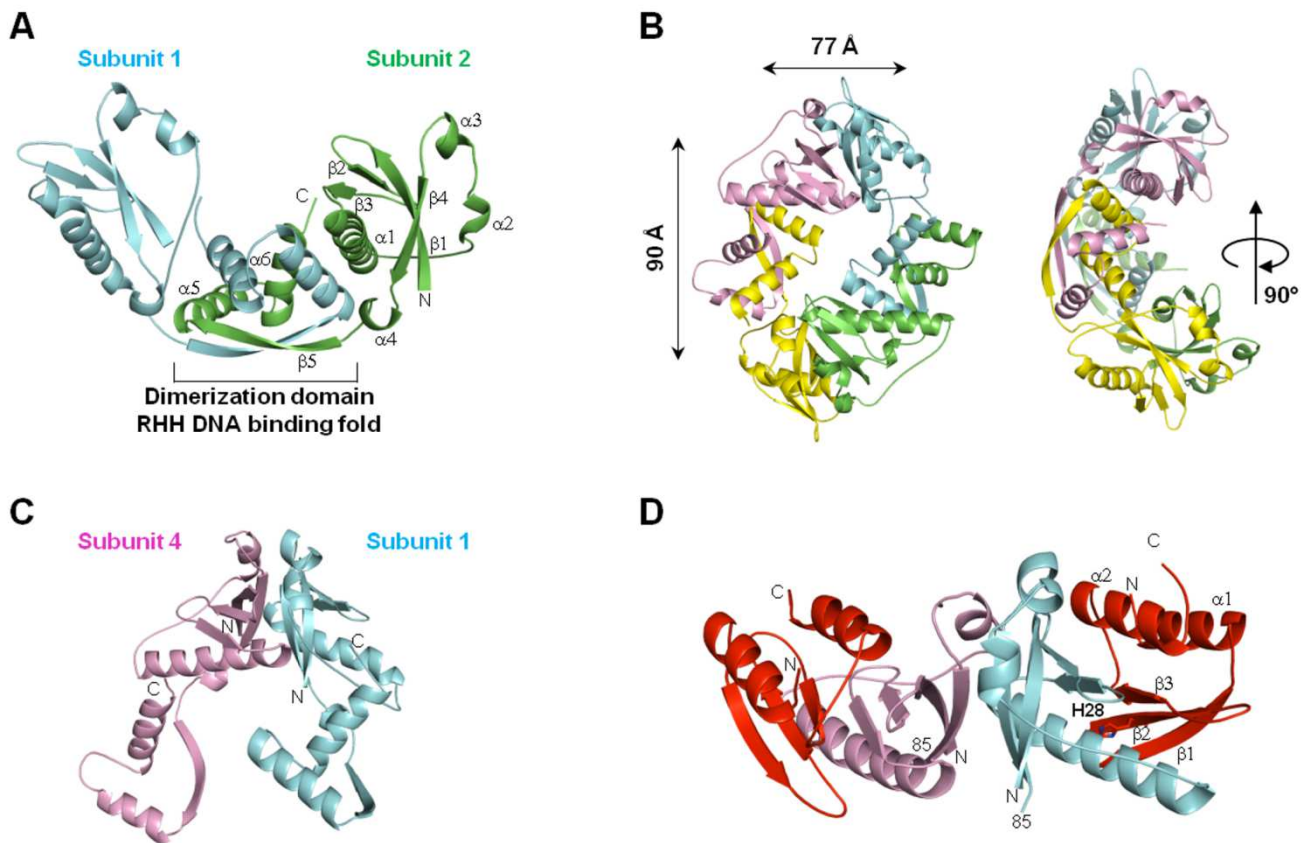


Fig. 7. Crystal structures (A) A schematic presentation of the HicB3 dimer; α helices, β strands, and N- and C-terminal residues for one monomer are labeled. Dimerization occurs via the $\beta 5$ strand of the C-terminal RHH domain in each subunit. (B) Perpendicular views of the HicB3 tetramer; two HicB3 dimers interact via their N-terminal domains to form a tetramer. (C) View of two interacting N-terminal domains in the tetramer. (D) HicA3HicB3-Nt tetrameric complex. The two HicA3 subunits are shown in red, and the two HicB3 subunits are shown in pink and blue. Position 85 indicates the last residue of HicB3-Nt.

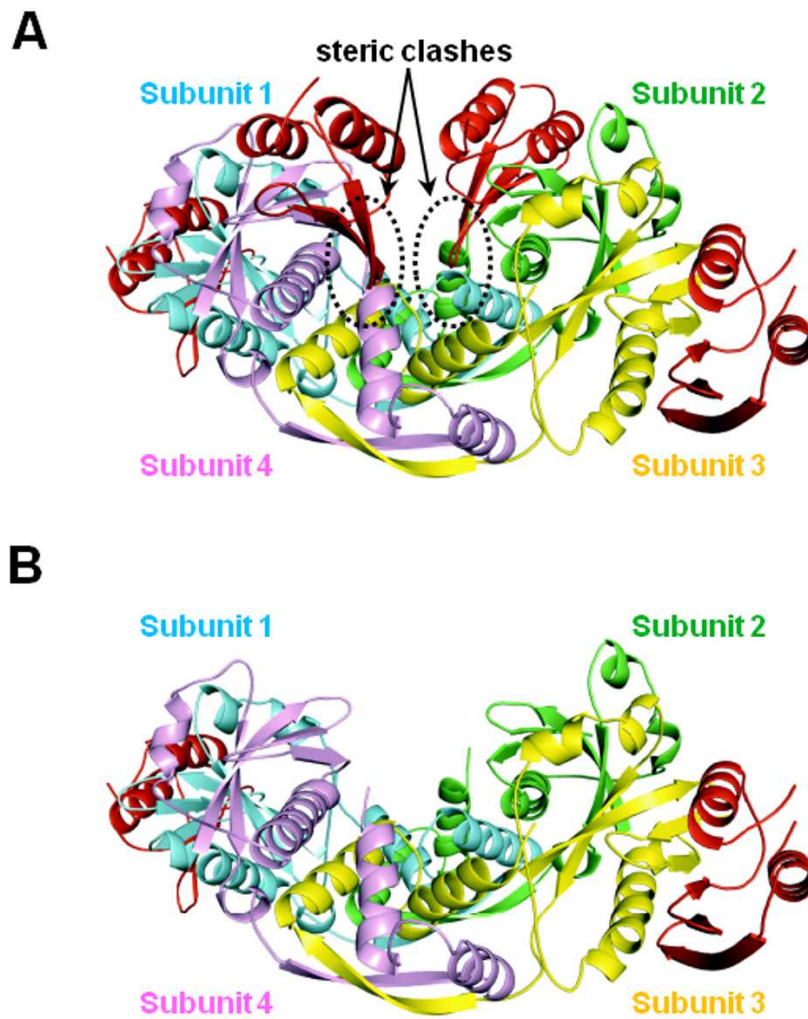


Fig. 8. *In silico* models of the HicA3HicB3 complexes. The HicA3 subunits are shown in red and the four HicB3 subunits are shown in green, blue, pink and yellow. (A) The putative hetero-octameric complex. The steric clashes between two HicA3 subunits and the Ct domains of HicB3 subunits 2 and 4 are circled. (B) The proposed heterohexameric complex.

Table S1. Primers

Primer	Use or characteristic	Sequence
<i>Y. pestis</i> mutants construction		
3369U 3369D	used to delete <i>hicB3</i> (<i>ypo3369</i>)	ATGATCTACCCTATTTTCATCTTCAAACCGTTGAAGGATTCGACGGT TAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC TTAGCTGATGATTTTCTCACGGCTAGCTCGGCCAGAACTGGCTACGAT CATATGAATATCCTCCTTAG
3369aU	used with 3369D to delete <i>hicA3B3</i>	ATGGAGAGTGGCAATTAATAAAACGCTTAGAGGATGCAGGATGGCAAT GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
PA3U PA3D	used to delete <i>P_{hicA3}</i>	GACGATCATTATGATCGCCCTTTCCGTGTTTTTCACGTATAAGAA TGGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC TCCTCTAAGCGTTTTTATAATTCGCCACTCTCCATGTGAACCCCTGGT GCATATGAATATCCTCCTTAG
T3F T4R	used to check T _{pR} exchange mutants	AAAAATGGGTCAAAGTAGCGA GACCGGGGATCCACTAGTT
Pla1 Pla2	used to verify the presence of pPCP1	TCTGTCCGGAGTGCTAATGC GAGCCGGATGCTTCTCACG
Ymt1 Ymt2	used to verify the presence of pMT1	CGGAA TTCGCGTTATCGCT GGAGCCATAAGCAGAAGAAC
YopH3 YopH4	used to verify the presence of pYV	ATTGGTGCAGCAAGAGAGCG CCAGTGAAGCGAGTGCCTTG
Cloning		
1246RT HicA3R12	used to obtain pSBT172	GCCCCAGACTGCTGACAAA ATATGA ATTCTACCTT ACCCACGTAAGGA
3369aUC 3369aR1	used with 3369aR1 to obtain pEP1164 3369aR1 also used for 5'-RACE	GATCGCCCTTTTCCGTGTTT GCGTGACATGGCTACCACTA
3369UC 3369R1	used with 3369R1 to get pSBT7 3369R1 also used with 3369aUC to obtain pEP1165	TTCGAGTTGCAGGAAAGCGG ACCTCAGGGCGCTAAGATCG
HicA3R1 HicA3Sal	used to obtain pSBT10 and pSBT230	ATATGA ATT CAGGGGTTACATGGAGAGT ATATG TCGAC GGTATGCAGCGTTGTTTAAC
3369NotR 3369NotF	used with 3369NotF to get pSBT13	GCGGCCGCTTAGCTGATGATTTTCTCAC GCGGCCGATGATCTACCTTATTTCATC
HicB393	used with 3369NotF to get pSBT174	TTACTCGAGGGCCTTACTTTCATATTTA
3369Nde 3369Xho2 3369aNde 3369aXho	used with 3369Xho2 to obtain pSBT73 3369Xho2 also used with 3369aNde to get pSBT71 3369aXho used with 3369aNde to obtain pSBT113	ATATAT CATATGATCT ACCCTATTTTC ATATAT CTCGAGGCTGATGATTTTCTC ATATAT CATATGGAGAGTGGCGAATTA ATATAT CTCGAGACTCAATTTAATCCGGC
HicB1-NotF HicB1-SalR	used to get pSBT231	ATATAT GCGGCCGATGGCTATCTATCCCGCTA ATATAT GTCGACTTACGCCAATTTCTGTAATTC
HicB2-NotF HicB2-SalR	used to get pSBT232	ATATAT GCGGCCGATGTTTCAAGTTACCCCGCCAG ATATAT GTCGACTCAGACGATTTCCGCACG
HicA3H28A	for mutagenesis to yield His28Ala substitution in <i>HicA3</i>	GCGTGACAGCGCTACCACTA
5' RACE		
B6 RlacZ RACE 3369R2	complementary to RACE RNA adapter for reverse transcription from <i>lacZ</i> RNA adapter <i>hicB3</i> specific primer	GCGCGAATTCCTGTAGA CCTGAATGGCGAATGGCG AUAUGCGCGAAUUCUGUAGAACGAACACUAGAAGAAA TGCGAAAAAACAGCCGTCAA
Gel shift assays		
BS1-BS2F BS1-BS2R	forward and reverse primers bearing BS1-BS2 from <i>P_{hicA3}</i>	ATTGGTGGGTATTACACCTATAACTAATTGACTCAACTACTTGTAGGTATGATACCCACAAGTA TACTTGTGGGTATCATACTACAAGTAGTATTGAGTCAATTAGTTATAGGTGTAATACCCACCAAT
MU1-BS2F MU1-BS2R	forward and reverse primers bearing mutations in the 1st binding site	ATATAG AATTC ACAAACGCTGTGTTTCATAACTAATTGACTCAACTACTTGTAGGTATGATACCCACAAGTAGCATGCA TGCATGCTACTTGTGGGTATCATACTACAAGTAGTATTGAGTCAATTAAT TATGAACACAGCGTTTGTGAATTC TATAT
BS1-MU2F BS1-MU2R	forward and reverse primers bearing mutations in the 2nd binding site	ATATAG AATTC GTTGGGTATTACACCTATAACTAATTGACTCAACTACTTGTGAATATGATGTTTACAAGTAGCATGCA TGCATGCTACTTGTAAACATCATATT CACAAGTAGTATTGAGTCAATTAGTTATAGGTGTAATACCCACGAATTC TATAT
MU1-MU2F MU1-MU2R	forward and reverse primers bearing mutations in both binding sites	ATATAG AATTC ACAAACGCTGTGTTTCATAACTAATTGACTCAACTACTTGTAGGTATGATGTTTACAAGTAGCATGCA TGCATGCTACTTGTAAACATCATACTACAAGTAGTATTGAGTCAATTAAT TATGAACACAGCGTTTGTGAATTC TATAT

Restriction sites are underlined
Nucleotides from the trimethoprim resistance cassette are in bold

Table S2. Crystallographic data-collection and refinement statistics**Crystallographic data collection**

	HicB3-SeMet	HicA3B3
X-ray source	PROXIMA 1 (05/12/2012)	PROXIMA 1 (10/04/2013)
Wavelength (Å)	0.97911	0.9801
Temperature (K)	100	100
Unit-cell parameters (Å, °)	$a = 69.84, b = 76.87, c = 118.17$ $\alpha = \beta = \gamma = 90.0$	$a = 47.17, b = 83.16, c = 88.48$ $\alpha = \beta = \gamma = 90.0$
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Resolution limits [†] (Å)	46.85 – 2.78 (2.95–2.78)	41.58 – 2.12 (2.24–2.12)
Number of observations [†]	116656 (17985)	118957 (18574)
Number of unique reflections	16491 (2565)	20448 (3229)
Rmerge [‡] (%)	9.5 (68.3)	10.7 (68.4)
Completeness [†] (%)	99.5 (97.2)	99.7 (98.7)
I/ σ [†] (I)	14.45 (2.84)	14.24 (2.85)

Refinement

Number of non-hydrogen atoms (Proteins / Water)	4335 / 0	2392 / 115
Resolution range (Å)	46.85 – 2.78	41.58 – 2.12
R / Rfree (%)	20.9 / 28.24	18 / 21.8
R.M.S.D Bonds (Å) / angles (°)	0.011 / 1.431	0.008 / 1.047
Average temperature factors (Proteins / Water)	63.42 / -	31.78 / 35.85

[†] Values in parentheses refer to the highest resolution shell.

[‡] $R_{\text{merge}} = \sum_h \sum_i |I_{hi} - \langle I_h \rangle| / \sum_h \sum_i I_{hi}$, where I_{hi} is the i th observation of the reflection h , while $\langle I_h \rangle$ is the mean intensity of reflection h .

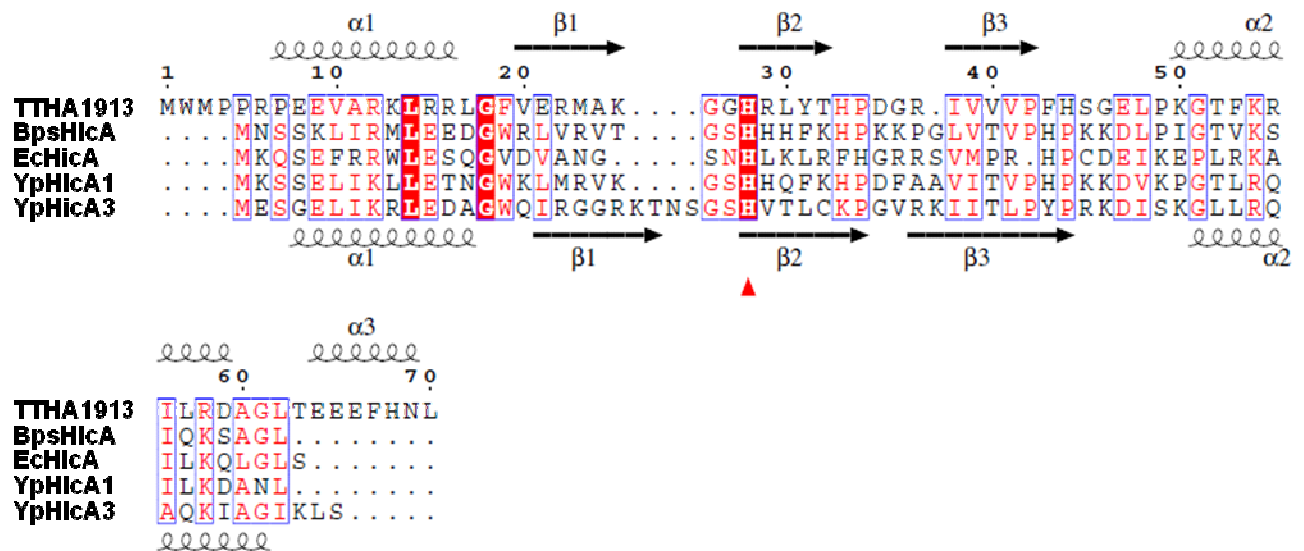


Fig. S1. Sequence alignment of the *Y. pestis* HicA3 and HicA1 toxins (YpHicA3 and YpHicA1) and the HicA toxins from *E. coli* (EcHicA) and *B. pseudomallei* (BpsHicA) with the *Thermus thermophilus* TTHA1913 protein of unknown function. The conserved histidine residue is indicated by a red triangle. The sequences were aligned using the ClustalW and ESPrift programs. The secondary structure was deduced from the crystal structures and is represented above and below the sequence alignment for TTHA1913 (PDB code: 1WHZ) and YpHicA3 (the present work), respectively.

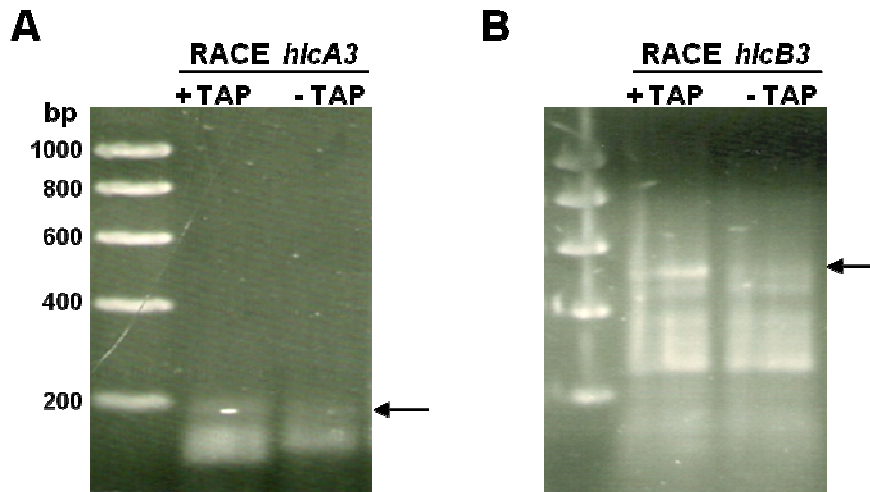


Fig. S2. Identification of the TSS for *hicA3B3*. 5' RACE was applied to total RNA extracted from YSBT61 (*PhicA3-lacZ* Δ *hicA3B3*) and YSBT62 (*hicB3-lacZ*). The resulting PCR products were amplified with a primer specific for the RACE adapter and a primer specific for either *hicA3* (A) or *hicB3* (B) and then separated on a 2% agarose-TBE gel. Arrows indicate the DNA fragments cloned to determine the TSS for *hicA3B3*. The smaller DNA fragments observed in panel B correspond to initiation between positions +144 to +365 relative to the *hicA3* TSS; they are probably monophosphorylated *hicA3B3* mRNA degradation products and not primary transcripts as they do not respond to TAP treatment.

BS1-BS2

gTg**GGT**Tt**AcACCT**AtaactaaTTGACTcaataactacttg**TaGGTATGATACC**cAcAagtag
 c**AcCCA**t**AaTgTGG**aTattgattAACTGAgttatgatgaac**AtCCATACTATGG**gTgTtcatc

MU1-BS2

acaaacgctgtgttc**A**taactaaTTGACTcaataactacttg**TaGGTATGATACC**cAcAagtag
 tgtttgcgacacaag**T**attgattAACTGAgttatgatgaac**AtCCATACTATGG**gTgTtcatc

BS1-MU2

gTg**GGT**Tt**AcACCT**AtaactaaTTGACTcaataactacttg**TgaaTATGAT**gttt**Ac**Aagtag
 c**AcCCA**t**AaTgTGG**aTattgattAACTGAgttatgatgaac**ActtATACTA**caaa**T**gTtcatc

MU1-MU2'

acaaacgctgtgttc**A**taactaaTTGACTcaataactacttg**TaGGTATGAT**gttt**Ac**Aagtag
 tgtttgcgacacaag**T**attgattAACTGAgttatgatgaac**AtCCATACTA**caaa**T**gTtcatc

Fig. S3. Double-stranded sequences of the 63-bp DNA region common to the BS1-BS2, MU1-BS2, BS1-MU2 and MU1-MU2' DNA fragments, which vary from 66 to 80 bp in length. BS1-BS2 contains the native *PhicA3* sequence. The -10 and -35 promoter sequences and the TSS are given in capital letters and underlined. Bases conserved in the consensus HicB3 binding site sequence are in bold capital letters.

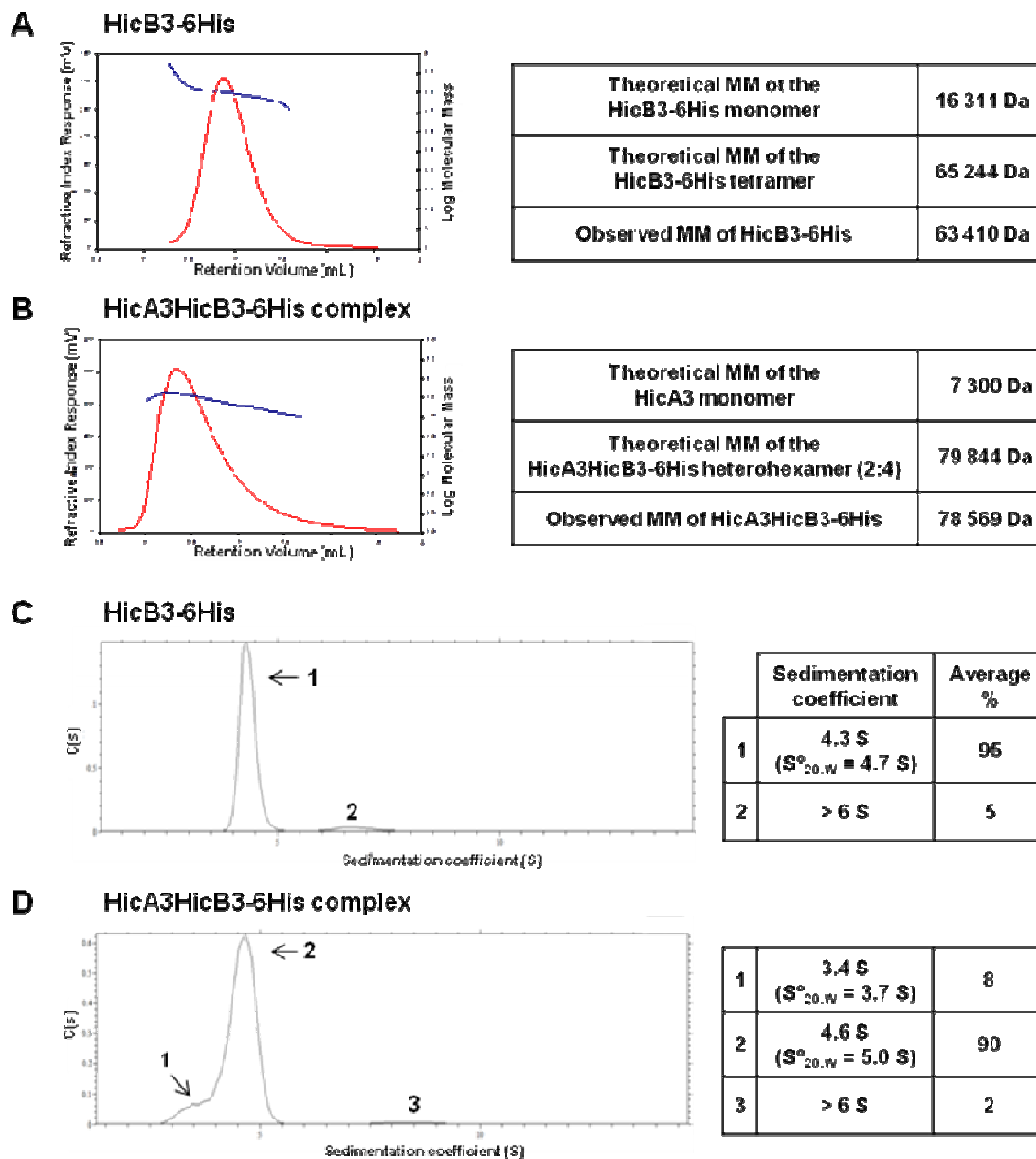


Fig S4. (A, B) SEC-MALS analyses of HicB3-6His and the HicA3HicB3-6His complex. The refractive index (red lines) and log molecular mass (MM, blue lines) are plotted against the elution volume from a Superdex 200 size-exclusion column. The predicted MMs of monomers and multimers and the observed MM of multimers are indicated. The MM was determined using a Viscotek SEC-TDA running OmniSEC software (Malvern Instruments, Malvern, UK). (C, D) Analytical ultracentrifugation data. Continuous sedimentation coefficient distributions of HicB3-6His at 0.31 OD and the HicA3HicB3-6His complex at 0.57 OD. The S-values and the mean proportion of each protein species are shown. Sedimentation velocity experiments were performed at 20°C in an XLA-70 analytical ultracentrifuge (Beckman Coulter, Palo Alto, USA) equipped with an An-60Ti rotor.

Résultats complémentaires

I. Régulation du promoteur *PhicA3*

A. Un excès de HicA3-H28A dérèprime *PhicA3*

Les promoteurs de STA sont généralement régulés par coopérativité conditionnelle. C'est-à-dire que lorsque le ratio toxine/antitoxine est faible, la toxine augmente l'affinité de l'antitoxine pour le promoteur de l'opéron. En revanche, lorsque la toxine est en excès, elle déstabilise le complexe tripartite TA-opérateur, ce qui libère le promoteur. Dans notre article, nous avons montré que le complexe HicA3-HicB3 réprime directement le promoteur *PhicA3* en se fixant sur une séquence opératrice répétée au niveau du promoteur (sites BS1 et BS2). Pour tester si un excès de toxine HicA3 affecte la répression du promoteur *PhicA3*, la souche *Y. pestis* $\Delta lacZ$ portant *hicA3B3* et la fusion *PhicA3-lacZ* sur le chromosome (YSBT59, *Yp PhicA3-lacZ* décrite dans l'article) a été transformée avec un plasmide portant le gène de la toxine inactivée HicA3-H28A sous contrôle d'un promoteur inductible par l'arabinose (*Para::hicA3-H28A*). Le plasmide vide a été introduit dans cette même souche comme contrôle (*Para::0*). Les transformants ont été déposés sur gélose LB-Xgal contenant ou non 5 mM d'arabinose et incubés à 28°C (Fig. 38). En absence de HicA3-H28A (milieu sans Ara ou plasmide vide), le promoteur *PhicA3* est réprimé (phénotype LacZ⁻). En revanche, lorsque HicA3-H28A est surproduite (milieu Ara 5 mM), on observe un phénotype LacZ⁺ indiquant que l'excès de HicA3-H28A provoque la dérèpression du promoteur *PhicA3*. Ainsi, la toxine HicA3 en excès serait capable de déstabiliser le complexe HicA3-HicB3-ADN et de libérer les opérateurs BS1 et BS2, ce qui entrainerait l'activation du promoteur *PhicA3*.

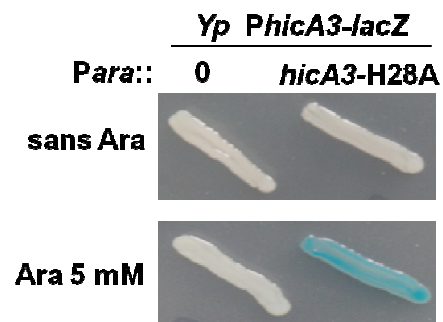


Fig. 38. La surproduction de HicA3-H28A entraîne la dérèpression du promoteur *PhicA3*.

B. L'activité de *PhicA3* dépend de la température de croissance

Nous avons étudié l'influence de la température de croissance sur l'activité du promoteur *PhicA3* car au cours du cycle infectieux, *Y. pestis* se multiplie à une température d'environ 20°C dans la puce, et à 37°C dans l'hôte mammifère. Les souches *Y. pestis* $\Delta lacZ$ portant la fusion chromosomique *PhicA3-lacZ* et délétés ou non de l'opéron *hicA3B3* ont été déposées sur gélose LB-Xgal et incubées à 21°C, 28°C (température optimale de croissance) ou 37°C (Fig. 39). En présence de HicA3B3, le promoteur *PhicA3* est réprimé à 21°C et 28°C (phénotype LacZ⁻), mais il est légèrement actif à 37°C (phénotype LacZ^{+/}). En absence de HicA3B3, le promoteur *PhicA3* est actif quelque soit la température de croissance (phénotype

LacZ⁺). La dérèpression de *PhicA3* à 37°C pourrait être due à un changement de conformation du répresseur HicB3 qui deviendrait incapable de réprimer efficacement le promoteur à cette température. Alternativement ou conjointement, un changement de conformation pourrait rendre HicB3 plus sensible à un excès de protéase. Nous avons réalisé quelques expériences pour évaluer ces hypothèses.

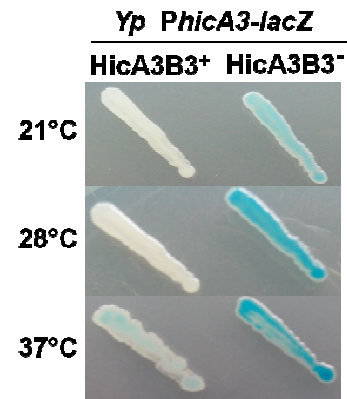


Fig. 39. Effet de la température sur l'activité du promoteur *PhicA3*.

C. La surproduction de la protéase Lon dérèprime *PhicA3*

Pour *Y. pestis*, dont la température optimale de croissance est de 28°C, 37°C est une température de « stress ». La dérèpression du promoteur *PhicA3* à 37°C pourrait être liée à l'activation de protéases de « stress », telles que Lon ou ClpPX, qui dégraderaient HicB3. Pour tester cette hypothèse, nous avons cloné les gènes *lon* et *clpP-clpX* de *Y. pestis* sous le contrôle d'un promoteur inducible par l'arabinose. Les plasmides recombinants obtenus et le plasmide vide (*Para::0*) ont été introduits dans la souche *Y. pestis* Δ *lacZ* portant la fusion chromosomique *PhicA3-lacZ* et les gènes *hicA3B3* intacts (*YSBT59*, *Yp PhicA3-lacZ*). Les transformants ont été déposés sur gélose

LB-Xgal contenant ou non 5 mM d'arabinose et incubés à 28°C (Fig. 40). La surproduction de la protéase Lon entraîne un phénotype LacZ⁺, alors que la surproduction de ClpPX entraîne un phénotype LacZ⁻ similaire à celui de la souche portant le plasmide vide, Cette observation suggère que la protéase Lon dégrade le répresseur HicB3, ce qui conduit à l'activation du promoteur

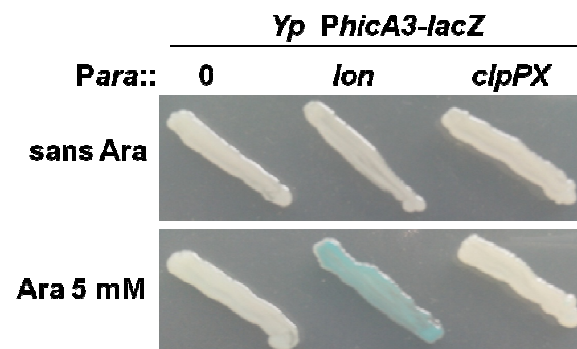


Fig. 40. La surproduction de la protéase Lon mais pas celle de ClpPX entraîne la dérèpression du promoteur *PhicA3*.

PhicA3. Nous avons essayé de mettre en évidence la dégradation de HicB3 par Lon par *Western Blot* (WB). Pour cela, nous avons surexprimé ou non *lon* à 28°C chez *Y. pestis* portant *hicB3* sur le chromosome ou portant *hicB3* cloné dans un plasmide multicopie et nous avons révélé par immunodétection la présence de HicB3 dans les quatre extraits totaux. Nous n'avons pas détecté de diminution de la quantité de HicB3 lorsque Lon est surproduite (résultat non montré). Cependant, la méthode de détection que nous avons utilisée est une méthode colorimétrique peu sensible. Il serait intéressant de refaire cette expérience, en utilisant cette fois-ci la détection par chimioluminescence. De plus, nous pourrions cultiver

Y. pestis à 37°C, puisque nous suspectons qu'à cette température, HicB3 est plus instable qu'à 28°C.

D'autre part, nous avons également délété les gènes *lon* ou *clpPX* du chromosome de la souche *Y. pestis* $\Delta lacZ$ portant la fusion chromosomique *PhicA3-lacZ* afin de déterminer si la perte des protéases Lon et ClpPX influe sur l'activité du promoteur *PhicA3*. La souche parentale *Yp PhicA3-lacZ* et les mutants *Yp PhicA3-lacZ Lon⁻* et *Yp PhicA3-lacZ ClpPX⁻* ont été déposés sur gélose LB-Xgal et incubés à 21°C, 28°C ou 37°C. L'absence des protéases Lon ou ClpPX ne modifie pas l'activité du promoteur *PhicA3* : il est toujours réprimé à 21°C et 28°C (phénotype LacZ⁻) et légèrement actif à 37°C (phénotype LacZ^{+/+}) (résultats non montrés). L'ensemble de ces résultats suggère que la protéase Lon n'est pas l'unique responsable de la dérégulation de *PhicA3* à 37°C. Il est possible que la dégradation de HicB3 par Lon ne soit pas essentielle pour que *PhicA3* soit dérégulé à 37°C et que le changement de conformation de HicB3 à cette température suffise à lever partiellement la répression. Une autre hypothèse est que d'autres protéases de *Y. pestis* dégradent HicB3 à 37°C et entraînent la dérégulation du promoteur.

D. La conformation de HicB3 est différente à 20°C et à 37°C

Pour étudier l'effet de la température sur la conformation de l'antitoxine, nous avons mesuré le dichroïsme circulaire (DC) de HicB3 entre 200 et 250 nm à différentes températures.

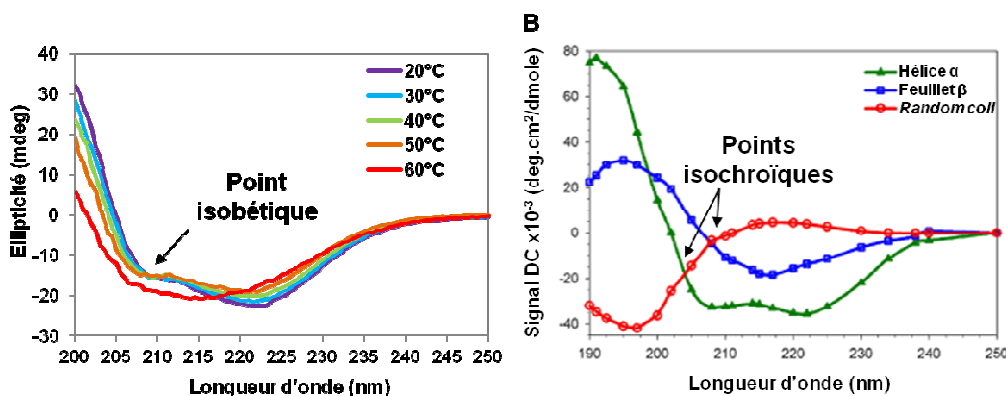


Fig. 41. (A) Spectres DC de HicB3 à différentes températures. Un point isobétique est observé à 208 nm. (B) Spectres DC de peptides modèles adoptant une structure en hélices α , en feuillets β ou en *random coil* (adapté de <http://www.fbs.leeds.ac.uk/facilities/cd/>). Deux points isochroïques sont observés : à 203 nm pour les structures en *random coil* et en hélices α , et à 208 nm pour les structures en *random coil* et en feuillets β .

Entre 20°C et 50°C, les spectres DC de HicB3 présentent un maximum d'ellipticité à 200 nm et deux minima autour de 208 nm et 222 nm (Fig. 41 A), ce qui montre qu'HicB3 est bien structurée et riche en hélices α . Le minimum négatif supérieur à 222 nm dénonce la présence de feuillets β . Ces résultats sont en accord avec la structure cristalline de HicB3 que nous avons résolue et ils montrent que HicB3 est une protéine complètement structurée entre 20°C

et 50°C. La dénaturation thermique est réversible jusqu'à 50°C. Au-delà de 50°C, HicB3 précipite et le spectre DC à 60°C (courbe rouge, Fig. 41 A) indique que la protéine ne contient quasiment plus que des feuillets β (le spectre à 60°C ressemble à celui d'une protéine repliée en feuillets β , avec un minimum d'ellipticité à environ 215 nm, Fig. 41 B).

Par ailleurs, on observe qu'entre 20°C et 50°C, les spectres DC ne se superposent pas, ce qui signifie que la structure d'HicB3 varie lorsque la température augmente. Toutefois, toutes les courbes se croisent en un point isobétique à 208 nm (longueur d'onde à laquelle les feuillets β et les structures désorganisées (*random coil*) sont isochroïques). La présence de ce point isobétique signifie que les changements de conformation, induits par l'augmentation de la température, n'affectent que les feuillets β , qui sont convertis en *random coil*, les hélices α restent intactes (Rq : dans le cas où hélices α et feuillets β seraient tous deux convertis en *random coil*, le point isobétique n'existerait pas). Lorsque l'on reporte les valeurs d'ellipticité à 215 nm en fonction de la température (entre 20°C et 50°C), on remarque que la température de transition à laquelle se produisent les changements de conformation d'HicB3 se situe entre 30°C et 35°C (Fig. 42).

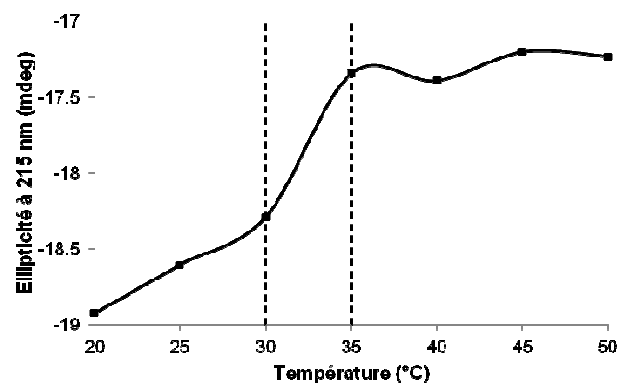


Fig. 42. Graphique représentant les valeurs d'ellipticités mesurées à 215 nm en fonction de la température.

L'ensemble de ces observations suggère que, jusqu'à 50°C, l'augmentation de la température influence la conformation de HicB3 et certains feuillets β sont convertis en structure *random coil*. On retrouve des feuillets β dans le domaine de fixation à l'ADN, où ils participent à la dimérisation des monomères et à la reconnaissance de l'ADN, ainsi que dans le domaine de neutralisation de la toxine, où ils sont responsables de la tétramérisation. Le changement de conformation de HicB3 observé *in vitro* entre 30°C et 35°C pourrait expliquer nos observations *in vivo* : la conformation de HicB3 à 37°C en ferait soit un moins bon répresseur, soit une meilleure cible pour des protéases.

II. STA et phylogénie de *Y. pestis*

Des analyses *in silico* du chromosome de *Y. pestis* CO92, antérieures à notre propre étude, avaient mis en évidence un total de 10 loci codant des STA putatifs et deux gènes d'antitoxines solitaires (Goulard et al., 2010; Jorgensen et al., 2008; Pandey and Gerdes, 2005). Cinq des STA avaient été annotés comme membres de la famille HigBA (HigB1A1 à HigB5A5), deux comme membres de la famille HicAB (HicA1B1 et HicA2B2) et trois autres classés dans les familles MqsRA, Phd/Doc et RelEB (RelE1B1). Les deux antitoxines solitaires avaient été annotées HicB3 et RelB2 par Goulard et al.

Notre étude a permis d'identifier HicA3 comme la toxine partenaire de HicB3. En ce qui concerne le STA HicA2B2 proposé par Goulard et al., la protéine HicA2 (42 aa) n'est pas toxique (Goulard et al., 2010) et elle ne ressemble pas aux toxines HicA1 et HicA3, ni à aucune autre protéine connue. De plus, le gène *hicA2* a été prédit en aval de *hicB2*, ce qui est inhabituel pour un opéron de STA de type HicAB. Nous avons cherché si une ORF de 62 codons, située 8 pb en amont de *hicB2*, pouvait coder une toxine. Nous avons observé que sa surproduction n'est pas toxique pour la croissance d'*E. coli* (résultat non montré). En absence de toxine associée à HicB2, nous proposons donc que *Y. pestis* possède seulement deux STA HicAB fonctionnels : HicA1B1 et HicA3B3, et une protéine solitaire HicB2 très peu similaire aux antitoxines HicB1 (12% d'identité) et HicB3 (18% d'identité) (Fig. 43).

```

HicB1 MAIYPAYVHVDND-GSAS---GYFPDVKGCIFAINAGEDLFAEASSALDAHFEALVSEGIEIPEAHDMPT
HicB3 MIYPIFIFKTVE-GFD---GYFPDIDGCFAGNTFADISKNAEEAFVHIEALMNEGFPPLPSPPKDP
HicB2 MFSYPASYTVDEASGEYHIHYRDFPELNSVTYS---LEDVELEAQEGIKNGVAAEMEERLLIPAPSALQ

HicB1 YHVYRNPCDYADGGQWYNVNIDMSKYDGKVERINVTLPRLIHQIDTIVKVRPEYASRSNFLAEAAARKE
HicB3 HRYIDDPRLKEEGGILGFVEIDPAKYESKAVKFNLTMSQNLTLTAIDKFIATNRGYKNRSQFLAELAREK
HicB2 PGDI AVHVPILVRLKAELHNAMLASDTRKADMARKLSLNAQAQMDRLLDVYYASKVEALEQALYLLGFEEA

HicB1 LQKLA      139
HicB3 IIS        135
HicB2 DVTVRKIV  143

```

Fig. 43. Alignement des séquences protéiques de HicB1, HicB2 et HicB3. Les aa identiques sont surlignés en gris.

Nous nous sommes intéressés à examiner la présence des gènes de STA en lien avec la phylogénie de *Y. pestis*. *Y. pestis* aurait émergé à partir d'une souche de *Y. pseudotuberculosis* de sérotype O:1b il y a moins de 6400 ans, ce qui est très récent du point de vue évolutif (Achtman et al., 1999; Skurnik et al., 2000; Sun et al., 2014). Par contre, la séparation entre les lignages de *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis* est, elle, beaucoup plus lointaine, elle aurait eu lieu il y a 41 à 186 millions d'années (Achtman et al., 1999).

Si l'on recherche les gènes des trois modules *hicAB* dans les génomes de *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica*, on constate que *hicA3B3* et *hicB2* sont présents dans les génomes de toutes les souches actuellement séquencées. Il est donc probable qu'ils ont été acquis avant la séparation des lignages de *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis* (Fig. 44). Il en va différemment pour le locus *hicA1B1*, conservé chez toutes les souches de *Y. pestis*, à l'exception de la souche Angola. Le génome de cette dernière porte une délétion de 16 kb dans la région *hicA1B1*. Les gènes *hicA1B1* sont absents du génome de *Y. enterocolitica* et ils sont présents chez une seule souche de *Y. pseudotuberculosis*, IP31758 (de sérotype O:1b). Chez toutes les autres souches, qu'elles soient ou non de sérotype O:1b, la synténie de la région est conservée mais *hicA1B1* est remplacé par une ORF putative. Mais cette ORF n'est probablement codante car la protéine déduite de cette

ORF (199 aa) n'a aucun homologue dans les banques de données. Nous proposons donc que les deux modules *hicA1B1* et *hicA3B3* ont été acquis par transfert horizontal à des périodes éloignées : *hicA3B3* a d'abord émergé chez l'ancêtre commun de *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica*, tandis que *hicA1B1* a été acquis plus récemment par l'ancêtre commun de *Y. pseudotuberculosis* IP31758 et *Y. pestis* (Fig. 44). Le locus

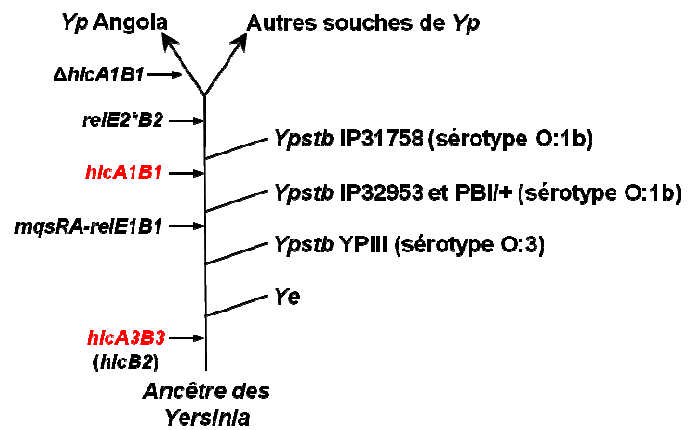


Fig. 44. Représentation schématisée de l'apparition de certains STA chez les *Yersinia*. Les loci TA de type *hicAB*, *mqsRA* et *relEB* acquis ou perdus au cours du temps sont indiqués. Ye: *Y. enterocolitica*, *Ypstb*: *Y. pseudotuberculosis*, *Yp*: *Y. pestis*

hicA1B1 aurait ensuite été perdu par l'ancêtre de la souche *Y. pestis* Angola, dont le génome a subi de nombreux remaniements et délétions. Ces données suggèrent que la souche IP31758 est la souche de *Y. pseudotuberculosis* la plus proche de *Y. pestis*.

En ce qui concerne les autres STA de *Y. pestis*, l'antitoxine solitaire RelB2, ne diffère que de trois aa par rapport à l'antitoxine RelB1 (Goulard et al., 2010) (Fig. 45).

```

RelB1 MAKLQYIHDEAGKPKQFVVLPVAEYQQLISNAKYEDIYPVADNDDDDQTIPNEVVQIMVNDGVSLLAAWRI
RelB2 MAKLQYIHDEAGKPKQFVVLPVIAEYQQLISNAKYEDIYPVADHDDDDQTIPNEVVQIMINDGVSLLAAWRI

RelB1 YRGFSQYEIAELLGTTQSAVSQWEAVDSRPQKKTREKLAAIYKCRAAQMIL 120
RelB1 YRGFSQYEIAELLGTTQSAVSQWEAVDSRPQKKTREKLAAIYKCRAAQMIL 120
    
```

Fig. 45. Alignement des séquences protéiques de RelB1 et RelB2. Les aa identiques sont surlignés en gris.

Le gène chromosomique *relB2* (*ypo4028*), distant d'environ 1 Mb de *relB1* (*ypo0883*) dans le génome de *Y. pestis* CO92, est précédé d'une copie tronquée du gène de toxine *relE1*, que nous pouvons appeler pseudogène *relE2**. Le locus *relE2*B2* dérive probablement de la duplication de *relE1B1*.

Les loci *relE1B1* (*ypo0884-ypo0883*) et *mqsRA* (*ypo0882-ypo0881*) sont voisins sur le chromosome de *Y. pestis* CO92 (163 pb les séparent). Cette disposition est conservée chez toutes les autres souches de *Y. pestis* séquencées, ainsi que chez les trois souches de *Y. pseudotuberculosis* de sérotype O:1b séquencées (IP31758, IP32953 et PB1/+). En revanche, ces deux loci sont absents des génomes de *Y. pseudotuberculosis* YPIII (sérotype O:3) et *Y. enterocolitica*. Le gène *relB2* est, quant à lui, présent uniquement sur le chromosome de *Y. pestis*. La région *mqsRA-relE1B1* a pu être acquise par l'ancêtre de *Y. pseudotuberculosis* sérotype O:1b, puis *relE1B1* se serait dupliqué chez l'ancêtre de *Y. pestis*, donnant naissance au pseudogène *relE2** et au gène d'antitoxine *relB2* (Fig. 44).

Pour les cinq STA de type HigBA prédits chez *Y. pestis*, l'alignement des séquences protéiques des toxines HigB1 à HigB5 montre qu'elles sont peu conservées (Fig. 46).

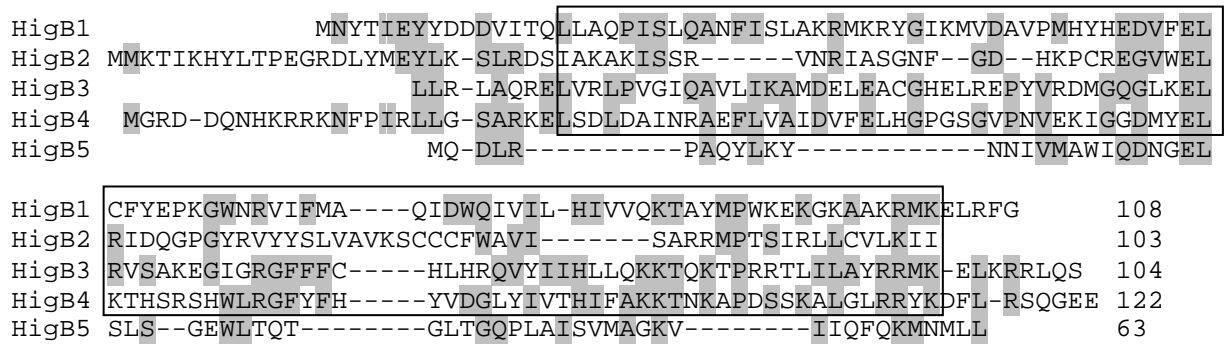


Fig. 46. Alignement des séquences protéiques de HigB1, HigB2, HigB3, HigB4, HigB5. Les aa identiques sont surlignés en gris. Le domaine de type Gp49 conservé dans les toxines de la famille HigB est encadré. Seule HigB2 est toxique chez *Y. pestis*.

Contrairement aux quatre autres protéines, HigB5 (63 aa) ne comporte pas de domaine Gp49 conservé parmi les toxines de la famille HigB (Fig. 46) mais un domaine caractéristique des toxines de la famille SymE (11% d'identité avec SymE d'*E. coli*, 113 aa) (Fig. 47). Cependant, la surproduction de HigB5 n'est pas toxique pour la croissance d'*E. coli* ou de *Y. pestis* (Goulard et al., 2010).

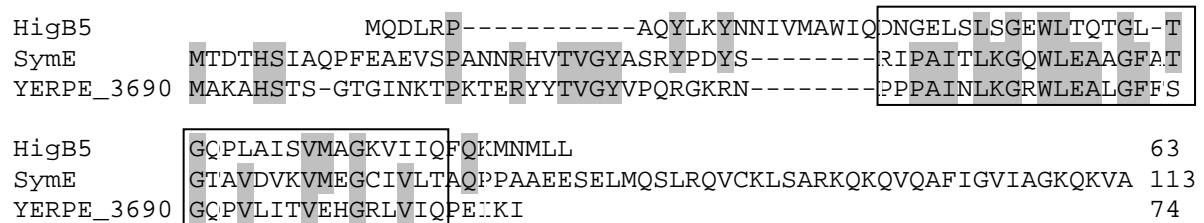


Fig. 47. Alignement des séquences protéiques de HigB5 et YERPE_3690 de *Y. pestis* avec SymE d'*E. coli* K-12. Les aa identiques sont surlignés en gris. Le domaine protéique conservé parmi les toxines de la famille SymE est encadré.

L'ordre des gènes *higA5-higB5* sur le chromosome étant inversé par rapport à celui des autres opérons *higBA*, nous avons cherché si une toxine pouvait être codée en amont de *higA5*. Nous n'avons pas détecté d'ORF candidate. En revanche, entre les gènes *higA5* et *higB5*, il existe une petite ORF, *yerpe_3690* (Fig. 48), dont la séquence protéique déduite (74 aa) possède 23% d'identité avec la toxine SymE d'*E. coli* K-12 (Fig. 47). Nous avons observé que la surproduction de YERPE_3690 entraîne un ralentissement de la croissance de *Y. pestis* (non montré). Nous n'avons pas testé si HigA5 est capable de neutraliser YERPE_3690. Chez *E. coli*, le STA SymER est de type I, c'est-à-dire que l'antitoxine SymR est un ARNnc complémentaire de la

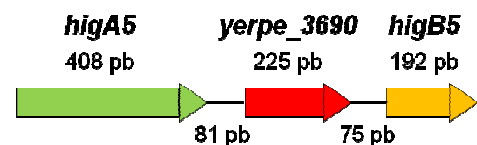


Fig. 48. Organisation génomique du locus chromosomique *higA5-yerpe_3690-higB5* de *Y. pestis*.

partie 5' du gène *symE*. Il serait donc intéressant de chercher si un ARNnc chevauche *yerpe_3690*.

Par ailleurs, nous avons identifié sur le chromosome de *Y. pestis*, deux ORF de 171 et 204 pb (*yerpe_3709* et *ypo3628*), séparées de 268 pb, pouvant coder un STA du type YafQ-DinJ (26% d'identité avec YafQ et DinJ d'*E. coli* K-12) (Fig. 49).

A

```

YERPE_3709                               LLQTGEALPPKYKEHPLIGNYIGYLECHGM
YafQ      MIQRDIEYSGQYSKDVKLAQKRHKDMNKLKYLMTLLINNTLPLPAVYKDHPLQGSWKGYRDAHVE

YERPE_3709  PDLLLIYQRTDSEIKLYRVGSHSDLF  56
YafQ        PDWILIIYKLTDKLLRFERTGTHAALFG  92

```

B

```

YPO3628                               MANAKALGLDLSTVIRMVVNRLAVNAELPIDLLQPNQETLQAIRDL
DinJ      MAANAFVRARIDEDLKNQAADVLGMLTISDLVRITLTKVAREKALPFDLREPNQLTIQSIKNS

YPO3628  ENGVEVYRVDSVDALKRDLGW  67
DinJ     EAGIDVHKAKDADDLFDKLG  86

```

Fig. 49. Alignement des séquences protéiques de (A) YERPE_3709 de *Y. pestis* et YafQ d'*E. coli* K-12 (B) YPO3628 de *Y. pestis* et DinJ d'*E. coli* K-12.

Cependant, l'ORF *yerpe_3709* débute par un codon CUG, qui est un codon d'initiation très rare chez *E. coli* (Sussman et al., 1996). De plus, la protéine déduite YERPE_3709 est tronquée de 35 aa N-terminaux par rapport à YafQ d'*E. coli*. Il est donc possible que YERPE_3709 soit le vestige non fonctionnel d'un gène de toxine.

Nous n'avons retrouvé aucun groupe de gènes pouvant coder des STA du type YoeB-YefM, Zeta-Epsilon ou HipAB dans le génome de *Y. pestis*.

A l'issu de ce travail de thèse, et en tenant compte des résultats publiés par Goulard et al. en 2010, il apparait que le chromosome de *Y. pestis* porte quatre loci TA codant des protéines toxiques pour *Y. pestis* (*hicA1B1*, *hicA3B3*, *higA2B2*, *relE1B1*), deux autres loci codent des protéines toxiques pour *E. coli* et non pour *Y. pestis* (*higB4A4*, *phd-doc*), quatre loci ne codent pas de toxine (*higB1A1*, *higB3A3*, *higB5A5* et *mqsRA*), un locus code un STA putatif YafQ-DinJ dont la fonctionnalité reste à tester, un gène coderait une toxine SymE pour laquelle aucune antitoxine n'a pour le moment été identifiée et deux gènes codent des antitoxines solitaires (*hicB2* et *relB2*) (Tableau 2).

Famille	Toxine		Antitoxine		Toxicité
	Protéine	Identifiant	Protéine	Identifiant	
HicAB	HicA1	YPO1818	HicB1	YPO1817	Oui chez <i>Y. pestis</i> et <i>E. coli</i>
	-	-	HicB2	YPO2973	Antitoxine solitaire
	HicA3	YERPE_3445	HicB3	YPO3369	Oui chez <i>Y. pestis</i> et <i>E. coli</i>
RelEB	RelE1	YPO0884	RelB1	YPO0883	Oui chez <i>Y. pestis</i> et <i>E. coli</i>
	-	-	RelB2	YPO4028	Antitoxine solitaire
Doc-Phd	Doc	YPO1833	Phd	YPO1832	Oui chez <i>E. coli</i>
MqsRA	MqsR	YPO0882	MqsA	YPO0881	Non
HigBA	HigB1	YPO0879	HigA1	YERPE_0889	Non
	HigB2	YPO1087	HigA2	YPO1088	Oui chez <i>Y. pestis</i> et <i>E. coli</i>
	HigB3	YPO2321	HigA3	YPO2320	Non
	HigB4	YPO3486	HigA4	YPO3485	Oui chez <i>E. coli</i>
	-	-	HigA5	YPO3612	Antitoxine solitaire ou partenaire de SymE ? A tester
SymE	SymE	YERPE_3690	-	-	Oui chez <i>Y. pestis</i>
YafQ-DinJ	YafQ	YERPE_3709	DinJ	YPO3628	A tester

Tableau 2. Tableau récapitulatif des STA codés sur le chromosome de *Y. pestis* CO92. Nos propres observations sont surlignées en gris.

Discussion et perspectives

Les travaux effectués au cours de cette thèse nous ont permis d'identifier et de caractériser un nouvel STA complet de la famille HicAB codé par le chromosome de *Y. pestis*. Ce STA est composé de la toxine HicA3, une ARNase de 66 aa dont la surproduction conduit à la bactériostase d'*E. coli* et de *Y. pestis*, et de son antitoxine partenaire HicB3, 135 aa, qui neutralise HicA3 en masquant son site actif. HicB3 a aussi une fonction de régulation, elle réprime l'expression de l'opéron *hicA3-hicB3* en se fixant sur deux opérateurs dans la région promotrice *PhicA3*. Le STA HicA3-HicB3 ne semble pas jouer de rôle dans la virulence dans le modèle murin de peste bubonique. Dans les paragraphes suivants, nous discuterons des résultats obtenus concernant l'organisation et l'autorégulation des gènes *hicA3-hicB3*, l'activité de la toxine HicA3 ainsi que du rôle de ce STA dans la physiologie de *Y. pestis*.

I. *hicA3* et *hicB3* forment un opéron

Notre travail a permis d'identifier le gène de toxine *hicA3* en amont du gène d'antitoxine *hicB3*. La région intergénique séparant *hicA3* de *hicB3* est plus longue (174 pb) que pour la plupart des autres locus TA (30 pb). Pour le STA HicA1B1 de *Y. pestis*, 44 pb séparent les gènes *hicA1* et *hicB1* (Goulard et al., 2010) et les gènes *hicA* et *hicB* d'*E. coli* K-12 sont distants de 45 pb (Jorgensen et al., 2008).

Cette longue région intergénique pouvait renfermer un second promoteur, comme c'est le cas pour l'opéron *higBA* présent sur le plasmide Rts1 de *P. vulgaris* (Tian et al., 1996). Le gène d'antitoxine *higA* est à la fois co-transcrit avec le gène de toxine *higB*, qu'il chevauche d'une pb, et il est également exprimé à partir d'un second promoteur, plus faible, localisé dans la phase codante *higB*. Nos études de la transcription des gènes *hicA3* et *hicB3* dans différents contextes de délétion chromosomique n'ont pas mis en évidence de promoteur spécifique de *hicB3*, ni dans la région intergénique, ni dans la phase codante *hicA3* (Fig. 2 et 3 de l'article). Les gènes *hicA3* et *hicB3* sont donc uniquement co-transcrits et nous avons localisé le promoteur *PhicA3* de cet opéron.

II. Régulation de l'opéron *hicA3-hicB3*

L'antitoxine HicB3, seule ou complexée à la toxine HicA3, réprime l'expression de l'opéron *hicA3-hicB3* en se fixant sur deux opérateurs de 15 pb (Fig. 3 et 4 de l'article). La plupart des promoteurs de STA sont régulés par coopérativité conditionnelle par le complexe TA : à faible concentration, la toxine agit comme co-répresseur de l'antitoxine, mais lorsqu'elle est en excès, la toxine devient un anti-répresseur qui déstabilise le complexe tripartite TA-opérateur et entraîne l'activation du promoteur.

Dans le cas du STA HicA3-HicB3, nos observations suggèrent que la régulation de l'opéron *hicA3-hicB3* est différente de celle des autres opérons de STA : HicB3 serait un répresseur thermosensible, et son affinité pour l'opérateur serait identique à celle du complexe HicA3-HicB3. Cependant, comme pour les autres STA, un excès de toxine déstabiliserait le complexe répresseur HicA3-HicB3 et entraînerait la dérégulation du promoteur *PhicA3*.

A. HicB3, un répresseur thermosensible ?

Nous avons observé que le promoteur *PhicA3* est réprimé lorsque *Y. pestis* est cultivée à 21°C et 28°C, alors qu'il est légèrement actif à 37°C. De plus, nous avons constaté que le repliement de HicB3 *in vitro* est stable entre 20°C et 30°C. Entre 30°C et 40°C, certains feuillets β sont convertis en *random coil* de manière réversible. La dénaturation des feuillets β pourraient avoir un impact direct sur l'activité répresseur de HicB3. La perte des feuillets β appartenant aux domaines RHH affecterait la reconnaissance et la fixation de HicB3 sur l'opérateur, tandis que la perte des feuillets β des domaines de neutralisation réduirait l'interaction entre les dimères, ce qui diminuerait l'affinité de HicB3 pour son opérateur. Nous n'avons pas testé l'effet de la température sur la conformation du complexe HicA3-HicB3. On ne peut pas exclure que le complexe HicA3-HicB3 soit plus stable que l'antitoxine HicB3. Toutefois, nous penchons pour l'hypothèse que la toxine HicA3 n'augmente pas la stabilité des feuillets β de HicB3 et qu'au delà de 30°C, la dénaturation des feuillets β des domaines de neutralisation diminue l'affinité de HicB3 pour HicA3, ce qui conduit à un déséquilibre du ratio toxine/antitoxine dans la cellule. D'autre part, la dénaturation partielle de HicB3 à 37°C pourrait augmenter sa sensibilité aux protéases, telles que Lon. Nous avons notamment observé que le promoteur *PhicA3* est dérégulé lorsque la protéase Lon est surproduite chez *Y. pestis*. Cependant, la perte de Lon chez *Y. pestis* n'empêche pas la dérégulation de *PhicA3* à 37°C. La dégradation de HicB3 par Lon ne serait donc pas seule responsable de la dérégulation du promoteur *PhicA3* et d'autres protéases pourraient intervenir. Pour répondre à ces interrogations, il serait intéressant de mesurer par résonance plasmonique de surface, à 21°C et à 37°C, les affinités de HicB3 et du complexe HicA3-HicB3 pour l'opérateur et celle de HicB3 pour la toxine HicA3, de détecter par DC les changements de conformation du complexe HicA3-HicB3 en fonction de la température et de quantifier les protéines HicA3 et HicB3 dans des extraits totaux de *Y. pestis* délétée ou non du gène chromosomique *lon* et cultivée à 21°C ou à 37°C.

B. HicA3

1. Un corépresseur ?

A faible concentration, la plupart des toxines agissent comme corépresseurs en stabilisant la structure des antitoxines. Cela permet, d'une part, d'augmenter l'affinité de l'antitoxine pour l'opérateur et d'autre part d'éviter sa dégradation par des protéases (Bøggild et al., 2012; Hansen et al., 2012; Li et al., 2008).

Dans le cas du STA HicA3-HicB3, nos expériences de DC montrent que HicB3 est complètement structurée entre 20°C et 30°C (Fig. 41). De plus, la superposition de la structure de HicB3 à celle du complexe HicA3-NtHicB3 montre que le domaine N-terminal de neutralisation de HicB3 ne subit aucun changement de conformation significatif suite à l'interaction avec HicA3 (RMSD, *root mean square deviation* = 0,543 Å pour 68 résidus, Fig. 50). Par ailleurs, nos expériences de retard sur gel semblent indiquer que HicB3 et le complexe HicA3-HicB3 se fixent sur l'ADN avec une affinité comparable (Fig. 3 de l'article). Ces résultats suggèrent donc que HicB3 est une antitoxine stable entièrement structurée en présence comme en absence de la toxine cible et dont l'affinité pour l'opérateur est indépendante de la présence de la toxine HicA3.

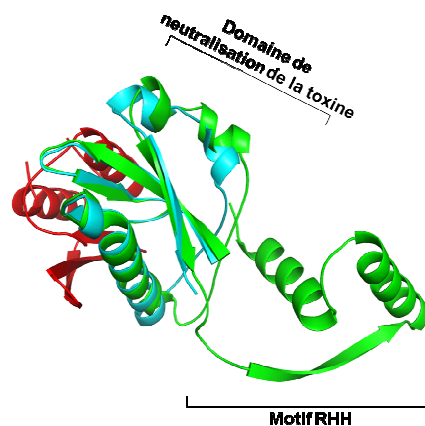


Fig. 50. Superposition d'un monomère HicB3 (vert) au domaine N-terminal de HicB3 (bleu) lié à HicA3 (rouge).

La résolution de la structure de HicB3 a montré que la protéine est tétramérique et comporte deux domaines de fixation à l'ADN de type RHH (Fig. 7 de l'article). Les protéines régulatrices à domaine RHH sont souvent dimériques en solution et se fixent à l'ADN en tant que dimères de dimères (Brown et al., 1990). Chaque domaine RHH s'insère dans un tour du grand sillon de l'ADN qui correspond à un demi-site de l'opérateur. L'interaction directe entre les deux dimères permet une fixation coopérative sur les deux demi-sites (Smith and Sauer, 1995). Certains régulateurs, comme Mnt du bactériophage P22 de *Salmonella*, sont tétramériques en solution, comme HicB3. Dans le cas de Mnt, deux domaines RHH sont formés par les domaines N-terminaux des monomères et les domaines C-terminaux forment un enroulement d'hélices (*coiled-coil*) responsable de la tétramérisation (Fig. 51) (Berggrun et Sauer, 2001; Nooren et al., 1999). L'association en tétramère augmente l'affinité de Mnt pour son opérateur. En effet, en absence du domaine de tétramérisation, deux domaines RHH interagissent l'un avec l'autre (via des ponts hydrogènes formés entre les résidus Arg28 et Glu33 localisés dans les boucles $\alpha 2$ - $\alpha 3$) et se fixent à l'ADN de manière coopérative avec une affinité de l'ordre de 10^{-9} M (Fig. 51) (Berggrun et Sauer, 2001; Waldburger et Sauer, 1995). La présence du domaine de tétramérisation stabilise la structure de Mnt et augmente son affinité pour l'opérateur (10^{-11} M) (Waldburger et Sauer, 1995).

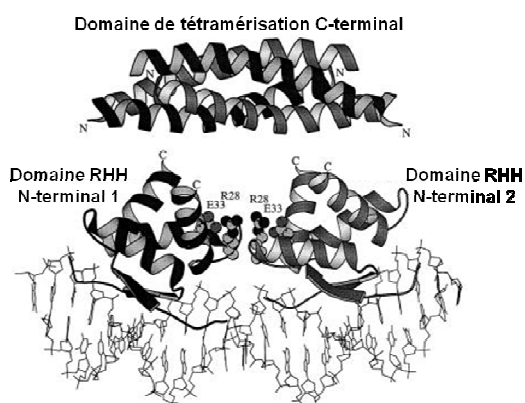


Fig. 51. Modèle de fixation des domaines RHH de Mnt (PDB 1MNT) sur l'opérateur du régulateur Arc (PDB 1PAR) et structure du domaine C-terminal responsable de la tétramérisation (PDB 1QEY) (adapté de Berggrun et Sauer, 2001).

Grâce aux domaines de neutralisation, HicB3 pourrait se fixer sur l'ADN avec une forte affinité, de la même manière que le régulateur Mnt. En modélisant la structure de HicB3 fixé sur l'ADN (superposition de HicB3 au régulateur Arc fixé sur son opérateur de 22 pb, Fig. 52), on remarque que les domaines RHH de HicB3, insérés dans le grand sillon de l'ADN, interagissent l'un avec l'autre par des ponts hydrogènes formés entre les Lys119 et entre Gln123 et Arg116 de deux monomères. Les domaines de neutralisation sont répartis de part et d'autre de l'hélice d'ADN. Il est donc possible que l'interaction entre les domaines RHH permette une fixation coopérative de HicB3 sur l'ADN et que les domaines de neutralisation stabilisent la structure de HicB3 et augmentent son affinité pour l'opérateur.

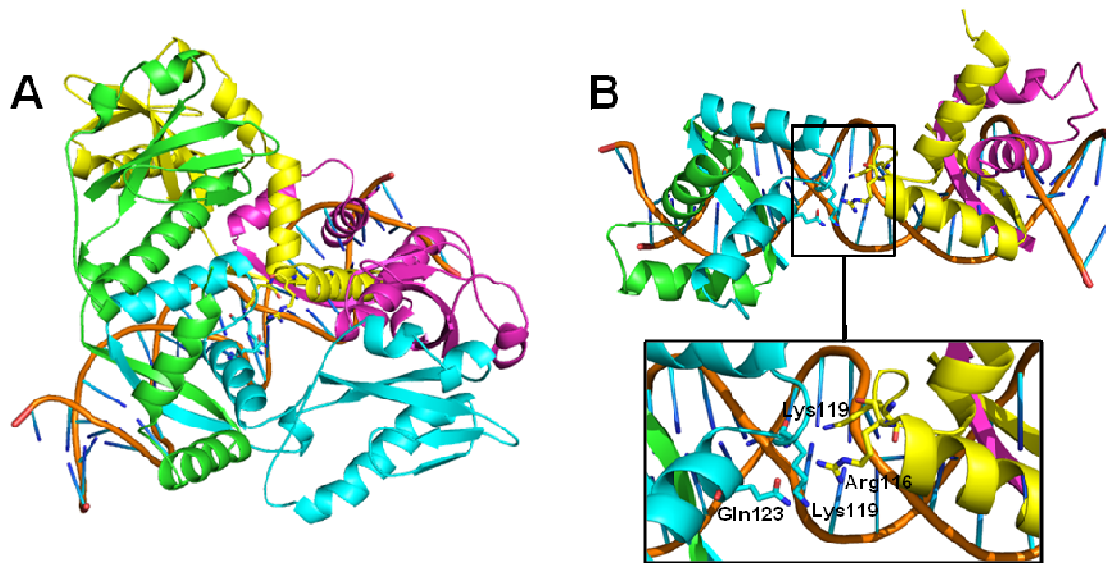


Fig. 52. (A) Modèle de fixation du tétramère HicB3 sur l'opérateur du régulateur Arc (PDB 1PAR). Les feuillettes β des domaines RHH sont insérés dans le grand sillon de l'hélice d'ADN et les deux domaines de neutralisation de la toxine sont de part et d'autre de l'hélice. (B) Zooms sur les deux domaines RHH de HicB3. Les résidus Lys119, Arg116 et Gln123 capables d'interagir sont indiqués.

Nos observations *in vitro* et *in vivo* de la capacité de HicB3 et du complexe HicA3-HicB3 à se fixer à l'opérateur et à réprimer le promoteur *PhicA3* ainsi que l'analyse de la structure de HicB3 semblent donc indiquer que la toxine HicA3 n'intervient pas dans la fixation de HicB3 sur l'ADN et n'est donc pas un co-répresseur. Mais cela reste à démontrer par la comparaison des affinités du domaine RHH de HicB3, de la protéine totale et du complexe HicA3-HicB3 pour l'opérateur. Ces affinités pourraient être mesurées par résonance plasmonique de surface et permettraient de déterminer si le domaine de neutralisation augmente l'affinité de HicB3 pour l'ADN et si HicA3 est un co-répresseur de HicB3.

2. HicA3 comme antirépresseur ?

Dans la majorité des STA, un excès de toxine déstabilise le complexe tripartite TA-opérateur et entraîne l'activation de l'expression de l'opéron TA (Overgaard et al., 2008). Le promoteur de l'opéron *mqsRA* est régulé différemment : l'antitoxine MqsA réprime seule le

promoteur de l'opéron et la toxine MqsR agit uniquement comme anti-répresseur quelque soit sa concentration (Brown et al., 2013).

Dans le cas du STA HicA3-HicB3, nous avons observé que la surproduction de la toxine inactive HicA3-H28A dérègle le promoteur *PhicA3* (Fig. 38), suggérant qu'un excès de toxine agirait comme un anti-répresseur. Nos résultats de SEC-MALS suggèrent que 90% des complexes HicA3-HicB3 sont hétéro-hexamériques (2:4) et que 8% sont hétéro-octamériques (4:4) (Fig. S4D de l'article). La modélisation du complexe 4:4, à partir du complexe HicA3-NtHicB3 hétéro-tétramérique (2:2), révèle un encombrement stérique entre les feuillets β de deux molécules HicA3 et les extrémités C-terminales des domaines RHH de HicB3 (Fig. 8 de l'article). Il est donc possible, qu'en présence d'un excès de HicA3, la structure du tétramère HicB3 s'adapte pour accueillir deux toxines supplémentaires mais que le changement de conformation se répercute aux domaines de fixation à l'ADN et que cela oblige le complexe 4:4 à se détacher de l'opérateur.

Nous proposons donc le modèle de régulation suivant : lorsque la température est inférieure à 30°C (ce qui est le cas lorsque *Y. pestis* se multiplie dans la puce), HicB3 se fixe sur son opérateur avec une forte affinité et réprime le promoteur *PhicA3*, qu'elle soit ou non complexée à deux molécules HicA3 (Fig. 53 A). Seule une faible quantité de complexe HicA3-HicB3 hétéro-hexamérique (2:4) est présente dans la cellule et assure l'autorépression du promoteur (Fig. 53 A). Les données du transcriptome de *Y. pestis* présente dans la puce sont en accord avec cette hypothèse (Vadyvaloo et al., 2010). Lorsque la température augmente (par exemple, lorsque *Y. pestis* infecte un hôte mammifère), la conformation de HicB3 change, son activité répresseur diminue et elle devient la cible de protéases (Fig. 53 B). De la même manière que pour d'autres STA, un déséquilibre de la qualité et/ou de la quantité du répresseur HicB3 permet alors une légère activation du promoteur *PhicA3* et une augmentation de la concentration en toxine libre dans la cellule (Fig. 53 B). Il se forme alors des complexes hétéro-octamériques (4:4) non répresseurs, le promoteur *PhicA3* est complètement activé et le déséquilibre du ratio toxine/antitoxine dans la cellule est amplifié (Fig. 53 C). La quantité d'antitoxine HicB3 dans la cellule n'est plus suffisante pour neutraliser toutes les molécules HicA3 qui exercent alors leur activité toxique.

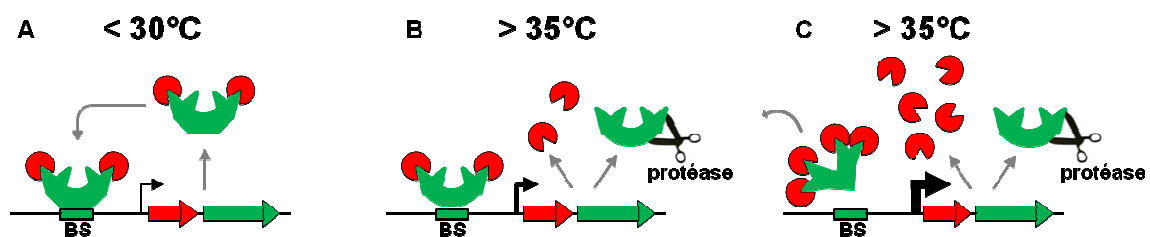


Fig. 53. Modèle de régulation de l'opéron *hicA3B3*. HicA3 est en rouge et HicB3 en vert. (A) En dessous de 30°C. (B) et (C) Au delà de 35°C.

III. La toxine HicA3

A. HicA3 est une ARNase

La toxine HicA3 purifiée peut cliver un ARN transcrit *in vitro*, ce qui démontre que HicA3 est une ARNase. Une publication précédente avait rapporté que la toxine HicA d'*E. coli*, EcHicA, dégrade *in vivo* l'ARNtm et au moins trois ARNm tests suggérant que EcHicA est une ARNase (Jorgensen et al., 2008). Toutefois, les auteurs ne pouvaient pas exclure que la surproduction d'EcHicA active des ARNases endogènes responsables du clivage des ARN. Leur étude n'a révélé aucun site de clivage spécifique des ARNm. En revanche, l'ARNtm a été clivé au niveau de deux sites A-AAC présents dans la séquence codante. Jorgensen et al. ont montré que l'activité ARNase d'EcHicA est indépendante du ribosome : la mutation du codon d'initiation de la traduction de l'ARNtm en un codon stop n'empêche pas son clivage par EcHicA, ce qui prouve que l'ARNtm n'a pas besoin d'être traduit pour être clivé par EcHicA (Jorgensen et al., 2008).

La perte d'une antitoxine est généralement létale pour la bactérie. Par exemple, la délétion du gène *higA* chez *V. cholerae* ou des gènes *parD1*, *parD3*, *parD4* ou *relB1* à *relB4* chez *C. crescentus* est impossible à moins que ces gènes chromosomiques ne soient exprimés *in trans* à partir d'un plasmide (Budde et al., 2006; Fiebig et al., 2010). Dans le cas du STA HicA3-HicB3, il est possible de déléter le gène *hicB3* du chromosome de *Y. pestis* sans avoir besoin de l'exprimer *in trans*. La perte de *hicB3* conduit seulement à un ralentissement de la croissance (Fig. 4 D de l'article). Il était possible qu'en absence de *hicB3*, la toxine HicA3 soit neutralisée par HicB1 et/ou HicB2, deux autres antitoxines de la famille HicB codées sur le chromosome de *Y. pestis*. Cependant, nous avons observé que ni HicB1, ni HicB2 ne neutralisent HicA3 chez *E. coli* et nos expériences de double hybride bactérien ont confirmé qu'elles n'interagissent pas avec la toxine HicA3 (résultats non montrés). La faible toxicité de HicA3 en absence de HicB3 pourrait s'expliquer par une activité ARNase faible ou des cibles ARN spécifiques non essentielles à la survie de *Y. pestis*. Une autre possibilité est que la toxine HicA3 soit faiblement traduite. Contrairement à la séquence SD de l'ARNm *hicB3* (séquence AGGGAG), la séquence SD de l'ARNm *hicA3* ne semble pas être optimale pour une traduction efficace de *hicA3* (séquence AGGG). La quantité de toxine HicA3 produite pourrait être insuffisante pour provoquer la mort de la cellule. Pour répondre à ces interrogations, il serait intéressant de déterminer si HicA3 reconnaît un site de clivage spécifique et quels sont les ARNm ciblés, ainsi que de comparer les quantités de HicA3 et de HicB3 produites.

B. Le site catalytique de HicA3

Nous avons montré que le résidu His28 de HicA3 est requis pour l'activité ARNase (Fig. 5 de l'article). Sa substitution en alanine inhibe totalement la dégradation de l'ARN *in vitro* et HicA3-H28A est non toxique *in vivo*. Une récente étude portant sur la toxine HicA de *B. pseudomallei* (BpsHicA) a également montré l'importance d'un résidu His (His24

correspondant à His28 de HicA3) ainsi que celle d'un résidu Gly (Gly22 correspondant à Gly26 de HicA3) dans l'activité toxique de BpsHicA (Butt et al., 2014). La substitution de His24 en Ala ou celle de Gly22 en Cys abolit complètement l'activité toxique de BpsHicA chez *E. coli*. Ces deux résidus sont très conservés parmi les toxines de la famille HicA (Fig. S1 de l'article). Ils sont également conservés dans la protéine de fonction inconnue TTHA1913 de *Thermus thermophilus* dont la structure est très similaire à celles de HicA3 et de BpsHicA (Fig. 54). Il est à noter que la protéine TTHA1913 a pu être surproduite chez *E. coli* pour être cristallisée, ce qui suggère qu'elle n'est pas toxique, alors que seule la forme inactive BpsHicA-H24A a pu être produite et purifiée pour déterminer sa structure par RMN (Butt et al., 2014). A ce jour, HicA3, BpsHicA-H24A et TTHA1913 sont les seules protéines de la famille HicA dont la structure a été résolue. Par ailleurs, la substitution d'autres résidus de BpsHicA très conservés (Gly14, Ser23 et Pro41 correspondants à Gly14, Ser27, Pro45 de HicA3) a montré que ces résidus ne sont pas impliqués dans l'activité toxique de BpsHicA, ni dans l'interaction avec l'antitoxine BpsHicB (Butt et al., 2014).

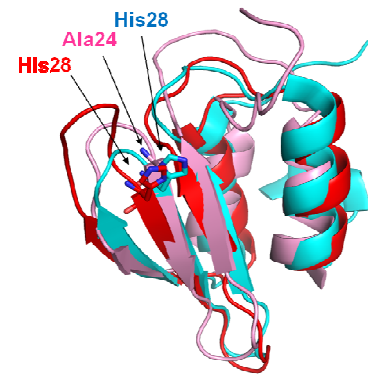


Fig. 54. Superposition des structures de HicA3 (rouge), BpsHicA-H24A (rose, PDB 4C26) et TTHA1913 (bleu, PDB 1WHZ). Les résidus His28 de HicA3 et TTHA1913, et Ala24 de BpsHicA-H24A sont indiqués.

Le site catalytique d'ARNases classiques comme les ARNases A, T1 ou la Barnase, contient généralement un couple de résidus acide-base, souvent His et Glu, qui participent à la réaction de clivage de l'ARN (Yang, 2011). D'autres résidus chargés positivement présents dans le site catalytique permettent la bonne orientation des bases ribonucléotidiques et stabilisent l'état de transition de la réaction de clivage. Des mécanismes de clivage alternatifs existent pour les ARNases dont le site actif est dépourvu de résidu acide ou basique. Toutefois, leur taux de clivage est généralement plus faible que celui des ARNases classiques (Yang, 2011). A titre d'exemple, la colicine E5 d'*E. coli*, qui clive les ARNt Asn, Asp, His et Tyr, ne possède aucun résidu acide dans son site actif. Des résidus basiques (deux Lys et une Arg) catalyseraient la réaction de clivage de l'ARN lorsque le pH est basique, l'activité de l'enzyme étant optimale à pH 9 (Yajima et al., 2006). Autre exemple, dans le site actif de la *tRNA-splicing endonuclease* de l'archée *Archaeoglobus fulgidus*, un résidu His joue le rôle d'acide, tandis qu'un résidu aromatique Tyr joue le rôle de base (Xue et al., 2006). Enfin, l'ARNase Csy4 qui clive les ARN CRISPR chez *P. aeruginosa* contient un résidu His basique dans son site actif mais ne contient ni résidu acide, ni résidu chargé positivement à proximité du site catalytique. L'absence de ces résidus est compensée par un résidu Ser présent dans le site catalytique qui permet à l'ARN d'être positionné de manière optimale pour être « attaqué » par le résidu His (Haurwitz et al., 2012).

Le résidu catalytique His28 de HicA3 est localisé à l'extrémité N-terminale du brin $\beta 2$ (Fig. 55). A l'extrémité C-terminale du brin $\beta 1$, à proximité de His28, se trouve le résidu Arg21 (Fig. 55). Ce résidu est conservé chez BpsHicA (Arg19) et il est remplacé par un résidu Lys chez TTHA1913 (Lys25). De plus, HicA3 possède une boucle de six résidus entre les brins $\beta 1$ et $\beta 2$, alors que TTHA1913 et BpsHicA ont une boucle plus courte (2 et 4 résidus, respectivement). Cette boucle plus ample contient un résidu basique Lys22 et deux résidus polaires Asn24 et Ser25 qui pourraient éventuellement être impliqués dans l'activité catalytique de HicA3. Le rôle de ces résidus dans l'activité de HicA3 pourra être évalué par leur substitution ou leur délétion. HicA3 étant une protéine relativement peu toxique, il est possible que son mécanisme catalytique diffère de celui des autres ARNases de la famille HicA.

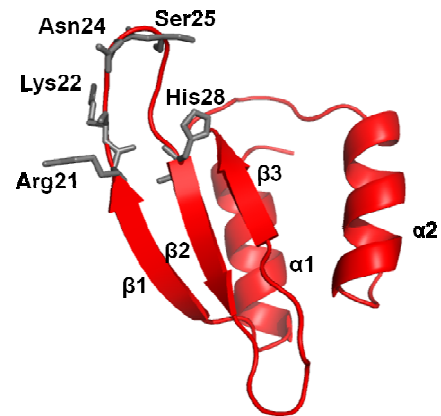


Fig. 55. Structure de HicA3. His28 et d'autres résidus catalytiques potentiels sont en gris.

C. HicA3 adopte un repliement comparable à celui d'un domaine de fixation à l'ARN double brin

HicA3 complexée à HicB3, est capable de fixer l'ARN mais pas de le cliver (Fig. 5 de l'article). Cela suggère que les résidus de HicA3 impliqués dans la fixation de l'ARN ne sont pas tous masqués par l'antitoxine HicB3. Le repliement $\alpha\beta\beta\alpha$ de HicA3 est comparable à celui du domaine de fixation à l'ARN double brin (dsRBD, *double-stranded RNA binding domain*). Ce domaine de 65 à 68 aa a été identifié en 1992 dans les protéines Staufen de *Drosophila melanogaster* et Xlrpba de *Xenopus laevis* (Johnston et al., 1992). Le repliement dsRBD est présent en une ou plusieurs copies chez un grand nombre de protéines eucaryotes, procaryotes et virales. Ces protéines possèdent généralement des domaines protéiques additionnels leur conférant des fonctions particulières (ribonucléase, hélicase, kinase...). De manière générale, les protéines à dsRBD sont impliquées dans la régulation de la traduction, l'édition, l'export nucléocytoplasmique et la localisation des ARNm, dans les mécanismes d'ARN interférence ou encore dans la défense contre les infections virales (Fierro-Monti and Mathews, 2000).

Le domaine dsRBD classique est formé d'une première hélice α , d'un feuillet à trois brins β antiparallèles et d'une seconde hélice α . Les deux hélices α reposent sur une même face du feuillet β (Fig. 56). Deux résidus Ala de l'hélice $\alpha 2$ et un motif GxG à l'extrémité C-terminale du brin $\beta 3$ permettent notamment à l'hélice $\alpha 2$ d'être très proche du feuillet β .

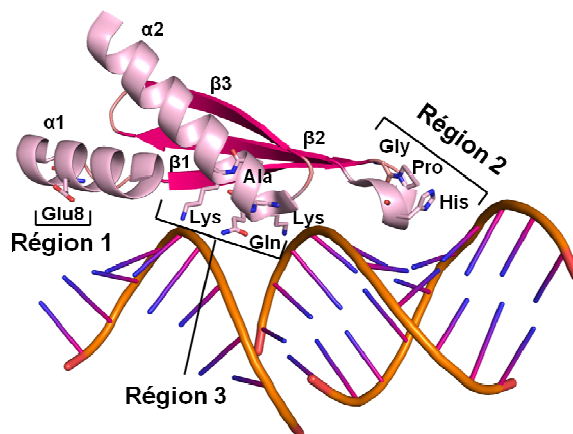


Fig. 56. Structure du domaine dsRBD2 de XlrpA de *X. laevis* fixé sur l'ARNdb (PDB 1DI2).

Bien que HicA3 adopte l'enchaînement typique $\alpha\beta\beta\alpha$ du dsRBD, il n'est pas possible de superposer sa structure à celle de domaines dsRBD connus. Une des différences majeures est qu'HicA3 possède une longue boucle de sept résidus entre le brin $\beta3$ et l'hélice $\alpha2$, alors que les dsRBD classiques n'y comptent qu'un seul résidu. De plus, HicA3 ne possède ni le motif GxG dans le brin $\beta3$, ni les deux Ala conservées dans l'hélice $\alpha2$. Par conséquent, l'hélice $\alpha2$ de HicA3 n'est pas directement accolée au feuillet β (Fig. 57).

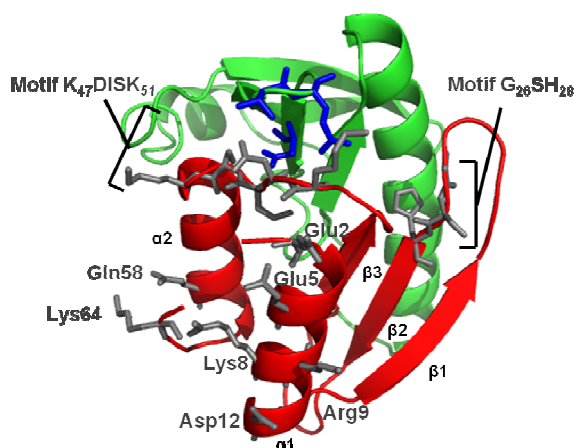


Fig. 57. Structure de HicA3 (rouge) complexée au domaine N-terminal de HicB3 (vert). Les résidus de HicA3 pouvant interagir avec l'ARN sont indiqués en gris. Ceux de HicB3 qui interagissent avec les résidus du motif KDISK de HicA3 sont en bleu.

D'autre part, trois régions du dsRBD classique contiennent des résidus conservés qui interagissent directement avec les bases, les riboses ou le squelette phosphate de l'hélice d'ARNdb (Fig. 56 et Fig. 58) (Masliah et al., 2012).

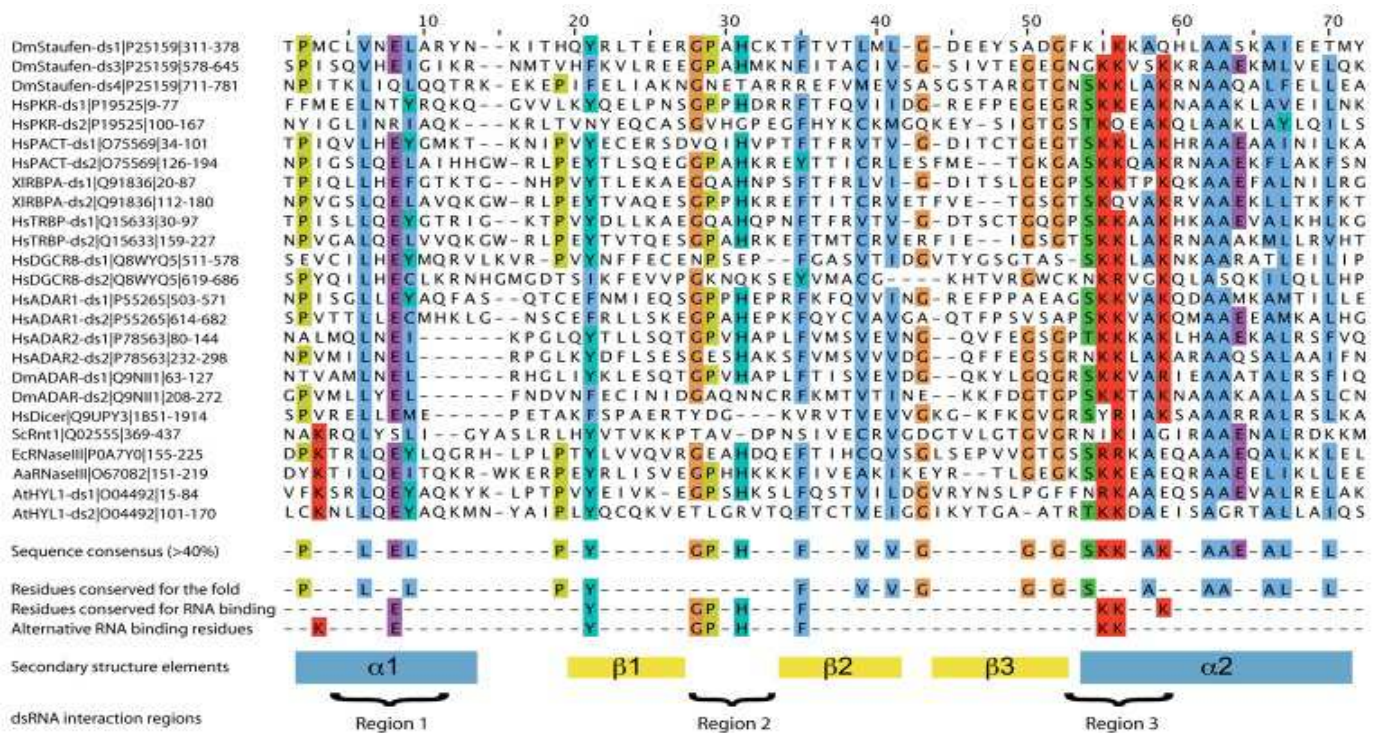


Fig. 58. Alignement des séquences protéiques de plusieurs dsRBD (tiré de Masliah et al., 2012).

La présence ou non de ces trois régions permet de classer les dsRBD en deux types : les dsRBD de type A contiennent les trois régions conservées et fixent mieux l'ARNdb que les dsRBD de type B qui ne contiennent que la région 3. La région 1, localisée dans l'hélice $\alpha 1$, est caractérisée par la présence d'un résidu Glu en 8^e position. La région 2 correspond à la boucle séparant les brins $\beta 1$ et $\beta 2$ et contient un motif GPxH. La région 3 correspond à l'extrémité N-terminale de l'hélice $\alpha 2$ et comporte un motif de résidus chargés positivement KKxAK (Fig. 58).

Ces trois régions ne sont pas conservées chez HicA3. Il n'y a pas de résidu Glu en position 8 dans l'hélice $\alpha 1$ qui définit la région 1. Cependant plusieurs résidus chargés dans cette hélice (Glu2, Glu5, Lys8, Arg9, Asp12) sont orientés vers l'extérieur de la protéine et n'appartiennent pas à la zone d'interface avec HicB3 (Fig. 57). Ils pourraient donc intervenir dans la fixation de l'ARN. La boucle séparant les brins $\beta 1$ et $\beta 2$ ne comprend pas le motif GPxH de la région 2, mais le motif GSH conservé dans les protéines de la famille HicA et qui contient l'His catalytique. Ce motif GSH est masqué par HicB3 dans le complexe HicA3-HicB3, or le complexe fixe l'ARN. Ce motif ne peut donc être le seul responsable de l'interaction avec l'ARN. Enfin, l'hélice $\alpha 2$ de HicA3 ne contient pas le motif KKxAK de la région 3, mais le motif K_{47} DISK₅₁ est présent dans la longue boucle séparant le brin $\beta 3$ de l'hélice $\alpha 2$ (Fig. 57). Cependant, tous les résidus chargés, mis à part Lys51, sont en interaction avec des résidus de HicB3 (Val11, Glu12, Asp15) dans le complexe HicA3-HicB3 (Fig. 57). Dans l'hélice $\alpha 2$, seuls les résidus Gln58 et Lys64 sont orientés vers l'extérieur et n'interagissent pas avec HicB3, ils pourraient donc interagir avec l'ARNdb.

Ainsi de nombreuses questions sur le mécanisme d'action de l'ARNase HicA3 restent à résoudre. HicA3 clive-t-elle une séquence d'ARN spécifique ? Se fixe-t-elle uniquement sur des régions d'ARNdb ou reconnaît-elle également l'ARNsb ? Quels sont les résidus impliqués dans la reconnaissance de l'ARN et ceux qui participent avec His28 au clivage ? L'analyse de la structure de HicA3 nous a donné des pistes sur les résidus impliqués dans le clivage et la fixation de l'ARN. La substitution de ces résidus permettra de comprendre le mécanisme d'action de HicA3. De plus, il serait intéressant de comparer son activité de clivage de l'ARN à celle d'autres toxines de la famille HicA, comme HicA1 de *Y. pestis* ou BpsHicA, afin de déterminer la spécificité d'action de chacune de ARNases.

IV. Rôle physiologique du STA HicA3-HicB3

De nombreuses études ont mis en évidence le rôle des STA dans la réponse au stress, par mort cellulaire programmée ou par induction de la dormance, dans la formation de biofilm ou encore dans la virulence. Les STA HicA1B1 et HicA3B3 ne semblent pas requis pour la virulence de *Y. pestis* dans le modèle murin de peste bubonique. En effet, les mutants $\Delta hicA3B3$ et $\Delta hicA1B1 \Delta hicA3B3$ sont aussi virulents que la souche sauvage (Fig. 5 de l'article). Il est possible que les cibles des ARNases HicA1 et HicA3 codent des protéines dépourvues de rôle dans la virulence de *Y. pestis*. Alternativement, le rôle des STA HicA1B1 et HicA3B3 pourrait être redondant avec celui de HigB2A2 et RelE1B1, les deux autres STA pour lesquels une activité toxique a été détectée chez *Y. pestis* (Goulard et al., 2010), donc la perte de deux STA fonctionnels sur quatre pourrait être insuffisante pour observer un phénotype affectant la virulence de *Y. pestis*. A ce propos, chez *E. coli*, la délétion d'au moins cinq opérons de STA est nécessaire pour diminuer la persistance (Maisonneuve et al., 2011). Il serait donc intéressant de tester la virulence de *Y. pestis* dépourvue des quatre STA cités plus haut, puis si ce mutant est atténué, de tester la virulence des souches dépourvues uniquement de HigB2A2 ou de RelE1B1.

Nos expériences préliminaires suggèrent que la perte des STA HicA1B1 et/ou HicA3B3 n'a pas d'effet sur la production de biofilm *in vitro* après 12 et 24 h de croissance de *Y. pestis* (résultats non montrés). La production de biofilm *in vitro* n'étant pas toujours corrélée avec la production de biofilm chez la puce (observation faite au laboratoire), ces STA pourraient toutefois jouer un rôle dans la colonisation et la formation de biofilm chez l'insecte. L'étude du transcriptome de *Y. pestis* extraite de puces bloquées (puces ayant le proventricule obstrué par un biofilm produit par *Y. pestis*) a révélé que l'opéron *hicA3B3* est très peu exprimé chez la puce (six fois moins que dans le bubon de rat infecté) (Vadyvaloo et al., 2010). Ce qui est cohérent avec le fait que l'antitoxine HicB3 réprime l'opéron *hicA3B3* à 21°C (qui reflète la température dans la puce) (Fig. 39). D'autre part, notre analyse *in silico* suggère que le génome de *Y. pestis* ne contient pas de site de fixation autre que les deux sites identifiés au niveau de *PhicA3* (Fig. 4 de l'article). Il est donc peu probable que HicB3 réprime l'expression

d'autres gènes et que le système HicA3B3 soit impliqué chez la puce. Il serait toutefois intéressant de confirmer ou non ces hypothèses *in vivo*, en testant la capacité d'un mutant $\Delta hicA3B3$ à coloniser et à bloquer la puce et en comparant son transcriptome à celui de la souche sauvage dans la puce bloquée.

Il est généralement admis que la circulation continue de *Y. pestis* dans les populations de rongeurs permet de maintenir les foyers de peste à travers le monde. Cependant, cette maintenance enzootique est controversée puisque il y a de longues périodes pendant lesquelles *Y. pestis* semble absente des populations de mammifères ou de leurs vecteurs dans les foyers de peste. Il a donc été proposé que *Y. pestis* persiste dans le sol et que cette persistance à long terme joue un rôle dans l'épidémiologie de la peste (Drancourt et al., 2006). Plusieurs études sont en faveur de cette hypothèse. Il a notamment été montré que *Y. pestis* est capable de survivre et de conserver sa virulence, dans des conditions de laboratoire, pendant 10 à 16 mois dans un sol autoclavé et hydraté (Ayyadurai et al., 2008; Mollaret, 1963). Elle serait également capable de survivre dans la nature pendant plusieurs mois, puisque la bactérie a été retrouvée vivante dans un terrier ayant abrité un animal mort de peste qui a ensuite été condamné pendant 11 mois (Drancourt et al., 2006; Karimi, 1963). Les mécanismes de persistance de *Y. pestis* dans le sol restent à élucider et on ne peut pas exclure que les STA puissent jouer un rôle dans l'écologie de la peste.

Références bibliographiques

- Aakre, C.D., Phung, T.N., Huang, D., and Laub, M.T. (2013). A bacterial toxin inhibits DNA replication elongation through a direct interaction with the β sliding clamp. *Mol. Cell* 52, 617–628.
- Achtman, M., Zurth, K., Morelli, G., Torrea, G., Guiyoule, A., and Carniel, E. (1999). *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 14043–14048.
- Van Acker, H., Sass, A., Dhondt, I., Nelis, H.J., and Coenye, T. (2014). Involvement of toxin-antitoxin modules in *Burkholderia cenocepacia* biofilm persistence. *Pathog. Dis.* 71, 326–335.
- Aizenman, E., Engelberg-Kulka, H., and Glaser, G. (1996). An *Escherichia coli* chromosomal “addiction module” regulated by guanosine 3', 5'-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 6059–6063.
- Allison, K.R., Brynildsen, M.P., and Collins, J.J. (2011). Heterogeneous bacterial persisters and engineering approaches to eliminate them. *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 593–598.
- Almeida, A.M.P. de, and Leal, N.C. (2012). *Advances in Yersinia Research* (Springer Science & Business Media).
- Amitai, S., Yassin, Y., and Engelberg-Kulka, H. (2004). MazF-mediated cell death in *Escherichia coli*: a point of no return. *J. Bacteriol.* 186, 8295–8300.
- Amitai, S., Kolodkin-Gal, I., Hananya-Meltabashi, M., Sacher, A., and Engelberg-Kulka, H. (2009). *Escherichia coli* MazF leads to the simultaneous selective synthesis of both “death proteins” and “survival proteins.” *PLoS Genet.* 5, e1000390.
- Anantharaman, V., and Aravind, L. (2003). New connections in the prokaryotic toxin-antitoxin network: relationship with the eukaryotic nonsense-mediated RNA decay system. *Genome Biol.* 4, R81.
- Aravind, L., Anantharaman, V., Balaji, S., Babu, M.M., and Iyer, L.M. (2005). The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 231–262.
- Arbing, M.A., Handelman, S.K., Kuzin, A.P., Verdon, G., Wang, C., Su, M., Rothenbacher, F.P., Abashidze, M., Liu, M., Hurley, J.M., et al. (2010). Crystal Structures of Phd-Doc, HigA, and YeeU Establish Multiple Evolutionary Links between Microbial Growth-Regulating Toxin-Antitoxin Systems. *Structure* 18, 996–1010.
- Arcus, V.L., Bäckbro, K., Roos, A., Daniel, E.L., and Baker, E.N. (2004). Distant structural homology leads to the functional characterization of an archaeal PIN domain as an exonuclease. *J. Biol. Chem.* 279, 16471–16478.
- Armalyte, J., Jurenaite, M., Beinoraviciute, G., Teiserskas, J., and Suziedeliene, E. (2012). Characterization of *Escherichia coli* dinJ-yafQ toxin-antitoxin system using insights from mutagenesis data. *J. Bacteriol.* 194, 1523–1532.
- Ayyadurai, S., Houhamdi, L., Lepidi, H., Nappez, C., Raoult, D., and Drancourt, M. (2008). Long-term persistence of virulent *Yersinia pestis* in soil. *Microbiology* 154, 2865–2871.
- Baik, S., Inoue, K., Ouyang, M., and Inouye, M. (2009). Significant bias against the ACA triplet in the tmRNA sequence of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 191, 6157–6166.

- Barbosa, L.C.B., Garrido, S.S., Garcia, A., Delfino, D.B., and Marchetto, R. (2010). Function inferences from a molecular structural model of bacterial ParE toxin. *Bioinformatics* 4, 438.
- Bartra, S.S., Styer, K.L., O'Bryant, D.M., Nilles, M.L., Hinnebusch, B.J., Aballay, A., and Plano, G.V. (2008). Resistance of *Yersinia pestis* to complement-dependent killing is mediated by the Ail outer membrane protein. *Infect. Immun.* 76, 612–622.
- Battesti, A., and Bouveret, E. (2006). Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism. *Mol. Microbiol.* 62, 1048–1063.
- Bearden, S.W., and Perry, R.D. (1999). The Yfe system of *Yersinia pestis* transports iron and manganese and is required for full virulence of plague. *Mol. Microbiol.* 32, 403–414.
- Beaucournu, J.C. (1995). A propos du vecteur de la peste en Europe occidentale au cours de la deuxième pandémie. *Bull. Société Fr. Parasitol.* 13, 233–252.
- Belitsky, M., Avshalom, H., Erental, A., Yelin, I., Kumar, S., London, N., Sperber, M., Schueler-Furman, O., and Engelberg-Kulka, H. (2011). The *Escherichia coli* extracellular death factor EDF induces the endoribonucleolytic activities of the toxins MazF and ChpBK. *Mol. Cell* 41, 625–635.
- Berggrun, A., and Sauer, R.T. (2001). Contributions of distinct quaternary contacts to cooperative operator binding by Mnt repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 2301–2305.
- Bernard, P., and Couturier, M. (1991). The 41 carboxy-terminal residues of the miniF plasmid CcdA protein are sufficient to antagonize the killer activity of the CcdB protein. *Mol. Gen. Genet.* MGG 226, 297–304.
- Bernard, P., and Couturier, M. (1992). Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J. Mol. Biol.* 226, 735–745.
- Bernard, P., Kézdy, K.E., Van Melderen, L., Steyaert, J., Wyns, L., Pato, M.L., Higgins, P.N., and Couturier, M. (1993). The F plasmid CcdB protein induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by gyrase. *J. Mol. Biol.* 234, 534–541.
- Bertram, R., and Schuster, C.F. (2014). Post-transcriptional regulation of gene expression in bacterial pathogens by toxin-antitoxin systems. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4.
- Black, D.S., Irwin, B., and Moyed, H.S. (1994). Autoregulation of *hip*, an operon that affects lethality due to inhibition of peptidoglycan or DNA synthesis. *J. Bacteriol.* 176, 4081–4091.
- Blower, T.R., Pei, X.Y., Short, F.L., Fineran, P.C., Humphreys, D.P., Luisi, B.F., and Salmond, G.P.C. (2011). A processed noncoding RNA regulates an altruistic bacterial antiviral system. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 185–190.
- Bobrov, A.G., Kirillina, O., Forman, S., Mack, D., and Perry, R.D. (2008). Insights into *Yersinia pestis* biofilm development: topology and co-interaction of Hms inner membrane proteins involved in exopolysaccharide production. *Environ. Microbiol.* 10, 1419–1432.
- Bøggild, A., Sofos, N., Andersen, K.R., Feddersen, A., Easter, A.D., Passmore, L.A., and Brodersen, D.E. (2012). The crystal structure of the intact *E. coli* RelBE toxin-antitoxin complex provides the structural basis for conditional cooperativity. *Structure* 20, 1641–1648.
- Bosák, J., Laiblová, P., Šmarda, J., Dědičová, D., and Šmajš, D. (2012). Novel colicin FY of *Yersinia frederiksenii* inhibits pathogenic *Yersinia* strains via YiuR-mediated reception, TonB import, and cell membrane pore formation. *J. Bacteriol.* 194, 1950–1959.

- Botelho-Nevers, E., Edouard, S., Leroy, Q., and Raoult, D. (2012). Deleterious effect of ciprofloxacin on *Rickettsia conorii*-infected cells is linked to toxin-antitoxin module up-regulation. *J. Antimicrob. Chemother.* *67*, 1677–1682.
- Brennan, R.G. (1993). The winged-helix DNA-binding motif: another helix-turn-helix takeoff. *Cell* *74*, 773–776.
- Brown, J.M., and Shaw, K.J. (2003). A novel family of *Escherichia coli* toxin-antitoxin gene pairs. *J. Bacteriol.* *185*, 6600–6608.
- Brown, B.L., Grigoriu, S., Kim, Y., Arruda, J.M., Davenport, A., Wood, T.K., Peti, W., and Page, R. (2009). Three dimensional structure of the MqsR:MqsA complex: a novel TA pair comprised of a toxin homologous to RelE and an antitoxin with unique properties. *PLoS Pathog.* *5*, e1000706.
- Brown, B.L., Wood, T.K., Peti, W., and Page, R. (2010). Structure of the *Escherichia coli* antitoxin MqsA (YgiT/b3021) bound to its gene promoter reveals extensive domain rearrangements and the specificity of transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* *286*, 2285–2296.
- Brown, B.L., Lord, D.M., Grigoriu, S., Peti, W., and Page, R. (2013). The *Escherichia coli* toxin MqsR destabilizes the transcriptional repression complex formed between the antitoxin MqsA and the *mqsRA* operon promoter. *J. Biol. Chem.* *288*, 1286–1294.
- Brown, B.M., Bowie, J.U., and Sauer, R.T. (1990). Arc repressor is tetrameric when bound to operator DNA. *Biochemistry (Mosc.)* *29*, 11189–11195.
- Brown, J.S., Gilliland, S.M., Spratt, B.G., and Holden, D.W. (2004). A locus contained within a variable region of pneumococcal pathogenicity island 1 contributes to virulence in mice. *Infect. Immun.* *72*, 1587–1593.
- Budde, P.P., Davis, B.M., Yuan, J., and Waldor, M.K. (2006). Characterization of a *higBA* toxin-antitoxin locus in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* *189*, 491–500.
- Bunker, R.D., McKenzie, J.L., Baker, E.N., and Arcus, V.L. (2008). Crystal structure of PAE0151 from *Pyrobaculum aerophilum*, a PIN-domain (VapC) protein from a toxin-antitoxin operon. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* *72*, 510–518.
- Burroughs, A.L. (1947). Sylvatic plague studies: The vector efficiency of nine species of fleas compared with *Xenopsylla cheopis*. *J. Hyg. (Lond.)* *45*, 371.
- Buts, L., Lah, J., Dao-Thi, M.-H., Wyns, L., and Loris, R. (2005). Toxin-antitoxin modules as bacterial metabolic stress managers. *Trends Biochem. Sci.* *30*, 672–679.
- Butt, A., Higman, V.A., Williams, C., Crump, M.P., Hemsley, C.M., Harmer, N., and Titball, R.W. (2014). The HicA toxin from *Burkholderia pseudomallei* has a role in persister cell formation. *Biochem. J.* *459*, 333–344.
- Castro-Roa, D., Garcia-Pino, A., De Gieter, S., van Nuland, N.A.J., Loris, R., and Zenkin, N. (2013). The Fic protein Doc uses an inverted substrate to phosphorylate and inactivate EF-Tu. *Nat. Chem. Biol.* *9*, 811–817.
- Cataudella, I., Trusina, A., Sneppen, K., Gerdes, K., and Mitarai, N. (2012). Conditional cooperativity in toxin-antitoxin regulation prevents random toxin activation and promotes fast translational recovery. *Nucleic Acids Res.* *40*, 6424–6434.
- Cavanaugh, D.C., and Randall, R. (1959). The role of multiplication of *Pasteurella Pestis* in mononuclear phagocytes in the pathogenesis of flea-borne plague. *J. Immunol.* *83*, 348–363.

- Chan, W.T., Moreno-Córdoba, I., Yeo, C.C., and Espinosa, M. (2012). Toxin-antitoxin genes of the Gram-positive pathogen *Streptococcus pneumoniae*: so few and yet so many. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *76*, 773–791.
- Cheng, H.-Y., Soo, V.W.C., Islam, S., McAnulty, M.J., Benedik, M.J., and Wood, T.K. (2014). Toxin GhoT of the GhoT/GhoS toxin/antitoxin system damages the cell membrane to reduce adenosine triphosphate and to reduce growth under stress. *Environ. Microbiol.* *16*, 1741–1754.
- Cherny, I., and Gazit, E. (2004). The YefM antitoxin defines a family of natively unfolded proteins. Implications as a novel antibacterial target. *J. Biol. Chem.* *279*, 8252–8261.
- Chouikha, I., and Hinnebusch, B.J. (2012). *Yersinia*–flea interactions and the evolution of the arthropod-borne transmission route of plague. *Curr. Opin. Microbiol.* *15*, 239–246.
- Christensen, S.K., and Gerdes, K. (2003). RelE toxins from bacteria and archaea cleave mRNAs on translating ribosomes, which are rescued by tmRNA. *Mol. Microbiol.* *48*, 1389–1400.
- Christensen, S.K., Mikkelsen, M., Pedersen, K., and Gerdes, K. (2001). RelE, a global inhibitor of translation, is activated during nutritional stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 14328–14333.
- Christensen, S.K., Pedersen, K., Hansen, F.G., and Gerdes, K. (2003). Toxin–antitoxin loci as stress-response-elements: ChpAK/MazF and ChpBK cleave translated RNAs and are counteracted by tmRNA. *J. Mol. Biol.* *332*, 809–819.
- Christensen-Dalsgaard, M., and Gerdes, K. (2006). Two *higBA* loci in the *Vibrio cholerae* superintegron encode mRNA cleaving enzymes and can stabilize plasmids. *Mol. Microbiol.* *62*, 397–411.
- Christensen-Dalsgaard, M., Jørgensen, M.G., and Gerdes, K. (2010). Three new RelE-homologous mRNA interferases of *Escherichia coli* differentially induced by environmental stresses. *Mol. Microbiol.* *75*, 333–348.
- Cohn, S.K.J. (2008). 4 Epidemiology of the Black Death and successive waves of plague. *Med. Hist. Suppl.* *74*.
- Coles, M., Djuranovic, S., Söding, J., Frickey, T., Koretke, K., Truffault, V., Martin, J., and Lupas, A.N. (2005). AbrB-like transcription factors assume a swapped hairpin fold that is evolutionarily related to double-psi β barrels. *Structure* *13*, 919–928.
- Cornelis, G.R., Boland, A., Boyd, A.P., Geuijen, C., Iriarte, M., Neyt, C., Sory, M.-P., and Stainier, I. (1998). The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost fenome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *62*, 1315–1352.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* *284*, 1318–1322.
- Cruz, J.W., Rothenbacher, F.P., Maehigashi, T., Lane, W.S., Dunham, C.M., and Woychik, N.A. (2014). Doc toxin is a kinase that inactivates elongation factor Tu. *J. Biol. Chem.* *289*, 7788–7798.
- De la Cruz, M.A., Zhao, W., Farenc, C., Gimenez, G., Raoult, D., Cambillau, C., Gorvel, J.-P., and Méresse, S. (2013). A toxin-antitoxin module of *Salmonella* promotes virulence in mice. *PLoS Pathog* *9*, e1003827.
- Cui, Y., Yu, C., Yan, Y., Li, D., Li, Y., Jombart, T., Weinert, L.A., Wang, Z., Guo, Z., Xu, L., et al. (2013). Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 577–582.

- Dalton, K.M., and Crosson, S. (2010). A conserved mode of protein recognition and binding in a ParD–ParE toxin–antitoxin complex. *Biochemistry (Mosc.)* **49**, 2205–2215.
- Demidenok, O.I., Kaprelyants, A.S., and Goncharenko, A.V. (2014). Toxin-antitoxin *vapBC* locus participates in formation of the dormant state in *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **352**, 69–77.
- Dennis, D.T., Gage, K.L., Gratz, N.G., Poland, J.D., Tikhomirov, E., and Organization, W.H. (1999). *Manuel de la peste: épidémiologie, répartition, surveillance et lutte*
- Derbise, A., Pierre, F., Merchez, M., Pradel, E., Laouami, S., Ricard, I., Sirard, J.-C., Fritz, J., Lemaître, N., Akinbi, H., et al. (2013). Inheritance of the lysozyme inhibitor Ivy was an important evolutionary step by *Yersinia pestis* to avoid the host innate immune response. *J. Infect. Dis.* **207**, 1535–1543.
- Dienemann, C., Bøggild, A., Winther, K.S., Gerdes, K., and Brodersen, D.E. (2011). Crystal structure of the VapBC toxin–antitoxin complex from *Shigella flexneri* reveals a hetero-octameric DNA-binding assembly. *J. Mol. Biol.* **414**, 713–722.
- Donegan, N.P., and Cheung, A.L. (2009). Regulation of the *mazEF* toxin-antitoxin module in *Staphylococcus aureus* and its impact on *sigB* expression. *J. Bacteriol.* **191**, 2795–2805.
- Dörr, T., Vulić, M., and Lewis, K. (2010). Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biol.* **8**, e1000317.
- Drancourt, M., Houhamdi, L., and Raoult, D. (2006). *Yersinia pestis* as a telluric, human ectoparasite-borne organism. *Lancet Infect. Dis.* **6**, 234–241.
- Du, Y. (2002). Role of fraction 1 antigen of *Yersinia pestis* in inhibition of phagocytosis. *Infect. Immun.* **70**, 1453–1460.
- Dy, R.L., Przybilski, R., Semeijn, K., Salmond, G.P.C., and Fineran, P.C. (2014). A widespread bacteriophage abortive infection system functions through a Type IV toxin–antitoxin mechanism. *Nucleic Acids Res.* gkt1419.
- Eisen, R.J., Bearden, S.W., Wilder, A.P., Monteneri, J.A., Antolin, M.F., and Gage, K.L. (2006). Early-phase transmission of *Yersinia pestis* by unblocked fleas as a mechanism explaining rapidly spreading plague epizootics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 15380–15385.
- Engelberg-Kulka, H., Hazan, R., and Amitai, S. (2005). *mazEF*: a chromosomal toxin-antitoxin module that triggers programmed cell death in bacteria. *J. Cell Sci.* **118**, 4327–4332.
- Van den Ent, F., Amos, L., and Löwe, J. (2001). Bacterial ancestry of actin and tubulin. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**, 634–638.
- Falla, T.J., and Chopra, I. (1998). Joint tolerance to β -lactam and fluoroquinolone antibiotics in *Escherichia coli* results from overexpression of *hipA*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 3282–3284.
- Fasani, R.A., and Savageau, M.A. (2013). Molecular mechanisms of multiple toxin–antitoxin systems are coordinated to govern the persister phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, E2528–E2537.
- Felek, S., and Krukoni, E.S. (2009). The *Yersinia pestis* Ail protein mediates binding and Yop delivery to host cells required for plague virulence. *Infect. Immun.* **77**, 825–836.
- Feng, S., Chen, Y., Kamada, K., Wang, H., Tang, K., Wang, M., and Gao, Y.-G. (2013). YoeB–ribosome structure: a canonical RNase that requires the ribosome for its specific activity. *Nucleic Acids Res.* **41**, 9549–9556.

- Fetherston, J.D., Kirillina, O., Bobrov, A.G., Paulley, J.T., and Perry, R.D. (2010). The Yersiniabactin transport system is critical for the pathogenesis of bubonic and pneumonic plague. *Infect. Immun.* **78**, 2045–2052.
- Fico, S., and Mahillon, J. (2006). TasA-tasB, a new putative toxin-antitoxin (TA) system from *Bacillus thuringiensis* pGI1 plasmid is a widely distributed composite *mazE-doc* TA system. *BMC Genomics* **7**, 259.
- Fiebig, A., Castro Rojas, C.M., Siegal-Gaskins, D., and Crosson, S. (2010). Interaction specificity, toxicity and regulation of a paralogous set of ParE/RelE-family toxin-antitoxin systems. *Mol. Microbiol.* **77**, 236–251.
- Fierro-Monti, I., and Mathews, M.B. (2000). Proteins binding to duplexed RNA: one motif, multiple functions. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 241–246.
- Fineran, P.C., Blower, T.R., Foulds, I.J., Humphreys, D.P., Lilley, K.S., and Salmond, G.P. (2009). The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein–RNA toxin–antitoxin pair. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 894–899.
- Fu, Z., Donegan, N.P., Memmi, G., and Cheung, A.L. (2007). Characterization of MazFSa, an endoribonuclease from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **189**, 8871–8879.
- Gage, K.L., and Kosoy, M.Y. (2005). Natural history of plague: perspectives from more than a century of research. *Annu. Rev. Entomol.* **50**, 505–528.
- Galvan, E.M., Lasaro, M.A.S., and Schifferli, D.M. (2008). Capsular antigen fraction 1 and Pla modulate the susceptibility of *Yersinia pestis* to pulmonary antimicrobial peptides such as Cathelicidin. *Infect. Immun.* **76**, 1456–1464.
- García-Contreras, R., Zhang, X.-S., Kim, Y., and Wood, T.K. (2008). Protein translation and cell death: the role of rare tRNAs in biofilm formation and in activating dormant phage killer genes. *PLoS ONE* **3**, e2394.
- Garcia-Pino, A., Christensen-Dalsgaard, M., Wyns, L., Yarmolinsky, M., Magnuson, R.D., Gerdes, K., and Loris, R. (2008). Doc of prophage P1 is inhibited by its antitoxin partner Phd through fold complementation. *J. Biol. Chem.* **283**, 30821–30827.
- Garcia-Pino, A., Balasubramanian, S., Wyns, L., Gazit, E., De Greve, H., Magnuson, R.D., Charlier, D., van Nuland, N.A.J., and Loris, R. (2010). Allostery and intrinsic disorder mediate transcription regulation by conditional cooperativity. *Cell* **142**, 101–111.
- Geng, J., Song, Y., Yang, L., Feng, Y., Qiu, Y., Li, G., Guo, J., Bi, Y., Qu, Y., Wang, W., et al. (2009). Involvement of the post-transcriptional regulator Hfq in *Yersinia pestis* virulence. *PLoS ONE* **4**, e6213.
- Georgiades, K., and Raoult, D. (2011). Genomes of the most dangerous epidemic bacteria have a virulence repertoire characterized by fewer genes but more toxin-antitoxin modules. *PLoS ONE* **6**, e17962.
- Gerdes, K., Christensen, S.K., and Løbner-Olesen, A. (2005). Prokaryotic toxin–antitoxin stress response loci. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 371–382.
- Germain, E., Castro-Roa, D., Zenkin, N., and Gerdes, K. (2013). Molecular mechanism of bacterial persistence by HipA. *Mol. Cell* **52**, 248–254.
- Goeders, N., and Van Melderen, L. (2014). Toxin-antitoxin systems as multilevel interaction systems. *Toxins* **6**, 304–324.

- Gomis-Ruth, F.X. (1998). The structure of plasmid-encoded transcriptional repressor CopG unliganded and bound to its operator. *EMBO J.* *17*, 7404–7415.
- Gonzalez Barrios, A.F., Zuo, R., Hashimoto, Y., Yang, L., Bentley, W.E., and Wood, T.K. (2005). Autoinducer 2 controls biofilm formation in *Escherichia coli* through a novel motility quorum-sensing regulator (MqsR, B3022). *J. Bacteriol.* *188*, 305–316.
- Gottfredsen, M., and Gerdes, K. (1998). The *Escherichia coli* *relBE* genes belong to a new toxin–antitoxin gene family. *Mol. Microbiol.* *29*, 1065–1076.
- Goulard, C., Langrand, S., Carniel, E., and Chauvaux, S. (2010). The *Yersinia pestis* chromosome encodes active addiction toxins. *J. Bacteriol.* *192*, 3669–3677.
- Griffin, M.A., Davis, J.H., and Strobel, S.A. (2013). Bacterial toxin RelE: a highly efficient ribonuclease with exquisite substrate specificity using atypical catalytic residues. *Biochemistry (Mosc.)* *52*, 8633–8642.
- Grønlund, H., and Gerdes, K. (1999). Toxin-antitoxin systems homologous with *relBE* of *Escherichia coli* plasmid P307 are ubiquitous in prokaryotes. *J. Mol. Biol.* *285*, 1401–1415.
- Hallez, R., Geeraerts, D., Sterckx, Y., Mine, N., Loris, R., and Van Melderren, L. (2010). New toxins homologous to ParE belonging to three-component toxin-antitoxin systems in *Escherichia coli* O157:H7. *Mol. Microbiol.* *76*, 719–732.
- Hansen, S., Vulić, M., Min, J., Yen, T.-J., Schumacher, M.A., Brennan, R.G., and Lewis, K. (2012). Regulation of the *Escherichia coli* HipBA Toxin-Antitoxin System by Proteolysis. *PLoS ONE* *7*, e39185.
- Hargreaves, D., Santos-Sierra, S., Giraldo, R., Sabariego-Jareño, R., de la Cueva-Méndez, G., Boelens, R., Díaz-Orejas, R., and Rafferty, J.B. (2002). Structural and functional analysis of the Kid toxin protein from *E. coli* plasmid R1. *Structure* *10*, 1425–1433.
- Harrison, J.J., Wade, W.D., Akierman, S., Vacchi-Suzzi, C., Stremick, C.A., Turner, R.J., and Ceri, H. (2009). The chromosomal toxin gene *yafQ* is a determinant of multidrug tolerance for *Escherichia coli* growing in a biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* *53*, 2253–2258.
- Haurwitz, R.E., Sternberg, S.H., and Doudna, J.A. (2012). Csy4 relies on an unusual catalytic dyad to position and cleave CRISPR RNA. *EMBO J.* *31*, 2824–2832.
- Hayes, C.S., and Sauer, R.T. (2003). Cleavage of the A site mRNA codon during ribosome pausing provides a mechanism for translational quality control. *Mol. Cell* *12*, 903–911.
- Hayes, F., and Van Melderren, L. (2011). Toxins-antitoxins: diversity, evolution and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *46*, 386–408.
- Hazan, R., and Engelberg-Kulka, H. (2004). *Escherichia coli* *mazEF*-mediated cell death as a defense mechanism that inhibits the spread of phage P1. *Mol. Genet. Genomics* *272*, 227–234.
- Hazan, R., Sat, B., and Engelberg-Kulka, H. (2004). *Escherichia coli* *mazEF*-mediated cell death is triggered by various stressful conditions. *J. Bacteriol.* *186*, 3663–3669.
- Hinnebusch, B.J. (2012). Biofilm-dependent and biofilm-independent mechanisms of transmission of *Yersinia pestis* by fleas. In *Advances in Yersinia Research*, A.M.P. de Almeida, and N.C. Leal, eds. (Springer New York), pp. 237–243.
- Hinnebusch, B.J., Perry, R.D., and Schwan, T.G. (1996). Role of the *Yersinia pestis* hemin storage (*hms*) locus in the transmission of plague by fleas. *Science* *273*, 367–370.

- Hinnebusch, B.J., Rudolph, A.E., Cherepanov, P., Dixon, J.E., Schwan, T.G., and Forsberg, Å. (2002). Role of *Yersinia* murine toxin in survival of *Yersinia pestis* in the midgut of the flea vector. *Science* 296, 733–735.
- Hitchen, P.G., Prior, J.L., Oyston, P.C.F., Panico, M., Wren, B.W., Titball, R.W., Morris, H.R., and Dell, A. (2002). Structural characterization of lipo-oligosaccharide (LOS) from *Yersinia pestis*: regulation of LOS structure by the PhoPQ system. *Mol. Microbiol.* 44, 1637–1650.
- Ho, D.K., Skurnik, M., Blom, A.M., and Meri, S. (2014). *Yersinia pestis* Ail recruitment of C4b-binding protein leads to factor I-mediated inactivation of covalently and noncovalently bound C4b: Immunity to infection. *Eur. J. Immunol.* 44, 742–751.
- Hong, S.H., Wang, X., O'Connor, H.F., Benedik, M.J., and Wood, T.K. (2012). Bacterial persistence increases as environmental fitness decreases. *Microb. Biotechnol.* 5, 509–522.
- Van Houdt, R., and Michiels, C.W. (2005). Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res. Microbiol.* 156, 626–633.
- Hoz, A.B. de la, Ayora, S., Sitkiewicz, I., Fernández, S., Pankiewicz, R., Alonso, J.C., and Ceglowski, P. (2000). Plasmid copy-number control and better-than-random segregation genes of pSM19035 share a common regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 728–733.
- Hu, Y., Benedik, M.J., and Wood, T.K. (2012). Antitoxin DinJ influences the general stress response through transcript stabilizer CspE. *Environ. Microbiol.* 14, 669–679.
- Huang, X.-Z., and Lindler, L.E. (2004). The pH 6 antigen is an antiphagocytic factor produced by *Yersinia pestis* independent of *Yersinia* outer proteins and capsule antigen. *Infect. Immun.* 72, 7212–7219.
- Hurley, J.M., and Woychik, N.A. (2009). Bacterial toxin HigB associates with ribosomes and mediates translation-dependent mRNA cleavage at A-rich sites. *J. Biol. Chem.* 284, 18605–18613.
- Hurley, J.M., Cruz, J.W., Ouyang, M., and Woychik, N.A. (2011). Bacterial toxin RelE mediates frequent codon-independent mRNA cleavage from the 5' end of coding regions *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 286, 14770–14778.
- Jaffé, A., Ogura, T., and Hiraga, S. (1985). Effects of the *ccd* function of the F plasmid on bacterial growth. *J. Bacteriol.* 163, 841–849.
- Jahn, N., Preis, H., Wiedemann, C., and Brantl, S. (2012). BsrG/SR4 from *Bacillus subtilis*—the first temperature-dependent type I toxin–antitoxin system. *Mol. Microbiol.* 83, 579–598.
- Janssen, W.A., and Surgalla, M.J. (1969). Plague bacillus: survival within host phagocytes. *Science* 163, 950–952.
- Jiang, Y., Pogliano, J., Helinski, D.R., and Konieczny, I. (2002). ParE toxin encoded by the broad-host-range plasmid RK2 is an inhibitor of *Escherichia coli* gyrase. *Mol. Microbiol.* 44, 971–979.
- Johnston, D.S., Brown, N.H., Gall, J.G., and Jantsch, M. (1992). A conserved double-stranded RNA-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 10979.
- De Jonge, N., Garcia-Pino, A., Buts, L., Haesaerts, S., Charlier, D., Zangger, K., Wyns, L., De Greve, H., and Loris, R. (2009). Rejuvenation of CcdB-poisoned gyrase by an intrinsically disordered protein domain. *Mol. Cell* 35, 154–163.

- Jorgensen, M.G., Pandey, D.P., Jaskolska, M., and Gerdes, K. (2008). HicA of *Escherichia coli* defines a novel family of translation-independent mRNA interferases in bacteria and archaea. *J. Bacteriol.* *191*, 1191–1199.
- Kamada, K., and Hanaoka, F. (2005). Conformational change in the catalytic site of the ribonuclease YoeB toxin by YefM antitoxin. *Mol. Cell* *19*, 497–509.
- Kamada, K., Hanaoka, F., and Burley, S.K. (2003). Crystal structure of the MazE/MazF complex: molecular bases of antidote-toxin recognition. *Mol. Cell* *11*, 875–884.
- Kamphuis, M.B., Bonvin, A.M.J.J., Monti, M.C., Lemonnier, M., Muñoz-Gómez, A., van den Heuvel, R.H.H., Díaz-Orejas, R., and Boelens, R. (2006). Model for RNA binding and the catalytic site of the RNase Kid of the bacterial *parD* toxin–antitoxin system. *J. Mol. Biol.* *357*, 115–126.
- Karimi, Y. (1963). Natural preservation of plague in soil. *Bull. Société Pathol. Exot. Ses Fil.* *56*, 1183–1186.
- Kasari, V., Kurg, K., Margus, T., Tenson, T., and Kaldalu, N. (2010). The *Escherichia coli* *mqsR* and *ygiT* genes encode a new toxin-antitoxin pair. *J. Bacteriol.* *192*, 2908–2919.
- Kaspy, I., Rotem, E., Weiss, N., Ronin, I., Balaban, N.Q., and Glaser, G. (2013). HipA-mediated antibiotic persistence via phosphorylation of the glutamyl-tRNA-synthetase. *Nat. Commun.* *4*.
- Kawahara, K., Tsukano, H., Watanabe, H., Lindner, B., and Matsuura, M. (2002). Modification of the structure and activity of lipid A in *Yersinia pestis* lipopolysaccharide by growth temperature. *Infect. Immun.* *70*, 4092–4098.
- Kawano, M., Aravind, L., and Storz, G. (2007). An antisense RNA controls synthesis of an SOS-induced toxin evolved from an antitoxin. *Mol. Microbiol.* *64*, 738–754.
- Keren, I., Shah, D., Spoering, A., Kaldalu, N., and Lewis, K. (2004). Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *186*, 8172–8180.
- Keren, I., Mulcahy, L.R., and Lewis, K. (2012). Chapter nineteen - Persister eradication: lessons from the world of natural products. In *Methods in Enzymology*, David A. Hopwood, ed. (Academic Press), pp. 387–406.
- Khoo, S.K., Loll, B., Chan, W.T., Shoeman, R.L., Ngoo, L., Yeo, C.C., and Meinhart, A. (2007). Molecular and structural characterization of the PezAT chromosomal toxin-antitoxin system of the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* *282*, 19606–19618.
- Kim, Y., and Wood, T.K. (2010). Toxins Hha and CspD and small RNA regulator Hfq are involved in persister cell formation through MqsR in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *391*, 209–213.
- Kim, Y., Wang, X., Ma, Q., Zhang, X.-S., and Wood, T.K. (2009). Toxin-antitoxin systems in *Escherichia coli* influence biofilm formation through YjgK (TabA) and fimbriae. *J. Bacteriol.* *191*, 1258–1267.
- Kim, Y., Wang, X., Zhang, X.-S., Grigoriu, S., Page, R., Peti, W., and Wood, T.K. (2010). *Escherichia coli* toxin/antitoxin pair MqsR/MqsA regulate toxin CspD. *Environ. Microbiol.* *12*, 1105–1121.
- Kinch, L.N., Yarbrough, M.L., Orth, K., and Grishin, N.V. (2009). Fido, a novel AMPylation domain common to Fic, Doc, and AvrB. *PLoS ONE* *4*, e5818.
- Koga, M., Otsuka, Y., Lemire, S., and Yonesaki, T. (2010). *Escherichia coli* *rnIA* and *rnIB* compose a novel toxin-antitoxin system. *Genetics* *187*, 123–130.

- Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., Hayete, B., Lawrence, C.A., and Collins, J.J. (2007). A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* 130, 797–810.
- Kolodkin-Gal, I., and Engelberg-Kulka, H. (2008). The extracellular death factor: physiological and genetic factors influencing its production and response in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 190, 3169–3175.
- Kolodkin-Gal, I., Hazan, R., Gaathon, A., Carmeli, S., and Engelberg-Kulka, H. (2007). A linear pentapeptide is a quorum-sensing factor required for *mazEF*-mediated cell death in *Escherichia coli*. *Science* 318, 652–655.
- Kolodkin-Gal, I., Verdiger, R., Shlosberg-Fedida, A., and Engelberg-Kulka, H. (2009). A differential effect of *E. coli* toxin-antitoxin systems on cell death in liquid media and biofilm formation. *PLoS ONE* 4, e6785.
- Kukkonen, M., Lähteenmäki, K., Suomalainen, M., Kalkkinen, N., Emödy, L., Lång, H., and Korhonen, T.K. (2001). Protein regions important for plasminogen activation and inactivation of $\alpha 2$ -antiplasmin in the surface protease Pla of *Yersinia pestis*. *Mol. Microbiol.* 40, 1097–1111.
- Kuroda, A., Murphy, H., Cashel, M., and Kornberg, A. (1997). Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 272, 21240–21243.
- Kwan, B.W., Valenta, J.A., Benedik, M.J., and Wood, T.K. (2013). Arrested protein synthesis increases persister-like cell formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 1468–1473.
- Lahteenmaki, K., Virkola, R., Saren, A., Emody, L., and Korhonen, T.K. (1998). Expression of plasminogen activator Pla of *Yersinia pestis* enhances bacterial attachment to the mammalian extracellular matrix. *Infect. Immun.* 66, 5755–5762.
- Lane, H.E.D. (1981). Replication and incompatibility of F and plasmids in the IncFI group. *Plasmid* 5, 100–126.
- Lehnherr, H., and Yarmolinsky, M.B. (1995). Addiction protein Phd of plasmid prophage P1 is a substrate of the ClpXP serine protease of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 3274–3277.
- Lehnherr, H., Maguin, E., Jafri, S., and Yarmolinsky, M.B. (1993). Plasmid addiction genes of bacteriophage P1: *doc*, which causes cell death on curing of prophage, and *phd*, which prevents host death when prophage is retained. *J. Mol. Biol.* 233, 414–428.
- Lemaitre, N., Sebbane, F., Long, D., and Joseph Hinnebusch, B. (2006). *Yersinia pestis* YopJ suppresses Tumor Necrosis Factor Alpha induction and contributes to apoptosis of immune cells in the lymph node but is not required for virulence in a rat model of bubonic plague. *Infect. Immun.* 74, 5126–5131.
- Leplae, R., Geeraerts, D., Hallez, R., Guglielmini, J., Drèze, P., and Van Melderen, L. (2011). Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families. *Nucleic Acids Res.* 39, 5513–5525.
- Lewis, K. (2008). Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322, 107–131.
- Lewis, K. (2010). Persister cells. *Annu. Rev. Microbiol.* 64, 357–372.
- Li, G.-Y., Zhang, Y., Chan, M.C.Y., Mal, T.K., Hoeflich, K.P., Inouye, M., and Ikura, M. (2006). Characterization of dual substrate binding sites in the homodimeric structure of *Escherichia coli* mRNA interferase MazF. *J. Mol. Biol.* 357, 139–150.

- Li, G.-Y., Zhang, Y., Inouye, M., and Ikura, M. (2008). Structural mechanism of transcriptional autorepression of the *Escherichia coli* RelB/RelE antitoxin/toxin module. *J. Mol. Biol.* **380**, 107–119.
- Li, G.-Y., Zhang, Y., Inouye, M., and Ikura, M. (2009). Inhibitory mechanism of *Escherichia coli* RelE-RelB toxin-antitoxin module involves a helix displacement near an mRNA interferase active site. *J. Biol. Chem.* **284**, 14628–14636.
- Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., and Ohashi, P.S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* **42**, 145–151.
- Madl, T., Van Melderen, L., Mine, N., Respondek, M., Oberer, M., Keller, W., Khatai, L., and Zangger, K. (2006). Structural basis for nucleic acid and toxin recognition of the bacterial antitoxin CcdA. *J. Mol. Biol.* **364**, 170–185.
- Maezato, Y., Daugherty, A., Dana, K., Soo, E., Cooper, C., Tachdjian, S., Kelly, R.M., and Blum, P. (2011). VapC6, a ribonucleolytic toxin regulates thermophilicity in the crenarchaeote *Sulfolobus solfataricus*. *RNA* **17**, 1381–1392.
- Magnusson, L.U., Farewell, A., and Nyström, T. (2005). ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol.* **13**, 236–242.
- Maisonneuve, E., and Gerdes, K. (2014). Molecular mechanisms underlying bacterial persisters. *Cell* **157**, 539–548.
- Maisonneuve, E., Shakespeare, L.J., Jørgensen, M.G., and Gerdes, K. (2011). Bacterial persistence by RNA endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 13206–13211.
- Maisonneuve, E., Castro-Camargo, M., and Gerdes, K. (2013). (p)ppGpp controls bacterial persistence by stochastic induction of toxin-antitoxin activity. *Cell* **154**, 1140–1150.
- Makarova, K.S., Wolf, Y.I., and Koonin, E.V. (2009). Comprehensive comparative-genomic analysis of Type 2 toxin-antitoxin systems and related mobile stress response systems in prokaryotes. *Biol. Direct* **4**, 19.
- Maki, S., Takiguchi, S., Horiuchi, T., Sekimizu, K., and Miki, T. (1996). Partner switching mechanisms in inactivation and rejuvenation of *Escherichia coli* DNA gyrase by F plasmid proteins LetD (CcdB) and LetA (CcdA). *J. Mol. Biol.* **256**, 473–482.
- Makoveichuk, E., Cherepanov, P., Lundberg, S., Forsberg, Å., and Olivecrona, G. (2003). pH6 antigen of *Yersinia pestis* interacts with plasma lipoproteins and cell membranes. *J. Lipid Res.* **44**, 320–330.
- Markovski, M., and Wickner, S. (2013). Preventing bacterial suicide: a novel toxin-antitoxin strategy. *Mol. Cell* **52**, 611–612.
- Masliyah, G., Barraud, P., and Allain, F.H.-T. (2012). RNA recognition by double-stranded RNA binding domains: a matter of shape and sequence. *Cell. Mol. Life Sci.* **14**, 3572–3584.
- Masuda, H., Tan, Q., Awano, N., Wu, K.-P., and Inouye, M. (2012). YeeU enhances the bundling of cytoskeletal polymers of MreB and FtsZ, antagonizing the CbtA (YeeV) toxicity in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **84**, 979–989.
- Masuda, Y., Miyakawa, K., Nishimura, Y., and Ohtsubo, E. (1993). *chpA* and *chpB*, *Escherichia coli* chromosomal homologs of the *pem* locus responsible for stable maintenance of plasmid R100. *J. Bacteriol.* **175**, 6850–6856.

- Mate, M.J., Vincentelli, R., Foos, N., Raoult, D., Cambillau, C., and Ortiz-Lombardia, M. (2011). Crystal structure of the DNA-bound VapBC2 antitoxin/toxin pair from *Rickettsia felis*. *Nucleic Acids Res.* *40*, 3245–3258.
- Matsuura, M., Takahashi, H., Watanabe, H., Saito, S., and Kawahara, K. (2010). Immunomodulatory Effects of *Yersinia pestis* lipopolysaccharides on human macrophages. *Clin. Vaccine Immunol.* *17*, 49–55.
- Mattison, K., Wilbur, J.S., So, M., and Brennan, R.G. (2006). Structure of FitAB from *Neisseria gonorrhoeae* bound to DNA reveals a tetramer of toxin-antitoxin heterodimers containing Pin domains and ribbon-helix-helix motifs. *J. Biol. Chem.* *281*, 37942–37951.
- Mazel, D. (2006). Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* *4*, 608–620.
- McKenzie, J.L., Robson, J., Berney, M., Smith, T.C., Ruthe, A., Gardner, P.P., Arcus, V.L., and Cook, G.M. (2012). A VapBC toxin-antitoxin module is a posttranscriptional regulator of metabolic flux in *Mycobacteria*. *J. Bacteriol.* *194*, 2189–2204.
- Meinhart, A., Alonso, J.C., Sträter, N., and Saenger, W. (2003). Crystal structure of the plasmid maintenance system ϵ/ζ : Functional mechanism of toxin ζ and inactivation by $\epsilon 2\zeta 2$ complex formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 1661–1666.
- Van Melderren, L. (2010). Toxin–antitoxin systems: why so many, what for? *Curr. Opin. Microbiol.* *13*, 781–785.
- Van Melderren, L., and Saavedra De Bast, M. (2009). Bacterial toxin–antitoxin systems: more than selfish entities? *PLoS Genet* *5*, e1000437.
- Miallau, L., Faller, M., Chiang, J., Arbing, M., Guo, F., Cascio, D., and Eisenberg, D. (2008). Structure and proposed activity of a member of the VapBC family of toxin-antitoxin systems: VapBC-5 from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* *284*, 276–283.
- Min, A.B., Miallau, L., Sawaya, M.R., Habel, J., Cascio, D., and Eisenberg, D. (2012). The crystal structure of the Rv0301-Rv0300 VapBC-3 toxin-antitoxin complex from *M. tuberculosis* reveals a Mg^{2+} ion in the active site and a putative RNA-binding site. *Protein Sci.* *21*, 1754–1767.
- Mine, N., Guglielmini, J., Wilboux, M., and Van Melderren, L. (2009). The decay of the chromosomally encoded *ccdO157* toxin-antitoxin system in the *Escherichia coli* species. *Genetics* *181*, 1557–1566.
- Mitchell, H.L., Dashper, S.G., Catmull, D.V., Paolini, R.A., Cleal, S.M., Slakeski, N., Tan, K.H., and Reynolds, E.C. (2010). *Treponema denticola* biofilm-induced expression of a bacteriophage, toxin–antitoxin systems and transposases. *Microbiology* *156*, 774–788.
- Mittenhuber, G. (1999). Occurrence of *mazEF*-like antitoxin/toxin systems in bacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* *1*, 295–302.
- Moll, I., and Engelberg-Kulka, H. (2012). Selective translation during stress in *Escherichia coli*. *Trends Biochem. Sci.* *37*, 493–498.
- Mollaret, H.H. (1963). Experimental preservation of plague in soil. *Bull. Société Pathol. Exot. Ses Fil.* *56*, 1168–1182.
- Moyed, H.S., and Bertrand, K.P. (1983). *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J. Bacteriol.* *155*, 768–775.

- Mutschler, H., and Meinhart, A. (2011). ϵ/ζ systems: their role in resistance, virulence, and their potential for antibiotic development. *J. Mol. Med.* **89**, 1183–1194.
- Mutschler, H., Gebhardt, M., Shoeman, R.L., and Meinhart, A. (2011). A novel mechanism of programmed cell death in bacteria by toxin–antitoxin systems corrupts peptidoglycan synthesis. *PLoS Biol.* **9**, e1001033.
- Nariya, H., and Inouye, M. (2008). MazF, an mRNA Interferase, mediates programmed cell death during multicellular *Myxococcus* development. *Cell* **132**, 55–66.
- Neubauer, C., Gao, Y.-G., Andersen, K.R., Dunham, C.M., Kelley, A.C., Hentschel, J., Gerdes, K., Ramakrishnan, V., and Brodersen, D.E. (2009). The structural basis for mRNA recognition and cleavage by the ribosome-dependent endonuclease RelE. *Cell* **139**, 1084–1095.
- Nooren, I.M.A., Kaptein, R., Sauer, R.T., and Boelens, R. (1999). The tetramerization domain of the Mnt repressor consists of two right-handed coiled coils. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **6**, 755–759.
- Nooren, I.M.A., Folkers, G.E., Kaptein, R., Sauer, R.T., and Boelens, R. (2000). Structure and dynamics of the tetrameric Mnt repressor and a model for its DNA complex. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **17**, 113–122.
- Nordström, K., and Aagaard-Hansen, H. (1984). Maintenance of bacterial plasmids: comparison of theoretical calculations and experiments with plasmid R1 in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **MGG 197**, 1–7.
- O’Loughlin, J.L., Spinner, J.L., Minnich, S.A., and Kobayashi, S.D. (2010). *Yersinia pestis* two-component gene regulatory systems promote survival in human neutrophils. *Infect. Immun.* **78**, 773–782.
- Oberer, M., Zangger, K., Gruber, K., and Keller, W. (2007). The solution structure of ParD, the antidote of the ParDE toxin–antitoxin module, provides the structural basis for DNA and toxin binding. *Protein Sci.* **16**, 1676–1688.
- Ogura, T., and Hiraga, S. (1983). Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**, 4784–4788.
- Overgaard, M., Borch, J., Jørgensen, M.G., and Gerdes, K. (2008). Messenger RNA interferase RelE controls *relBE* transcription by conditional cooperativity. *Mol. Microbiol.* **69**, 841–857.
- Overgaard, M., Borch, J., and Gerdes, K. (2009). RelB and RelE of *Escherichia coli* form a tight complex that represses transcription via the ribbon–helix–helix motif in RelB. *J. Mol. Biol.* **394**, 183–196.
- Oyston, P.C.F., Dorrell, N., Williams, K., Li, S.-R., Green, M., Titball, R.W., and Wren, B.W. (2000). The response regulator PhoP is important for survival under conditions of macrophage-induced stress and virulence in *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* **68**, 3419–3425.
- Pandey, D.P., and Gerdes, K. (2005). Toxin–antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res.* **33**, 966–976.
- Pedersen, K., Christensen, S.K., and Gerdes, K. (2002). Rapid induction and reversal of a bacteriostatic condition by controlled expression of toxins and antitoxins. *Mol. Microbiol.* **45**, 501–510.
- Pedersen, K., Zavialov, A.V., Pavlov, M.Y., Elf, J., Gerdes, K., and Ehrenberg, M. (2003). The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site. *Cell* **112**, 131–140.

- Pellegrini, O., Mathy, N., Gogos, A., Shapiro, L., and Condon, C. (2005). The *Bacillus subtilis* *ycdDE* operon encodes an endoribonuclease of the MazF/PemK family and its inhibitor. *Mol. Microbiol.* *56*, 1139–1148.
- Perry, R.D., and Fetherston, J.D. (1997). *Yersinia pestis*—etiologic agent of plague. *Clin. Microbiol. Rev.* *10*, 35–66.
- Perry, R.D., and Fetherston, J.D. (2011). Yersiniabactin iron uptake: mechanisms and role in *Yersinia pestis* pathogenesis. *Microbes Infect.* *13*, 808–817.
- Perry, R.D., Jr, I.M., and Fetherston, J.D. (2007). Roles of the Yfe and Feo transporters of *Yersinia pestis* in iron uptake and intracellular growth. *BioMetals* *20*, 699–703.
- Peters, K.N., Dhariwala, M.O., Hughes Hanks, J.M., Brown, C.R., and Anderson, D.M. (2013). Early apoptosis of macrophages modulated by injection of *Yersinia pestis* YopK promotes progression of primary pneumonic plague. *PLoS Pathog* *9*, e1003324.
- Pieper, R., Huang, S.-T., Robinson, J.M., Clark, D.J., Alami, H., Parmar, P.P., Perry, R.D., Fleischmann, R.D., and Peterson, S.N. (2009). Temperature and growth phase influence the outer-membrane proteome and the expression of a type VI secretion system in *Yersinia pestis*. *Microbiology* *155*, 498–512.
- Pimentel, B., Madine, M.A., and de la Cueva-Méndez, G. (2005). Kid cleaves specific mRNAs at UUACU sites to rescue the copy number of plasmid R1. *EMBO J.* *24*, 3459–3469.
- Pradel, E., Lemaître, N., Merchez, M., Ricard, I., Reboul, A., Dewitte, A., and Sebbane, F. (2014). New insights into how *Yersinia pestis* adapts to its mammalian host during bubonic plague. *PLoS Pathog* *10*, e1004029.
- Prysak, M.H., Mozdzierz, C.J., Cook, A.M., Zhu, L., Zhang, Y., Inouye, M., and Woychik, N.A. (2009). Bacterial toxin YafQ is an endoribonuclease that associates with the ribosome and blocks translation elongation through sequence-specific and frame-dependent mRNA cleavage. *Mol. Microbiol.* *71*, 1071–1087.
- Pujol, C., and Bliska, J.B. (2005). Turning *Yersinia* pathogenesis outside in: subversion of macrophage function by intracellular yersiniae. *Clin. Immunol.* *114*, 216–226.
- Pujol, C., Grabenstein, J.P., Perry, R.D., and Bliska, J.B. (2005). Replication of *Yersinia pestis* in interferon -activated macrophages requires *ripA*, a gene encoded in the pigmentation locus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *102*, 12909–12914.
- Pujol, C., Klein, K.A., Romanov, G.A., Palmer, L.E., Ciota, C., Zhao, Z., and Bliska, J.B. (2009). *Yersinia pestis* can reside in autophagosomes and avoid xenophagy in murine macrophages by preventing vacuole acidification. *Infect. Immun.* *77*, 2251–2261.
- Rafferty, J.B., Somers, W.S., Saint-Girons, I., and Phillips, S.E.V. (1989). Three-dimensional crystal structures of *Escherichia coli* met repressor with and without corepressor. *Nature* *341*, 705–710.
- Ramage, H.R., Connolly, L.E., and Cox, J.S. (2009). Comprehensive functional analysis of *Mycobacterium tuberculosis* toxin-antitoxin systems: implications for pathogenesis, stress responses, and evolution. *PLoS Genet* *5*, e1000767.
- Reece, R.J., Maxwell, A., and Wang, J.C. (1991). DNA gyrase: structure and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *26*, 335–375.
- Roberts, R.C., Burioni, R., and Helinski, D.R. (1990). Genetic characterization of the stabilizing functions of a region of broad-host-range plasmid RK2. *J. Bacteriol.* *172*, 6204–6216.

- Rodgers, M.E., and Schleif, R. (2009). Solution structure of the DNA binding domain of AraC protein. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 77, 202–208.
- Rothenbacher, F.P., Suzuki, M., Hurley, J.M., Montville, T.J., Kirn, T.J., Ouyang, M., and Woychik, N.A. (2012). *Clostridium difficile* MazF toxin exhibits selective, not global, mRNA cleavage. *J. Bacteriol.* 194, 3464–3474.
- Rowe-Magnus, D.A., Guerout, A.-M., Biskri, L., Bouige, P., and Mazel, D. (2003). Comparative analysis of superintegrations: engineering extensive genetic diversity in the Vibrionaceae. *Genome Res.* 13, 428–442.
- Ruiz-Echevarría, M.J., Giménez-Gallego, G., Sabariego-Jareño, R., and Díaz-Orejas, R. (1995). Kid, a small protein of the parD stability system of plasmid R1, is an inhibitor of DNA replication acting at the initiation of DNA synthesis. *J. Mol. Biol.* 247, 568–577.
- Salmon, M.A., Van Melderen, L., Bernard, P., and Couturier, M. (1994). The antidote and autoregulatory functions of the F plasmid CcdA protein: a genetic and biochemical survey. *Mol. Gen. Genet. MGG* 244, 530–538.
- Sayeed, S., Reaves, L., Radnedge, L., and Austin, S. (2000). The stability region of the large virulence plasmid of *Shigella flexneri* encodes an efficient postsegregational killing system. *J. Bacteriol.* 182, 2416–2421.
- Schifano, J.M., Vvedenskaya, I.O., Knoblauch, J.G., Ouyang, M., Nickels, B.E., and Woychik, N.A. (2014). An RNA-seq method for defining endoribonuclease cleavage specificity identifies dual rRNA substrates for toxin MazF-mt3. *Nat. Commun.* 5.
- Schmidt, O., Schuenemann, V.J., Hand, N.J., Silhavy, T.J., Martin, J., Lupas, A.N., and Djuranovic, S. (2007). *prfF* and *yhaV* encode a new toxin–antitoxin system in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 372, 894–905.
- Schreiter, E.R., and Drennan, C.L. (2007). Ribbon–helix–helix transcription factors: variations on a theme. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 710–720.
- Schreiter, E.R., Sintchak, M.D., Guo, Y., Chivers, P.T., Sauer, R.T., and Drennan, C.L. (2003). Crystal structure of the nickel-responsive transcription factor NikR. *Nat. Struct. Biol.* 10, 794–799.
- Schumacher, M.A., Piro, K.M., Xu, W., Hansen, S., Lewis, K., and Brennan, R.G. (2009). Molecular mechanisms of HipA-mediated multidrug tolerance and its neutralization by HipB. *Science* 323, 396–401.
- Schureck, M.A., Maehigashi, T., Miles, S.J., Marquez, J., Cho, S.E., Erdman, R., and Dunham, C.M. (2014). Structure of the *Proteus vulgaris* HigB-(HigA)₂-HigB toxin-antitoxin complex. *J. Biol. Chem.* 289, 1060–1070.
- Sebbane, F., Lemaître, N., Sturdevant, D.E., Rebeil, R., Virtaneva, K., Porcella, S.F., and Hinnebusch, B.J. (2006). Adaptive response of *Yersinia pestis* to extracellular effectors of innate immunity during bubonic plague. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 11766–11771.
- Shah, D., Zhang, Z., Khodursky, A.B., Kaldalu, N., Kurg, K., and Lewis, K. (2006). Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*. *BMC Microbiol.* 6, 53.
- Shannon, J.G., Hasenkrug, A.M., Dorward, D.W., Nair, V., Carmody, A.B., and Hinnebusch, B.J. (2013). *Yersinia pestis* subverts the dermal neutrophil response in a mouse model of bubonic plague. *mBio* 4, e00170–13.

- Sharp, J.D., Cruz, J.W., Raman, S., Inouye, M., Husson, R.N., and Woychik, N.A. (2012). Growth and translation inhibition through sequence-specific RNA binding by *Mycobacterium tuberculosis* VapC toxin. *J. Biol. Chem.* 287, 12835–12847.
- Short, F.L., Pei, X.Y., Blower, T.R., Ong, S.-L., Fineran, P.C., Luisi, B.F., and Salmond, G.P.C. (2012). PNAS Plus: Selectivity and self-assembly in the control of a bacterial toxin by an antitoxic noncoding RNA pseudoknot. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, E241–E249.
- Signoli, M. (2012). Reflections on crisis burials related to past plague epidemics. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 218–223.
- Simanshu, D.K., Yamaguchi, Y., Park, J.-H., Inouye, M., and Patel, D.J. (2013). Structural basis of mRNA recognition and cleavage by toxin MazF and its regulation by antitoxin MazE in *Bacillus subtilis*. *Mol. Cell* 52, 447–458.
- Simond, P.-L. (1905). La question du véhicule de la peste. *Rev Méd.-Chir. Brés. Am Lat* 5.
- Skurnik, M., Peippo, A., and Ervelä, E. (2000). Characterization of the O-antigen gene clusters of *Yersinia pseudotuberculosis* and the cryptic O-antigen gene cluster of *Yersinia pestis* shows that the plague bacillus is most closely related to and has evolved from *Y. pseudotuberculosis* serotype O:1b. *Mol. Microbiol.* 37, 316–330.
- Smith, T.L., and Sauer, R.T. (1995). P22 Arc repressor: role of cooperativity in repression and binding to operators with altered half-site spacing. *J. Mol. Biol.* 249, 729–742.
- Smith, A.B., López-Villarejo, J., Diago-Navarro, E., Mitchenall, L.A., Barendregt, A., Heck, A.J., Lemonnier, M., Maxwell, A., and Díaz-Orejas, R. (2012). A common origin for the bacterial toxin-antitoxin systems *parD* and *ccd*, suggested by analyses of toxin/target and toxin/antitoxin interactions. *PLoS ONE* 7, e46499.
- Sodeinde, O.A., Subrahmanyam, Y.V., Stark, K., Quan, T., Bao, Y., and Goguen, J.D. (1992). A surface protease and the invasive character of plague. *Science* 258, 1004–1007.
- Songsungthong, W., Higgins, M.C., Rolan, H.G., Murphy, J.L., and Meccas, J. (2010). ROS-inhibitory activity of YopE is required for full virulence of *Yersinia* in mice. *Cell. Microbiol.* 12, 988–1001.
- Spinner, J.L., and Hinnebusch, B.J. (2012). The life stage of *Yersinia pestis* in the flea vector confers increased resistance to phagocytosis and killing by murine polymorphonuclear leukocytes. In *Advances in Yersinia Research*, A.M.P. de Almeida, and N.C. Leal, eds. (Springer New York), pp. 159–163.
- Spinner, J.L., Jarrett, C.O., LaRock, D.L., Miller, S.I., Collins, C.M., and Hinnebusch, B.J. (2012). *Yersinia pestis* insecticidal-like toxin complex (Tc) family proteins: characterization of expression, subcellular localization, and potential role in infection of the flea vector. *BMC Microbiol.* 12, 296.
- Spinner, J.L., Carmody, A.B., Jarrett, C.O., and Hinnebusch, B.J. (2013). Role of *Yersinia pestis* toxin complex family proteins in resistance to phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* 81, 4041–4052.
- Spinner, J.L., Winfree, S., Starr, T., Shannon, J.G., Nair, V., Steele-Mortimer, O., and Hinnebusch, B.J. (2014). *Yersinia pestis* survival and replication within human neutrophil phagosomes and uptake of infected neutrophils by macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 95, 389–398.
- Strauch, M.A., and Hoch, J.A. (1993). Transition-state regulators: sentinels of *Bacillus subtilis* post-exponential gene expression. *Mol. Microbiol.* 7, 337–342.

- Sun, Y.-C., Jarrett, C.O., Bosio, C.F., and Hinnebusch, B.J. (2014). Retracing the evolutionary path that led to flea-borne transmission of *Yersinia pestis*. *Cell Host Microbe* 15, 578–586.
- Sussman, J.K., Simons, E.L., and Simons, R.W. (1996). *Escherichia coli* translation initiation factor 3 discriminates the initiation codon *in vivo*. *Mol. Microbiol.* 21, 347–360.
- Szekeres, S., Dauti, M., Wilde, C., Mazel, D., and Rowe-Magnus, D.A. (2007). Chromosomal toxin–antitoxin loci can diminish large-scale genome reductions in the absence of selection. *Mol. Microbiol.* 63, 1588–1605.
- Tan, Q., Awano, N., and Inouye, M. (2011). YeeV is an *Escherichia coli* toxin that inhibits cell division by targeting the cytoskeleton proteins, FtsZ and MreB. *Mol. Microbiol.* 79, 109–118.
- Dao-Thi, M.-H., Charlier, D., Loris, R., Maes, D., Messens, J., Wyns, L., and Backmann, J. (2002). Intricate interactions within the *ccd* plasmid addiction system. *J. Biol. Chem.* 277, 3733–3742.
- Dao-Thi, M.-H., Van Melderen, L., De Genst, E., Afif, H., Buts, L., Wyns, L., and Loris, R. (2005). Molecular basis of gyrase poisoning by the addiction toxin CcdB. *J. Mol. Biol.* 348, 1091–1102.
- Tian, Q.B., Hayashi, T., Murata, T., and Terawaki, Y. (1996). Gene product identification and promoter analysis of *hig* locus of plasmid Rts1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225, 679–684.
- Torres, R., Swift, R.V., Chim, N., Wheatley, N., Lan, B., Atwood, B.R., Pujol, C., Sankaran, B., Bliska, J.B., Amaro, R.E., et al. (2011). Biochemical, structural and molecular dynamics analyses of the potential virulence factor RipA from *Yersinia pestis*. *PLoS ONE* 6, e25084.
- Torres, R., Chim, N., Sankaran, B., Pujol, C., Bliska, J.B., and Goulding, C.W. (2012). Structural insights into RipC, a putative citrate lyase β subunit from a *Yersinia pestis* virulence operon. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 68, 2–7.
- Tsang, T.M., Felek, S., and Krukoni, E.S. (2010). Ail binding to fibronectin facilitates *Yersinia pestis* binding to host cells and Yop delivery. *Infect. Immun.* 78, 3358–3368.
- Tsilibar, V., Maenhaut-Michel, G., Mine, N., and Melderen, L.V. (2007). What is the benefit to *Escherichia coli* of having multiple toxin-antitoxin systems in its genome? *J. Bacteriol.* 189, 6101–6108.
- Tsuchimoto, S., Ohtsubo, H., and Ohtsubo, E. (1988). Two genes, *pemK* and *pemI*, responsible for stable maintenance of resistance plasmid R100. *J. Bacteriol.* 170, 1461–1466.
- Unterholzner, S.J., Poppenberger, B., and Rozhon, W. (2013). Toxin–antitoxin systems: biology, identification, and application. *Mob. Genet. Elem.* 3, e26219.
- Vadyvaloo, V., Jarrett, C., Sturdevant, D.E., Sebbane, F., and Hinnebusch, B.J. (2010). Transit through the flea vector induces a pretransmission innate immunity resistance phenotype in *Yersinia pestis*. *PLoS Pathog* 6, e1000783.
- Vázquez-Laslop, N., Lee, H., and Neyfakh, A.A. (2006). Increased persistence in *Escherichia coli* caused by controlled expression of toxins or other unrelated proteins. *J. Bacteriol.* 188, 3494–3497.
- Vega, N.M., Allison, K.R., Khalil, A.S., and Collins, J.J. (2012). Signaling-mediated bacterial persister formation. *Nat. Chem. Biol.* 8, 431–433.

- Vesper, O., Amitai, S., Belitsky, M., Byrgazov, K., Kaberdina, A.C., Engelberg-Kulka, H., and Moll, I. (2011). Selective translation of leaderless mRNAs by specialized ribosomes generated by MazF in *Escherichia coli*. *Cell* 147, 147–157.
- Viboud, G.I., and Bliska, J.B. (2005). *Yersinia* outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 59, 69–89.
- Vinella, D., Albrecht, C., Cashel, M., and D'Ari, R. (2005). Iron limitation induces SpoT-dependent accumulation of ppGpp in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 56, 958–970.
- Waldburger, C.D., and Sauer, R.T. (1995). Domains of Mnt repressor: roles in tetramer formation, protein stability, and operator DNA binding. *Biochemistry (Mosc.)* 34, 13109–13116.
- Waldor, M.K., Tschäpe, H., and Mekalanos, J.J. (1996). A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139. *J. Bacteriol.* 178, 4157–4165.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., and Gay, N.J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1, 945–951.
- Wang, X., and Wood, T.K. (2011). Toxin-antitoxin systems influence biofilm and persister cell formation and the general stress response. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5577–5583.
- Wang, X., Kim, Y., Hong, S.H., Ma, Q., Brown, B.L., Pu, M., Tarone, A.M., Benedik, M.J., Peti, W., Page, R., et al. (2011). Antitoxin MqsA helps mediate the bacterial general stress response. *Nat. Chem. Biol.* 7, 359–366.
- Wang, X., Lord, D.M., Cheng, H.-Y., Osbourne, D.O., Hong, S.H., Sanchez-Torres, V., Quiroga, C., Zheng, K., Herrmann, T., Peti, W., et al. (2012). A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS. *Nat. Chem. Biol.* 8, 855–861.
- Wang, X., Lord, D.M., Hong, S.H., Peti, W., Benedik, M.J., Page, R., and Wood, T.K. (2013). Type II toxin/antitoxin MqsR/MqsA controls type V toxin/antitoxin GhoT/GhoS. *Environ. Microbiol.* 15, 1734–1744.
- Wen, Y., Behiels, E., and Devreese, B. (2014). Toxin-antitoxin systems: their role in persistence, biofilm formation and pathogenicity. *Pathog. Dis.*
- Wendrich, T.M., Blaha, G., Wilson, D.N., Marahiel, M.A., and Nierhaus, K.H. (2002). Dissection of the mechanism for the stringent factor RelA. *Mol. Cell* 10, 779–788.
- WHO (2000). Chapter 3 Plague - WHO report on global surveillance of epidemic-prone infectious diseases.
- WHO (2010). Relevé épidémiologique hebdomadaire. 85, 37–48.
- Winther, K.S., and Gerdes, K. (2012). Regulation of enteric *vapBC* transcription: induction by VapC toxin dimer-breaking. *Nucleic Acids Res.* 40, 4347–4357.
- Winther, K.S., Brodersen, D.E., Brown, A.K., and Gerdes, K. (2013). VapC20 of *Mycobacterium tuberculosis* cleaves the Sarcin–Ricin loop of 23S rRNA. *Nat. Commun.* 4.
- Wozniak, R.A.F., and Waldor, M.K. (2009). A toxin–antitoxin system promotes the maintenance of an integrative conjugative element. *PLoS Genet* 5, e1000439.
- Xue, S., Calvin, K., and Li, H. (2006). RNA recognition and cleavage by a splicing endonuclease. *Science* 312, 906–910.

- Yajima, S., Inoue, S., Ogawa, T., Nonaka, T., Ohsawa, K., and Masaki, H. (2006). Structural basis for sequence-dependent recognition of colicin E5 tRNase by mimicking the mRNA-tRNA interaction. *Nucleic Acids Res.* *34*, 6074–6082.
- Yamaguchi, Y., Park, J.-H., and Inouye, M. (2009). MqsR, a crucial regulator for quorum sensing and biofilm formation, is a GCU-specific mRNA interferase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *284*, 28746–28753.
- Yamaguchi, Y., Park, J.-H., and Inouye, M. (2011). Toxin-antitoxin systems in bacteria and archaea. *Annu. Rev. Genet.* *45*, 61–79.
- Yamanaka, K., Zheng, W., Crooke, E., Wang, Y.-H., and Inouye, M. (2001). CspD, a novel DNA replication inhibitor induced during the stationary phase in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* *39*, 1572–1584.
- Yang, W. (2011). Nucleases: diversity of structure, function and mechanism. *Q. Rev. Biophys.* *44*, 1–93.
- Yersin, A. (1894). La peste bubonique à Hong Kong. *Ann Inst Pasteur* *8*, 662–667.
- Zhang, Y., and Inouye, M. (2009). The inhibitory mechanism of protein synthesis by YoeB, an *Escherichia coli* toxin. *J. Biol. Chem.* *284*, 6627–6638.
- Zhang, Y., and Inouye, M. (2011). RatA (YfjG), an *Escherichia coli* toxin, inhibits 70S ribosome association to block translation initiation. *Mol. Microbiol.* *79*, 1418–1429.
- Zhang, X.-S., García-Contreras, R., and Wood, T.K. (2008). *Escherichia coli* transcription factor YncC (McbR) regulates colanic acid and biofilm formation by repressing expression of periplasmic protein YbiM (McbA). *ISME J.* *2*, 615–631.
- Zhang, Y., Zhang, J., Hoeflich, K.P., Ikura, M., Qing, G., and Inouye, M. (2003). MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*. *Mol. Cell* *12*, 913–923.
- Zhang, Y.X., Guo, X.K., Wu, C., Bi, B., Ren, S.X., Wu, C.F., and Guo Ping Zhao (2004). Characterization of a novel toxin-antitoxin module, VapBC, encoded by *Leptospira interrogans* chromosome. *Cell Res.* *14*, 208–216.
- Zhao, J., Wang, Q., Li, M., Heijstra, B.D., Wang, S., Liang, Q., and Qi, Q. (2013). *Escherichia coli* toxin gene *hipA* affects biofilm formation and DNA release. *Microbiology* *159*, 633–640.
- Zhou, D., Han, Y., Qin, L., Chen, Z., Qiu, J., Song, Y., Li, B., Wang, J., Guo, Z., Du, Z., et al. (2005). Transcriptome analysis of the Mg²⁺-responsive PhoP regulator in *Yersinia pestis*. *FEMS Microbiol. Lett.* *250*, 85–95.
- Zhu, L., Phadtare, S., Nariya, H., Ouyang, M., Husson, R.N., and Inouye, M. (2008). The mRNA interferases, MazF-mt3 and MazF-mt7 from *Mycobacterium tuberculosis* target unique pentad sequences in single-stranded RNA. *Mol. Microbiol.* *69*, 559–569.
- Zhu, L., Inoue, K., Yoshizumi, S., Kobayashi, H., Zhang, Y., Ouyang, M., Kato, F., Sugai, M., and Inouye, M. (2009). *Staphylococcus aureus* MazF specifically cleaves a pentad sequence, UACAU, which is unusually abundant in the mRNA for pathogenic adhesive factor SraP. *J. Bacteriol.* *191*, 3248–3255.
- Zielenkiewicz, U., and Ceglowski, P. (2005). The toxin-antitoxin system of the Streptococcal plasmid pSM19035. *J. Bacteriol.* *187*, 6094–6105.

Identification et caractérisation fonctionnelle et structurale du système toxine-antitoxine HicA3-HicB3 de *Yersinia pestis*

Les systèmes toxine-antitoxine (STA) sont généralement constitués de deux petites protéines cytoplasmiques : une toxine stable et une antitoxine instable capable de neutraliser la toxine et de réprimer l'expression de l'opéron toxine-antitoxine. Une étude menée au laboratoire avait mis en évidence que la perte du gène *hicB3* (*ypo3369*) de *Y. pestis*, codant une antitoxine solitaire putative, entraîne un retard de la croissance bactérienne *in vitro* et une atténuation de la virulence dans un modèle murin de peste bubonique (Pradel et al., 2014). Par analyse *in silico*, nous avons détecté, en amont de *hicB3*, un petit gène non annoté candidat pour coder la toxine HicA3. La surproduction de HicA3 provoque la bactériostase chez *Escherichia coli* et *Y. pestis* et la production subséquente de HicB3 restaure la croissance. HicA3 et HicB3 constituent donc un STA fonctionnel. Cependant, la perte du STA HicA3B3 n'affecte pas la virulence de *Y. pestis* dans un modèle murin de peste bubonique. Nous avons ensuite purifié et caractérisé les protéines HicA3 et HicB3. La toxine HicA3 est une ribonucléase monomérique de 66 aa qui comporte un résidu histidine catalytique essentiel pour son activité. L'antitoxine HicB3 a une double fonction : elle interagit avec HicA3 pour la neutraliser et elle réprime le promoteur de l'opéron *hicA3B3*. Des expériences de retard sur gel et de fusions transcriptionnelles avec un gène rapporteur ont révélé que l'antitoxine HicB3 et le complexe HicA3-HicB3 se fixent sur deux opérateurs chevauchant les boîtes -10 et -35 du promoteur *PhicA3*. Nous avons également résolu la structure cristalline de l'antitoxine HicB3 et celle du complexe HicA3-HicB3. HicB3 est un tétramère qui comporte deux domaines de fixation à l'ADN du type ruban-hélice-hélice et deux domaines de neutralisation de la toxine.

Identification and functional and structural characterization of the HicA3-HicB3 toxin-antitoxin system of *Yersinia pestis*

Toxin-antitoxin systems (TAS) are generally constituted by two small cytoplasmic proteins: a stable toxin and an unstable antitoxin which neutralizes the toxin and represses the expression of the toxin-antitoxin operon. In previous research, our lab found that *Yersinia pestis* lacking the *hicB3* (*ypo3369*) gene, encoding a putative orphan antitoxin, has a growth defect *in vitro* and is attenuated for virulence in a murine model of bubonic plague (Pradel et al., 2014). *In silico* analysis revealed a small gene upstream of *hicB3*, encoding a putative toxin that we called HicA3. HicA3 overproduction generates bacteriostasis of *Escherichia coli* and *Y. pestis*, and the subsequent production of HicB3 restores cell growth. HicA3 and HicB3 thus constitute a functional TAS. However, the lack of the HicA3B3 TAS does not affect *Y. pestis* virulence in a murine model of bubonic plague. We then purified and characterized the HicA3 and HicB3 proteins. The HicA3 toxin is a monomeric 66-aa ribonuclease with a catalytic histidine residue required for its activity. The HicB3 antitoxin has two functions: it binds and neutralizes HicA3 and it represses the *hicA3B3* operon promoter. Gel-shift assays and transcriptional reporter fusion experiments showed that both HicB3 and the HicA3-HicB3 complex bind to two operators overlapping the -10 and -35 boxes of the *PhicA3* promoter. We also solved the crystal structures of the HicB3 antitoxin and the HicA3-HicB3 complex. HicB3 is a tetramer with two DNA binding domains of the ribbon-helix-helix type and two toxin neutralization domains.