

Etude fonctionnelle et régulations croisées de systèmes toxine-antitoxine de type I exprimés par Staphylococcus aureus

Camille Riffaud

► To cite this version:

Camille Riffaud. Etude fonctionnelle et régulations croisées de systèmes toxine-antitoxine de type I exprimés par Staphylococcus aureus. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2019. Français. NNT : 2019REN1B021 . tel-02419414

HAL Id: tel-02419414 https://theses.hal.science/tel-02419414

Submitted on 19 Dec 2019

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 BIOLOGIE BRETAGNE SANTE LOIRE



THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605 *Biologie Santé* Spécialité : Biochimie, Biologie Moléculaire et Cellulaire



Etude fonctionnelle et régulations croisées de systèmes toxine-antitoxine de type I exprimés par *Staphylococcus aureus*

Thèse présentée et soutenue à l'Université de Rennes 1, le jeudi 20 juin 2019 Unité de recherche : INSERM U1230 ARN régulateurs bactériens et médecine

Rapporteurs avant soutenance :

Laurence Van MelderenPr à l'Université Libre de Bruxelles, DR ULB138 LGPB (Gosselies)Patrick ViollierPr à l'Université de Genève, DR Groupe 895 (Genève)

Composition du Jury :

Présidente : Nathalie	Théret	DR INSER	M IRSET Equipe 5 Dymec (Rennes)
Examinateurs : Laure Patric Franc Natha	ence Van Melderen ck Viollier cis Repoila alie Théret	Pr à l'Unive Pr à l'Unive CR INRA L DR INSER	ersité Libre de Bruxelles, DR ULB138 LGPB (Gosselies) ersité de Genève, DR Groupe 895 (Genève) JMR1319 Micalis (Jouy en Josas) M IRSET Equipe 5 Dymec (Rennes)
Directeur de thèse : E	Brice Felden	F	PU INSERM U1230 (Rennes)
Co-directeur de thèse	e : Marie-Laure Pinel-Mai	rie M	MCU INSERM U1230 (Rennes)

Remerciements

La thèse est une aventure scientifique et humaine, que je n'aurai pas réussie sans le soutien de nombreuses personnes que je tiens à remercier : collègues, famille et amis.

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse, **Laurence Van Melderen**, **Patrick Viollier**, **Francis Repoila** et **Nathalie Théret** d'avoir accepté de juger ce travail. Ce travail de thèse a pu être réalisé grâce au soutien financier du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, de la faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques de l'Université Rennes 1 et de la Fondation pour la Recherche Médicale.

Merci à **Brice Felden**, mon directeur de thèse, et à **Marie-Laure Pinel-Marie**, ma codirectrice, de m'avoir préparée au concours de l'école doctorale afin d'obtenir mon financement de thèse, ce qui a permis mon arrivée au laboratoire. Je remercie tout particulièrement **Marie-Laure Pinel-Marie** pour son encadrement parfait du début à la fin de cette thèse. Je tiens à te témoigner ma grande reconnaissance et à souligner ton engagement sans faille à l'égard de tes étudiants (doctorants ou futurs pharmaciens), en plus de ta vie de famille bien remplie. Je n'oublierai pas ta grande disponibilité, ta bienveillance, ton écoute, ton exigence et la qualité de la formation scientifique que tu m'as donnée. Tout cela m'a permis d'aller au bout de cette thèse. Nos discussions/réunions du vendredi au sujet de mes résultats, des expériences à prévoir, de mon avenir, mais pas seulement, vont me manquer.

Pendant cette thèse, j'ai eu l'honneur de partager le bureau de mes « justes collègues » doctorants **Julie Bronsard**, **Simon Raynaud** et **KimBoi Le Huyen**. Grâce à vous, mes chers amis, cette thèse s'est accomplie dans la bonne humeur, l'entraide et l'écoute mutuelle. Merci pour tous les bons moments que nous avons partagés, au boulot et en dehors. Je suis toujours venu travailler avec entrain car je savais que vous étiez à mes côtés. Julie, tu as partagé ces presque quatre ans de thèse avec moi depuis le début et je t'adresse un grand merci pour ta gentillesse et ton soutien. Cela a été un plaisir de partager cette aventure avec toi, du début à la fin.

Je remercie également les autres membres actuels et passés du laboratoire INSERM U1230 pour leur accueil chaleureux, leur aide et nos discussions (scientifiques ou pas) : Yoann Augagneur, Gaëtan Pascreau, Mohamed Sassi, Marc Hallier, Valérie Bordeau, Nathalie Ramage, Svetlana Chabelskaya, Cintia Gonzales, Astrid Rouillon, Noëlla Amiot, Hélène Le Pabic, Pierre-Yves Donnio, Matthieu Revest, Vincent Cattoir, Pierre Tattevin, Annick Lefèvre, Nadège Thuya et Anne Moreau. Un grand merci à Gaëtan Pascreau pour avoir participé à mon projet de thèse avec enthousiasme et pour avoir consacré beaucoup de temps aux expériences de culture cellulaire, de RT-qPCR et à la relecture de mon article.

Je remercie aussi les anciens doctorants du laboratoire : **Régine Brielle**, **Tony Mauro** et **Lorraine Adam**. Nous avons essayé de perpétuer à notre manière la tradition des fameux repas à thème organisés par les doctorants. La marche était haute, mais nous avons relevé ce défi et le flambeau est maintenant transmis à nos successeurs de l'équipe des doctorants : **Charlotte Oriol, Guillaume Ménard, Killian Le Neindre, Loren Dejoies** et **Sophie Reissier**. A tous, merci et bon courage pour la poursuite de votre thèse. Sophie, merci pour nos discussions équestres, c'est toujours un plaisir d'échanger autour de sa passion et cela permet de s'évader un court instant. Merci également aux stagiaires de passage au laboratoire, surtout **Steven Crété**, qui viennent perturber un peu notre routine et apporter quelques distractions bienvenues pour regonfler le moral des doctorants.

Un grand merci à ma famille et mes amis pour leur soutien inébranlable et la confiance que vous placez en moi. Tous, vous avez été indispensables à la réussite de cette thèse et pour cela je vous remercie. Enfin, merci à **Kévin Huguet**, qui, lors des mes stages de master 1 et master 2, m'a transmis son goût de la recherche et m'a encouragée à poursuivre en thèse.

Table des matières

Table des matières	1
Liste des Figures	4
Liste des Tableaux	6
Liste des Abréviations	7
Introduction	9
I. Staphylococcus aureus	10
A. Caractéristiques générales	10
1. Découverte de l'espèce et taxonomie	10
2. Caractéristiques morphologiques et biochimiques de S. aureus	11
3. Le génome de <i>S. aureus</i>	12
3.1. Caractéristiques et définitions	12
3.2. Les éléments génétiques mobiles présents chez S. aureus	13
4. S. aureus : bactérie commensale et pathogène	16
4.1. Habitat de S. aureus	16
4.2 Diversité des infections à <i>S. aureus</i>	17
B. Les facteurs de virulence de S. aureus	19
 B. Les facteurs de virulence de S. aureus 1. Les facteurs d'adhésion et de colonisation 	19 19
 B. Les facteurs de virulence de S. aureus 1. Les facteurs d'adhésion et de colonisation 2. Les facteurs d'invasion et de destruction des tissus 	19 19 22
 B. Les facteurs de virulence de S. aureus 1. Les facteurs d'adhésion et de colonisation 2. Les facteurs d'invasion et de destruction des tissus 2.1. Les toxines formant des pores 	19 19 22 22
 B. Les facteurs de virulence de S. aureus 1. Les facteurs d'adhésion et de colonisation 2. Les facteurs d'invasion et de destruction des tissus 2.1. Les toxines formant des pores 2.2. Les toxines exfoliatives 	19 19 22 22 25
 B. Les facteurs de virulence de S. aureus 1. Les facteurs d'adhésion et de colonisation 2. Les facteurs d'invasion et de destruction des tissus 2.1. Les toxines formant des pores 2.2. Les toxines exfoliatives 2.3. Les enzymes sécrétées par <i>S. aureus</i>. 	19 19 22 22 25 25
 B. Les facteurs de virulence de S. aureus 1. Les facteurs d'adhésion et de colonisation 2. Les facteurs d'invasion et de destruction des tissus 2.1. Les toxines formant des pores 2.2. Les toxines exfoliatives 2.3. Les enzymes sécrétées par <i>S. aureus</i> 3. Les facteurs d'échappement au système immunitaire 	19 19 22 22 25 25 26
 B. Les facteurs de virulence de S. aureus 1. Les facteurs d'adhésion et de colonisation 2. Les facteurs d'invasion et de destruction des tissus 2.1. Les toxines formant des pores 2.2. Les toxines exfoliatives 2.3. Les enzymes sécrétées par S. aureus 3. Les facteurs d'échappement au système immunitaire C. S. aureus et adaptation aux stress environnementaux 	19 19 22 22 25 25 26 26
 B. Les facteurs de virulence de S. aureus 1. Les facteurs d'adhésion et de colonisation 2. Les facteurs d'invasion et de destruction des tissus 2.1. Les toxines formant des pores 2.2. Les toxines exfoliatives 2.3. Les enzymes sécrétées par S. aureus 3. Les facteurs d'échappement au système immunitaire C. S. aureus et adaptation aux stress environnementaux D. S. aureus et adaptation aux antibiotiques 	19 19 22 22 25 25 26 26 27 31
 B. Les facteurs de virulence de S. aureus 1. Les facteurs d'adhésion et de colonisation 2. Les facteurs d'invasion et de destruction des tissus 2.1. Les toxines formant des pores 2.2. Les toxines exfoliatives 2.3. Les enzymes sécrétées par S. aureus 3. Les facteurs d'échappement au système immunitaire C. S. aureus et adaptation aux stress environnementaux. D. S. aureus et adaptation aux antibiotiques 1. La résistance aux antibiotiques 	19 19 22 22 25 25 26 26 27 31 32
 B. Les facteurs de virulence de S. aureus 1. Les facteurs d'adhésion et de colonisation 2. Les facteurs d'invasion et de destruction des tissus 2.1. Les toxines formant des pores 2.2. Les toxines exfoliatives 2.3. Les enzymes sécrétées par <i>S. aureus</i> 3. Les facteurs d'échappement au système immunitaire C. S. aureus et adaptation aux stress environnementaux D. S. aureus et adaptation aux antibiotiques 1. La résistance aux antibiotiques agissant sur la paroi et la membrane 	19 19 22 22 25 25 26 26 27 31 32
 B. Les facteurs de virulence de S. aureus 1. Les facteurs d'adhésion et de colonisation 2. Les facteurs d'invasion et de destruction des tissus 2.1. Les toxines formant des pores 2.2. Les toxines exfoliatives 2.3. Les enzymes sécrétées par S. aureus 3. Les facteurs d'échappement au système immunitaire C. S. aureus et adaptation aux stress environnementaux D. S. aureus et adaptation aux antibiotiques 1. La résistance aux antibiotiques agissant sur la paroi et la membrane cytoplasmique. 	19 19 22 22 25 25 26 26 27 31 32
 B. Les facteurs de virulence de S. aureus 1. Les facteurs d'adhésion et de colonisation 2. Les facteurs d'invasion et de destruction des tissus 2.1. Les toxines formant des pores 2.2. Les toxines exfoliatives 2.3. Les enzymes sécrétées par S. aureus 3. Les facteurs d'échappement au système immunitaire C. S. aureus et adaptation aux stress environnementaux D. S. aureus et adaptation aux antibiotiques 1. La résistance aux antibiotiques agissant sur la paroi et la membrane cytoplasmique 1.2. Autres résistances aux antibiotiques de S. aureus 	19 19 22 22 25 25 26 27 31 32 32 37

3. Les bactéries persistantes	41
3.1. Historique et définitions	41
3.2. La persistance des infections à <i>S. aureus</i>	43
E. Les régulateurs de la pathogénie de S. <i>aureus</i>	49
1. Les systèmes à deux composants	49
2. Les facteurs de transcription	52
3. Les ARN régulateurs impliqués dans la pathogénie de S. aureus	57
3.1. L'ARN III	59
3.2. Autres ARN régulateurs impliqués dans la pathogénie de S. aureus	60
II. Les systèmes toxine-antitoxine de type I	63
A. Classification des systèmes toxine-antitoxine	63
1. Les systèmes toxine-antitoxine avec une antitoxine de nature ARN	63
2. Les systèmes toxine-antitoxine avec une antitoxine protéique	64
B. Les systèmes toxine-antitoxine de type I	67
1. Historique	67
2. Régulation de l'expression de la toxine	68
2.1. Inhibition de l'expression des toxines grâce à la structure des ARNm	69
2.2. Les antitoxines inhibant la traduction des toxines	71
2.3. Les antitoxines favorisant la dégradation de l'ARNm de la toxine	73
3. Les fonctions biologiques des STA de type I	74
C. Abondance des STA dans les génomes bactériens	78
Article 1	80
en préparation	80
Contexte de la thèse	111
Résultats	116
Partie I : Identification, caractérisation et étude de la régulation de nouveaux syst	èmes toxine-
antitoxine de type I chez S. aureus	117
Article 2: Functionality and cross-regulation of the four SprG/SprF type I tox	in–antitoxin
systems in Staphylococcus aureus	118
Article 2	124
Functionality and cross-regulation of the four SprG/SprF type I toxin-antitox	in systems
in Staphylococcus aureus	124

Table des matières

Nucleic Acids Research, 28 February 2019, 47 (4): 1740–1758	
Partie II : Identification de la fonction biologique des STA de type I sprG/Spr	rF exprimés par S.
aureus	
I. Etude de l'implication des STA <i>sprG</i> /SprF dans l'adaptation de S.	<i>aureus</i> aux
stress environnementaux	
A. Etude de l'impact de stress environnementaux sur le niveau des ARN	sprG et SprF 161
B. Etude de l'influence de stress environnementaux sur la traduction du j	peptide codé par
sprG2	
C. Etude de l'influence de stress environnementaux sur la croissance de	la souche HG003
de S. aureus sauvage ou délétée des STA sprG/SprF	
II. Etude de l'implication des STA <i>sprG</i> /SprF dans l'adaptation de S. a	<i>aureus</i> aux
antibiotiques	
<i>A. Etude de l'implication des STA sprG/SprF dans la résistance de S. au</i>	reus aux
antibiotiques	
B. Etude de l'implication des STA sprG/SprF dans la formation de bacté	ries persistantes
aux antibiotiques chez S. aureus	
1. Etude chez la souche HG003 de S. aureus	171
2. Etude chez la souche N315 de S. aureus	
Article 3: An RNA antitoxin associates with ribosomes in Staphylococcu	<i>is aureus t</i> o
modulate protein synthesis and increase antibiotic persister cell formatio	n176
Article 3	
Nature Microbiology (en soumission)	
C. Etude de l'implication des STA sprG/SprF dans l'internalisation et la	persistance de S.
aureus dans les macrophages humains	
Discussion et perspectives	219
Annexe	219
Références bibliographiques	219

Liste des Figures

Figure 1 : Visualisation de S. aureus en microscopie à balayage à différents grossissements.11
Figure 2 : Représentation schématique du génome de S. aureus N31512
Figure 3: Mécanismes d'acquisition d'EGM chez S. aureus par transfert horizontal de
gènes16
Figure 4 : Diversité des infections à <i>S. aureus</i> 17
Figure 5 : Représentation schématique des mécanismes d'adhésion de S. aureus aux cellules
de l'hôte impliquant des protéines CWA21
Figure 6 : Les modes d'action des toxines formant des pores de S. aureus
Figure 7 : Mécanisme d'action des toxines superantigènes
Figure 8 : Représentation schématique des stratégies employées par S. aureus pour échapper
au système immunitaire
Figure 9 : Les modes d'action des principaux antibiotiques
Figure 10 : Pourcentage d'isolats invasifs de S. aureus résistants à la méticilline dans les pays
européens en 2017
Figure 11 : Mécanismes moléculaires de résistance de S. aureus à la méticilline, la
vancomycine et la daptomycine
Figure 12 : La réponse aux antibiotiques des bactéries tolérantes40
Figure 13 : Caractéristiques des bactéries persistantes
Figure 14 : Modèle du cycle de vie d'un biofilm de S. aureus avec rechute de l'infection48
Figure 15 : Rôle joué par le système de quorum-sensing Agr dans la régulation de la virulence
de S. aureus
Figure 16 : Circuits impliqués dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans la
pathogénie de S. aureus comprenant le système Agr, les TCSs et les FTs56
Figure 17 : Mécanismes de régulation directe par les ARNreg de l'expression de leurs gènes
cibles
Figure 18 : Mécanismes d'action de l'ARN III sur ces cibles ARNm60
Figure 19 : Représentation schématique des STA avec une antitoxine ARN
Figure 20 : Représentation schématique des STA avec une antitoxine de nature protéique67
Figure 21 : Effet de « post-segregational killing » (PSK) lors de la non transmission verticale
d'un plasmide codant un STA68
Figure 22 : Exemples de structures secondaires séquestrant la séquence SD chez des ARNm de
toxine de type I70

Figure 23 : Exemple de mécanismes d'action employés par des antitoxines de type I chez les
bactéries Gram négative72
Figure 24 : Exemples de mécanisme d'action employés par les antitoxines de type I SR4 (A)
et RNA II (B) chez des bactéries Gram positive73
Figure 25 : Exemple d'antitoxine ciblant la dégradation de l'ARNm de la toxine par des
RNases74
Figure 26 : Représentation schématique du génome de S. aureus HG003118
Figure 27: Représentation schématique résumant les connaissances actuelles sur les
interactions croisées entre les quatre homologues du STA sprG/SprF de S. aureus123
Figure 28 : Analyse par Northern blot des souches HG003 sauvage (WT) et délétées pour les
STA <i>sprG</i> /SprF160
Figure 29 : Influence d'un pH à 5,5 et du milieu carencé SNM3 sur le niveau des ARN sprG
et SprF
Figure 30 : Etude de l'effet des stress thermiques chaud et froid sur le niveau d'expression des
ARN sprG et SprF chez S. aureus HG003163
Figure 31 : Etude de l'effet des acide, oxydatif et hyperosmotique sur la traduction du peptide
encodé par sprG2165
Figure 32 : Influence d'un stress oxydant et hyperosmotique sur la croissance de la souche
HG003 de S. aureus sauvage ou délétée pour les STA sprG/SprF166
Figure 33 : Influence de la carence nutritive sur la croissance de la souche HG003 de S. aureus
sauvage ou délétée pour les STA <i>sprG</i> /SprF167
Figure 34 : Influence de la température sur la croissance de la souche HG003 de S. aureus
sauvage ou délétée pour les STA <i>sprG</i> /SprF168
Figure 35 : Etude de la résistance aux antibiotiques en présence ou absence des STA
<i>sprG</i> /SprF171
Figure 36 : Etude de l'implication des STA sprG/SprF dans la formation de bactéries
persistantes sur des cultures de S. aureus en phase stationnaire de croissance173
Figure 37: Etude de l'implication des STA sprG/SprF dans la formation de bactéries
persistantes sur des cultures de S. aureus en phase exponentielle de croissance174
Figure 38 : Etude de l'implication des STA <i>sprG</i> /SprF dans l'internalisation de <i>S. aureus</i> dans
les macrophages humains
Figure 39 : Structure secondaire de <i>sprG3</i> déterminée avec l'outil Mfold225

Figure 40 : Représentation schématique de la structure secondaire de sprG2 et des int	eractions
entre sprG2 et les antitoxines SprF2 et SprF4	230
Figure 41 : Alignements des séquences nucléotidiques des gènes $sprF$ de la souche H	IG003 de
S. aureus, incluant les séquences promotrices	238

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Adaptation de S. aureus aux stress environnementaux
Tableau 2 : Nombreuses résistances aux antibiotiques chez S. aureus
Tableau 3 : Caractéristiques génétiques retrouvées parmi les sous-populations de SCVs de
S. aureus
Tableau 4 : Les systèmes à deux composants SaeRS, SrrAB, ArlRS et LytRS
Tableau 5 : Principaux ARNreg impliqués dans la pathogénie de S. aureus
Tableau 6: Distribution des STA de type I identifiés chez les bactéries selon leur
fonction
Tableau 7 : Valeurs de CMI obtenues avec les souches HG003 de S. aureus sauvage et délétées
des STA <i>sprG</i> /SprF (en µg/mL)170
Tableau 8 : Valeurs de MDK99 et MDK99,99 obtenues à partir des courbes de survie des souches
HG003 de S. aureus sauvage et délétées des STA sprG/SprF (en h)175

Liste des Abréviations

ADN : Acide désoxyriboNucléique Emp: Extracellular matrix binding protein ET : Exfoliative Toxin Agr : Accessory Gene Regulator AIP : Auto-Inducteur Peptide **FnBPs** : Fibronectin-Binding Proteins Ala: Alanine FT : Facteur de Transcription Arl: Autolysis Related Locus G : Guanine H. pylori : Helicobacter pylori ARN: Acide RiboNucléique ARNm: ARN messager h-VISA : heterogeneous Vancomycin-Intermediate S. aureus ARNreg : ARN régulateur HCl: Acide chlorhydrique asARN : ARN antisens H₂O₂ : Peroxyde d'Hydrogène ARNt : ARN de transfert Kb : Kilo bases Isd : Iron-regulated Surface Determinant asARN : ARN antisens aTc: Anhydrotétracycline M : Molaire B. subtilis : Bacillus subtilis MDK: Minimum Duration for Killing **BHI** : Brain Heart Infusion Mg: Magnésium C: Cytosine MH : Mueller-Hinton Clf: Clamping factor MLS : Macrolides, Lincosamides et Synergystines CHIPS : CHemotaxis Inhibitory Protein of MOI : Multiplicity Of Infection Staphylococci CMB: Concentration Minimale Bactéricide MprF: Multiple Peptide Resistance Factor CMI : Concentration Minimale Inhibitrice MSCRAMM: Microbial Surface Components **Recognizing Adhesive Matrix Molecules CNA** : CollageN Adhesion *M. tuberculosis : Mycobacterium tuberculosis* CWA: Cell Wall-Anchored NaCl : Chlorure de Sodium **ORF** : Open Reading Frame DO₆₀₀ : Densité Optique à 600 nm Eap : Extracellular adherence protein P. aeruginosa : Pseudomonas aeruginosa E. coli : Escherichia coli PAMs: Peptides Anti-Microbiens E. faecalis : Enterococcus faecalis **PBP**: Penicillin-Binding Protein Efb: Extracellular fibrinogen binding protein **PFT** : Pore Forming Toxin EGM : Elément Génétique Mobile PG : Peptidoglycane

Liste des Abréviations

pH: potentiel Hydrogène	Srr : Staphylococcal respiratory response	
Pi : Phosphate inorganique	Ssl : Staphylococcal superantigen-like	
PLP : Protéines Liant les Pénicillines	SSSS : Staphylococcal Scalded Skin Syndrome	
(p)ppGpp : guanosine penta- ou tetraphosphate	SSTI : Skin and Soft Tissues Infections	
PSK : Post-Segregational Killing	STA : Système Toxine-Antitoxine	
PSMs : Phénol-Solubles Modulines	TaARN : ARNreg agissant en trans	
PVL : Leucocidine de Panton-Valentine	TCS : Two Components System	
RACE : Rapid Amplification of cDNA Ends	TIR : Translation Initiation Region	
RBS : Ribosome Binding Site	Tn : Transposon	
RNase : RiboNucléase	TSBd : TSB dilué au 1/10	
ROS : Reactive Oxygen Species	TSST: Toxine du Syndrome de choc Toxique	
	Staphylococcique	
rpm : rotations par minutes	UFC : Unité Formant Colonie	
Sae : S. aureus Exoprotein expression	UTR : Untranslated Transcribed Region	
SAg : SuperAntigène	UV : Ultraviolets	
SaPI : îlot de Pathogénie de Staphylococcus aureus	VISA : Vancomycin-Intermediate S. aureus	
SARM : S. aureus Résistant à la Méticilline	VSSA : Vancomycin-Susceptible S. aureus	
SasG : S. aureus surface protein G	VRSA : Vancomycin-Resistant S. aureus	
S. aureus : Staphylococcus aureus	WT: wild-type (phénotype sauvage)	
SCC : Staphylococcal Chromosome Cassette	%GC : Pourcentage en Guanine et Cytosine	
SCIN : Staphylococcal Complement INhibitor	°C : Degré Celsius	
SCVs : Small Colony Variants	$\sigma^{\rm B}$: Sigma B	
S. epidermidis : Staphylococcus epidermidis		
SD : Shine Dalgarno		
SdrD : Serine/aspartate-rich protein D		
SE : Staphylococcal Enterotoxins		
SERAM: Secretable Expanded Repertoire		
Adhesive Molecules		
SOD : SuperOxyde Dismutase		
Spr : Small Pathogenicity island RNA		

I. Staphylococcus aureus

A. Caractéristiques générales

1. Découverte de l'espèce et taxonomie

La découverte puis l'identification de l'espèce *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) a eu lieu à la fin du XIX^e siècle. A partir de pus de furoncles, *S. aureus* fut observé au microscope comme des bactéries en « amas de grains », premièrement par Robert Koch en 1878, puis par Louis Pasteur deux ans plus tard. Ce fut Alexander Ogston qui, à partir d'abcès post-opératoires, isola ces bactéries en 1881 et nomma ce genre *Staphylococcus*, référence aux termes grecs « staphyles » et « kokkos » désignant les grappes de raisin et la forme arrondie (Newsom, 2008). Puis en 1884, Friedrich Julius Rosenbach cultiva le staphylocoque *in vitro* et en décrivit deux premières espèces, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus albus* (aujourd'hui *S. epidermidis*), différenciées par la couleur des colonies obtenues, respectivement dorées et blanches. La pigmentation jaune des colonies de *S. aureus* s'explique par la production de la staphyloxanthine, caroténoïde lié à la membrane (Thomer *et al.*, 2016).

S. aureus est une bactérie au pouvoir infectieux élevé, du genre *Staphylococcus* et de la famille des *Staphylococcaceae*. Pour plus de précision taxonomique, le genre *Staphylococcus* appartient au règne des Procaryotes, à la division des Firmicutes, classe des Bacilli, ordre des Bacillales. De nos jours, plus de cinquante espèces et sous-espèces sont classées dans le genre *Staphylococcus*. Toutes ces espèces ont en commun un métabolisme aéro-anaérobie facultatif, un contenu en guanine et cytosine (%GC) entre 30 et 39 %, une paroi contenant un peptidoglycane (PG) protégeant *S. aureus* d'un choc osmotique et des acides teichoïques jouant un rôle dans l'acquisition de métaux par *S. aureus* (Le Loir & Gautier, 2010).

2. Caractéristiques morphologiques et biochimiques de S. aureus

S. aureus est une bactérie immobile, à coloration de Gram positive, sous forme de coques de 0,8 à 1 µm de diamètre, isolés ou en amas (**Figure 1**). Cultivé en milieu solide, *S. aureus* produit des colonies rondes et lisses de 1 à 3 mm de diamètre.



Figure 1 : Visualisation de *S. aureus* en microscopie à balayage à différents grossissements (x3000 à x40 000). (Adaptée de Merghni *et al.*, 2017)

La plupart des souches de *S. aureus* possèdent une capsule polysaccharidique, dont la synthèse est hautement régulée et qui leur assure une protection lors de certaines conditions environnementales (Lei & Lee, 2015 ; 2018). *S. aureus* est halophile et mésophile avec des conditions de croissance optimales entre 30 et 37 °C à pH 7,0-7,5. Cependant, c'est une bactérie capable de s'adapter à des environnements divers, comme des gammes de températures allant de 7 à 48,5 °C, de pH allant de 4 à 10 (Valero *et al.*, 2009) ou un milieu contenant une concentration jusqu'à 2 M de NaCl (Price-Whelan *et al.*, 2013).

Le métabolisme de *S. aureus* est de type aéro-anaérobie facultatif avec production de la catalase et absence de l'oxydase. Parmi les deux espèces de staphylocoques pouvant coloniser l'Homme, *S. aureus* se distingue par sa capacité à sécréter une coagulase lui conférant un caractère pathogène supérieur à *S. epidermidis* (Cheng *et al.*, 2010). C'est une protéine extracellulaire qui se lie à la prothrombine de l'hôte, entraînant la transformation du fibrinogène en fibrine et donc la coagulation du sang. En clinique, la recherche de la coagulase est un critère permettant la distinction de souches potentiellement pathogènes.

L'identification de *S. aureus* en tant qu'espèce peut reposer à la fois sur des critères morphologiques, biochimiques et moléculaires, depuis le développement des méthodes basées sur l'amplification d'ADN ou le séquençage. De plus, le séquençage du génome entier de

souches de *S. aureus* a permis de mettre en lumière la grande variabilité génomique présente au sein de cette espèce.

3. Le génome de S. aureus

3.1. Caractéristiques et définitions

De manière générale, le génome de *S. aureus* est composé d'un seul chromosome variant de 2,7 à 2,9 millions de paires de base, avec un %GC d'environ 33 % (donc riche en adénines et thymines). Depuis l'avènement du séquençage à l'échelle génomique, de nombreuses souches de *S. aureus* ont été séquencées, les premières furent N315 et Mu50 en 2001 (Kuroda *et al.*, 2001 ; **Figure 2**). A l'heure actuelle, plus de 300 génomes publiés de *S. aureus* sont complets et annotés soulignant la diversité génétique de ce pathogène (Source NCBI : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/154).



Figure 2 : Représentation schématique du génome de S. aureus N315 (Kuroda et al., 2001).

Le génome de S. aureus ne peut pas se résumer à celui de certaines souches appartenant à cette espèce car un pourcentage significatif du génome est souche-spécifique. Pour englober le répertoire de gènes d'une espèce, le concept de pan-génome a été défini comme la somme du core génome et du génome accessoire (Tettelin et al., 2008). Ainsi, le pan-génome de S. aureus regroupe environ 7500 gènes dont approximativement 1500 appartiennent au core génome (Bosi et al., 2016). Celui-ci regroupe tous les gènes conservés au sein d'une espèce encodant les fonctions de base pour la croissance de la bactérie comme son métabolisme et la synthèse des acides nucléiques (Lindsay & Holden, 2004). Certains facteurs de virulence propres à S. aureus, comme les gènes permettant la biosynthèse de la capsule font également parti du core génome (Lindsay & Holden, 2004). Le restant du génome est variable, composé de gènes dits accessoires que les bactéries acquièrent par transferts horizontaux d'éléments génétiques mobiles (EGM). Ce sont les EGM qui participent le plus à la diversité génétique de l'espèce S. aureus, conférant un avantage sélectif aux souches qui les possèdent, comme la résistance aux antibiotiques, la résistance aux stress environnementaux ou la capacité de coloniser de nouveaux hôtes (Bosi et al., 2016). De nombreux facteurs de virulence sont sur des EGM et leur transfert horizontal au sein de l'espèce entraîne une augmentation de la pathogénicité des souches de S. aureus (Fitzgerald, 2014).

3.2. Les éléments génétiques mobiles présents chez S. aureus

S. aureus possède dans son génome plusieurs types d'EGM : les plasmides, prophages, îlots de pathogénie, transposons (Tn) ou séquences d'insertions (IS) et les cassettes chromosomiques (Staphylococcal chromosome cassette, SCC ; Malachowa & DeLeo, 2010).

➢ Les plasmides sont des éléments génétiques constitués d'ADN double brin circulaire capable de se répliquer de manière autonome. Chez *S. aureus*, il existe aussi des plasmides conjugatifs encodant de multiples gènes de résistance aux antibiotiques comme le plasmide pSK41 (Berg *et al.*, 1998). Les plasmides peuvent aussi être le support génétique de gènes de virulence comme pETB, codant la toxine exfoliative ETB impliquée dans le syndrome de la peau ébouillantée (Staphylococcal Scalded Skin Syndrom, SSSS ; Yamaguchi *et al.*, 2001).

≻ Les prophages résultent de l'intégration de l'ADN d'un bactériophage dans le génome bactérien. Cette intégration peut avoir un impact positif ou négatif sur l'expression des gènes bactériens. Par exemple, le gène codant la β-hémolysine est inactivé par l'intégration des phages Φ Sa3 ou Φ 13 (Goerke *et al.*, 2009). Les prophages sont répliqués en même temps que le chromosome bactérien et transmis verticalement. Ils contiennent souvent des gènes conférant un avantage sélectif aux bactéries qui les portent dans leur génome tels que l'échappement au système immunitaire (Van Wamel *et al.*, 2006) et la production de toxines comme les entérotoxines et la toxine exfoliative ETA (Botka *et al.*, 2015).

≻ Les îlots de pathogénie de *S. aureus* (SaPIs) sont des EGM de 14-17 kb, encodant de nombreux gènes de virulence dont les gènes codant pour les entérotoxines-B ou la toxine du syndrome de choc toxique staphylococcique TSST-1 (Malachowa & DeLeo, 2010 ; Yarwood *et al.*, 2002). Dans une revue en 2010, Novick *et al.* ont décrit 17 SaPIs chez *S. aureus* qui partagent des gènes conservés codant pour une intégrase (*int*), une excisionase (*xis*), une protéine régulatrice de la réplication (*rep*) et une terminase (*terS*). Les SaPIs sont des EGM intégrés au niveau de sites spécifiques du chromosome nommés *attS* et sont mobilisables via des bactériophages ou prophages endogènes dits « helper » comme le phage 80α qui induit l'excision, la circularisation et le transfert de SaPI1 à d'autres staphylocoques (Novick *et al.*, 2010).

> Les îlots génomiques de *S. aureus* sont classés en trois familles : vSaα, vSaβ et vSaγ. Ils sont flanqués d'une transposase inactive et d'un système de restriction/modification incomplet. Ils ont un %GC différent du reste du génome suggérant leur acquisition par transfert horizontal de gènes (Malachowa & DeLeo, 2010). En effet, vSaα encode un cluster de gènes *lpl* codant pour des lipoprotéines et des gènes *ssl* (staphylococcal superantigen-like) impliqués dans l'échappement au système immunitaire (Lina *et al.*, 2004).

➤ Les transposons (Tn) et séquences d'insertions (IS) sont largement retrouvés dans le génome de S. aureus, parfois en multiples copies, sur le chromosome ou en association avec d'autres EGM comme des plasmides ou des prophages. Les IS sont souvent associées aux transposons et leur insertion au niveau des loci peut provoquer des changements dans l'expression de gènes du core génome (Fiandt *et al.*, 1972; Jansen *et al.*, 2007). Les Tn

encodent souvent des gènes de résistance aux antibiotiques et la transposase assure leur réplication et intégration dans un ADN étranger (Firth *et al.*, 2018).

≻ Les staphylococcal chromosome cassettes (SCCs) sont de grands fragments d'ADN toujours intégrés au niveau du chromosome de *S. aureus* dans le gène *orfX*, codant pour une méthyltransférase (Boundy *et al.*, 2013). Les SCCs encodent des gènes de résistance aux antibiotiques ou de virulence et sont divisées en deux catégories selon la présence du gène de résistance à la méticilline *mec*, SCCmec *versus* non-SCCmec (Malachowa & DeLeo, 2010). Les SCCs ne sont pas autonomes pour leur réplication et les protéines codées par les gènes *ccrA*, *ccrB* et *ccrC* permettent leur excision et intégration au niveau d'un site spécifique nommé *att*B_{SCC}, proche de l'origine de réplication du chromosome bactérien (Gill *et al.*, 2005 ; Firth *et al.*, 2018).

Chez *S. aureus*, le transfert horizontal de ces EGM d'une bactérie à une autre peut s'effectuer par transduction, conjugaison ou transformation (Lindsay, 2014 ; **Figure 3**). Lors de la transduction, des dommages à l'ADN causés par les UV ou un antibiotique vont provoquer la reprise du cycle lytique d'un prophage. Le prophage peut alors déclencher l'encapsidation de séquences d'ADN bactérien qui sont alors transférées horizontalement à une autre bactérie. On peut citer le cas des SaPIs qui sont d'anciens prophages ayant perdus les gènes permettant le cycle lytique (Novick *et al.*, 2010). La transduction généralisée, comme avec les phages Φ 11 ou Φ 80, est la méthode majeure de transfert d'ADN entre bactéries chez *S. aureus*. Φ 11 est capable d'encapsider 45 kb du génome de son hôte qui peuvent être intégrées au génome d'une autre bactérie par recombinaison homologue (Maslanova *et al.*, 2013). La conjugaison nécessite que la bactérie donatrice possède un élément conjugatif et la machinerie de conjugaison pour transmettre un plasmide ou un transposon à une bactérie réceptrice. C'est un mode de transfert horizontal de gènes mineur chez *S. aureus*. Ensuite, pour la transformation, les bactéries rendues compétentes peuvent assimiler de l'ADN libre de l'environnement.



Figure 3 : Mécanismes d'acquisition d'EGM chez S. aureus par transfert horizontal de gènes.

La richesse de son core génome et la grande diversité d'EGM présents dans les génomes des souches de *S. aureus* mettent en avant l'importante plasticité génomique de ce pathogène qui lui permet d'acquérir et de conserver des gènes pour s'adapter à de nombreuses conditions environnementales et à de nombreux hôtes.

4. S. aureus : bactérie commensale et pathogène

4.1. Habitat de S. aureus

S. aureus appartient à la flore commensale normale de l'Homme et des animaux à sang chaud. C'est une bactérie qui semble capable de coloniser tous les mammifères, ce qui la distingue parmi les staphylocoques. S. *aureus* colonise les muqueuses, la surface et les glandes de la peau et principalement les muqueuses nasales chez environ 20-30 % de la population humaine (Van Belkum *et al.*, 2009). La colonisation des muqueuses par *S. aureus* est généralement asymptomatique mais permet une dissémination importante de la bactérie notamment via les aérosols libérés lors d'un éternuement. Le portage de *S. aureus* dans les fosses nasales augmente fortement la probabilité de développer une infection, la bactérie commensale devient alors pathogène opportuniste (Wertheim *et al.*, 2005). Cependant, il a été

montré que les non porteurs développant une infection nosocomiale présentent un taux de mortalité supérieur aux porteurs lors d'une bactériémie (Wertheim *et al.*, 2004). Le porteur a une réponse immunitaire permanente vis-à-vis de *S. aureus* et paraît plus à même de se défendre au moment d'une infection. De plus, *S. aureus* résiste bien dans l'environnement sur des sols inertes et dans la poussière, en attente d'un nouvel hôte.

4.2 Diversité des infections à S. aureus

S. aureus est aussi un pathogène responsable d'un spectre d'infections très varié à la fois en termes de symptômes et de gravité (**Figure 4**).



Figure 4 : Diversité des infections à S. aureus.

On distingue les toxi-infections alimentaires à staphylocoques, les infections suppuratives et les syndromes toxiniques. Les toxi-infections alimentaires à staphylocoques sont dues à l'ingestion d'aliments contaminés par des entérotoxines produites par *S. aureus*. En majorité, les symptômes régressent de manière spontanée dans les 24 h sans besoin de recourir à un

traitement spécifique. En France, l'institut de veille sanitaire (InVS) recensait 1310 foyers de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) en 2017 soit 13 010 cas dont 2060 où *S. aureus* était l'agent infectieux suspecté/confirmé.

La physiopathologie des infections suppuratives est liée à la multiplication des bactéries chez l'hôte et à l'expression de facteurs de virulence responsables de l'invasion et de la destruction des tissus. Les infections cutanées comme les impétigos, les furoncles et les infections des tissus mous (SSTI pour Skin and Soft Tissues Infections) sont généralement bénignes et se manifestent par des exsudats purulents drainés à partir du site de l'infection (Thomer *et al.*, 2016). Dans le cas des SSTI, l'infection ne permet pas de développer une réponse immunitaire protectrice et environ 20 % des patients ayant suivi une antibiothérapie vont développer des infections récurrentes à la même souche de *S. aureus* (Thomer *et al.*, 2011). Parmi les infections suppuratives, on compte aussi les ostéomyélites qui sont souvent des infections difficiles à traiter notamment par un problème de diffusion des antibiotiques jusqu'au site d'infection. Les infections suppuratives locales peuvent être le point de départ d'une bactériémie, c'est-à-dire le développement de bactéries dans le système sanguin. Le taux de mortalité des patients avec bactériémie varie selon le foyer initial de l'infection et l'évolution possible en choc septique (Tong *et al.*, 2015).

S. aureus a acquis de nombreux facteurs de virulence au cours de son évolution et il peut aussi être l'agent étiologique de syndromes toxiniques, où la production de toxines est majoritairement responsable des signes cliniques retrouvés chez l'hôte. Le syndrome de choc toxique staphylococcique et le syndrome d'exfoliation généralisée (SSSS) appartiennent à cette catégorie d'infections. Ces pathologies sont liées à l'action de toxines dites « superantigènes » (SAgs), toxine du choc toxique staphylococcique TSST-1 et toxines épidermolytiques ETA ou ETB respectivement, qui vont aller stimuler de manière excessive le système immunitaire (Tong *et al.*, 2015).

En plus d'infections communautaires, *S. aureus* pose un problème majeur de santé publique car c'est également la seconde source d'infections nosocomiales en France avec 16 % des cas, derrière *Escherichia coli* (*E. coli*). Les infections nosocomiales font parties des infections associées aux soins, contractées au cours d'une hospitalisation et se déclarant au minimum 48 heures après l'admission. Ces infections sont fréquemment liées à des interventions invasives. Par ordre décroissant du nombre de cas, on retrouve le plus souvent des infections urinaires, puis des infections de la peau et des tissus mous, des pneumonies, des

infections du site opératoire et les bactériémies/septicémies (Source INSERM : https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/infections-nosocomiales). De plus, une étude rétrospective française a démontré que les infections à staphylocoques engendraient environ 22 jours d'hospitalisation supplémentaires par patient ainsi qu'une augmentation significative de son coût, dans le cas de chirurgies cardio-thoraciques et orthopédiques (Schmidt *et al.*, 2015). Pour limiter ces risques d'infections associées aux soins, il est recommandé de réaliser la décolonisation des personnes porteuses de *S. aureus* avec de la mupirocine avant une chirurgie cardio-thoracique ou orthopédique (Allegranzi *et al.*, 2016). La mupirocine est un analogue de l'isoleucine qui inhibe l'élongation de la traduction par compétition sélective sur l'isoleucyl-ARNt synthétase (Le Loir & Gautier, 2010).

Du fait de la diversité et la gravité des infections qu'il peut provoquer, *S. aureus* est un pathogène humain majeur développant à la fois des infections d'origine communautaire ou associée aux soins. Son portage dans les fosses nasales est le facteur de risque le plus important pour l'initiation d'une infection. De plus, la gravité des infections à *S. aureus* est exacerbée par l'expression de facteurs de virulence par la bactérie.

B. Les facteurs de virulence de S. aureus

La pathogénie de *S. aureus* repose principalement sur la production d'un arsenal varié de facteurs de virulence. Ceux-ci peuvent être définis comme des molécules qui augmentent le potentiel d'un pathogène à provoquer une maladie au sens large du terme. Ces facteurs de virulence, pour la plupart encodés par des EGM comme les plasmides ou les prophages, peuvent être transférés entre souches par transfert horizontal de gènes, facilitant la propagation de ces facteurs de virulence au sein de l'espèce *S. aureus* (Otto, 2014).

1. Les facteurs d'adhésion et de colonisation

L'adhésion constitue l'étape initiale d'une infection et *S. aureus* possède des protéines de surface qui ont la capacité de se fixer par liaison covalente sur les molécules de l'hôte ou à des surfaces inertes type cathéter, ce sont des adhésines. Le génome de *S. aureus* encode de

nombreuses adhésines regroupées dans deux familles : les adhésines associées au PG de la bactérie par liaison covalente nommées protéines CWA (Cell Wall-Anchored Proteins) et les adhésines sécrétées appelées SERAM (Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules) (Paharik & Horswill, 2016).

Les adhésines CWA de S. aureus sont classées en différents groupes selon la présence de certains motifs structuraux. On distingue notamment les MSCRAMM (Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules), les protéines avec un motif NEAT et les protéines avec un motif répété de cinq résidus Glycine (G5-E) (Foster et al., 2014). Selon la définition proposée en 2014 par Foster et al., les MSCRAMM sont des adhésines dont la structure comporte au moins deux repliements « IgG-like » permettant leur attachement aux composants de la matrice extracellulaire de l'hôte tels que le fibrinogène, la fibronectine et le collagène. Les MSCRAMM de S. aureus comprennent la famille des protéines Clf-Sdr (ClfA, ClfB, SdrC, SdrD, SdrE), les FnBPs (Fibronectin-binding proteins) et la protéine CNA (collagen adhesion). Les MSCRAMM emploient un mécanisme commun pour se fixer à leur ligand, appelé « Dock, lock and latch » (DLL). Le ligand se fixe dans un premier temps à sa protéine MSCRAMM dont la structure est « ouverte ». Cette fixation engendre un changement de conformation du MSCRAMM vers une structure dite « fermée » qui va emprisonner le ligand (Foster et al., 2014). L'adhésion et l'internalisation de S. aureus dans les cellules de l'hôte (cellules épithéliales, ostéoblastes et kératinocytes) sont principalement médiées par les deux isoformes FnBPA et FnBPB, capables de se lier au fibrinogène, à l'élastine et à la fibronectine. La liaison des FnBPs à la fibronectine permet l'adhésion et l'internalisation de S. aureus via une interaction avec les récepteurs cellulaires, intégrines $\alpha 5\beta 1$ (Figure 5). Les FnBPs peuvent également se lier directement au récepteur Hsp60 (Josse et al., 2017 ; Figure 5). In vivo, la délétion de chaque FnBP atténue la capacité de S. aureus à coloniser le rein et à induire un sepsis fatal chez la souris (Shinji et al., 2011). L'adhésion de S. aureus aux cellules de l'hôte peut également faire intervenir d'autres MSCRAMM telles que SdrD qui se fixe directement à la Desmogléine-1 des kératinocytes et des cellules nasales, ClfA qui se fixe à l'Annexine-2 ou via le fibrinogène au récepteur $\alpha V\beta 3$ des cellules endothéliales (Figure 5). Cette liaison au fibrinogène favorise l'agrégation plaquettaire et la formation d'abcès impliqués dans les lésions thromboemboliques du cœur lors du sepsis (Malachowa *et al.*, 2016).

La famille des protéines comportant une structure avec à un motif NEAT regroupe les protéines Isd (Iron-regulated Surface Determinants). Ces adhésines CWA ont pour ligand l'hème ou l'hémoglobine et permettent l'adaptation de la bactérie dans un environnement pauvre en fer. Dans cette famille de protéines, IsdA est la plus abondante chez *S. aureus* et se fixe à l'hème, au fibrinogène et la fibronectine avec son motif NEAT et participe à l'échappement du système immunitaire notamment (Paharik & Horwill, 2016). De plus, il a été démontré dans un modèle murin de septicémie à *S. aureus* que l'expression de *isdB* variait selon l'organe dans lequel était localisé *S. aureus* et que IsdB était requise pour la colonisation du cœur (Pishchany *et al.*, 2009).

Les adhésines CWA de *S. aureus* comptent également la protéine SasG qui appartient à la famille des protéines au motif répété G5-E, nommée ainsi du fait de la conservation de 5 résidus Glycine dans les motifs répétés. SasG participe à l'adhésion de *S. aureus* aux cellules épithéliales des surfaces nasales antérieures mais son ligand demeure à identifier (Krismer *et al.*, 2017 ; **Figure 5**).



Figure 5 : Représentation schématique des mécanismes d'adhésion de *S. aureus* aux cellules de l'hôte impliquant des protéines CWA.

> Les SERAM sont des protéines sécrétées par S. aureus favorisant l'adhésion des bactéries à des molécules ou aux cellules de l'hôte, qui interagissent avec un large spectre de ligands et participent notamment à l'échappement aux défenses de l'hôte. Deux SERAM, la protéine Eap (Extracellular adherence protein) et la protéine Emp (Extracellular matrix binding protein) sont impliquées dans la formation de biofilm (Paharik & Horswill, 2016 ; Yonemoto et al., 2019). Eap est une adhésine sécrétée participant à l'adhésion de S. aureus à la matrice extracellulaire en se liant à différents ligands tels que le fibrinogène, la fibronectine, la vitronectine et la thrombospondine-1 avec différentes affinités. Les études semblent montrer que Eap favorise l'adhésion et l'internalisation de S. aureus aux fibroblastes et cellules épithéliales dans un contexte d'infection cutanée polymicrobienne (Bur et al., 2013). Emp peut se lier aux protéines de la matrice extracellulaire et au fibrinogène (Paharik & Horswill, 2016). Efb (Extracellular fibrinogen binding protein) et la coagulase sont aussi des SERAM. Efb se lie à la molécule C3 du complément empêchant l'opsonisation des bactéries (Ko et al., 2013 ; 2016), et se lie aussi aux plaquettes directement ou via le fibrinogène (Posner et al., 2016). Les SERAM possèdent donc des propriétés d'adhésion, immuno-modulatrices et participent activement à la pathogénie des infections endo- et extravasculaires.

2. Les facteurs d'invasion et de destruction des tissus

Les facteurs d'invasion et de destruction des tissus sont des toxines ou des enzymes sécrétées par *S. aureus*, capables d'affecter directement les cellules de l'hôte (Otto, 2014). Parmi les toxines, il existe des toxines provoquant des dommages membranaires (membranedamaging toxins), des toxines dégradant les molécules de l'hôte comme les toxines exfoliatives (ET) ou des toxines affectant de manière importante les défenses de l'hôte, les SAgs.

2.1. Les toxines formant des pores

Les toxines créant des dommages membranaires, ou PFTs (Pore Forming Toxins), provoquent la formation de pores dans les membranes conduisant à l'efflux de molécules vitales. Cette libération de molécules, médiée par ces toxines cytolytiques, constitue une source

de nutriments favorisant la croissance de *S. aureus* au sein de l'organisme infecté. Les PFTs se divisent en deux catégories et leurs modes d'action sont schématisés en **Figure 6 A et B**.

➢ Parmi les PFTs récepteur-dépendantes, les toxines ciblant les globules rouges sont les hémolysines alors que celles ciblant les globules blancs sont les leucotoxines (Otto, 2014). La PFT la plus connue est l'α-hémolysine, produite par 80 à 90 % des souches de *S. aureus* et encodée par le gène *hla*. Elle possède une structure à feuillet β et a pour récepteur ADAM-10, auquel elle est capable de se fixer sous la forme d'un monomère sécrété. Le récepteur ADAM-10 est présent à la membrane des cellules épithéliales, endothéliales, des globules rouges et des cellules immunitaires, excepté les neutrophiles (Inoshima *et al.*, 2011 ; Berube & Bubeck Wardenburg, 2013). Cette fixation favorise l'oligomérisation heptamérique de l'α-hémolysine et son incorporation dans la membrane cellulaire pour former un pore responsable de la lyse cellulaire. Plus récemment, il a été démontré que l'intégrine β1 à la surface des mastocytes et que cette dernière favorisait l'internalisation et donc la survie de *S. aureus* dans l'échappement au système immunitaire et dans la dissémination de *S. aureus* dans l'organisme via son activité lytique (Figure 6 A).

S. aureus produit également des toxines à deux composants dont la structure est similaire à l' α -hémolysine et qui sont également des toxines à feuillet β : la leucocidine de Panton-Valentine (PVL), les leucocidines LukAB et LukDE et la γ -toxine (γ -hémolysine = HlgA, HlgB ou HlgC). Ce sont des toxines constituées de deux composants protéiques, une sous-unité S qui confèrent la spécificité de liaison aux récepteurs cellulaires et une sous-unité F, dont l'oligomérisation induit la formation d'un pore actif (Otto, 2014 ; **Figure 6 B**). La découverte de leurs récepteurs respectifs, C5aR pour la PVL, C5L2 et CD11b pour LukAB et CCR5 pour LukDE, explique la spécificité des cellules ciblées par ces toxines à deux composants de *S. aureus* (Löffler *et al.*, 2010 ; Spaan *et al.*, 2013a ; DuMont *et al.*, 2013 ; Alonzo III *et al.*, 2013). Ces leucotoxines lysent surtout des cellules de l'immunité favorisant leur apoptose et permettant l'échappement de *S. aureus* au système immunitaire.

> Les PFTs récepteur-indépendantes comprennent notamment la famille des Phenol-Soluble Modulins (PSMs). Ce sont de petits peptides amphipathiques, α -hélicoïdaux avec des

propriétés détergentes capables de former des pores transitoires dans les membranes des cellules cibles (**Figure 6 C**). Les PSMs, par leurs propriétés physico-chimiques, ont été démontrées comme essentielles à la structuration des biofilms formés par *S. aureus*, ainsi qu'à l'étape de détachement permettant la dissémination des bactéries (Periasamy *et al.*, 2012). *In vivo*, les PSM α sont impliquées dans le développement d'infections cutanées et de bactériémie à *S. aureus* chez la souris contrairement aux PSM β et la δ -hémolysine (Wang *et al.*, 2007). Les PSM α 1-4 encodés par le locus *psma* (surtout PSM α 3) sont fortement cytolytiques et des études récentes ont montré leur contribution dans la lyse des neutrophiles après phagocytose de souches de *S. aureus* particulièrement virulentes comme des isolats d'origine communautaire et résistants à la méticilline (Surewaard *et al.*, 2013 ; Oliveira *et al.*, 2018). Cependant, il a été montré que tous les PSM α participent activement à l'échappement de *S. aureus* au système immunitaire en favorisant sa sortie du phagolysosome. Elles participent également à la dissémination de l'infection en permettant la sortie de *S. aureus* des phagocytes et des cellules épithéliales et endothéliales (Grosz *et al.*, 2014 ; Munzenmayer *et al.*, 2016).



Figure 6 : Les modes d'action des toxines formant des pores de *S. aureus*. A) mécanisme d'action de l' α -hémolysine. B) mécanisme d'action des leucotoxines. C) modèle de formation de pores par les PSMs.

2.2. Les toxines exfoliatives

Les épidermolysines (toxines exfoliatives = ETs) sont des sérine-protéases très spécifiques qui hydrolysent les cadhérines desmosomales de la couche superficielle de la peau, notamment la Desmogléine-1 des kératinocytes. Les ETs sont responsables du syndrome de la peau ébouillantée lié à *S. aureus* (SSSS) qui touche particulièrement les enfants du fait de leur système immunitaire immature et d'une faible clairance rénale des toxines. Ce syndrome provoque la chute de la couche superficielle de la peau, une déshydratation et des infections secondaires. Trois sérotypes d'ETs (ETA, ETB et ETD) sont impliqués dans le SSSS chez l'Homme et les gènes encodant ces toxines sont tous situés sur des EGM (Bukowski *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2018).

2.3. Les enzymes sécrétées par S. aureus

Le pathogène *S. aureus* sécrète aussi des enzymes qui lui permettent d'envahir et de détruire les tissus de l'hôte. Parmi ces enzymes, on trouve des protéases non spécifiques qui dégradent les protéines de l'hôte et conduisent donc à la destruction des tissus (Otto, 2014). La β -toxine est une toxine avec une activité enzymatique sphingomyélinase lui permettant de dégrader la sphingomyéline présente à la surface des cellules de l'hôte. Cependant, le gène encodant cette toxine à activité enzymatique est interrompu par l'insertion d'un îlot de pathogénie chez de nombreuses souches virulentes de *S. aureus*, elle n'est donc pas considérée comme un facteur de virulence majeur. *S. aureus* produit également des lipases et des nucléases, ces dernières seraient impliquées dans l'échappement à l'activité antimicrobienne de pièges tendus par les neutrophiles, appelés NETs (Neutrophil Extracellular Traps), et constitués d'ADN extracellulaire (Otto, 2014). Il existe encore de nombreuses enzymes sécrétées par *S. aureus*, mais leur fonction est directement liée à l'échappement au système immunitaire de l'hôte, comme la coagulase, l'auréolysine ou la staphylokinase qui a une double fonction puisque qu'elle permet aussi la pénétration de *S. aureus* à travers la peau (Kwiecinski *et al.*, 2014).

3. Les facteurs d'échappement au système immunitaire

Plus de 30 toxines superantigènes (SAgs) ont été décrites chez S. aureus comme facteurs d'échappement au système immunitaire de l'hôte. La toxine TSST-1 et les entérotoxines SEA et SEB (Staphylococcal Enterotoxins) sont les SAgs les plus puissants. Elles provoquent l'activation et la prolifération polyclonale des lymphocytes T par interaction non spécifique entre la molécule de complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II des cellules présentatrices d'antigènes et la région Vβ du récepteur TCR (T-Cell Receptor) des lymphocytes T (Otto, 2014; Figure 7). De même, une production massive de cytokines/chimiokines proinflammatoires interleukine-1 β (IL-1 β), interleukine-2 (IL-2), interféron- γ (IFN- γ) et facteur de nécrose tumorale a (TNFa) est observée en présence de ces SAgs ce qui résulte en une activation des monocytes/macrophages, neutrophiles et des lymphocytes T pouvant conduire à leur apoptose (Oliveira et al., 2018 ; Figure 7). Cette stimulation disproportionnée et continue du système immunitaire va donc générer d'importants dégâts chez l'hôte. En effet, le TNF α et l'IL-1β sont notamment des médiateurs directs de la fièvre, de l'inflammation, de l'hypotension et du choc septique. Les cellules de l'hôte activées par un SAg peuvent également produire des espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species, ROS) et des métalloprotéinases de matrice (MMP) conduisant à une augmentation de la perméabilité vasculaire et des lésions tissulaires responsables de défaillance multi-organes.



Figure 7 : Mécanisme d'action des toxines superantigènes.

C. S. aureus et adaptation aux stress environnementaux

S. aureus est une bactérie qui résiste bien dans l'environnement sur des sols inertes et dans la poussière, en attente d'un nouvel hôte. Capable de résister à des stress comme la dessiccation, un stress osmotique et la carence nutritive, *S. aureus* est ubiquitaire et se maintient dans des environnements très variés, ce qui est problématique dans l'environnement hospitalier ou agro-alimentaire (Clements & Foster, 1999).

Au cours de l'infection, *S. aureus* subit de nombreux stress, notamment à l'intérieur du phagolysosome qui possède un pH acide de 4,5 avec présence de ROS comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et l'oxyde nitrique (NO) par exemple (Horn *et al.*, 2018). Face à ce « burst oxydatif », *S. aureus* a développé des stratégies de lutte pour résister, notamment en produisant des enzymes comme la catalase, la réductase et la superoxyde dismutase (SOD) pour détoxifier les ROS (Fraunholz & Sinha, 2012 ; Horn *et al.*, 2018 ; **Figure 8.1**). Afin de s'adapter au stress exercer par le système immunitaire, *S. aureus* a aussi développé des mécanismes de résistance aux molécules du complément. L'inhibition de la prise en charge de *S. aureus* par le complément est médiée notamment par la protéine SCIN (Staphylococcal Complement INhibitor) qui est un inhibiteur de la C3 convertase, la plasmine qui clive les molécules du complément par encombrement stérique et les CHIPS (CHemotaxis Inhibitory Protein of Staphylococci) rentrent en compétition avec le complément pour sa fixation sur leur récepteur au niveau des neutrophiles (Horn *et al.*, 2018 ; **Figure 8.2**).

In vivo, S. aureus est également soumis à l'assaut des peptides antimicrobiens (PAMs), composants de l'immunité innée. Ce sont des peptides qui endommagent les membranes bactériennes et qui entrainent l'expression de mécanismes de défense par les bactéries. Chez S. aureus, la résistance aux PAMs comprend la production de lysyl-phosphatidylglycérol, qui incorporé dans les membranes bactériennes, diminue la sensibilité de S. aureus aux PAMs, la D-alanylation des acides téichoïques pour diminuer l'attraction des PAMs par les surfaces bactériennes ou encore l'utilisation de transporteurs pour expulser les PAMs dans le milieu extracellulaire. S. aureus possède également des enzymes d'inactivation des PAMs comme DltA qui détourne les PAMs par répulsion électrostatique, la staphylokinase qui permet la dégradation des défensines ou encore l'enzyme OatA qui modifie le PG pour épaissir la paroi et mieux résister au lysozyme (Laarman et al., 2010 ; Dastgheyb & Otto ; Figure 8.3). De plus,

grâce à la coagulase sécrétée et à l'auréolysine inhibant les inhibiteurs de protéases, *S. aureus* détourne les mécanismes de la coagulation pour former un caillot sanguin protecteur via l'activation de la prothrombine et le clivage du fibrinogène en fibrine pour structurer le caillot (Cheng *et al.*, 2010 ; **Figure 8.4**).



Figure 8 : Représentation schématique des stratégies employées par *S. aureus* pour échapper au système immunitaire.

De plus, *S. aureus* résiste efficacement au stress acide avec la production d'enzymes de désacidification. La limitation en oxygène, la carence en fer et la carence nutritive sont des stress également rencontrés par *S. aureus* lors d'une infection ou de la colonisation d'une nouvelle niche écologique. Un pH acide et une carence nutritive sont spécifiquement rencontrés par *S. aureus* lorsqu'il colonise la peau de l'hôte. Comme *S. aureus* possède un métabolisme aéro-anaérobie facultatif, la transition du métabolisme vers la respiration anaérobie permet l'adaptation à une limitation en oxygène (Le Loir & Gautier, 2010). La réponse à une carence nutritive est complexe et fait intervenir de nombreux acteurs. Lors de la carence nutritive, la concentration de la molécule signal guanosine penta- ou tetra-phosphate (p)ppGpp produite par

l'enzyme RSH augmente, induisant une cascade de réactions dans le but d'activer l'expression de gènes de la biosynthèse des acides aminés notamment. Cette réponse mise en œuvre par les bactéries est appelée réponse stringente (Hauryliuk *et al.*, 2015). La réponse stringente est régulée par un régulateur transcriptionnel global nommé CodY qui réprime une centaine de gènes en absence de stress. CodY est activé par les acides aminés branchés tels l'isoleucine, la leucine et la valine et même le Guanosine-triphosphate (GTP). Leur fixation sur CodY augmente son affinité pour l'ADN et permet ainsi sa fixation au niveau d'un motif spécifique sur le promoteur des gènes qui seront réprimés. Une carence en acides aminés induit la levée de la répression par CodY et l'expression des gènes permettant l'adaptation à ce stress nutritif comme par exemple l'expression de transporteurs membranaires d'acides aminés (Hauryliuk *et al.*, 2015). Les moyens mis en œuvre par *S. aureus* pour s'adapter à des stress spécifiques sont regroupés dans le **Tableau 1.**

Stress	Moyens de résistance	Références
Espèces réactives de l'oxygène (ROS) : phagolysosome et compétition bactérienne	détoxification par superoxyde dismutase, catalase et réductase	Le Loir & Gautier, 2010
gradient en oxygène : agro-alimentaire, peau ou tissus/organes d'un hôte, biofilm	fermentation	Le Loir & Gautier, 2010
stress osmotique : agro- alimentaire, forte concentration en NaCl	accumulation molécules osmoprotectrices dont les ions K ⁺ , résistance mécanique par raccourcissement ponts interpeptidiques du PG	Le Loir & Gautier, 2010 ; Price-Whelan <i>et al.</i> , 2013
stress acide : estomac, peau, phagolysosome, agro-alimentaire avec bactéries lactiques	désacidification avec uréase, mécanismes de réparation des macromolécules par des chaperonnes	Le Loir & Gautier, 2010
stress thermique chaud	dégradation des protéines mal repliées avec protéase Clp, induction de chaperonnes pour maintenir la conformation des protéines	Le Loir & Gautier, 2010
stress thermique froid	induction protéase Clp, chaperonnes à ARN comme CspA pour défaire les structures secondaires	Le Loir & Gautier, 2010
carence en fer : contexte d'infection	captation du fer extérieur et transport dans la bactérie, production de lactate	Le Loir & Gautier, 2010
carence en acides aminés : niches écologiques pauvres en acides aminés libres	activation de la réponse stringente par accumulation de(p)ppGpp, de protéases et de transporteurs de peptides à vocation nutritionnelle Opp3 et DtpT	Le Loir & Gautier, 2010 ; Geiger <i>et al.</i> , 2012 ; Hauryliuk <i>et al.</i> , 2015

Tableau 1 : Adaptation de S. aureus aux stress environnementaux

D. S. aureus et adaptation aux antibiotiques

En plus de mesures d'hygiènes accrues, les infections à *S. aureus* nécessitent un traitement avec des antibiotiques. Ce sont majoritairement des substances hémi-synthétiques à activité antibactérienne, issues de la modification chimique de molécules naturelles produites par les microorganismes du sol. Les antibiotiques actifs sur *S. aureus* sont classés en cinq grandes familles selon leur mécanisme d'action (schématisées en **Figure 9**).



Figure 9 : Les modes d'action des principaux antibiotiques.

A doses thérapeutiques, les antibiotiques peuvent être bactériostatiques ou bactéricides. Si un antibiotique agit seulement en inhibant la croissance bactérienne sans perte de viabilité, il est bactériostatique. La bactériostase se mesure par la concentration minimale inhibitrice (CMI) qui est la plus faible concentration d'antibiotique inhibant la croissance bactérienne. Par opposition, un antibiotique bactéricide peut lui, à dose thérapeutique, provoquer la mort des bactéries. On peut alors déterminer la concentration minimale bactéricide (CMB), plus faible concentration permettant de tuer 99,99 % d'un inoculum bactérien (Le Loir & Gautier, 2010). Pour faire face au stress antibiotique, les souches de *S. aureus*, tout comme les autres espèces

bactériennes, ont mis en œuvre différentes stratégies allant de la résistance, la tolérance et la persistance aux antibiotiques.

1. La résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques est un terme utilisé pour décrire la capacité héritable d'un micro-organisme à continuer de croître à des concentrations élevées d'un ou de plusieurs antibiotiques. On a alors une augmentation de la CMI pour cet antibiotique chez la souche résistante par rapport à la souche sensible. Les mécanismes moléculaires de résistance aux antibiotiques sont variés et incluent des mutations de la cible, une activité enzymatique inactivant l'antibiotique ou l'efflux de l'antibiotique hors de la bactérie. La résistance à un antibiotique peut être naturelle ou acquise. Quelques antibiotiques n'ont aucune action sur *S. aureus*, comme l'aztréonam, les quinolones de première génération comme l'acide nalidixique, et des peptides cycliques (polymixine B par exemple). En revanche, la résistance acquise signifie que la bactérie a acquis un mécanisme de résistance dont le support génétique peut-être chromosomique (si mutations) ou porté par un EGM. De manière générale et pour toutes les classes d'antibiotiques, l'émergence de souches de *S. aureus* résistantes à un antibiotique s'effectue dans les années qui suivent l'introduction de cet antibiotique en thérapeutique (Le Loir & Gautier, 2010).

1.1. La résistance aux antibiotiques agissant sur la paroi et la membrane cytoplasmique

La résistance à la méticilline

Chez les staphylocoques, la paroi bactérienne est formée d'une épaisse couche de PG, structure réticulée de N-acétyl glucosamine, N-acétyl muramique et de tétrapeptides linéaires L-alanine-D-glutamine-L-lysine-D-alanine. La synthèse de la paroi est un phénomène continu chez les bactéries impliquant des réactions de transglycosylation et de transpeptidation. Les β -lactamines sont des antibiotiques bactéricides pour *S. aureus* comprenant les pénicillines, les céphalosporines et les carbapénèmes. Leurs cibles sont des enzymes impliquées dans les réactions de transglycosylation et transpeptidation, nommées protéines liant les pénicillines (PLP). Les β -lactamines inhibent la synthèse de la paroi via l'acylation des PLP essentielles à la survie de *S. aureus* (Bush & Bradford, 2016).
Après les débuts de l'utilisation de la pénicilline G contre les infections à S. aureus en 1940, des souches résistantes sont identifiées dès 1942. Ces isolats résistants portaient le gène blaZ codant pour une pénicillinase (ou β-lactamase) hydrolysant l'antibiotique (Peacock & Paterson, 2015). Comme le gène blaZ est sur un transposon plasmidique (Lyon & Skurray, 1987), celui-ci est maintenant présent dans plus de 90 % des isolats de S. aureus ce qui rend obsolète l'usage de la pénicilline. En réponse à l'émergence de ces souches résistantes, une pénicilline semi-synthétique et résistante à la pénicillinase, appelée méticilline, est utilisée à partir de 1959. Les premiers isolats résistants apparurent en 1960 au Royaume-Uni (Peacock & Paterson, 2015). La Figure 10 est une carte indiquant le pourcentage de souches de S. aureus à méticilline (SARM) Europe en 2017 résistantes la en (source ecdc : https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx). Contrairement aux Etats-Unis où la résistance à la méticilline pose un réel problème de santé publique, celle-ci diminue de manière significative en Europe depuis 2014 (ecdc, 2017).



Figure 10 : Pourcentage d'isolats invasifs de *S. aureus* résistants à la méticilline dans les pays européens en 2017 (ecdc).

La résistance à la méticilline résulte de l'utilisation par la bactérie d'une enzyme PBP (Penicillin-Binding Protein ou PLP) de moindre affinité pour l'antibiotique, la PBP2a, dont le mécanisme de résistance est schématisé en **Figure 11 A**. La PBP2a est codé par le gène *mecA*,

localisé sur le chromosome au sein d'un EGM, la SCCmec, absente chez les souches sensibles à la méticilline (Peacock & Paterson, 2015). En plus de *mecA*, deux autres gènes *mec* ont été identifiés, *mecB* et *mecC* (Liu *et al.*, 2016a). La transcription du gène *mec* est induite en présence de méticilline. La cassette SCCmec est de composition variable (11 types décrits à ce jour), comprenant un ou deux gènes codant une recombinase et les gènes de régulation *mecI*, *mecR1* et *mecA*. MecR1 est une protéine membranaire qui permet la transduction du signal détectant la présence de l'antibiotique alors que MecI est un répresseur de l'expression du gène *mec* en absence de méticilline (Liu *et al.*, 2016a). D'autres EGM peuvent également être incorporés dans la SCCmec, notamment le Tn554 contenant des gènes de résistance aux macrolides (Tillotson *et al.*, 1989).

La résistance à la vancomycine

Les glycopeptides, dont la vancomycine, ont également pour cible la paroi bactérienne mais de manière indirecte, en ciblant ses précurseurs. La vancomycine est un antibiotique capable de diffuser à travers la paroi des bactéries à Gram positif pour atteindre sa cible, le dipeptide D-Ala-D-Ala, à l'extrémité du PG. La vancomycine est une grosse molécule qui ne pénètre pas à l'intérieur du cytoplasme. Elle n'atteint sa cible que lorsque les dipeptides sont transloqués à la surface extérieure de la membrane bactérienne (Santos-Beneit *et al.*, 2017).

La vancomycine est un antibiotique utilisé dans le cas d'infections causées par des souches de *S. aureus* SARM. Son utilisation à l'échelle planétaire a exercé une pression de sélection sur *S. aureus* entraînant l'émergence de clones résistants. Cependant, en Europe, la résistance à la vancomycine n'est présente qu'à son niveau intermédiaire (VISA) et concerne moins de 1 % des souches hospitalières (Le Loir & Gautier, 2010). Les souches de *S. aureus* sont classées en trois catégories selon leur sensibilité à la vancomycine, reflétée par la détermination de la CMI. Ainsi, on distingue les *S. aureus* sensibles à la vancomycine (VSSA) avec une CMI < 2 mg/L, les staphylocoques avec une résistance intermédiaire à la vancomycine (VISA) avec une CMI comprise entre 4 et 8 mg/L et les souches résistantes à la vancomycine (VRSA) avec une CMI \geq 16 mg/L. Parmi les souches VISA, certaines expriment la résistance à la vancomycine de manière hétérogène, c'est-à-dire qu'une sous-population est résistante alors que la souche parentale est sensible. On parle alors de souches hétéro-VISA (hVISA ; Howden *et al.*, 2014). En 2014, Roch *et al.* ont démontré que l'exposition *in vitro* pendant 18 jours de souches SARM à des concentrations sub-inhibitrices des β -lactamines, ceftazidime, ceftriaxone et imipenem, induisait une résistance à la vancomycine h-VISA via le locus *trfA*

encodant un facteur de résistance aux glycopeptides dont le mécanisme d'action exact est encore inconnu (Roch *et al.*, 2014). L'expression de l'ARNm *trfA* est induite par les glycopeptides et le gène *trfA* de *S. aureus* est homologue au gène *mecA* de *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) impliqué dans la protéolyse et la compétence bactérienne (Jousselin *et al.*, 2013).

Deux mécanismes de résistance ont été identifiés chez les souches résistantes à la vancomycine, expliquant les différents phénotypes de résistance observés (**Figure 11 B**). La résistance VISA résulte d'une accumulation de mutations sous la pression de sélection antibiotique provoquant une anomalie dans la biosynthèse du PG avec surproduction de la cible D-Ala-D-Ala, présente en abondance dans la paroi (et non uniquement sur les précurseurs), ce qui bloque l'antibiotique dans le milieu extérieur (Courvalin, 2006). Le second mécanisme de résistance à l'origine de l'émergence des souches VRSA est plus rare car il s'agit de l'acquisition par *S. aureus* du Tn1546 présent chez les entérocoques et contenant un opéron de gènes de résistance avec *vanH* codant une déshydrogénase réduisant le pyruvate en lactate et *vanA* codant la ligase qui va aller lier le D-lactate au D-Ala (Clark *et al.*, 2005). Les glycopeptides n'ont qu'une affinité très faible pour ce nouveau précurseur d'où de fortes augmentations de la CMI.

La résistance à la daptomycine

Les lipopeptides, dont la daptomycine, sont des antibiotiques naturels produits par les Streptomyces. Ce sont des molécules comportant un cœur peptidique avec une queue lipidique. Bien que le mécanisme précis d'action de la daptomycine ne soit pas encore connu, sa cible est la membrane bactérienne où elle provoque une série de réactions entraînant la mort des bactéries. La daptomycine est chargée négativement et s'oligomérise avec les ions calcium pour former des micelles capables de pénétrer à travers la paroi et de se lier à la membrane cytoplasmique via le phospholipide anionique phosphatidylglycérol (Muraih *et al.*, 2011). Cette liaison à la membrane induit des dommages responsables d'une dépolarisation, d'une perméabilisation et d'une libération d'ions potassium, entraînant la mort de la bactérie (Miller *et al.*, 2016).

S. aureus emploie différentes stratégies pour résister à la daptomycine représentées en **Figure 11 C**. La plus commune est de charger positivement la membrane pour repousser l'antibiotique par répulsion électrostatique. Ce phénotype est associé à une mutation dans le gène mprF (multiple peptide resistance factor) encodant une « flippase » permettant

l'incorporation dans la paroi d'un lysyl-phosphatidylglycérol. Ces mutations ont pour conséquence la production par S. aureus d'un PG chargé positivement qui repousse la daptomycine (Miller et al., 2016). La surexpression de l'opéron dlt est également impliquée dans la résistance aux lipopeptides. Il encode les enzymes responsables de l'attachement de l'acide aminé alanine au niveau des acides téichoïques de la paroi qui est alors plus épaisse et avec une charge positive augmentée. Cependant, malgré la démonstration de l'implication des gènes mprF et dlt dans l'augmentation de la charge positive de la paroi, ces modifications génétiques ne sont pas corrélées avec une augmentation de la CMI pour la daptomycine chez toutes les souches (Miller et al., 2016). Une autre stratégie de résistance à la daptomycine a été mise en évidence, il s'agit de l'altération de la composition en phospholipides et de la fluidité de la membrane. Pour cela, des mutations présentes dans les gènes *pgsA* (enzyme de synthèse du phosphatidylglycérol) et cls2 (cardiolipine synthase) sont corrélées avec la résistance à la daptomycine. Des changements de la production de staphyloxanthine, responsable de la pigmentation dorée mais aussi impliquée dans la fluidité membranaire, sont observés chez des souches résistantes à la daptomycine (Miller et al., 2016). Enfin, la dernière stratégie mise en œuvre par S. aureus pour résister aux lipopeptides est le relargage de phospholipides membranaires, mais les acteurs moléculaires de ce mode de résistance ne sont pas encore connus (Pader et al., 2016).



Figure 11 : Mécanismes moléculaires de résistance de *S. aureus* à la méticilline, la vancomycine et la daptomycine.

1.2. Autres résistances aux antibiotiques de S. aureus

Sous la pression de sélection des antibiotiques et pour assurer sa survie, *S. aureus* a aussi acquis des mécanismes de résistance à tous les antibiotiques utilisés contre lui. Les résistances non développées dans la partie précédente de ce manuscrit sont évoquées dans le **Tableau 2**.

Antibiotiques	Cibles des antibiotiques	Support génétique de la résistance	Mécanismes de résistance	Références
Antibiotiques inhibant la biosynthèse des acides nucléiques				
Fluoroquinolones	ADN gyrase et Sous-unité C de la topo-isomérase IV (<i>parC</i>)	Chromosome : gènes <i>parC</i> et <i>norA/B/C</i>	Mutations dans <i>parC</i> entraînant une modification de la cible et efflux des antibiotiques avec les pompes NorA, NorB et NorC	Foster, 2017
Rifamycines	Sous-unité B de l'ARN polymérase (<i>rpoB</i>)	Chromosome : gène <i>rpoB</i>	Mutations sur le gène <i>rpoB</i> réduisant l'affinité de l'antibiotique pour la cible	Schmitz <i>et</i> <i>al.</i> , 2000
Association thriméthoprime et sulfamides	Métabolisme des folates par inhibition des enzymes dihydrofolate réductase DHFR et dihydroptéroate synthétase DHPS	Chromosome : gènes <i>dhfr</i> et <i>dhps</i> ; EGM : Tn4001 (<i>dfrA</i>), pKKS2187 (<i>dfrK</i>) et, Tn916-1545 (<i>dfrG</i>)	Mutations dans les gènes <i>dhfr</i> et <i>dhps</i> inhibant la fixation de l'antibiotique sur sa cible et enzymes DHFR résistantes encodées par les gènes <i>dfrA/K/G</i>	Foster, 2017 ; Kadlec & Schwarz, 2009 ; Haubert <i>et</i> <i>al.</i> , 2017
Antibiotic	ques ciblant la sous-i	unité 30S du ribosor	ne, inhibiteurs de la traduct	ion
Cyclines	Sous-unité 30S du ribosome	EGM : pT181 intégré dans la SSCmecIII (<i>tetK</i>), Tn916 (<i>tetO</i>) et Tn1545 (<i>tetM</i>)	Efflux actif par la pompe TetK/L et protection de la cible avec les protéines TetO/M pour expulser l'antibiotique du site A du ribosome	Foster, 2017
Aminoglycosides	Sous-unité 30S du ribosome	EGM : Tn4001 (<i>aacA-aphD</i>), Tn5405 (<i>aphA</i>), pUB110 intégré dans la SCCmecII (<i>aadD</i>)	Enzymes inactivant des aminoglycosides : Acétyltransférease- phosphotransferase (<i>aacA- aphD</i>), phosphotransférase (<i>aphA</i>), adényltransferase (<i>aadD</i>)	Le Loir & Gautier, 2010

Tableau 2 : Nombreuses résistances aux antibiotiques chez S. aureus

Antibiotiques	Cibles des antibiotiques	Support génétique de la résistance	Mécanismes de résistance	Références
	Antibiotiques	ciblant la sous-unité s	50S du ribosome	
Phénicolés	Sous-unité 50S du ribosome	EGM : plasmide (<i>cat</i>) ; chromosome : <i>norA</i>	inactivation de l'antibiotique par une chloramphénicol acétyltransférase CAT et efflux avec la pompe d'efflux multiple NorA	Le Loir & Gautier, 2010
Macrolides, Lincosamides, Synergystines (MLS)	Sous-unité 50S du ribosome	EGM : Tn554 (<i>ermA</i>) intégré dans les SCCmecII et III ; chromosome : <i>msrA</i>	Modification de la cible par méthylation de l'ARN ribosomique 23S (méthylation par enzyme Erm), efflux actif par la pompe MsrA	Oliveira <i>et</i> <i>al.</i> , 2002 ; Le Loir & Gautier, 2010
Oxazolidinones	Sous-unité 50S du ribosome	Chromosome : gène codant l'ARN ribosomique 23S ; EGM : plasmide codant une méthyltransférase (<i>cfr</i>)	Mutations sur le gène codant pour l'ARN ribosomique 23S, méthylation par l'enzyme Cfr et mutations sur les gènes des protéines ribosomales L3 et L4	Foster, 2017
Ant	ibiotiques ciblant	le facteur d'élongatio	n de la traduction EF-G	
Mupirocine	EF-G	Chromosome : gène de l'isoleucyl-ARNt synthétase (<i>ileS</i>) EGM : plasmide codant l'enzyme modifiée	Mutation dans le gène ileS ce qui modifie la cible, acquisition d'une isoleucyl-ARNt synthétase modifiée	Hurdle <i>et</i> <i>al.</i> , 2004, 2005
Acide fusidique	EF-G	Chromosome : gène fusA codant EF-G ; EGM : plasmide gène fusB	Mutation de la cible et acquisition d'une enzyme FusB libérant le ribosome de l'antibiotique	Foster, 2017
Antibiotique inhibant les étapes cytoplasmiques de la synthèse du peptidoglycane				
Fosfomycine	Enolpyruvyl- transférase	EGM : plasmide (fosB)	Dégradation de l'antibiotique par FosB	Le Loir & Gautier, 2010

Tableau 2 suite : Nombreuses résistances aux antibiotiques chez S. aureus

2. La tolérance aux antibiotiques

La tolérance aux antibiotiques est la capacité d'une population bactérienne dans sa globalité à survivre à une exposition transitoire à un antibiotique bactéricide, même de concentration supérieure à la CMI. Pour un antibiotique donné, la CMI demeure la même que pour les bactéries sensibles mais il faudra une durée de traitement plus longue pour obtenir la même mortalité bactérienne qu'avec une souche sensible (Brauner *et al.*, 2016). Un indicateur récemment décrit pour mesurer quantitativement la tolérance est la MDK (minimum duration for killing). Ainsi, la MDK₉₉ désigne la durée minimum de traitement requise pour tuer 99 % d'une population bactérienne. La valeur de MDK₉₉, déterminée à partir des courbes de survie permet de différencier les bactéries sensibles et tolérantes (**Figure 12 A**, Brauner *et al.*, 2016).

Deux principaux types de tolérance bactérienne ont été répertoriés : la tolérance par croissance lente et la tolérance par retard (par « lag »). Dans les deux cas, on observe une augmentation de la MDK par rapport à une souche sensible.

> La tolérance par croissance lente (Figure 12 B) implique la présence de conditions diminuant le taux de croissance des bactéries. Cette forme de tolérance peut être un caractère héritable ou non. Par exemple, *Mycobacterium tuberculosis (M. tuberculosis)* possède un taux de croissance 40 fois supérieur à *E. coli* ce qui augmente également sa MDK₉₉ pour un antibiotique donné d'un facteur 40 (Manina *et al.*, 2015). Lors de la tolérance par croissance lente, plus le temps de génération est élevé, plus la capacité d'un antibiotique à tuer 99 % des bactéries en un minimum de temps (MDK₉₉) sera réduite (Figure 12 B) (Brauner *et al.*, 2016).

≻ La tolérance par retard (« par lag ») est observée lorsque les bactéries ne sont pas en croissance. Le terme de « retard » désigne alors le temps pris par la population bactérienne pour atteindre la phase exponentielle en présence de conditions favorables à la reprise de la croissance (Brauner *et al.*, 2016). C'est donc un phénotype transitoire (Fridman *et al.*, 2014). Lors de la tolérance par retard, on a une répartition plus homogène des valeurs de MDK₉₉ en fonction du temps de génération des bactéries (**Figure 12 C**).



Figure 12 : La réponse aux antibiotiques des bactéries tolérantes. A) Représentation schématique de souches sensibles et tolérantes aux antibiotiques avec les indicateurs de CMI qui restent les mêmes et la MDK₉₉ qui est plus élevée chez les bactéries tolérantes. B) et C) Représentation de la MDK₉₉ en fonction du temps de génération lors de la tolérance par croissance lente (B) et tolérance par retard (C) (adaptée de Brauner *et al.*, 2016).

Chez *S. aureus*, des phénotypes de tolérance en réponse aux antibiotiques ont été démontrés par différents laboratoires. Les autolysines LgrA et LgrB qui inhibent l'activité extracellulaire des hydrolases des muréines de la paroi, permettent à *S. aureus* de tolérer les β -lactamines (Groicher *et al.*, 2000; Bronner *et al.*, 2004). Sandberg *et al.* ont également démontré l'implication de la tolérance à la dicloxacilline dans la difficulté d'éradiquer une infection lorsque *S. aureus* a une localisation intracellulaire où la MDK₉₉ est alors 5 fois plus élevée que pour les bactéries extracellulaires (Sandberg *et al.*, 2010). Plus récemment, une mutation ponctuelle dans le gène *pitA* codant un transporteur putatif de phosphate inorganique (Pi) a été mise en évidence chez une souche de *S. aureus* rendue tolérance serait liée à la phase stationnaire de croissance et à une augmentation de la concentration intracellulaire de Pi pour ralentir des fonctions cellulaires critiques (Mechler *et al.*, 2015).

La tolérance aux antibiotiques est aussi retrouvée dans un phénomène ne touchant qu'une partie de la population bactérienne : la persistance.

3. Les bactéries persistantes

3.1. Historique et définitions

En plus des phénomènes de résistance et de tolérance aux antibiotiques, la présence de bactéries persistantes fait partie des phénomènes expliquant l'établissement à long terme d'infections bactériennes sous traitement antibiotique. On parle alors d'infection persistante (Fisher *et al.*, 2017). Tout comme la résistance aux antibiotiques, la persistance a suivi de près les débuts de l'utilisation des antibiotiques et le terme de bactéries persistantes, en anglais « persisters », a été utilisé pour la première fois en 1944 par Joseph Bigger pour la description d'une culture de *S. aureus* qui n'était pas sensible (rendue stérile) par de fortes doses de pénicilline. Son hypothèse était qu'une partie minoritaire de la culture survivait à l'antibiotique du fait de son absence de croissance et non par acquisition d'un mécanisme de résistance (Fisher *et al.*, 2017). Puis, par absence de techniques capables de confirmer cette hypothèse, la persistance est tombée dans l'oubli pendant 60 ans jusqu'à ce qu'une étude utilisant la microfluidique et l'imagerie de bactéries vivantes démontre qu'après l'ajout de l'antibiotique, les bactéries survivantes n'étaient pas en croissance (Balaban *et al.*, 2004).

A la différence de la résistance et la tolérance aux antibiotiques qui touchent la globalité d'une population bactérienne, la persistance aux antibiotiques désigne une sous-population qui survit à une exposition d'antibiotique à une dose létale pour la majorité de la population qui est sensible (Gefen & Balaban, 2009). La fréquence d'apparition de « persisters » est de 1/10⁶ bactéries et souligne le développement d'une population bactérienne hétérogène. Certains termes appartenant au domaine de la persistance sont à définir pour bien comprendre ce champ de la recherche en bactériologie (Fisher *et al.*, 2017 ; Balaban *et al.*, 2019).

➢ Une infection persistante s'établit durablement chez un hôte, indépendamment de la réponse immunitaire ou d'un traitement antibiotique prolongé. Les causes de la persistance de l'infection peuvent être, chez les bactéries incriminées, une tolérance ou une persistance aux antibiotiques (Fisher *et al.*, 2017).

➤ La persistance aux antibiotiques désigne un phénomène attribué à une sous-population bactérienne appelée « persisters » qui survivent malgré un traitement antibiotique à des doses létales pour la majorité de la population. La CMI de la population bactérienne globale reste celle de bactéries sensibles à l'antibiotique (Figure 13). L'aptitude de ces bactéries à survivre aux antibiotiques est transitoire et ne se transmet pas aux générations suivantes qui peuvent être

soit sensibles au même antibiotique soit « persister ». *In vitro*, les « persisters » sont mis en évidence par une courbe de survie en fonction du temps à deux phases où les bactéries sensibles meurent rapidement alors que les « persisters », hautement tolérants aux antibiotiques, survivent (Balaban *et al.*, 2019). L'indicateur permettant de quantifier la persistance est la MDK_{99,99}, soit la durée minimum de traitement requise pour tuer 99,99 % des bactéries. C'est une valeur déterminée à partir des courbes de survie et qui différencie les bactéries tolérantes et persistantes. Les « persisters » ont la même CMI et la même MDK₉₉ que les bactéries tolérantes tolérantes mais la durée nécessaire pour tuer 99,99 % de la population bactérienne est supérieure (**Figure 13**; Brauner *et al.*, 2016). L'ajout de stress comme les antibiotiques favorise l'apparition de cette sous-population mais celle-ci peut rester en dormance malgré l'arrêt du stress, ce qui la différencie de la tolérance (Fisher *et al.*, 2017).

La dormance désigne l'état d'une bactérie qui ne se divise plus et possède une activité métabolique ralentie ce qui dans la majorité des cas, provoque une tolérance aux antibiotiques (Balaban *et al.*, 2019). Ces caractéristiques peuvent être partagées par les « persisters » mais ce n'est pas toujours le cas (Amato *et al.*, 2014 ; Helaine *et al.*, 2014).

Il existe différents types de persistance bactérienne parmi lesquels la persistance ciblée et la persistance spontanée englobant la persistance induite par les antibiotiques et les « persisters » formés spontanément dans une culture non soumise à un stress (**Figure 13**; Balaban *et al.*, 2019). La persistance ciblée désigne les bactéries persistantes formées lors de l'exposition à un stress rencontré dans leur environnement comme une carence nutritive, un stress acide, la phase stationnaire de croissance ou les cellules de l'immunité. Chez ce type de « persisters », l'arrêt du stress n'induit pas la reprise de la croissance de toutes les bactéries. Une fraction des bactéries persistantes induites par le stress demeure dans une phase de latence de longue durée (Balaban *et al.*, 2019).

La persistance induite par les antibiotiques ne dépend pas des événements rencontrés par la culture avant d'être soumise à un stress antibiotique. C'est pour cela qu'elle est classée parmi la persistance spontanée. Cependant, elle peut dépendre de la dose d'antibiotique utilisé ou de la famille de celui-ci, ce qui lui confère une certaine spécificité. La persistance spontanée comprend également les bactéries persistantes formées spontanément et à fréquence constante dans une culture en phase exponentielle de croissance dont les conditions de culture sont fixes (Balaban *et al.*, 2019 ; **Figure 13**).



Figure 13 : Caractéristiques des bactéries persistantes (adaptée de Brauner *et al.*, 2016 ; Balaban *et al.*, 2019).

La persistance aux antibiotiques est un phénomène décrit chez de nombreuses bactéries pathogènes comme *E. coli, Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa), M. tuberculosis, Salmonella enterica* et *S. aureus* (Michiels *et al.*, 2016). En lien avec l'échec d'un traitement antibiotique, certaines études ont d'autant plus démontré l'implication de la persistance dans l'émergence de résistance aux antibiotiques renforçant l'impact de la persistance sur la santé publique (Cohen *et al.*, 2013 ; Levin-Reisman *et al.*, 2017).

3.2. La persistance des infections à S. aureus

Les conditions environnementales rencontrées par *S. aureus*, dans le milieu extérieur ou à l'intérieur d'un hôte, déclenchent chez celui-ci une réponse adaptatrice qui se traduit par la formation de bactéries persistantes retrouvées dans le phénotype de SCVs lié à la persistance intracellulaire, ou à l'intérieur d'un biofilm. Ces bactéries persistantes peuvent être formées à faible fréquence de manière stochastique et spontanée au cœur d'une population bactérienne (donc pré-existantes). Ces bactéries persistantes sont directement impliquées dans la chronicité et la rechute des infections à *S. aureus* (Tuchscherr *et al.*, 2010 ; Bui *et al.*, 2017).

3.2.1. Les small colony variants (SCVs)

Par définition, le terme de SCVs désigne des colonies de petite taille, à croissance lente, peu pigmentées, avec une paroi peu épaisse, non hémolytiques et non cytolytiques (Kahl *et al.*, 2016). Leur étude est complexe car leur formation est un phénomène dynamique et que la plupart des SCVs obtenues *in vitro* ou à partir de modèles murins retrouvent une taille normale après quelques passages en culture dans un milieu riche. Ces SCVs instables sont formées à basse fréquence dans la population bactérienne mais leur formation peut être induite par exposition à des stress comme le milieu intracellulaire, un pH acide et l'H₂O₂ (Edwards, 2012 ; Leimer *et al.*, 2016 ; Tranchemontagne *et al.*, 2016 ; Painter *et al.*, 2015).

Afin de les caractériser, des SCVs sélectionnées pour leur petite taille par cultures successives sous pression de sélection antibiotique (aminoglycosides, gentamycine, kanamycine, streptomycine, amikacine) ont pu être étudiées et les mutations génétiques à la base de leur phénotype identifiées. Les SCVs partagent des mutations sur des gènes du métabolisme impliqués notamment dans la synthèse de la thymidine, de la ménadione (menD) et de l'hémine (hemB) (Tableau 3). Des mutations dans le gène encodant la thymidine perturbent le bon fonctionnement du cycle de Krebs et ont pour conséquence un défaut dans le transport d'électrons. Des mutations impactant la production de ménadione et d'hémine par S. aureus inhibent la biosynthèse des cytochromes et de la ménaquinone, essentiels au système de transport des électrons. Le transport des électrons est le processus principal impacté chez toutes les SCVs et cela entraîne chez celles-ci une diminution de la production d'ATP requise pour la biosynthèse de la paroi, un ralentissement de la croissance, une pigmentation moins importante et un potentiel membranaire réduit. De plus, leur croissance lente explique leur petite taille mais a aussi l'avantage de rendre les SCVs tolérantes aux antibiotiques (Kahl et al., 2016). D'autres mutations ont été mises en évidence, plus spécifiques à certaines SCVs, comme la présence d'une mutation supplémentaire sur le gène rfl (aussi fusE) encodant la protéine ribosomale L6 (Tableau 3). La synthèse des protéines est alors réduite, ce qui augmente la résistance de ces SCVs aux aminoglycosides (Bui et al., 2017).

Les SCVs sont classées en différentes catégories selon leur auxotrophisme (hémine, ménadione et/ou thymidine) et selon l'antibiotique utilisé pour les sélectionner. On a les SCVs ménadione ou hémine-dépendantes sélectionnées par les aminoglycosides prescrits dans le cas d'infections pulmonaires chroniques, d'endocardites, d'ostéomyélites et de bactériémies par exemple. On distingue également les SCVs thymidine-dépendantes sélectionnées par l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole utilisée dans le traitement des infections

pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose, et les SCVs CO₂-dépendantes formées sous l'action d'un composé encore inconnu (Kahl *et al.*, 2016).

D'autres facteurs peuvent induire la formation de SCVs *in vivo*, pendant une infection. La co-culture de *S. aureus* avec un autre pathogène est l'un de ces facteurs. Chez les malades atteints de mucoviscidose, la prévalence des SCVs de *S. aureus* est associée à des infections pulmonaires graves (Wolter *et al.*, 2013). Cependant, les voies pulmonaires de ces malades sont colonisées dès l'enfance par *S. aureus* et *P. aeruginosa* (Schneider *et al.*, 2008). Il a été démontré que *S. aureus* forme alors des SCVs déficientes pour la chaîne respiratoire en réponse à la pyocyanine et au 4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide (HQNO) produits par *P. aeruginosa*. Donc en favorisant la formation de SCVs, *P. aeruginosa* facilite la survie de *S. aureus* pendant l'antibiothérapie par les aminoglycosides, souvent utilisés pour traiter les infections respiratoires à *P. aeruginosa* (Kahl *et al.*, 2016). De plus, un nouveau mécanisme de formation de SCVs via la réponse stringente a été décrit chez un patient souffrant de bactériémies chroniques à une souche de SARM. La caractérisation de ces SCVs a révélé la présence d'une mutation dans le gène *relA* ayant pour conséquence une activation constante de la réponse stringente, mesurée par la quantité de (p)ppGpp présente dans les bactéries (Gao *et al.*, 2010 ; **Tableau 3**).

Afin de persister à long terme à l'intérieur des cellules de l'hôte (phagocytaires ou non), les SCVs diminuent l'expression de ces principaux facteurs d'invasion des tissus de l'hôte et augmentent l'expression des gènes impliqués dans l'adhésion (**Tableau 3**) (Kahl *et al.*, 2016). Cette persistance intracellulaire va ainsi permettre à *S. aureus* d'échapper aux défenses immunitaires de l'hôte et de mieux tolérer les antibiotiques. Ainsi, *S. aureus* peut survivre 3-4 jours dans les cellules phagocytaires et jusqu'à 7 jours dans les ostéoblastes avant d'induire la mort de sa cellule hôte par apoptose (Kahl *et al.*, 2016).

La présence de SCVs dans des prélèvements cliniques a été mise en évidence par Proctor et al (1997) chez des patients atteints d'ostéomyélite. La formation de ces SCVs engendre de réelles implications cliniques sur la chronicité des infections à *S. aureus* qui peuvent rechuter après une longue période asymptomatique. Dans un contexte d'infections récurrentes, la fréquence de formation des SCVs est estimée à 29 % dans le cas des ostéomyélites et à 17-46 % dans les infections du tractus respiratoire chez les patients atteints de mucoviscidose ce qui explique les difficultés rencontrées pour traiter ces infections persistantes (Bui *et al.*, 2017).

 Tableau 3 : Caractéristiques génétiques retrouvées parmi les sous-populations de SCVs

 de S. aureus

Gènes cibles	Fonctions touchées	Références	
	Mutations dans la séquence du gène		
menD	biosynthèse de la ménaquinone et transport d'électrons	Bates et al., 2003	
menB	biosynthèse de la ménaquinone et transport d'électrons	Lannergärd <i>et al.</i> , 2008	
hemB	Biosynthèse de l'hémine et transport d'électrons	von Eiff <i>et al.</i> , 1997	
hemH	Biosynthèse de l'hémine et transport d'électrons	Schaaff et al., 2003	
hemA	Biosynthèse de l'hémine et transport d'électrons	Schaaff et al., 2003	
hemG	Enzyme tronquée bloquant la biosynthèse de l'hémine et le transport d'électrons	Köser et al., 2012	
ctaA	blocage biosynthèse de HemA	Clements <i>et al.</i> , 1999	
thyA	conversion de l'uracile en thymidine	Besier et al., 2007	
rfl	Diminution de la synthèse protéique par inactivation de la protéine ribosomale L6	Bui et al., 2017	
relA	activité hydrolase de RelA réduite avec activation permanente de la réponse stringente	Gao <i>et al.</i> , 2010	
rexAB	induction par la réponse SOS de la catalase et résistance au stress oxydatif H ₂ O ₂	Painter et al., 2015	
mgrA et rsbU	résistance aux stress chimiques produits par les défenses de l'hôte	Bui & Kidd, 2015 ; Bui <i>et al.</i> , 2015	
Modification de l'expression des gènes par activation ou réduction de la transcription			
surexpression opéron arcABDC	production d'ATP à partir du catabolisme de l'arginine en anaérobie ou par compensation du défaut en transport d'électrons	Kohler <i>et al.</i> , 2003, 2008	
expression réduite de <i>acnA</i>	inhibition ou absence du cycle TCA (acide tricarboxylique)	Kohler <i>et al.</i> , 2003 ; Kriegeskorte <i>et al.</i> , 2011, 2014	
inhibition des gènes <i>agr</i> et de la production d'ARN III	inhibition de la production des facteurs de virulence ARN III-dépendants comme les toxines hémolytiques et expression des adhésines accrue	Vaudaux <i>et al.</i> , 2002 ; Kohler <i>et</i> <i>al.</i> , 2003 ; Kahl <i>et</i> <i>al.</i> , 2005	
surexpression de <i>sigB</i> et adhésines	persistance à long terme dans les cellules hôtes et formation des SCVs	Mitchell <i>et al.</i> , 2008 ; Tuchscherr & Löffler, 2015	

3.2.2. Le biofilm, un environnement favorable à la persistance de S. aureus

Une des raisons augmentant l'impact des staphylocoques sur la santé publique est leur capacité à former des « biofilms ». Les biofilms sont des communautés bactériennes enchâssées dans une matrice exopolymérique, adhérentes à une surface et résistantes aux antimicrobiens et au système immunitaire (Paharik & Horswill, 2016 ; **Figure 14**).

Le cycle de vie d'un biofilm a pour étapes principales l'attachement initial à une surface, la maturation du biofilm et la phase de dispersion. Les moyens employés par les bactéries pour l'attachement initial varient selon la surface sur laquelle le biofilm va se former. S'il s'agit d'une surface inerte comme un polymère, son caractère hydrophobe est suffisant pour permettre l'attachement de S. aureus, même si l'autolysine Atl et les acides téichoïques de la paroi peuvent être impliqués. In vivo, ce sont les protéines de surface de S. aureus capables de se fixer sur les protéines de matrice des cellules hôtes qui sont impliquées dans la phase d'attachement, et plus particulièrement les adhésines ancrées dans la paroi bactérienne comme les MSCRAMM ou les SERAM avec la protéine Eap (Otto, 2018 ; Figure 14). Une particularité des biofilms formés par S. aureus est la présence d'une étape « d'exode » entre la première accumulation de bactéries et la maturation du biofilm (Figure 14). En effet, Moormeier et al. ont démontré que des portions de S. aureus se détachaient du site initial d'attachement et servaient de support pour la formation d'un biofilm mature en forme de tour. De plus, ils ont mis en évidence que cet « exode » entrant dans le cycle des biofilms à S. aureus est modulé par une nucléase (Moormeier et al., 2014; Figure 14). Ensuite, survient la maturation du biofilm, ou aussi appelée étape d'accumulation. Elle implique la prolifération des bactéries et la formation de la matrice du biofilm, composée de polysaccharides et d'ADN extracellulaire (Figure 14). Chez S. aureus, le principal composant de la matrice est un polysaccharide nommé PIA pour Polysaccharide Intercellular Adhesin, dont la biosynthèse est permise grâce aux produits des gènes de l'opéron icaADBC, qui permettent l'assemblage et l'export du PIA (Heilmann et al., 1996). L'expression de l'opéron *ica* est sous le contrôle du répresseur IcaR (Conlon *et al.*, 2002). Cependant, des études récentes sur des isolats de S. aureus résistants et sensibles à la méticilline reportent que ceux-ci formaient majoritairement un biofilm dépendant de protéines et non du PIA (Pozzi et al., 2012 ; Loughran et al., 2014). Dans ce type de biofilm, il a été démontré que la protéine SasG participe aux interactions entre bactéries permettant la structuration du biofilm. En effet, SasG possède la capacité de s'auto-assembler en fibrilles permettant l'adhésion des bactéries entre elles (Geoghegan et al., 2010). L'étape finale et déterminante dans le cycle de vie d'un biofilm est sa dispersion, permettant la dissémination de

l'infection chez l'hôte. La dégradation de la matrice du biofilm nécessite l'action d'enzymes, nucléases et protéases, produites par la bactérie ou présentes dans l'environnement. De plus, les PSMs, en perturbant les interactions non covalentes, participent activement au détachement et à la dispersion du biofilm (Otto, 2018 ; **Figure 14**).

Les biofilms forment un environnement protecteur pour *S. aureus* contre la phagocytose, le complément et lui permettent également de tolérer les antibiotiques grâce à la formation de bactéries persistantes (Conlon, 2014). Un modèle proposé par Kim Lewis indique qu'un antibiotique bactéricide est capable de tuer la majorité des bactéries du biofilm, sauf les « persisters » (Lewis, 2001). A l'arrêt de l'antibiothérapie, ces « persisters » peuvent reprendre leur croissance et repeupler le biofilm causant le retour de l'infection (**Figure 14**). La capacité de *S. aureus* à former des biofilms présentant des bactéries persistantes, donc tolérantes aux antibiotiques, peut expliquer les difficultés rencontrées dans le traitement de nombreuses infections. Présent comme bactéries commensales sur la peau, les staphylocoques sont la première source d'infections associées à un biofilm sur le matériel médical implanté chirurgicalement. Souvent, il s'agit d'infections graves comme des endocardites ou des infections de prothèses articulaires qui peuvent évoluer en sepsis (Otto, 2018).

Outre la formation de SCVs et de bactéries persistantes à l'intérieur des biofilms, une importante formation stochastique de « persisters » chez *S. aureus* a été mise en évidence lorsque les bactéries sont en phase stationnaire de croissance. Chez ces bactéries persistantes, induites par une dose de ciprofloxacine de concentration supérieure à la CMI, l'entrée en état de persistance a été démontrée comme étant liée à une chute du taux intracellulaire d'ATP, augmentant la tolérance à la ciprofloxacine (Conlon *et al.*, 2016).



Figure 14 : Modèle du cycle de vie d'un biofilm de *S. aureus* **avec rechute de l'infection** (Adaptée de Paharik & Korswill ; 2016 et Conlon 2014).

Les infections à *S. aureus* produisant des bactéries persistantes sont des infections complexes où dans certains cas, formation de SCVs et de biofilm sont liés. Ainsi, Schwartbeck *et al.* sont parvenus à établir un lien entre la persistance d'infections pulmonaires à *S. aureus* chez des malades atteints de mucoviscidose et la présence de colonies mucoïdes ayant un important taux de mutations dans l'opéron *ica* (Schwartbeck *et al.*, 2016).

Le point commun des bactéries persistantes chez *S. aureus*, en SCVs ou dans un biofilm, est un taux d'ATP intracellulaire très bas qui *in vivo*, est rencontré dans des sites d'infections anaérobies comme les os ou l'environnement pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose (Bui *et al.*, 2017). Eradiquer une infection chronique à *S. aureus*, avec présence de bactéries persistantes sous forme de SCVs ou de biofilm, reste un problème majeur de santé publique avec la nécessité de développer de nouveaux antibiotiques. La molécule ADEP4, développée récemment, est un antibiotique qui agit quel que soit le taux d'ATP de la bactérie et qui active les protéases Clp afin de stimuler la protéolyse. Son efficacité, en co-administration avec la rifampicine, a été démontrée contre les SCVs et dans l'éradication totale d'une infection associée à un biofilm dans un modèle murin (Conlon *et al.*, 2013).

E. Les régulateurs de la pathogénie de S. aureus

La pathogénie de *S. aureus* est hautement régulée et sous le contrôle d'un réseau complexe de régulateurs. On distingue les systèmes à deux composants, les facteurs de transcription et les ARNs régulateurs.

1. Les systèmes à deux composants

Les systèmes de régulation à deux composants (TCS) sont des systèmes de transduction de signaux capables de détecter des changements environnementaux et de déclencher une réponse adaptée chez la bactérie au niveau transcriptionnel. Ils sont constitués de deux protéines : une histidine kinase transmembranaire, senseur du signal, et un régulateur de réponse. Suite à la fixation d'un ligand extracellulaire sur le senseur, une cascade de phosphorylations conduit à la fixation de la protéine régulatrice au niveau des promoteurs des gènes cibles. Chez *S. aureus*, cinq TCS ont été caractérisés comme impliqués dans la régulation de la virulence : le système Agr, SaeRS, SrrAB, ArlRS et LytRS (Bronner *et al.*, 2004).

Le système Agr (Accessory gene regulator)

Le quorum-sensing est un système de régulation de gènes par communication entre bactéries dépendant de la densité de population bactérienne et de l'environnement (Waters & Bassler, 2005). Le locus agr a une taille de 3,5 kb et consiste en deux unités de transcription, RNAII et RNAIII sous le contrôle des promoteurs P2 et P3 respectivement. Le locus RNAII comporte quatre gènes, agrB, agrD, agrC et agrA. Le gène agrD encode le peptide AIP (Auto-Inducer Peptide) de 7 à 9 acides aminés, précurseur du signal extracellulaire du système de quorum sensing Agr. S. aureus synthétise la molécule de signalisation AIP qui s'accumule dans l'environnement jusqu'à atteindre une concentration seuil, dépendante de la densité bactérienne (Le & Otto, 2015, Figure 15 A). Le gène agrB code pour une endopeptidase transmembranaire qui va maturer et exporter l'AIP dans le milieu extracellulaire. Les gènes agrC et agrA codent un TCS où AgrC est l'histidine kinase et AgrA est le régulateur de réponse. Une fois la concentration seuil atteinte, l'auto-inducteur AIP va aller se fixer sur son récepteur AgrC. Phosphorylé par AgrC, AgrA se fixe sur les régions promotrices P2, P3, et sur les promoteurs de gènes, comme par exemple les gènes codant les PSMa et PSMb, pour activer leur transcription (Figure 15 B). La fixation de AIP sur AgrC entraîne donc une cascade de réactions afin de moduler l'expression des gènes de virulence et favoriser l'entrée de S. aureus dans une stratégie d'invasion des tissus (Le & Otto, 2015, Figure 15).



Figure 15 : Rôle joué par le système de quorum-sensing Agr dans la régulation de la virulence de S. aureus.

En plus des AIP, le système Agr peut être activé par d'autres régulateurs comme le facteur de transcription SarA, le système à deux composants SrrAB ou des facteurs environnementaux tels que la concentration en glucose et le pH (Le & Otto, 2015). Il peut réguler la virulence de manière directe avec AgrA qui va induire l'expression des PSMs et inhiber des gènes du

métabolisme, ou indirecte avec l'ARN régulateur ARN III qui favorise l'expression de toxines et enzymes sécrétées par *S. aureus* pour envahir les tissus de l'hôte et inhibe l'expression des adhésines. On compte plus d'une centaine de facteurs de virulence dont l'expression est régulée positivement ou négativement par le système Agr qui est le système de régulation majeur de la virulence de *S. aureus* (Le & Otto, 2015). En plus de promouvoir la phase d'invasion d'une infection à *S. aureus*, le système Agr est impliqué dans la survie en intracellulaire et la formation des biofilms. En effet, l'expression des gènes du système *agr* est diminuée chez les SCVs mais elle est augmentée au moment de la sortie du phagolysosome ou de la lyse de la cellule par l' α -hémolysine et les PSM α . Alors que dans le biofilm, les PSMs participent activement à sa structuration et à la phase de dispersion, pendant laquelle le système Agr est activé. Par les gènes qu'il régule, le système de quorum sensing Agr est directement lié à la pathogénie de *S. aureus* dans les infections cutanées et tissulaires, via l'expression de toxines, mais aussi dans les endocardites, les pneumonies et les ostéomyélites via son implication dans le cycle de vie du biofilm (Oliveira *et al.*, 2018 ; Otto, 2018).

> Autres TCSs participant à la régulation de la pathogénie de S. aureus

D'autres TCSs permettent aussi à *S. aureus* d'intégrer les signaux de son environnement et d'adapter l'expression de ses gènes de virulence. Ces TCSs sont regroupés dans le **Tableau 4**. Le TCS SaeRS est particulièrement impliqué dans la régulation de la virulence de *S. aureus* via l'activation de l'expression de toxines sécrétées favorisant la dissémination du pathogène dans les tissus, la formation d'abcès, et via la production de protéines d'évasion du système immunitaire augmentant la survie de *S. aureus* dans le sang (Münzenmayer *et al.*, 2016 ; Spaan *et al.*, 2013b ; Thomer *et al.*, 2016).

Composants	Stimuli environnementaux	Gènes régulés	Références
SaeRS : S. aureus exoprotein expression			
-SaeS : senseur -SaeR : régulateur -SaeP : lipoprotéine -SaeQ : protéine transmembranaire	peptides produits par les neutrophiles humains (HNPs), calprotectine des neutrophiles, peroxyde d'hydrogène H ₂ O ₂ , β-lactamines, 1M NaCl, pH acide	induit l'expression d'adhésines, les hémolysines α et β, protéines d'évasion du système immunitaire	Liu <i>et al.</i> , 2016b
SrrAB : Staphylococcal respiratory response			
- SrrB : senseur - SrrA : régulateur	disponibilité en oxygène, carence nutritive	 -aérobie : stimule expression de la toxine TSST-1, de la protéine A, du régulateur IcaR et de la NOS (nitric oxyde synthase) -anaérobie : répression des gènes <i>tsst, spa</i> et <i>icaR</i> ce qui induit la formation de biofilm 	Yarwood <i>et</i> <i>al.</i> , 2001 Ulrich <i>et al.</i> , 2007 James <i>et al.</i> , 2019
	ArlRS : Autol	ysis related locus	
- ArlS : senseur - ArlR : régulateur	croissance bactérienne, stress de paroi	inhibe les autolysines permettant à <i>S. aureus</i> de casser sa paroi lors de la division cellulaire (souches sensibles méticilline), active l'expression du régulateur transcriptionnel MgrA	Fournier & Hooper, 2000 Memmi <i>et</i> <i>al.</i> , 2012 Walker <i>et</i> <i>al.</i> , 2013 Burgui <i>et al.</i> , 2018
LytRS			
-LytS : senseur -LytR : régulateur	croissance bactérienne, stress de paroi	régulation positive des gènes <i>lrgA</i> et <i>lrgB</i> qui inhibent l'hydrolyse du peptidoglycane	Bronner <i>et</i> <i>al.</i> , 2004

Tableau 4 : Les systèmes à deux composants SaeRS, SrrAB, ArlRS et LytRS

2. Les facteurs de transcription

Afin d'optimiser l'expression des gènes, un réseau de régulation complexe imbriquant entre eux les différents systèmes de régulation est mis en œuvre par la bactérie (**Figure 16**). Les facteurs de transcription appartiennent à ce réseau complexe, on distingue le facteur sigma alternatif SigmaB et les facteurs de transcription de la famille Sar.

> Le facteur SigmaB (σ^{B})

La transcription et la synthèse des facteurs de virulence de S. aureus répondent également aux stress environnementaux, que celui-ci peut rencontrer au cours d'une infection, via le régulateur transcriptionnel σ^{B} . En absence de stimuli environnementaux, σ^{B} est inhibé, séquestré par l'anti-facteur-σ RsbW. En présence d'un stress environnemental comme un pH acide ou un stress oxydant (par exemple dans le phagolysosome), la phosphatase RsbU va activer RsbV en le déphosphorylant et RsbV va alors entrer en compétition avec le facteur σ^B pour la fixation sur RsbW. On a alors une augmentation de la concentration de σ^{B} libre dans la cellule. Associé au core-enzyme de l'ARN polymérase, σ^{B} va pouvoir se fixer aux promoteurs σ^{B} -dépendants des gènes cibles et permettre leur transcription (Sommerville & Proctor, 2009). σ^{B} participe à l'inhibition de l'expression des gènes de virulence spa et hla, codant respectivement pour la protéine A et l'a-hémolysine (Kullik et al., 1998; Horsburgh et al., 2002 : Figure 16). σ^{B} joue aussi un rôle important dans la persistance intracellulaire et les infections chroniques. Il a été démontré que des souches délétées de σ^{B} étaient incapables de former des SCVs lors d'expériences d'infections sur culture cellulaire suggérant que ce régulateur est indispensable pour la persistance de S. aureus à long terme dans les cellules de l'hôte (Kahl et al., 2016).

> Les facteurs de transcription de la famille Sar

Le locus *sar* fait partie lui aussi des grands systèmes de régulation de *S. aureus*. Un de ces acteurs est le facteur de transcription (FT) SarA qui module l'expression d'environ 120 gènes et influence notamment la transcription de l'ARN III (Cheung *et al.*, 2008 ; Jenul & Horswill, 2018). A la différence du système Agr, dépendant de la phase de croissance, la synthèse de la protéine SarA est constante. Le locus *sarA* est complexe, avec la production de trois transcrits sous le contrôle des promoteurs P1, P2 et P3. La régulation de l'expression des facteurs de virulence de *S. aureus* par SarA a lieu de manière dépendante du système Agr via sa fixation sur le promoteur P2 du locus *agr* ou de manière indépendante. En effet, il a été montré que SarA régule positivement la transcription de l'ARN III et donc régule le système Agr de quorum sensing (Arya & Princy, 2013 ; **Figure 16**). SarA régule aussi l'expression d'autres gènes de la famille Sar tels *sarS* et *sarV* (**Figure 16**). De plus, SarA agit également en stabilisant les ARNm des protéines A et CNA pendant la phase exponentielle de croissance en se fixant directement aux ARNm pour inhiber leur dégradation par les RNases (Roberts *et al.*,

2006 ; Morrison *et al.*, 2012a). Au niveau transcriptionnel, SarA stimule l'expression de la leucocidine PVL et en synergie avec SarS, inhibe la production de protéases extracellulaires se traduisant par une adhésion augmentée de *S. aureus* et une plus grande capacité à former des biofilms (Bronner *et al.*, 2000 ; Mrak *et al.*, 2012).

SarA possède 8 paralogues fonctionnels dans le génome de *S. aureus* : SarS, SarV, SarR, SarT, SarU, SarX, Rot et MgrA. Tous ces paralogues agissent de concert pour réguler de manière positive ou négative leur expression mais aussi celle de nombreux gènes cibles impliqués dans la virulence, la formation de biofilm, la résistance aux antibiotiques, l'autolyse et des voies métaboliques (Arya & Princy, 2013 ; Jenul & Horswill, 2018 ; **Figure 16**).

SarS participe activement à la régulation de la protéine A puisque le gène *sarS* est situé en amont du gène *spa*. Dans un mutant de délétion des loci *agr* et *sarA*, SarS induit une surexpression de *spa*, expression qui se retrouve diminuée dans un mutant de délétion de *sarS* (Cheung *et al.*, 2001). L'expression de SarS est fortement inhibée par SarA, et induite par SarT. SarS inhibe l'expression de la toxine exfoliative ETA et de l' α -hémolysine. SarS participe également à la régulation d'EGM en activant l'expression des gènes encodant les recombinases A et B responsables de l'excision des cassettes SCC*mec* suggérant l'implication de SarS dans le transfert horizontal de gènes de résistance aux antibiotiques (Jenul & Horswill, 2018 ; Zhang *et al.*, 2015 ; **Figure 16**).

SarV régule les gènes de l'autolyse encodant des hydrolases du PG qui participent au renouvellement de la paroi, à la division cellulaire et à la lyse des cellules bactériennes. Il a été montré que la délétion de *sarV* rendait *S. aureus* plus résistant à la lyse par le triton-X100 et à l'action des pénicillines par diminution de l'activité hydrolase des muréines extracellulaires alors que sa surexpression provoquait une hypersensibilité de *S. aureus* à cette lyse (Manna *et al.*, 2004).

SarR a plutôt un rôle de répresseur (**Figure 16**) car il réprime l'expression des gènes *sarA*, *agr, hla, hlb* et *spa* (Arya & Princy, 2013). De même, SarT, dont l'expression est réprimée par SarA, inhibe la transcription de l'ARN III et de l' α -hémolysine. A proximité de *sarT* mais sur le brin opposé d'ADN, se trouve le gène *sarU*, dont l'expression est réprimée par SarT (Manna & Cheung, 2003 ; **Figure 16**). Au contraire de SarT, SarU stimule la transcription de l'ARN III et atténue l'expression des gènes contrôlés par le système Agr. Il a été démontré par des analyses

transcriptionnelles et par Northern blot une diminution des niveaux d'ARN II et d'ARN III dans une souche délétée de *sarU* (Liu *et al.*, 2006).

SarX est aussi un répresseur du système Agr et donc d'exoprotéines impliquées dans la virulence. De plus, SarX est aussi impliqué dans la formation de biofilm dépendant de l'opéron *icaADBC* par l'intermédiaire d'un autre FT de la famille AraC/Xyl nommé Rbf. En effet, l'expression de *sarX* est activée par Rbf, SarX va alors réprimer l'expression du répresseur *icaR*, activant l'expression de l'opéron *icaADBC* et stimulant la formation de biofilm par *S. aureus* (Gallegos *et al.*, 1997 ; Cue *et al.*, 2013). SarX est aussi lui-même régulée positivement par MgrA qui régule donc de manière indirecte l'expression du système Agr et la production de biofilm (Manna & Cheung, 2006 ; **Figure 16**).

MgrA est un autre régulateur global de *S. aureus* qui stimule la production du polysaccharide 8 de la capsule, de la nucléase et empêche la production d' α -hémolysine, de la coagulase, de protéases et de la protéine A (Luong *et al.*, 2003). Indépendamment du système Agr, MgrA peut se lier directement aux promoteurs des gènes *hla* et *sarS* pour moduler l'expression de l' α -hémolysine et de la protéine A (Ingavale *et al.*, 2005). MgrA se fixe aux promoteurs des gènes *norA* et *norB* encodant des pompes d'efflux non spécifiques impliqués dans la résistance aux fluoroquinolones et aux phénicolés, afin d'activer leur expression sous forme déphosphorylée ou de la réprimer sous forme phosphorylée (Truong-Bolduc *et al.*, 2005, 2010 ; **Figure 16**). Pour la régulation de la formation de biofilm, l'effet de MgrA semble souche-dépendant car la délétion de *mgrA* n'a pas d'effet sur l'accumulation de PIA, un des composants du biofilm, dans la souche LAC, alors que chez la souche UAMS-1, la production de PIA est augmentée (Trotonda *et al.*, 2008 ; Atwood *et al.*, 2015). Plus récemment, Jin *et al.* ont démontré que MgrA et le régulateur de réponse ArlR pouvaient se lier directement au promoteur de l'opéron *ica* pour induire l'expression de l'opéron et la production de PIA (Jin *et al.*, 2018).

Rot (Represseur of toxins) est un autre FT homologue de SarA dont l'expression est inhibée par l'ARN III, et qui agit en amont du système Agr pour stimuler la synthèse de la paroi (**Figure 16** ; Arya & Princy, 2013). En se fixant sur les promoteurs de ces gènes cibles avec une affinité plus ou moins grande, Rot stimule l'expression de 86 gènes dont la protéine A (*spa*) et lui-même par une boucle d'auto-régulation alors qu'il réprime l'expression de 60 gènes

comme ceux codant certaines protéases, la lipase, l'entérotoxine B (*seb*) et les hémolysines α et β (*hla* et *hlb*) au niveau transcriptionnel (Jenul & Horswill, 2018).



Figure 16 : Circuits de la régulation de l'expression des gènes impliqués dans la pathogénie de *S. aureus* comprenant le système Agr, les TCSs et les FTs. Ce schéma est représentatif d'informations extraites d'articles scientifiques concernant la régulation de la pathogénie de *S. aureus*. Les deux TCS représentés ici sont en noir, le FT alternatif Sigma B en bleu, les FTs de la famille Sar en violet, l'ARN III en jaune et les cibles régulées sont en bleu. Les flèches noires correspondent à une régulation au niveau transcriptionnel et celles en bleu à une régulation post-transcriptionnelle. Les flèches symbolisées par un trait plein correspondent aux régulations positives et celles en pointillés aux régulations négatives.

Les FT sont donc des acteurs majeurs de la régulation de la virulence de *S. aureus*. Ils agissent directement en se fixant sur les promoteurs des gènes cibles pour induire, ou réprimer, leur expression ou indirectement en régulant un autre régulateur.

3. Les ARN régulateurs impliqués dans la pathogénie de S. aureus

Les ARN régulateurs (ARNreg) font également parti de la boîte à outils des bactéries pour s'adapter aux changements rapides de leur environnement et contrôler l'expression de leurs facteurs de virulence. Différents types d'ARNreg ont été identifiés chez les bactéries et les plus étudiés sont ceux régulant leur ARN cible par appariement de bases afin de moduler l'expression des gènes, parmi lesquels on trouve les ARNreg agissant en cis (ARN antisens, asARN) et ceux agissant en trans (taARN). Les asARN sont des ARNreg transcrits à partir du brin complémentaire de leur gène cible et ont donc une complémentarité parfaite et étendue avec celui-ci. Au contraire, les taARN n'ont pas de grandes régions chevauchantes avec leur cible et ils sont situés au niveau d'un autre locus dans le génome bactérien. La définition communément admise des taARN est basée sur un ensemble de caractéristiques. Elle indique que ces ARNreg sont transcrits sous le contrôle du promoteur du gène encodant l'ARNreg, qu'ils exercent leur fonction régulatrice par appariement de bases avec leur ARNm cible au niveau de zones complémentaires de 7 à 12 nucléotides avec une complémentarité parfois partielle et qu'ils forment un groupe d'ARN de taille hétérogène allant d'environ 50 à 500 nucléotides. Certains de ces ARN dépendent de la présence d'une protéine chaperonne pour assurer leur stabilité et les assister dans leur fonction de régulateur (Carrier et al., 2018).

La famille des ARNreg compte également des ARNs particuliers nommés riboswitches et thermosenseurs. Les riboswitches sont des ARNreg formés à partir de régions 5'-UTR structurées d'un ARNm. Ils détectent des métabolites ou produits de voies de biosynthèse bactérienne et exercent un rétrocontrôle de ces voies de biosynthèse. Ils sont généralement composés de deux domaines structurés indépendants, l'un déterminant la sensibilité au signal (aptamère), et l'autre permettant la régulation. La fixation d'un ligand spécifique sur le domaine aptamère va entraîner un changement de la structure du riboswitch affectant la structure du domaine adjacent et permettant l'expression de l'ARNm (Svensson & Sharma, 2016). Les régions 5'-UTR structurées peuvent aussi réguler l'expression de gènes en réponse à des changements de température. C'est le cas des ARNreg thermosenseurs qui, en fonction des changements de température, possèdent une structure secondaire différente permettant soit d'exposer soit de séquestrer le site de fixation du ribosome (RBS) pour réguler la traduction (Svensson & Sharma, 2016).

Les ARNreg agissent à travers différents mécanismes d'action pour réguler leur cible. La **Figure 17** présente les mécanismes d'action les plus classiques utilisés par les ARNreg pour activer ou réprimer la traduction de leur ARNm cible. Ainsi, les ARNreg peuvent, par

appariement de bases, rendre accessible le RBS ou protéger un site de clivage de l'ARNm cible dans le but d'activer la traduction de l'ARNm (**Figure 17, partie gauche**). Au contraire, dans les cas d'ARNreg inhibant la traduction de leur cible, le contrôle de la traduction des ARNm s'effectue en bloquant l'accès du RBS au ribosome ou en recrutant des RNases qui vont dégrader l'ARNm (**Figure 17 partie droite** ; Svensson & Sharma, 2016). De plus, les ARNreg ont une structure secondaire comportant des tiges-boucles nécessaires à leur fonction régulatrice.



Figure 17 : Mécanismes de régulation directe par les ARNreg de l'expression de leurs ARNm cibles. L'interaction avec l'ARN cible s'effectue par appariement de bases au niveau d'une région complémentaire soit pour activer (1- en vert) ou réprimer (3- en rouge) la traduction de l'ARNm cible ou augmenter sa stabilité (2- en vert) ou favoriser sa dégradation (4- en rouge) par le recrutement de RNases. RBS désigne le Ribosome Binding Site.

S. aureus exprime une centaine de ces ARNreg, qui sont compilés dans la base de données SRD pour Staphylococcal regulatory RNA Database (Tomasini *et al.*, 2014 ; Sassi *et al.*, 2015 ; Bronsard *et al.*, 2017). Certains de ces ARNreg participent activement à la régulation des facteurs de virulence de *S. aureus*, notamment l'ARN III, transcrit sous le contrôle du promoteur P3 du système de quorum sensing Agr.

3.1. <u>L'ARN III</u>

L'ARN III est un ARNreg agissant en *trans* car il n'est pas codé au niveau du même locus que ces ARNm cibles. C'est un ARN de 514 nucléotides, hautement structuré avec 14 tigesboucles et qui est l'effecteur du système de « quorum sensing » Agr (Novick *et al.*, 1993). C'est un ARN bifonctionnel, codant pour une PSM appelée δ -hémolysine (gène *hld*). Ces fonctions régulatrices sont présentées dans la **Figure 18**.

Crucial pour la virulence de S. aureus, l'ARN III permet à la bactérie d'effectuer une transition entre l'expression de nombreuses protéines de surfaces comme les adhésines, et la synthèse de toxines sécrétées (Bronesky et al., 2016). La structure complexe de l'ARN III lui permet d'interagir avec les ARNm rot et coa via les tiges-boucles 7 et 13, l'ARNm sbi avec les tiges-boucles 1 et 10-11 et l'ARNm spa par l'intermédiaire de la boucle 13. La fixation de l'ARN III sur les ARNm cibles rot, coa, sbi et spa réprime l'initiation de la traduction et aboutit à la dégradation des complexes ARN III-ARNm cible par l'endoribonucléase III (RNase III), enzyme dégradant les ARN doubles brins (Boisset et al., 2007; Chabelskaya et al., 2014; Chevalier et al., 2010; Huntzinger et al., 2005; Figure 18). Ainsi, l'ARN III inhibe directement la production de protéines de surfaces majeures comme la protéine A, la coagulase et Sbi, impliquées dans l'adhésion et l'échappement au système immunitaire. L'ARN III réprime également l'expression de lytM qui code pour une autolysine associée au renouvellement du PG, la division cellulaire, l'export de protéines et la formation de biofilms (Bronesky et al., 2016). Les fonctions activatrices de l'ARN III ciblent les gènes hla et mgrA (Figure 18). L'interaction de l'ARN III, via sa tige-boucle 2, avec la partie 5'-UTR de l'ARNm hla libère la séquence Shine-Dalgarno (SD) et permet donc le recrutement des ribosomes et l'initiation de la traduction. Pour l'ARNm mgrA, son interaction avec les tiges-boucles 2 et 13 de l'ARN III au niveau de la partie 5'-UTR de mgrA le stabilise et inhibe sa dégradation (Bronesky et al., 2016).

L'ARN III est donc un régulateur aux multiples cibles connues, et qui possède également de nombreuses autres cibles, pour lesquelles l'interaction nécessite encore une démonstration expérimentale. De plus, son action régulatrice sur Rot et MgrA qui sont eux-aussi des régulateurs globaux de l'expression des gènes chez *S. aureus* met en lumière la complexité et la présence de différents niveaux pour réguler la pathogénie de *S. aureus*.



Figure 18 : Mécanismes d'action de l'ARN III sur ces ARNm cibles, (Adaptée de Bronesky et al., 2016).

3.2. Autres ARN régulateurs impliqués dans la pathogénie de S. aureus

Initialement détectés par des analyses bio-informatiques et transcriptomiques, sept ARNreg exprimés par *S. aureus* ont été découverts sur des SaPI, nommés de SprA à SprG pour small pathogenicity island RNA (Pichon & Felden, 2005). Certains de ces ARN Spr ont été démontrés comme impliqués dans la pathogénie de *S. aureus*. Par exemple, SprD réprime l'expression de l'ARNm *sbi* pendant la phase exponentielle de croissance. SprD contribuent également à la mise en place de l'infection dans un modèle murin de septicémie (Chabelskaya *et al.*, 2010; 2014). Si SprD est impliqué dans la virulence de *S. aureus*, SprC est, quant à lui, plus favorable à la colonisation de l'hôte par la bactérie. En effet, des expériences ont montré que la délétion du gène *sprC* augmente la virulence et la dissémination de *S. aureus* chez des animaux colonisés (Le Pabic *et al.*, 2015). La régulation de l'ARNreg SprC a fait l'objet d'une étude démontrant que SarA réprime l'expression de SprC en se fixant sur son promoteur (Mauro *et al.*, 2016).

L'ARNreg SprX1 participe à la résistance de *S. aureus* aux antibiotiques de la famille des glycopeptides en réprimant la traduction de la protéine SpoVG dont la fonction est de réguler

différents processus liés à la paroi bactérienne (Eyraud et al., 2014). De plus, il a été démontré que SprX1 activait l'expression des facteurs de virulence *hld* encodant la δ -hémolysine et *clfB* encodant une adhésine (Kathirvel et al., 2016). En plus de la résistance aux antibiotiques, d'autres ARNreg agissant en trans peuvent aussi participer à la tolérance aux antibiotiques et à la formation de SCVs chez S. aureus. Ainsi, la surexpression des ARNreg RsaA et RsaE a été mise en évidence chez les SCVs. Romilly et al. ont démontré que lors de conditions de stress activant le FT σ^{B} , RsaA réprimait l'expression du régulateur MgrA et par conséquent favorisait l'adhésion et la formation de biofilms. Sur modèle murin, il a été mis en évidence dans cette même étude que RsaA favorise une infection chronique et réduit la gravité d'une infection systémique (Romilly et al., 2014). La participation de RsaE dans le phénotype des SCVs serait plus en lien avec ses fonctions régulatrices de gènes du métabolisme et notamment la répression de gènes impliqués dans le cycle métabolique de l'acide tricarboxylique (TCA) et la biosynthèse des folates. Les SVCs ont une production d'ATP réduite et ont besoin de ralentir leur métabolisme. RsaE serait impliqué dans cette adaptation, d'autant plus qu'il est régulé par le TCS SrrAB induit par une diminution de la synthèse de ménaquinone (Mashruwala et al., 2017 ; Rochat et al., 2018). Un autre ARNreg nommé RsaI favorise l'adaptation de S. aureus aux conditions de son environnement. Dans un environnement pauvre en glucose, RsaI favorise une réorientation du métabolisme en inhibant l'expression des gènes glcU et fn3K, encodant respectivement une glucose perméase et une enzyme de protection contre les fortes concentrations de glucose. Mais indépendamment de ses cibles métaboliques, Bronesky et al. ont démontré que RsaI stabilisait l'ARNm icaR ce qui inhibe l'expression de l'opéron ica et donc la formation de biofilms (Bronesky et al., 2019).

Dans tous ces exemples, l'étape clé est la formation de complexes entre ARNreg et leurs ARNm cibles, codant pour des facteurs de virulence, impliqués dans la formation de biofilms ou dans l'adaptation de *S. aureus* aux stress environnementaux et aux antibiotiques. Ces ARNreg importants pour la pathogénie de *S. aureus* sont regroupés dans le **Tableau 5**.

ARNreg	Cibles connues	Fonctions	Références
SprC	inhibe l'ARNm <i>atl</i> de l'autolysine	diminution de la phagocytose et de la dissémination de <i>S. aureus</i>	Le Pabic <i>et al.</i> , 2015
SprD	réprime la traduction de <i>sbi</i> en phase exponentielle de croissance	régulation de Sbi en coopération avec l'ARN III	Chabelskaya <i>et al.</i> , 2010 ; Chabelskaya <i>et al.</i> , 2014
SprX1	réprime la traduction de <i>spoVG</i> , stimule la traduction de <i>clfB</i> et <i>hld</i>	résistance aux antibiotiques, virulence	Eyraud <i>et al.</i> , 2014 ; Kathirvel <i>et</i> <i>al.</i> , 2016
RsaA	réprime l'expression de <i>mgrA</i> , de gènes codant des hydrolases de la paroi et une molécule immunomodulatrice (FIR)	régulation de la virulence, favorise une infection chronique, stimule la formation de biofilm	Romilly <i>et al.</i> , 2014 ; Tomasini <i>et al.</i> , 2017
RsaE	inhibe les gènes du cycle métabolique de l'acide tricarboxylique (TCA) et de la biosynthèse des folates, inhibe l'ARNm rocF codant une arginase	Adaptation du métabolisme, surtout chez les SCVs	Geissmann <i>et al.</i> , 2009, Bohn <i>et al.</i> , 2010 ; Rochat <i>et</i> <i>al.</i> , 2018
RsaI	inhibe les ARNm glcU et fn3k, stabilise l'ARNm icaR	adaptation du métabolisme et inhibition de la formation de biofilm	Bronesky <i>et al.</i> , 2019
RsaOX	transposase hypothétique SA0062	stabilité du génome	Bohn et al., 2010
SSR42		hémolyse, échappement au complément en phase stationnaire de croissance	Morrison <i>et al.</i> , 2012b
ArtR	active l'expression de l'hémolysine α, ARNm <i>sarT</i>	virulence, favorise la dégradation de <i>sarT</i>	Xue et al., 2014

Tableau 5 : Principaux ARNreg impliqués dans la pathogénie de S. aureus

Parmi les ARNreg identifiés par Pichon *et al.* en 2005, SprA et SprG sont associés à un ARN antisens codé en *cis*, SprA_{AS} et SprF respectivement. Leur étude a démontré qu'ils formaient des systèmes toxine-antitoxine (STA) de type I (Sayed *et al.*, 2011, Pinel-Marie *et al.*, 2014).

II. Les systèmes toxine-antitoxine de type I

Les STA sont de petits modules génétiques codant une toxine stable, dont la surexpression induit la mort ou la stase bactérienne, et son antitoxine labile, qui neutralise l'activité de la toxine (Van Melderen & Saavedra De Bast, 2009). De nombreux STA sont présents dans les génomes des bactéries et des archaebactéries. Ils sont classés en six types selon la nature de l'antitoxine et son mode d'action. Alors que la toxine est toujours une protéine, l'antitoxine est soit un ARN (type I et III), soit une protéine (type II, IV, V et VI). Quel que soit la nature de l'antitoxine, son action a toujours pour but d'inhiber la synthèse de la toxine, de la séquestrer ou de contrebalancer son activité toxique (Lobato-Marquez *et al.*, 2016).

A. Classification des systèmes toxine-antitoxine

1. Les systèmes toxine-antitoxine avec une antitoxine de nature ARN

Chez les STA de type I et de type III, la toxine est une protéine et l'antitoxine un petit ARN non codant. Les STA de type I sont les mieux caractérisés parmi les STA ayant une antitoxine de nature ARN. Dans ces systèmes, l'antitoxine est un ARN antisens interagissant par appariements de bases avec l'ARNm codant la toxine afin d'inhiber sa traduction et/ou d'induire sa dégradation. Des STA de type I ont été découverts chez les bactéries Gram positive et négative, sous la forme de deux gènes chevauchants transcrits de manière convergente ou sous la forme de deux unités de transcription divergentes et n'appartenant pas au même locus. Du fait de ces différentes organisations génomiques retrouvées chez les STA de type I, on distingue les antitoxines qui sont des ARN antisens codés en *cis* et les antitoxines codées en *trans* par rapport au gène de la toxine (Brantl, 2012). A l'exception des peptides cytoplasmiques SymE et de RalR, les toxines de type I sont de petits peptides hydrophobes possédant un domaine transmembranaire putatif et capables de former des pores dans les membranes cellulaires ou d'induire la condensation du nucléoïde (Brielle *et al.*, 2016).

Contrairement à l'antitoxine de type I qui s'apparie avec l'ARNm de la toxine pour favoriser la dégradation de l'ARN duplex et/ou inhiber sa traduction, l'antitoxine de type III

interagit directement avec la toxine protéique pour la séquestrer grâce à une structure avec des pseudo-nœuds (Page & Peti, 2016 ; **Figure 19**). Le premier STA de type III découvert, et aussi le plus étudié, est le système *toxIN* du phytopathogène *Pectobacterium atrosepticum* (aussi appelé *Erwinia carotovora* sous-espèce *atroseptica*) impliqué dans la protection de la bactérie contre les bactériophages (Fineran *et al.*, 2009 ; Short *et al.*, 2013). Le locus *toxIN* comporte certaines particularités. Il est précédé par des répétitions nucléotidiques en tandem en amont du gène de l'antitoxine *toxI* et il possède une courte séquence répétée de palindromes entre le gène *toxI* et le gène *toxN* codant la toxine. La toxine ToxN est une RNase qui clive notamment le transcrit *toxIN* et permet la maturation de l'antitoxine ARN ToxI. L'antitoxine ARN ToxI peut alors aller s'associer à la toxine au niveau du site actif, inhibant son activité (Page & Peti, 2016, **Figure 19**).



Figure 19 : Représentation schématique des STA avec une antitoxine ARN. Les toxines sont représentées en jaune et les antitoxines en orange à la fois pour les STA de type I en A et pour les STA de type II en B.

2. Les systèmes toxine-antitoxine avec une antitoxine protéique

Les STA de type II

Ce sont de loin les STA les plus répandus dans les génomes bactériens avec plus d'une centaine de STA identifiés, et donc les plus étudiés. Les antitoxines de type II possèdent deux domaines, un domaine N-terminal très structuré avec des motifs de liaison à l'ADN et un second domaine plus désorganisé en C-terminal impliqué dans l'interaction avec la toxine et sa

neutralisation (Lobato-Marquez et al., 2016). Dans la plupart des cas, les STA de type II fonctionnent avec une boucle d'autorégulation assurée par l'antitoxine qui avec son domaine de liaison à l'ADN, va se fixer sur le promoteur de l'opéron pour réprimer la transcription du STA, avec parfois la toxine comme co-répresseur. Pour beaucoup de STA de type II, cette répression de l'expression du STA est dépendante du ratio de toxine et d'antitoxine présentes dans la bactérie. Lorsque l'antitoxine est en excès, elle est complexée avec la toxine, inhibant son activité toxique et l'expression de l'opéron. Mais lorsque la quantité de toxines augmente, la stœchiométrie du complexe change et la répression est levée pour permettre la production d'antitoxines (Lobato-Marquez et al., 2016 ; Figure 20 A). Les toxines et antitoxines de type Il diffèrent par leur sensibilité à être dégradées par des protéases ATP-dépendantes comme les protéases Lon ou Clp. Les toxines sont stables alors que les antitoxines sont hautement sensibles à la protéolyse. Les antitoxines de type II ont une structure tridimensionnelle partiellement organisée, ce qui les exposerait de manière plus importante à l'action des protéases que les toxines de type II. Cette différence de stabilité explique en partie l'organisation génomique de la plupart des opérons des STA de type II où le gène de l'antitoxine est transcrit en premier pour assurer un pool constant d'antitoxines pour neutraliser les toxines plus stables (Chan et al., 2016 ; Figure 20 A).

L'action toxique des toxines de type II entraine la perturbation de processus cellulaires essentiels comme la réplication et la traduction. Les toxines inhibant la réplication peuvent agir par inhibition de l'ADN gyrase et c'est le cas des toxines CcdB et ParE (Bernard *et al.*, 1993 ; Jiang *et al.*, 2002). La traduction des protéines est affectée à différents niveaux par les toxines de type II. Par exemple, les toxines RelE, MazF et MqsR sont des RNases clivant leurs ARNm cibles au niveau de sites spécifiques (Pedersen *et al.*, 2003 ; Yamaguchi *et al.*, 2009). D'autres toxines comme TacT chez *Salmonella*, ItaT et AtaT chez *E. coli* inhibent la traduction bactérienne en acétylant les ARN de transfert aminoacylés (Cheverton *et al.*, 2016 ; Jurenas *et al.*, 2017 ; Wilcox *et al.*, 2018). Le facteur d'élongation ribosomique EF-Tu est également inhibé par la toxine Doc du STA *phd-doc* (Castro-Roa *et al.*, 2013). Cependant, la grande majorité des toxines de type II sont des endoribonucléases (RNases) dépendantes ou non des ribosomes, inactivant la traduction des ARNm cibles. Certaines toxines comme RelE, YoeB, YafO et HigB chez *E. coli* se fixent directement au niveau du site A du ribosome où elles clivent les ARNm présents au ribosome. En revanche, les RNases MqsR et MazF sont ribosomes indépendantes (Page & Peti, 2016).

> Les nouveaux types de STA : types IV, V et VI

Les STA de type IV sont aussi formés d'une toxine et d'une antitoxine de nature protéique. Cependant, la neutralisation de la toxine par l'antitoxine ne s'effectue pas par interaction directe entre les deux partenaires mais en bloquant l'accès de la toxine à sa cible cellulaire (**Figure 20 B**). Le premier STA de type IV découvert est *yeeUV* chez *E. coli*. La toxine YeeV inhibe la croissance de la bactérie en se fixant sur les protéines MreB et FtsZ impliquées dans la polymérisation du cytosquelette, bloquant alors la division cellulaire. De son côté, l'antitoxine YeeU contrebalance l'activité toxique de YeeV en stabilisant l'assemblage des protéines du cytosquelette MreB et FtsZ (Masuda *et al.*, 2012).

Seulement un seul STA de type V est connu à ce jour, nommé *ghoST*, présent chez *E. coli* et *Shigella spp*. Pour ce STA, l'antitoxine GhoS est une RNase qui, en conditions de croissance normale, clive l'ARNm de la toxine GhoT, inhibant sa traduction (**Figure 20 C**). Cependant, en conditions de stress, l'ARNm de l'antitoxine GhoS est dégradé par la toxine MqsR, appartenant à un STA de type II. La dégradation de l'antitoxine permet la traduction de la toxine GhoT, petit peptide hydrophobe qui perturbe le potentiel membranaire et donc la production d'ATP par la bactérie. GhoT est donc régulée à la fois par l'antitoxine GhoS mais aussi par le STA de type II MqsRA qui agissent de manière coordonnée pour contrôler la traduction de GhoT (Wang *et al.*, 2012, 2013).

Plus récemment, c'est chez *Caulobacter crescentus* qu'a été mis en évidence un nouveau type de STA (type VI). La toxine SocB inhibe l'étape d'élongation de la réplication de l'ADN par fixation directe sur sa cible DnaN. L'antitoxine SocA est une protéine adaptatrice qui neutralise la toxicité de SocB en favorisant sa dégradation par la protéase ClpXP (Aakre *et al.*, 2013 ; **Figure 20 D**).



Figure 20 : Représentation schématique des STA avec une antitoxine de nature protéique. Les toxines sont représentées en jaune et les antitoxines en orange à la fois pour les STA de type II en A, de type IV en B, de type V en C et de type VI en D.

B. Les systèmes toxine-antitoxine de type I

1. Historique

Les STA de type I ont été initialement découverts dans les années 80 sur des plasmides comme étant impliqués dans leur maintenance. Ainsi, la stabilité des plasmides R1 et pAD1 au cours des divisions bactériennes est assurée entre autres, par les STA de type I *hok*/Sok (locus *parB*) pour le plasmide R1 de *E. coli*, et par *fst*/RNAII pour le plasmide pAD1 d'*Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) (Gerdes *et al.*, 1986 ; Weaver *et al.*, 1996). La fonction de ces STA dans le maintien de ces plasmides s'exerce par un mécanisme de post-segregational killing (PSK). Lorsqu'une copie du plasmide n'est pas transmise à la bactérie fille, l'antitoxine labile est rapidement dégradée. La toxine est alors traduite amenant à la mort de la bactérie qui a perdu le plasmide. Les bactéries possédant toujours le plasmide ne sont pas affectées par l'effet de la toxine grâce à la synthèse *de novo* et continue d'antitoxine (Van Melderen, 2010 ; **Figure 21**). La présence de tels éléments stabilisateurs sur des plasmides porteurs de gènes de résistance

aux antibiotiques participe à leur maintien au cours des générations bactériennes en absence de pression de sélection et augmente leur prévalence chez les bactéries par rapport à un plasmide dépourvu de STA (Wang *et al.*, 2015).

Par la suite, des homologues de ces STA plasmidiques ont été identifiés dans le chromosome bactérien, notamment lors d'études visant à découvrir de petits ARN exprimés par les bactéries (Sharma *et al.*, 2010; Fozo *et al.*, 2010). Pour beaucoup de ces STA chromosomiques, leur fonction est encore inconnue.

Effet PSK



Croissance normale des bactéries

Figure 21 : Effet de « post-segregational killing » (PSK) lors de la non transmission verticale d'un plasmide codant un STA. La partie gauche de la figure représente les bactéries filles récupérant le plasmide encodant le STA lors de la division cellulaire. La partie droite correspond à une bactérie fille n'héritant pas de ce plasmide et subissant l'effet PSK.

2. <u>Régulation de l'expression de la toxine</u>

Afin d'éviter leur autodestruction ou le ralentissement de leur croissance, les bactéries encodant des STA ont besoin de réprimer en permanence la production de toxines. L'organisation génomique des STA de type I est une exception car contrairement aux autres types, les deux gènes ne sont pas dans un opéron, mais ont chacun leur promoteur. Les antitoxines de types I neutralisent la production des toxines en inhibant la traduction de leur ARNm, en induisant la dégradation des ARNm des toxines par des RNases spécifiques ou via
les deux mécanismes (Brantl & Jahn, 2015). Mais indépendamment des antitoxines, il existe un premier niveau de contrôle de l'expression des toxines de type I avec la structure secondaire et la maturation des ARNm.

2.1. Inhibition de l'expression des toxines grâce à la structure des ARNm

Les ARNm des toxines de type I sont très structurés afin de prévenir l'expression du peptide toxique par différents mécanismes : la séquestration de la séquence SD, le besoin d'étapes de maturation de l'ARNm ou le blocage de la charge du ribosome au niveau d'une séquence additionnelle spécifique (Standby RBS) (Masachis & Darfeuille, 2018).

> La séquestration de la séquence SD au niveau de l'ARNm de la toxine

Classiquement, l'efficacité de l'initiation de la traduction est liée à deux éléments de l'ARNm : son accessibilité pour les ribosomes et sa structure au niveau de la région d'initiation de la traduction (TIR). Bloquer cette accessibilité est donc un moyen de contrôler l'expression de gènes toxiques, d'autant plus que transcription et traduction sont souvent couplées chez les procaryotes. Ainsi, la formation d'un transcrit primaire non traductible à cause de sa structure interne emprisonnant la SD via une séquence anti-SD a été mis en évidence pour les toxines de type I Fst, TxpA, BsrE et BsrG chez les bactéries Gram positive (Masachis & Darfeuille, 2018 ; **Figure 22**).

De plus, la structure secondaire de ces ARN non traductibles est essentielle à leur stabilité. En effet, contrairement à d'autres ARNm bactériens, ces transcrits primaires ont des demi-vies très élevées suggérant que la structure très compacte des ARNm des toxines de type I diminue leur dégradation par les RNases (Masachis & Darfeuille, 2018). Des exceptions existent à ce repliement emprisonnant la SD de l'ARNm de la toxine. Chez *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), l'ARNm de la toxine YonT (STA *yonT*/SR6) ne possède pas une structure masquant la SD mais possède un codon d'initiation de la traduction non canonique (GUG) qui réduit le taux de traduction de la toxine en diminuant l'affinité de l'ARNt^{fmet} pour le codon d'initiation de la traduction de la traduction (Reif *et al.*, 2018).



Figure 22 : Exemples de structures secondaires séquestrant la séquence SD chez des ARNm de toxines de type I. Les séquences antisens de la SD sont surlignées en noir alors que les séquences SD sont surlignées en rouge (Adaptée de Meissner *et al.*, 2016 et Masachis & Darfeuille, 2018).

Présence d'une étape d'activation pour la traduction de l'ARNm des toxines

Certains ARNm de toxines nécessitent une étape d'activation pour permettre leur traduction. Ainsi, les ARNm *aapA1* et *hok* appartenant respectivement aux STA *aapA1/*IsoA1 d'*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) et *hok/*Sok chez *E. coli* ont besoin d'un clivage au niveau de leur extrémité 3'-UTR. Cette maturation des ARNm *aapA1* et *hok* induit un réarrangement de la partie 5'-UTR. Cependant, pour l'ARNm *hok*, l'activation de la traduction dépend aussi de la traduction couplée d'un cadre ouvert de lecture (ORF) situé en amont, et encodant le peptide Mok (Masachis & Darfeuille, 2018). Dans le cas de STA de type I dont les deux gènes sont non chevauchants comme *tisB/*IstR1, *dinQ/*AgrAB, *shoB/*OhsC et *zorO/*OrzO, le clivage de l'ARNm de la toxine conduisant à sa traduction s'effectue au niveau de son extrémité 5'-UTR. Ce clivage induit un changement structural de l'ARNm permettant à la fois la fixation du ribosome pour la traduction de la toxine et celle de l'antitoxine pour inactiver l'ARNm de la toxine (Masachis & Darfeuille, 2018). Par exemple, pour le système *dinQ/*AgrAB, le clivage au niveau de l'extrémité 5'-UTR de l'ARNm *dinQ* induit d'importants réarrangements et notamment l'ouverture d'une structure tige-boucle libérant la SD et permettant ainsi la traduction de la toxine DinQ (Kristiansen *et al.*, 2016).

Présence d'un site de standby du ribosome

Pour certains STA de type I, le réarrangement structural induit par le clivage de maturation ne permet pas l'accessibilité de la SD sur l'ARNm de la toxine. Ces ARNm, par exemple *tisB* et *zorO*, nécessitent la présence d'un site de standby du ribosome (Standby RBS), une région simple brin permettant le chargement de la sous-unité 30S du ribosome (Masachis

& Darfeuille, 2018). Le transcrit primaire *tisAB* est clivé en 5' formant un transcrit plus court mais pour lequel la SD est toujours emprisonnée dans une structure en tige-boucle. Cependant, ce clivage expose une région au niveau de la 5'-UTR de l'ARNm permettant l'accès de la sousunité 30S du ribosome (Darfeuille *et al.*, 2007). Un mécanisme similaire est également suggéré pour l'ARNm de la toxine ZorO (Wen *et al.*, 2017)

La régulation de la traduction des toxines de type I peut être résumée par le modèle suivant. Au cours de la transcription, la traduction du transcrit en formation et la fixation de l'antitoxine sont réprimées par la formation de structures secondaires de l'ARNm de la toxine séquestrant la séquence SD. A la fin de la transcription, l'ARNm de la toxine n'est pas traductible à cause d'une conformation emprisonnant le RBS. Puis un clivage intervient entraînant un changement de structure de l'ARNm de la toxine rendant possible l'interaction avec les ribosomes et avec l'antitoxine. Si un ribosome se fixe, le peptide toxique est traduit, entraînant un arrêt de la croissance ou la mort des bactéries alors que si l'antitoxine se fixe, la toxicité est neutralisée (Masachis & Darfeuille, 2018).

2.2. Les antitoxines inhibant la traduction des toxines

Par définition, chez les STA de type I, l'inhibition de la synthèse de la toxine est effectuée grâce à un ARN antisens à l'ARNm de la toxine, qui s'apparie au niveau de séquences complémentaires. Selon la localisation génomique de l'antitoxine encodée en *cis* ou en *trans* de la toxine, la région et la longueur de l'appariement peuvent varier.

L'exemple type d'antitoxine inhibant la traduction de la toxine est SymR de *E. coli* qui en s'appariant au niveau de sa région complémentaire sur l'ARNm de la toxine SymE, bloque directement l'accès du ribosome à la séquence SD (**Figure 23 A**). Dans le cas de *hok*/Sok, l'inhibition de la traduction de Hok par l'antitoxine est indirecte. En effet, l'antitoxine Sok s'apparie au niveau de la SD de l'ARNm codant le peptide leader Mok, nécessaire à la traduction de l'ARNm *hok* (**Figure 23 B**). L'inhibition de la traduction peut aussi s'effectuer par appariement de l'antitoxine au niveau du RBS de l'ARNm de la toxine, c'est le cas pour le STA *tisB/*IstR1 (**Figure 23 C**; Brantl & Jahn, 2015).



Figure 23 : Exemples de mécanismes d'action employés par des antitoxines de type I chez les bactéries Gram négative. A) Exemple du système *symE*/SymR, B) Exemple du système *hok*/Sok et C) Exemple du système *tisB*/IStR1 (Adaptée de Brantl & Jahn, 2015).

Chez les bactéries Gram positive, les antitoxines sont majoritairement encodées en *cis*, de manière chevauchante avec la région 3' de l'ARNm de la toxine. Bien que cette organisation suggère un appariement étendu entre l'antitoxine asARN et son ARNm cible, l'appariement initial est souvent médié par des régions simple brin formées après la maturation des ARN, via des interactions « kissing-loop » (Durand *et al.*, 2012 ; Arnion *et al.*, 2017). Après cette première interaction, un appariement plus étendu survient, formant un long ARN duplex stable qui dans la plupart des cas masque la SD et inhibe la traduction de la toxine (Masachis & Darfeuille, 2018).

Par exemple, l'antitoxine SR4 partage une région complémentaire d'environ 120 paires de bases avec l'ARNm de la toxine BsrG. L'interaction entre les deux ARN provoque un changement de la structure de l'ARNm *bsrG* qui obstrue la SD et donc inhibe la traduction de BsrG (Jahn & Brantl, 2013 ; **Figure 24 A**).

Contrairement aux exemples donnés précédemment, l'antitoxine RNAII et l'ARNm de la toxine Fst (RNAI) possèdent deux régions complémentaires (nommées Site 1 et Site 2 sur la **Figure 24**), à proximité de la SD, toutes les deux impliquées dans la régulation du système *fst*/RNAII d'*E. faecalis*. L'antitoxine RNAII se fixe d'abord en 3' de l'ARNm *fst* puis à une région complémentaire plus étendue en 5' afin de former un ARN duplex stable inhibant la traduction de la toxine Fst (Greenfield *et al.*, 2001 ; **Figure 24 B**).



Figure 24 : Exemples de mécanismes d'action employés par les antitoxines de type I SR4 (A) et RNA II (B) chez des Bactéries Gram positive. (Adaptée de Brantl & Jahn, 2015).

2.3. Les antitoxines favorisant la dégradation de l'ARNm de la toxine

En plus de l'inhibition de la traduction, la fixation de l'antitoxine peut également conduire à la dégradation de l'ARNm de la toxine. Ainsi, le clivage de l'ARN duplex toxine-antitoxine par la RNase III a été démontré pour les ARNm des toxines AapA1, Hok, TisB, BsrG et BsrE (Masachis & Darfeuille, 2018). Pour l'antitoxine SR6, l'appariement de SR6 en 3' de l'ARNm de la toxine YonT ne suffit pas à inhiber la synthèse de la toxine. Le clivage de l'ARN duplex *yonT*-SR6 est donc l'étape permettant finalement la neutralisation de l'expression de la toxine YonT (Reif *et al.*, 2018).

La RNase III n'est pas la seule RNase impliquée dans ces dégradations d'ARN ciblées par les antitoxines de type I. Chez *B. subtilis*, l'endoribonucléase Y (RNase Y), les exoribonucléases PnpA et J1 puis la RNase III participent toutes à la dégradation du complexe *txpA*-RatA soulignant un schéma complexe de dégradation de l'ARNm *txpA* induit par l'antitoxine RatA (Durand *et al.*, 2012). C'est aussi le cas pour le STA *bsrE*/SR5, toujours chez *B. subtilis*, car la demi-vie de l'antitoxine SR5 n'est pas impactée par la RNase III. Là encore, Müller *et al.* ont démontré que la RNase J1 est la principale RNase responsable de la dégradation de *bsrE* et SR5 alors que la RNase Y dégrade les deux ARN en présence d'un stress éthanol (Müller *et al.*, 2016). Enfin, il existe des antitoxines qui agissent via plusieurs

mécanismes. L'antitoxine SR4 inhibe la traduction de l'ARNm *bsrG*, mais elle conduit également à sa dégradation (Jahn & Brantl, 2013).

Figure 25 : Exemple d'antitoxine ciblant la dégradation de l'ARNm de la toxine par des **RNases.** (Adaptée de Brantl & Jahn, 2015).



3. Les fonctions biologiques des STA de type I

Les premiers STA de type I découverts sont impliqués dans la stabilité des éléments génétiques qui les encodent, soit le plasmide pAD1 d'*E. faecalis* pour *fst*/RNA II et le plasmide R1 d'*E. coli* pour *hok*/Sok. Ce sont deux EGM conjugatifs retrouvés dans des isolats cliniques et encodant des gènes impliqués dans la résistance aux UV et l'hémolyse pour pAD1, et la résistance aux antibiotiques de la famille des sulfamides et des aminoglycosides pour le plasmide R1 (Francia *et al.*, 2001 ; Cox & Schildbach, 2017).

L'implication des STA plasmidiques dans le maintien de l'EGM qui les porte au cours des divisions bactériennes semble claire, mais les rôles joués par les STA chromosomiques demeurent flous pour la plupart d'entre eux. Encodés dans le chromosome bactérien, les STA exercent des fonctions plus diverses même si dans le cas du système *txpA*/RatA codé au sein du prophage *skin* chez *B. subtilis*, celui-ci permettrait le maintien de cet élément génétique lors de la sporulation lorsqu'il s'excise du chromosome (Silvaggi *et al.*, 2005). Il a aussi été montré que l'activation du système *txpA*/RatA permet d'éliminer les bactéries défectueuses et de maintenir la symétrie du biofilm chez *B. subtilis*, via l'action de la toxine TxpA en synergie avec une toxine d'un STA de type II (Bloom-Ackermann *et al.*, 2016). D'autres STA chromosomiques de type I ont une fonction suggérée dans l'homéostasie de la bactérie, via

différentes voies métaboliques. Ainsi, Kawano *et al.* ont démontré que l'expression de gènes de l'opéron *pur* permettant la synthèse *de novo* des purines est induite lors de la surexpression de la toxine LdrD, suggérant une implication de *ldrD*/RdlD dans le métabolisme des purines chez *E. coli* (Kawano *et al.*, 2002). La surexpression de ShoB entraîne quant à elle l'expression de plusieurs gènes de réponse au stress et de transport des sucres, suggérant également une implication du système *shoB*/OhsC dans le métabolisme de *E. coli* (Fozo *et al.*, 2008). L'activité RNase de la toxine SymE et l'induction de son expression lors de la réponse SOS permettent à Kawano *et al.* de proposer une fonction originale pour le système *symE*/SymR dans le recyclage d'ARN endommagés chez *E. coli* en conditions de réponse SOS (Kawano *et al.*, 2007). Les stress rencontrés par la bactérie dans son environnement seraient les éléments déclencheurs de l'activation des STA. Par exemple, pour le STA *bsrG*/SR4 de *B. subtilis*, la dégradation de l'ARNm de la toxine BsrG est favorisée après un choc thermique à 48 °C (Jahn *et al.*, 2012). Chez *E. coli*, Chukwudi *et al.* ont démontré l'implication de *hok*/Sok dans la réponse de la bactérie aux stress exercés par des températures élevées et par les antibiotiques de la famille des β-lactamines (Chukwudi & Good, 2015).

Certains STA chromosomiques pourraient être impliqués dans la pathogénie des bactéries, en lien avec la formation de biofilms et de bactéries persistantes. L'expression de la toxine RalR est induite dans un biofilm mature de *E. coli* (biofilm à 24 h versus 4 h). De plus, le STA *ralR*/RalA pourrait participer à la résistance à la fosfomycine puisqu'un mutant délété de *ralR* ou du système entier semble plus sensible à cet antibiotique comparé à la souche sauvage (Domka *et al.*, 2007, Guo *et al.*, 2014). Chez *Salmonella Typhimurium*, une bactérie pathogène fréquemment retrouvée en intracellulaire, la production des toxines de type I LdrA_{ST}, Hok_{ST} et TisB_{ST} entre autres, permettrait à *Salmonella* de pouvoir survivre en état de dormance dans les fibroblastes (Lobato-Marquez *et al.*, 2015).

De nombreuses investigations sur la persistance bactérienne s'intéressent au rôle joué par les STA dans ce phénomène, étroitement lié à la chronicité des infections bactériennes. L'implication dans la formation de bactéries persistantes en réponse à une carence nutritive a été recherchée pour la toxine HokB chez *E. coli*. Il a été démontré que la réponse stringente associée à une accumulation de la concentration intracellulaire de (p)ppGpp augmente la concentration intracellulaire de la protéine Obg, ce qui induit l'expression de la toxine HokB. Puis, l'activité toxique de HokB entraîne la formation de pores dans la membrane bactérienne et sa dépolarisation, ce qui provoquerait une stase permettant à *E. coli* de tolérer l'ofloxacine et la tobramycine (Verstraeten *et al.*, 2015; Wilmaerts et al., 2018). L'implication dans la formation de bactéries persistantes a également été démontrée pour le système *tisB*/IstR1 chez *E. coli*, induit lors de la réponse SOS. Lors de l'activation de la réponse SOS, l'action de la toxine TisB au niveau de la membrane des bactéries entraîne la formation de pores et la diminution de la force proton-motrice, ce qui induirait l'état de dormance des bactéries et leur permettrait de tolérer les fluoroquinolones et les β -lactamines (Dörr *et al.*, 2010; Gurnev *et al.*, 2012). Le **Tableau 6** ci-dessous permet de compléter cette liste non exhaustive de fonctions biologiques occupées par des STA de type I, à l'exception des STA de type I de *S. aureus*, détaillés dans le contexte de ma thèse.

Systèmes TA	Localisation génomique	Nombre de systèmes	Localisation et mécanisme de la toxine	Références				
Maintien d'un EGM par effet PSK								
fst/RNAII	Plasmide pAD1 d' <i>E. faecalis</i>	1	Membrane, condensation du nucléoïde	Greenfield <i>et</i> <i>al.</i> , 2000 ; Weaver <i>et al.</i> , 2009				
ipt/RNAII*	Plasmide de Lactobacillus rhamnosus	1	?	Folli <i>et al.</i> , 2017				
<i>hok/</i> Sok	Plasmide R1 d' <i>E. coli</i>	1	Membrane, formation de pores	Gerdes <i>et al.</i> , 1986				
<i>srnB'</i> /SrnC-RNA	Plasmide F d'E. coli	1	Membrane, mécanisme inconnu	Nielsen <i>et al.</i> , 1991				
pndA/PndB-RNA	Plasmide R483 d' <i>E. coli</i>	1	Membrane, mécanisme inconnu	Nielsen <i>et al.</i> , 1991				
Adaptation de la bactérie à des stress multiples								
<i>bsrH</i> /as-bsrH*	Elément skin (prophage) de <i>B. subtilis</i>	1	?	Durand <i>et al.</i> , 2012				
bsrG/SR4*	Prophage SPβ dans le chromosome de <i>B. subtilis</i>	1	Membrane, invaginations membranaires induisant l'autophagie	Jahn & Brantl, 2013 ; Jahn <i>et</i> <i>al.</i> , 2015				
bsrE/SR5*	Région P6 prophage- like chromosomique de <i>B. subtilis</i>	1	Membrane, mécanisme inconnu	Müller <i>et al.</i> , 2016 ; Meissner <i>et</i> <i>al.</i> , 2016				
yonT/SR6*	Prophage SPβ dans le chromosome de <i>B. subtilis</i>	1	?	Reif <i>et al.</i> , 2018				

Tableau 6 : Distribution des STA de type I identifiés chez les bactéries selon leur fonction

 Tableau 6 suite : Distribution des STA de type I identifiés chez les bactéries selon leur fonction

Systèmes TA	Localisation génomique	Nombre de systèmes	Localisation et mécanisme de la toxine	Références			
Immunité de la bactérie (colocalisation avec système CRISPR)							
CDS2517.1/RCd8*	Chromosome de Clostridium difficile	jusqu'à 6	Membrane, mécanisme inconnu	Maikova <i>et al.</i> , 2018			
Implication dans la persistance bactérienne aux antibiotiques							
fst-Sm /SrSm ^{*^a}	Chromosome de Streptococcus mutans	1	Membrane, mécanisme inconnu	Koyanagi & Lévesque, 2013			
<i>hok/</i> Sok ^{*b}	Chromosome des Entérobactéries	jusqu'à 15	Membrane, formation de pores	Pedersen & Gerdes, 1999			
<i>hokB</i> /SokB ^b	Chromosome de <i>E. coli</i> K-12	1	Membrane, formation de pores	Verstraeten et al., 2015 ; Wilmaerts <i>et</i> <i>al.</i> , 2018			
<i>tisB/</i> IstR1 ^{b, c}	Chromosome de E. coli	1	Membrane, dépolarisation membranaire	Gurnev <i>et al.</i> , 2012 ; Berghoff <i>et</i> <i>al.</i> , 2017			
Implication dans le métabolisme énergétique et des acides nucléiques							
<i>ldr</i> /Rdl*	Chromosome E. coli K- 12, des Salmonella et des Shigella	jusqu'à 10	Membrane, condensation du nucléoïde	Kawano <i>et al.</i> , 2002			
shoB/OhsC*	Chromosome E. coli et des Shigella	1	Membrane, mécanisme inconnu	Fozo <i>et al.</i> , 2008			
<i>symE/</i> SymR* ^c	Chromosome E. coli	1	Cytoplasme, RNase	Kawano <i>et al.</i> , 2007			
dinQ/AgrAB* ^c	Chromosome E. coli	1	Membrane, condensation du nucléoïde	Weel-Sneve et al., 2013			
Implication dans la pathogénie des bactéries							
ralR/RalA*	Prophage <i>rac</i> dans le chromosome d' <i>E. coli</i>	1	Cytoplasme, DNase	Guo <i>et al.</i> , 2014			

 Tableau 6 suite : Distribution des STA de type I identifiés chez les bactéries selon leur fonction

Systèmes TA	Localisation génomique	Nombre de systèmes	Localisation et mécanisme de la toxine	Références			
Implication dans le cycle de vie d'un biofilm							
<i>txpA</i> /RatA	Elément skin (prophage) de <i>B. subtilis</i>	jusqu'à 6	Membrane, mécanisme inconnu	Silvaggi <i>et</i> <i>al.</i> , 2005 ; Bloom- Ackermann <i>et al.</i> , 2016			
Fonction inconnue							
<i>ibs</i> /Sib	Chromosome des Entérobactéries et d' <i>H. pylori</i>	jusqu'à 7	Membrane, mécanisme inconnu	Fozo <i>et al.</i> , 2008 ; Sharma <i>et</i> <i>al.</i> , 2010			
<i>zor0</i> /OrzO	Chromosome E. coli	2	?	Wen <i>et al.</i> , 2014, Wen <i>et al.</i> , 2017			
<i>аарА1/</i> IsoA1	Chromosome d' <i>H pylori</i>	jusqu'à 2	?	Arnion <i>et</i> <i>al.</i> , 2017			
aapA/IsoA	plasmide d' <i>H. pylori</i> et de <i>Campylobacter</i>	jusqu'à 9	?	Arnion <i>et</i> <i>al.</i> , 2017			

* : La fonction biologique des systèmes marqués avec un astérisque nécessite des expériences complémentaires pour être clairement démontrée.

^a : Inhibition de la persistance lors d'une légère surexpression du système.

^b : La formation de bactéries persistantes serait favorisée par ces systèmes.

^c : Systèmes dont l'expression est induite par la réponse SOS.

C. Abondance des STA dans les génomes bactériens

Les STA sont largement répandus dans les génomes (core génome et EGM) des bactéries et archaébactéries. De plus, le **Tableau 6** permet de mettre en avant un point sur les STA de type I, c'est leur présence parfois en plusieurs copies dans le génome des bactéries, jusqu'à 15 copies pour *hok*/Sok chez les Entérobactéries par exemple. Les STA de types II sont aussi parfois en copies multiples dans les génomes et l'exemple le plus flagrant est *M. tuberculosis*

avec au moins 79 STA dont 50 de la famille VapBC et 10 de la famille MazEF (Sala *et al.*, 2014). Une telle redondance pourrait expliquer la difficulté de trouver leurs fonctions biologiques pour la bactérie. La multiplicité des STA dans les génomes des bactéries suggère que des interactions croisées peuvent avoir lieu entre plusieurs copies de STA appartenant à une même famille. A ce sujet, nous avons voulu regrouper les études considérant cette thématique de la recherche sur les STA dans une revue en cours de rédaction et intitulée « Cross-interactions between bacterial toxin-antitoxin systems: an interconnected network », par **Camille Riffaud**, Marie-Laure Pinel-Marie et Brice Felden.

<u>Article 1</u>

Cross-interactions between bacterial toxin-antitoxin systems: an interconnected network

Camille Riffaud, Marie-Laure Pinel-Marie and Brice Felden

en préparation

Cross-interactions between bacterial toxin-antitoxin systems: an interconnected network

Camille Riffaud¹, Marie-Laure Pinel-Marie^{1†} and Brice Felden^{1†}

¹Inserm, BRM [Bacterial Regulatory RNAs and Medicine] - UMR_S 1230, 35000 Rennes, France.

[†]email: <u>marie-laure.pinel@univ-rennes1.fr;</u> bfelden@univ-rennes1.fr

Abstract

Toxin-antitoxin (TA) systems are ubiquitous among bacteria and consist of stable toxins whose toxicity is counteracted by a RNA or a protein antitoxin. They are involved in multiple functions associated with stress survival, influencing bacterial physiology to promote stress adaptation. They are classified into six types, depending on the nature and mode of action of the antitoxins. In type I and III, antitoxins are RNAs that either inhibit the synthesis of the toxin or sequester it. In type II, IV, V and VI, antitoxins are proteins that either by inhibiting toxin synthesis, sequestering toxins, promoting toxin degradation, or by counteracting toxic activity. TA systems loci are widespread, abundant and frequently in multiple copies on the bacterial chromosomes and the reasons of their abundance remain unclear. In this review, we will focus on cross-interactions between homologous and non-homologous TA systems. They can modulate TA toxicity and also can influence RNA expression levels of cognate or non-cognate TA pairs. We will discuss cross-interactions between TA systems that support their involvement into an extended interconnected network, expanding far beyond each individual system.

1

Toxin-antitoxin (TA) systems are genetic modules that encode a stable toxic protein whose overexpression leads to growth arrest or cell death, and a labile antitoxin that neutralizes the toxin's activity during bacterial growth (Van Melderen & Saavedra De Bast, 2009). Under stress conditions, antitoxins are degraded, allowing toxins to interfere with a vital cellular processes such as replication, translation or cell division (Van Melderen et al., 1994; Christiansen et al., 2004). Initially, TA systems were discovered in the 1980s on E. coli R1 and F plasmids. These TA systems act by a post-segregational killing (PSK) mechanism to prevent plasmid loss during cell division (Ogura & Hiraga, 1983; Gerdes et al., 1986). When a copy of a plasmid encoding a TA system is not transmitted to the daughter cell, the labile antitoxin is degraded. The stable toxin is then able to express its toxicity, leading to the death of the cells that have lost the plasmid. Bacteria that inherited the plasmid are not affected by toxin activation, through *de novo* and continuous antitoxin synthesis (Van Melderen, 2010). Since then, homologues of these plasmidic TA systems were identified on the chromosomes of most bacteria, including threatening pathogens such as Mycobacterium tuberculosis (M. tuberculosis), Enterobacteria or Staphylococcus aureus (S. aureus). Their biological roles, however, remained elusive (Fernandez-Garcia et al., 2016; Sierra et al., 2018). Nowadays, significant scientific advances were achieved, chromosomal TA systems were shown to possess various functions, including stability maintenance of genetic elements, growth control in response to environmental stresses, and persister cell formation (Patel, 2016; Brantl & Jahn, 2015; Ronneau & Helaine, 2019). Recent reviews covering the field of TA systems have been published, and especially about their biological functions (Page & Peti, 2016; Lobato-Marquez et al., 2016; Harms et al., 2018). TA systems loci are widespread, abundant and frequently present in multiple copies in bacterial genomes (chromosomes and mobile genetic elements (MGEs) (Table 1). The number of expressed TA loci vary extensively between species. A striking example concerns M. tuberculosis, with 79 TA systems identified, including 50 systems from the VapBC family and 10 systems from the MazEF family (Ramage et al., 2010; Sala et al., 2014). Numerous families of type II TA systems also exist in Escherichia coli (E. coli) genome, and type I TA systems are often detected in multiple copies among bacterial genomes (Fozo et al., 2010, 2012). A recent study predicted 67 TA loci into the S. aureus MW2 genome, including type I and type II TA systems (Habib et al., 2018). This

high abundance raises the question of the existence of interactions between homologous and non-homologous systems and how they can impact the overall TA system's activity. In this review, we will describe the reported cross-interactions for type I and type II TA systems in bacteria. We will focus on cross-interactions that affect the toxicity of TA systems, as referred as cross-talks, or influencing the RNA levels of other TA pairs, as referred to cross-regulations.

Classification of TA systems

TA systems are classified into six types depending on the antitoxin's nature and mode of action. While the toxins are proteins, the antitoxins can be either non-coding RNAs (types I and III) or low-molecular weight proteins (types II, IV, V, and IV).

Type I toxin and antitoxin genes are independently transcribed from their own promoters. Type I antitoxins are unstable *cis*-encoded antisense small RNA (sRNA) when toxin and antitoxin genes are overlapping, or *trans*-encoded sRNA when toxin and antitoxin genes are located at different locus in the genome. To neutralize toxin activity, type I antitoxins interact with toxin-encoding mRNA by base pairing to inhibit toxin mRNA translation and/or to induce toxin mRNA degradation (**Figure 1A**). Under stress conditions, the pool of antitoxins is reduced by specific RNases, resulting in toxin translation. Most type I toxins are hydrophobic peptides of less than 60 amino acids with a predicted α -helical transmembrane domain. They induce pore formation (TisB, HokB) or nucleoid condensation (DinQ, Fst, LdrD, BsrG) causing defects in membrane potential and/or cell division. Some toxins (SymE and RalR) can act within the cytosol to cleave nucleic acids (**Brielle et al., 2016**).

Type II TA systems are the best-characterized among all TA classes. Type II toxin and antitoxin genes are in the same operon and co-transcribed from a single promoter located upstream the antitoxin gene. The unstable type II antitoxins have two domains, a structured Nterminal domain with DNA binding motifs to control TA operon expression and a C-terminal domain involved in toxin neutralization by protein-protein interactions (**Lobato-Marquez** *et al.*, 2016; Figure 1B). During growth, the antitoxin inhibits the activity of the toxin by forming a TA complex. Commonly, the TA complex or the antitoxin alone binds to the TA promoter to repress transcription. In response to stress, antitoxins are susceptible to cellular proteases which allows activity of the stabler toxin, leading to growth arrest by interfering with replication, translation or peptidoglycan synthesis (**Lobato-Marquez** *et al.*, 2016). Type II toxins function by inhibiting DNA gyrase (CcdB, ParE), EF-Tu elongation factor action during translation (Doc), tRNA synthetase aminoacylation (HipA), tRNA (VapC, AtaT, TacT) and peptidoglycan

precursor synthesis (PezT). However, the majority of type II toxins are ribosome-independent endoribonucleases (RNases MazF, Kid, PemK or MqsR) or ribosome-dependent RNases RelE, YoeB or HigB) that bind the ribosomal A site where they cleave ribosome-associated mRNAs (**Page & Peti, 2016**).

In Type III TA systems, as in Type I, the antitoxin is a RNA. As for type II TA systems, type III toxin and antitoxin genes are in a single operon and co-transcribed from one promoter upstream from the antitoxin gene. A short imperfect palindromic repeat between toxin and antitoxin genes forms a transcription terminator which controls the relative levels of toxin and antitoxin RNAs. A well-studied member of the type III TA systems is ToxIN located on a plasmid from *Pectobacterium atrosepticum* (Fineran *et al.*, 2009; Short *et al.*, 2013). ToxN toxin is an RNase that processes the antitoxin precursor into small RNAs and cleaves the host RNAs. ToxI antitoxin forms a pseudoknots secondary structure that binds to and blocks the toxin active site (Brantl & Jahn, 2015; Figure 1C). This system induces an abortive phage infection by degrading phage RNAs, which promotes the suicide of the phage-infected cells.

For the newly discovered types IV, V and VI, the antitoxins are proteins. Toxin and antitoxin genes are also in the same operon and co-transcribed from one promoter upstream from the antitoxin gene. In the type IV TA systems, the antitoxin and the toxin do not interact. The *E. coli* YeeV and CptA toxins prevent cell division by binding to the cytoskeletal proteins MreB and FtsZ, inhibiting their polymerization. The YeeU and CptB antitoxins counterbalance toxin activity by stabilizing MreB and FtsZ cytoskeletal filaments (**Masuda** *et al.*, **2012; Figure 1D**). Only one type V TA module is reported to date, the *ghoST* system of *E. coli* and *Shigella spp* in which GhoS antitoxin is an RNase that inhibits GhoT toxin translation by mRNA cleavage during growth (**Wang** *et al.*, **2012; Figure 1E**). Under stress conditions, the *ghoS* mRNA is degraded by the type II MqsR that results in GhoT translation. GhoT is a hydrophobic peptide that disrupts the cell membranes, as type I toxins do.

The most recently type VI TA system was detected in *Caulobacter crescentus* (*C. crescentus*) (Aakre *et al*, 2013). In this novel class, the SocA antitoxin is a proteolytic adaptor protein that inhibits SocB toxicity by promoting its degradation by the ClpXP protease (Figure 1F). SocB interferes with replication elongation by binding the β sliding clamp DnaN.

Cross-interactions between type I TA systems

Type I TA systems are frequently in multiple copies in bacterial genomes. Many type I TA homologues were identified during small bacterial RNAs identification (**Table 1**). As

example, during a transcriptomic study of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), six antisense sRNAs to six small open reading frame (ORF) encoding putative hydrophobic peptides, have suggested the existence of new type I TA systems in this bacterium (**Sharma** *et al.*, **2010**). The presence of 26 type I TA loci including 14 *hok* and 7 *Ibs* genes were also predicted within the *E. coli* 0157:H7 genome (**Fozo** *et al.*, **2010**). Recently, 7 type I TA loci from the TxpA or Fst families were identified, in the MW2 *S. aureus* genome (**Habib** *et al.*, **2018**). Their abundances and apparent redundancies in bacterial genomes suggest they are required for fitness and that interactions between non-cognate pairs may very well occur.

Cross-talks between type I TA systems

The *hok/sok* loci, initially discovered on the *E. coli* R1 plasmid as PSK module, are in multiple copies in the chromosomes from enterobacteria (**Table 1**). Many are nonfunctional due to mutations, insertions or large rearrangements in *E. coli* (**Gerdes** *et al.*, **1997; Pedersen & Gerdes, 1999; Faridani** *et al.*, **2006**). During nutritive starvation, the alarmone (p)ppGpp induces, *via* a GTPase (Obg), *hokB* mRNA transcription. The HokB toxin forms pores into the bacterial membrane that disrupts the proton motrice force and reduces intracellular ATP, triggering dormancy (Verstraeten *et al.*, **2015; Wilmaerts** *et al.*, **2018**). The existence of cross-interactions between the *hok*/Sok copies has not been searched and should be informative. However, it was demonstrated that *sokE* and *sokX* loci can be expressed without *hok* transcripts, suggesting that these antitoxins could possess additional roles beyond toxicity neutralization (**Pedersen & Gerdes, 1999; Kawano et al., 2005**).

The *ldr/rdl* multi-copy type I TA system is also expressed from the Enterobacteria chromosomes (**Yoshida** *et al.*, **2000**, **Fozo** *et al.*, **2010**). The highly structured *ldr* mRNA encode a small toxic protein whose expression depends on the *ldrX* ORF translation (**Kawano** *et al.*, **2002**). *Ldr* overexpression leads to nucleoid condensation, inducing host cell death. This toxicity is counteracted by the unstable Rdl antisense RNA that represses *ldr* mRNA translation (**Kawano** *et al.*, **2002**, **Yamaguchi** *et al.*, **2014**). As for *hok*/Sok TA modules, there are no studies about cross-interactions between the *ldr*/Rdl copies.

Cross-talks have been studied among the type I *ibs*/Sib systems. Five Sib RNA antitoxins are expressed by the *E. coli* K12 genome, named SibA-E (**Fozo** *et al.*, **2008**; **Figure 2A**). These 140 nt-long Sib RNAs possess high sequence identity. On their opposite strands, there are genes encoding toxic Ibs proteins with 18-19 hydrophobic amino-acids. Overexpression of each Ibs peptide is lethal for *E. coli* and affects the cell envelope, a toxicity repressed by the expression of Sib RNA antitoxins (**Fozo** *et al.*, **2008**). Cis-encoded Sib RNAs possess extended sequence

complementarity with the *ibs* mRNAs, where they pair with the internal ORF translation initiation region (TIR) to prevent toxin expression. Among the *ibs*/Sib pairs, the *ibsA*/SibA module has unusual properties since the *ibsA* mRNA is recognized by non-cognate Sib RNAs. A *sibA*-deleted strain is viable even when the *ibsA* toxin is expressed (**Fozo et al., 2008**). Furthermore, *ibsA* expression had no effect on cell survival, suggesting that other Sib RNA than SibA can antagonize *ibsA* toxicity. The specificity of the *ibsC*/SibC system was investigated further (**Han et al., 2010**). Two interaction-domains (TRD1 and TRD2) exist on the SibC RNA antitoxin. TRD1 and TRD2 are located into the variable domains of the five Sib RNA from the other, non-cognate, mRNA toxins. Exceptions are the SibA and SibE TRD2 sequences which are identical and suggest that SibE could recognize *ibsA* mRNA to repress IbsA toxicity (**Figure 2A**).

Among type I TA systems in multiple copies on *E. coli* chromosome, there are also 2 copies of the *zor*/Orz system, referred as *zorO*/OrzO and *zorP*/OrzP. Overproduction of ZorO is toxic for *E. coli* and this toxicity was neutralized by the OrzO RNA antitoxin in an RNase III dependent-manner (**Wen et al., 2014**). OrzO and OrzP are homologues and OrzP possess a 15 nucleotides region in the 5'-end predicted to interact with *zorO* mRNA (versus 18 nucleotides for OrzO). However, only OrzO was able to rescue toxicity induced by ZorO during growth experiments, demonstrating the specificity of the *zorO*/OrzO system. A variable region consisting of 3 nucleotides (called V1) was identified within OrzO and OrzP. Interestingly, it was demonstrated that an OrzP V1 mutant was able to repress *zorO* expression and toxicity indicating this V1 region was responsible for the OrzO RNA antitoxin specificity to its *zor* target mRNA (**Wen et al., 2014**).

The *aapA*/IsoA TA systems are conserved as five expressed copies in *H. pylori* strains (**Arnion** *et al.*, **2017**). The *aapA1* gene encodes a 30 amino acid peptide whose overexpression induces cell death. The translation of the *aapA1* toxin is prevented by mRNA folding and processing, but also by the IsoA1 RNA antitoxin (**Arnion** *et al.*, **2017**). Despite similar structural fold between IsoA1 and IsoA3, no interaction was found between *aapA1* and IsoA3 by footprinting experiments suggesting a specificity in term of toxicity neutralization between *aapA* and IsoA RNAs (**Arnion** *et al.*, **2017**).

Very recently, our group reported novel functional type I TA systems in the *S. aureus* gram-positive bacteria, homologues of the *sprA1*/SprA1_{AS} (Fst-like TA system family). The *sprA2*/SprA2_{AS} module, located in *S. aureus* Newman core genome, shares 75% sequence similarity with the *sprA1*/SprA1_{AS} module. The *sprA1* and *sprA2* genes encode toxic peptides

able to lyse both bacteria and host cells as erythrocytes. The two *sprA*/SprA_{AS} modules are stress-activated since decreased SprA1_{AS} RNA level caused by oxidative and acidic stress induce increased SprA1 toxin production, and since SprA2_{AS} antitoxin is reduced during an osmotic stress and in a stringent medium, highlighting systems responding to different stresses (**Sayed et al., 2012; Germain-Amiot et al., 2019**). SprA1 and SprA2 toxins are neutralized *in trans* by their respective SprA1_{AS} and SprA2_{AS} cis-RNA antitoxins, to inhibit toxins translation by a partial complementarity base-pairing mechanism at the ribosomal binding site (RBS; **Sayed et al., 2011; Germain-Amiot et al., 2019**). But despite sequence identities, there is no cross-talk between the *sprA1*/SprA1_{AS} and *sprA2*/SprA2_{AS} systems, demonstrated both by gel shift assays and growth kinetics between non-cognate pairs with SprA1/A2 induction. Together, these experiments indicated specificity of each *sprA*/SprA_{AS} module (**Germain-Amiot et al., 2019; Figure 2B**).

Cross-regulations between type I TA systems

Our group also detected three additional copies of the pathogenicity island encoded SprG1/SprF1 RNA pair (txpA/RatA-like TA system family), within the core genome of S. aureus strains, named sprG2/sprF2, sprG3/sprF3, and sprG4/sprF4 (Pichon et al., 2005; Fozo et al., 2010). We demonstrated that sprG2/SprF2, sprG3/SprF3 are functional type I TA systems express by S. aureus HG003 and that SprG4 was not express in this strain since lacking a promoter. Our experimental data demonstrated that SprG2 and SprG3 RNA encode toxic peptides whose overexpression trigger S. aureus stasis but not death, contrary to SprG1encoded peptides (Pinel-Marie et al., 2014, Riffaud et al., 2019). This toxicity was abolished by overexpressing SprF2 or SprF3 RNA antitoxins, which down-regulate, at the RNA level, SprG2 or SprG3 peptide translation. As for sprA/SprAAS TA systems, there is no cross-talk between sprG/SprF TA homologues, because each SprF antitoxin specifically neutralizes its cognate SprG toxin. However, RNA complexes were detected between SprG3 and SprF1 and between SprG2 and SprF4 by gel shift assays. Then, RNA level variations were observed by northern blot analysis with strains overexpressing SprF1, SprG2, SprG2/SprF2 and SprF4 during S. aureus HG003 growth. These variations were abolished in the deletion strains (Riffaud et al., 2019). Taken together, these results suggested that the control of SprG toxicity is specific to the cognate pair in each sprG/SprF TA system, but that cross-regulations do occur between the sprG/SprF TA systems during S. aureus growth, with sprG/SprF pairs modulating the RNA levels of some other copies (Riffaud et al., 2018; Figure 2C). Interestingly, the sprG4 toxin is not expressed in S. aureus HG003 strain suggesting that the SprF4 antitoxin may retain

the ability to interact with sprG2 mRNA. Thus, the toxin:antitoxin ratio of sprG2/SprF2 could be impacted by SprF4 antitoxin located in the same intergenic region. Further experiences are needed to investigate the physiological relevance of such a network of sprG/SprF TA system in *S. aureus*.

Thus, specificity can be relaxed in the case of toxin lacking cognate antitoxin, as suggested for sprG/SprF TA systems. In the gram-positive and non-pathogenic bacterium Corynebacterium glutamicum (C. glutamicum), used to produce industrially the L-glutamate and L-Lysine residues (Hirasawa & Shimizu, 2016), was reported an atypical type I TA system called grtABC/AsgR. In an original way, the first reported antisense RNA antitoxin AsgR overlapped and regulated grtA but also grtB and grtC mRNAs. GtrA, GtrB and GtrC are predicted to be soluble proteins with many glutamine residues, but their mode of action is unknown. They demonstrated that gtrA is mainly transcribed as a monocistronic mRNA and that duplex gtrA-AsgR RNA is degraded by RNase III. The gtrABC mRNA is a polycistronic RNA, transcribed by read-through and half-lives of gtrA, gtrB and gtrC mRNAs were significantly increased in an AsgR mutant strain indicating repression of grtABC by AsgR. They also found that expression of grtA, grtB and grtC were increased after exposure to several stresses including heat shock, treatment with penicillin G, H₂O₂, NaCl or lysozyme, and that a strain lacking the gtraABC genes showed a decreased survival rate after exposure to heat, penicillin G and H₂O₂, suggesting a stress adaptation function for this atypical type I TA system in C. glutamicum. Since grtB and gtrC do not have their own antisense RNA, their expression is repressed by AsgR suggesting one antitoxin regulating three toxins, although the complementarity of grtB and grtC mRNAs with AsgR is not perfect (Maeda et al., 2018).

To conclude, among all the type I TA systems present in multiple copies, cross-talks were only observed between *zorO*/OrzO and *zorP*/OrzP TA systems and suggested for *ibs*/Sib TA systems. The absence of cross-talks does not exclude cross-regulations at the transcriptional level in the case of the *sprG*/SprF and *grtABC*/AsgR TA systems.

Cross-interactions between type II TA systems

Cross-interactions between homologous type II TA systems are more documented since antitoxins and/or TA complexes are able to act as transcriptional repressors and most of type II toxins are endoribonucleases.

Cross-talks between type II TA systems

The first level of cross-talk studies was between several plasmid-encoded TA systems. Smith *et al.*, studied cross-talks between the *ccdAB* system of the plasmid F and *parD* system (composed of the Kis antitoxin and the Kid toxin) from the *E. coli* R1 plasmid. CcdB and Kid toxins have different targets, the DNA gyrase for CcdB and RNA with an endoribonuclease activity for Kid. Despite different cellular targets, CcdB and Kid toxins have a common structural folding that leads Smith *et al.* to assume cross-talk can occur. They showed that Kid toxicity was fully rescued by the cognate Kis antitoxin and altered by CcdA antitoxin. Conversely, Kis antitoxin was able to inhibit CcdB toxicity, but less efficiently than CcdA. Physical interactions between toxins and antitoxins of non-cognate complexes were also demonstrated suggesting that cross-talks between the *ccd* and *parD* systems can effectively occurred (**Smith** *et al.*, **2012**).

Two homologous plasmid-encoded systems were found on the pSymA megaplasmid of *Sinorhizobium meliloti* which possess, among all the predicted TA, two homologous *relB-parE* systems (**Milunovic** *et al.*, **2014**). The first system $relB_{Sme1}/parE_{Sme1}$ was demonstrated as a functional TA system. Cross-talks were investigated between these two systems because the *parESme2* locus shares 91% nucleic sequence identity with the 5' region of *parESme1* locus. The predicted antitoxin $relB_{Sme2}$ is truncated of its 5'-end. Interestingly, $ParE_{Sme2}$ was not toxic for *E. coli*, but the predicted RelB2_{Sme2} antitoxin was able to neutralize the functional ParE_{Sme1} toxin (**Goeders & Van Melderen, 2014**).

A second level of cross-interactions studies was between chromosomally- and plasmidencoded homologous TA systems. Investigations were conducted for the F plasmid *ccdF* system and the chromosomally-encoded *ccd0157* system in *E. coli* O157:H7 (**Wilbaux** *et al.*, **2007; Saavedra De Bast** *et al.*, **2008**) and for the R100 plasmid *par* locus and the chromosomally-encoded *mazEF* and *chpB* systems, and concluded to the specificity of each system (**Santos-Sierra** *et al.*, **1997, 1998**). In *E. coli*, *in vivo* overproduction of MazE antitoxin (chromosomal homologue of Kis) enhanced bacterial growth upon Kid toxicity, in the absence of the native Kis antitoxin (**Santos-Sierra** *et al.*, **1997**). This cross-talk between MazE and Kid was also shown by Kamphuis *et al.* who demonstrated by native macromolecular mass spectroscopy that MazE and Kis share high structural similarity and could associate in a proteinprotein complex *via* weak interactions (**Kamphuis** *et al.*, **2007**).

Furthermore, the barrier between two specific, but homologous, TA systems is sometimes tenuous and two studies demonstrate it. Polom *et al.* investigated specificity of TA interactions

between the homologous plasmid-encoded Axe-Txe and the chromosomal-encoded YefM-YoeB systems, at the amino acid residues level. No cross-interactions were detected between wild-type proteins. But, a single Txe-Asp83Tyr amino acid substitution promoted functional interaction between Txe toxin and YefM antitoxin and allowed YefM to abolish Txe toxicity (**Polom** *et al.*, **2013**). With the same experimental approach, Walling & Butler highlighted in *Haemophilus influenzae* that a genetically modified T47W VapB1 antitoxin, which gain the tryptophan residue required for the VapB2-VapC2 interaction was able to neutralize both VapC1 and VapC2 toxins (**Walling & Butler**, **2016**). Altogether, these results indicated that only a single mutation in an essential residue can relax specificity of type II antitoxin.

It was interesting to note that, from the evolution point of view, if a chromosomallyencoded antitoxin could neutralize a plasmid-encoded toxin, plasmids maintenance by a PSK effect would be challenged.

The third level of cross-talk investigations was between chromosomal TA systems. In *S. aureus* chromosome, two *yefM-yoeB* homologous type II systems were characterized, composed of two paralogues of the YoeB toxin and the YefM antitoxin, named '*yefM-yoeB-sa1*' and '*yefM-yoeB-sa2*' (also referred in the literature as '*axe-txe1*' and '*axe-txe2*'; **Donegan** *et al.*, **2010**). Like the *E. coli* YoeB toxin, YoeB RNase from *S. aureus* seems also to associate with ribosomes to cleave target mRNAs near the translation initiation site (**Zhang & Inouye**, **2009; Larson & Hergenrother, 2014**). YefM-sa1 and YefM-sa2 share 47% of homology concerning amino-acids residues whereas homology between YoeB-sa1 and YoeB-sa2 was of 45%, indicating the conservation of almost 50% of amino acids sequence between the two systems located on *S. aureus* chromosome (**Yoshizumi** *et al.*, **2009**). Despite sequence homology, Yoshizumi *et al.*, demonstrated that there was no cross-talk between the *S. aureus* type II '*yefM-yoeB-sa1*' and '*yefM-yoeB-sa2*' systems, neither in terms of toxin neutralization, nor in transcriptional auto-regulation of the TA modules (**Yoshizumi** *et al.*, **2009**).

In the chromosome of the α -proteobacterium *C. crescentus*, there are eight TA systems of the RelE/ParE superfamily (**Fiebig** *et al.*, **2010**). Of the seven encoded functional toxins, the non-functional one supposed to be a pseudogene because of a pre-mature stop-codon responsible for the production of a truncated non-toxic protein. ParD and RelB proteins are effective antitoxins against ParE and RelE induced toxicity. The transcriptional study of these paralogous TA systems highlighted that they were activated under distinct environmental conditions. During ParE characterization, they showed that ParE1 toxin inhibits cell division and that a fraction of cells escaped toxicity upon ParE1 continuous overexpression (**Fiebig** *et*

al., **2010**). No cross-talks were observed between the eight RelE/ParE homologues since chromosomal deletions of the *parD* and *relB* antitoxin genes were not recovered when a non-cognate antitoxin was overexpressed *in trans* (Fiebig *et al.*, **2010**).

A cross-talk study was also conducted between TA systems within the *V. cholerae* N16961 superintegron, which has 18 type II TA systems that contribute to its stability (**Iqbal** *et al.*, **2015**). Among these, belonging to the Hig, Rel, Par and Phd-Doc families, no cross-talk was observed during induction of toxin expression in the presence of a non-cognate antitoxin (**Iqbal** *et al.*, **2015**).

Study of cross-talk between TA systems is also well documented in M. tuberculosis because TA systems are widespread within its genome. In M. tuberculosis genome, extensive gene duplication events have led to the accumulation of functional VapBC, MazEF, ParDE, RelBE and HigBA TA homologues. RelBE TA systems, represented in three RelBE-like modules named RelBE, RelFG and RelJK, are partly expressed in human macrophages during infection (Yang et al., 2010). It was demonstrated, in vitro and in vivo in Mycobacterium smegmatis, that RelB antitoxin could replace the RelF antitoxin and cross-neutralize the RelG toxin (Yang et al., 2010). On the contrary, RelF and RelB antitoxins seemed to enhance the toxicity of RelE and RelK respectively. Altogether, these experiments demonstrated cross-talks between different pairs of RelBE modules in *M. tuberculosis* (Yang et al., 2010). Physical interactions between ReIE, ReIG and ReIK was also investigated in vitro with bacterial two hybrid techniques to test protein-protein interaction by co-transformants isolation and then by EMSA. Interactions between RelB or RelF antitoxins with RelE, RelG and RelK toxins were demonstrated with two hybrids methodology. EMSA assays were also conducted to demonstrate that RelG has the same DNA-binding activity than RelB on the relBE promoter suggesting a cross-regulation event (Yang et al., 2010). Cross-talks were investigated with or without toxins induction. Growth inhibition was almost eliminated in the strain overexpressing the toxin RelB and the non-cognate antitoxin RelG, consistent with the in vitro interaction assays. However, it was not the case for the predicted physical interaction between ReIE and RelF, since RelF was unable to rescue the growth inhibition conferred by RelE overproduction (Yang et al., 2010). In 2010, Zhu et al. studied combination of cognate and non-cognate M. tuberculosis TA systems using in vivo toxicity assays with in vitro interaction experiments. They uncovered several examples of non-cognate TA associations, even among different families, such as between MazF toxins and VapB antitoxins suggesting a sophistically network between all the TA systems in *M. tuberculosis*, in order to achieve their biological function (Zhu et al., 2010). More particularly, they studied two MazF homologues (MazF-mt1 and

MazF-mt3) and they discovered interactions with VapB antitoxins. They also identified noncognate interactions between VapC toxins and a MazE antitoxin. Moreover, these interactions were also physiologically relevant because the non-cognate antitoxins VapB24 and VapB25 were able to reduce MazF-mt1 toxicity when co-expressed in an *E. coli* host, and that MazEmt1, MazE-mt3, VapB24 and VapB25 were also able to inhibit MazF-mt3 toxicity (**Zhu** *et al.*, **2010**).

Cross-interactions leading to an antitoxin with several toxins from different systems could result to an excess of free toxin leading to cell growth or cell death inhibition. This concept was demonstrated by Park *et al.* (2013) since the competition of a chimera MazF toxin with endogenous MazF_{K-12} toxin for MazE_{K-12} antitoxin in *E. coli* leads to MazF_{K-12} toxicity (**Park** *et al.*, **2013**).

Cross-regulations between type II TA systems

Cross-regulations between type II TA systems can occur since antitoxins and/or TA complexes are able to act as transcriptional repressors and most of type II toxins are endoribonucleases. Most of type II toxins inhibits bacterial translation since they possess endoribonucleases activity against mRNA, for example RelE, MazE and MqsR, or against tRNA as VapC, TacT and AtaT (Page & Peti, 2016; Cheverton *et al.*, 2016; Jurenas *et al.*, 2017).

The first case of cross-activation between type II TA systems was reported with the *phd/doc* system, which participate to the maintenance of the plasmid-prophage P1 in *E. coli* (Lehnherr *et al.*, 1993), and the RelE toxin of the *relBE* chromosomal TA module. The Doc toxin associates to the Elongation Factor Tu on the 30S ribosomal subunit to repress the translation elongation step (Liu *et al.*, 2008; Castro-Roa *et al.*, 2013). This toxicity is neutralized by the type II Phd antitoxin. Phd has two domains, a highly structured N-terminal DNA-binding domain to control the expression of the *phd/doc* operon, and a disorganized C-terminal domain to inhibit Doc toxicity by protein-protein interaction, as most type II antitoxins (Garcia-Pino *et al.*, 2008; Lobato-Marquez *et al.*, 2016). Garcia-Pino *et al.* provided further information on the interplay between the Doc toxin and chromosomal TA systems. They studied the impact of Doc induction on model mRNAs *lpp* and *dskA* very similar to that induced by RelE, near to the start codon. However, the Doc toxin inhibits the elongation step and such a cleavage pattern suggests that the cleavage was due to activation of endogenous TA loci. Moreover, Doc induction in a *relBE* deleted *E. coli* MG1655 strain didn't manage to induce

mRNA cleavage, suggesting that Doc activates endogenous RelE activity indicating transactivation between Doc and RelE toxins (Garcia-Pino *et al.*, 2008).

Another research group also studied transcriptional cross-activation between non-cognate type II TA systems in *E. coli*. It was shown that the chromosomal *relBEF* operon was activated by overproduction of MazF, MqsR, HicA and HipA toxins. Moreover, the expression of the RelE toxin induces transcription of several TA operon, more particularly *mazEF* during amino acid starvation, as compared to a *relBEF* deletion mutant (Kasari *et al.*, 2013).

Moreover, overexpression of the *Shigella* plasmid, pMYSH6000 VapC, activates the type II *yefM-yoeB system* (Winther & Gerdes, 2009). It is not known whether these toxins specially degrade the antitoxin-encoding portion of mRNA. However, these toxins target translation suggesting that cross-activation could be a secondary effect of translation inhibition.

Altogether, these results suggest that plasmid-encoded toxins induce a chain reaction by activating chromosomally-encoded toxins.

In 2017, Yao et al. characterized a novel type II TA pair, named ParE_{SO}/CopA_{SO}, expressed in Shewenella oneidensis (S. oneidensis) and involved in the maintenance of the prophage CP4So after its excision induced by cold temperatures stresses (Zeng et al., 2016; Yao et al., 2017). They demonstrated that CopAso acts as a typical type II antitoxin by inhibiting ParEso toxicity through a direct protein-protein interaction mechanism and by repressing transcription of the TA operon with its DNA binding domain. They observed that the DNA motif of the promoter region involved in the auto-regulation process was also found in the promoter region of the TA system pemKSO/pemISO of the pMR-1 megaplasmid in S. oneidensis. They highlighted with quantitative real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) analysis, that CopAso was also able to repress pemKSO/pemISO transcription suggesting crossinhibition between these two TA systems (Yao et al., 2017). In order to verify the results obtained with qRT-PCR, they synthesized a mutated promoter of *pemISO-pemKSO*, and challenged the ability of $CopA_{SO}$ to bind the native and the mutated promoter. As expected, the repression of promoter activity was not observed with the mutated promoter. The particularity of this system is that $parE_{SO}$ gene was prevalent in Shewenella strains but sometimes inactivated by nonsense mutations, and that the $CopA_{SO}$ antitoxin is able to function as transcriptional regulator and possesses homologues existing as 'orphan antitoxin' in some Shewenella strains (Yao et al., 2017).

VapBC TA systems consist the major TA family on *M. tuberculosis* chromosome, characterised by a VapB antitoxin and VapC toxin with a PilT N-terminal domain containing

conserved acidic residues and an RNase-H like fold with ribonuclease activity (Arcus et al., 2011). Cross-talks within the VapBC family in *M. tuberculosis* were first studied by Ramage et al. in 2010 between four heterologous vapB and vapC genes, but unsuccessfully (Ramage et al., 2010). More recently, regulatory interplay between type II TA systems was studied by RTqPCR to monitor the effect of ectopic expression of an "active" toxin on the RNA levels of other chromosomal copies of "active" toxins. Agarwal et al., demonstrated that overexpression of VapC3, 11, 13, 20, 22, 27 and 33 resulted in an 8.0-16.0-fold significant increase in mRNA levels of vapC15. Moreover, RNA level of higB1 and mazF6 was increased by ectopic expression of respectively VapC3, 11, 15, 20, 22, 27 and VapC11, 13, 15, 20, 22, and 44, indicating cross-activation of non-cognate chromosome-encoded toxins by several VapC proteins in M. tuberculosis (Agarwal et al., 2018). Other groups studied VapBC TA systems expressed in M. tuberculosis and used RNA probes with mass spectrometry to demonstrate that the ribonuclease is specific, with an affinity for UAGG sequences for VapC1, 19, 27, 29 and 39. Surprisingly, auto-regulatory properties displayed by the binding of the VapBC29 TA complex was not the case for VapBC1 and VapBC27. No cross-regulation were observed between VapBC29, VapBC1 and VapBC27, investigated by EMSA assays between the VapBC29 TA complex and the promoter regions of vapBC1 and vapBC27 (Sharrock et al., **2018**). However, in this study, nothing has been published about cross-talk in term of toxicity neutralization.

Cross-regulations between TA systems that does not belong to the same type were initially discovered by Wang *et al.* in 2013, between the type II MqsR/MqsA and the type V GhoT/GhoS systems. In its active form, the GhoT toxin is located at the bacterial membrane and induce a ghost cell phenotype, rescued by the GhoS antitoxin that cleaves specifically *ghoT* mRNA (**Wang** *et al.***, 2012**). The MqsA antitoxins have the particularity to repress the stationary-phase sigma factor RpoS and has been demonstrated to influence stress response (**Wang** *et al.***, 2011**). The mRNA cleavage by the RNase MqsR toxin is preferentially at 5'-GCU sites (**Yamaguchi** *et al.***, 2009; Christensen-Dalsgaard** *et al.***, 2010). Using quantitative real-time reverse transcription PCR, regulation of** *ghoST* **mRNA stability by MqsR was studied** *in vivo***, at the post-transcriptional level. When MqsR toxin was produced,** *ghoT* **mRNA was enriched and this was confirmed** *in vitro***. On the contrary, the introduction of a cleavage site into** *ghoT* **mRNA reduced toxicity of GhoT and cell death, due to increased degradation of** *ghoT* **mRNA by MqsR (Wang** *et al.***, 2013**). In *E. coli*, only 14 mRNA transcripts do not contain the MqsR-preferred 5'-GCU cleavage site and *ghoS* mRNA is an MqsR target (**Domka** *et al.***, 2007;**

Wang *et al.*, **2012**). Wang *et al.* proposed that during stress, an antibiotic for example, the *ghoS* mRNA of the antitoxin was degraded by the MqsR toxin, allowing the translation of GhoT toxin and ghost cells formation, reporting the first case of a TA system regulated by another one (**Wang** *et al.*, **2013**).

Cross-regulation was also observed in the *Enterococcus faecalis* clinical isolate V583. In the genome of this isolate was discovered a locus encoding two putative and adjacent TA modules with an antisense organization, one related to the type I TxpA family, and the other to the type II MazEF family (**Fouquier d'Herouel et al., 2011**). The novel predicted MazEF TA system showed a bona fide type II TA behavior in *E. coli*, since MazF was toxic for *E. coli* by triggering RNA degradation, and was counteracted by MazE. In this study, they demonstrated a dual regulatory activity of MazE that repressed *mazEF* operon expression but also that activated transcription of the RatA RNA antitoxin, indicating cross-regulation between a type II antitoxin and a type I TA module with coordinated expression of the two systems (**Wessner et al., 2015**).

Concluding remarks and perspectives

By adding all the results of the studies grouped in this review, the hypothesis of isolated TA systems accomplishing their function on their side is challenged. Indeed, a network with subtle interactions between homologous and non-homologous TA systems, belonging to the same type or not, seems to exist more often than previously thought. In fact, homologues TA systems with the ability to neutralize each other are rather rare and the toxicity is not completely prevented but only reduced. Cross-regulations are more often reported, within the network of TA systems of a bacteria. These complex interactions might be specific to bacterial species carrying a high number of TA systems such as M. tuberculosis, E.coli or S. aureus. TA systems diversity, abundance and cross-interactions may be explained by a nature consequence of pathogen-host conflict to increase the diversity and hence fitness to respond to various forms of stimuli. A better understanding of biological functions of TA systems will arise from a better characterization of their cross-interactions and the identification of novels functions specific to one components of the TA systems. Type II antitoxins may have a role of global regulator on genes expression in response to environmental stimuli via their DNA-binding domain. Besides, the regulatory properties of small regulatory RNAs are widely recognized in the bacterial world, with often many targets, RNA or proteins. This raise the question of the type I and III RNA antitoxins and their possible regulatory functions, in addition to counteracting their respective

toxins. Considering TA systems more as a network of interconnected systems than individually one, would perhaps allow a better comprehension of their impact in the bacterial physiology.

Figures legends

Figure 1: Overview of currently characterized types of TA systems. Toxins (T) and antitoxins (A) are indicated in grey and black, respectively. A) Type I: the antitoxin is an antisense RNA molecule that base-pairs with the toxin-encoding mRNA, frequently at the Shine-Dalgarno (SD) sequence, to prevent toxicity by inhibition of toxin translation or promoting the degradation of the duplex RNA. B) Type II: the antitoxin is a protein that forms a complex with the toxin protein to neutralize toxicity by protein-protein interaction. The antitoxin or a non-toxic TA complex can repressed the TA operon transcription. C) Type III: Antitoxins RNA molecules have pseudoknots secondary structure and they assemble to sequester the toxin. D) Type IV: There is a competition between the toxin and the antitoxin to interact with the cellular targets of the toxin. E) Type V: the antitoxin has RNase activity and cleaves the mRNA of the toxin, thus preventing the translation of the toxin. F) Type VI: The antitoxin selectively induces toxin degradation by proteases when a TA complex is formed.

Figure 2: Examples of absence or presence of cross-interactions between non-cognate type

I TA systems. A) Cross-interactions between the five homologues of the *ibs*/Sib TA systems in *E.coli*. Existence of a putative cross-talk, via RNA complex formation between *ibsA* toxin mRNA and non-cognate SibE RNA antitoxin, allowing *E.coli* growth. B) Cross-interactions between the two homologues of the *sprA*/SprA_{AS} TA systems in *S. aureus*. No *sprA*/SprA_{AS} RNA complexes and no cross-talks demonstrating that *sprA* toxicity is specifically neutralized by the SprA_{AS} cognate antitoxin. C) Cross-interactions between the four homologues of the *sprG*/SprF TA systems in *S. aureus*. Presence of *in vitro* RNA complexes between SprF1 and *sprG3* and between SprF4 and *sprG2*. Cross-regulations also occur *in vivo*, between SprF1 and *sprG2* or *sprG3*, between *sprG2* and SprF1 or SprF3 or *sprG1*, and between SprF4 and *sprG1* or *sprG2*. These cross-interactions are effective to control the *sprG*/SprF RNA levels allowing *S. aureus* growth, but not to control the toxicity of SprG toxins.

Figure 3: Cross-interactions between non-cognate type II TA systems. A) Homologous TA systems are specific and don't interact to neutralize the toxicity of a non-cognate toxin. B) A

cross-talk exist between non-cognate type II TA systems since toxicity of a toxin can be impaired by a non-cognate antitoxin. C) Cases of trans-activation between non-cognate TA systems in which induction of a toxin leads to activation of the transcription of another TA operon. D) Cross-regulations between non-cognate TA systems when an antitoxin can repress the expression of another TA operon.

Figure 4: Cross-regulations between non-cognate TA systems belonging to different types.

A) Cross-regulation between the type V ghoST system and the type II mqsRA system in *E. coli*. Red arrows indicate the cross-regulation event which leads to ghoS mRNA by the MqsR toxin allowing GhoT toxicity. B) Schematic model of the cross-regulation between the type II mazEFsystem and the type I txpA/RatA system in *E. faecalis*. The red arrow indicates the activator role played by the MazE-MazF complex in the transcription of the RatA RNA antitoxin.

References

- Aakre, C.D., Phung, T.N., Huang, D., 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.
- Agarwal, S., Tiwari, P., Deep, A., Kidwai, S., Gupta, S., Thakur, K.G., Singh, R., 2018. System-Wide Analysis Unravels the Differential Regulation and In Vivo Essentiality of Virulence-Associated Proteins B and C Toxin-Antitoxin Systems of Mycobacterium tuberculosis. J. Infect. Dis. 217, 1809–1820.
- Arcus, V.L., McKenzie, J.L., Robson, J., Cook, G.M., 2011. The PIN-domain ribonucleases and the prokaryotic VapBC toxin-antitoxin array. Protein Eng. Des. Sel. 24, 33–40.
- Arnion, H., Korkut, D.N., Masachis Gelo, S., Chabas, S., Reignier, J., Iost, I., Darfeuille, F., 2017. Mechanistic insights into type I toxin antitoxin systems in Helicobacter pylori: the importance of mRNA folding in controlling toxin expression. Nucleic Acids Res. 45, 4782–4795.
- Brantl, S., Jahn, N., 2015. sRNAs in bacterial type I and type III toxin-antitoxin systems. FEMS Microbiol. Rev. 39, 413–427.
- Brielle, R., Pinel-Marie, M.-L., Felden, B., 2016. Linking bacterial type I toxins with their actions. Curr. Opin. Microbiol. 30, 114–121.
- Castro-Roa, D., Garcia-Pino, A., De Gieter, S., van Nuland, N.A.J., Loris, R., Zenkin, N., 2013. The Fic protein Doc uses an inverted substrate to phosphorylate and inactivate EF-Tu. Nat. Chem. Biol. 9, 811–817.

- Cheverton, A.M., Gollan, B., Przydacz, M., Wong, C.T., Mylona, A., Hare, S.A., Helaine, S., 2016. A Salmonella Toxin Promotes Persister Formation through Acetylation of tRNA. Mol. Cell 63, 86–96.
- Christensen, S.K., Maenhaut-Michel, G., Mine, N., Gottesman, S., Gerdes, K., Van Melderen, L., 2004. Overproduction of the Lon protease triggers inhibition of translation in Escherichia coli: involvement of the yefM-yoeB toxin-antitoxin system. Mol. Microbiol. 51, 1705–1717.
- Christensen-Dalsgaard, M., Jørgensen, M.G., Gerdes, K., 2010. Three new RelE-homologous mRNA interferases of Escherichia coli differentially induced by environmental stresses. Mol. Microbiol. 75, 333–348.
- Domka, J., Lee, J., Bansal, T., Wood, T.K., 2007. Temporal gene-expression in Escherichia coli K-12 biofilms. Environ. Microbiol. 9, 332–346.
- Donegan, N.P., Thompson, E.T., Fu, Z., Cheung, A.L., 2010. Proteolytic regulation of toxinantitoxin systems by ClpPC in Staphylococcus aureus. J. Bacteriol. 192, 1416–1422.
- Faridani, O.R., Nikravesh, A., Pandey, D.P., Gerdes, K., Good, L., 2006. Competitive inhibition of natural antisense Sok-RNA interactions activates Hok-mediated cell killing in Escherichia coli. Nucleic Acids Res. 34, 5915–5922.
- Fernández-García, L., Blasco, L., Lopez, M., Bou, G., García-Contreras, R., Wood, T., Tomas, M., 2016. Toxin-Antitoxin Systems in Clinical Pathogens. Toxins (Basel) 8.
- Fiebig, A., Castro Rojas, C.M., Siegal-Gaskins, D., Crosson, S., 2010. Interaction specificity, toxicity and regulation of a paralogous set of ParE/RelE-family toxin-antitoxin systems. Mol. Microbiol. 77, 236–251.
- Fineran, P.C., Blower, T.R., Foulds, I.J., Humphreys, D.P., Lilley, K.S., Salmond, G.P.C., 2009. The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106, 894–899.
- Fouquier d'Hérouel, A., Wessner, F., Halpern, D., Ly-Vu, J., Kennedy, S.P., Serror, P., Aurell, E., Repoila, F., 2011. A simple and efficient method to search for selected primary transcripts: noncoding and antisense RNAs in the human pathogen Enterococcus faecalis. Nucleic Acids Res. 39, e46.
- Fozo, E.M., 2012. New type I toxin-antitoxin families from "wild" and laboratory strains of E. coli: Ibs-Sib, ShoB-OhsC and Zor-Orz. RNA Biol 9, 1504–1512.
- Fozo, E.M., Kawano, M., Fontaine, F., Kaya, Y., Mendieta, K.S., Jones, K.L., Ocampo, A., Rudd, K.E., Storz, G., 2008. Repression of small toxic protein synthesis by the Sib and OhsC small RNAs. Mol. Microbiol. 70, 1076–1093.

- Fozo, E.M., Makarova, K.S., Shabalina, S.A., Yutin, N., Koonin, E.V., Storz, G., 2010. Abundance of type I toxin-antitoxin systems in bacteria: searches for new candidates and discovery of novel families. Nucleic Acids Res. 38, 3743–3759.
- Garcia-Pino, A., Christensen-Dalsgaard, M., Wyns, L., Yarmolinsky, M., Magnuson, R.D., Gerdes, K., Loris, R., 2008. Doc of prophage P1 is inhibited by its antitoxin partner Phd through fold complementation. J. Biol. Chem. 283, 30821–30827.
- Gerdes, K., Bech, F.W., Jørgensen, S.T., Løbner-Olesen, A., Rasmussen, P.B., Atlung, T., Boe, L., Karlstrom, O., Molin, S., von Meyenburg, K., 1986. Mechanism of postsegregational killing by the hok gene product of the parB system of plasmid R1 and its homology with the relF gene product of the E. coli relB operon. EMBO J. 5, 2023–2029.
- Gerdes, K., Gultyaev, A.P., Franch, T., Pedersen, K., Mikkelsen, N.D., 1997. Antisense RNAregulated programmed cell death. Annu. Rev. Genet. 31, 1–31.
- Germain-Amiot, N., Augagneur, Y., Camberlein, E., Nicolas, I., Lecureur, V., Rouillon, A., Felden, B., 2019. A novel Staphylococcus aureus cis-trans type I toxin-antitoxin module with dual effects on bacteria and host cells. Nucleic Acids Res. 47, 1759–1773.
- Goeders, N., Van Melderen, L., 2014. Toxin-antitoxin systems as multilevel interaction systems. Toxins (Basel) 6, 304–324.
- Habib, G., Zhu, Q., Sun, B., 2018. Bioinformatics and Functional Assessment of Toxin-Antitoxin Systems in Staphylococcus aureus. Toxins (Basel) 10.
- Han, K., Kim, K.-S., Bak, G., Park, H., Lee, Y., 2010. Recognition and discrimination of target mRNAs by Sib RNAs, a cis-encoded sRNA family. Nucleic Acids Res. 38, 5851–5866.
- Harms, A., Brodersen, D.E., Mitarai, N., Gerdes, K., 2018. Toxins, Targets, and Triggers: An Overview of Toxin-Antitoxin Biology. Mol. Cell 70, 768–784.
- Hirasawa, T., Shimizu, H., 2016. Recent advances in amino acid production by microbial cells. Curr. Opin. Biotechnol. 42, 133–146.
- Iqbal, N., Guérout, A.-M., Krin, E., Le Roux, F., Mazel, D., 2015. Comprehensive Functional Analysis of the 18 Vibrio cholerae N16961 Toxin-Antitoxin Systems Substantiates Their Role in Stabilizing the Superintegron. J. Bacteriol. 197, 2150–2159.
- Jurėnas, D., Garcia-Pino, A., Van Melderen, L., 2017. Novel toxins from type II toxin-antitoxin systems with acetyltransferase activity. Plasmid 93, 30–35.
- Kamphuis, M.B., Monti, M.C., van den Heuvel, R.H.H., Santos-Sierra, S., Folkers, G.E., Lemonnier, M., Díaz-Orejas, R., Heck, A.J.R., Boelens, R., 2007. Interactions between the toxin Kid of the bacterial parD system and the antitoxins Kis and MazE. Proteins 67, 219–231.

- Kasari, V., Mets, T., Tenson, T., Kaldalu, N., 2013. Transcriptional cross-activation between toxinantitoxin systems of Escherichia coli. BMC Microbiol. 13, 45.
- Kawano, M., Oshima, T., Kasai, H., Mori, H., 2002. Molecular characterization of long direct repeat (LDR) sequences expressing a stable mRNA encoding for a 35-amino-acid cell-killing peptide and a cis-encoded small antisense RNA in Escherichia coli. Mol. Microbiol. 45, 333–349.
- Kawano, M., Reynolds, A.A., Miranda-Rios, J., Storz, G., 2005. Detection of 5'- and 3'-UTRderived small RNAs and cis-encoded antisense RNAs in Escherichia coli. Nucleic Acids Res. 33, 1040–1050.
- Larson, A.S., Hergenrother, P.J., 2014. Light activation of Staphylococcus aureus toxin YoeBSa1 reveals guanosine-specific endoribonuclease activity. Biochemistry 53, 188–201.
- Liu, M., Zhang, Y., Inouye, M., Woychik, N.A., 2008. Bacterial addiction module toxin Doc inhibits translation elongation through its association with the 30S ribosomal subunit. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105, 5885–5890.
- Lobato-Márquez, D., Díaz-Orejas, R., García-Del Portillo, F., 2016. Toxin-antitoxins and bacterial virulence. FEMS Microbiol. Rev. 40, 592–609.
- Maeda, T., Tanaka, Y., Inui, M., 2018. Glutamine-rich toxic proteins GrtA, GrtB and GrtC together with the antisense RNA AsgR constitute a toxin-antitoxin-like system in Corynebacterium glutamicum. Mol. Microbiol. 108, 578–594.
- Masuda, H., Tan, Q., Awano, N., Wu, K.-P., 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.
- Milunovic, B., diCenzo, G.C., Morton, R.A., Finan, T.M., 2014. Cell growth inhibition upon deletion of four toxin-antitoxin loci from the megaplasmids of Sinorhizobium meliloti. J. Bacteriol. 196, 811–824.
- Ogura, T., Hiraga, S., 1983. Partition mechanism of F plasmid: two plasmid gene-encoded products and a cis-acting region are involved in partition. Cell 32, 351–360.
- Page, R., Peti, W., 2016. Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. Nat. Chem. Biol. 12, 208–214.
- Park, S.J., Son, W.S., Lee, B.-J., 2013. Structural overview of toxin-antitoxin systems in infectious bacteria: a target for developing antimicrobial agents. Biochim. Biophys. Acta 1834, 1155– 1167.
- Patel, S., 2016. Drivers of bacterial genomes plasticity and roles they play in pathogen virulence, persistence and drug resistance. Infect. Genet. Evol. 45, 151–164.

- Pedersen, K., Gerdes, K., 1999. Multiple hok genes on the chromosome of Escherichia coli. Mol. Microbiol. 32, 1090–1102.
- Pinel-Marie, M.-L., Brielle, R., Felden, B., 2014. Dual toxic-peptide-coding Staphylococcus aureus RNA under antisense regulation targets host cells and bacterial rivals unequally. Cell Rep 7, 424–435.
- Połom, D., Boss, L., Węgrzyn, G., Hayes, F., Kędzierska, B., 2013. Amino acid residues crucial for specificity of toxin-antitoxin interactions in the homologous Axe-Txe and YefM-YoeB complexes. FEBS J. 280, 5906–5918.
- Ramage, H.R., Connolly, L.E., Cox, J.S., 2009. Comprehensive functional analysis of Mycobacterium tuberculosis toxin-antitoxin systems: implications for pathogenesis, stress responses, and evolution. PLoS Genet. 5, e1000767.
- Riffaud, C., Pinel-Marie, M.-L., Pascreau, G., Felden, B., 2019. Functionality and cross-regulation of the four SprG/SprF type I toxin-antitoxin systems in Staphylococcus aureus. Nucleic Acids Res. 47, 1740–1758.
- Ronneau, S., Helaine, S., 2019. Clarifying the Link between Toxin-Antitoxin Modules and Bacterial Persistence. J. Mol. Biol.
- Saavedra De Bast, M., Mine, N., Van Melderen, L., 2008. Chromosomal toxin-antitoxin systems may act as antiaddiction modules. J. Bacteriol. 190, 4603–4609.
- Sala, A., Bordes, P., Genevaux, P., 2014. Multiple toxin-antitoxin systems in Mycobacterium tuberculosis. Toxins (Basel) 6, 1002–1020.
- Santos Sierra, S., Giraldo, R., Díaz Orejas, R., 1998. Functional interactions between chpB and parD, two homologous conditional killer systems found in the Escherichia coli chromosome and in plasmid R1. FEMS Microbiol. Lett. 168, 51–58.
- Santos-Sierra, S., Giraldo, R., Díaz-Orejas, R., 1997. Functional interactions between homologous conditional killer systems of plasmid and chromosomal origin. FEMS Microbiol. Lett. 152, 51–56.
- Sayed, N., Jousselin, A., Felden, B., 2011. A cis-antisense RNA acts in trans in Staphylococcus aureus to control translation of a human cytolytic peptide. Nat. Struct. Mol. Biol. 19, 105–112.
- Sayed, N., Nonin-Lecomte, S., Réty, S., Felden, B., 2012. Functional and structural insights of a Staphylococcus aureus apoptotic-like membrane peptide from a toxin-antitoxin module. J. Biol. Chem. 287, 43454–43463.
- Sharma, C.M., Hoffmann, S., Darfeuille, F., Reignier, J., Findeiss, S., Sittka, A., Chabas, S., Reiche, K., Hackermüller, J., Reinhardt, R., Stadler, P.F., Vogel, J., 2010. The primary transcriptome of the major human pathogen Helicobacter pylori. Nature 464, 250–255.

- Short, F.L., Pei, X.Y., Blower, T.R., Ong, S.-L., Fineran, P.C., Luisi, B.F., Salmond, G.P.C., 2013. Selectivity and self-assembly in the control of a bacterial toxin by an antitoxic noncoding RNA pseudoknot. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 110, E241-249.
- Sierra, R., Viollier, P., Renzoni, A., 2018. Linking toxin-antitoxin systems with phenotypes: A Staphylococcus aureus viewpoint. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Gene Regulatory Mechanisms.
- Smith, A.B., López-Villarejo, J., Diago-Navarro, E., Mitchenall, L.A., Barendregt, A., Heck, A.J., Lemonnier, M., Maxwell, A., Díaz-Orejas, R., 2012. A common origin for the bacterial toxinantitoxin systems parD and ccd, suggested by analyses of toxin/target and toxin/antitoxin interactions. PLoS ONE 7, e46499.
- Van Melderen, L., 2010. Toxin-antitoxin systems: why so many, what for? Curr. Opin. Microbiol. 13, 781–785.
- Van Melderen, L., Bernard, P., Couturier, M., 1994. Lon-dependent proteolysis of CcdA is the key control for activation of CcdB in plasmid-free segregant bacteria. Mol. Microbiol. 11, 1151–1157.
- Van Melderen, L., Saavedra De Bast, M., 2009. Bacterial toxin-antitoxin systems: more than selfish entities? PLoS Genet. 5, e1000437.
- Verstraeten, N., Knapen, W.J., Kint, C.I., Liebens, V., Van den Bergh, B., Dewachter, L., Michiels, J.E., Fu, Q., David, C.C., Fierro, A.C., Marchal, K., Beirlant, J., Versées, W., Hofkens, J., Jansen, M., Fauvart, M., Michiels, J., 2015. Obg and Membrane Depolarization Are Part of a Microbial Bet-Hedging Strategy that Leads to Antibiotic Tolerance. Mol. Cell 59, 9–21.
- Walling, L.R., Butler, J.S., 2016. Structural Determinants for Antitoxin Identity and Insulation of Cross Talk between Homologous Toxin-Antitoxin Systems. J. Bacteriol. 198, 3287–3295.
- Wang, X., Kim, Y., Hong, S.H., Ma, Q., Brown, B.L., Pu, M., Tarone, A.M., Benedik, M.J., Peti, W., Page, R., Wood, T.K., 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., Benedik, M.J., Page, R., Wood, T.K., 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., Wood, T.K., 2013. Type II toxin/antitoxin MqsR/MqsA controls type V toxin/antitoxin GhoT/GhoS. Environ. Microbiol. 15, 1734–1744.

- Wen, J., Won, D., Fozo, E.M., 2014. The ZorO-OrzO type I toxin-antitoxin locus: repression by the OrzO antitoxin. Nucleic Acids Res. 42, 1930–1946.
- Wessner, F., Lacoux, C., Goeders, N., Fouquier d'Hérouel, A., Matos, R., Serror, P., Van Melderen, L., Repoila, F., 2015. Regulatory crosstalk between type I and type II toxin-antitoxin systems in the human pathogen Enterococcus faecalis. RNA Biol 12, 1099–1108.
- Wilbaux, M., Mine, N., Guérout, A.-M., Mazel, D., Van Melderen, L., 2007. Functional interactions between coexisting toxin-antitoxin systems of the ccd family in Escherichia coli O157:H7. J. Bacteriol. 189, 2712–2719.
- Wilmaerts, D., Bayoumi, M., Dewachter, L., Knapen, W., Mika, J.T., Hofkens, J., Dedecker, P., Maglia, G., Verstraeten, N., Michiels, J., 2018. The Persistence-Inducing Toxin HokB Forms Dynamic Pores That Cause ATP Leakage. MBio 9.
- Winther, K.S., Gerdes, K., 2009. Ectopic production of VapCs from Enterobacteria inhibits translation and trans-activates YoeB mRNA interferase. Mol. Microbiol. 72, 918–930.
- Yamaguchi, Y., Park, J.-H., 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., Tokunaga, N., Inouye, M., Phadtare, S., 2014. Characterization of LdrA (long direct repeat A) protein of Escherichia coli. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 24, 91–97.
- Yang, M., Gao, C., Wang, Y., Zhang, H., He, Z.-G., 2010. Characterization of the interaction and cross-regulation of three Mycobacterium tuberculosis RelBE modules. PLoS ONE 5, e10672.
- Yao, J., Guo, Y., Wang, P., Zeng, Z., Li, B., Tang, K., Liu, X., Wang, X., 2018. Type II toxin/antitoxin system ParESO /CopASO stabilizes prophage CP4So in Shewanella oneidensis. Environ. Microbiol. 20, 1224–1239.
- Yoshida, T., Obata, N., Oosawa, K., 2000. Color-coding reveals tandem repeats in the Escherichia coli genome. J. Mol. Biol. 298, 343–349.
- Yoshizumi, S., Zhang, Y., Yamaguchi, Y., Chen, L., Kreiswirth, B.N., Inouye, M., 2009. Staphylococcus aureus YoeB homologues inhibit translation initiation. J. Bacteriol. 191, 5868– 5872.
- Zeng, Z., Liu, X., Yao, J., Guo, Y., Li, B., Li, Y., Jiao, N., Wang, X., 2016. Cold adaptation regulated by cryptic prophage excision in Shewanella oneidensis. ISME J 10, 2787–2800.
- Zhang, Y., Inouye, M., 2009. The inhibitory mechanism of protein synthesis by YoeB, an Escherichia coli toxin. J. Biol. Chem. 284, 6627–6638.

Zhu, L., Sharp, J.D., Kobayashi, H., Woychik, N.A., Inouye, M., 2010. Noncognate Mycobacterium tuberculosis toxin-antitoxins can physically and functionally interact. J. Biol. Chem. 285, 39732–39738.
TA systems	Bacteria	Localization	Copy number	References					
Type I TA systems									
Gram negative bacteria									
<i>hok</i> /Sok	Enterobacteria	Plasmid R1 and chromosome	Up to 15	Pedersen et al., 1999					
<i>ldr</i> /Rdl	E. coli, Salmonella and Shigella	Chromosome	Up to 10	Kawano <i>et</i> <i>al.</i> , 2002; Fozo <i>et al.</i> , 2010					
ibs/Sib	Enterobacteria	Chromosome	Up to 7	Fozo <i>et al.</i> , 2008					
<i>zor</i> /Orz	E. coli	Chromosome	2	Wen <i>et al.</i> , 2014					
aapA/IsoA	H. pylori	Chromosome	6	Sharma <i>et al.</i> , 2010; Arnion <i>et al.</i> , 2017					
Gram positive bacteria									
<i>sprA</i> /SprA _{AS}	S. aureus	Chromosome	2	Sayed <i>et al.</i> , 2011; Germain- Amiot <i>et al.</i> , 2018					
<i>sprG</i> /SprF	S. aureus	Chromosome	4	Pinel-Marie <i>et al.</i> , 2014; Riffaud et al., 2018					
Type II TA systems									
Gram negative ba	cteria								
relB/parE	S. meliloti	Plasmid	2	Milunovic <i>et</i> <i>al.</i> , 2014; Goeders & Van Melderen, 2014					
relE/parE	C. crescentus	Chromosome	8	Fiebig <i>et al.</i> , 2010					

1	Tab	le 1	: Type	I and	type	II TA	systems	in multi	ple co	pies de	evelop	ed in	this	review
----------	-----	------	--------	-------	------	-------	---------	----------	--------	---------	--------	-------	------	--------

TA systems	Bacteria	Localization	Copy number	References				
Type II TA systems								
Gram negative ba								
higBA	V. cholerae N16961	Chromosome	2	Iqbal <i>et al</i> ., 2015				
relBE	V. cholerae N16961	Chromosome	4	Iqbal <i>et al</i> ., 2015				
parDE	V. cholerae N16961	Chromosome	3	Iqbal <i>et al</i> ., 2015				
paaR-paaA- parE	<i>E. coli</i> O157:H7	Chromosome	3	Pandey & Gerdes, 2005; Hallez <i>et al.</i> , 2010				
vapBC	H. influenzae	Chromosome	2	Walling & Bulter, 2016				
Gram positive bacteria								
yefM-yoeB	S. aureus	Chromosome	2	Yoshizumi et al., 2009; Donegan <i>et</i> <i>al.</i> , 2010				
vapBC	M. tuberculosis	Chromosome	Up to 50	Sala <i>et al.</i> , 2014; Slayden <i>et al.</i> , 2018				
mazEF	M. tuberculosis	Chromosome	Up to 10	Sala <i>et al.</i> , 2014; Slayden <i>et al.</i> , 2018				

Table 1 Cont. : Type I and type II TA systems in multiple copies developed in this review.

Introduction



Introduction





Introduction



Contexte de la thèse

S. aureus est une bactérie, à la fois commensale et pathogène de l'Homme, responsable d'infections bénignes de la peau, des tissus mous mais aussi d'infections plus graves comme des endocardites infectieuses, caractérisées par la présence de bactéries dans le sang. Second pathogène responsable d'infections nosocomiales en France, l'impact de *S. aureus* sur la santé publique est majoré par l'expression d'un arsenal de facteurs de virulence et le développement de résistance aux antibiotiques.

S. aureus, comme bien d'autres bactéries pathogènes, possède dans son génome des gènes encodant des STA de types I, II et III, dont l'étude a commencé à la fin des années 2000 (Fernandez-Garcia *et al.*, 2016). Huit STA exprimés par *S. aureus* ont été caractérisés expérimentalement : *sprA1*/SprA1_{AS}, *sprA2*/SprA2_{AS} et *sprG1*/SprF1 pour les STA de type I et MazEF, PemIK_{SA}, YefM-YoeB-sa1, YefM-YoeB-sa2 et Omega/Epsilon/Zeta pour les types II (Schuster & Bertram, 2016 ; Germain-Amiot *et al.*, 2019).

Concernant les loci encodant les STA de type I *sprA1/sprA1_{AS}* (système Fst-like) et *sprG1/sprF1* (famille *txpA*/RatA), ils sont localisés dans des îlots de pathogénie, alors que *sprA2/sprA2_{AS}* est dans le core génome. Les gènes *sprA1*, *sprA2* et *sprG1* encodent des peptides toxiques capables de lyser à la fois les bactéries mais aussi des cellules de l'hôte comme les érythrocytes. De plus, il a été démontré que les toxines SprA1 et SprG1 sont localisées à la membrane bactérienne. L'expression de ces toxines est inhibée par leur antitoxine ARN respective, SprA1_{AS}, SprA2_{AS} et SprF1 (Sayed *et al.*, 2011, 2012 ; Pinel-Marie *et al.*, 2014 ; Germain-Amiot *et al.*, 2019).

Les antitoxines SprA1_{AS} et SprA2_{AS} possèdent un mode de régulation particulier, elles agissent *en trans* pour inhiber la traduction des toxines SprA1 et SprA2. En effet, bien que possédant une région 3' complémentaire des ARNm des toxines (encodées en *cis*), ce sont les régions 5' de SprA1_{AS} et de SprA2_{AS} qui vont se fixer sur les ARNm des toxines pour prévenir la fixation du ribosome (Sayed *et al.*, 2011 ; Germain-Amiot *et al.*, 2019). Il a été également démontré que la structure secondaire de l'ARN *sprA1* ajoute un niveau supplémentaire dans le contrôle de l'expression de la toxine. L'ARN *sprA1*, long de 208 nucléotides, possède une structure formant deux pseudo-nœuds incluant l'ORF encodant la toxine. Ainsi, la séquence SD de *sprA1* est emprisonnée dans cette structure secondaire et la traduction du peptide toxique est naturellement défavorisée.

L'ARN *sprG1* a la particularité de coder pour deux peptides membranaires et sécrétés dont l'expression est inhibée par l'antitoxine SprF1. SprF1 interagit en *cis* avec *sprG1* par

appariement de bases au niveau de la région de chevauchement en 3' des deux ARN. Bien que cette interaction ne soit pas au niveau de la séquence SD de sprG1, l'antitoxine SprF1 possède une double fonction régulatrice puisqu'elle est capable d'inhiber la traduction de sprG1 et de favoriser sa dégradation (Pinel-Marie *et al.*, 2014).

Plusieurs STA de type II ont également été caractérisés chez S. aureus. Dans le cas du système MazEF, l'expression de l'opéron est inhibée par le facteur de transcription σ^{B} qui est le régulateur de réponse aux stress environnementaux. La toxine MazF est une RNase clivant les ARNm au niveau de sites spécifiques reconnaissables par leur séquence UACAU, dont l'activité est empêchée par interaction directe avec l'antitoxine protéique MazE. Le rôle physiologique de MazEF n'est pas encore clairement identifié chez S. aureus, mais des études récentes ont mis en évidence que la délétion de mazEF augmente la sensibilité de S. aureus aux antibiotiques de la classe des β -lactamines et que la délétion de la toxine *mazF* conduit à une augmentation de la formation de biofilms (Donegan & Cheung, 2009 ; Schuster et al., 2015 ; Kato et al., 2017). Le STA PemIKSA est codé par plusieurs plasmides de S. aureus dont le plasmide pAvX de la souche CH91 et un méga-plasmide de la souche MRSA-118. Ce sont des EGM importants pour la pathogénie et l'adaptation de S. aureus à son environnement puisque pAvX encode le gène de la staphopaine A2 permettant le clivage des molécules du complément et que le méga-plasmide MRSA-118 porte des gènes de résistance à l'arsenic, à la pénicilline et un gène codant un transporteur ABC. PemIK_{SA} participerait au maintien de ces plasmides, par un mécanisme de PSK (Bukowski et al., 2013, 2017). La toxine PemK_{SA} est une RNase neutralisée par l'antitoxine PemI_{SA} par interaction protéine-protéine. Les séquences protéiques des toxines MazF et PemKsA sont différentes mais leur activité RNase est proche car PemKsA clive les ARNm cibles au niveau d'une séquence spécifique UAUU (Bukowski et al., 2013).

Un autre STA de type II exprimé par *S. aureus* est YefM-YoeB, composé de la toxine YoeB et de l'antitoxine YefM. C'est un système encodé dans le chromosome, sous la forme de deux systèmes paralogues partageant un haut degré de conservation, nommés « YefM-YoeBsa1 » et « YefM-YoeB-sa2 » (aussi retrouvés dans la littérature sous les noms de « Axe-Txe1 » et « Axe-Txe2 »). Cependant, ce sont des systèmes spécifiques puisque à la fois la neutralisation de l'activité de la toxine et l'auto-régulation de l'opéron sont bien spécifiques à chaque module (Yoshizumi *et al.*, 2009). Comme la toxine YoeB étudiée chez *E. coli*, la RNase YoeB produite chez *S. aureus* semble aussi devoir s'associer aux ribosomes pour cliver les ARNm cibles à proximité du site d'initiation de la traduction (Zhang et Inouye, 2009 ; Larson & Hergenrother, 2014). Toutefois, les conditions activant ce STA et les conséquences de l'action de la RNase YoeB sur la traduction de *S. aureus* demeurent à déterminer. Un STA de type II, fortement homologue à « *yefM-yoeB-sa2* » mais renommé *savRS*, a été récemment caractérisé dans la souche NCTC8325 de *S. aureus*. Au niveau moléculaire, il a été mis en évidence qu'à la fois l'antitoxine SavR et le complexe TA SavRS étaient capables de se fixer sur les promoteurs des gènes *hla* et *efb*, codant pour l' α -hémolysine et une protéine extracellulaire de liaison au fibrinogène, pour réprimer leur expression. De plus, l'implication de ce STA dans la virulence de *S. aureus* a été étudiée *in vivo* avec un modèle murin d'abcès sous-cutané. Il a été démontré que la délétion de ce STA augmentait les capacités hémolytiques de *S. aureus* suggérant que SavRS régulerait négativement l'expression des gènes *hla* et *efb in vivo*, diminuant ainsi la virulence de *S. aureus* (Wen *et al.*, 2018).

Le STA de type II Omega/Epsilon/Zeta est formé de trois composants, le régulateur Omega, l'antitoxine Epsilon et la toxine Zeta. Il est retrouvé chez la souche CM05 de *S. aureus*, résistante à la méticilline, au niveau du plasmide pSM19035 qui est intégré au chromosome. Le STA permet alors d'assurer le maintien de cette région instable du génome lors des divisions bactériennes (Schuster & Bertram, 2016).

Comme de nombreuses espèces bactériennes, *S. aureus* possède de nombreux STA candidats dans son génome, beaucoup d'entre eux identifiés avec des outils bio-informatiques par des homologies de séquences avec les différentes familles de STA connues. Ainsi, trois STA putatifs, homologues du STA de type III *tenIP*, initialement découvert chez *Photorhabdus luminescens*, ont été prédits sur le chromosome de la souche A9754 et sur différentes plasmides de staphylocoques appelés pPR9, VRSAp, pSK41 et pGO1 (Schuster & Bertram, 2016). Récemment, une vaste étude conduite sur la souche MW2 prédit 67 STA appartenant à 13 familles différentes chez cette souche. Toutefois, des investigations plus poussées sont nécessaires au sujet de ces STA putatifs (Habib *et al.*, 2018).

Pour en revenir aux STA de type I, ils sont fréquemment présents en plusieurs copies dans les génomes bactériens (Fozo *et al.*, 2010). Par exemple, j'ai précédemment évoqué le système *sprA*/SprA_{AS}, présent en au moins deux copies fonctionnelles chez *S. aureus* Newman. Le système *sprG*/SprF n'échappe pas à cette observation, puisque trois copies de ce STA ont été détectées dans le core génome de nombreuses souches de *S. aureus* (Pichon *et al.*, 2005 ; Pinel-Marie *et al.*, 2014). Ces couples d'ARN ont été nommés *sprG*/SprF2, *sprG3*/SprF3 et

sprG4/SprF4, ou bien srn_2230/srn_2240, srn4100/srn_4090 et srn_2250/srn_2260 selon la classification proposée dans la base de données SRD (Sassi *et al.*, 2015).

C'est dans ce contexte que débute mon travail de thèse dans l'unité INSERM U1230 « Bacterial Regulatory RNAs and Medicine », où les STA de type I *sprA1*/SprA1_{AS} et *sprG1*/SprF1 ont préalablement été caractérisés. Il s'inscrit dans la poursuite de l'identification de STA de type I chez *S. aureus*. Deux grands axes de travail seront mis en œuvre dans le but d'étudier les ARN *sprG* et SprF localisés dans le core génome. La première partie de mon travail porte sur la caractérisation de nouveaux STA chez *S. aureus* avec notamment l'étude des régulations croisées puisque nous sommes en présence de STA homologues. La seconde partie de cette thèse concerne la recherche de la fonction biologique des différentes copies de *sprG*/SprF chez *S. aureus* et s'appuie sur un panel de fonctions attribuées aux STA de type I : adaptation aux stress environnementaux, implication dans la persistance aux antibiotiques et la virulence bactérienne.

Partie I :

Identification, caractérisation et étude de la régulation de nouveaux systèmes toxine-antitoxine de type I chez *S. aureus*

<u>Article 2: Functionality and cross-regulation of the four SprG/SprF type I</u> <u>toxin–antitoxin systems in *Staphylococcus aureus*</u>

Les travaux initiés au laboratoire ont permis l'identification d'un STA de type I fonctionnel et exprimé par *S. aureus*, nommé *sprG1*/SprF1 (Pinel-Marie *et al.*, 2014). D'autres copies des gènes *sprG* et *sprF* ont été identifiées par des outils bio-informatiques (Pinel-Marie *et al.*, 2014). L'organisation génomique et les identités de séquence des ARN et des peptides putatifs avec le couple *sprG1*/SprF1 nous suggèrent que ces trois copies coderaient pour des STA de type I. Ainsi, la première partie de mon travail de thèse a pour objectifs l'identification de nouveaux STA de type I chez *S. aureus*, leur caractérisation et l'étude de leur régulation.

La souche HG003 de *S. aureus*, utilisée lors des expériences dont les résultats sont présentés ici, est dérivée de la souche NCTC8325 de *S. aureus*, une souche clinique de sepsis isolée dans les années 1960 (Novick & Richmond, 1965). La souche HG003 présente l'intérêt de posséder des gènes *tcaR* et *rsbU* encodant des protéines régulatrices fonctionnelles. Elle est ainsi considérée comme la souche de référence pour étudier les mécanismes de régulation chez *S. aureus* (Herbert *et al.*, 2010). De plus, son génome a été entièrement séquencé en 2014. Il contient 2,8 millions de paires de bases avec les trois prophages Φ 11, Φ 12 et Φ 13, ainsi que quatre îlots génomiques/de pathogénie nommés vSaα, vSaβ, vSaγ et SaPI2 (Baba *et al.*, 2008 ; Sassi *et al.*, 2014 ; **Figure 26**). De plus, il contient les trois copies de *sprG1* et *sprF1* appartenant au core génome (**Figure 26**). La construction d'outils génétiques a également été réalisée avec succès dans cette souche de *S. aureus* au laboratoire (Mauro *et al.*, 2016).



Figure 26 : Représentation schématique du génome de *S. aureus* HG003. La présence de bactériophages intégrés est indiquée en vert et celle des loci *sprG/sprF* en orange.

Nous avons débuté les recherches par l'étude de l'organisation génomique des différents ARN sprG et SprF dans la souche HG003 de *S. aureus*. Cette organisation génomique, comprenant la position des extrémités 5' et 3' des ARN et la région chevauchante entre chaque couple sprG/SprF, est présentée dans la **Figure 1A de l'article 2**. Les alignements des séquences nucléotidiques des gènes sprF et sprG nous indiquent que seulement sprF2 et sprF4 peuvent être considérés comme des copies avec un pourcentage d'identité de séquence de 93 % et que les autres gènes sprG et sprF peuvent être considérés comme des homologues puisque les identités de séquence sont comprises entre 36 à 64 % (**Figures 1B, 1C et figures supplémentaires Tableau 4, article 2**). De plus, les alignements des séquences peptidiques des deux peptides encodés par sprG1 et des peptides putatifs encodés par sprG2, sprG3 et sprG4 indiquent que ceux-ci coderaient pour de petits peptides de 35, 26 et 19 résidus d'acides aminés respectivement, avec une plus grande conservation des séquences peptidiques au niveau de la région C-terminale (**Figure 1D, article 2**).

Afin d'étudier la fonctionnalité des STA putatifs composés des couples d'ARN sprG2/SprF2, sprG3/SprF3 et sprG4/SprF4, nous avons construit des souches de surexpression des antitoxines putatives SprF2, SprF3 et SprF4 sous le contrôle de leur propre promoteur endogène à l'aide du vecteur à fort taux de copies pCN35 (Charpentier et al., 2004), et des toxines putatives sprG2, sprG3 et sprG4 à l'aide du vecteur pALC sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'anhydrotétracycline (aTc ; Bateman et al., 2001). La surexpression de chaque ARN dans les souches à doubles plasmides, en condition d'induction ou non, a été validée par la technique de Northern blot (Figure 2A, article 2). En présence d'aTc, le suivi de croissance des souches à doubles plasmides par mesure de la densité optique à 600 nm (DO₆₀₀) montre que la surexpression des ARN sprG2, sprG3 et sprG4 induit une forte inhibition de la croissance de S. aureus. Cette toxicité est neutralisée par les antitoxines respectives SprF2, SprF3 et SprF4 (Figure 2B, article 2). Ces résultats ont pu être confirmés en mesurant la viabilité de ces mêmes souches par dépôt de dilutions successives sur des géloses contenant de l'aTc (Figure 2C, article 2). L'ensemble de ces résultats et l'organisation génomique des loci sprG2/sprF2, sprG3/sprF3, sprG4/sprF4 nous indiquent que les paires sprG2/SprF2, sprG3/SprF3 et sprG4/SprF4 constituent des STA de type I fonctionnels.

Nous avons poursuivi les recherches en analysant l'expression des ARN sprG et SprF au cours de la croissance de la souche HG003 de *S. aureus* par la technique de Northern blot. Nous avons mis en évidence que tous les ARN sprG et SprF sont exprimés en milieu riche, à

l'exception de sprG4 (Figure 3A, article 2). La quantification du niveau d'expression de ces ARN, rapporté à celui de l'ARNtm (transcrit de référence), montre que sprG2, SprF2, SprF3 et SprF4 sont principalement transcrits lors de la phase exponentielle de croissance alors que sprG3 est majoritairement transcrit pendant la phase stationnaire de croissance (Figure 3B, article 2). Ce différentiel d'expression entre sprG3 et SprF3 nous a été confirmé lorsque nous avons estimé les quantités de sprG3 et de SprF3 en comparant leur expression chez S. aureus à une gamme de concentrations d'ARN synthétisés in vitro. En effet, les résultats obtenus lors de ces expériences indiquent qu'en phase exponentielle de croissance, sprG3 et SprF3 sont en quantité équivalente alors que pendant la phase stationnaire, sprG3 est presque 3 fois plus abondant que SprF3 (Figure 3D, article 2). De manière plus attendue, nous avons mis en évidence, avec la même méthodologie, qu'il y a toujours plus d'antitoxine SprF2 que de toxine sprG2 à chaque phase de croissance (Figure 3C, article 2). L'analyse de l'expression des ARN sprG et SprF s'est poursuivie par la détermination de leur demi-vie. En effet, il a été montré précédemment au laboratoire que SprF1 a une demi-vie plus courte que celle de sprG1 dans la souche N315 de S. aureus (Pinel-Marie et al., 2014). Nous avons voulu vérifier si cette différence de stabilité était conservée pour les copies de sprGl et SprF1. Après culture de la souche HG003 de S. aureus en présence de rifampicine, un antibiotique inhibant la transcription, nous avons confirmé une plus grande stabilité des toxines sprG2 et sprG3, par rapport aux antitoxines, SprF2, SprF3 et SprF4 (Figures 3E et 3F, article 2).

Afin de mettre en évidence la traduction des peptides putatifs codés par sprG2 et sprG3, nous avons cloné sprG2 et sprG3 en ajoutant une étiquette FLAG en amont du codon stop et en phase par rapport à la séquence des peptides putatifs (Zeghouf *et al.*, 2004). Après avoir validé la surexpression de l'ARN sprG2-FLAG par Northern blot, nous avons mis en évidence, à l'aide d'un anticorps anti-FLAG, la traduction du peptide codé par sprG2 lors de la croissance de la souche HG003 de *S. aureus* (Figure 4, article 2). De plus, après un fractionnement cellulaire, nous avons montré que le peptide codé par sprG2 est un peptide majoritairement localisé à la membrane bactérienne (Figure 4, article 2), comme cela a déjà été démontré pour les deux peptides codés par sprG1 (Pinel-Marie *et al.*, 2014). Cette méthodologie ne nous a malheureusement pas permis de mettre en évidence la traduction du peptide encodé par sprG3 chez *S. aureus*, malgré plusieurs tentatives et en positionnant également l'étiquette FLAG en aval du codon d'initiation du peptide putatif. De plus, la séquence de l'ARN sprG3 comporte quatre codons d'initiation de la traduction prédits par bio-informatique, un codon UUG et trois codons AUG. La recherche du cadre ouvert de lecture permettant la traduction de la toxine

sprG3 s'est donc poursuivie *in vitro* par la technique de toeprint. Nous avons ainsi identifié le codon d'initiation de la traduction $A_{85}UG_{87}$ utilisé pour la traduction du peptide encodé par *sprG3*, confirmée par la technique de traduction *in vitro* (**Figures 4D et 4E, article 2**).

Afin de démontrer que la toxicité des ARN sprG2 et sprG3 est liée à la production des peptides toxiques, nous avons remplacé les codons d'initiation de la traduction putatifs de sprG2 et de sprG3 par des codons stop. Nous avons confirmé que la toxicité de la surexpression de sprG2 et de sprG3 est dépendante de la traduction d'un peptide toxique par la mesure de la DO₆₀₀ des différentes souches de *S. aureus* induites à l'aTc (**Figures 5A, 5B et 5C, article 2**). De plus, en utilisant des sondes fluorescentes nous permettant de discriminer les bactéries vivantes des bactéries mortes, nous avons observé, par microscopie à fluorescence, que la surexpression des peptides encodés par sprG2 et sprG3 induit une stase bactérienne après une heure d'induction à l'aTc, contrairement à la surexpression des peptides encodés par sprG1 (**Figure 5D, article 2**) (Pinel-Marie *et al.*, 2014).

Nous nous sommes ensuite intéressés à la régulation de l'expression des toxines sprG2 et sprG3 par leurs antitoxines respectives, SprF2 et SprF3. Dans un premier temps, nous avons réalisé des expériences de retard sur gel où nous avons mis en évidence la formation de complexes ARN-ARN entre sprG2 et SprF2 puis entre sprG3 et SprF3, au niveau de leur zone de chevauchement en 3' (Figures 6A et 6B, article 2). Dans un second temps, nous avons montré par Northern blot que la surexpression de SprF2 et SprF3 induit une forte réduction du taux des ARN sprG2 et sprG3 et inversement (Figure 6C, article 2). Nous avons démontré que la surexpression de SprF2 induit également une inhibition de la traduction du peptide encodé par sprG2 (Figure 6D, article 2). Enfin, nous avons mis en évidence que la régulation de l'expression de la toxine sprG2 ets grG2 et reflectuée au niveau ARN puisque l'ajout de SprF2 n'altère pas la traduction de sprG2 lors d'expériences de traduction *in vitro*, à la différence de SprF1 (Pinel-Marie *et al.*, 2014) (Figure 6E, article 2).

Comme mon sujet de thèse porte sur des STA homologues, nous avons voulu étudier la possibilité d'interactions croisées entre ces systèmes, tout d'abord, du point de vue du contrôle de la toxicité, puis ensuite de la régulation de l'expression des ARN. A l'aide de souches à doubles plasmides surexprimant *sprG1*, *sprG2* ou *sprG3* en présence d'aTc, nous avons démontré que leur toxicité est spécifiquement neutralisée par leur antitoxine respective SprF1, SprF2 ou SprF3. De façon surprenante, SprF4 ne permet pas de neutraliser la toxicité de *sprG2*,

malgré une identité de séquence importante (**Figure 7, article 2**). Nous avons ensuite montré *in vitro* par retards sur gel la présence d'une interaction entre les ARN *sprG2* et SprF4 et entre les ARN *sprG3* et SprF1, mais avec une affinité moindre que pour leur antitoxine respective (**Figure 8A et Figures supplémentaires 5 et 6 de l'article 2**). Afin de vérifier l'impact de ces résultats obtenus *in vitro*, nous avons utilisé les souches de surexpression de SprF1, *sprG1*/SprF1, SprF2, *sprG2*, *sprG2*/SprF2, SprF3, *sprG3*, *sprG3*/SprF3 et SprF4 pour analyser par Northern blot le niveau de chacun de ces ARN. En rapportant le niveau de chaque ARN à celui obtenu avec la souche possédant le vecteur pCN35 vide, les résultats indiquent la présence de modulations du niveau de certains ARN *sprG* et SprF dans les souches de surexpression de SprF1, *sprG2* et SprF4. Ces variations de niveaux d'ARN semblent être spécifiques puisqu'elles ne sont plus observées dans les souches HG003 délétées des loci *sprG1/sprF1* et *sprG2/sprF2* (**Figures 8B, 8C, 8D et 8E et Figure supplémentaire 7, article 2**).

Afin d'identifier la fonction biologique des STA *sprG*/SprF, nous avons étudié l'expression de ces ARN lorsque *S. aureus* est soumis à des stress rencontrés lors de l'infection d'un hôte comme les stress oxydant et hyperosmotique. En effet, des études ont déjà montré l'implication de STA de type I dans l'adaptation de *B. subtilis* à son environnement (Jahn & Brantl, 2013 ; Müller *et al.*, 2016 ; Meissner *et al.*, 2016 ; Reif *et al.*, 2018). Nous avons montré par Northern blot une diminution importante du niveau des antitoxines SprF en présence de ces deux stress (**Figure 9A et Figure supplémentaire S8, article 2**). Puisque le phagolysosome est connu pour provoquer un environnement oxydant nécessitant l'adaptation de *S. aureus* pour sa survie (Horn *et al.*, 2018), nous avons quantifié les niveaux des ARN *sprG* et SprF par RT-qPCR après deux heures d'internalisation de la souche HG003 de *S. aureus* dans les macrophages humains (lignée THP-1 de monocytes humains différenciés en macrophages par le PMA (Phorbol-Myristate Acetate)). Les résultats que nous avons obtenus indiquent que seul le STA *sprGI*/SprF1 présente une expression significativement différente au cours de la phagocytose, avec une diminution plus importante du niveau d'ARN de *sprG1* que de SprF1 (**Figure 9B, article 2**).

En conclusion de cette étude, nous avons démontré que les couples d'ARN *sprG2*/SprF2 et *sprG3*/SprF3 constituent des STA de type I fonctionnels exprimés par *S. aureus* et homologues du système *sprG1*/SprF1 caractérisé au laboratoire. Nous avons montré que les antitoxines SprF2 et SprF3 inhibent l'expression des toxines *sprG2* et *sprG3* qui codent pour des peptides toxiques capables d'induire la stase de *S. aureus* en condition de surexpression.

Nous avons également démontré que le contrôle de la toxicité engendrée par l'induction de l'expression des toxines *sprG* est spécifique à chaque couple *sprG*/SprF (**Figure 27**). En revanche, nous avons identifié des régulations croisées entre les ARN *sprG* et SprF au niveau ARN (**Figure 27**). Enfin, nous avons observé des variations du niveau des ARN *sprG* et SprF au cours de stress oxydant et hyperosmotique et après la phagocytose de *S. aureus* par des macrophages humains, observations essentielles pour la compréhension de la fonction biologique de ces STA.

L'ensemble de ces résultats a permis la publication d'un article intitulé « Functionality and cross-regulation of the four SprG/SprF type I toxin–antitoxin systems in *Staphylococcus aureus* », par **Camille Riffaud**, Marie-Laure Pinel-Marie, Gaëtan Pascreau et Brice Felden, publié dans Nucleic Acids Research en février 2019.



Figure 27 : Représentation schématique résumant les connaissances actuelles sur les interactions croisées entre les 4 homologues du STA *sprG*/SprF de *S. aureus*.

<u>Article 2</u>

Functionality and cross-regulation of the four SprG/SprF type I toxin–antitoxin systems in *Staphylococcus aureus*

Camille Riffaud, Marie-Laure Pinel-Marie, Gaëtan Pascreau and Brice Felden

Nucleic Acids Research, 28 February 2019, 47 (4): 1740–1758.

Functionality and cross-regulation of the four SprG/SprF type I toxin–antitoxin systems in *Staphylococcus aureus*

Camille Riffaud, Marie-Laure Pinel-Marie^{*}, Gaëtan Pascreau and Brice Felden^{®*}

Université de Rennes 1, Inserm, BRM (Bacterial Regulatory RNAs and Medicine) UMR_S 1230, 35000 Rennes, France

Received August 02, 2018; Revised November 29, 2018; Editorial Decision November 30, 2018; Accepted December 04, 2018

ABSTRACT

Toxin-antitoxin (TA) systems are ubiquitous among bacteria, frequently expressed in multiple copies, and important for functions such as antibiotic resistance and persistence. Type I TA systems are composed of a stable toxic peptide whose expression is repressed by an unstable RNA antitoxin. Here, we investigated the functionalities, regulation, and possible cross-talk between three core genome copies of the pathogenicity island-encoded 'sprG1/sprF1' type I TA system in the human pathogen Staphylococcus aureus. Except for SprG4, all RNA from these pairs, sprG2/sprF2, sprG3/sprF3, sprG4/sprF4, are expressed in the HG003 strain. SprG2 and SprG3 RNAs encode toxic peptides whose overexpression triggers bacteriostasis, which is counteracted at the RNA level by the overexpression of SprF2 and SprF3 antitoxins. Complex formation between each toxin and its cognate antitoxin involves their overlapping 3' ends, and each SprF antitoxin specifically neutralizes the toxicity of its cognate SprG toxin without cross-talk. However, overexpression studies suggest cross-regulations occur at the RNA level between the SprG/SprF TA systems during growth. When subjected to H₂O₂-induced oxidative stress, almost all antitoxin levels dropped, while only SprG1 and SprF1 were reduced during phagocytosis-induced oxidative stress. SprG1, SprF1, SprF2, SprG3 and SprF3 levels also decrease during hyperosmotic stress. This suggests that novel SprG/SprF TA systems are involved in S. aureus persistence.

INTRODUCTION

The Gram-positive *Staphylococcus aureus* bacteria is part of the human commensal flora, and can be found in the

skin and nostrils of 20-30% of the population (1). But S. aureus is also a major pathogen that causes a wide spectrum of nosocomial and community-associated infections that can range from skin and soft tissue infections all the way to life-threatening diseases (2,3). In addition to expressing a large set of virulence factors, S. aureus antibiotic resistance is a major public health issue (4). The expression of S. aureus virulence factors is precisely tuned by regulatory proteins and small RNAs (sRNAs) (5,6). S. aureus expresses hundreds of these sRNAs, which have been compiled into the Staphylococcal regulatory RNA Database (SRD: http: //srd.genouest.org/) (7-9). Initially detected by bioinformatic and transcriptome analyses (10), seven of these sR-NAs are expressed from pathogenicity islands (PIs), so they were named SprA to SprG, for small pathogenicity island RNA. One of these, SprD, contributes to infection in a murine model of sepsis (11), while SprC attenuates S. aureus virulence (12). Several of the 'Spr' sRNAs have associated cis-antisense RNA (asRNAs). For instance, the SprA1/SprA1_{AS} and SprG1/SprF1 RNA pairs have been identified as functional type I toxin-antitoxin (TA) systems (13, 14).

TA systems are genetic modules that encode a stable toxic protein, whose overexpression leads to growth arrest or cell death, along with a labile antitoxin that neutralizes the toxin's activity (15). TA systems were initially discovered in the 1980s on plasmids, where they maintain daughter cells through post-segregational killing (16). They are currently classified into six types depending on the antitoxin's nature and mode of action (17). The antitoxins can be RNA (types I and III) or protein (types II, IV, V and IV). They act in different ways, by inhibiting toxin synthesis, sequestering toxins, promoting toxin degradation, or by counteracting toxic activity (17). Chromosomal TA systems possess various biological functions, including maintaining the stability of genetic elements, growth control in response to environmental stresses, and persister cell formation (18-21). Like other pathogens (22), S. aureus has genes that express types I, II, and III TA systems within

© The Author(s) 2018. Published by Oxford University Press on behalf of Nucleic Acids Research.

(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com

^{*}To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 223234851; Email: bfelden@univ-rennes1.fr Correspondence may also be addressed to Marie-Laure Pinel-Marie. Tel: +33 223234850; Email: marie-laure.pinel@univ-rennes1.fr

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License

its genome, and five have been characterized experimentally: *sprA1/sprA1_{AS}* and *sprG1/sprF1* (type I); and *mazEF*, *yefM-yoeB* and *omega/epsilon/zeta* (type II) (23,24).

Type I TA systems are frequently present in multiple copies in bacterial genomes (25). Three additional copies of the PI-encoded SprG1/SprF1 RNA pair were detected within the core genome of S. aureus strains (10,25). The sprG2/sprF2, sprG3/sprF3 and sprG4/sprF4 core genome copies were renamed srn_2230/srn_2240, srn_4100/srn_4090 and srn_2250/srn_2260 according to the SRD database classification (8). In this study, we investigated their functionalities, regulations, and cross-talk. Our experimental data confirmed the existence of these additional copies in the S. aureus HG003 strain, and demonstrated that they function as TA systems. SprG2 and SprG3 RNA encode toxic peptides whose overexpression trigger S. aureus stasis but not death, contrary to SprG1-encoded peptides (14). This toxicity is abolished by overexpressing SprF2 or SprF3 RNA antitoxins, which down-regulate, at the RNA level, SprG2 or SprG3 peptide translation. Each SprF antitoxin specifically neutralizes its cognate SprG toxin, without cross-talk. However, our results suggested cross-regulations between the SprG/SprF TA systems, with SprG/SprF pairs modulating the RNA levels of some other copies during S. aureus growth. All SprF antitoxin RNA levels drop during H2O2-induced oxidative stress, although only SprG1 and SprF1 levels are reduced during phagocytosis-induced oxidative stress. Furthermore, SprG1, SprF1, SprF2, SprG3 and SprF3 RNA levels also decrease during hyperosmotic stress. This suggests a biological function for SprG/SprF TA systems during stress adaptation.

MATERIALS AND METHODS

Strains, plasmids and genetic manipulations

Strains, plasmids, and primers are listed in Supplementary Tables S1–S3. Staphylococcus aureus strains were grown at 37°C, 160 rpm, in brain heart infusion broth (BHI, Oxoid). When necessary, chloramphenicol and erythromycin were added at 10 µg/ml, or at 5 µg/ml for strains harboring two plasmids. We used the high-copy-number plasmid pCN35 to overexpress SprF1-4, SprG2-3, SprG2-SprF2 and SprG3-SprF3, each under the control of its own promoter (26). For the flagged SprG2 construct, a sequence encoding for the 3xFLAG epitopes was added upstream from the termination codon, in-frame with the SprG2-encoded peptide (27). This fragment, with flanking BamHI/EcoRI sites, was then inserted into pCN35. The flagged SprG2 construct which also expresses SprF2 corresponds to a 706-bp fragment of 192 nucleotides (nts) upstream of SprG2 and 143 nts downstream from SprF2. To generate constructs that are inducible by anhydrotetracycline (aTc), we amplified S. aureus HG003 DNA fragments starting at the +1 nt of transcription and ending 38 (SprG2), 36 (SprG3) or 31 (SprG4) nts downstream from its 3' end, then inserted these into pALC (28). To generate an inducible construct containing an 'SprG2-STOP' mutant, we created a premature TAA termination codon by replacing G88 by a thymine, and T89 and G90 by two

adenines. For the 'SprG3-STOP1-4' mutants, the four initiation codons (TTG63, ATG87, ATG102 and ATG108) in-frame with the TAA termination codon were mutated one at a time to obtain termination codons, then inserted into pALC. All of the constructed plasmids were transformed into S. aureus RN4220 (29) and then into S. aureus HG003 (30). Overexpression strains were confirmed by northern blotting. To inactivate the sprF1/SprG1 gene pair, HG003 DNA fragments from 1007 bp upstream and 904 bp downstream of the sprF1/SprG1 gene were amplified by PCR then cloned onto the BamHI/PstI sites of the temperature-sensitive plasmid pBT2 (31). The resulting pBT2 Δ sprF1/sprG1 plasmid was transformed into S. aureus strain RN4220, then into HG003. Mutants were enriched via growth at 42°C. Cells from stationaryphase cultures were plated onto trypticase soy agar (TSA) plates and incubated at 37°C. Colonies were imprinted on plates supplemented with 10 μ g/mL chloramphenicol. Chloramphenicol-sensitive colonies were tested by PCR for the deletion of sprF1/sprG1, then confirmed by northern blots.

Race mapping

The primers used are presented in Supplementary Table S3. First, 5 μ g total RNAs from *S. aureus* HG003 were treated with Terminator 5'-phosphate-dependent exonuclease (Epicentre) to degrade 5'-monophosphate RNA, then with polyphosphatase (Epicentre) to remove pyrophosphate from the terminal single-strand RNA (9). Race mapping (rapid amplification of cDNA ends) was performed for SprG2 and SprG3 RNAs as previously described (14).

RNA extraction, northern blots and RNA half-life determination

RNA extraction was performed as previously described (11). DNA probes for RNA detection are listed in Supplementary Table S3. We separated 10 µg each of total RNAs onto 8% polyacrylamide/8M urea gels and transferred them onto Hybond-N⁺ membranes (Amersham). Specific ³²P-labeled probes were hybridized in ExpressHyb solution (Clontech), then washed, exposed, and scanned with a PhosphorImager (Molecular Dynamics). Quantifications were performed with ImageQuant and normalized to either transfer-messenger RNA (tmRNA) or 5S ribosomal RNA. For the RNA half-life measurements, S. aureus HG003 was cultured overnight, diluted to 1/100, grown for an additional 3 h at 37°C to the exponential growth phase, and finally incubated with 200 μ g/ml rifampicin for 1–120 min. Samples of 2 ml each were taken before and then at 1, 3, 5, 7.5, 10, 15, 20, 30, 60 and 120 min after rifampicin addition. These samples were centrifuged, and pellets were frozen in liquid nitrogen then stored at -80° C. The RNA was then extracted and northern blot assays performed.

SprG induction, growth, and cell death experiments

For the kinetic assays, strains containing the relevant plasmids were grown overnight in BHI. The cultures were then diluted to 1/100 in BHI, then grown in 96-well microtiter plates for 135 min at 37° C until the exponential growth phase (14). To induce expression of SprG1, SprG2, SprG3 and SprG4, the cultures were then incubated with 1 or 2 μ M of aTc. For the kinetics, the optical absorbance at 600 nm (OD₆₀₀) was measured at 30-min intervals using a Synergy 2 multi-mode reader (Biotek). To determine the effects of SprG induction on bacterial growth, cultures were prepared by 2-fold serial dilutions of exponential phase cultures on BHI plates containing 1 or 2 μ M aTc, then incubated for 24 h at 37°C. For the cell death experiments, cultures were incubated for 135 min, washed with 9‰ saline solution, then stained with a LIVE/DEAD bacterial viability kit (Invitrogen). Pictures of fluorescence-labeled cells were captured with a Leica DM RXA2 microscope and a Cool-SNAP HQ charge-coupled device camera using Metavue software (Molecular Devices).

Protein extraction, cell fractionation and western blots

Protein extracts were recovered as previously described (13,32). Zinc staining was done on the samples using a Biorad zinc stain and destain kit to verify the protein amounts used for western blotting. Samples were separated onto 16% tricine SDS-PAGE gels and transferred onto Amersham Hybond-P PVDF membranes. After blocking, the membranes were incubated with mouse monoclonal anti-FLAG horseradish peroxidase (HRP) antibodies (Sigma). The membranes were revealed after incubation using an ECL Plus western blotting detection kit (Amersham) and scanned with a LAS4000 imager. In the case of western blots containing cell fractionation samples, the membranes were incubated with the following antibodies: anti-FLAG; rabbit polyclonal anti-Micrococcus luteus ATPase (33); rabbit anti-S. aureus SarA (produced in our laboratory); and mouse monoclonal anti-S. aureus Protein A (Sigma). After incubation with HRP-conjugated secondary antibodies, the membranes were revealed as detailed above.

In vitro transcription, RNA labeling and translation assays

All RNAs were transcribed from PCR-amplified templates using HG003 or N315 genomic DNA and forward primers containing a T7 promoter sequence (Supplementary Table S3). PCR-generated DNA was used as the template for transcription with a MEGAscript T7 kit (Ambion). RNAs were gel-purified, eluted, and ethanol precipitated. The 5' ends of SprF1–4 purified *in vitro* were labeled as previously described (34). *In vitro* translation of [³⁵S]-methionine was done (13) using an *Escherichia coli* S30 Extract System for Linear Templates (Promega).

Gel shift and toeprint assays

Gel shift assays were performed as previously described (34). For determination of the dissociation constant (K_d), 0.12 pmol labeled SprF RNA was incubated with varying concentrations (0.0025–0.2 or 0.025–2.0 pmol respectively) of unlabeled SprG2 or SprG3 RNA. Interaction analysis between the pairs SprG2/SprF2, SprG2/SprF4 and SprG3/SprF3 were performed with 0.5 pmol of complete or truncated SprG2 and SprG3 RNA incubated with 0.25 or 0.5 pmol of SprF2, SprF4, and SprF3 RNA. For the cross-regulation experiments, 0.01–0.1 pmol of labeled SprF

RNA was incubated with 0.05–0.5 pmol of unlabeled SprG RNA. For gel shift assays, RNAs were incubated in binding buffer (80 mM K-HEPES pH 7.5, 4 mM MgCl₂, 330 mM KCl) for 20 min at 30°C before native gel separation. For the toeprinting assays, annealing mixtures containing 4 pmol SprG3 RNA with 0.5 pmol 'SprG3-AS-SRD'-labeled primer were incubated with a buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 60 mM NH₄Cl) for 2 min at 90°C. Renaturation was done in the presence of 10 mM MgCl₂ for 20 min at 20°C. The ribosomes were reactivated for 15 min at 37°C and diluted in the reaction buffer. Various concentrations (0, 0.5, 1 or 2 pmol) of purified 70S ribosomes were added to each sample, and these were incubated for 5 min at 37°C, after which MgCl₂ was adjusted to 10 mM. After 15 min at 37°C, 10 pmol of uncharged tRNA^{fMet} was added and incubated for 5 min at 37°C. The cDNA were synthesized with 2 U of AMV RT (NEB) for 15 min. Reactions were stopped by the addition of 15 µl of loading buffer II (Ambion). The cDNAs were loaded and separated onto 8% polyacrylamide/8M urea gels. Sequencing ladders were generated with the primer labeled with 'SprG3-AS-SRD' (Supplementary Table S3).

Stress assays

Strains were grown overnight in tryptic soy broth (TSB) diluted to 1/10 with a TSBd buffer (2.5 g/l K₂HPO₄, 2.5 g/l glucose, 5 g/l NaCl). Cultures were diluted to an OD₆₀₀ of 0.1 in TSBd and grown until the OD₆₀₀ reached 0.5. To create hyperosmotic stress, sodium chloride was added to the culture to a final concentration of 2 M. For the oxidative stress, hydrogen peroxide was added to a final concentration of 10 mM. After the stress agents were added, the cultures were grown for 1 h at 37°C under agitation. Samples (40 ml) were collected by centrifugation, and the pellets stored at -80° C until RNA extraction was done.

Phagocytosis assays

10⁷ THP-1 monocyte cells (ATCC) were plated into 175 cm² flasks and cultured in RPMI-1640 medium (Invitrogen) containing 10% decomplemented fetal bovine serum (FBS, Biowest) at 37°C and 5% CO₂. The monocytes were then differentiated into macrophages for 3 days using 120 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma). The macrophages were then cultured for another 3 days in complete RPMI medium without PMA. The phagocytes were infected at an MOI of 10:1 (bacteria:macrophages) with S. aureus HG003 in RPMI-1640 containing 5% human AB serum (hSAB, EFS Rennes) for 2 h at 37°C and 5% CO₂. After three washes in phosphate-buffered solution (PBS) $1 \times$, in order to eliminate extracellular bacteria the cells were treated with 10 µg/ml lysostaphin (Sigma) for 1 h at 37°C and 5% CO₂. Cells were rewashed, lysed in PBS 1× containing 0.5% triton X-100 for 10 min at room temperature (RT), then centrifuged for 10 min at 4500 rpm, 4°C. The supernatant was eliminated and the cell lysate resuspended in RNA lysis buffer, after which the RNA extraction was performed as described (35). RNA preparations were treated twice in a row with amplification grade DNase I (ThermoFisher) for 20 min at RT, each time purified

by phenol/chloroform extraction. Purified RNA were used to produce cDNA in a reverse transcription assay (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Life Technologies) using either random or specific primers (Supplementary Table S3). The cDNA that corresponded to RNA expressed during phagocytosis were then amplified by qPCR using a RealMasterMIX SYBR Kit (Life Technologies). Their amounts were compared to those present in the inoculum before infection, using tmRNA as reference gene.

RESULTS

SprF and SprG end mapping, nucleotide overlaps and sequence alignments in the S. aureus HG003 strain

Up to three copies of the 'sprG1/sprF1' locus were detected in various S. aureus strains (10,14). They are all located in the core genome, with sprG2/sprF2 and sprG4/sprF4 next to each other. We worked with HG003, which has all of the gene pairs and is considered to be the reference strain for studying S. aureus regulation (30). We began with RACE mapping to compare the SprG2 and SprG3 5' and 3' ends in HG003 to those previously determined in the N315 strain (14). The positions of the 5' and 3' ends of the SprG and SprF RNAs in HG003, as well as their overlapping regions, are shown in Figure 1A. The sprF1 antitoxin gene shares 64%, 54% and 61% sequence identity with putative antitoxins sprF2, sprF3 and sprF4 respectively (Supplementary Table S4). The sprG1 toxin gene shares 56%, 46%, and 48% sequence identity with putative toxins sprG2, sprG3 and sprG4, respectively. The most similar copies are SprF2 and SprF4, which have 93% sequence identity (Supplementary Table S4). A region of 22 nucleotides is conserved between the four SprF copies (Figure 1B). This is located outside the complementary sequence with the SprG toxin mRNA, except in the case of SprF1. The sequence alignments of the sprG genes are more divergent, but each gene is able to encode for a peptide of 35, 26 or 19 amino acids for sprG2, sprG3 and sprG4 respectively (Figure 1C and D). These peptides possess C-terminal amino acid identity, especially between the SprG1- and SprG2-encoded peptides. In summary, the three core genome copies of the 'sprG1/sprF1' locus have overlapping sequences at their 3' ends, and the SprF2 and SprF4 sequences are very similar.

SprG2/SprF2, SprG3/SprF3 and SprG4/SprF4 pairs are functional type I TA systems

Turning to the SprG1/SprF1 pair (14), we assayed the expression of SprF2, SprF3, and SprF4 in *S. aureus* to see how much they neutralized SprG2, SprG3, and SprG4 toxicity. Two sets of plasmids were used for this: pALC, which has promoter inducible by anhydrotetracycline (aTc) that can overexpress the putative three new SprG toxins; and multicopy pCN35, which has an endogenous promoter that might express the putative SprF cognate antitoxins. We used northern blots to validate the overexpression of SprF2, SprF3 and SprF4 RNA in HG003 containing pCN35\OmegaSprF2, pCN35\OmegaSprF3 or pCN35\OmegaSprF4 (Figure 2A). We did the same for SprG2, SprG3 and SprG4 expression after aTc induction in strains transformed with pALCΩSprG2, pALCΩSprG3 or pALCΩSprG4. These

experiments also indicated that with aTc induction, SprG2 and SprG3 RNA levels decrease when SprF2 and SprF3 are overexpressed respectively (Figure 2A, last 2 lanes). Note that none of the overproducing strains designed have a growth phenotype without aTc induction (Supplementary Figure S1). In the presence of aTc, the strains containing pALC and pCN35ΩSprF2-4 (and therefore expressing SprF2-4) grew in the same way as those containing the two empty vectors (Figure 2B). The cells expressing SprG2-4 after aTc induction inhibited S. aureus growth, and this toxicity was fully rescued by overexpressing SprF2-4 (Figure 2B). When spotted on BHI plates in the presence of aTc (Figure 2C), serial dilutions of every S. aureus strain used in this experiment showed the same results as the growth kinetics in liquid cultures. Altogether, these experiments indicate that the SprG2/SprF2, SprG3/SprF3 and SprG4/SprF4 pairs are functional TA systems in S. aureus.

SprF2-4 and SprG2-4 expression levels, relative amounts and stabilities in *S. aureus* HG003

Using probes specific to each SprG and SprF, we used northern blots to show that all SprF and SprG RNAs are expressed in rich medium except SprG4 (Figure 3A). We quantified the expression levels of these RNAs during growth as compared to tmRNA, used as a reference transcript (Figure 3B). We showed that SprG2, SprF2, SprF3 and SprF4 are mainly expressed during the exponential growth phase, while SprG3 was mainly expressed during the stationary phase (Figure 3A and B). We estimated the quantities of SprG2, SprF2 and SprF4, and of SprG3 and SprF3, by comparing their expressions to the concentrations of a range of purified synthetic RNA (Figure 3C and D). During the exponential and stationary growth phases (OD_{600} values of 1.6 and 9.3), there were respectively about 27 and 42 times more SprF2 than SprG2. We also had about 31 and 68 times more SprF2 than SprF4 during the exponential and stationary growth phases (Figure 3C). Meanwhile, SprG3 and SprF3 are present in equal amounts during the exponential growth phase ($OD_{600} = 1.6$), but during the stationary phase ($OD_{600} = 9.3$), SprG3 is about three times as abundant as SprF3 (Figure 3D). RNA halflife determinations (Figure 3E and F) showed that SprF2 (~4 min) and SprF4 (~6 min) have much shorter half-lives than SprG2 (>120 min), with SprF3 (~7 min) also having a much shorter half-life than SprG3 (>120 min). So, we were able to demonstrate that the SprG2 and SprG3 toxins and SprF2, SprF3 and SprF4 antitoxins are expressed at various levels throughout S. aureus HG003 growth. Quantitative estimations and half-life determinations for each RNA indicated that the unstable SprF2 and SprF4 antitoxins are much more present in S. aureus than the stable SprG2 toxin, while at the end of growth, the stable SprG3 toxin is more present than its unstable SprF3 antitoxin.

SprG2 and SprG3 each express a peptide

We next decided to test whether SprG2 and SprG3 could encode and express peptides. In *sprG2* and *sprG3* sequences, we identified open reading frames (ORFs), with putative Shine-Dalgarno (SD) sequences \sim 8 nts upstream from the

Nucleic Acids Research, 2018 5



Figure 1. Genomic locations of the four copies of *sprG* and *sprF*, sequence alignments of the *sprF* and *sprG* gene copies and of the SprG-encoded peptides. (A) Genomic location, length determination by RACE, and nucleotide overlaps of SprG1-4 and SprF1-4 in *Staphylococcus aureus* HG003. (**B** and **C**) Sequence alignments of *sprF* and *sprG* including their promoters. TATA boxes are green; +1 of transcription are magenta boxes; asterisks indicate the nucleotides shared by the four sequences; and the mutation shared between a set of three common nucleotides is boxed in red. (**C**) The proposed Shine-Dalgarno sequences are boxed and underlined in dark gray; the first peptide initiation codon (M1 for SprG1) is boxed in red, and the second (M14 for SprG1) is boxed in blue. Sequences of SprG-encoded peptides are yellow until the stop codon, which is underlined and bold. (**D**) Sequence alignments of the SprG-encoded peptides are blue, and those common to three SprG-encoded peptides are blue, and those common to three SprG-encoded peptides are prene.

6 Nucleic Acids Research, 2018



Figure 2. SprG2, SprG3 and SprG4 toxin RNA overexpression triggers *Staphylococcus aureus* growth inhibition which is reversed by their respective antitoxins. (A) Northern blot analysis of SprG2, SprF2, SprG3, SprF3, SprG4 and SprF4 RNA expression levels in isogenic *S. aureus* HG003 strains containing the following plasmids: (left) pALC and pCN35; pALC and pCN35ΩSprF2; pALCΩSprG2 and pCN35; or pALCΩSprG2 and pCN35ΩSprF2; (middle) pALC and pCN35; pALC and pCN35ΩSprF3; pALCΩSprG4 and pCN35; or pALCΩSprG3 and pCN35ΩSprF3; or (right) pALC and pCN35; pALC and pCN35ΩSprF4; pALCΩSprG4 and pCN35; or pALCΩSprG4 and pCN35ΩSprF4. All samples after anhydrotetracycline (aTc) induction of the pALC vectors are blue, and tmRNA is the internal loading control. (B) Growth kinetics in liquid cultures and (C) serial dilutions of HG003 strains containing the following plasmids: (left) pALC and pCN35; pALC and pCN35ΩSprF2; pALCΩSprG2 and pCN35; or pALCΩSprG2 and pCN35ΩSprF2; (middle) pALC and pCN35ΩSprF3; pALCΩSprG3 and pCN35; or pALCΩSprG2 and pCN35ΩSprF2; mALCΩSprG2 and pCN35ΩSprF2; middle) pALC and pCN35ΩSprF3; pALCΩSprG3 and pCN35; or pALCΩSprG3 and pCN35ΩSprF3; or (right) pALC and pCN35ΩSprF4; pALCΩSprG4 and pCN35ΩSprF4; pALCΩSprG3 and pCN35ΩSprF4; pALCΩSprG4 and pCN35ΩSprF4; pALCΩSprG4 and pCN35ΩSprF4; pALCΩSprG3 and pCN35ΩSprF4; pALCΩSprG4 and pCN35ΩSprF4; pALC

Nucleic Acids Research, 2018 7



Figure 3. SprG2, SprG3, SprF2, SprF3 and SprF4 RNA expression survey, quantities, and stabilities in *Staphylococcus aureus* HG003. (A) Growth kinetics in liquid cultures of *S. aureus* HG003, and northern blots detecting SprG2, SprF2, SprG3, SprF3, SprG4 and SprF4 RNA at various times during growth, with tmRNA as the internal control. (B) SprF2, SprG2, SprF3, SprG3 and SprF4 RNA quantifications during *S. aureus* HG003 growth relative to tmRNA. (C) RNA quantifications of SprG2, SprF2, and SprF4 and (D) SprG3 and SprF3 relative to a range of increasing amounts of synthetic SprG2, SprF2, SprF4, SprG3 and SprF4 RNA, *n vivo* samples were taken during exponential $(OD_{600} = 1.6)$ and stationary $(OD_{600} = 9.3)$ growth phases. (E) SprG2, SprF2, SprG3, SprF3 and SprF4 expression levels during growth after rifampicin addition, relative to the 5S rRNA control. (F) Quantification of the RNA levels of SprG2 (black circles), SprF2 (white circles), SprG3 (white squares), SprF3 (black squares) and SprF4 (gray triangles) after rifampicin addition. AU, arbitrary units. The error bars in B and F indicate variations between three biological replicates.

potential initiation codon (Figure 1C, gray highlighting). SprG2 and SprG3 can therefore express peptides: 35 amino acids with a predicted molecular weight (MW) of \sim 3.9 kDa for the SprG2 peptide, and 26 amino acids with a predicted MW of ~2.9 kDa for the SprG3 peptide. To investigate whether SprG2 produces this peptide during growth, we generated a reporter construct by adding a sequence having a predicted MW of ~2.75 kDa (3xFLAG) in-frame ahead of the predicted termination codon. In addition to endogenous SprG2 RNA, northern blots validated the expression of SprG2-FLAG during growth, an overexpression that caused a small difference in the amount of bacterial biomass formed as compared to the empty vector strain (Figure 4A). Using anti-FLAG antibodies, immunoblots revealed that a SprG2 fusion peptide was expressed during growth, and furthermore that this peptide was expressed at a higher level during the stationary growth phase (Figure 4B). We next studied the subcellular localization of the flagged SprG2encoded peptide within S. aureus cells. HG003 cell wall, membrane, cytoplasm, and extracellular fractions were prepared and then analysed by western blotting. To control the purity of the cell fractionations, we used anti-ATPase, anti-SarA, and anti-protein A antibodies (Figure 4C). As expected, SarA was located in the cytoplasmic fraction, protein A was extracellular, and ATPase was mainly found at the membrane (Figure 4C). No peptide was detected for the S. aureus strain with an empty pCN35 tested as a negative control. Immunoblots with anti-FLAG indicated that the SprG2-encoded peptide was detected both in the membrane and extracellular fractions (Figure 4C), as with most type I toxins (36). Despite several attempts, we could not demonstrate SprG3-encoded peptide expression in vivo by immunoblotting with an anti-FLAG antibody. In fact, there are four predicted translation initiation codons within the SprG3 RNA sequence (Figure 4D, underlined). To evaluate the direct interaction between the ribosomes and the predicted translation initiation signals, we used toeprinting assays on the ternary initiation complexes of purified ribosomes, initiator tRNAfMet, and SprG3. In the SprG3 ORF, we detected a ribosome toeprint at position C_{103} , 19 nts downstream from A+1 of the first predicted initiation codon (Figure 4D). We performed in vitro translation assays to demonstrate SprG3-encoded peptide production, with SprG1 and SprG2-encoded peptides as positive controls and SprB sRNA (10) as negative control (Figure 4E). This showed that synthetic SprG3 RNA produces a peptide with an apparent MW of 2.9 kDa. The results of all of these experiments show that SprG2 and SprG3 RNA do encode peptides, which could explain their toxicity.

The encoded peptides of both SprG2 and SprG3 inhibit *S. aureus* growth, triggering bacterial stasis

To determine whether SprG2 and SprG3 toxicity is linked to peptide production, we constructed 'pALCΩSprG2-STOP' and 'pALCΩSprG3-STOP' strains. These overexpress SprG2 or SprG3, and to abolish peptide production their initiation codon was replaced with a UAA termination codon (Figure 5A). SprG3's RNA sequence contains several putative translation initiation codons, four of which were replaced by the STOP codons STOP₁, -2, -3 and -

4 (Figure 5A). We used northern blots to verify the production of each overexpressed RNA after aTc induction (Supplementary Figure S2). Without aTc, S. aureus cells containing each of the seven constructs grow similarly to the cells containing the empty vector (Supplementary Figure S2). In the presence of aTc, however, the induced transcription of SprG2, SprG3, or SprG3-STOP1 RNA inhibits S. aureus growth (Figure 5B). Growth inhibition is also observed after adding aTc to solid rich medium followed by serial dilutions (Figure 5C). S. aureus growth is restored almost to isogenic strain levels in both liquid and solid cultures after aTc induction of SprG2-STOP and SprG3-STOP2 (Figure 5, panels B and C). SprG2 and SprG3 also slightly impaired growth independently of the translation product (Figure 5B and C) implying toxicity of the SprG RNAs themselves. This provides experimental evidence that both SprG2 and SprG3 inhibit S. aureus growth since they each express a peptide, with translation initiation at G₈₇UG₈₉ and A₈₅UG₈₇, respectively. After aTc induction, strains overexpressing SprG3-STOP-3 or SprG3-STOP4 had similar growth rates as the isogenic strain having an empty vector. The translation initiation codons A100UG102 and A106UG108 in SprG3 are in-frame with the A85UG87 initiation codon, which is the translation initiation codon used to produce the peptide encoded by SprG3. This suggests that peptide toxicity is linked to the last 18 residues of the SprG3-encoded peptide. These residues are the most conserved between the sequences of the peptides encoded by SprG1-4 (Figure 1D). To determine whether the SprG2- and SprG3-encoded peptides induce S. aureus death, bacteria containing an empty pALC, pALCΩSprG2 and pALCΩSprG2-STOP mutant, or pALCΩSprG3 and pALCΩSprG3-STOP2 mutant were stained with fluorescent dyes to discriminate between living (green = intact membranes) or dead cells (red = disrupted membranes). These were then viewed by fluorescent microscopy. Cells transformed with an empty pALC vector are intact 1 h after aTc induction (Figure 5D). Cells transformed with pALCΩSprG2 and pALCΩSprG2-STOP or with pALC Ω SprG3 and pALC Ω SprG3-STOP2 were also mostly green, indicating the presence of living cells. This was in contrast to those treated with isopropanol or transformed with pALC Ω SprG1, which were stained red (~70%) dead cells for isopropanol and $\sim 40\%$ for SprG1) (Figure 5D). This suggests that contrary to the two SprG1-encoded peptides, SprG2- and SprG3-encoded peptides do not trigger S. aureus death but instead induce stasis (14).

SprF2 and SprF3 reduce SprG2 and SprG3 RNA levels by a direct (*cis*)-interaction involving their sequence overlaps

We have previously (14) demonstrated that the SprF1 antitoxin interacts with SprG1 RNA to trigger its degradation and prevent translation. The SprG2/SprF2 and SprG3/SprF3 pairs have nucleotide complementarities at their 3' ends, involving 57 nts for SprG2/SprF2 and 97 nts for SprG3/SprF3 (Figure 1A). Native gel shift assays performed between each pair member revealed an RNA complex (Figure 6A) with an apparent binding constant (K_d) of about 1.0 0.4 nM between SprG2 and SprF2, and ~1.9 0.4 nM between SprG3 and SprF3. Binding is specific, be-



<u>UAA--3'</u>

Figure 4. SprG2 and SprG3 both express a peptide. (A) Growth kinetics in liquid cultures of *Staphylococcus aureus* HG003 strains containing pCN35 (black) and pCN35 Ω SprG2-FLAG (gray), plus northern blot analysis of SprG2 and SprG2-FLAG RNA during growth, with tmRNA as an internal loading control. (**B**) Western blot analysis of SprG2-encoded flagged peptide expression during HG003 growth. Zinc staining of the total proteins from each sample are the loading controls. (**C**) After cell fractionation, the expression of SprG2-encoded peptides was analysed by western blots in pCN35 and pCN35 Ω SprG2-FLAG grown to the exponential phase. ATPase, SarA, and Protein A expression were monitored as membrane (M), cytosolic (C), extracellular (E) and wall (W) controls, respectively. (**D**) An experimentally-determined ribosomal toeprint on SprG3 (arrow) identifying the AUG internal initiation codon is underlined. The predicted AUG codons 1, 2 and 3 are both bold and underlined. The AUG related to the toeprint and to nucleotide C103 are both highlighted in gray. (**E**) *In vitro* translation assays to monitor peptide expression by SprG1, SpG2 and SprG3 RNA, with SprB RNA used as a negative control.





Figure 5. Determination of SprG2 and SprG3 internal coding sequences, with evidence that both trigger *Staphylococcus aureus* stasis but not death. (A) Schematic showing 'pALCΩSprG2-STOP' and 'pALCΩSprG3-STOP' strain constructs overexpressing either SprG2 or SprG3, with stop codons instead of the predicted initiation codons in order to abolish peptide production. (B) Growth kinetics in liquid cultures and (C) serial dilutions of exponentially grown HG003 bacteria containing pALC (yellow), pALCΩSprG2 or pALCΩSprG3 (blue), pALCΩSprG2-STOP (green), pALCΩSprG3-STOP1 (black), pALCΩSprG3-STOP2 (green), pALCΩSprG3-STOP3 (gray) or pALCΩSprG3-STOP4 (orange) RNA after induction with anhydrotetracycline (aTc). Err or bars indicate the variations between three biological replicates. (D) Pictures of *S. aureus* cells labeled with a SYTO 9 fluorescent probe after LIVE/DEAD experiments demonstrate that overexpression of SprG2- and SprG3-encoded peptides induce stasis. HG003 bacteria containing pALCΩSprG1 are shown as a positive control for *S. aureus* death, as well as HG003 containing empty pALC treated with 70% isopropanol.

Nucleic Acids Research, 2018 11



Figure 6. SprG2/SprF2 and SprG3/SprF3 regulation at the RNA and peptide levels in *Staphylococcus aureus* HG003. (A) Native gel shift assays of purified labeled SprF2 or SprF3 RNA against unlabeled SprG2 or SprG3 RNA. The complexes were revealed using a PhosphorImager. Competition assays were done with a 2,000-fold molar excess of polyuridine (PolyU) RNA or with a 20- or 10-fold molar excess of unlabeled SprF2 and SprF3, respectively. The apparent binding constant (K_d) was inferred from the results of three independent experiments. (B) On the left side, native gel shift assays of SprF2 with SprG2, its SprG2 5' sequence with open reading frame (SprG2–5'ORF), and its 3' sequence (SprG2–3'); on the right side, the same assays respectively but using SprF3 with SprG3. The RNA complexes were revealed using a PhosphorImager, and labeled RNAs are indicated with asterisks. (C) Northern blot analysis of SprG2, SprF2, SprG3, and SprF3 RNA expression levels during growth in HG003 carrying an empty pCN35, and in isogenic strains containing pCN35ΩSprF2, pCN35ΩSprG2, pCN35ΩSprG2, pCN35ΩSprF3, pCN35ΩSprG3 or pCN35ΩSprG3SprF3. The internal loading control is tmRNA. (D) Western blot analysis of SprG2-FLAG-SprF2. Zinc stainings of the total proteins from each sample are the loading controls. (E) *In vitro* translation assays and quantification of detected peptide expressed by SprG2 RNA, with or without SprF2 RNA.

cause a 2,000-fold molar excess of unrelated RNA does not remove SprF2 or SprF3 from its preformed complex, but a 20-fold excess of SprF2 and a 10-fold excess of SprF3 will. To study which SprG2 and SprG3 domains interact with SprF2 and SprF3 RNA, we divided SprG2 and SprG3 into two. The SprG2- and SprG3-5' ORF parts contain the 5' domains with their ORFs, while the other sections, SprG2-3' and SprG3-3', include the 3' domains that overlap with their respective antitoxins (Figure 6B). Gel shift assays indicated that SprF2 and SprF3 interact with the corresponding SprG2 or SprG3 via the toxin's 3' end (Figure 6B). Therefore, SprG2/SprF2 and SprG3/SprF3 RNA interact in vitro with affinity and specificity. We next investigated whether these interactions affect RNA levels in vivo. Strains overexpressing SprF2, SprG2, SprG2/SprF2, SprF3, SprG3 and SprG3/SprF3 were constructed by cloning the genes with their endogenous promoters. Northern blots indicated that when either SprF2 or SprF3 is overexpressed, SprG2 and SprG3 are undetectable during growth (Figure 6C). Similarly, when SprG2 or SprG3 is overexpressed, there is a reduction in SprF2 and SprF3 RNA levels. On the other hand, when both SprF and SprG are overexpressed from the same plasmid, there is no imbalance in the expression of either RNA and no impact on SprF or SprG RNA levels. SprF2 and SprF3 overexpression therefore clearly reduces SprG2 and SprG3 RNA levels in vivo, and vice-versa. To determine whether SprF2 affects SprG2-encoded peptide expression, we designed a construct to produce the flagged peptide in the presence of an excess of SprF2. SprG2-FLAG and SprF2 RNA overexpression were verified by northern blots (Supplementary Figure S3). Immunoblot analysis with an anti-FLAG antibody showed that SprF2 expression does inhibit production of a SprG2-flagged peptide during growth (Figure 6D). However, in vitro translation experiments demonstrated that SprF2 does not directly inhibit the translation of the SprG2-encoded peptide (Figure 6E). Our results demonstrate that SprF2 and SprF3 antitoxins downregulate SprG2 and SprG3 RNA expression, respectively, at the RNA level, and vice-versa.

Cross-talk between the SprG/SprF pairs expressed by S. aureus HG003

We began by exploring whether an SprF antitoxin could influence the activity of a non-cognate SprG toxin. We used HG003 strains overexpressing each SprG toxin under the control of the aTc-inducible promoter, transformed with pCN35 overexpressing each SprF antitoxin. The strain overexpressing SprG1 was transformed with pCN35ΩSprF2, pCN35ΩSprF3 or pCN35ΩSprF4, and overexpression was monitored by northern blots (Supplementary Figure S4). In the same manner, we transformed the strain overexpressing SprG2 with pCN35 Ω SprF1, pCN35ΩSprF3 or pCN35ΩSprF4, and the strain overexpressing SprG3 with pCN35ΩSprF1, pCN35ΩSprF2 or pCN35ΩSprF4, and checked them all with northern blots (Supplementary Figure S4). We then performed growth kinetics in the presence of aTc (Figure 7). Cells expressing SprG1-3 RNAs after aTc induction had inhibited S. aureus growth, and this was specifically rescued by overexpressing SprF1 (for SprG1/SprF1), SprF2 (for SprG2/SprF2),

or SprF3 (for SprG3/SprF3) (Figure 7). SprG2 toxicity was not rescued by SprF4 overexpression, even under the control of the Pveg promoter (Figure 7B and D). Therefore, the cells did not grow when an SprG toxin was overexpressed in the presence of a non-cognate SprF antitoxin (Figure 7), and no cross-talk was detected in terms of SprG toxicity neutralization. To explore the specificity of these TA systems, we first investigated the potential regulatory interplay between all of the 'sprG/sprF' modules. We performed native gel shift assays between SprG1, SprG2, and SprG3 RNAs and the four radiolabeled SprF RNAs. No RNA complexes were detected between SprG1 and SprF2, SprF3 or SprF4, but we found them between SprG3 and SprF1, and between SprG2 and SprF4 (Figure 8A). Indeed, IntaRNA software (37) had predicted interactions between these same two pairs (Supplementary Figures S5B and S6B). However, the complex formation between SprG3 and SprF1 lacks specificity, because a 2,000-fold molar excess of polyuridine (PolyU) RNA displaces the preformed SprF1-SprG3 complex (Supplementary Figure S5A). We specifically analysed the duplex formation between SprF4 and SprG2 RNA because of the high sequence identity (93%) between SprF2 and SprF4. The binding turned out to be specific (Supplementary Figure S6A), and a 2000-fold molar excess of PolyU RNA did not displace either SprF4 or SprG2 RNA from preformed SprF4-SprG2 complexes, whereas a 10-fold excess of unlabeled SprF4 RNA does. SprF4 binds SprG2 with an apparent K_d of about 3.4 1.6 nM (Supplementary Figure S6A), an affinity three times lower than for SprF2 and SprG2 RNA. To challenge the in vitro results, we used strains overexpressing SprF1, SprG1/SprF1, SprF2, SprG2, SprG2/SprF2, SprF3, SprG3, SprG3/SprF3 and SprF4 (all cloned in the pCN35 vector with their own promoters). To monitor the impact of putative interactions during S. aureus growth, these were compared to HG003 transformed with an empty pCN35 vector. Northern blot analvsis showed that SprF1 overexpression decreases SprG2 RNA levels during all growth phases (to about 0.54, 0.68, and 0.55 times the RNA levels, respectively), and that it decreases (~0.75) SprG3 during stationary growth (Figure 8B and Supplementary Figure S7A). At the beginning of growth, SprG2 overexpression decreases SprF1 and SprF3 RNA levels (by about 0.38 and 0.53, respectively), and SprG2/SprF2 overexpression increases SprG1 RNA levels by about 1.74 times at the exponential growth phase (Figure 8C and Supplementary Figure S7B). Overexpression of SprF3, SprG3, and SprG3/SprF3 do not affect SprG1, SprF1, SprG2, SprF2 or SprF4 RNA levels (Supplementary Figure S7C and D). Finally, SprF4 overexpression (Figure 8D and Supplementary Figure S7E) decreases SprG1 and SprG2 RNA levels during the stationary growth phase (about 0.64 and 0.36 times, respectively). To confirm these RNA level variations, we monitored the RNA levels in the HG003 strain deleted in either the sprG1/sprF1 or sprG2/sprF2 locus, yielding $\Delta sprG1/sprF1$ and $\Delta sprG2/sprF2$, respectively (38). Northern blot analysis indicated that the decreased SprG2 and SprG3 RNA levels observed during SprF1 overexpression is abolished in the $\Delta sprG1/sprF1$ strain. Moreover, the modulation of SprF1, SprF3, and SprG1 RNA levels observed during SprG2



Figure 7. Specific neutralization of SprG-induced toxicity by SprF cognate antitoxin. (A–C) Growth kinetics in liquid culture of *S. aureus* HG003 after induction with anhydrotetracycline (aTc). (A) Strains shown: pALC and pCN35 (green); pALCΩSprG1 and pCN35 (blue); pALCΩSprG1 and pCN35ΩSprF1 (yellow); pALCΩSprG1 and pCN35ΩSprF2 (gray); pALCΩSprG1 and pCN35ΩSprF3 (orange); and pALCΩSprG1 and pCN35ΩSprF4 (black). (B) Strains shown: pALC and pCN35 (green); pALCΩSprG2 and pCN35ΩSprF4 (perform); pALCΩSprG2 and pCN35ΩSprF4 (perform); pALCΩSprG2 and pCN35ΩSprF4 (black). (C) Strains shown: pALCΩSprG2 and pCN35ΩSprF4 (gray); pALCΩSprG3 and pCN35ΩSprF4 (black). (C) Strains shown: pALCΩSprG3 and pCN35ΩSprF4 (black). (D) Growth kinetics in liquid cultures of HG003 deleted for SprG2 and SprF2, containing the following: pALCΩSprG2 and pCN35 (green); pALCΩSprG2 and pCN35 (green); pALCΩSprG2 and pCN35 (green); pALCΩSprF4 (black). (D) Growth kinetics in liquid cultures of HG003 deleted for SprG2 and SprF2, containing the following: pALC and pCN35 (green); pALCΩSprG2 and pCN35 (blue); pALCΩSprG2 and pCN35 (green); pALCΩSprG2 and pCN35 (blue); pALCΩSprG3 and pCN35ΩSprF4 (black). (D) Growth kinetics in liquid cultures of HG003 deleted for SprG2 and SprF2, containing the following: pALC and pCN35 (green); pALCΩSprG2 and pCN35 (blue); pALCΩSprG3 and pCN35 (blue); pALCΩSprG3 and pCN35 (blue); pALCΩSprG3 and pCN35 (blue); pALCΩSprG3 and pCN35 (blue); pALCΩSprG2 and pCN35 (blue); pALCΩSprG2 and pCN35 (blue); pALCΩSprG3 and pCN35 (blue); pALC and pCN35 (blue); pALCΩSprG3 and pCN35 (blue); pALC and pCN35 (bl

and SprG2/SprF2 overexpression is also reversed in the $\Delta sprG2/sprF2$ strain (Figure 8E and Supplementary Figure S7F). Taken together, these results indicate that the control of SprG toxicity is specific to the cognate pair in each SprG/SprF TA system, but suggest that cross-regulations do indeed occur at the RNA level between the SprG/SprF TA systems during *S. aureus* growth.

Modulation of SprG and SprF RNA levels upon oxidative and hyperosmotic stress

Several publications (17,22) have reported the involvement of TA systems in the adaptation of bacteria to their environment. To investigate the biological functions of the SprG/SprF TA systems, we began by trying to identify the conditions that might influence SprG and/or SprF RNA levels. HG003 was subjected to 1 h of either oxidative stress (by adding 10 mM hydrogen peroxide), or hyperosmotic stress (2M sodium chloride). Afterwards, northern blots revealed that the RNA levels of SprF antitoxins always dropped during oxidative stress (Figures 9A and Supplementary Figure S8). Our results also show that the RNA levels of SprG1, SprF1, SprF2, SprF3 and SprG3 decrease in the presence of hyperosmotic stress (Figures 9A and Supplementary Figure S8). On the other hand, the stress experiments did not highlight a particular condition for the detection of SprG4 expression (Supplementary Figure S8). Overall, our findings show that the SprG/SprF TA systems could be activated by stresses regularly encountered by bacteria during infection. We wondered whether SprG1/SprF1, SprG2/SprF2 and SprG3/SprF3 TA systems are activated in the context of S. aureus internalization by human phagocytes. Indeed, phagolysosomes are known to create an oxidative environment (39), and this could potentially reduce SprF antitoxin expression. We therefore performed an assay to monitor HG003 phagocytosis by the PMA-induced THP-1 macrophages, using RT-qPCR to quantify SprG and SprF RNA levels after 2 h of phagocytosis. During these experiments, SprF3 RNA levels were too low for

14 Nucleic Acids Research, 2018



Figure 8. Crosstalk regulation between the four SprG/SprF toxin–antitoxin pairs. (A) Native gel shift assays of purified labeled SprF1, SprF2, SprF3 and SprF4 RNA with unlabeled SprG1, SprG2, or SprG3 RNAs. The complexes were revealed with a PhosphorImager, and labeled RNA are indicated with a sterisks. (B, C and D) Charts showing SprG/SprF RNA quantifications during the pre-exponential (PE), exponential (E) and stationary (S) growth phases in *Staphylococcus aureus*. Quantifications are relative to tmRNA and then normalized to the pCN35 empty vector levels, considered as equal to 1. Welch's *t*-test results: *P < 0.05; **P < 0.01. (E) Chart of SprG/SprF RNA quantifications during the same growth phases in *S. aureus* HG003 *AsprG1/sprF1* and $\Delta sprG2/sprF2$ strains. Quantifications are relative to tmRNA, then normalized to levels of the wild-type HG003 strain, considered as equal to 1.





Figure 9. Modulation of SprG and SprF RNA levels upon oxidative and hyperosmotic stress and *Staphylococcus aureus* internalization in human macrophages. (A) Quantification of SprG and SprF RNA levels by northern blot during *S. aureus* growth under environmental stress. Each stress was performed for 1 h. Data are expressed as mean fold changes relative to the SprG and SprF RNA levels found without stress, measured as the growth in tryptic soy broth (TSB) arbitrarily set to a value of 1. (B) Quantification of SprG and SprF RNA levels by RT-qPCR during *S. aureus* internalization in PMA-induced THP-1 macrophages. Data are expressed as mean fold changes relative to the SprG and SprF RNA levels found in the inoculum before phagocytosis, arbitrarily set to a value of 1. Error bars correspond to variations between four independent experiments. Welch's *t*-test results: **P* < 0.05; ***P* < 0.01.

quantitative PCR. Only SprF1 levels significantly decrease after *S. aureus* phagocytosis (Figure 9B), while all SprF antitoxins decrease after exposure to H_2O_2 (Figure 9A). Interestingly, a significant drop in SprG1 RNA levels is also observed after phagocytosis (Figure 9B), suggesting that the environmental conditions encountered in phagocytes, other than oxidative stress, contribute to reducing SprG1 RNA levels.

DISCUSSION

Identifying a full set of expressed and functional TA systems in bacteria is a serious challenge, especially because there can be so many. *Mycobacterium tuberculosis* has up to 79 TA systems, with at least 50 in the VapBC family and at least 10 in the MazEF family (40). In *S. aureus*, only five functional TA systems have been reported (23). For the *S. aureus* type II TA systems, only one MazEF and two paralogues YefM/YoeB ('*yefM-yoeB-sa1*' and '*yefMyoeB-sa2*,' also referred to as '*axe-txe-1*' and '*axe-txe-2*'), have been described (41). As for *S. aureus* type I TA systems, both SprA1/SprA1_{AS} and SprG1/SprF1 have additional copies in the core genome (13,14). Here we report on the functionality, mechanisms, and cross-talk between four SprG/SprF type I TA pairs that are expressed

in most S. aureus strains (10,14). One is expressed from a pathogenicity island (SprG1/SprF1), while the others are encoded in the core genome (SprG2-4/SprF2-4). Only SprF2 and SprF4 can be considered as bona fide gene copies, with 93% sequence identity (Supplementary Table S4). For SprG1, SprG2, SprG3 and SprG4, and as well as SprF1 and SprF3, their sequence identities are much weaker, which suggests that SprG1/SprF1, SprG2/SprF2, SprG3/SprF3 and SprG4/SprF4 are homologous TA systems (Supplementary Table S4). In Figure 3, half-life determinations indicate low half-lives and rapid turnovers for the four SprF antitoxins, whereas their cognate toxic mR-NAs have much longer half-lives (up to 2 h). Although it is expressed in S. aureus N315, COL, and Newman strains, SprG4 expression is undetectable in various growth conditions (14).

The reason for the abundance of TA systems (either as multiple copies or as homologues in bacterial genomes) is unclear, but one possibility is that they could have acquired specific functions. Some bacterial TA systems can behave as non-functional pseudogenes due to sequence insertions, mutations or gene promoter defects. Several copies of the aapA/IsoA type I TA module are expressed in Helicobacter pylori (42). For that module, the IsoA2 RNA antitoxin is expressed, but the lack of a promoter upstream from the AapA2 mRNA prevents transcription, which is similar to what happens with SprG4/SprF4 in S. aureus HG003. The E. coli K1217 genome has five inactive homologues of the type I Hok toxin (43) which harbor point mutations, insertions, or large rearrangements (44). Multiple homologues are also observed in type II TA systems. For example, RelBE has seven homologues in Vibrio cholerae within the superintegron on chromosome II, with only six effective TA systems (45). Here, the sprG2/sprF2 and sprG3/sprF3 loci encode functional TA systems, with the exception of the sprG4/sprF4 locus, probably due to the lack of a functional promoter in the HG003 strain.

Mutations at the internal initiation codons show that toxic peptide translation controls the toxicity of both SprG2 and SprG3 RNA (Figure 5). Type I toxins are divided into two groups depending on whether they are located at the membrane or within the cytoplasm (36). SprG2 accumulates at the bacterial membrane and is also extracellular, like the SprG1-encoded peptides (14). SprG3-encoded peptides, however, were only detected in vitro, suggesting that SprG3 RNA folding must impede internal translation. Arnion et al. have demonstrated the importance of mRNA toxin maturation for translation, most notably because RNA structures block ribosomal access to the Shine-Dalgarno sequence. Toxin mRNA can be cleaved into shorter fragments with translatable conformations (42). A conformational change in SprG3 might be necessary before translation, as is the case with AapA1, TisB, and Hok, all of which require structural shifts for toxin translation (46,47). In S. aureus, ClpP protease is essential for the degradation of the MazE, Axe1 and Axe2 type II antitoxins (48). Although nothing has been described in the literature about the degradation of type I and type II toxins in S. aureus, it could be interesting to study the translation of the SprG3-encoded peptide in a context of clpP deletion. Toxic peptides encoded by SprG2 and SprG3 RNAs induce bacterial stasis

stimulated by their expression. In S. aureus, overexpression of the sequence-specific MazF RNase, the type II mazEF locus toxin, also induces bacterial stasis but not cell death (49). This shows that at least three toxins (MazF, SprG2 and SprG3-encoded peptides) can induce stasis, as opposed to the SprA1- and SprG1-encoded peptides that trigger cell death (14,32). The mechanisms of action of SprG-encoded peptides are still unknown, but our results suggest that SprG2- and SprG3-encoded peptides should possess different biological functions than PepG1₃₁ and PepG1₄₄ cytolytic peptides. Peptide sequence alignments suggest that SprG2- and SprG3-encoded peptides are hydrophobic and contain cationic residues (Figure 1D), like the SprA1- and SprG1-encoded cytolytic peptides (13,14). The PepA1 helical toxin expressed from S. aureus SprA1 induces cell death by accumulating into and permeating bacterial and eukaryotic membranes (32). Further studies are needed to investigate the putative ability of SprG2- and SprG3-encoded peptides to lyse competitive bacteria and host erythrocytes, as SprG1-encoded peptides are known to do.

During S. aureus growth, SprG2 and SprG3 toxin expression is repressed at the RNA level by their cognate SprF2 and SprF3 antitoxins to prevent stasis. SprF2 and SprF3 both interact in cis with the overlapping 3' ends of their respective toxins, as occurs for the SprF1/SprG1 pair (14). In type I TA systems, antitoxins can act by inhibiting toxic mRNA translation, by inducing mRNA degradation of the toxin by specific double-stranded RNases (50), or by doing both (14,51). The SprA1_{AS} antitoxin forms a complex with SprA1 RNA, preventing toxin production in *trans* by occluding the translation initiation signals (13). The SprF1 antitoxin acts by a pairing mechanism with SprG1 toxin RNA to trigger its degradation and prevent its translation (14). In the case of SprG2/SprF2 and SprG3/SprF3, SprF2 and SprF3 antitoxins could trigger mRNA degradation and decay by recruiting RNases and/or by relaxing the toxic mRNA's conformation, making it less stable. This was shown in *Bacillus subtilis* for both the txpA/RatA (52) and the bsrE/SR5 toxin-antitoxin systems (53).

Cross-regulation and cross-talk between TA homologues is mostly unknown, with very few examples for type II TA pairs. In 2016, Walling and Butler identified W48 and F52, two important residues in the Haemophilus influenzae type II VapB2 antitoxin which are required to neutralize VapC2 toxicity. If the VapB1 antitoxin is genetically modified to add just the tryptophan residue (T47W mutant) required for the VapB2-VapC2 interaction, both toxins VapC1 and VapC2 are neutralized (54). Cross-talk between TA systems was also studied within the V. cholerae N16961 superintegron, which contains 18 type II TA systems (55). Among these TA systems, no cross-talk was detected during toxin induction in the presence of a noncognate antitoxin. This suggests that there is specificity between type II antitoxins and their cognate toxins. In addition, there was no cross-talk found between the S. aureus type II 'yefM-yoeB-sal' and 'yefM-yoeB-sa2' systems, whether in terms of toxin activity neutralization, nor in transcriptional auto-regulation of the TA modules (56). Nothing is currently known about cross-talk in type I toxinantitoxin systems. We therefore analysed all of the possible cross-interactions between the four antitoxins and their cog-

nate toxins. For every pair, not a single instance of crosstalk prevents toxicity, even for those interacting in vitro (SprG1/SprF3 and SprG2/SprF4). This implies that each set of RNA pairs acts independently of the others when dealing with its own toxicity and regulations. However, heterologous cross-regulations between the RNAs from noncognate pairs can occur via pairing interactions and/or can influence steady state expression levels. For instance, overexpression of the SprF1 antitoxin decreases the RNA levels not only of SprG1 (14) but also of SprG2 and SprG3 (Figure 8B). Moreover, overexpression of the SprG2 toxin decreases SprF antitoxin RNA levels and increases those of the SprG1 toxin (Figures 6C and 8C). In addition, when SprF4 is overexpressed, a drop in SprG1 and SprG2 RNA levels is observed (Figure 8D). This indicates both flexibility and interactions between the pairs, with probable additional effects on TA module functions unrelated to toxicity.

It is well established that TA systems are involved in the adaptation of bacteria to their environments (17,22). The bsrG/SR4 type I TA system, located on the SPB B. subtilis prophage, is a stress-response system, because a temperature shock of at least 48°C increases RNA degradation of the BsrG toxin (57). Another stress-response TA system is hok/sok, which responds to high temperatures and to β-lactams by allowing bacteria to extend its lag phase for adaptation (58). The type I toxin, PepA1, also modulates its expression in response to decreased SprA1_{AS} antitoxin RNA levels when undergoing oxidative and acidic stress (32). Activation of TA systems upon oxidative stress has also been demonstrated in Caulobacter crescentus for the type II systems ParDE₂ and RelBE₃ (59), and for the PasTI TA system of extraintestinal pathogenic E. coli (Ex-PEC) (60). Northern blot analysis provides evidence that SprG/SprF TA systems respond to stress, specifically hyperosmotic and oxidative stresses. In Figure 9A, we show decreased RNA levels of SprG1 and SprG3 toxins and SprF1, SprF2, and SprF3 antitoxins during hyperosmotic stress, and decreased levels of SprG1 toxin and all SprF RNA antitoxins during oxidative stress. However, when S. aureus was exposed to oxidative stress in the phagolysosome of THP-1 macrophages, only SprF1 and SprG1 were reduced. This last result suggests that during its internalization in human phagocytes, S. aureus favors inhibiting the expression of the SprG1/SprF1 TA system which induces its death, rather than the SprG2/SprF2 and SprG3/SprF3 ones that only induce stasis. This could be a way to promote its persistence in a stressful environment.

Activation of TA systems when bacteria encounter unfavorable growth conditions could explain entry into the persister state, promoting multi-drug tolerance and infection chronicity (21). Some bacteria enter metabolically inactive or dormant states to become persister cells, a slowgrowing and drug-tolerant bacterial sub-population (61). In fact, the formation of persistent bacteria or stress adaptation are often mentioned as the biological roles of certain chromosomal TA systems. A period of stasis might allow bacteria to resume normal growth, and toxins from TA systems could be involved in this process (21,62). For type I TA systems, involvement in persister cell formation via Obg in response to nutrient starvation was demonstrated for the HokB toxin in *E. coli* (63). After Hok toxicity, depolariza-
tion of the membrane causes either stasis or bacterial death, depending on toxin concentrations, with persistence triggered by a physiological concentration of the Hok toxin (63). The TisB toxin of the tisB/IstR1 system in E. coli is induced during the SOS response, allowing bacterial persistence by decreasing the proton motive force to promote dormancy, thus indirectly promoting tolerance to antibiotics such as β-lactams and fluoroquinolones (20,64). Fourteen type II TA systems are important for Salmonella persistence because deletions of each of these systems show a reduction of persister formation after internalization in human macrophages (65-67). TA system redundancy on bacterial genomes implies that the deletion of one TA operon does not necessarily affect persistence or phenotype. In S. aureus, however, a knockout of all the type II TA systems has no persister phenotype (68). The physiological role of the MazEF type II TA system is not well understood in S. aureus, but recent studies reported that mazEF deletion increases sensitivity to B-lactam antibiotics (69) and leads to increased biofilm formation (70). The deletion of the SavRS TA system (probably the same as YefM-YoeB-sa2) (41) increases S. aureus hemolytic activity and virulence in a mouse subcutaneous abscess model (24). Our results suggest that SprG2/SprF2 and SprG3/SprF3 TA systems affect S. aureus persister cell formation during hyperosmotic or oxidative stress. This is in contrast to the SprG1/SprF1 (14), SprA1/SprA1_{AS} (13), and SprA2/SprA2_{AS} (71) TA systems, which trigger cell death and probably participate in S. aureus virulence through the liberation of hemolytic and/or antimicrobial peptides. Our findings and these studies suggest that although S. aureus type I TA systems have quite different toxicities, modes of action, regulation mechanisms, stress responses, and biological functions, they still all have something in common. In all case, the environmental stresses encountered by S. aureus during host infection affect how antitoxin RNA level decreases trigger the production of toxins.

In short, we identified two new functional type I TA systems in *S. aureus*: SprG2/SprF2 and SprG3/SprF3. These both induce bacterial stasis by expressing toxic peptides. Each set of SprG/SprF RNA pairs acts independently of each other while they deal with their own toxicity and regulations. However, heterologous cross-regulations between the RNAs from non-cognate pairs can occur via pairing interactions and/or by steady state expression level variations. The next challenge will be to unravel the biological functions of these new TA systems, particularly their involvement in *S. aureus* persistence.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are thankful to Stéphane Dréano (IGDR, Rennes, France) for the DNA sequencing of all constructs in this study; to Wenfeng Liu and Philippe Bouloc (I2BC, Gif sur Yvette, France) for creating the HG003 strain deleted in the *sprG2/sprF2* locus; and to Juliana Berland for help with editing. Thanks also to Noëlla Germain-Amiot, Yoann Augagneur, and Astrid Rouillon for sharing information about

TA systems expressed by *S. aureus*, and for help with the manuscript.

Author contributions: C.R. and M.L.P.M. designed and performed the experiments, with phagocytosis experiments designed and performed by G.P. M.L.P.M. and B.F. supervised research. The data was analysed by C.R., M.L.P.M, G.P. and B.F. C.R. prepared the figures and wrote the manuscript, which was edited by M.L.P.M. and B.F.

FUNDING

Ministère Français de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche [MENRT to C.R.]; School of Pharmacy and Medical Sciences of the University of Rennes 1; Agence Nationale pour la Recherche [ANR-15-CE12-0003-01 'sRNA-Fit' to B.F.]; Fondation pour la Recherche Médicale [DBF20160635724 'Bactéries et champignons face aux antibiotiques et antifongiques' to B.F.]; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. Funding for open access charge: Inserm.

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- van Belkum, A., Verkaik, N.J., de Vogel, C.P., Boelens, H.A., Verveer, J., Nouwen, J.L., Verbrugh, H.A. and Wertheim, H.F. (2009) Reclassification of *Staphylococcus aureus* nasal carriage types. *J. Infect. Dis.*, **199**, 1820–1826.
- 2 Lowy, F.D. (1998) Staphylococcus aureus infections. N. Engl. J. Med., 339, 520–532.
- 3 Tong,S.Y., Davis,J.S., Eichenberger,E., Holland,T.L. and Fowler,V.G. Jr2015) *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin. Microbiol. Rev.*, 28, 603–661.
- 4 Chambers, H.F. and Deleo, F.R. (2009) Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era. Nat. Rev. Microbiol., 7, 629–641.
- 5 Caldelari, I., Chao, Y., Romby, P. and Vogel, J. (2013) RNA-mediated regulation in pathogenic bacteria. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 3, a010298.
- 6 Fechter, P., Caldelari, I., Lioliou, E. and Romby, P. (2014) Novel aspects of RNA regulation in *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett.*, 588, 2523–2529.
- 7 Tomasini, A., François, P., Howden, B.P., Fechter, P., Romby, P. and Caldelari, I. (2014) The importance of regulatory RNAs in *Staphylococcus aureus. Infect. Genet. Evol.*, **21**C, 616–626.
- 8 Sassi, M., Augagneur, Y., Mauro, T., Ivain, L., Chabelskaya, S., Hallier, M., Sallou, O. and Felden, B. (2015) SRD: a *Staphylococcus* regulatory RNA database. *RNA*, **21**, 1005–1017.
- 9 Bronsard, J., Pascreau, G., Sassi, M., Mauro, T., Augagneur, Y. and Felden, B. (2017) sRNA and cis-antisense sRNA identification in *Staphylococcus aureus* highlights an unusual sRNA gene cluster with one encoding a secreted peptide. *Sci. Rep.*, **7**, 4565.
- 10 Pichon, C. and Felden, B. (2005) Small RNA genes expressed from *Staphylococcus aureus* genomic and pathogenicity islands with specific expression among pathogenic strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 14249–14254.
- 11 Chabelskaya,S., Gaillot,O. and Felden,B. (2010) A Staphylococcus aureus small RNA is required for bacterial virulence and regulates the expression of an immune-evasion molecule. *PLoS Pathog.*, 6, e1000927.
- 12 Le Pabic,H., Germain-Amiot,N., Bordeau,V. and Felden,B. (2015) A bacterial regulatory RNA attenuates virulence, spread and human host cell phagocytosis. *Nucleic Acids Res.*, 43, 9232–9248.
- 13 Sayed, N., Jousselin, A. and Felden, B. (2011) A cis-antisense RNA acts in trans in *Staphylococcus aureus* to control translation of a human cytolytic peptide. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 19, 105–112.
 14 Pinel-Marie, M.L., Brielle, R. and Felden, B. (2014) Dual
- 14 Pinel-Marie, M.L., Brielle, R. and Felden, B. (2014) Dual toxic-peptide-coding *Staphylococcus aureus* RNA under antisense

18 Nucleic Acids Research, 2018

regulation targets host cells and bacterial rivals unequally. *Cell Rep.*, 7, 424–435.

- 15 Van Melderen, L. and Saavedra De Bast, M. (2009) Bacterial toxin–antitoxin systems: more than selfish entities? *PLoS Genet.*, 5, e1000437.
- 16 Gerdes, K., Bech, F.W., Jørgensen, S.T., Løbner-Olesen, A., Rasmussen, P.B., Atlung, T., Boe, L., Karlstrom, O., Molin, S. and von Meyenburg, K. (1986) Mechanism of postsegregational killing by the *hok* gene product of the *parB* system of plasmid R1 and its homology with the *relF* gene product of the E. coli *relB* operon. *EMBO J.*, 5, 2023–2029.
- 17 Lobato-Márquez, D., Díaz-Orejas, R. and García-del Portillo, F. (2016) Toxin-antitoxins and bacterial virulence. *FEMS Microbiol. Rev.*, 40, 592–609.
- 18 Patel,S. (2016) Drivers of bacterial genomes plasticity and roles they play in pathogen virulence, persistence and drug resistance. *Infect. Genet. Evol.*, 45, 151–164.
- 19 Durand, S., Jahn, N., Condon, C. and Brantl, S. (2012) Type I toxin-antitoxin systems in *Bacillus subtilis*. *RNA Biol.*, 9, 1491–1497.
- 20 Dörr, T., Vulic, M. and Lewis, K. (2010) Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biol.*, 8, e1000317.
- 21 Page, R. and Peti, W. (2016) Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. *NCHEMBIO.*, **12**, 208–214.
- 22 Fernández-García, L., Blasco, L., Lopez, M., Bou, G., García-Contreras, R., Wood, T. and Tomas, M. (2016) Toxin-Antitoxin systems in clinical pathogens. *Toxins*, 8, 227.
- 23 Schuster, C.F. and Bertram, R. (2016) Toxin-Antitoxin systems of Staphylococcus aureus. Toxins, 8, 140.
- 24 Wen, W., Liu, B., Xue, L., Zhu, Z., Niu, L. and Sun, B. (2018) Autoregulation and virulence control by the Toxin-Antitoxin system SavRS in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, 86, e00032–18.
- 25 Fozo,E.M., Makarova,K.S., Shabalina,S.A., Yutin,N., Koonin,E.V. and Storz,G. (2010) Abundance of type I toxin–antitoxin systems in bacteria: searches for new candidates and discovery of novel families. *Nucleic Acids Res.*, 38, 3743–3759.
- 26 Charpentier, E., Anton, A.I., Barry, P., Alfonso, B., Fang, Y. and Novick, R.P. (2004). Novel cassette-based shuttle vector system for gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 6076–6085.
- 27 Zeghouf, M., Li, J., Butland, G., Borkowska, A., Canadien, V., Richards, D., Beattie, B., Emili, A. and Greenblatt, J.F. (2004) Sequential Peptide Affinity (SPA) system for the identification of mammalian and bacterial protein complexes. J. Proteome Res., 3, 463–468.
- 28 Bateman, B.T., Donegan, N.P., Jarry, T.M., Palma, M. and Cheung, A.L. (2001) Evaluation of a tetracycline-inducible promoter in *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo and its application in demonstrating the role of *sigB* in microcolony formation. *Infect. Immun.*, 69, 7851–7857.
- Kreiswirth, B.N., Lofdahl, S., Betley, M.J., O'Reilly, M., Schlievert, P.M., Bergdoll, M.S. and Novick, R.P. (1983) The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. *Nature*, **305**, 709–712.
 Herbert, S., Ziebandt, A.K., Ohlsen, K., Schafer, T., Hecker, M.,
- Herbert,S., Žiebandt,A.K., Ohlsen,K., Schafer,T., Hecker,M., Albrecht,D., Novick,R. and Gotz,F. (2010) Repair of global regulators in *Staphylococcus aureus* 8325 and comparative analysis with other clinical isolates. *Infect. Immun.*, 78, 2877–2889.
 Brückner,R. (1997) Gene replacement in *Staphylococcus carnosus* and
- 31 Brückner, R. (1997) Gene replacement in *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus xylosus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **151**, 1–8.
- 32 Sayed, N., Nonin-Lecomte, S., Réty, S. and Felden, B. (2012) Functional and structural insights of a *Staphylococcus aureus* apoptotic-like membrane peptide from a toxin–antitoxin module. *J. Biol. Chem.*, 287, 43454–43463.
- 33 Downer, R., Park, P.W., Mecham, R.P. and Foster, T.J. (2002) The elastin-binding protein of *Staphylococcus aureus* (EbpS) is expressed at the cell surface as an integral membrane protein and not as a cell wall-associated protein. *J. Biol. Chem.*, 277, 243–250.
- 34 Antal, M., Bordeau, V., Douchin, V. and Felden, B. (2005) A small bacterial RNA regulates a putative ABC transporter. J. Biol. Chem., 280, 7901–7908.
- 35 Raynaud,S., Le Pabic,H. and Felden,B. (2018) Selective recovery of RNAs from bacterial pathogens after their internalization by human host cells. *Methods*, 143, 4–11.

- 36 Brielle, R., Pinel-Marie, M.L. and Felden, B. (2016) Linking bacterial type I toxins with their actions. *Curr. Opin. Microbiol.*, 30, 114–121.
- 37 Busch,A., Richter,A.S. and Backofen,R. (2008) IntaRNA: efficient prediction of bacterial sRNA targets incorporating target site accessibility and seed regions. *Bioinformatics*, 24, 2849–2856.
- 38 Le Lam, T.N., Morvan, C., Liu, W., Jaszczyszyn, Y. and Bouloc, P. (2017) Finding sRNA-associated phenotypes by competition assays: an example with *Staphylococcus aureus*. *Methods*, **117**, 21–27.
- 39 Horn, J., Stelzner, K., Rudel, T. and Fraunholz, M. (2018) Inside job: Staphylococcus aureus host-pathogen interactions. Int. J. Med. Microbiol., 308, 607–624.
- 40 Sala, A., Bordes, P. and Genevaux, P. (2014) Multiple toxin-antitoxin systems in *Mycobacterium tuberculosis*. *Toxins*, **6**, 1002–1020.
- 41 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.
- 42 Arnion, H., Korkut, D.N., Gelo, S.M., Chabas, S., Reignier, J., Iost, I. and Darfeuille, F. (2017) Mechanistic insights into type I toxin antitoxin systems in *Helicobacter pylori*: the importance of mRNA folding in controllong toxin expression. *Nucleic Acids Res.*, 45, 4782–4795.
- 43 Steif,A. and Meyer,I.M. (2012) The hok mRNA family. RNA Biol., 9, 1399–1404.
- 44 Pedersen, K. and Gerdes, K. (1999) Multiple *hok* genes on the chromosome of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **32**, 1090–1102.
- 45 Wang,Y., Wang,H., Hay,A.J., Zhong,Z., Zhu,J. and Kan,B. (2015) Functional RelBE-family toxin–antitoxin pairs affect biofilm maturation and intestine colonization in *Vibrio cholerae*. *PLoS One*, **10**, e0135696.
- 46 Darfeuille, F., Unoson, C., Vogel, J. and Wagner, E.G.H. (2007) An antisense RNA inhibits translation by competing with standby ribosomes. *Mol. Cell.*, 26, 381–392.
- 47 Thisted, T., Nielsen, A.K. and Gerdes, K. (1994) Mechanisms of post-segregational killing: translation of Hok, SrnB and Pnd mRNAs of plasmids R1, F and R483 is activated by 3'-end processing. *EMBO J.*, 13, 1950–1959.
- 48 Donegan, N.P., Thompson, E.T., Fu, Z. and Cheung, A.L. (2010) Proteolytic regulation of toxin–antitoxin systems by ClpPC in *Staphylococcus aureus. J. Bacteriol.*, **192**, 1416–1422.
- 49 Fu,Z., Tamber,S., Memmi,G., Donegan,N.P. and Cheung,A.L. (2009) Overexpression of MazFsa in *Staphylococcus aureus* induces bacteriostasis by selectively targeting mRNAs for cleavage. *J.Bacteriol.*, **191**, 2051–2059.
- 50 Brantl,S. and Jahn,N. (2015) sRNAs in bacterial type I and type III toxin-antitoxin systems. *FEMS Microbiobiol. Rev.*, 39, 413–427.
- 51 Jahn, N. and Brantl, S. (2013) One antitoxin-two functions: SR4 controls toxin mRNA decay and translation. *Nucleic Acids Res.*, 41, 9870–9880.
- 52 Silvaggi, J.M., Perkins, J.B. and Losick, R. (2005) Small untranslated RNA antitoxin in *Bacillus subtilis, J. Bacteriol.*, **187**, 6641–6650.
- 53 Meißner, C., Jahn, N. and Brantl, S. (2016) *In vitro* characterization of the type I toxin–antitoxin system *bsrE*/SR5 from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.*, 291, 560–571.
 54 Walling, L.R. and Butler, J.S. (2016) Structural determinants for
- 54 Walling, L.R. and Butler, J.S. (2016) Structural determinants for antitoxin identity and insulation of cross talk between homologous toxin–antitoxin systems. J. Bacteriol., 198, 3287–3295.
- 55 Iqbal,N., Guérout,A.-M., Krin,E., Le Roux,F. and Mazel,D. (2015) Comprehensive functional analysis of the 18 *Vibrio cholerae* N16961 toxin–antitoxin systems substantiates their role in stabilizing the superintegron. *J. Bacteriol.*, **197**, 2150–2159.
- 56 Yoshizumi,S., Zhang,Y., Yamaguchi,Y., Chen,L., Kreiswirth,B.N. and Inouye,M. (2009) *Staphylococcus aureus* YoeB homologues inhibit translation initiation. *J. Bacteriol.*, **191**, 5868–5872.
- 57 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.
- 58 Chukwudi, C.U. and Good, L. (2015) The role of the *hok/sok* locus in bacterial response to stressful growth conditions. *Microb. Pathogen.*, 79, 70–79.
- 59 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.

Nucleic Acids Research, 2018 19

- 60 Norton, J.P. and Mulvey, M.A. (2012) Toxin-antitoxin systems are important for niche-specific colonization and stress resistance of uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathog.*, **8**, e1002954.
- 61 Fisher, R.A., Gollan, B. and Helaine, S. (2017) Persistent bacterial infections and persister cells. *Nat. Rev. Microbiol.*, 15, 453–464.
- 62 Hall,A.M.J., Gollan,B. and Helaine,S. (2017) Toxin-antitoxin systems: reversible toxicity. *Curr. Opin. Microbiol.*, 36, 102–110.
- 63 Verstraeten, N., Knapen, W.J., Kint, C.I., Liebens, V., Van den Bergh, B., Dewachter, L., Michiels, J.E., Fu, Q., David, C.C., Fierro, A.C. *et al.* (2015) Obg and membrane depolarization are part of a microbial bet-hedging strategy that leads to antibiotic tolerance. *Mol. Cell*, **59**, 9–21.
- 64 Gurnev, P.A., Ortenberg, R., Dorr, T., Lewis, K. and Bezrukov, S.M. (2012) Persister-promoting bacterial toxin TisB produces anion-selective pores in planar lipid bilayers. *FEBS Lett.*, 586, 2529–2534.
- 65 Helaine,S., Cheverton,A.M., Watson,K.G., Faure,L.M., Matthews,S.A. and Holden,D.W. (2014) Internalization of *Salmonella* by macrophages induces formation of nonreplicating persisters. *Science*, 343, 204–208.
- 66 Cheverton, A.M., Gollan, B., Przydacz, M., Wong, C.T., Mylona, A., Hare, S.A. and Helaine, S. (2016) A *Salmonella* toxin promotes

persister formation through acetylation of tRNA. Mol. Cell, 63, 86–96.

- 67 Rycroft, J.A., Gollan, B., Grabe, G.J., Hall, A., Cheverton, A.M., Larrouy-Maumus, G., Hare, S.A. and Helaine, S. (2018) Activity of acetyltransferase toxins involved in *Salmonella* persister formation during macrophage infection. *Nat. Commun.*, 9, 1993.
- Conlon, B.P., Rowe, S.E., Gandt, A.B., Nuxoll, A.S., Donegan, N.P., Zalis, E.A., Clair, G., Adkins, J.N., Cheung, A.L. and Lewis, K. (2016) Persister formation in *Staphylococcus aureus* is associated with ATP depletion. *Nat. Microbiol.*, 1, 16051.
 Schuster, C.F., Mechler, L., Nolle, N., Krismer, B., Zelder, M.E.,
- 69 Schuster,C.F., Mechler,L., Nolle,N., Krismer,B., Zelder,M.E., Götz,F. and Bertram,R. (2015) The MazEF toxin–antitoxin system alters the β-lactam susceptibility of *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*, **10**, e0126118.
- 70 Kato,F., Yabuno,Y., Yamaguchi,Y., Sugai,M. and Inouye,M. (2017) Deletion of *mazF* increases *Staphylococcus aureus* biofilm formation in an *ica*-dependent manner. *Pathog. Dis.*, **75**, doi:10.1093/femspd/ftx026.
- 71 Germain-Amiot, N., Augagneur, Y., Camberlein, E., Nicolas, I., Lecureur, V., Rouillon, A. and Felden, B. (2018) A novel *Staphylococcus aureus cis-trans* type I toxin–antitoxin module with dual effects on bacteria and host cells. *Nucleic Acids Res.*, doi:10.1093/nar/gky1257.

Supplementary Table S1. Strains used in this study.

Strains	Genotypes and descriptions	References
<u>E. coli strain</u>		
XL1-Blue	Δ(ara-leu) 7697 araD139 fhuA ΔlacX74 galK16 galE15 e14-φ80dlacZΔM15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (StrR) rph spoT1 Δ(mrr-hsdRMS- mcrBC)	
<u>S. aureus strains</u>		
RN4220	Restriction-defective derivative of 8325-4	Kreiswirth <i>et al.</i> 1983
HG003	<i>rsbU</i> and <i>tcaR</i> restored strain 8325	Herbert <i>et al.</i> 2010
HG003 ∆sprG1/sprF1	HG003 strain deleted for <i>sprG1</i> and <i>sprF1</i>	This study
HG003 ∆sprG2/sprF2	HG003 strain deleted for sprG2 and sprF2	Le Lam <i>et al.</i> 2017

Supplementary Table S2. Plasmids used in this study.

Plasmids	Relevant characteristics	References
pCN35	Modified high-copy-number shuttle vector with Amp ^R in <i>E. coli</i> and ErmR in <i>S. aureus</i>	Charpentier <i>et al</i> . 2004
pCN35ΩSprF2	pCN35 with <i>sprF2</i> under the control of its endogenous promoter	This study
pCN35ΩSprG2	pCN35 with <i>sprG2</i> under the control of its endogenous promoter	This study
pCN35ΩSprG2SprF2	pCN35 with <i>sprG2</i> and <i>sprF2</i> each under the control of its endogenous promoter	This study
pCN35ΩSprG2FLAG	pCN35ΩSprG2 with a 3XFLAG sequence before the termination codon of the predicted internal coding sequence of SprG2	This study
pCN35ΩSprG2FLAG /SprF2	pCN35ΩSprG2FLAG with <i>sprF2</i> under the control of SprG2 and SprF2 endogenous promoters	This study
pCN35ΩSprG2FLAG- STOP	$pCN35\Omega SprG2FLAG$ with the initiation codon of translation GUG mutated to the UAA stop codon	This study
pCN35ΩSprF3	pCN35 with <i>sprF3</i> under the control of its endogenous promoter	This study
pCN35ΩSprG3	pCN35 with <i>sprG3</i> under the control of its endogenous promoter	This study
pCN35ΩSprG3SprF3	pCN35 with <i>sprG3</i> and <i>sprF3</i> each under the control of its endogenous promoter	This study
pALC2073	Multicopy shuttle vector with the tetracycline- inducible $P_{xyl-tetO}$ promoter and Cat ^R in <i>S. aureus</i>	Bateman <i>et al.</i> 2001
pALC2073ΩSprG2	pALC2073 with sprG2 under the tetracycline- inducible $P_{xyl-tetO}$ promoter and Cat ^R in <i>S. aureus</i>	This study
pALC2073ΩSprG2- STOP	pALC2073 Ω SprG2 with the first GTG codon, encoding valine V1, mutated to the UAA stop codon	This study
pALC2073ΩSprG3	pALC2073 with sprG3 under the tetracycline- inducible $P_{xyl-tetO}$ promoter and Cat ^R in <i>S. aureus</i>	This study
pALC2073ΩSprG3- STOP1	pALC2073 Ω SprG3 with the first predicted UUG codon, mutated to the UAA stop codon	This study
pALC2073ΩSprG3- STOP2	pALC2073ΩSprG3 with the second AUG codon, encoding methionine M1, mutated to the UAA stop codon	This study
pALC2073ΩSprG3- STOP3	pALC2073 Ω SprG3 with the third AUG codon, encoding methionine M2, mutated to the UAA stop codon	This study

		Résultats
pALC2073ΩSprG3- STOP4	pALC2073 Ω SprG3 with the fourth AUG codon, encoding methionine M3, mutated to the UAA stop codon	This study
pCN35ΩSprF4	pCN35 with <i>sprF4</i> under the control of its endogenous promoter	This study
pCN35ΩSprF1	pCN35 with <i>sprF1</i> under the control of its endogenous promoter	Pinel-Marie <i>et al</i> . 2014
pCN35ΩSprF1SprG1	pCN35 with <i>sprF1</i> and <i>sprG1</i> , each under the control of its endogenous promoter	Pinel-Marie <i>et al</i> . 2014
pALC2073ΩSprG1	pALC2073 with sprG1 under the tetracycline-inducible $P_{xyl-tetO}$ promoter and Cat ^R in <i>S. aureus</i>	This study
pCN35ΩP _{veg} SprF4	pCN35 with <i>sprF4</i> under the control of the P _{veg} promoter	This study

Supplementary Table S3. DNA primers used in this study.

DNA	Sequences	Purposes
SprF1-NB3'	TAACTTTGGCTGGTTTCGATGGTT	SprF1 northern blot
SprG1-NB	ATGCCACCATAGGCACCACCTCCTT	SprG1 northern blot
SprG2_2-NB	AACATACCGAAACTTAACATTAA	SprG2 northern blot
SprG2bis-NB	TTAACCATCATTCTATGTCAAAGTT	SprG2 northern blot
SprF2-NBHG003	TAACCATCATTTCAAAACTTTGACATA	SprF2 northern blot
SprF3-NB	TAACATGTTTCCGAGTGTTGCCCTT	SprF3 northern blot
SprG3bis-NB	CAGACATGCTAGTCCTTTCTAGGAG	SprG3 northern blot
SprF4-NBHG003	CAACCATCATTTCCAAACTTTGACAAC	SprF4 northern blot
5SRNA-NB	CGTAAGTTCGACTACCATCG	5SRNA northern blot
tmRNA-NB	ACACGCTTAATGAGCTCGGG	tmRNA northern blot
FLAG-NB	ATCCTTGTAGTCGATGTCATGATCTT	FLAG northern blot
SprG2-F1 SprG2-F2	TCATTGGTATAGTAGTAGCAATAAT AACCATCATTTCAAAACTTTGAC	SprG2 5'/3' RACE
SprG3-R2 SprG3-F1 SprG3-F2	CAACTATAACCATAGGCATCA GAAATGCTTATGGTTGTATTAACA GGTTTAGTATTGATTAGTACTCAAGAC	SprG3 5'/3' RACE
<u>T7</u> -SprF1 SprF1-Rev	TAATACGACTCACTATAGGGATATATAGAAAAAGGGCAAC AACCATCGCTAACTTTGGCT	SprF1 transcription
<u>T7</u> -SprF2 SprF2-Rev	TAATACGACTCACTATAGGGGTAAAAAGACGACATGCAGGAA AAATAACCATCATTTCAAAACTT	SprF2 transcription
<u>T7</u> -SprG2_2 SprG2-Rev	TAATACGACTCACTATAGGG TATCTGA TAAATGAGATTTTCTTTAACCAT	SprG2 transcription
<u>T7</u> -SprF3	TAATACGACTCACTATAGGGGTAGCAAGTAGAAGCAAAAGATG	SprF3 transcription
SprF3-Rev		
<u>17</u> -SprG3 SprG3AS-SRD	TAATACGACTCACTATAGGGGAGCAAGTTGGATAGATGGTGG CTAAT ACATGTTACCCTAATGAGCCCGT	SprG3 transcription and toeprint (primer as)
<u>T7</u> -SprF4 SprF4-Rev	TAATACGACTCACTATAGGGTAAATAGACGATATGCAGGAAC	SprF4 transcription
<u>T7</u> -SprB SprB-Rev	TAATACGACTCACTATAGGGG AAATAAAAAAACCATTCCGCAT	SprB transcription
SprF1surS- <u>BamHI</u> SprF1surAS- <u>EcoRI</u>	ATCG <u>GGATCC</u> ATATCATACCCAATAGCTTT ATCG <u>GAATTC</u> TTGGTTTATTCCTTATTGCATT	pCN35ΩSprF1

SprF2surS- <u>BamHI</u> SprF2surAS- <u>EcoRI</u>	ATCG <u>GGATCC</u> CTGACATGTTTAGCAGGCAAT ATCG <u>GAATTC</u> TTGAAAGGAAAAGCCTATTGTGATA	pCN35ΩSprF2
SprG2surS- <u>BamHI</u> SprG2surAS- <u>EcoRI</u>	ATCG <u>GGATCC</u> AATGCTTAAATAAGCTTTTCTTAGACGT ATCGG <u>GAATTC</u> AACATGTCGCCTAATGAGCCCGTT	pCN35ΩSprG2
SprG2F2surAS- <u>EcoRI</u>	ATCG <u>GAATTC</u> AATCATAATTGATTTCTACCACAGTATGATT	pCN35ΩSprG2SprF2 pCN35ΩSprG2FLAG /SprF2
SprG2- <i>FlagS</i> SprG2- <i>FlagAS</i>	GACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACAT CGACTACAAGGATGACGATGACAAGTAACCATCATTTCAAA ACTTTGACATA CTTGTCATCGTCATCCTTGTAGTCGATGTCATGATCTTTATA ATCACCGTCATGGTCTTTGTAGTCTTTTTTTTTGCTTAAATTT ATTATTGCT	pCN35ΩSprG2FLAG (FLAG in italics)
SprG2 <u>StopS</u> SprG2 <u>StopAS</u>	AAAGGAAAAGCCTATT <u>TAA</u> ATATCTATTGCAAACGC GCGTTTGCAATAGATAT <u>TTA</u> AATAGGCTTTTCCTTT	pCN35ΩSprG2FLAG- STOP pALC2073ΩSprG2-STOP
SprG2pALCS- <u>KpnI</u>	ATCG <u>GGTACC</u> GAGCAAGTTGAATTGATGGTGGC	pALC2073ΩSprG2 pALC2073ΩSprG2-STOP
SprF3surS- <u>BamHI</u> SprF3surAS- <u>EcoRI</u>	ATCG <u>GGATCC</u> ATTCGTGATTACATTCTATACTT ATCG <u>GAATTC</u> ATGCCTATGGTTATAGTTGTTA	pCN35ΩSprF3
SprG3surS- <u>BamHI</u> SprG3surAS- <u>EcoRI</u>	ATCG <u>GGATCC</u> ATGAACAAACGATAACAGGGGAAGAA ATCG <u>GAATTC</u> TTAACTCTTGAAACACAAAAAGGGCAA	pCN35ΩSprG3
SprG3F3surAS- <u>EcoRI</u>	ATCG <u>GAATTC</u> TTACAACTTTAGTTGTTAGGGGCTCTTAT	pCN35ΩSprG3SprF3 pCN35ΩSprG3FLAG /SprF3
SprG3pALCS- <u>KpnI</u>	ATCG <u>GGTACC</u> GAGCAAGTTGGATAGA	pALC2073ΩSprG3 pALC2073ΩSprG3- STOP1 pALC2073ΩSprG3- STOP2 pALC2073ΩSprG3- STOP3 pALC2073ΩSprG3- STOP4
SprG3-STOP-S SprG3-STOP-AS	ATGGTTATAG <u>TAA</u> TTACTCCTAGA TCTAGGAGTAA <u>TTA</u> CTATAACCAT	pALC2073ΩSprG3- STOP1
SprG3-STOP2-S SprG3-STOP2-AS	CCTAGAAAGGACTAGC <u>TAA</u> TCTGATTTTGAAATGCT AGCATTTCAAAATCAGA <u>TTA</u> GCTAGTCCTTTCTAGG	pALC2073ΩSprG3- STOP2
SprG3-STOP3-S SprG3-STOP3-AS	GTCTGATTTTGAA <u>TAA</u> CTTATGGTTGTA TACAACCATAAG <u>TTA</u> TTCAAAATCAGAC	pALC2073ΩSprG3- STOP3
SprG3-STOP4-S SprG3-STOP4-AS	TTGAAATGCTT <u>TAA</u> GTTGTATTAACAATC GATTGTTAATACAAC <u>TTA</u> AAGCATTTCAA	pALC2073ΩSprG3- STOP4
SprF4surS- <i>pCN35</i> - <u>BamHI</u> -2 SprF4surAS_ <i>pCN35</i> - <u>EcoRI</u>	<i>CTGCAGGTCGACTCTAGA<u>GGATCC</u>TCTTCATATTTAATCCA TATCTCTT <i>GTTGTAAACGACGGCCAGT<u>GAATTC</u>ATTGCCTGCTAAACAT GTCAG</i></i>	pCN35ΩSprF4 (pCN35 in italics)
SprF1-F2 SprF1-R2	GTGAGCCCGTTAAAAAGACG GGCTGGTTTCGATGGTTAAA	RT-qPCR
SprG1-F SprG1-R	TAAGGAGGTGGTGCCTATGG CAGCCAAAGTTAGCGATGGT	RT-qPCR

SprF2/SprF4-F2 SprF2/SprF4-R2	AAAAGACGACATGCAGGAACA AGAAAATCTCATTTAGTCACCGTCT	RT-qPCR
SprG2-F SprG2-R	GGGTGGTGCCTATGGCATT TGAAAGTGACGATAAACATACCGA	RT-qPCR
SprG3-F SprG3-R	GGATAGATGGTGGCTAATCTCTTAA TTCAAAATCAGACATGCTAGTCCT	RT-qPCR
TmRNA-F2 TmRNA-R2	CACTCTGCATCGCCTAACAG GATTTGAACCCGCGTCCAG	RT-qPCR

A Toxin gene sequence identities (%)

	sprG1	sprG2	sprG3	sprG4
sprG1	100%	56%	46%	48%
sprG2	56%	100%	55%	51%
sprG3	46%	55%	100%	36%

B Antitoxin gene sequence identities (%)

	sprF1	sprF2	sprF3	sprF4
sprF1	100%	64%	54%	61%
sprF2	64%	100%	55%	93%
sprF3	54%	55%	100%	51%

Supplementary Table S4. Sequence identities of the four *sprG* and *sprF* copies in *S. aureus* HG003.

(A) *sprG* copies and (B) *sprF* copies. The highest sequence identities are in bold.

Table S4



Supplementary Figure S1. Growth kinetics in the absence of aTc-induction.

(**A-C**) Growths kinetics in liquid culture of *S. aureus* HG003 without anhydrotetracycline (aTc) induction. (**A**) Strains shown: pALC and pCN35 (blue); pALC and pCN35ΩSprF2 (green); pALCΩSprG2 and pCN35 (black); and pALCΩSprG2 and pCN35ΩSprF2 (red). (**B**) Strains shown: pALC and pCN35 (blue); pALC and pCN35ΩSprF3 (green); pALCΩSprG3 and pCN35 (black); and pALCΩSprG3 and pCN35ΩSprF3 (red). (**C**) Strains shown: pALC and pCN35 (blue); pALC and pCN35ΩSprF4 (green); pALCΩSprG4 and pCN35 (black); and pALCΩSprG4 and



Supplementary Figure S2. SprG2 and SprG3 RNA overexpression and various SprG2 and SprG3 mutants harbouring premature termination codons in their internal coding sequences.

(**A**) Northern blot analysis of SprG2, SprG2-STOP, SprF2, SprG3, SprG3-STOP1-4, and SprF3 RNA expression in strains before and after (blue) anhydrotetracycline (aTc) induction. The internal control is tmRNA. (**B**) Growth kinetics in liquid cultures of HG003 bacteria containing the following plasmids without aTC induction: (left) pALC (yellow); pALCΩSprG2 (blue); or pALCΩSprG2-STOP (green); and (right) pALC (yellow); pALCΩSprG3-STOP1 (black); pALCΩSprG3-STOP2 (green); pALCΩSprG3-STOP3 (grey); or pALCΩSprG3-STOP4 (orange). The error bars indicate variations between three biological replicates.



Supplementary Figure S3. Overexpression of SprG2-FLAG and SprF2 RNA during *S. aureus* growth.

Northern blot analysis of SprF2, SprG2, and SprG2-FLAG RNA expression during HG003 growth, with tmRNA as the internal loading control.



Supplementary Figure S4. Northern blot analyses of strains expressing non-cognate SprF/SprG RNA pairs.

(**A-C**) Northern blot analysis of the RNA expression levels of various toxins and antitoxins in isogenic *S. aureus* HG003 strains. (**A**) RNA levels of SprG1, SprF2, SprF3, and SprF4 in HG003 containing: pALC and pCN35; pALCΩSprG1 and pCN35; pALCΩSprG1 and pCN35ΩSprF2; pALCΩSprG1 and pCN35ΩSprF3; and pALCΩSprG1 and pCN35ΩSprF4. (**B**) RNA levels of SprG2, SprF1, SprF3, and SprF4 in HG003 containing: pALC and pCN35; pALCΩSprG2 and pCN35ΩSprF1; pALCΩSprG2 and pCN35ΩSprF3; and pALCΩSprG2 and pCN35ΩSprF1; pALCΩSprG2 and pCN35ΩSprF3; and pALCΩSprG2 and pCN35ΩSprF4. (**C**) RNA levels of SprG3, SprF1, SprF2, and SprF4 in HG003 containing: pALC and pCN35ΩSprF3; and pALCΩSprG3 and pCN35ΩSprF4. (**C**) RNA levels of SprG3, SprF1, SprF2, and SprF4 in HG003 containing: pALC and pCN35ΩSprF2; and pALCΩSprG3 and pCN35ΩSprF3; pALCΩSprG3 and pCN35ΩSprF4. Samples after anhydrotetracycline (aTc) induction are blue, and tmRNA is the internal loading control.



Supplementary Figure S5. Binding constant and interaction between SprF1 and SprG3.

(A) Native gel shift assays detect the complex formation between labelled SprF1 with increasing amounts of unlabelled SprG3. The apparent binding constant between SprF1 and SprG3 is around 2.0 \pm 1.7 nM. The RNA complexes were revealed with a PhosphorImager. Labelled RNAs are indicated with asterisks. (B) Schematic diagram created with IntaRNA showing the predicted interaction between SprG3/SprF1 RNA. Figure S5



Supplementary Figure S6. Binding constants and cross-interaction domain between SprF4 and SprG2 RNA.

Native gel shift assays showing complex formation between labelled SprF4 with increasing amounts of (A) unlabelled SprG2 or (B) SprG2, SprG2-5'ORF, and SprG2-3'. The apparent binding constant between SprF4 and SprG2 is about 3.4 ± 1.6 nM. The complex formation between SprF4 and SprG2 involves the SprG2-3' end. The complexes were revealed with a PhosphorImager. Labelled RNAs are indicated with asterisks. (C) Schematic diagram created with IntaRNA of the predicted interaction between SprG2/SprF4 RNA. Figure S6



D

SprF3 SprG1 SprG3

SprG1

SprF1
 SprF1

✓ SprF4

F

SprG2





Figure S7



pCN35

ΩSprG3

PE E S

.

SprG3SprF3

PE E S

pCN35

ΩSprF3

PE E S

pCN35

PEES

8



A





Supplementary Figure S7. Cross-talk regulation between SprG and SprF RNA copies during *S. aureus* HG003 growth.

(**A-C**) Northern blot analysis of SprG1, SprF1, SprG2, SprF2, SprG3, SprF3, and SprF4 RNA expression levels during the pre-exponential (PE), exponential (E), and stationary (S) growth phases in *S. aureus* HG003 with an empty pCN35 and in isogenic strains containing the following: (**A**) pCN35 Ω SprF1 or pCN35 Ω SprG1SprF1; (**B**) pCN35 Ω SprF2, pCN35 Ω SprG2, or pCN35 Ω SprG2SprG2SprF2; (**C**) pCN35 Ω SprF3, pCN35 Ω SprG3, or pCN35 Ω SprG3SprG3SprF3. The internal loading control is tmRNA. (**D**) Chart of RNA quantifications during the same growth phases in *S. aureus*. These quantifications are relative to tmRNA, then normalized to levels with the pCN35 empty vector, considered as equal to 1. Error bars indicate variations between three biological replicates. (**E-F**) Northern blot analysis of SprG1, SprF1, SprG2, SprF2, SprG3, SprF3, and SprF4 RNA during the PE, E, and S growth phases in HG003 with an empty pCN35 and in isogenic strains containing the following: (**E**) pCN35 Ω SprF4; and (**F**) *S. aureus* HG003 wild-type, Δ *sprG1/sprF1*, and Δ *sprG2/sprF2*. TmRNA is the internal loading control.



Supplementary Figure S8. Modulation of SprG and SprF RNA levels upon oxidative and hyperosmotic stress.

Northern blot analysis of SprG and SprF RNA levels during *S. aureus* HG003 growth while undergoing two different environmental stresses for 1 h, and in TSB medium with no stress. TmRNA is the internal loading control.

Partie II :

Identification de la fonction biologique des STA de type I *sprG*/SprF exprimés par *S. aureus*

Afin de déterminer la fonction biologique des STA sprG/SprF, nous avons construit une souche de délétion du STA sprGl/SprF1 ($\Delta G1F1$) obtenue par recombinaison homologue à l'aide du plasmide thermosensible pBT2 (Brückner, 1997) à partir des souches HG003 et N315 de S. aureus (WT). Ces souches de délétion ont été complémentées ou non avec les plasmides pCN35 à fort taux de copies (Charpentier et al., 2004) surexprimant SprF1 (pCN35ΩsprF1) ou le STA complet (pCN35 $\Omega sprG1/sprF1$) sous le contrôle de leur promoteur endogène. En ce qui concerne les STA sprG2/SprF2 et sprG3/SprF3, les souches de délétion nous ont été gracieusement données par l'équipe du Dr Philippe Bouloc (Equipe « Signalisation et Réseaux de Régulations Bactériens », Institut de Biologie Intégrative de la Cellule, Gif sur Yvette, France) (Le Lam et al., 2017). Nous avons également construit une souche de délétion des deux STA localisés au sein de la même région intergénique, les STA sprG2/SprF2 et sprG4/SprF4, recombinaison homologue en utilisant le plasmide thermosensible pYMAY par $(\Delta G2F2\Delta G4F4$; Monk et al., 2012). Pour réaliser la souche de délétion de nos quatre STA, nous sommes partis de la souche délétée du STA sprG3/SprF3 que nous avons transformé par le plasmide pBT2\[2014] sprG1/sprF1 afin d'obtenir la souche délétée de ces deux STA avons transformé cette souche par le plasmide $(\Delta G1F1\Delta G3F3).$ Enfin, nous pYMAY $\Delta G2F2\Delta G4F4$ afin d'obtenir notre souche délétée des quatre STA (Δ 4TA). La construction de ces souches de délétion a été vérifiée par Northern blot afin de valider que les ARN sprG et SprF n'étaient plus exprimés (Figure 28A, 28B et 28C). Une précaution supplémentaire a été prise avec la souche délétée pour les 4 loci sprG/sprF, obtenue la plus récemment. Nous avons souhaité procéder au séquençage de son génome afin de confirmer nos délétions puis de vérifier l'absence de mutations qui pourraient donner lieu à des variations phénotypiques et fausser nos analyses. Ce séquençage est actuellement en cours d'analyse.



Figure 28 : Analyse par Northern blot des souches HG003 sauvage (WT) et délétées pour les STA *sprG/SprF.* Niveau des ARN *sprG* et SprF dans les souches HG003 : A) WT, délétée pour *sprG2/SprF2*, délétée pour la région comportant *sprG2/SprF2*, *sprG4/SprF4*. B) WT, délétée pour *sprG3/SprF3*, délétée pour *sprG1/SprF1*, délétées pour *sprG3/SprF3* et *sprG1/SprF1*. C) WT, délétée pour *sprG1/SprF1*, délétée pour *sprG2/SprF2*, délétée pour *sprG3/SprF3* et délétées pour les quatre STA *sprG/SprF1*. L'ARNtm a été utilisé comme contrôle de dépôt.

I. <u>Etude de l'implication des STA *sprG*/SprF dans l'adaptation de</u> <u>*S. aureus* aux stress environnementaux</u>

Dans le milieu extérieur, comme bactérie commensale lors de la colonisation des sites de portage ou comme bactérie pathogène lors de l'infection, S. aureus est soumis à de nombreux stress environnementaux auxquels il doit s'adapter pour survivre. La plupart des STA de type I chromosomiques possèdent une expression constitutive en milieu riche, à 37 °C, qui varie en présence de stress environnementaux conduisant à des modifications du ratio toxine:antitoxine dans la bactérie. Chez les bactéries Gram positive, l'influence des stress sur les STA de type I est bien documentée chez l'organisme modèle B. subtilis. Par exemple, il a été démontré que lors d'un choc thermique à 48 °C, l'ARN de la toxine bsrG est plus dégradé que son antitoxine SR4 indiquant une moins grande stabilité de cet ARN suite à un choc thermique (Jahn et al., 2012). De plus, l'expression des ARN bsrE et SR5 du STA bsrE/SR5 est influencée par des chocs température froid ou chaud, des variations de pH, une limitation de la disponibilité en oxygène ou en fer (Müller et al., 2016). Plus récemment, il a été montré que le STA yonT/SR6 répond à des stress comme l'ajout de vancomycine, de manganèse, d'éthanol, un stress oxydatif, nutritif ou un choc température chaud avec notamment pour celui-ci une diminution de l'antitoxine SR6 et une augmentation de l'ARNm yonT suggérant la possible production de la toxine YonT dans ces conditions (Reif et al., 2018). Chez S. aureus, l'expression de l'antitoxine SprA1_{AS} est inhibée lors d'un stress acide et oxydant favorisant ainsi l'expression du peptide toxique (Sayed et al., 2012). De même, le niveau de l'antitoxine SprA2AS est également diminué lors d'un stress stringent et d'un stress hyperosmotique (Germain-Amiot et al., 2019). Suite à ces exemples, nous avons voulu poursuivre nos expériences de stress avec notamment les stress acide, nutritif et températures.

A. <u>Etude de l'impact de stress environnementaux sur le niveau des ARN</u> <u>sprG et SprF</u>

Dans un premier temps, nous avons testé l'impact d'un stress acide à pH 5,5 rencontré par *S. aureus* dans le phagolysosome et d'un milieu carencé SNM3 qui mime l'environnement nasal rencontré par *S. aureus* lors de la colonisation (Krismer *et al.*, 2014, composition en **Annexe**) sur l'expression des ARN *sprG* et SprF. Nous avons cultivé la souche HG003 en milieu TSB dilué au 1/10 (TSBd) jusqu'à atteindre une DO₆₀₀ d'environ 0,5 correspondant à la

phase exponentielle de croissance. Puis la culture initiale est divisée en quatre cultures. Le stress acide est appliqué par ajout d'acide chlorhydrique (HCl) à 37 %. Pour le stress nutritif, après élimination du milieu TSBd par centrifugation, les bactéries sont resuspendues soit dans le milieu TSBd comme contrôle ou le milieu SNM3. Les différentes cultures sont incubées 1 h, à 37 °C, 160 rpm, les ARN totaux de *S. aureus* sont récupérés par une extraction au phénol/chloroforme puis analysés par Northern blot (**Figure 29**). Les résultats de ces expériences ne nous ont pas permis de mettre en évidence des variations significatives du niveau des ARN *sprG* et SprF, malgré une tendance vers une augmentation de l'expression des ARN *sprG2* et SprF2 lors d'un stress acide (**Figure 29**).



Figure 29 : Influence d'un pH à 5,5 et du milieu carencé SNM3 sur le niveau des ARN *sprG* et **SprF.** Quantification du niveau des ARN *sprG* et SprF par Northern blot après 1 h d'exposition de la souche HG003 de *S. aureus* à un stress acide avec un pH à 5,5 ou à un stress nutritif avec le milieu pauvre SNM3 mimant l'environnement nasal. Les résultats sont exprimés en variation moyenne du niveau de chaque ARN *sprG* et SprF obtenu pendant les stress, comparé à celui mesuré pour la souche HG003 cultivée dans le milieu TSBd, arbitrairement fixé à 1. Les écart-types représentent la variation des résultats de trois expériences indépendantes.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'effet de chocs de température sur le niveau d'expression des ARN *sprG* et SprF. Nous avons choisi de réaliser un choc thermique froid (18 °C) subit par *S. aureus* lors de la colonisation de la peau et un choc thermique chaud (42 °C) rencontré par *S. aureus* lors d'une infection chez l'hôte. Pour cela, les cultures diluées à DO₆₀₀ égale à 0,1 et issues d'une pré-culture de la souche HG003 à 37 °C dans le milieu BHI, sont incubées à 37 °C pour le contrôle, à 18 °C pour le stress froid et à 42 °C pour le stress chaud. Des prélèvements bactériens sont effectués au bout de 2 h et de 6 h de culture afin d'obtenir des ARN totaux de la souche HG003 de *S. aureus* extraits en phase exponentielle de

croissance pour le choc à 18°C puis en phase exponentielle et stationnaire de croissance pour le choc à 42 °C (**Figure 30A**). L'analyse du niveau d'expression des ARN *sprG* et SprF lors d'une croissance à 42 °C ou à 18 °C est effectuée par Northern blot (**Figures 30B et 30C**). Nous avons montré que les niveaux d'expression des ARN *sprG1* et SprF1 diminuent significativement lors du choc thermique à 42 °C en phase stationnaire de croissance (**Figure 30B**). De plus, le niveau d'expression de SprF3 diminue lors du choc thermique à 18 °C et à 42 °C en phase stationnaire de croissance (**Figure 30B**). De plus, le niveau d'expression de SprF3 diminue lors du choc thermique à 18 °C et à 42 °C en phase stationnaire de croissance suggérant la production du peptide toxique encodé par *sprG3* dans ces conditions (**Figures 30B et 30C**).



Figure 30 : Etude de l'effet des stress thermiques chaud et froid sur le niveau d'expression des ARN *sprG* et SprF chez *S. aureus* HG003. (A) Cinétiques de croissance de la souche HG003 en milieu liquide BHI aux trois températures testées, 37 °C, 42 °C et 18 °C. (B et C) Quantification du niveau des ARN *sprG* et SprF par Northern blot pendant la croissance de la souche HG003 de *S. aureus* lors d'un stress chaud à 42 °C (B) et d'un stress froid à 18 °C (C). Les ARN totaux sont extraits à partir des phases exponentielle (Expo) et stationnaire (Stat) de croissance. Les résultats sont exprimés en variations moyennes du niveau de chaque ARN *sprG* et SprF obtenu à 42 °C et 18 °C, comparées à ceux déterminés pour la souche HG003 cultivée à 37 °C. La moyenne de trois expériences indépendantes (+/- écart-type) a été représentée (t-test de Welch : * : p-value<0,05 ; ** : p-value<0,01)

B. <u>Etude de l'influence de stress environnementaux sur la traduction du</u> <u>peptide codé par sprG2</u>

L'influence des stress environnementaux sur la traduction des toxines de type I peut être directe *via* la modulation du niveau des ARNm codant pour les toxines ou indirecte *via* la diminution du niveau des antitoxines. Ceci a été démontré chez *S. aureus* où lors d'un stress acide et d'un stress oxydatif, la traduction du peptide encodé par *sprA1* est induite par la diminution du niveau d'antitoxine SprA1_{AS} (Sayed *et al.*, 2012).

Nous avons donc analysé l'impact des stress acide, oxydatif et hyperosmotique sur la traduction du peptide SprG2-flaggé puisque nous avons démontré une diminution significative du niveau d'expression de SprF2 lors des stress oxydant et hyperosmotique (**Figure 9A, article 2**). Une culture de la souche HG003 surexprimant le peptide SprG2-flaggé a été exposée ou non à un pH de 5,5, à 10 mM d'H₂O₂ ou à 2 M de NaCl pendant 1 h à 37 °C. Les protéines totales et extracellulaires ont été extraites pour suivre la production de la toxine encodée par *sprG2* par Western blot, à l'aide d'un anticorps anti-FLAG. De façon surprenante, nous n'observons pas d'augmentation significative de la traduction de *sprG2* au cours de ces stress, ni d'augmentation de sa sécrétion dans le milieu extracellulaire (**Figures 31A et 31B**).



Figure 31. Etude de l'effet des stress acide, oxydatif et hyperosmotique sur la traduction du peptide encodé par *sprG2*.

Analyse par Western blot de l'effet de stress environnementaux sur la traduction du peptide SprG2-flaggé chez la souche HG003 pCN35 Ω sprG2-FLAG en phase exponentielle de croissance, dans les protéines totales (A) et les protéines extracellulaires (B). Les protéines sont extraites au bout de 1 h d'exposition des bactéries à un pH de 5,5, à 10 mM d'H₂O₂ ou 2 M de NaCl. Avant le transfert sur membrane PVDF, une coloration au zinc est effectuée pour vérifier la quantité de protéines déposées. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes +/- écart-type avec le contrôle sans stress arbitrairement mis à 1. Les quantifications obtenues après incubation avec l'anticorps anti-FLAG sont normalisées par rapport à la quantité de protéines déposées.

Malgré le fait que nous ayons observé une diminution significative du niveau d'expression de l'ARN SprF3 lors des stress oxydant, hyperosmotique et thermique, nous n'avons pas été en mesure d'étudier la régulation de la traduction de *sprG3* dans ces différentes conditions de stress puisque nous n'avons pas réussi à mettre en évidence la production du peptide SprG3-flaggé.

C. <u>Etude de l'influence de stress environnementaux sur la croissance de la</u> <u>souche HG003 de S. aureus sauvage ou délétée des STA sprG/SprF</u>

Nous nous sommes ensuite intéressés à la croissance de la souche HG003 sauvage et des souches isogéniques délétées des différents STA *sprG*/SprF en présence des stress oxydant et hyperosmotique pour lesquels nous avons observé une variation des niveaux d'expression des ARN *sprG* et SprF (**Figure 9A, article 2**). Nous avons donc cultivé les bactéries dans le milieu TSBd à 37 °C sous agitation jusqu'à atteindre la phase exponentielle de croissance. Les bactéries ont été soumises aux stress oxydant (10 mM H₂O₂) ou osmotique (2 M NaCl). Les cinétiques de croissance ont ensuite été effectuées en microplaques 96 puits par mesure de la DO₆₀₀ toutes les 30 min à 37 °C sous agitation à l'aide d'un lecteur de plaques « Synergy 2 multi-mode reader » (Biotek). Aucune variation de croissance significative n'a été mise en évidence entre ces différentes souches malgré la présence de variations du niveau des ARN *sprG1, sprG3* et SprF lors de ces conditions (**Figure 32 A-C**).





Cinétiques de croissance des souches HG003 WT (bleu), délétée pour le STA *sprG1*/SprF1 (gris), délétée pour le STA *sprG2*/SprF2 (orange), délétée pour le STA *sprG3*/SprF3 (jaune) et délétée pour les 4 STA *sprG*/SprF (violet). Les cultures de nuit ont été diluées de manière à ensemencer la plaque avec des cultures à DO₆₀₀ 0,1. Après une première phase de culture à 37 °C avec agitation sans stress pour atteindre le début de la phase exponentielle de croissance, les cultures sont réincubées à 37 °C avec agitation soit en milieu TSBd (A : contrôle), en milieu TSBd avec 2 M de NaCl (B : stress osmotique) ou 10 mM d'H₂O₂ pour créer un stress oxydant (C). La DO₆₀₀ est mesurée toutes les 30 min et les écart-types représentent les variations entre trois expériences indépendantes.

Nous avons également testé l'influence d'une carence nutritive sur la croissance de nos souches. Des pré-cultures en milieu TSB sont diluées de manière à ensemencer les cultures à DO₆₀₀ 0,1 dans les différents milieux testés. Le milieu TSB est un milieu riche qui sert de contrôle, les bactéries ayant tous les nutriments nécessaires à leur croissance. Ensuite, nous avons testé différents milieux pauvres : un milieu TSB dilué au 1/100, le milieu NZM qui favorise la réponse stringente et le milieu chimiquement défini SNM3 mimant l'environnement nasal donc pauvre en nutriments (composition en **Annexe**). Les cinétiques de croissance dans ces différents milieux ciblant une carence nutritive n'ont pas révélé de variation phénotypique entre les souches testées (**Figure 33 A-D**).





Cinétiques de croissance des souches HG003 sauvage (bleu), délétée pour le STA sprG1/SprF1 (gris), délétée pour le STA sprG2/SprF2 (orange), délétée pour le STA sprG3/SprF3 (jaune) et délétée pour les 4 STA sprG/SprF (violet) cultivées en milieu TSB (A), TSB dilué au 1/100 (B), NZM (C). Cinétiques de croissance des souches HG003 sauvage (bleue), délétée pour le STA sprG2/SprF2 (orange) et délétée pour le STA sprG3/SprF3 (jaune) cultivées en milieu SNM3 (D). La DO₆₀₀ est mesurée toutes les 30 min et les écart-types représentent les variations entre trois expériences indépendantes.

Pour finir, nous avons suivi la cinétique de croissance des souches HG003 sauvage ou délétées pour les STA *sprG*/SprF lors d'un stress thermique chaud et lors d'un stress thermique froid, 37 °C servant de température de contrôle. Les cultures de nuit en milieu BHI sont diluées de manière à ensemencer à DO₆₀₀ 0,1 50 mL de milieu BHI déjà incubé à la température voulue. La croissance des bactéries est alors suivie par mesure de la DO₆₀₀ à intervalles réguliers de 1 h pendant 10 h avec agitation soit à 37 °C, 42 °C (stress chaud) ou 18 °C (stress froid ; **Figure 34 A-C**). Lors d'un stress chaud, nous observons, à partir de 3 h de culture à 42 °C, une différence de croissance entre la souche HG003 sauvage et les souches mutées qui ont une quantité de biomasse produite moins importante (**Figure 34 B**). Lors d'un stress chaud, la croissance de la souche HG003 sauvage semble donc favorisée. Cependant, nous observons que toutes les souches mutées ont le même profil de croissance nous laissant supposer un effet secondaire lié à la construction de nos mutants à l'aide de plasmides thermosensibles plutôt qu'un effet redondant de nos STA.



Figure 34. Influence de la température sur la croissance de la souche HG003 de *S. aureus* sauvage ou délétée pour les STA *sprG*/SprF.

Cinétiques de croissance des souches HG003 sauvage (bleu), délétée pour le STA *sprG1*/SprF1 (gris), délétée pour le STA *sprG2*/SprF2 (orange), délétée pour le STA *sprG3*/SprF3 (jaune) et délétée pour les 4 STA *sprG*/SprF (violet) cultivées en milieu BHI à 37 °C (A), à 42 °C (B) ou à 18 °C (C). La DO₆₀₀ est mesurée toutes les heures et les écart-types représentent les variations entre trois expériences indépendantes.

II. <u>Etude de l'implication des STA *sprG*/SprF dans l'adaptation de</u> <u>S. aureus aux antibiotiques</u>

A. <u>Etude de l'implication des STA sprG/SprF dans la résistance de S. aureus</u> <u>aux antibiotiques</u>

Certains STA chromosomiques peuvent avoir un rôle dans la résistance aux antibiotiques, c'est le cas du STA de type I *ralR*/RalA et des STA de type II MazEF et PezAT. En effet, il a été démontré chez *E. coli* que la délétion de la toxine *ralR* ou du locus entier augmente la sensibilité des bactéries à la fosfomycine (Guo *et al.*, 2014). Chez *S. aureus*, la délétion de *mazEF* augmente la sensibilité de ce pathogène aux antibiotiques de la famille des β -lactamines (Schuster *et al.*, 2015). A l'inverse des autres STA qui favorisent la résistance, le STA PezAT augmente la sensibilité de *Streptococcus pneumoniae* aux antibiotiques appartenant aux β -lactamines (Chan & Espinosa, 2016). Les STA plasmidiques encodés par des plasmides porteurs de gènes de résistance participent indirectement à la résistance aux antibiotiques. Ils permettent le maintien de ces plasmides dans les populations bactériennes en absence de pression de sélection, grâce à un effet PSK (Wang *et al.*, 2015). Ces exemples nous laissaient envisager que les STA *sprG*/SprF pourraient participer à la résistance de *S. aureus* aux antibiotiques.

Nous avons donc poursuivi notre identification de la fonction biologique des STA *sprG*/SprF par l'étude de leur implication dans l'adaptation de *S. aureus* aux antibiotiques, en commençant par la résistance. Face à la pression de sélection des antibiotiques, *S. aureus* a développé des mécanismes de résistance pour survivre, se traduisant par une augmentation de la CMI pour ces antibiotiques. Nous avons ciblé notre étude sur 4 antibiotiques utilisés pour traiter les infections à *S. aureus* et appartenant à différentes familles : la ciprofloxacine (fluoroquinolone), la vancomycine (glycopeptide), la céfazoline et la cloxacilline (β -lactamines). Nous avons déterminé la CMI des souches HG003 sauvage et des mutants simples pour les STA *sprG1*/SprF1, *sprG2*/SprF2 et *sprG3*/SprF3 pour ces différents antibiotiques en milieu Mueller-Hinton (MH) dans des microplaques. Les bactéries ont été cultivées dans le milieu MH jusqu'à la DO₆₀₀ de 0,2 correspondant à une concentration de 0,2.10⁹ ufc/mL, puis diluées pour obtenir la concentration de 5.10⁵ ufc/mL et incubées en présence de ciprofloxacine (0,1-1,6 µg/mL), vancomycine (0,125-2 µg/mL), céfazoline (0,0625-1 µg/mL) et cloxacilline (0,03125-0,5 µg/mL) pendant 24 h à 37 °C. La détermination des CMI s'effectue en mesurant la DO₆₀₀ à intervalles réguliers dans le lecteur de microplaques Biotek. La valeur de la CMI

correspond alors à la plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle aucune croissance visible des bactéries n'est observée. Les valeurs de CMI que nous avons déterminées sont regroupées dans le **Tableau 7**. Nous n'avons pas observé pas de différence de CMI pour les souches HG003 sauvage, Δ G1F1, Δ G2F2 et Δ G3F3 pour la ciprofloxacine, la vancomycine, la céfazoline et la cloxacilline.

Tableau	7:	Valeurs	de	CMI	obtenues	avec	les	souches	HG003	de S.	aureus	sauvage	et
délétées	des	STA spr	G/S	prF (en µg/mL).							

	WT	Δ G1F1	∆G2F2	∆G3F3
Ciprofloxacine	0,4	0,4	0,4	0,4
Vancomycine	0,6	0,6	0,6	0,6
Céfazoline	0,375	0,375	0,375	0,375
Cloxacilline	0,25	0,25	0,25	0,25

Pour confirmer ces résultats, nous avons également réalisé des gradients de concentrations d'antibiotiques en milieu solide. Pour les expériences de gradients d'antibiotiques, nous avons comparé la souche HG003 de *S. aureus* sauvage et tous les mutants de délétion que nous avons construits : les mutants simples Δ G1F1, Δ G2F2, Δ G3F3, les mutants doubles Δ G1F1 Δ G3F3, Δ G2F2G4F4 et la souche délétée des 4 STA *sprG*/SprF nommée Δ 4TA. A l'issue d'une culture de nuit, un inoculum des différentes souches à DO₆₀₀ égale à 10 a été ensemencé par une strie sur gélose BHI en allant de la zone la moins concentrée en antibiotiques vers celle où la concentration d'antibiotiques est la plus forte. Les boîtes ont été ensuite mises à l'étuve à 37 °C pendant 24 h avant d'être prises en photo (**Figure 35 A-D**). Ces expériences ne nous ont pas permis de mettre en évidence des variations significatives du niveau de sensibilité des souches testées que ce soit en présence de ciprofloxacine, de vancomycine, de céfazoline et de cloxacilline.



Figure 35. Etude de la résistance aux antibiotiques en présence ou absence des STA *sprG*/SprF.

Des inoculums de 10 μ L des souches HG003 sauvage, Δ G1F1, Δ G2F2, Δ G3F3, Δ G1F1 Δ G3F3, Δ G2F2G4F4 et Δ 4TA à DO₆₀₀ égale à 10 ont été ensemencés par une strie sur des géloses BHI contenant les gradients de concentration d'antibiotiques suivant : 0 à 1,2 μ g/mL de ciprofloxacine (A), 0 à 2 μ g/mL de vancomycine (B), 0 à 0,3 μ g/mL de céfazoline (C) et 0 à 0,25 μ g/mL de cloxacilline (D).

Les deux approches que nous avons utilisées nous permettent de conclure que les STA *sprG*/SprF ne sont pas impliqués dans la résistance de *S. aureus* aux antibiotiques testés. En effet, nous n'observons pas de variation de la CMI ou du niveau de résistance aux antibiotiques dans un panel de mutants de délétion des STA *sprG*/SprF, comparés à la souche HG003 sauvage. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'étude de leur implication dans la formation de bactéries tolérantes et persistantes aux antibiotiques chez *S. aureus*.

B. <u>Etude de l'implication des STA sprG/SprF dans la formation de</u> <u>bactéries persistantes aux antibiotiques chez S. aureus</u>

Ces expériences ont été réalisées sur les souches HG003 et N315 de *S. aureus* sauvages et délétées des STA *sprG*/SprF.

1. Etude chez la souche HG003 de S. aureus

Comme les STA *sprG*/SprF ne semblent pas impliqués dans la résistance de *S. aureus* aux antibiotiques, nous avons voulu étudier leur rôle dans la tolérance aux antibiotiques testés,

et plus particulièrement la persistance. Beaucoup d'études, y compris chez *S. aureus*, se sont focalisées sur l'implication des STA de type II dans la formation de bactéries persistantes (Conlon *et al.*, 2016). L'étude de la participation des STA de type I dans la persistance bactérienne est plus avancée chez *E. coli* où il a été démontré que les toxines membranaires TisB et HokB augmentaient la persistance aux antibiotiques en créant des dommages membranaires affectant la force proton-motrice et le niveau d'ATP intracellulaire (Dörr *et al.*, 2010 ; Verstraeten *et al.*, 2015 ; Wilmaerts *et al.*, 2018). Chez *S. aureus*, Conlon *et al.* ont également démontré que la chute du taux intracellulaire d'ATP est nécessaire pour la formation de bactéries persistantes aux antibiotiques et que les STA de type II de *S. aureus* n'influencent pas la formation de bactéries persistantes (Conlon *et al.*, 2016). En se basant sur ces études, nous avons émis l'hypothèse que les toxines de type I SprG1, SprG2 et SprG3 pourraient favoriser la persistance de *S. aureus* aux antibiotiques.

Les souches utilisées pour cette étude sont les souches HG003 sauvage, délétées de chaque STA (Δ G1F1, Δ G2F2 et Δ G3F3), ainsi que la souche délétée des quatre STA *sprG*/SprF (Δ 4TA). L'implication des STA *sprG*/SprF dans la persistance de *S. aureus* dans nos différentes souches a été étudiée sur des cultures en phases exponentielle et stationnaire de croissance, en milieu MH. Nous avons mesuré le taux de survie de nos souches après exposition à un antibiotique à une concentration supérieure à la CMI, à différents temps et pendant au moins 24 h. Les antibiotiques testés ont été ajoutés aux concentrations suivantes : 8 µg/mL de ciprofloxacine (20 fois la CMI), 15 µg/mL et 30 µg/mL de vancomycine (20 fois et 40 fois la CMI respectivement) et 7,5 µg/mL de céfazoline (20 fois la CMI).

Pour les expériences de survie en phase stationnaire de croissance, nous n'observons pas de courbe biphasique caractéristique de la sous-population des bactéries persistantes, capables de tolérer l'antibiotique (**Figure 36 A-C**). Ces résultats nous suggèrent que le taux de bactéries dormantes, c'est-à-dire à avec une croissance lente et un métabolisme ralenti, est important dans la phase stationnaire de croissance. Leur présence limiterait l'efficacité des antibiotiques bactéricides utilisés.



Figure 36. Etude de l'implication des STA *sprG*/SprF dans la formation de bactéries persistantes sur des cultures de *S. aureus* en phase stationnaire de croissance. Des cultures en phase stationnaire de croissance des souches HG003 sauvage, Δ G1F1, Δ G2F2, Δ G3F3 et Δ 4TA en milieu MH sont exposées à des concentrations d'antibiotiques correspondant à 20 fois la CMI : 8 µg/mL de ciprofloxacine (A), 15 µg/mL de vancomycine (B) ou 7,5 µg/mL de céfazoline (C). Avant ajout de l'antibiotique puis à 24 h et à 48 h, des prélèvements de chaque culture sont effectués, puis lavés avec du milieu MH dépourvu d'antibiotique. Après dilutions, les bactéries sont étalées sur géloses BHI pour dénombrer les bactéries survivantes. La moyenne de quatre expériences indépendantes (+/- écart-type) a été représentée.

En revanche, pour les expériences de survie en phase exponentielle de croissance, nous avons bien observé pour la souche HG003 sauvage une courbe biphasique soulignant la présence d'une sous-population de bactéries persistantes à la ciprofloxacine et à la céfazoline (**Figures 37A et 37C**). Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative dans la formation de bactéries persistantes entre la souche HG003 sauvage et les souches délétées des STA *sprG*/SprF exposées à la ciprofloxacine (**Figures 37A et 37B**). En revanche, nous avons montré que la souche HG003 sauvage possède une meilleure survie comparée à celle des souches délétées des STA *sprG*/SprF suite à une exposition de à la céfazoline (**Figures 37C et 37D**). Pour la vancomycine, nous observons que toutes les souches de *S. aureus* se comportent de la même manière et semblent demeurer sensibles à la vancomycine, suggérant que la dose utilisée (40 fois la CMI) est insuffisante pour induire la formation de bactéries persistantes par *S. aureus* (**Figure 37E**).



Figure 37. Etude de l'implication des STA *sprG*/SprF dans la formation de bactéries persistantes sur des cultures de *S. aureus* en phase exponentielle de croissance.

Les souches HG003 sauvage, Δ G1F1, Δ G2F2, Δ G3F3 et Δ 4TA sont mises en culture en milieu MH pendant 1 h 30 à 37 °C, 160 rpm. Lorsqu'elles sont en phase exponentielle de croissance, les bactéries sont exposées à des concentrations d'antibiotiques correspondant à 20 fois la CMI pour la ciprofloxacine (8 µg/mL, A-B), 20 fois la CMI pour la céfazoline (7,5 µg/mL, C-D) et 40 fois la CMI pour la vancomycine (30 µg/mL, E). Des prélèvements sont effectués aux temps suivants : 0, 2, 4, 6, 24 et 48 h avec arrêt après 24 h pour la céfazoline. Les bactéries sont lavées, diluées puis étalées sur géloses BHI pour dénombrer les bactéries survivantes. La moyenne de trois expériences indépendantes (+/- écart-type) a été représentée. Les diagrammes en B et E représentent le taux de survie des souches de *S. aureus* testées après 48 h d'exposition à 8 µg/mL de ciprofloxacine (B) et 24 h d'exposition 20 fois la CMI de céfazoline (D).

Les courbes de survie nous permettent de déterminer graphiquement les paramètres MDK (Minimum Duration for Killing) (Brauner et al., 2016, Balaban et al., 2019). Le paramètre MDK₉₉ est représentatif de la tolérance aux antibiotiques et correspond à la durée minimale de traitement pour tuer 99 % des bactéries c'est-à-dire pour un taux de survie de 10⁻² sur l'axe des ordonnées de la courbe de survie. Pour nos expériences, les valeurs de MDK₉₉ sont identiques pour toutes nos souches de S. aureus exposées aux trois antibiotiques testés (Tableau 8). La MDK99 de la ciprofloxacine est de 1 h, ce qui est une durée relativement courte. La vancomycine et la céfazoline, qui sont deux antibiotiques ciblant la paroi, partagent la même valeur de MDK₉₉. Le paramètre MDK_{99,99} est représentatif de la persistance aux antibiotiques et correspond à la durée minimale de traitement pour tuer 99,99 % des bactéries c'est-à-dire pour un taux de survie de 10⁻⁴ sur l'axe des ordonnées de la courbe de survie. Les valeurs de MDK_{99,99} sont identiques entre les souches de S. aureus exposées à la ciprofloxacine et à la vancomycine (Tableau 8). Pour les expériences réalisées avec la céfazoline, nous avons déterminé une valeur de MDK99.99 entre 15 et 18 h pour les souches délétées des STA sprG/SprF tandis que la valeur de MDK99.99 pour la souche HG003 sauvage n'a pas pu être déterminée du fait d'un taux plus important de bactéries survivantes (Tableau 8).

Tableau 8 : Va	leurs de MDK99	et MDK99,99 obte	nues à partir d	es courbes d	e survie des
souches HG003	de S. <i>aureus</i> sau	uvage et délétées d	les STA sprG/S	prF (en h)	

	WT	∆G1F1	Δ G2F2	∆G3F3	$\Delta 4TA$			
MDK99								
Ciprofloxacine	1	1	1	1	1			
Céfazoline	6	6	6	6	6			
Vancomycine	6	6	6	6	6			
		MDK99,9	99					
Ciprofloxacine	2	2	2	2	2			
Céfazoline	-	15	18	17	17			
Vancomycine	18	18	18	18	18			

Des expériences supplémentaires de complémentation du phénotype observé avec la céfazoline seront nécessaires pour confirmer une implication des STA *sprG*/SprF dans la formation de bactéries persistantes par la souche HG003 de *S. aureus*. Le STA *sprG1*/SprF1 a

été initialement caractérisé dans la souche N315 de *S. aureus*, souche dans laquelle l'étude du lien entre ce STA de type I et la persistance de *S. aureus* est plus approfondie.

2. Etude chez la souche N315 de S. aureus

<u>Article 3: An RNA antitoxin associates with ribosomes in *Staphylococcus*</u> <u>aureus to modulate protein synthesis and increase antibiotic persister cell</u> <u>formation</u>

Les travaux présentés dans cet article constituent la suite de la caractérisation du STA de type I *sprG1*/SprF1 dans la souche N315 de *S. aureus*. La souche N315 présente l'intérêt d'être une souche clinique de *S. aureus* résistante à la méticilline (SARM) et d'être entièrement séquencée (Kuroda *et al.*, 2001). Des études préliminaires de séquençage à haut débit effectuées sur des ribosomes purifiés de *S. aureus* en collaboration avec le Pr Norbert Polacek de l'Université de Bern en Suisse ont été réalisées afin d'identifier une nouvelle classe d'ARN régulateurs (ARNreg) capables de cibler et de réguler le ribosome de *S. aureus*. Parmi ces ARNreg, nous avons retrouvé l'antitoxine SprF1 associée aux ribosomes de *S. aureus*.

Fort de cette découverte, la première étape de nos recherches a été de vérifier que SprF1 peut effectivement moduler la traduction de *S. aureus*. L'ensemble des expériences ont été conduites sur les 4 souches suivantes : N315 sauvage possédant le plasmide pCN35 (WT), délétée du STA *sprG1*/SprF1 et transformée avec le plasmide pCN35 ($\Delta\Delta$), délétée de *sprG1*/SprF1 et complémentée avec le plasmide pCN35 Δ ($\Delta\Delta$ + SprF1) et la souche délétée de *sprG1*/SprF1 et complémentée avec le plasmide pCN35 Ω *sprG1*/*sprF1* ($\Delta\Delta$ + SprF1 + SprG1). Nous avons, tout d'abord, vérifié que SprF1 n'affecte pas le phénomène de transcription des ARN en mesurant l'incorporation de l'uridine tritiée ([³H]-uridine) au cours de la croissance de *S. aureus*. Comme attendu, nous n'avons pas observé de variation de l'incorporation de l'uridine tritiée dans les souches testées, indiquant que la transcription n'est pas affectée par le STA *sprG1*/SprF1 (**Figure 1a, article 3**). En parallèle, nous n'avons démontré aucun impact de SprF1, *in vitro*, sur la transcription de l'ARNm *sarA* codant pour le facteur de transcription SarA (**Figure supplémentaire 2a, article 3**). En revanche, nous avons montré que SprF1 inhibe la traduction de l'ARNm *sarA* par des essais de traduction *in vitro* (**Figure supplémentaire 2b, article 3**). Nous avons ensuite réalisé le marquage métabolique
en mesurant l'incorporation de la méthionine-[³⁵S] dans les protéines nouvellement synthétisées au cours de la croissance de S. aureus. Nous avons montré une augmentation significative de l'incorporation de la méthionine-[³⁵S] dans la souche $\Delta\Delta$ par rapport à la souche sauvage (WT), phénotype complémenté avec les souches surexprimant SprF1 ou le STA sprG1/SprF1 entier (Figure 1b, figure supplémentaire 1d article 3). Pour confirmer ces résultats, nous avons également montré que SprF1 est capable d'inhiber significativement et de manière dose dépendante la traduction de la luciférase et de la β-lactamase par traduction *in vitro* (Figure 1c, figure supplémentaire 2c, article 3). Pour mieux comprendre comment SprF1 atténue la traduction globale de S. aureus, nous avons recherché in vivo la présence de SprF1 au niveau des polysomes, c'est-à-dire les ribosomes traductionnellement actifs, dans la bactérie. Après un enrichissement des différentes fractions ribosomales, nous avons démontré par RT-qPCR que, contrairement à sprG1, SprF1 est associée aux polysomes et dans une moindre mesure aux ribosomes au cours de la croissance de S. aureus (Figure 1d, article 3). Nous avons également mis en évidence la capacité de SprF1 à s'associer aux ribosomes de S. aureus in vitro par Dot blot (Figure 1e, figure supplémentaire 3b, article 3). Ces expériences montrent que SprF1 fixe préférentiellement le ribosome 70S avec une constante de dissociation comparable à un ARNm, mais peut également se fixer aux deux sous-unités dissociées (Figures supplémentaires 3c et 3d, article 3). La présence d'un cadre ouvert de lecture précédé d'une séquence riche en purines (A7GAAAA12) dans la partie 5' de SprF1 nous a laissé penser que SprF1 pouvait coder pour un peptide putatif de 17 acides aminés. Nous avons confirmé la nature non-codante de l'ARN SprF1 par les techniques de traduction in vitro et de Western Blot, suggérant que celui-ci ne s'associait pas aux ribosomes pour être traduit mais pour exercer une fonction régulatrice (Figures 1f et 1g, article 3).

Pour aller plus loin dans l'étude des mécanismes moléculaires permettant à SprF1 d'atténuer la traduction de *S. aureus*, il a été nécessaire de déterminer la structure secondaire de SprF1 (**Figure 2, article 3**). L'analyse des clivages effectués par une nucléase S1 qui clive l'ARN simple brin et une RNase V1 coupant au niveau des structures en tige-boucle, nous a permis de déterminer que SprF1 comporte trois tiges-boucles ainsi qu'une région ARN simple brin étendue (**Figures 2a et 2b, article 3**). De plus, nous avons montré par traduction *in vitro* et Dot blot que c'est la partie 5' de SprF1, comportant deux structures en tige-boucle, qui interagit avec les ribosomes pour atténuer la traduction (**Figures 2c et 2d, article 3**).

Afin d'identifier la séquence nucléotidique de SprF1 responsable de sa fixation sur les ribosomes, nous avons réalisé un toeprint sur le complexe ternaire d'initiation de la traduction

qui inclut les ribosomes purifiés, l'ARNt^{fmet} initiateur et SprF1. Nous avons ainsi identifié un toeprint au niveau du nucléotide G₂₃ situé dans la partie 5' de SprF1 suggérant que SprF1 s'associe aux ribosomes via sa séquence riche en purines. Comme attendu, nous avons montré par Dot blot et traduction in vitro que cette région riche en purines très conservée est bien requise pour la fixation de SprF1 aux ribosomes 70S et pour l'inhibition de la traduction (Figures 3a, 3b et 3c, figure supplémentaire 4, article 3). SprF1 peut également rentrer en compétition avec un ARNm comme sarA et inhiber de presque moitié sa fixation aux ribosomes à un ratio molaire de 100:1 (SprF1 versus sarA). De la même manière, lorsque SprF1 est associé au ribosome, un excès d'ARNm diminue de manière significative et dose-dépendante cette fixation de SprF1 aux ribosomes (Figures 3d et 3e, article 3). Nous avons voulu ensuite déterminer l'étape de la traduction ciblée par SprF1. Nous avons donc testé l'effet de SprF1 sur la formation du complexe d'initiation de la traduction en utilisant des extraits ribosomaux d'E. coli, de la méthionine-[35S] et de l'ARNt^{fmet}. La fixation de l'ARNt^{fmet}, liée à la méthionine-[³⁵S], au niveau du site P du ribosome a été analysée par Dot blot. Les résultats montrent que SprF1 inhibe la formation du complexe d'initiation de la traduction suggérant que SprF1 inhibe l'étape d'initiation de la traduction. Pour plus de relevance biologique, nous avons déterminé la quantité de SprF1 dans la bactérie. Elle a été estimée à 2.10⁹ et 4.10⁹ molécules de SprF1 pour 5 µg d'ARN totaux en phase exponentielle et stationnaire de croissance respectivement. Cela semble être compatible avec son effet d'inhibition de la traduction en condition normale de croissance, bien que cette quantité soit 10 fois moins importante que celle de l'ARN transfert-messager (Figure supplémentaire 5, article 3).

Sur la base de l'ensemble de ces résultats, nous nous sommes demandé quel était l'intérêt pour *S. aureus* de moduler ainsi son niveau de synthèse protéique, d'autant plus que les signaux initiant la fixation de SprF1 aux ribosomes sont inconnus. Nous avons posé l'hypothèse que cette diminution de la traduction pourrait permettre à *S. aureus* d'entrer en état de persistance. En effet, les bactéries persistantes correspondent à une sous-population bactérienne hautement tolérante aux antibiotiques pour laquelle la traduction globale est fortement inhibée (Cho *et al.*, 2015). Cette hypothèse a été testée sur deux antibiotiques utilisés pour traiter les infections à *S. aureus*, la ciprofloxacine (inhibant la réplication de l'ADN) et la vancomycine (inhibant la synthèse de la paroi). Nous avons, dans un premier temps, montré que les souches N315 WT, $\Delta\Delta$, $\Delta\Delta$ + SprF1 et $\Delta\Delta$ + SprF1 + SprG1 possèdent toutes la même CMI pour ces antibiotiques. Nous avons ensuite étudié la formation de bactéries persistantes à partir de cultures en phase exponentielle de croissance de nos souches de *S. aureus* exposées à la ciprofloxacine et la

vancomycine. Dans ces conditions, nous avons bien observé la formation de bactéries persistantes caractérisées par une courbe de survie biphasique chez toutes les souches testées (**Figure 4a, article 3**). Nous avons également observé une diminution importante du nombre de bactéries survivantes en absence du STA *sprG1*/SprF1 comparé à celui de la souche sauvage ou des souches surexprimant SprF1 ou le STA *sprG1*/SprF1 (**Figure 4a, article 3**). La détermination de la durée minimale de traitement permettant de tuer 99 % (tolérance) et 99,9 % (persistance) des bactéries confirme nos premières observations et suggère une implication de SprF1 dans la persistance de *S. aureus* puisque la MDK_{99,99} est réduite en absence de SprF1 contrairement à la souche sauvage et aux souches de complémentation (**Figure supplémentaire 6, article 3**).

En conclusion, les résultats présentés dans cet article démontrent donc que dans le cas du STA *sprG1*/SprF1, c'est l'antitoxine de type I SprF1 qui semble favoriser la formation de bactéries persistantes aux antibiotiques chez *S. aureus*. Nos expériences mettent également en évidence la dualité de l'antitoxine SprF1 qui, grâce à son extrémité 3', neutralise la toxicité des peptides encodés par *sprG1* envers les bactéries compétitrices et les cellules de l'hôte et, grâce à son extrémité 5', comportant une région riche en purines, interagit avec les ribosomes pour diminuer la traduction de *S. aureus* et favoriser la persistance aux antibiotiques (**Figure 4b**, **article 3**). Ce travail fait l'objet d'un article intitulé « An RNA antitoxin associates with ribosomes in *Staphylococcus aureus* to modulate protein synthesis and increase antibiotic persister cell formation », qui est soumis dans la revue Nature Microbiology.

<u>Article 3</u>

An RNA antitoxin associates with ribosomes in Staphylococcus aureus to modulate protein synthesis and increase antibiotic persister cell formation

Marie-Laure Pinel-Marie*, Régine Brielle*, Camille Riffaud, Noëlla Germain-Amiot, Norbert Polacek and Brice Felden

Nature Microbiology (en soumission)

An RNA antitoxin associates with ribosomes in *Staphylococcus aureus* to modulate protein synthesis and increase antibiotic persister cell formation.

Marie-Laure Pinel-Marie^{1*†}, Régine Brielle^{1*}, Camille Riffaud¹, Noëlla Germain-Amiot¹, Norbert Polacek², and Brice Felden^{1†}

¹Inserm, BRM [Bacterial Regulatory RNAs and Medicine] - UMR_S 1230, 35000 Rennes, France.

²Department of Chemistry and Biochemistry, Bern University, 3012 Bern, Switzerland.

^{*}These authors contributed equally to this work.

[†]email: marie-laure.pinel@univ-rennes1.fr; bfelden@univ-rennes1.fr

Introductory paragraph

Persister cells are a subpopulation of transiently antibiotic-tolerant bacteria associated with chronic infection and antibiotic treatment failure¹. Toxin-antitoxin (TA) systems have been linked to persister cell formation², but the molecular mechanisms leading to bacterial persistence are mostly unknown. We show here that SprF1, a type I antitoxin, associates with translating ribosomes from the major human pathogen Staphylococcus aureus to reduce the pathogen's overall protein synthesis during growth. The untranslated SprF1 is a dualfunction RNA antitoxin that represses toxin expression via its 3'-end³. Using an internal 6-nt sequence on its 5'-end, SprF1 binds ribosomes and interferes with initiator tRNA binding, thus reducing translation initiation. An excess of mRNA not only causes the antitoxin to move, freeing the ribosomes for new translation cycles, but this RNA antitoxin can also displace ribosome-bound mRNAs. The RNA antitoxin 5'-end modulates translation whereas its 3'-end regulates toxin expression. This novel translation attenuation mechanism, mediated by a RNA antitoxin, causes increased persister levels after treatment with ciprofloxacin or vancomycin antibiotics. These unprecedented findings demonstrate a general function for a bacterial RNA antitoxin which modulates the proteins from a bacterial pathogen during growth. They also highlight a novel RNA-guided molecular process that influences antibiotic persister cell production.

Persistent bacterial infections are related to host immunosuppression and antibiotic resistance, and constitute a major public health problem¹. Persister cells can also lead to antibiotic resistance on their own⁴. These cells are a subpopulation of genetically identical, metabolically slow-growing bacteria which survive extremely high antibiotic doses. The presence of such antibiotic-tolerant bacteria (selected for after repeated antibiotic exposure) can result in treatment failure, relapse, and recalcitrant and persistent bacterial infections¹. For the most part, the molecular mechanisms leading to persister formation are unknown. However, there is mounting evidence that type I toxin-antitoxin (TA) systems influence bacterial persistence².

These type I TA systems are widespread genetic modules in bacterial genomes⁵. They were initially discovered on plasmids, where they maintain daughter cells through post-segregational killing mechanisms⁶. They were then identified on bacterial chromosomes, sometimes in multiple copies and on phage-like elements⁵. They are intracellular time bombs which express a stable toxic peptide whose overexpression leads to growth arrest or cell death. They also express a labile RNA antitoxin which neutralizes the toxin's activity. Type I RNA antitoxins repress toxin expression by interacting with the toxin messenger RNA (mRNA), thereby inducing mRNA degradation, preventing its translation, or both⁷. The *Staphylococcus aureus* genome contains several functional type I TA systems^{3,8-11}. *S. aureus* is a multi-drug resistant pathogen, and a leading cause of systemic, local, device-related, and chronic infections¹². Although type I toxins expressed by *S. aureus* trigger lysis of competing bacteria and human cells^{3,8,10}, their biological functions remain unclear.

We investigated the cellular processes regulated by a functional type I TA system expressed by *S. aureus*. We chose the SprG1/SprF1 RNA pair because it has been thoroughly characterized^{3,9}. We started by measuring the incorporation of radiolabelled precursors during transcription and translation in methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) N315 strains expressing, overexpressing, or not expressing SprG1 and/or SprF1 RNAs. The four strains investigated were N315; N315 Δ sprG1/ Δ sprF1; N315 Δ sprG1/ Δ sprF1 complemented with pCN35 Ω sprF1, which only overexpresses SprF1; and N315 Δ sprG1/ Δ sprF1 complemented with pCN35 Ω sprG1/sprF1, which overexpresses both RNA types (Supplementary Fig. 1a). Due to peptide toxicity, we could not obtain N315 Δ sprG1/ Δ sprF1 complemented with pCN35 Ω sprG1, which overexpresses only

SprG1³. The growth kinetics of each of the four strains were similar (Supplementary Fig. 1b). As expected^{13,14}, the transcription inhibitor rifampicin inhibited $[^{3}H]$ -uridine incorporation during S. aureus transcription, but the translation inhibitor streptomycin did not (Supplementary Fig. 1c). The translation inhibitor chloramphenicol¹⁵ impaired [³⁵S]-methionine incorporation into *S. aureus* proteins (Supplementary Fig. 1d). SprF1 did not influence the overall transcription yields, with similar [³H]-uridine incorporation for all four strains (Fig. 1a). However, overall translation yields were reduced by it: [³⁵S]-methionine incorporation into synthesized proteins significantly increased in N315*AsprG1/AsprF1* pCN35 as compared to N315 pCN35, whereas SprF1 or SprF1/SprG1 complementation almost completely restored N315_pCN35 levels (Fig. 1b, Supplementary Fig. 1d). To confirm these observations, we performed *in vitro* translation assays using the transcription factor sarA mRNA as a specific S. aureus mRNA template. The transcription of sarA was unaffected by SprF1 and streptomycin (Supplementary Fig. 2a), but SprF1 attenuated sarA mRNA translation (Supplementary Fig. 2b). Moreover, in a dose-dependent manner, SprF1 reduced luciferase and β-lactamase translation in *E. coli* cell-free extracts (Fig. 1c, Supplementary Fig. 2c). The positive control chloramphenicol also inhibited luciferase and β -lactamase translation, but protein synthesis was not affected by the srn 3600 negative control, untranslated S. aureus SprB small RNA (sRNA)¹⁶ (Fig. 1c). For luciferase and β -lactamase, SprF1's apparent IC₅₀ (or the RNA concentration that will inhibit translation by 50%) was estimated at 4.3 and 4.2 µM, respectively (Fig. 1c, Supplementary Fig. 2c). Therefore, the SprF1 RNA antitoxin reduces translation in S. aureus cells and in reporter assays.

To understand how SprF1 attenuates translation in *S. aureus*, we used RT-qPCR to look for SprF1 and SprG1 RNAs in purified polysomes, ribosomes, and ribosomal subunit fractions during bacterial growth (Fig. 1d). *S. aureus* polysomes and ribosomes were purified as previously described¹⁷. See Supplementary Fig. 3a for a representative FPLC profile and agarose gel electrophoresis. SprG1 expresses two toxic peptides³, but as expected it was not detected in either the polysomal or ribosomal fractions (Fig. 1d) during the exponential growth phase, when SprF1 prevents toxic peptide expression³. About 20-30% of SprF1 RNAs and 50-60% of *spa* mRNAs (the positive mRNA controls) associated with polysomes, and to a lesser extent with the 70S fraction (Fig. 1d). In the polysomal fractions, we did not detect any SprB RNA, which lacks an open reading frame (ORF) (Fig. 1d). These results imply that toxic SprG1 mRNAs do not interact with the translating ribosomes during *S. aureus* growth, whereas a significant proportion of the SprF1

antisense RNAs associate with the polysomes (\sim 30%) and 70S ribosomes (\sim 10%). We used filterbinding assays to further characterize the association of SprF1 RNAs with purified ribosomes. Radiolabelled synthetic SprF1 was incubated with purified S. aureus 70S ribosomes. The two positive controls used were RNAIII, a multifunctional sRNA that is internally translated $(\delta$ -hemolysin)¹⁸, and a canonical mRNA. These both bound purified S. aureus 70S ribosomes, implying that both the ribosomes and the assay were functional (Fig. 1e, Supplementary Fig. 3b). We showed that SprF1 associated with S. aureus 70S ribosomes, whereas SprB and SprG1 did not (Fig. 1e, Supplementary Fig. 3b). These in vitro results were consistent with the in vivo association of SprF1 with polysomes and 70S ribosomes (Fig. 1d). SprF1 is thus self-sufficient for binding to 70S, whereas SprG1 internal translation probably requires additional component(s) and/or structural rearrangements for toxic peptide synthesis. SprF1 preferentially bound the 70S ribosomes, but also interacted with both ribosomal subunits (Supplementary Fig. 3c), which suggests that it binds at the subunit interface. SprF1's apparent dissociation constant (K_d) with purified S. aureus 70S ribosomes was ~100±30 nM (Supplementary Fig. 3d), comparable to that of canonical mRNAs $(K_d \approx 87 \pm 18 \text{ nM})^{19}$. Together, these results imply that SprF1 interacts with ribosomes and polysomes during staphylococcal growth in order to attenuate translation.

A putative ORF was detected within the SprF1 sequence, with a purine-rich sequence (A_7GAAAA_{12}) about 9 nts upstream from a potential initiation codon $(A_{21}UG_{23})^3$. The SprF1 antisense RNA could express a peptide of 17 amino acids having a predicted molecular weight (MW) of ~2.2 kDa. To determine whether SprF1 associates with ribosomes to express a peptide, we performed *in vitro* translation assays. No translation was detected with SprF1 (Fig. 1f), contrary to what happens with the SprG1 positive control³. To investigate whether SprF1 encodes for a peptide produced during growth, we designed a reporter construct by adding a 3xFLAG (FLAG) sequence (theoretical MW of ~2.75 kDa) in-frame, ahead of the ORF's predicted termination codon. As with the translation assays (this work and³), when using anti-FLAG antibodies, the predicted peptide of ~5 kDa was not detected in either the intracellular or extracellular fractions, while the positive control SprG1-encoded peptides were detected in both (Fig. 1g). These data indicate that SprF1 is not translated.

To understand how protein synthesis is affected by an antisense RNA bound to a fraction of polysomes or ribosomes during bacterial growth, we solved the RNA's secondary structure in solution using a lead(II) acetate chemical probe and nuclease S_1 and RNase V_1 enzymatic probes.

Nuclease S₁ cleaves accessible single-stranded RNA, and RNase V₁ cuts at RNA helices or stacked nucleotides. As shown in Fig. 2a, the presence of multiple V_1 cuts with no S_1 or lead cleavages supported the existence of three stems, H1 to H3. Many S_1 and lead cleavages without V_1 cuts demonstrated the presence of three loops (L1 to L3) and an extended single-strand stretch (from A_{68} to U_{99}). The SprF1 structure consists of three stem-loops, with the third acting as a transcription terminator (Fig. 2b). To determine which SprF1 structural domains are required for binding to ribosomes, we split the SprF1 RNA into two halves: 5'-SprF1 (A₁ to A₇₉); and 3'-SprF1 (A₈₀ to A₁₃₃) (Fig. 2b). The 5'-SprF1 portion interacted with S. aureus 70S ribosomes, whereas the 3'-SprF1 section did not (Fig. 2c). Additionally, 5'-SprF1 inhibited luciferase and β -lactamase synthesis by about 50% (Fig. 2d), as observed for SprF1 itself (Fig. 1c). Translation was not altered by 3'-SprF1 (Fig. 2d). These results highlight the fact that in S. aureus, the SprF1 5' half is required for translation interference, while its 3' section is unnecessary. In vitro translation and western blots suggested that SprF1 is not translated (Fig. 1f,g). However, we hypothesized from the results discussed here that the SprF1 5'-end can form a translation initiation complex. To investigate, we performed toeprinting assays on ternary initiation complexes having purified ribosomes, initiator transfer RNA^{fMet} (tRNA^{fMet}) and full-length SprF1. In the presence of increasing concentrations of purified ribosomes, a ribosome toeprint was detected at position G_{23} (Fig. 3a), implying that a ribosome can load onto the SprF1 5'-end. To identify the nucleotides responsible for this binding, we deleted either 23 nts of the 5'-end (SprF1 Δ_{23}), or only 6 nts where the A₇GAAAA₁₂ predicted purine-rich sequence is located (SprF1 $_{\Delta 6}$). The associations of SprF1 $_{\Delta 23}$ and SprF1 $_{\Delta 6}$ with S. aureus 70S ribosomes were both greatly reduced (Fig. 3b). In addition, neither SprF1_{$\Delta 23$} nor SprF1_{$\Delta 6$} was as effective as SprF1 in reducing the translation of the two reporter genes (Fig. 3c). These mutant results suggest that the purine-rich sequence at the SprF1 5'-end may act as a functional analogue of the 'GGAGGU' Shine-Dalgarno sequence in canonical mRNAs in order to interact with 16S ribosomal RNA (rRNA). In this scenario, SprF1's H1 helix would probably have to unfold in vivo when the RNA 5'-end binds to the ribosome. Phylogenetic analysis of the sprfl sequences in various S. aureus clonal complexes showed that, with the exception of the ED133 animal strain (which lacks the entire ribosomal binding site), they all exhibited high sequence conservation at their 5'-ends, including the 6-nt purine-rich sequence (Supplementary Fig. 4). Altogether, our results imply that 70S ribosomes can load onto the SprF1 5'-end to attenuate protein synthesis, and that a 5' purine-rich sequence is required for this loading and translation attenuation.

Canonical translation starts when mRNA binds onto the 30S subunit with tRNA^{fMet} in the P-site, and after which it is joined by the 50S to form functional 70S ribosomes²⁰. We did competition assays to test whether SprF1 impacts protein synthesis by interfering with mRNA binding. The addition of SprF1 at a 100:1 molar ratio with sarA canonical mRNAs inhibited about half of mRNA-ribosomal binding (Fig. 3d). Adding increasing concentrations of sarA mRNAs to SprF1 (up to that 100:1 level) showed that SprF1-ribosome binding is affected in a dose-dependent manner (Fig. 3e). This implies that an excess of mRNA will displace SprF1, freeing the stalled ribosomes for new translation cycles. Ribosome-bound SprF1 molecules are thus easily moved by mRNA, but it is more difficult for SprF1 to displace ribosome-bound mRNAs. In vivo, SprF1 associates with polysomes and 70S ribosomes (Fig. 1d), suggesting that SprF1 may influence translation initiation. We used a translation assay with E. coli S30 extracts, $[^{35}S]$ -methionine, and tRNA^{fMet}. The incorporation of [³⁵S]-methionine into translation initiation complexes was determined by filter binding, then compared to the same experiments done with streptomycin or SprF1. As with streptomycin, SprF1 significantly reduced -tRNA^{fMet} binding to the ribosomal Psite (Fig. 3f). This indicates that SprF1-ribosome binding reduces translation initiation. As hypothesized for an 18-mer mRNA fragment targeting yeast ribosomes²¹, our results suggest that ribosomes bound to the SprF1 5'-end can enter the elongation phase, in keeping with the presence of SprF1 in the polysomes (Fig. 1d). SprF1 antitoxins in a subset of initiating and elongating ribosomes could compete against incoming mRNAs and attenuate translation during bacterial growth (Fig. 3d). Cryo-electron microscopy or X-ray structural investigations of 'SprF1-ribosome' complexes will surely show the location of SprF1 on the ribosomes, as well as provide additional explanations for how this particular RNA antitoxin attenuates protein synthesis. We monitored the SprF1 RNA copy numbers during S. aureus growth to assess whether SprF1 expression levels were compatible with the antitoxin's effect on protein synthesis. At the exponential and stationary growth phases, we detected about 2.10^9 and 4.10^9 copies per 5 µg SprF1 total RNA, respectively (Supplementary Fig. 5). During growth, SprF1 is about ten-fold less abundant than transfermessenger RNA (tmRNA), which associates with stalled ribosomes to rescue translation and allow degradation of problematic mRNA and proteins²². We therefore estimate that the amount of SprF1 produced during S. aureus growth is compatible with its role in protein synthesis. Further investigations are needed to unravel the environmental trigger(s) that increase or decrease SprF1 RNA levels and thereby influence overall translation for S. aureus fitness.

What might be beneficial about reduced S. aureus translation rates during growth? One hypothesis is that translation attenuation could facilitate the formation of bacterial persister cells when they are needed. To investigate whether SprF1 influences persister levels in response to antibiotics, as previously described^{23,24}, we determined the minimal inhibitory concentrations (MICs) of ciprofloxacin (targeting bacterial replication) and vancomycin (attacking the cell envelope) on S. aureus strains in which SprF1 expression was present, absent, or restored. The presence or absence of the SprG1/SprF1 TA system did not modify the MICs for either of these antibiotics, commonly used in the clinic to treat S. aureus (Supplementary Table 3)¹². We next examined the role of the SprG1/SprF1 RNAs in S. aureus tolerance and persistence. We determined the minimum duration for killing 99% (MDK₉₉) or 99.9% of the population (MDK_{99.9}), allowing estimation of bacterial survival after antibiotic exposure²⁴. Ciprofloxacin and vancomycin induced a biphasic killing curve with a subpopulation of surviving persisters on the N315 pCN35 strain (Fig. 4a). SprG1 and SprF1 deletion significantly decreased persister levels after ciprofloxacin or vancomycin treatment of exponentially growing cells (Fig. 4a). SprF1 or SprF1/SprG1 complementation almost completely restored N315 pCN35 persister levels. Tolerance and persistence of these strains were further confirmed by the MDK parameters (Supplementary Fig. 6b,c). While 99% of N315 pCN35 bacteria were killed by ciprofloxacin and vancomycin after 4 and 9 h, respectively, these times were reduced for the other strains: 2 and 6 h for N315 $\Delta sprG1/\Delta sprF1$ pCN35; 4.5 and 7 h for the SprF1-complemented strain (N315AsprG1/AsprF1 pCN35); and 3 and 8 h for the SprF1/SprG1-complemented strain (N315AsprG1/AsprF1 pCN35) (Supplementary Fig. 6b). SprF1 clearly influences persister formation, since MDK_{99,9} was greatly reduced in the N315*AsprG1/AsprF1* pCN35 strain as compared to N315 pCN35, whereas SprF1 or SprF1/SprG1 complementation almost completely restored N315 pCN35 levels (Supplementary Fig. 6c). SprF1 RNA therefore facilitates persister formation when S. aureus is in contact with the two antibiotics most commonly used to treat human infections¹². Extraordinarily, this is the first described case of persistence being affected only by the RNA antitoxin, and not by the complete type I TA pair². Deletion of the entire tisB/istR-1 TA locus in E. coli induces a 10- to 100-fold reduction in persister cells after ciprofloxacin treatment, whereas a strain deleted for only the IstR-1 antitoxin has a 10- to 100-fold persister increase^{25,26}. These results are opposite to the effects observed in this S. aureus SprF1/SprG1 TA system. Deletion of either the fst-Sm/srSm TA locus in Streptococcus mutans or the hokB locus in E. coli

does not impact persister formation^{27,28}, however these studies did not address the roles of the antitoxins independently of each other. Nevertheless, an overproduction of pore-forming toxins TisB, HokB, or Fst-Sm/srSm (RNAI/RNAII homologue) severely impacts the number of persisters that are antibiotic-tolerant^{25,26,27,28}. We must be cautious when interpreting toxin overexpression data, as the overexpression of unrelated proteins has also been shown to induce persister formation in *E. coli*²⁹. The existence of TA redundancies in many bacterial genomes also implies that the deletion of one TA gene pair may not be sufficient to impact either persistence or other associated phenotypes. Also, the three additional copies of SprG1/SprF1⁹ may have to be deleted to more severely impair *S. aureus* persistence.

Here we have presented experimental evidence documenting an unprecedented case of a dual function for a type I RNA antitoxin expressed by a major human pathogen. Via its 3'-end, SprF1 acts as an antitoxin to prevent SprG1 toxicity towards competing bacteria and host cells³. However, during S. aureus growth, its 5'-end also attenuates overall translation. Thanks to a purinerich sequence located at its 5'-end, the RNA interacts with a subset of polysomes and ribosomes in response to antibiotics, increasing the number of S. aureus persister cells (Fig. 4b). In all organisms, translation is fine-tuned by sophisticated regulations modulating gene expression in response to internal and external stimuli³⁰. Bacterial translation is known to be targeted by several type II toxins, but not by type I toxins². In our case, the scenario is different, since it is not the toxin itself but the RNA antitoxin that binds directly to a subset of translating ribosomes. Two ribosomeassociated regulatory RNAs (rancRNAs)³¹ have been described in bacteria: tmRNA²², and signalrecognition particle RNA³². In addition, rancRNAs have been detected in archaea³³⁻³⁵ and in the eukaryotes Saccharomyces cerevisiae²² and the parasite Trypanosoma brucei³⁶. We recently showed that oxidative and hyperosmotic stresses lower SprF1 levels9. This suggests that the SprG1encoded peptides will be produce and target the host cells, leading to staphylococcal disease progression. Our data also implies that, during infection, S. aureus protein synthesis yields are at least in part regulated by SprF1 RNAs.

With this study, we have identified a new mechanism of bacterial persistence wherein an RNA antitoxin interacts with translating ribosomes to modulate protein synthesis and persister cell formation. This may be a general antibiotic tolerance mechanism that also occurs in other bacteria, and could offer new perspectives in the design of RNA-based therapies for combatting recurrent

bacterial infections.

Methods

S. aureus strains and cultures

Bacterial strains are listed in Supplementary Table 1. Strains were grown overnight in tryptic soy broth (TSB, Thermo Fisher, Dardilly, France) agar plates for 18 h at 37 °C with 10 μ g/ml chloramphenicol for strains carrying resistance gene. The liquid cultures were diluted to an optical density at 600 nm (OD_{600nm}) of 0.1, then grown at 37 °C with shaking at 160 rpm in TSB diluted to one-tenth by a TSBd buffer (2.5 g/L K₂HPO₄, 2.5 g/L glucose, 5 g/L NaCl).

Plasmid constructions

Plasmids and primers are listed in Supplementary Tables 1 and 2. For pCN35 Ω *sprG1/sprF1*, the SprG1 and SprF1 sequences 149 nts upstream and 147 nts downstream were amplified using KOD Hot Start polymerase (Novagen, Millipore, Molsheim, France) from N315 genomic DNA. This yielded a 741-bp fragment with flanking BamHI/EcoRI sites, which was inserted into pCN35³⁷. For the flagged SprF1 construct, N315 DNA was amplified from a SprF1 sequence 187 nts upstream and 66 nts downstream. A 3xFLAG in-frame sequence of the putative SprF1-encoded peptide followed by a termination codon was added³⁸, resulting in a 451-bp fragment with flanking BamHI/EcoRI sites. This was inserted into pCN35, purified with a QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen, Les Ulis, France), then transformed into *S. aureus* RN4220 and then into *S. aureus* N315.

S. aureus cell-labelling assays

Labelling assays were started with wild-type and *sprG1/sprF1*-deleted N315 *S. aureus* strains complemented with multicopy pCN35 empty vector or overexpressed SprG1 and/or SprF1 in pCN35 under the control of their endogenous promoters (Supplementary Table 1). These were grown in TSBd buffer to an OD₆₀₀ of 0.1, incubated 1 h at 37 °C, and pulsed with 1 μ L [³H]-labeled uridine (1 μ Ci, PerkinElmer, Boston, USA) for 30 min at 37 °C. The bacterial pellets were suspended in lysis buffer (50 mM Tris-EDTA pH 7.7, 5 mM MgCl₂, 100 μ g/ml lysostaphin) and incubated for 10 min at 37 °C. The lysates were precipitated with 10% TCA and filtered onto 0.45- μ m nitrocellulose membranes (Dutscher, Brumath, France). The membranes were washed twice with 10% TCA, air-dried, then immersed in 5 ml Optiphase HiSafe 2 scintillation liquid (PerkinElmer). The filter counts per minute were detected in a liquid scintillation counter

(Beckman Coulter, Roissy-CDG, France). The *S. aureus* strains were also grown in TSBd to an OD_{600} of 0.1 and incubated 3 h at 37 °C with 0.5 μ L [³⁵S]-methionine (5 μ Ci, PerkinElmer). The reaction was stopped for 5 min on ice, then bacterial pellets were suspended in lysis buffer and incubated for 10 min at 37 °C, after which the samples were loaded onto a 10% Tris-glycine SDS-PAGE gel. After migration, the gel was fixed with 10% acetic acid and 30% ethanol, exposed with a screen, then scanned with a Molecular Dynamics PhosphorImager (GE Healthcare, Saint Aubin, France). The gel was washed twice with water, and stained with Coomassie blue as a loading control.

Transcription and RNA labelling

All the RNAs were transcribed from PCR-amplified templates using N315 genomic DNA and forward primers containing a T7 promoter sequence (Supplementary Table 2). PCR-generated DNA was used as a template for transcription using an Ambion MEGAscript T7 Transcription kit (Thermo Fisher) as per the manufacturer's protocol. For the transcription of a canonical mRNA $(MF36^{39})$ 5'-GGCAAGGAGGUAAAAAUGUUUAAAACGUAAAUCUACU-3' with the sequence, a template was produced by annealing the primers listed in Supplementary Table 2. RNAs were purified on an 8% urea-PAGE gel and eluted overnight at 37 °C under shaking in 500 µl elution buffer (20 mM Tris HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% SDS). RNAs were then purified by ethanol precipitation, and pellets were resuspended with 20 µl water and stored at -80 °C. For the labelling of the RNA 5'-ends, RNAs were dephosphorylated by CIP alkaline phosphatase (NEB, Evry, France) and labelled with 0.5 μ L [γ^{32} P]-ATP (5 μ Ci, PerkinElmer) and NEB T4 PNK enzyme. Labelled RNAs were gel-purified, eluted, and precipitated with ethanol. Pellets were resuspended in 20 µl H₂O and stored at -20 °C. Before use, each transcribed RNA was denatured by incubation at 90 °C for 2 min without magnesium and salt, then chilled on ice for 1 min. This was followed by a renaturation step at room temperature for 15 min in a buffer (80 mM K-HEPES pH 7.5, 4 mM MgCl₂, 330 mM KCl). The *in vitro* transcription assay was performed by adding 100 fmol E. coli polymerase (NEB) to 10 fmol sarA DNA template (Supplementary Table 2), in 5x E. coli RNA polymerase buffer (NEB) supplemented with 0.75 mM each of nucleoside triphosphate ATP, CTP, GTP, and $\left[\alpha^{-32}P\right]$ -UTP (5 μ Ci, PerkinElmer). Samples were loaded onto 8% urea-PAGE gels, air-dried prior to their exposition onto a screen, then analysed with a PhosphorImager.

Translation and translation-initiation assays

Translation with [³⁵S]-methionine was performed using an *E. coli* S30 Extract System for Linear Templates (Promega, Charbonnière Les Bains, France), following the manufacturer's instructions. The pBESTluc DNA vector or SprF1, SprG1, or sarA mRNAs were used as templates for translating luciferase, B-lactamase, the putative SprF1-encoded peptide, SprG1-encoded peptides, and SarA, respectively. For a final volume of 25 µL, 1 µg pBESTluc vectors or sarA mRNAs were incubated for 30 min at 37 °C with or without 1-5 µM SprF1, 10 µL S30 premix, 7.5 μL S30 extracts, 2.5 μL amino acids without methionine, and 0.5 μL [³⁵S]-methionine (5 μCi). For the SprF1 and SprG1 translation assays, a final volume of 25 µL was achieved using 50 pmol SprF1 or 15 pmol SprG1 incubated for 30 min at 37 °C with 10 µL S30 premix, 7.5 µL S30 extracts, 2.5 μ L amino acids without methionine, and 0.5 μ L [³⁵S]-methionine (5 μ Ci). In all cases, the samples were then placed on ice for 5 min and loaded onto 10% Tris-glycine SDS-PAGE gels. After migration, the gels were air-dried, exposed with a screen, and scanned with a PhosphorImager. In parallel, a Coomassie blue stain was performed as a loading control. To monitor initiation complex formation, a final volume of 20 µL was created using 0.15 µg pBESTluc, 25 pmol tRNA^{fMet}, 0.5 μL [³⁵S]-methionine (5 μCi), 5 μL S30 extracts, and 7 μL S30 premix, all of which was incubated for 5 min at 37 °C. To this was added 4 µM SprF1 and 5 µM streptomycin, after which the samples were incubated for 10 min at 37 °C. After 5 min incubation on ice, the samples were filtered through nitrocellulose membranes (0.45 µm, Dutscher) using a vacuum device, then underwent three washing steps with binding buffer (20 mM Tris-acetate pH 7.5, 60 mM NH₄Cl, 1 mM DTT). The membranes were air-dried prior to exposition on a screen, and the results were analysed on a PhosphorImager.

Polysomal and ribosomal extractions, enrichment, and RNA expression analysis

Polysomes were extracted and enriched as previously described¹⁷. Total RNA was harvested just after bacterial growth. The ribosome-associated RNAs were purified and used for RT-qPCR analysis.

RNA extractions, northern blots, and RT-qPCR assays

After *S. aureus* growth, bacteria were centrifuged for 5 min at 4500 rpm at 4 °C, and the pellets were stored at -80 °C. Cell pellets were resuspended in 500 μ L lysis buffer (0.5% SDS, 20 mM sodium acetate, 1 mM EDTA pH 5.5) and mechanically broken through beads beating in phenol pH 4 using a FastPrep-24 5G instrument (MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, France). After 5 min centrifugation at 13000 rpm and 4 °C, the aqueous phase was transferred with an equal

volume of phenol (pH 4) and centrifuged 5 min at 13000 rpm and 4 °C. This was then transferred with an equal volume of a 24:1 solution of chloroform/isoamyl alcohol, and centrifuged for 5 min at 13000 rpm and 4 °C. RNAs were precipitated from the aqueous phase by adding 2.5 volumes of ethanol and 0.1volume of 3 M NaOAc (pH 5.2) solution. For the northern blot assays, 1-10 µg RNAs were separated onto an 8% urea-PAGE gel, and electro-transferred onto a ZetaProbe GT membrane (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) in 0.5x TBE buffer (90 mM Tris, 90 mM boric acid, 2 mM EDTA) for 2 h at 25 V. RNAs were cross-linked to the membrane by UV irradiation. Specific ³²P probes (Supplementary Table 2) were labelled with 0.5 μ L [γ^{32} P]-ATP (5 μ Ci) and T4 PNK enzyme, and hybridized overnight on the membranes with ExpressHyb solution (Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Membranes were washed twice in 2x SSC solution with 0.05% SDS for 10 min, in 0.1x SSC with 0.1% SDS for 10 min, then exposed and scanned with a PhosphorImager. The counts were normalized to the 5S rRNA used as the loading control. For the RT-qPCR assays, putative contaminating DNAs were degraded from 2 µg RNA extracts using amplification-grade DNase 1 enzymes (Life Technologies, Courtaboeuf, France). The complementary DNAs (cDNAs) were synthesized using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Life Technologies). RT-qPCR was performed using a 5 PRIME RealMasterMix SYBR kit (Life Technologies) on a StepOnePlus Real-Time PCR system (GE Healthcare). The DNA primers are listed in Supplementary Table 2. The comparative cycle threshold ($\Delta\Delta$ Ct) method was used to normalize the amounts of detected RNAs against the 5S and 16S rRNA references.

Filter-binding assays

Studies of RNA binding with purified ribosomes or ribosomal subunits were done using a dot blot-filtering device. For the experiments, we used 0.1 or 1 pmol of 5'[³²P]-end-labelled synthetic RNAs, SprF1, SprG1, RNAIII, or *sarA* mRNA, plus a canonical mRNA as a positive control and SprB as a negative one. Each was incubated in a binding buffer (20 mM Tris-acetate pH 7.5, 60 mM NH₄Cl, 1 mM DTT) for 1 min at 90 °C, then chilled on ice for 1 min. Renaturation was performed in 10 mM MgCl₂ at 20 °C for 15 min. Purified HG003 *S. aureus* ribosomal particles (70S, 50S, and 30S) were diluted in binding buffer in the presence of 1 mM MgCl₂ and activated for 15 min at 37 °C. After adding 5 pmol ribosomes, 5 min incubation at 37 °C was done, and the MgCl₂ concentration was adjusted to 10 mM. For the competition experiments, unlabelled SprF1 or *sarA* mRNA were simultaneously added to the ribosomes in the reactions. After 10 min at 37 °C, 12.5 pmol uncharged tRNA^{fMet} was added, and the samples were incubated for 15 min at 37

°C. The final volume was set to 20 μ l. After 5 min incubation on ice, the reactions were filtered through a nitrocellulose membrane (0.45 μ m diameter, Dutscher) and nylon membrane (0.22 μ m diameter, Dutscher) using a vacuum device, followed by three washing steps with binding buffer. Nitrocellulose membranes retain RNA that are associated with ribosomes, whereas the nylon membranes hold the free RNAs. The membranes were air-dried prior to exposition on a screen, and the results were analysed on a PhosphorImager.

Protein extractions and western blots

S. aureus strains were grown to pre-exponential, exponential, and stationary growth phases, and protein extractions were done using 2 mL cultures. For intracellular protein extractions, the pellets were resuspended in lysis buffer, incubated for 15 min at 37 °C, and transferred onto ice with protease inhibitors (Roche Diagnostics) added to a 1x final concentration. After sonication, the proteins were assayed using the Qubit Protein Assay Kit (ThermoFisher), as per the manufacturer's instructions. For the extraction of extracellular proteins, the supernatants were precipitated with 10% TCA overnight at 4 °C. After a centrifugation of 30 min at 13000 rpm and 4 °C, the pellets were washed with 80% acetone and resuspended with 20 μ L loading buffer (37.5 mM Tris-HCl pH 7, 0.75% SDS, 7.5% glycerol, 0.01% Coomassie blue). For the western blots, intracellular proteins were extracted from the strain carrying pCN35ΩsprG1-FLAG (5 µg) or from strains carrying an empty pCN35 vector and pCN35ΩsprF1-FLAG (25 µg). All of the extracellular protein extracts were separated onto a 16% Tricine SDS-PAGE gel. Zinc staining was done as a loading control, then the samples were transferred onto Amersham Hybond-P PVDF membranes (GE Healthcare). After blocking, membranes were incubated with monoclonal mouse ANTI-FLAG horseradish peroxidase (HRP, Sigma). Incubation was done for 1 h at room temperature, and the membranes were then washed, revealed with an Amersham ECL Plus Western Blotting Detection kit, and scanned with an ImageQuant LAS 4000 imager (GE Healthcare).

RNA structural analysis

Structural analysis of SprF1 was performed by incubating 0.5 pmol labelled SprF1 in the structure buffer for 20 min at 30 °C. Digestions with V₁ (5.10^{-5} unit) and S₁ nucleases (5 units) and 1 mM lead acetate were performed for 10 min at 30 °C in the presence of 1 µg yeast total tRNA. Digestions with the U₂ (0.01 unit) and T₁ (0.25 unit) ribonucleases were performed for 15 min at 50 °C with 1 µg total tRNA. Reactions were stopped then precipitated with ethanol, after which the pellets were re-suspended in Ambion Loading Buffer II. The digestion products were loaded

and separated onto an 8% urea-PAGE gel, which was dried prior to exposition on a screen. The SprF1 solution structure was determined using an alkaline ladder performed by incubating labelled SprF1 with 50 mM sodium bicarbonate (pH 9) for 3 min at 75 °C. The results were analysed on a PhosphorImager.

Toeprinting assays

Annealing mixtures containing 0.15 pmol unlabelled SprF1 and 1.5 pmol labelled 'SprF1rev' primer (Supplementary Table 2) in binding buffer were incubated for 1 min at 90 °C, then chilled on ice for 1 min. Renaturation was done in 10 mM MgCl₂ at 20 °C for 15 min. The purified *E. coli* 70S ribosomes were diluted in the reaction buffer with 1 mM MgCl₂, and activated for 15 min at 37 °C. For the toeprinting assays, 1-5 pmol 70S ribosomes was added, incubation was done for 5 min at 37 °C, and then the MgCl₂ concentration was adjusted to 10 mM. After 10 min at 37 °C, 12.5 pmol uncharged tRNA^{fMet} was added, and the samples were incubated for 5 min at 37 °C. The cDNAs were synthesized using 2 units AMV RT (New England Biolabs, Ipswich, USA) for 15 min at 37 °C. Reactions were stopped by adding 15 μ l Loading Buffer II. The cDNAs were loaded and separated onto an 8% urea-PAGE gel, which was dried prior to exposition on a screen. The toeprint position on SprF1 was determined by DNA sequencing, and the results were analysed on a PhosphorImager.

MIC determination

The minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined in triplicate in *S. aureus* strains via the microdilution method. The bacterial inoculum ($5x10^5$ CFU/well) was prepared in Mueller-Hinton medium. Antibiotics were assayed in concentration ranges of 0.1-1.6 µg/mL for ciprofloxacin, and 0.125-2 µg/mL for vancomycin. A Synergy 2 spectrophotometer (Biotek, Colmar, France) was used to record the results after 18-20 h incubation at 37 °C.

Time-kill kinetics assays

Strains were grown to the exponential phase in TSBd medium, plated for colony forming unit (c.f.u.) counts (t = 0), and challenged with 8 µg/mL ciprofloxacin or 20 µg/mL vancomycin. At each time point (t = 2 to 48 h), a cell aliquot was removed, washed, and plated for enumeration of the surviving bacteria (persister cells). Time-kill curves were drawn to determine the minimum duration for killing 99% (MDK₉₉) and 99.9% of the population (MDK_{99.9})^{23,24}.

Statistical analysis

Data were expressed as the means \pm standard deviations of at least 3 independent

experiments. Significant differences were evaluated using the Welch's *t*-test. P < 0.05 was considered to be statistically significant.

Acknowledgments

We thank Jennifer Gebetsberger and Marek Żywicki for their contributions to the initial phase of the project and Juliana Berland for help with editing. This work was funded by the Agence Nationale pour la Recherche (grant #ANR-15-CE12-0003-01 "sRNA-Fit" to B.F.); by the Fondation pour la Recherche Médicale (grant #DBF20160635724 "Bactéries et champignons face aux antibiotiques et antifongiques" to B.F.); by the universities of Rennes and Sherbrooke; and by INSERM and the School of Pharmacy and Medical Sciences at Rennes University. Additional funding came from the Swiss National Science Foundation (grants 31003A_143388/1 and 31003A_166527 to N.P.)

Author contributions

M-L.P.-M. supervised the project, contributed to the design of the experiments, conducted most of the experiments and their analysis, and wrote the manuscript. R.B. designed and conducted polysome-enrichment and persistence experiments, analysed their results, and wrote the manuscript. C.R. performed persistence experiments and interpreted the data. N.G.A. performed persistence experiments and interpreted the project. N.P. contributed to the initial phase of this project. B.F. supervised the project, contributed to the design of the experiments, analysed the data, and wrote the manuscript.

Competing financial interests

The authors declare no competing financial interests.

Materials & Correspondence

Correspondence and requests for materials should be addressed to M.-L.P.-M. and B.F.

Figure legends

Fig. 1: The SprF1 antitoxin attenuates global translation and associates with polysomes and 70S ribosomes in Staphylococcus aureus. a,b Four strains were examined: N315 pCN35 (WT), N315 $\Delta sprG1/\Delta sprF1$ pCN35 ($\Delta\Delta$), N315 $\Delta sprG1/\Delta sprF1$ pCN35 $\Omega sprF1$ $(\Delta\Delta + \text{SprF1})$, and N315 $\Delta sprG1/\Delta sprF1$ pCN35 $\Omega sprG1/sprF1$ ($\Delta\Delta + \text{SprF1}+ \text{SprG1}$). These strains were cultivated 1 h at 37 °C with [³H]-uridine (**a**), and for 3 h at 37 °C with [³⁵S]-methionine (**b**). a, The incorporation of [³H]-uridine into neosynthesized transcripts was determined after TCA precipitation and filtration of the S. aureus lysates, quantified and shown in comparison to the radiolabelled N315 pCN35 RNAs, arbitrarily set to 1. b, [³⁵S]-methionine incorporation into proteins was quantified and compared with radiolabelled N315 pCN35 proteins, arbitrarily set to 1. c, Dose-response relationship between SprF1 and luciferase and β -lactamase translation in E. coli cell-free extracts was determined using pBESTluc. The amounts of radiolabelled proteins in the presence of 1-5 µM SprF1 are shown as percentages of the control, radiolabelled proteins without SprF1, arbitrarily set to 1. IC_{50} values are the SprF1 concentrations that inhibit translation by 50%. The negative and positive controls were 4 μ M SprB sRNA and 10 μ M chloramphenicol (CHL), respectively. d, RT-qPCR analysis to monitor the presence of SprF1, SprG1, SprB, and spa mRNAs in the ribosomal fractions purified from N315. The data are expressed as percentages of their presence within the total fractions, arbitrarily set to 100%, and are the means \pm SD of three independent experiments. The 50S ribosomal subunits were normalized against 5S rRNA (left), while the 30S subunits were normalized against 16S rRNA (right). e, Filter-binding assays of labelled synthetic RNAs (SprF1, SprG1, SprB, canonical mRNA, and RNAIII) on purified S. aureus 70S ribosomes. Binding levels are shown compared to SprF1 association to purified 70S, normalized to 1. Signals measured without ribosomal particles were subtracted from the experimental values. As positive controls, the binding of RNAIII and canonical mRNAs to the purified 70S was monitored. To confirm SprF1 binding specificity, SprB sRNA was used as a negative control. f, In vitro translation of SprF1 and SprG1 RNAs using E. coli cell-free extracts. Arrows indicate SprG1-encoded peptides. g, S. aureus N315 carrying pCN35, pCN35ΩsprF1-FLAG, or pCN35ΩsprG1-FLAG were grown to pre-exponential (PE), exponential (E) and stationary (S) growth phases and cell lysates were prepared. The expression of the putative SprF1encoded flagged peptides and the SprG1-encoded flagged peptides (arrows) was analysed by western blot analysis. of. For each sample, zinc staining acted as the loading control. In f.g, the M column indicates protein markers: 10 kDa (green), 5 kDa (blue), and 2 kDa (red). The results are

expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. Welch's *t*-test: *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001.

Fig. 2: The SprF1 antitoxin solution structure and the lack of a role for the SprF1 3'end in ribosome binding. a, Structural probes were used to monitor SprF1 conformation in solution. 5'-labelled SprF1 was probed by RNase V₁, which cleaves double-stranded RNAs and stacked nucleotides, and by nuclease S1 and lead acetate, both of which cleave accessible singlestranded RNA. Lanes: A, RNase U₂; C, control; L, alkaline ladder; G, RNase T₂; S1, nuclease S₁; V1, RNase V₁; and Pb, lead(II)-induced cleavages. **b**, The secondary structure of SprF1 from *Staphylococcus* aureus N315, as inferred from the probing data. V₁ (arrows) and S₁ cuts (circles) were positioned on the RNA secondary structure model. The purine-rich sequence is red. **c**, Filterbinding assays of radiolabelled SprF1 5'- and 3'-ends with purified 70S ribosomes from *S. aureus*. All signals measured without ribosomal particles were subtracted from the experimental data. **d**, Per pBEST*luc*, effects of the SprF1 5'- and 3'-ends on luciferase and β -lactamase translations in *E. coli* cell-free extracts. The amount of radiolabelled proteins in the presence of 4 μ M RNAs was compared with that of radiolabelled proteins without RNAs, arbitrarily set to 1. The results in **c**,**d** are expressed as the means \pm SD of three independent experiments. *P*-values inferred using the Welch's *t*-test: **, *p* < 0.01; ***, *p* < 0.001when compared to SprF1.

Fig. 3: A purine-rich sequence at the SprF1 5'-end interacts with *Staphylococcus aureus* ribosomes and attenuates translation initiation. a, Experimentally determined ribosomal toeprint on SprF1 (arrow) at position G₂₃. U, C, G, and A are the SprF1 sequencing ladders. b, Filter–binding assays of SprF1 mutants Δ_{23} (lacking 23 nts at the SprF1 5'-end) and Δ_6 (lacking 6 nts at that 5'-end) on purified 70S ribosomes from *S. aureus*. The association of SprF1 with the purified 70S particles was set to 100%, and all signals measured without ribosomal particles were subtracted from the experimental values. Top: schematic representation of the SprF1 mutants Δ_{23} and Δ_6 , which lacks the purine-rich sequence. c, The plasmid pBEST*luc* was used to show the effects of SprF1 Δ_{23} and SprF1 Δ_6 mutants on luciferase and β -lactamase translations in *E. coli* cell-free extracts. The amounts of radiolabelled proteins with 4 μ M RNAs were compared to those lacking RNA, arbitrarily set to 1. The results in **b,c** are expressed as the means \pm SD of three independent experiments. *P*-values by Welch's *t*-test: **, p < 0.01; ***, p < 0.001 as compared to SprF1. **d**, The

effects of adding varying concentrations of SprF1 on the association of labelled *sarA* mRNA with ribosomes is compared to their association to 70S ribosomes, arbitrarily set to 1. **e**, The effects of the addition of varying concentrations of *sarA* mRNAs on the association of labelled SprF1 with ribosomes is compared to their association with 70S, arbitrarily set to 1. **f**, Filter-binding assays with [³⁵S]-tRNA^{fMet} radiolabelled initiator bound to a ribosome-mRNA complex. Luciferase and β -lactamase-encoded mRNAs from pBEST*luc* were used as RNA templates, to which was added 4 μ M SprF1 or 5 μ M streptomycin (as the positive control). Top: schematic representation of these translation-initiation assays. [³⁵S]-tRNA^{fMet} ribosomal binding was quantified and compared with the control reaction, arbitrarily set to 1. The results in **d**,**e**,**f** are expressed as the means \pm SD of three independent experiments. Welch's *t*-test: *, *p* < 0.05; **, *p* < 0.01; ***, *p* < 0.001.

Fig. 4: The SprF1 antitoxin increases the levels of antibiotic tolerant persisters in Staphylococcus aureus. a,b, S. aureus strains N315 pCN35 (WT), N315 $\Delta sprG1/\Delta sprF1$ pCN35 N315 $\Delta sprG1/\Delta sprF1$ pCN35 $\Omega sprF1$ $(\Delta \Delta),$ $(\Delta \Delta + \text{SprF1}),$ and $N315\Delta sprG1/\Delta sprF1$ pCN35 $\Omega sprG1/sprF1$ ($\Delta\Delta$ +SprF1+SprG1) were grown to exponential phase then challenged with 20x MIC ciprofloxacin and 40x MIC vancomycin (a). At each time point, samples were taken, washed, then plated in order to enumerate the survivors. The results are shown as time-kill curves and expressed as the means \pm SD of at least three independent experiments. Student's t-test: *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001. b The SprF1 antitoxin RNA (red with three stem-loops, the third acting as a transcription terminator) extensively overlaps the SprG1 toxin (green RNA fold-predicted structure) via its 3'-end. This prevents the translation of the SprG1-encoded toxic peptides that would normally kill competing bacteria and host cells⁹. Through its 5'-end, SprF1 can also associate with a subset of translating polysomes and 70S ribosomes (yellow), and this causes global translational attenuation, thought to facilitate antibiotic persister formation in S. aureus.

References

 Fisher, R. A., Gollan, B. & Helaine, S. Persistent bacterial infections and persister cells. *Nat Rev Microbiol* 15, 453-464, doi:10.1038/nrmicro.2017.42 nrmicro.2017.42 [pii] (2017).

- 2 Ronneau, S. & Helaine, S. Clarifying the Link between Toxin-Antitoxin Modules and Bacterial Persistence. *J Mol Biol*, doi:10.1016/j.jmb.2019.03.019 (2019).
- 3 Pinel-Marie, M. L., Brielle, R. & Felden, B. Dual toxic-peptide-coding Staphylococcus aureus RNA under antisense regulation targets host cells and bacterial rivals unequally. *Cell Rep* 7, 424-435, doi:10.1016/j.celrep.2014.03.012S2211-1247(14)00190-9 [pii] (2014).
- Levin-Reisman, I. *et al.* Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. *Science* 355, 826-830, doi:10.1126/science.aaj2191 (2017).
- 5 Fozo, E. M. *et al.* Abundance of type I toxin-antitoxin systems in bacteria: searches for new candidates and discovery of novel families. *Nucleic Acids Res* **38**, 3743-3759, doi:10.1093/nar/gkq054gkq054 [pii] (2010).
- 6 Gerdes, K. *et al.* Mechanism of postsegregational killing by the hok gene product of the parB system of plasmid R1 and its homology with the relF gene product of the E. coli relB operon. *Embo J* **5**, 2023-2029 (1986).
- Wen, J. & Fozo, E. M. sRNA antitoxins: more than one way to repress a toxin. *Toxins* (*Basel*) 6, 2310-2335, doi:10.3390/toxins6082310 (2014).
- Sayed, N., Jousselin, A. & Felden, B. A cis-antisense RNA acts in trans in Staphylococcus aureus to control translation of a human cytolytic peptide. *Nat Struct Mol Biol* 19, 105-112, doi:10.1038/nsmb.2193nsmb.2193 [pii] (2011).
- 9 Riffaud, C., Pinel-Marie, M. L., Pascreau, G. & Felden, B. Functionality and crossregulation of the four SprG/SprF type I toxin-antitoxin systems in Staphylococcus aureus. *Nucleic Acids Res*, doi:10.1093/nar/gky1256 (2018).
- 10 Germain-Amiot, N. *et al.* A novel Staphylococcus aureus cis-trans type I toxin-antitoxin module with dual effects on bacteria and host cells. *Nucleic Acids Res*, doi:10.1093/nar/gky1257 (2018).
- Habib, G., Zhu, Q. & Sun, B. Bioinformatics and Functional Assessment of Toxin-Antitoxin Systems in Staphylococcus aureus. *Toxins (Basel)* 10, doi:E473
 [pii]10.3390/toxins10110473toxins10110473 [pii] (2018).
- 12 Tong, S. Y., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L. & Fowler, V. G., Jr. Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev* 28, 603-661, doi:10.1128/CMR.00134-14 (2015).
- 13 Campbell, E. A. et al. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial rna

polymerase. Cell 104, 901-912 (2001).

- 14 Tai, P. C., Wallace, B. J. & Davis, B. D. Streptomycin causes misreading of natural messenger by interacting with ribosomes after initiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 75, 275-279 (1978).
- 15 Murray, R. W., Melchior, E. P., Hagadorn, J. C. & Marotti, K. R. Staphylococcus aureus cell extract transcription-translation assay: firefly luciferase reporter system for evaluating protein translation inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 1900-1904, doi:10.1128/AAC.45.6.1900-1904.2001 (2001).
- 16 Pichon, C. & Felden, B. Small RNA genes expressed from Staphylococcus aureus genomic and pathogenicity islands with specific expression among pathogenic strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 14249-14254, doi:0503838102 [pii]10.1073/pnas.0503838102 (2005).
- 17 Brielle, R., Pinel-Marie, M. L., Chat, S., Gillet, R. & Felden, B. Purification, identification, and functional analysis of polysomes from the human pathogen Staphylococcus aureus. *Methods*, doi:S1046-2023(16)30233-X [pii]10.1016/j.ymeth.2016.10.003 (2016).
- 18 Balaban, N. & Novick, R. P. Translation of RNAIII, the Staphylococcus aureus agr regulatory RNA molecule, can be activated by a 3'-end deletion. *FEMS Microbiol Lett* 133, 155-161, doi:10.1111/j.1574-6968.1995.tb07877.x (1995).
- 19 Kaminishi, T. *et al.* A snapshot of the 30S ribosomal subunit capturing mRNA via the Shine-Dalgarno interaction. *Structure* **15**, 289-297, doi:10.1016/j.str.2006.12.008 (2007).
- 20 Gualerzi, C. O. & Pon, C. L. Initiation of mRNA translation in bacteria: structural and dynamic aspects. *Cell Mol Life Sci* **72**, 4341-4367, doi:10.1007/s00018-015-2010-3 (2015).
- 21 Pircher, A., Bakowska-Zywicka, K., Schneider, L., Zywicki, M. & Polacek, N. An mRNAderived noncoding RNA targets and regulates the ribosome. *Mol Cell* 54, 147-155, doi:10.1016/j.molcel.2014.02.024 (2014).
- Huter, P., Muller, C., Arenz, S., Beckert, B. & Wilson, D. N. Structural Basis for Ribosome Rescue in Bacteria. *Trends Biochem Sci* 42, 669-680, doi:10.1016/j.tibs.2017.05.009 (2017).
- 23 Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O. & Balaban, N. Q. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat Rev Microbiol* 14, 320-330, doi:10.1038/nrmicro.2016.34 (2016).
- 24 Balaban, N. Q. et al. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. Nat

Rev Microbiol, doi:10.1038/s41579-019-0196-3 (2019).

- 25 Dorr, T., Vulic, M. & Lewis, K. Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in Escherichia coli. *PLoS Biol* 8, e1000317, doi:10.1371/journal.pbio.1000317 (2010).
- 26 Gurnev, P. A., Ortenberg, R., Dorr, T., Lewis, K. & Bezrukov, S. M. Persister-promoting bacterial toxin TisB produces anion-selective pores in planar lipid bilayers. *FEBS Lett* 586, 2529-2534, doi:10.1016/j.febslet.2012.06.021S0014-5793(12)00499-1 [pii] (2012).
- 27 Koyanagi, S. & Levesque, C. M. Characterization of a Streptococcus mutans intergenic region containing a small toxic peptide and its cis-encoded antisense small RNA antitoxin. *PLoS One* 8, e54291, doi:10.1371/journal.pone.0054291 (2013).
- 28 Verstraeten, N. *et al.* Obg and Membrane Depolarization Are Part of a Microbial Bet-Hedging Strategy that Leads to Antibiotic Tolerance. *Mol Cell* 59, 9-21, doi:10.1016/j.molcel.2015.05.011 (2015).
- 29 Vazquez-Laslop, N., Lee, H. & Neyfakh, A. A. Increased persistence in Escherichia coli caused by controlled expression of toxins or other unrelated proteins. *J Bacteriol* 188, 3494-3497, doi:188/10/3494 [pii]
- 30 Yusupova, G. Z., Yusupov, M. M., Cate, J. H. & Noller, H. F. The path of messenger RNA through the ribosome. *Cell* **106**, 233-241 (2001).
- Pircher, A., Gebetsberger, J. & Polacek, N. Ribosome-associated ncRNAs: an emerging class of translation regulators. *RNA Biol* 11, 1335-1339, doi:10.1080/15476286.2014.996459 (2014).
- 32 Gupta, S., Roy, M. & Ghosh, A. The Archaeal Signal Recognition Particle: Present Understanding and Future Perspective. *Curr Microbiol* **74**, 284-297, doi:10.1007/s00284-016-1167-9 (2017).
- Gebetsberger, J., Zywicki, M., Kunzi, A. & Polacek, N. tRNA-derived fragments target the ribosome and function as regulatory non-coding RNA in Haloferax volcanii. *Archaea* 2012, 260909, doi:10.1155/2012/260909 (2012).
- 34 Gebetsberger, J., Wyss, L., Mleczko, A. M., Reuther, J. & Polacek, N. A tRNA-derived fragment competes with mRNA for ribosome binding and regulates translation during stress. *RNA Biol* 14, 1364-1373, doi:10.1080/15476286.2016.1257470 (2017).
- 35 Wyss, L., Waser, M., Gebetsberger, J., Zywicki, M. & Polacek, N. mRNA-specific

translation regulation by a ribosome-associated ncRNA in Haloferax volcanii. *Sci Rep* **8**, 12502, doi:10.1038/s41598-018-30332-w (2018).

- 36 Fricker, R. *et al.* A tRNA half modulates translation as stress response in Trypanosoma brucei. *Nat Commun* 10, 118, doi:10.1038/s41467-018-07949-6 (2019).
- Charpentier, E. *et al.* Novel cassette-based shuttle vector system for gram-positive bacteria.
 Appl Environ Microbiol 70, 6076-6085, doi:70/10/6076 [pii]10.1128/AEM.70.10.6076-6085.2004 (2004).
- 38 Zeghouf, M. *et al.* Sequential Peptide Affinity (SPA) system for the identification of mammalian and bacterial protein complexes. *J Proteome Res* **3**, 463-468 (2004).
- 39 Yusupova, G. Z., Yusupov, M. M., Cate, J. H. & Noller, H. F. The path of messenger RNA through the ribosome. *Cell* **106**, 233-241 (2001).





204





Figure 4

Strains	Relevant characteristics	References	
<i>E. coli</i> strain DH5α	F- f80 D <i>lacZ</i> D <i>M15</i> D(<i>lacZA-argF</i>) <i>U169</i> deoR recA1 endA1 hsdR17 (rK- mK-) phoA supE441- thi-1 gyrA96 relA1	Sambrook <i>et al.</i> , 1989	
<i>S. aureus</i> strains RN4220 N315	Restriction-defective derivative of 8325-4 Methicillin-resistant <i>S. aureus (</i> MRSA) strain isolated in 1982 from the pharyngeal smear of a Japanese patient	Kreiswirth <i>et al.</i> , 1983 Kuwahara-Arai <i>et al.</i> , 1996	
N315∆ <i>sprG1/sprF1</i>	N315 strain deleted for <i>sprG1</i> and <i>sprF1</i>	Pinel-Marie <i>et al.</i> , 2014	
Plasmids			
pCN35	Modified high-copy-number shuttle with Amp ^R in <i>E. coli</i> and Cat ^R in <i>S. aureus</i>	Charpentier <i>et al.</i> , 2004	
pCN35Ω <i>sprF1</i>	pCN35 with <i>sprF1</i> under the control of its endogenous promoter	Pinel-Marie <i>et al</i> ., 2014	
pCN35Ω <i>sprG1/sprF1</i>	pCN35 with <i>sprG1/sprF1</i> under the control of its endogenous promoter	This study	
pCN35Ω <i>sprF1</i> -FLAG	CN35Ω <i>sprF1</i> -FLAG pCN35 with <i>sprF1</i> with a 3xFLAG sequence before the termination codon of SprF1's predicted internal coding sequence		
pCN35Ω <i>sprG1</i> -FLAG	pCN35 with <i>sprG1</i> with a 3xFLAG sequence before the termination codon of SprG1's predicted internal coding sequence	Pinel-Marie <i>et al</i> ., 2014	

Supplementary Table 1. Strains and plasmids used in this study.

DNAs		Sequences	
SprF1-NB	TAACTTTGGCT	Northern blot	
SprG1-NB	ATGCCACCAT	Northern blot	
5S rRNA-NB	CGTAAGTTCGACTACCATCG		Northern blot
SprF1	SprF1-F2	SprF1-F2 GTGAGCCCGTTAAAAAGACG	
	SprF1-R2	GGCTGGTTTCGATGGTTAAA	
SprG1	SprG1-F	TAAGGAGGTGGTGCCTATGG	RT-qPCR
	SprG1-R	CAGCCAAAGTTAGCGATGGT	
0 5	SprB-F	CTTTGGCAAGTTGGAATGGT	RT-qPCR
эргь	SprB-R	CGAACATGTCGTCAAAGCAA	
	5SRTFor	GCAAGGAGGTCACACCTGTT	RT-qPCR
35 IRINA	5SRTRev	GCCTGGCAACGTTCTACTCT	
	16SRTFor-2	GAACCGCATGGTTCAAAAGT	DT DOD
165 IRINA	16SRTRev-2	TRev-2 TATGCATCGTTGCCTTGGTA	
	SprF1-T7	TAATACGACTCACTATAGGGATATATAGAAAAAGGGCAAC	In vitro
SprF1	SprF1-rev	AACCATCGCTAACTTTGGCT	transcription
SprG1	SprG1-T7	TAATACGACTCACTATAGGGCTTTGAGCAAGTTGGATAGATG GTGGCTAT	<i>In vitro</i> transcription
	SprG1-rev	TAGAAAAAGGGCAACATGCGCAAACATGTT	
canonical mRNA	mRNA-for	TAATACGACTCACTATAGGGGGGCAAGGAGGTAAAAATGTTTA AACGTAAATCTACT	<i>In vitro</i> transcription
	mRNA-rev	AGTAGATTTACGTTTAAACATTTTTACCTCCTTGCCCCCTATA GTGAGTCGTATTA	
RNAIII	RNAIII-for	TAATACGACTCACTATAGGGCTAGCATGTAAGCTATCGTAAAC AACA	In vitro transcription
	RNAIII-rev	NAIII-rev CTTCCTTAATTAAGATAAAAATTC	
SprB	SprB-for	TAATACGACTCACTATAGGGGTAAAAATAAGACGACATGC	In vitro
	SprB-rev	B-rev AAATAAAAAAACCATTCCGCAT	
5'-SprF1	SprF1-T7	TAATACGACTCACTATAGGGATATATAGAAAAAGGGCAAC	In vitro transcription In vitro transcription
	5'-SprF1-rev	CTAAAATAGCCACCGTCTTTTTAACG	
3'-SprF1	3'-SprF1-for	TAATACGACTCACTATAGGGATTAAAGATTAAATTAATAACCAT TT	
	SprF1-rev	AACCATCGCTAACTTTGGCT	
SprF1∆SD	SprF1∆SD-T7	TAATACGACTCACTATAGGGATATATAGGGCAACATGCGC	In vitro
	SprF1-rev AACCATCGCTAACTTTGGCT		transcription

Supplementary Table 2. DNA primers used in this study.

DNAs	Sequences	Purposes	
SprG1-S	ATCGGGATCCAGATACACAGTTGAGGATATATA	pCN35Q <i>spr</i>	
SprG1/F1- AS	ATCGGAATTCAAAGATAGCTGACAATATCGCTA	G1/sprF1	
SarA-S	TGTTTTATAAACACTTTTTGTTTA		
SarA-AS	CAGAAGCATTTATGAATTATTATTT	template	
T7-SarA	TAATACGACTCACTATAGGGATAATAGAGCATTAAATATAT	SarA mRNA	
SarA-AS	CAGAAGCATTTATGAATTATTATTT	transcription	
SprF1surS	ATCGGGATCCATATCATACCCAATAGCTTT		
SprF1flagAS	CTTGTCATCGTCATCCTTGTAGTCGATGTCATGATCTTTATAATCACCGTC ATGGTCTTTGTAGTCAAATAGCCACCGTCTTTTTAACGGGCT	CACCGTC pCN35Ω	
SprF1flagS	GACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGACTACAA GGATGACGATGACAAGTAGATTAAAGATTAAATTAA	Spir - LAG	
SprF1surAS	ATCGGAATTCTTGGTTTATTCCTTATTGCATT		

Supplementary Table 2. DNA primers used in this study (continued).

Supplementary Table 3. Ciprofloxacin and vancomycin minimal inhibitory concentrations (MIC) for *S. aureus* N315 strains.

MIC (µg/mL)	WT	Δ۵	ΔΔ+SprF1	ΔΔ+SprF1 +SprG1
Ciprofloxacin	0.4	0.4	0.4	0.4
Vancomycin	0.25	0.25	0.25	0.25



Supplementary Fig. 1. In *S. aureus*, SprF1 inhibits *in vivo* global translation, but not transcription. The strains N315 WT Ω pCN35 (WT), $\Delta sprG1/sprF1\Omega$ pCN35 ($\Delta\Delta$), $\Delta sprG1/sprF1\Omega$ pCN35*sprF1* ($\Delta\Delta$ +SprF1), and $\Delta sprG1/sprF1\Omega$ pCN35*sprG1/sprF1* ($\Delta\Delta$ +SprF1+SprG1) were cultivated in TSBd buffer until the exponential growth phase. **a**, After 3 h RNA extraction, northern blot analysis was done on SprG1 and SprF1 expression, with 5S rRNA used as the loading control. **b**, Growth kinetics of N315 WT Ω pCN35 (blue), $\Delta sprG1/sprF1\Omega$ pCN35 (orange), $\Delta sprG1/sprF1\Omega$ pCN35*sprF1* (grey), and $\Delta sprG1/sprF1\Omega$ pCN35*sprG1/sprF1* (yellow) strains. Error bars show the means and standard deviations of three independent experiments. **c**, The N315 wild-type (WT) strain was cultivated 1 h at 37 °C and incubated with [³H]-uridine in the absence or presence of 20 µg/mL rifampicin or streptomycin over 30 min at 37 °C. The incorporation of the [³H]-uridine into the transcriptome was determined after TCA precipitation and filtration of *S. aureus* lysates. The incorporation was quantified and is shown compared to the radiolabelled RNAs of the WT Ω pCN35 strain, arbitrarily set to 1. **d**, The strains were incubated for 3 h at 37 °C with [³5S]-methionine, with 10 µg/mL chloramphenicol (CHL) used as the positive control. Shown are the results of a representative SDS-PAGE of the newly synthesized radiolabelled proteins, with Coomassie blue staining as the loading control.



Supplementary Fig. 2: SprF1 does not affect *in vitro* transcription, but it slows down *in vitro* translation. **a**, Effect of SprF1 on *in vitro* transcription of *sarA* mRNA. *E. coli* RNA polymerase was incubated for 30 min at 37 °C with 10 fmol *sarA* PCR product, 50 fmol SprF1, 20 μ g/ml rifampicin (Rif) used as the positive control, or 20 μ g/ml streptomycin (Str) used as the negative control. Shown is a representative urea-PAGE of the radiolabelled *sarA* mRNA in the absence (-) or presence of SprF1, rifampicin, or streptomycin. **b**, Effects of SprF1 on *in vitro* translation of SarA in *E. coli* cell-free extracts. Shown is a representative SDS PAGE of the radiolabelled SarA in the absence (-) or presence of 4 μ M SprF1, with Coomassie blue staining as a loading control. **c**, Dose-response relationship of SprF1 effects on *in vitro* translations of luciferase and β -lactamase in *E. coli* cell-free extracts using the pBEST*luc* vector. Shown is a representative SDS-PAGE of the radiolabelled luciferase and β -lactamase proteins in the absence (-) or presence of 1-5 μ M SprF1, 4 μ M SprB (negative control), or 10 μ M chloramphenicol (CHL, the positive control).


Supplementary Fig. 3: SprF1 associates with S. aureus polysomes and ribosomes. a, FPLC profile of ribosomal fraction extracts from S. aureus N315 grown in TSBd medium until the exponential growth phase (OD₆₀₀ = 5). Sucrose gradient separation was done to analyse cell extracts on 18-40% linear sucrose density gradients, and the absorption profiles were measured at 254 nm. The graph (left) corresponds to one of three ribosomal fractions performed. Each fraction indicated in the profile was pooled, rinsed, concentrated, then analysed by agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide (right). There, 23S rRNA represents 50S subunit enrichment, and 16S rRNA represents 30S subunit enrichment. b, Filter-binding assays of radiolabelled synthetic RNAs (SprF1, SprG1, SprB, canonical mRNA, or RNAIII) on purified S. aureus 70S ribosomes. Signals measured in the absence of ribosomal particles (-) were subtracted from the experimental values. As positive controls, the binding of RNAIII and a canonical mRNA to purified S. aureus 70S were also monitored. To confirm the binding specificity of SprF1, SprB sRNA was used as a negative control. c, In vitro association of SprF1 with purified S. aureus 70S, 50S, and 30S ribosomal particles. Binding quantification is shown compared to SprF1 association with 70S, arbitrarily normalized to 1. Signals measured without ribosomal particles were subtracted from the experimental values. The results are expressed as the means ± SD of three independent experiments. Student's t-test: *, p < 0.05. **d**, Scatchard analysis of the binding of SprF1 to S. aureus 70S ribosomes using in vitro filter-binding assays, with determination of the dissociation constants (K_d). Error bars show the means and SDs of three independent experiments.



Supplementary Fig. 4: Conservation of the SprF1 5'-ribosome binding sequence among the *S. aureus* phylogeny. Alignments of 14 *sprf1* gene sequences extracted from various *S. aureus* clonal complexes are shown, with emphasis on sequence conservations and variations (light blue). The 5' sequence involved in ribosomal binding is bold, and contains a 6-nt Shine-Dalgarno-like sequence (yellow) that is required for ribosomal loading. Note that this ribosomal-binding site is missing in ED133, an S. aureus ovine mastitis isolate.



Supplementary Fig. 5: Quantification of SprF1 RNA abundance in *S. aureus*. A denaturing polyacrylamide gel was loaded with 5 μ g *S. aureus* total RNA and cultivated to exponential (E) and stationary (S) growth phases with 0.001-0.01 pmol SprF1 and 0.00625-0.1 pmol tmRNA transcribed *in vitro*. SprF1 and tmRNA expressions were analysed by northern blot, with 5S rRNA expression as the loading control. The signals were quantified to determine the amount of SprF1 per 5 μ g total RNA. The mean values from three independent experiments were ~2.10⁹ copies per 5 μ g total SprF1 RNA at the exponential growth phase, and ~4.10⁹ at the stationary growth phase. For tmRNA, the mean values were ~3.10¹⁰ and ~6.10¹⁰.

MDK ₉₉ (h)	WT	ΔΔ	ΔΔ+SprF1	ΔΔ+SprF1 +SprG1
Ciprofloxacin	4 ± 1	2 ± 0.5	4.5 ± 0.5	3 ± 1
Vancomycin	9 ± 3	6 ± 2	7 ± 3	8 ± 2

b

а

MDK _{99.9} (h)	WT	ΔΔ	∆∆+SprF1	ΔΔ+SprF1 +SprG1
Ciprofloxacin	> 48	14 ± 4	> 48	> 48
Vancomycin	> 48	16.5 ± 1.5	24 ± 8.5	21.5 ± 3

Supplementary Fig. S6: Determination of the minimum duration for killing (MDK₉₉ and MDK_{99.9}) parameters for ciprofloxacin and vancomycin against *S. aureus* N315 strains. **a**,**b** The minimum duration for killing 99% (MDK₉₉, **a**) and 99.9% of the population (MDK_{99.9}, **b**) for several *S. aureus* strains was determined using time-kill curves. The results are expressed as the means SD of at least three independent experiments.

Supplemental references

Charpentier E, Anton AI, Barry P, Alfonso B, Fang Y, Novick RP (2004) Novel cassettebased shuttle vector system for gram-positive bacteria. Appl Environ Microbiol **70**: 6076-6085

Kreiswirth, B.N., Lofdahl, S., Betley, M.J., O'Reilly, M., Schlievert, P.M., Bergdoll, M.S., and Novick, R.P. (1983) The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. Nature **305**: 709-712

Kuwahara-Arai K, Kondo N, Hori S, Tateda-Suzuki E, Hiramatsu K (1996) Suppression of methicillin resistance in a mecA-containing pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain is caused by the mecI-mediated repression of PBP 2' production. Antimicrob. Agents Chemother. **40**: 2680-5685

Sambrook J, Firtsch EF and Maniatis T (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

C. <u>Etude de l'implication des STA sprG/SprF dans l'internalisation et la</u> <u>persistance de S. aureus dans les macrophages humains</u>

S. aureus est un pathogène capable de persister dans les cellules de l'hôte lui permettant d'échapper au système immunitaire. S. aureus peut survivre 3-4 jours dans les cellules phagocytaires et jusqu'à 7 jours dans les ostéoblastes avant d'induire la mort de sa cellule hôte par apoptose (Kahl et al., 2016). Cette persistance intracellulaire est largement impliquée dans la récurrence de certaines infections à S. aureus comme les ostéomyélites et les infections des voies pulmonaires des patients atteints de mucoviscidose (Bui et al., 2017). Un autre pathogène adoptant un mode de vie intracellulaire au cours de l'infection est Salmonella qui possède dans son génome un nombre important de STA. Il a été mis en évidence que la délétion de chacun des 14 STA de type II diminuait la formation de « persisters » après l'internalisation par des macrophages humains (Helaine et al., 2014; Ronneau et al., 2019). Parmi les toxines de ces STA, celles appartenant à une famille de toxines atténuant la traduction de Salmonella par acétylation des ARN de transfert aminoacylés (TacT, TacT2 et TacT3) semblent particulièrement impliquées dans la persistance intracellulaire. En effet, des études ont démontré que la surproduction de ces trois toxines conduit à une augmentation de la souspopulation des « persisters » et que leur délétion réduit la persistance après internalisation par les macrophages humains (Helaine et al., 2014 ; Cheverton et al., 2016 ; Rycroft et al., 2018).

Dans ce contexte, nous avons débuté notre étude par la mise au point de l'internalisation de *S. aureus* par les macrophages humains en culture primaire. Nous avons choisi ce modèle cellulaire pour se rapprocher des conditions physiologiques d'internalisation de *S. aureus* puisque ce modèle permet l'étude chez différents sujets et l'analyse des facteurs de variabilité individuelle. Les bactéries à la MOI (Multiplicity of infection) de 25 (25 bactéries pour 1 macrophage) ont été incubées pendant 2 h à 37 °C sous 5 % de CO₂ avec les macrophages humains en présence de sérum AB afin de favoriser l'opsonisation des bactéries, et ainsi leur internalisation par les macrophages. Les cellules infectées ont été ensuite traitées pendant 1 h 30 à 37 °C sous 5 % de CO₂ par la gentamycine à la concentration de 150 µg/mL pour tuer toutes les bactéries extracellulaires non phagocytées. L'internalisation de *S. aureus* dans les macrophages a été analysée par le dénombrement sur gélose des bactéries internalisées après la lyse des macrophages par une solution de triton-X100 à 0,025 %. Les résultats ont été exprimés en effectuant le rapport du nombre d'UFC pour 10⁵ macrophages calculé pour les souches délétées des STA *sprG*/SprF sur celui déterminé pour la souche HG003 sauvage. Nous

n'observons pas de variation du nombre de bactéries internalisées entre les souches HG003 WT, Δ G1F1, Δ G2F2, Δ G3F3 et Δ G2F2G4F4. Dans le cas de la souche Δ 4TA, nos résultats semblent indiquer que la quantité de bactéries internalisées est légèrement plus importante après 2 h de phagocytose. Nous pouvons remarquer que la quantité de bactéries internalisées semble différer uniquement lorsque tous les STA *sprG*/SprF sont délétés, suggérant une action redondante de ces STA qui empêcherait la phagocytose de *S. aureus* par les macrophages humains et pourrait ainsi participer à l'échappement de *S. aureus* au système immunitaire de l'hôte, par un autre mécanisme que la survie en intracellulaire (**Figure 38**).



Figure 38. Etude de l'implication des STA *sprG*/SprF dans l'internalisation de *S. aureus* dans les macrophages humains.

Les souches HG003 de *S. aureus* sauvage et délétées des STA *sprG*/SprF ont été mises en contact avec les macrophages pendant 2 h à une MOI de 25. Les bactéries non internalisées sont tuées par un traitement à la gentamycine de 1 h 30 à une concentration de 150 $\mu g/\mu L$. Puis les macrophages ont été lysés avec une solution de triton-X100 à 0,025% et les bactéries internalisées sont dénombrées. Le graphique représente la proportion de bactéries vivantes après 2 h de phagocytose, en attribuant arbitrairement la valeur de 1 au nombre d'UFC pour 10⁵ macrophages dénombré pour la souche sauvage. Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes +/- écart-type.

Pour conclure cette seconde partie de résultats, nous avons identifié une fonction biologique pour le STA *sprG1*/SprF1 dans la souche N315 de *S. aureus*. En effet, Pour le premier STA *sprG*/SprF caractérisé, *sprG1*/SprF1, il semble impliqué dans la formation de bactéries persistantes à la ciprofloxacine et à la vancomycine chez la souche N315 de *S. aureus*. Nous avons mis en évidence que cette fonction serait exerçait par l'antitoxine SprF1, et plus particulièrement par son extrémité 5', qui lui permettrait d'interagir avec les ribosomes traductionnellement actifs de *S. aureus* dans le but d'atténuer la traduction.

Résultats

En revanche, en ce qui concerne les autres STA *sprG*/SprF exprimés par la souche HG003 de *S. aureus*, les différentes pistes explorées nous ont permis d'initier et d'orienter les recherches dans le but d'identifier leur fonction biologique. Les variations observées du niveau des ARN *sprG* et SprF en condition de stress, ainsi que de la toxine encodée par *sprG2* ne semblent pas avoir d'impact sur la croissance de *S. aureus* lors d'un stress hyperosmotique, oxydant et nutritif. Seul le stress chaud à 42 °C nous montre une différence de croissance entre les souches HG003 sauvage et délétées des STA *sprG*/SprF, quel que soit le STA délété. Les études sur une fonction hypothétique des STA *sprG*/SprF comme systèmes de réponses aux stress physico-chimiques doivent être poursuivies, mais nos résultats semblent plutôt indiquer que les STA *sprG*/SprF appartenant au core génome puisse également avoir une fonction d'adaptation au stress antibiotique, comme cela a été identifié pour le STA *sprG1*/SprF1.

Lors de notre étude de l'adaptation au stress antibiotique, nous avons démontré que les STA *sprG*/SprF ne sont pas impliqués dans la résistance de *S. aureus* à la ciprofloxacine (fluoroquinolone) et à trois antibiotiques ayant pour cible la paroi bactérienne : la vancomycine, la céfazoline et la cloxacilline. Nous avons également initié l'étude de leur implication dans la persistance à ces antibiotiques dans la souche HG003, en déterminant les conditions dans lesquelles devront être poursuivies les expériences de survie, en termes de concentration d'antibiotique et de temps de prélèvements. Nous avons identifié un antibiotique, la céfazoline, pour lequel les expériences de survie avec les souches de complémentation des STA *sprG*/SprF devront être conduites afin de confirmer le phénotype observé.

Enfin, l'analyse de l'internalisation des souches HG003 sauvage et délétées pour les STA *sprG*/SprF nous a permis d'observer que la souche Δ 4TA semble être plus internalisée que la souche sauvage. Cette observation nous permet d'envisager l'étude de l'implication de ces STA dans l'échappement au système immunitaire de l'hôte et la persistance intracellulaire de *S. aureus*. L'ensemble des résultats que nous avons obtenus dans le but d'identifier la fonction biologique des STA *sprG*/SprF va nous permettre d'approfondir l'étude de l'implication des STA *sprG*/SprF dans la tolérance/persistance de *S. aureus*, en particulier sur la persistance intracellulaire.

Discussion et perspectives

Ma thèse s'inscrit dans la suite d'un projet ayant mené à la caractérisation du STA de type I sprG1/SprF1, exprimé par la bactérie pathogène S. aureus (Pinel-Marie et al., 2014). Ce nouveau STA est encodé dans l'îlot de pathogénie ØN315 comportant des gènes de facteurs de virulence comme le gène sak encodant la staphylokinase et le gène sep encodant une entérotoxine (Pichon & Felden, 2005). Le STA sprG1/SprF1 n'est pas le seul STA de type I exprimé par S. aureus puisque parmi les ARN Spr, les ARN chevauchants sprA1 et SprA1_{AS} ont également été démontrés comme appartenant à un STA de type I (Sayed et al., 2011). Les STA de type I sont fréquemment retrouvés en plusieurs copies dans les génomes bactériens (Fozo et al., 2010; Sharma et al., 2010) et c'est notamment le cas pour sprA/SprAAS qui présente deux copies fonctionnelles dans la souche Newman de S. aureus (Germain-Amiot et al., 2019). D'autres copies des gènes sprG et sprF ont été identifiées par des outils bioinformatiques (Pinel-Marie et al., 2014). Ces copies sont conservées parmi tous les génomes séquencés de S. aureus et appartiennent au core génome de ce pathogène. Ainsi, la présence ou l'absence de l'îlot de pathogénie Φ N315, et donc de *sprG1*/SprF1, est la différence majeure observée quant à la conservation des ARN sprG et SprF dans les génomes des souches de S. aureus. Mon travail de thèse a consisté dans un premier temps en l'identification puis la caractérisation de nouveaux STA de type I chez le pathogène S. aureus.

Les locus sprG2/sprF2 et sprG3/sprF3 expriment des STA de type I fonctionnels.

L'identification de nouveaux STA, quel que soit le type, est souvent basée sur des analyses bio-informatiques mettant en avant la présence d'homologies de séquences nucléotidiques ou peptidiques avec des STA connus. Cette identification peut être facilitée par des bases de données permettant de comparer des séquences d'intérêt aux STA connus chez un grand nombre de bactéries. Certaines bases de données, comme RASTA-bacteria (Rapid Automated Scan for Toxins and Antitoxins in Bacteria) et TADB2 (Toxin-Antitoxin DataBase 2.0), sont plutôt consacrées aux STA de type II (Sevin & Barloy-Hubley, 2007 ; Xie *et al.*, 2018). Très récemment, le développement d'une base de données ambitieuse permettant l'identification bio-informatique de STA appartenant à tous les types a été initiée. Elle est d'ores et déjà disponible pour les TA de type I à IV (Akarsu *et al.*, 2019).

Concernant les copies de sprG1 et SprF1 présentes dans le core génome, l'organisation génomique et les identités de séquences des ARN et des peptides putatifs avec le couple sprG1/SprF1 suggéraient que ces trois copies codaient pour des STA de type I. Les identités de séquences déterminées entre les différents gènes sprG et sprF révèlent que seuls sprF2 et sprF4

peuvent être considérés comme de vraies copies, avec une identité de séquences de 93 %. L'analyse de l'expression des homologues de *sprG1* et SprF1 par la technique de Northern blot a démontré que *sprG2*, SprF2, *sprG3*, SprF3 et SprF4 sont exprimés au cours de la croissance de la souche HG003 de *S. aureus*, contrairement à *sprG4*. L'absence d'expression de *sprG4* chez *S. aureus* HG003 semble être une particularité de cette souche, puisque *sprG4* est exprimé chez les souches N315, COL et Newman (Pinel-Marie *et al.*, 2014). L'analyse de la demi-vie des homologues exprimés de *sprG1* et SprF1 a mis en évidence que *sprG2* et *sprG3* sont des ARN stables contrairement à SprF2, SprF3 et SprF4 qui sont instables. *sprG2* et *sprG3* encodent un peptide dont la surexpression est toxique pour *S. aureus*. Les ARN antisens SprF2 et SprF3 sont capables de neutraliser cette toxicité. Ces résultats nous ont permis d'identifier deux nouveaux STA de type I exprimés par *S. aureus*, en plus des STA *sprG1*/SprF1, *sprA1*/SprA1_{AS} et *sprA2*/SprA2_{AS} (Pinel-Marie *et al.*, 2014 ; Sayed *et al.*, 2011 ; Germain-Amiot *et al.*, 2019).

Le couple *sprG4*/SprF4 code lui aussi pour un STA mais dans la souche HG003 de *S. aureus*, l'absence de promoteur devant le gène *sprG4* explique qu'il ne soit pas exprimé, contrairement à l'antitoxine SprF4. Une telle situation est aussi retrouvée pour les STA *hok*/Sok présents en multiples copies dans les génomes de *E. coli*. Dans le cas des copies *hokE*/SokE et *hokX*/SokX, seule l'expression des antitoxines SokE et SokX a été démontrée par Northern blot alors que les gènes des toxines *hokE* et *hokX* ne semblent pas exprimés chez la souche MG1655 d'*E. coli* (Kawano *et al.*, 2005). De plus, l'absence de promoteur excluant l'expression de l'un des partenaires du STA putatif est aussi observée pour le couple d'ARN *aapA2*/IsoA2 chez H. *pylori* où le gène de la toxine *aapA2* n'est pas exprimé contrairement à l'antitoxine IsoA2 (Arnion *et al.*, 2017).

Notre étude a démontré qu'il reste encore des STA à identifier dans les génomes de *S. aureus*. Une analyse à large échelle du génome de la souche MW2 de *S. aureus* prédit la présence dans son génome de 67 STA appartenant à différentes familles, dont 7 nouveaux STA de type I (Habib *et al.*, 2018). Chez certaines espèces bactériennes, une relation semble exister entre le nombre de STA présents dans le génome et la pathogénicité. En effet, chez les mycobactéries, certains STA sont conservés dans les génomes des espèces pathogènes, dont *M. tuberculosis*, mais sont absents des génomes de mycobactéries environnementales ou d'espèces non pathogènes comme *Mycobacterium smegmatis* qui ne possède que deux STA. Ces observations suggèrent une implication des STA dans la pathogénicité de *M. tuberculosis* (Ramage *et al.*, 2009 ; Frampton *et al.*, 2012). Il serait intéressant d'étudier la relation entre les 6 STA de type I identifiés au laboratoire et le caractère pathogène de *S. aureus*.

Les peptides encodés par *sprG2* et *sprG3* sont bactériostatiques pour *S. aureus* en condition de surexpression contrairement aux deux peptides encodés par *sprG1*.

En remplaçant les codons d'initiation de la traduction des peptides encodés par *sprG2* et *sprG3*, nous avons démontré que la toxicité induite par leur surexpression était liée à la production d'un peptide toxique. Nous avons montré que le peptide encodé par *sprG2* était traduit au cours de la croissance de *S. aureus*, mais nous n'avons pas réussi à mettre en évidence la traduction du peptide encodé par *sprG3*. Il est possible que l'étiquette 3xFLAG que nous avons utilisé bloque l'ARNm *sprG3* dans une structure secondaire très compacte empêchant sa traduction. Nous pourrions envisager d'utiliser un autre type d'étiquette comme une étiquette 6-Histidine ou 3-Hémagglutinine (3HA). Une autre hypothèse que nous pouvons envisager est la dégradation du peptide SprG3-flaggé par des protéases, et en particulier la protéase ClpP, essentielle à la dégradation des antitoxines de type II MazE, Axe1 (YefM-_{SA1}) et Axe2 (YefM-_{SA2}) (Donegan *et al.*, 2010). Cela n'a pas été reporté pour les toxines de type I et de type II chez *S. aureus* mais nous pourrions étudier la production du peptide SprG3-flaggé dans une souche délétée du gène codant la protéase *clpP* afin de tester l'hypothèse de la dégradation du peptide encodé par *sprG3* chez *S. aureus*.

Ce résultat peut aussi être dû au fait que l'ARNm sprG3 ait besoin d'une étape de maturation pour que celui-ci soit traductible. Les ARNm des toxines de type I AapA1 et Hok nécessitent notamment un clivage au niveau de leur extrémité 3'-UTR, et l'ARNm de la toxine DinQ un clivage au niveau de son extrémité 5'-UTR. Ces clivages permettent des réarrangements structuraux des ARNm et l'accès des ribosomes (Arnion et al., 2017 ; Franch et al., 1997; Kristiansen et al., 2016). De plus, pour certaines toxines de type I, le clivage de l'ARNm ne suffit pas à ce que celui-ci soit traductible car la séquence SD est toujours inaccessible, bloquée par une séquence anti-SD. Ainsi pour les ARNm des toxines tisB et zorO (STA tisB/IstR1 et zorO/OrzO respectivement), leur traduction est permise grâce à une région simple brin formée à la suite d'une première étape de maturation par clivage et servant de site de standby permettant le chargement de la sous-unité 30S du ribosome (Darfeuille et al., 2007; Wen et al., 2017). La structure secondaire de l'ARNm sprG3 prédite avec l'outil Mfold (Zuker, 2003) semble indiquer que l'ARNm sprG3 possèderait une structure presque circulaire, avec 7 tiges-boucles. A la fois la séquence SD et le codon d'initiation de la traduction seraient inaccessibles, séquestrés dans une structure en tige-boucle (Figure 39). Cette prédiction de la structure secondaire de *sprG3* suggère que des étapes de maturation soient nécessaires pour la traductibilité de la toxine SprG3 chez la bactérie. Déterminer la structure secondaire de l'ARNm

sprG3 en solution par probing à l'aide notamment de la nucléase S1 clivant l'ARN simple brin et de la RNase V1 clivant les structures tiges-boucles permettrait de mieux comprendre les réarrangements structuraux nécessaires à la traduction de la toxine SprG3 *in vivo*. Nous pourrons par ailleurs poursuivre cette analyse en identifiant les RNases impliquées *in vivo* dans les clivages permettant la maturation de l'ARNm *sprG3* en sa forme traductible.



Figure 39. Structure secondaire de *sprG3* déterminée avec l'outil Mfold. La séquence SD est matérialisée par un crochet bleu le codon d'initiation de la traduction est indiqué par un crochet vert et le codon STOP du peptide encodé par sprG3 est indiqué par un trait gris.

La localisation des toxines des STA de type I peut être cytoplasmique ou membranaire. Il n'existe à ce jour que deux exemples de toxines de type I cytoplasmiques, qui se caractérisent par une action RNase pour SymE et DNase pour RalR. La majorité des toxines de type I sont des petits peptides hydrophobes, à localisation membranaire dont le mode d'action est la formation de pores ou la condensation du nucléoïde (Brielle *et al.*, 2016). Chez *S. aureus*, les toxines SprA1 et les deux peptides encodés par *sprG1* (respectivement 31 et 44 résidus d'acides aminés) sont des petits peptides hydrophobes et bactéricides, majoritairement localisés à la membrane bactérienne (Sayed *et al.*, 2012 ; Pinel-Marie *et al.*, 2014). L'étude du mécanisme

d'action de la toxine SprA1 a démontré que celle-ci possède une structure hélicoïdale et exerce sa toxicité en s'accumulant à la membrane bactérienne qu'elle perméabilise (Sayed *et al.*, 2012). Pendant mon travail de thèse, nous avons démontré que la toxine SprG2 est majoritairement localisée à la membrane plasmique, conformément aux autres toxines de type I exprimées par *S. aureus*. Les alignements des séquences peptidiques des peptides encodés par *sprG2*, *sprG3* avec les peptides encodés par *sprG1* indiquent que SprG2 et SprG3 seraient également des peptides hydrophobes. De plus, la conservation de certains résidus d'acides aminés cationiques parmi les toxines SprG suggère que ceux-ci sont importants pour leur mécanisme d'action par formation de pores ou par condensation du nucléoïde.

Certaines toxines de type I exprimées par *S. aureus* présentent des propriétés hémolytiques et cytolytiques vis-à-vis de bactéries compétitrices. Les deux peptides encodés par *sprG1* sont capables de lyser les érythrocytes et les bactéries Gram positive tous les deux mais de manière inégale car le peptide court possède une plus grande activité antibactérienne et le peptide long est plus hémolytique (Pinel-Marie *et al.*, 2014). Pour les toxines SprA1 et SprA2, SprA2 semble surtout cytotoxique, même à l'égard des cellules de l'hôte comme les érythrocytes, alors que SprA1 présente une plus grande activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries Gram positive et Gram négative (Sayed *et al.*, 2012 ; Solecki *et al.*, 2015 ; Germain-Amiot *et al.*, 2019).

Lors de l'analyse de la viabilité cellulaire par microscopie à fluorescence en condition de surexpression des toxines, nous avons montré que les peptides encodés par sprG2 et sprG3 induisaient une stase bactérienne au bout d'1 h d'induction de leur expression. Ce résultat suggère que ceux-ci seraient moins toxiques que SprG1, SprA1 et SprA2 qui induisent la mort de S. aureus, et possèderaient un mode d'action et une fonction biologique différents. Des expériences supplémentaires doivent être menées afin de vérifier si la stase de S. aureus induite par les toxines SprG2 et SprG3 est durable et si l'arrêt de l'induction de l'expression de ces toxines permet à S. aureus de reprendre sa croissance. De plus, ces expériences étant menées en conditions de surexpression des toxines, il est possible que l'action bactéricide des toxines des STA soit « dose-dépendante ». Verstraeten et al. ont démontré que des concentrations différentes de la toxine HokB induisaient soit la stase soit la mort d'E. coli, suggérant que les effets des toxines observés en condition artificielle de surexpression ne soient pas représentatifs de l'effet produit chez une souche sauvage (Verstraeten et al., 2015). SprG2 et SprG3 ne seraient pas les seules toxines bactériostatiques de S. aureus puisque la surexpression de la toxine de type II MazF induit également la stase de ce pathogène. MazF est une RNase qui clive de manière spécifique les ARNm au niveau de séquences riches en uracile. Cependant, une étude a démontré que son action était sélective puisque certains ARNm clivés par MazF in vitro ne l'étaient pas *in vivo*, suggérant l'existence d'un mécanisme de protection qui expliquerait que cette toxine ne soit pas bactéricide (Fu *et al.*, 2009).

L'analyse de la capacité des peptides encodés par sprG2 et sprG3 à lyser les bactéries compétitrices ou les cellules de l'hôte peut être menée afin de mieux caractériser ces toxines. De plus, la détermination de leur structure tridimensionnelle et de leur mode d'action pourrait être une piste permettant d'orienter les recherches de leur fonction biologique. Pour rechercher le mode d'action de ces peptides, ainsi que des peptides encodés par sprG1, nous pourrons réaliser des tests de perméabilité membranaire selon la méthodologie déterminée par Solecki *et al.* en utilisant une souche déficiente en lactose perméase (Solecki *et al.*, 2015). L'utilisation de la microscopie électronique ou à fluorescence est aussi envisagée pour détecter la présence de dommages membranaires putatifs liés à la surproduction de ces peptides toxiques et hydrophobes.

L'expression des toxines encodées par sprG2 et sprG3 est régulée au niveau ARN.

Nous avons démontré que la surexpression des toxines SprG2 et SprG3 est toxique pour *S. aureus*. L'expression des gènes dont le produit est toxique pour l'organisme qui les produit doit être fortement régulée. Pour de nombreux STA de type I, l'ARNm de la toxine possède une structure secondaire complexe qui via la présence d'une séquence anti-SD, forme une structure en tige-boucle emprisonnant la SD et inhibant ainsi la traduction (Masachis & Darfeuille, 2018). C'est le cas pour l'ARNm *sprA1* où la séquence SD est emprisonnée dans un pseudo-nœud empêchant la fixation des ribosomes et donc la traduction de la toxine (Sayed *et al.*, 2011). Les prédictions de structure des ARNm *sprG1*, *sprG2* et *sprG3* suggèrent qu'ils obéissent eux aussi à ce premier niveau de régulation de leur expression (Figures 39 et 40).

Lors des expériences de traduction *in vitro*, nous avons observé que les peptides encodés par *sprG2* et *sprG3* étaient moins traduits que les peptides encodés par *sprG1*. Pour la toxine SprG2, le codon d'initiation de la traduction est un codon non canonique GUG ce qui pourrait diminuer l'affinité de l'ARNt^{fmet} et réduire la traduction de *sprG2*. Cela a déjà été démontré pour l'ARNm de la toxine YonT du STA *yonT*/SR6 de *B. subtilis* qui ne possède pas de structure séquestrant la SD mais un codon d'initiation de la traduction non canonique GUG, comme *sprG2* (Reif *et al.*, 2018). Là encore, déterminer la structure secondaire des ARN *sprG1*, *sprG2* et *sprG3* en solution par probing permettra de mieux comprendre la maturation de ces ARN et les mécanismes permettant à la bactérie de limiter l'expression de ces toxines.

En conditions normales de croissance, l'expression des toxines SprG2 et SprG3 est inhibée par leur antitoxine respective SprF2 et SprF3. SprF2 et SprF3 interagissent en cis avec les ARNm sprG2 et sprG3, par appariement de bases au niveau de la région chevauchante en 3' de chacun des ARN. Ainsi, les antitoxines SprF2 et SprF3 interagissent avec l'ARNm de leur toxine respective de manière similaire à l'antitoxine SprF1 (Pinel-Marie et al., 2014). L'expression des toxines de type I est régulée par l'antitoxine via différents mécanismes comprenant l'inhibition de la traduction, la promotion de la dégradation de l'ARNm de la toxine par des RNases, ou les deux mécanismes (Brantl & Jahn, 2015). Deux exemples d'antitoxines de type I encodées en cis mais agissant en trans ont été reportés chez S. aureus. Il s'agit des antitoxines SprA1_{AS} et SprA2_{AS} qui inhibent la traduction de leur antitoxine respective en se fixant au niveau de la séquence SD qui n'appartient pas à leur région de complémentarité (Sayed et al., 2011 ; Germain-Amiot et al., 2019). Pour les antitoxines permettant le recrutement de RNases, un clivage par la RNase III spécifique des ARN duplex a été démontré pour les STA aapA1/IsoA1, hok/Sok et tisB/IstR1 (Masachis & Darfeuille, 2018). Cependant, ce n'est pas la seule RNase impliquée dans ce mode de régulation qui peut aussi employer les RNases J1/J2 et la RNase Y. Les RNases impliquées peuvent également varier selon l'environnement de la bactérie. En effet, Müller et al. ont démontré que la RNase J1 était la principale RNase engagée dans la dégradation des ARN bsrE et SR5, sauf lors d'un stress éthanol où c'est alors la RNase Y qui assure cette fonction (Müller et al., 2016). Certaines antitoxines de type I, telle SR4 du STA bsrG/SR4 de B. subtilis, régulent l'expression de leur toxine en inhibant leur traduction et en ciblant leur dégradation (Jahn & Brantl, 2013). L'antitoxine SprF1 agit également par les deux mécanismes (Pinel-Marie et al., 2014). Dans le cas des STA sprG2/SprF2 et sprG3/SprF3, notre première hypothèse est que les antitoxines SprF2 et SprF3 pourraient réguler l'expression de leur ARNm cible par inhibition de la transcription. Contrairement aux antitoxines de type II qui répriment l'expression de l'opéron encodant le STA par fixation au niveau de la séquence promotrice (Lobato-Marquez et al., 2016), cela n'a jamais été démontré dans le cas des antitoxines de type I. L'autre hypothèse est que les antitoxines SprF, en se fixant sur leur ARNm sprG cible, favorisent la dégradation de l'ARNm sprG ou du duplex sprG/SprF par des RNases comme la RNase III. Il serait intéressant d'étudier la demi-vie des ARNm des toxines sprG2 et sprG3 en condition de surexpression des antitoxines SprF2 et SprF3, et inversement. Cela a été fait par Germain-Amiot et al. au sujet du STA de type I sprA2/SprA2AS de S. aureus et en condition de surexpression de sprA2, une diminution de la stabilité de l'antitoxine SprA2_{AS} a été observée (Germain-Amiot et al., 2019). De plus, il parait important d'étudier par probing la structure des ARN sprG et SprF lorsqu'ils sont sous forme de complexe, afin d'identifier les réarrangements structuraux provoqués par la fixation d'une antitoxine SprF sur l'ARNm de sa toxine *sprG*. Par la technique de toeprint en présence d'antitoxine, nous pouvons également tester si l'ajout de l'ARN SprF diminue la fixation des ribosomes sur les ARNm *sprG2* et *sprG3*, comme cela a été démontré pour le couple *sprA2*/SprA2_{AS} (Germain-Amiot *et al.*, 2019). Enfin, analyser l'expression des ARN *sprG* et SprF dans des souches de *S. aureus* délétée pour la RNase III, les RNases J1/J2, la RNase Y et de plusieurs RNases (si possible) pourrait permettre d'identifier si une ou plusieurs RNases sont impliquées dans la régulation de l'expression des toxines *sprG* par les antitoxines SprF. Dans une souche de *S. aureus* délétée pour le gène encodant la RNase III, une diminution du niveau d'ARN de SprF1 est observée, alors que le niveau d'ARN de *sprG1* est constant, suggérant que la RNase III agit sur la stabilité de l'antitoxine SprF1. Il serait aussi intéressant d'utiliser ces souches délétées de RNase pour analyser l'expression des ARN *sprG* et SprF dans des conditions de stress et notamment si une diminution de la stabilité des ARN SprF peut conduire à la production des peptides encodés par les gènes *sprG* dans ces conditions.

Des interactions croisées existent entre les STA sprG/SprF.

Puisque les STA sprG/SprF sont des STA de type I homologues, une attention particulière a été donnée à l'étude des interactions croisées entre ces différents systèmes. Les interactions croisées peuvent intervenir à deux niveaux. Le premier niveau est celui du contrôle de la toxicité des toxines, qui sont alors neutralisées par une antitoxine appartenant à un autre STA. Le second niveau est le contrôle de l'expression des toxines ou antitoxines, qui chez les STA de type I, s'effectue au niveau ARN. Les STA de types I sont souvent en plusieurs copies dans les génomes bactériens, mais ils semblent présenter une certaine spécificité dans le contrôle de la toxicité. Ainsi il n'y a pas d'interaction croisée impactant la neutralisation des toxines entre les deux copies du STA sprA/SprAAS chez S. aureus Newman, ni entre les deux copies du STA zor/Orz présentes chez E. coli, ni entre les STA aapA1/IsoA1 et aapA3/IsoA3 d'H. pylori (Germain-Amiot et al., 2019 : Wen et al., 2014 ; Arnion et al., 2017). Deux cas d'interactions croisées impactant le contrôle de la toxicité semblent exister pour les STA de type I, entre l'ARNm de la toxine ibsA et l'antitoxine SibE, parmi les cinq copies du STA ibs/Sib chez E. coli et entre l'ARNm de la toxine putative yoyJ et l'antitoxine SR6 chez B. subtilis. Une des zones essentielles au contrôle de l'expression de ibsA est identique entre les antitoxines SibA et SibE et il a été démontré que la délétion du gène codant l'antitoxine SibA n'était pas létale dans une souche exprimant ibsA (Fozo et al., 2008; Han et al., 2010). Chez B. subtilis, l'antitoxine SR6 et le gène de la toxine *yoyJ* sont chevauchants et la région chevauchante recoupe notamment la séquence RBS de *yoyJ* suggérant que par sa fixation au niveau de cette séquence, SR6 peut contrôler la production de la toxine YoyJ (Reif *et al.*, 2018). Concernant les STA homologues *sprG*/SprF, nous avons identifié *in vitro* des interactions croisées entre les paires *sprG2*/SprF4 et *sprG3*/SprF1 mais nous avons démontré que SprF4 et SprF1 sont incapables de neutraliser les toxines SprG2 et SprG3 respectivement, en condition de surexpression. *sprF2* et *sprF4* possédant 93 % d'identité de séquences (54 % entre *sprF1* et *sprF3*), nous nous attendions à une possible interaction croisée permettant à SprF4 de neutraliser *sprG2*. Avec l'outil IntaRNA (Busch *et al.*, 2008), nous avions prédit une interaction englobant 15 nucléotides entre *sprG2* et SprF4, interaction démontrée par gel retard, mais qui ne semble pas suffisante pour neutraliser la toxicité du peptide encodé par *sprG2* en condition de surexpression (**Figure 40**).



Figure 40. Représentation schématique de la structure secondaire de *sprG2* et des interactions entre *sprG2* et les antitoxines SprF2 et SprF4.

Mfold a été utilisé pour modéliser la structure secondaire de sprG2. La séquence SD est matérialisée par un crochet bleu le codon d'initiation de la traduction est indiqué par un crochet vert et le codon STOP du peptide encodé par sprG2 est indiqué par un trait gris. Les flèches rouge et orange matérialisent la zone d'interaction avec SprF2 et SprF4. Les prédictions d'interactions ont été effectuées avec l'outil bio-informatique IntaRNA.

La spécificité des systèmes *zorO*/OrzO et *zorP*/OrzP a été étudiée par Wen *et al.* car une zone de complémentarité avait été mise en évidence entre l'antitoxine OrzP et l'ARNm de la toxine *zorO*. Il s'est avéré que le contrôle de la toxicité était spécifique à chaque système, sauf en cas de mutation de l'ARN OrzP au niveau d'une région de trois nucléotides appartenant à la zone d'interaction avec *zorO*, rendant possible un cross-talk entre une antitoxine OrzP mutée et l'ARNm *zorO* (Wen *et al.*, 2014). Avec une souche de surexpression de SprF4, nous avons observé par Northern blot une diminution du niveau de l'ARNm de la toxine *sprG2*. Il serait donc intéressant d'étudier si SprF4 parvient à neutraliser la toxicité de SprG2 dans une souche délétée du locus *sprG2/sprF2* et également voir si l'antitoxine SprF4 peut inhiber la traduction du peptide SprG2-flaggé. Nous pourrions aussi envisager de muter la séquence de SprF4 afin de la rapprocher de celle de SprF2 et ainsi identifier les nucléotides permettant la spécificité de *sprG2*/SprF2.

Un autre type d'interactions peut exister entre STA, il s'agit des interactions croisées influençant la régulation des toxines ou antitoxines. Ces régulations croisées ont surtout été étudiées chez les STA de type II et incluent même des interactions avec des STA appartenant à des types différents comme entre le STA de type II MqsR/MqsA et le STA de type V GhoT/GhoS chez *E. coli* et entre le STA de type I *txpA*/RatA et le STA de type II MazEF chez *E. faecalis* (Wang *et al.*, 2013 ; Wessner *et al.*, 2015). Chez *E. faecalis*, le fait que les STA *txpA*/RatA et MazEF soient dans la même région intergénique, comme *sprG2* et SprF4, a peut-être encouragé la régulation croisée de ces deux STA au cours de l'évolution de la bactérie. Dans ce locus, non seulement l'antitoxine MazE réprime l'expression de l'opéron *mazEF* assurant son auto-régulation mais elle active aussi la transcription de l'antitoxine RatA (Wessner *et al.*, 2015). Par exemple, chez le pathogène *M. tuberculosis* possédant un grand nombre de STA de la famille VapBC, des régulations croisées ont été mises en évidence. Une étude a démontré que la surexpression des toxines VapC3, 11, 20, 22, 27 et 33 provoquait une augmentation du niveau d'ARNm de *vapC15*, indiquant une la présence d'une régulation croisée (Agarwal *et al.*, 2018).

Pour les STA *sprG*/SprF de *S. aureus*, nous n'avons pas observé de cross-talk mais en revanche, nous reportons des régulations croisées au sein d'une famille de STA homologues. Grâce à des souches de surexpression, nous avons pu observer une diminution du niveau d'ARN de *sprG2* et *sprG3* lorsque SprF1 est surexprimé et une diminution du niveau des ARNm de *sprG1* et *sprG2* dans une souche de surexpression de SprF4. La surexpression de *sprG2* entraîne une diminution du niveau d'ARN des antitoxines SprF et une augmentation du niveau d'ARN

de la toxine *sprG1*. Cela suggère que des interactions peuvent avoir lieu entre ARN *sprG* et SprF n'appartenant pas au même couple. Nous avons démontré que pendant la phase stationnaire de croissance, l'ARNm *sprG3* est 3 fois plus présent que l'antitoxine SprF3. Une hypothèse serait que pendant cette phase de croissance, SprF1, dont l'expression est constitutive au cours de la croissance de *S. aureus* (Pinel-Marie *et al.*, 2014), puisse également s'apparier avec l'ARNm de *sprG3* afin d'en moduler la quantité présente dans la cellule.

L'expression des ARN sprG et SprF est modulée par des stress environnementaux.

L'adaptation aux stress rencontrés par la bactérie est l'une des fonctions attribuées aux STA de type I. L'influence des stress environnementaux sur les STA de type I peut être étudiée à deux niveaux : sur l'expression des ARN et la traduction des toxines. Ainsi, une augmentation de la production d'une toxine en condition de stress peut être liée à une chute de l'expression de l'antitoxine. Les exemples de stress influençant l'expression des STA de type I sont nombreux. Chez B. subtilis, une diminution du niveau d'ARN de l'antitoxine SR5 a été mise en évidence lors de l'exposition des bactéries à un pH alcalin, à une limitation de la disponibilité en oxygène et en fer, suggérant que bsrE/SR5 permettrait l'adaptation de B. subtilis dans ces conditions (Müller et al., 2016). De même, il a été démontré qu'une carence en fer et un stress oxydatif diminuaient uniquement le niveau d'ARN de l'antitoxine SR6, suggérant une activation du STA yonT/SR6 en réponse à ces stress (Reif et al., 2018). Chez S. aureus, Sayed et al. ont démontré une augmentation de la traduction de la toxine SprA1 lors d'un stress acide et d'un stress oxydant, en réponse à une diminution du niveau d'ARN de l'antitoxine SprA1AS (Sayed et al., 2012). Pour la copie sprA2/SprA2AS, une diminution significative du niveau d'antitoxine SprA2_{AS} a été établie pendant un stress hyperosmotique et une carence nutritive (Germain-Amiot et al., 2019) laissant suggérer une possible augmentation de la production de toxine SprA2 dans ces conditions.

Pour les STA *sprG*/SprF, nous avons démontré par Northern blot que l'expression des ARN *sprG* et SprF variaient en présence des stress hyperosmotique et oxydant avec notamment une diminution significative du niveau d'expression de toutes les antitoxines SprF lors d'un stress oxydant provoqué par l'ajout d'H₂O₂ à la concentration de 10 mM. Cependant, une analyse par RT-qPCR de l'expression des ARN *sprG* et SprF au cours de la phagocytose de *S. aureus* a montré que seul le STA *sprG1*/SprF1 était affecté par l'environnement du phagolysosome. Malgré la diminution du niveau d'expression de l'antitoxine SprF2, nous n'avons pas observé d'augmentation significative de la production de peptide SprG2-flaggé lors

des stress hyperosmotique et oxydant. Il est possible que l'étiquette FLAG utilisée lors de nos expériences puisse apporter un biais à nos résultats.

Concernant les cinétiques de croissance en présence de stress environnementaux, nous n'avons pas mis en évidence de phénotype associé à la délétion des locus sprG/sprF au cours des stress oxydant, hyperosmotique et d'un stress thermique froid. Au cours d'un stress thermique chaud à 42 °C, nous observons que la quantité de biomasse formée est moins importante chez toutes les souches délétées que pour la souche HG003 sauvage. Il faudrait analyser le niveau de production du peptide SprG2-flag lors du stress à 42 °C et étudier la cinétique de croissance des souches de complémentation des STA sprG/SprF lors de ce stress thermique. De plus, nous souhaitons effectuer de nouvelles cinétiques de croissance en conditions de stress hyperosmotique, oxydant, acide et nutritif avec des bactéries cultivées dans des erlenmeyers comme cela a été fait pour les stress thermiques. En effet, les cinétiques en microplaques ne semblent pas adaptées pour étudier l'impact de stress environnementaux sur la croissance de S. aureus. De plus, nous souhaitons aussi réaliser des cinétiques de croissance en condition de stress des souches HG003 de S. aureus avec le plasmide pCN35 et avec le plasmide pCN35ΩsprG2-FLAG puisque dans le cas du STA sprG1/SprF1, il a été démontré qu'une souche surexprimant sprG1-flaggé avait un retard de croissance significatif lors de la carence nutritive (résultats non publiés).

Recherche du rôle putatif des STA sprG/SprF dans l'adaptation de S. aureus aux antibiotiques.

Il est souvent difficile d'attribuer un phénotype aux STA chromosomiques, à cause de leur abondance dans les génomes bactériens. De plus, la possibilité de plusieurs STA participant à une même fonction biologique fait qu'un mutant pour un STA unique ne possède souvent pas de phénotype particulier. La délétion de plusieurs STA semble donc incontournable afin d'identifier leur fonction avec précision.

Le STA *ralR*/RalA d'*E. coli* est le seul STA de type I chromosomique impliqué dans la résistance aux antibiotiques. La délétion du système entier ou du gène de la toxine *ralR* augmente la sensibilité d'*E. coli* à la fosfomycine, suggérant une implication de cette toxine de type I dans la résistance à cet antibiotique (Guo *et al.*, 2014). Notre étude de l'implication des STA *sprG*/SprF dans l'adaptation de *S. aureus* aux antibiotiques a débuté avec la résistance aux antibiotiques, en choisissant un antibiotique ciblant la réplication de l'ADN (la ciprofloxacine) et trois antibiotiques ciblant la biosynthèse de la paroi (la vancomycine, la céfazoline et la

cloxacilline). Nous n'avons pas mis en évidence de différence de CMI entre la souche HG003 sauvage et les différents mutants de délétion des STA *sprG*/SprF, indiquant que les STA *sprG*/SprF ne participent pas à la résistance de *S. aureus* à ces antibiotiques.

Nous sommes ensuite passés à l'étude de la formation de bactéries tolérantes et persistantes aux antibiotiques puisque l'implication dans ce phénomène de certains STA, et notamment de type I, a été décrite. Conlon et al. ont mis en évidence que les STA de type II de S. aureus ne permettaient pas la formation de bactéries persistantes puisqu'un mutant de délétion de ces STA avait la même capacité à former des « persisters » qu'une souche sauvage (Conlon et al., 2016). Cependant, l'implication des toxines de type I TisB et HokB dans ce phénomène a été mise en évidence dans la persistance aux antibiotiques chez E. coli (Dörr et al., 2010 ; Gurnev et al., 2012 ; Verstraeten et al., 2015). L'effet bactériostatique des toxines SprG2 et SprG3 pourrait suggérer leur implication dans ce phénotype. Nous avons effectué des expériences de survie des souches HG003 sauvage et délétées pour les STA sprG/SprF après exposition des bactéries à une dose supérieure à la CMI de ciprofloxacine, céfazoline ou vancomycine. Nous avons effectué ces expériences à partir de cultures en phase stationnaire et exponentielle de croissance, dans le but d'étudier l'implication de nos STA dans la tolérance et la persistance de S. aureus aux antibiotiques. Les expériences sur les cultures en phase stationnaire de croissance ne nous ont pas permis d'observer des bactéries tolérantes ou persistantes pour chaque antibiotique testé, suggérant que la quantité de bactéries dormantes était alors trop importante pour permettre l'action des antibiotiques. En revanche, lors de nos expériences en phase exponentielle de croissance, nous avons pu observer la présence de courbe de survie biphasiques caractéristiques de la sous-population de bactéries persistantes. La céfazoline est le seul antibiotique pour lequel nous avons montré une réelle différence de survie entre les souches HG003 sauvage et délétées des STA sprG/SprF. Cependant, l'impossibilité de déterminer alors le paramètre MDK99,99 représentatif de la persistance nous suggère qu'il s'agit d'un phénomène de tolérance. La courbe biphasique obtenue avec la souche HG003 de S. aureus exposée à une dose de céfazoline de concentration 20 fois supérieure à la CMI peut aussi être le fruit de l'émergence d'un mutant résistant à la céfazoline (Balaban et al., 2019). Des études supplémentaires sont nécessaires pour discriminer entre tolérance/persistance et résistance à la ciprofloxacine et la céfazoline, et pour approfondir l'étude du rôle exercé par l'ensemble des STA sprG/SprF dans l'adaptation de S. aureus aux antibiotiques. Ces expériences devront être menées avec la souche de délétion de tous les STA sprG/SprF, ainsi que les souches de complémentation.

En revanche, notre étude avec la souche N315 de S. aureus présente un résultat atypique car c'est l'antitoxine SprF1 qui semble impliquée dans l'entrée en persistance de S. aureus, et non la toxine SprG1. Par sa capacité à s'associer aux ribosomes actifs, SprF1 atténuerait la traduction globale de S. aureus. Nous avons démontré qu'un mutant de délétion du STA sprG1/SprF1 chez la souche N315 de S. aureus forme moins de bactéries persistantes que la souche sauvage lors d'une exposition à une forte dose de ciprofloxacine et de vancomycine, ainsi que la surexpression de SprF1 permet presque le retour au nombre de « persister » formés par la souche sauvage. Cependant, afin de valider le phénotype, nous devons confirmer que les courbes biphasiques obtenues sont bien représentatives de bactéries persistantes et non de bactéries résistantes. Pour éliminer l'hypothèse d'un phénotype lié à un mutant résistant, les bactéries survivantes doivent être soumises à nouveau à la même dose d'antibiotique. Si les courbes de survie obtenues pour chaque souche sont identiques à celle obtenues lors de la première exposition à l'antibiotique, nous pourrons alors envisager que le phénotype identifié correspond à la formation de bactéries persistantes aux antibiotiques. En cas d'une meilleure survie provoquée par l'émergence d'une résistance lors de l'expérience numéro 1, les courbes de survie obtenues lors de la seconde exposition à l'antibiotique montrerait alors une proportion de bactéries tuées moins importante en comparaison de celles de l'expérience 1 (Balaban et al., 2019). Ces expériences de validation sont d'autant plus importantes car nous avons choisi d'utiliser la vancomycine, antibiotique très fréquemment utilisé en clinique et notamment contre les souches SARM, mais pour lequel le phénomène d'hétéro-résistance est déjà connu (Howden et al., 2014). Afin de limiter la résistance hétérogène, il est conseillé d'utiliser des doses d'antibiotiques de concentration nettement supérieure à la CMI (Balaban et al., 2019), ce que nous avons fait en utilisant une dose de vancomycine de concentration 40 fois supérieure à la CMI. Le dernier point que nous n'avons pas étudié est la capacité de re-croissance des « persisters » ainsi formés après le retrait de la ciprofloxacine et de la vancomycine conformément au consensus méthodologique récemment établi (Balaban et al., 2019). De plus, ce consensus conseille l'utilisation des techniques de microfluidique permettant de visualiser le phénotype de persistance au niveau de la cellule bactérienne. Il serait intéressant de développer ces techniques chez S. aureus afin d'apporter de nouveaux arguments dans l'implication des STA *sprG*/SprF dans la persistance aux antibiotiques de *S. aureus*.

Nous souhaitons également développer l'étude de la persistance intracellulaire de *S. aureus* car chez ce pathogène, ce qui pose un problème de santé publique est la présence de bactéries persistantes à l'intérieur des cellules de l'hôte sous forme de SCVs et à l'intérieur des biofilms (Conlon *et al.*, 2014). A présent, l'implication des STA dans la persistance intracellulaire a surtout été étudiée pour les STA de type II. Chez *Salmonella*, l'activation de 14 STA de type II participent à l'entrée en persistance de ce pathogène après leur internalisation par des macrophages humains (Helaine *et al.*, 2014 ; Cheverton *et al.*, 2016 ; Rycroft *et al.*, 2018). Par RT-qPCR, nous avons démontré que l'expression du STA *sprG1*/SprF1 diminuait lors de la phagocytose par des macrophages humains. Nous souhaitons maintenant poursuivre les recherches afin de déterminer si la diminution de l'expression du STA *sprG1*/SprF1 et l'absence de variation de l'expression des autres STA pourraient conduire à la formation de SCVs. De plus, nous nous sommes intéressés à l'expression des ARN *sprG* et SprF mais nous pourrions aussi étudier la production des peptides codés par les ARN *sprG* après internalisation par les macrophages. Nous savons que les toxines de type SprG partagent toutes un caractère hydrophobe et que ses propriétés sont retrouvées chez les PSM, facteurs de virulence sécrétés par *S. aureus* pour sortir du phagolysosome. L'analyse de la production des peptides encodés par *sprG1* et *sprG2* par Western blot après internalisation de *S. aureus* par des phagocytes humains sera utilisée afin de vérifier cette hypothèse.

Au cours des expériences d'internalisation, nous avons mis en évidence que la souche HG003 de *S. aureus* délétée pour les 4 STA *sprG*/SprF semble plus internalisée, après 2 h de phagocytose, que la souche sauvage ou que les souches de simple délétion suggérant que tous les STA *sprG*/SprF pourrait participer à l'échappement de *S. aureus* au système immunitaire de l'hôte. Nous souhaitons enfin développer un modèle de persistance intracellulaire de *S. aureus* sur plusieurs jours, en présence de ciprofloxacine ou de vancomycine. Si l'étude de l'implication des STA *sprG*/SprF dans la persistance intracellulaire conclue à des résultats encourageants, nous pourrions poursuivre ces recherches en utilisant un modèle *in vivo* d'infection persistante décrit par Conlon *et al.*, qui consiste en un abcès sous-cutané au niveau de la cuisse de souris (Conlon *et al.*, 2013).

Nous n'avons pas étudié le rôle des STA *sprG*/SprF dans la formation ou la dissémination des biofilms chez *S. aureus*. Chez *B. subtilis*, l'expression de la toxine de type I TxpA et de la toxine de type II YqcG est induite par la carence nutritive rencontrée par les bactéries au cœur du biofilm. Leur activation permet alors d'éliminer les bactéries dont le développement est anormal et de maintenir la symétrie du biofilm de *B. subtilis* (Bloom-Ackermann *et al.*, 2016). Les STA de type II MazEF et YefM-YoeB de *S. aureus* pourrait intervenir dans la formation de biofilm. L'opéron *icaADBC* comporte dans sa séquence 6 sites de clivage spécifique de la toxine MazF et sa délétion conduit à une augmentation de la formation de biofilm chez *S. aureus* suggérant l'implication de cette toxine dans la régulation du biofilm (Kato *et al.*, 2017). Une

autre étude a montré que l'expression de la toxine YoeB était significativement supérieure après 3 h de traitement par 1 µg/mL de céfazoline d'un biofilm préformé sur une prothèse orthopédique, en comparaison de bactéries au mode de vie planctonique (Urish *et al.*, 2016). Nous savons que les PSMs, proches des peptides encodés par les gènes *sprG* par leur hydrophobicité, participent à la dispersion du biofilm. Il serait intéressant d'étudier cette étape du cycle de vie des biofilms dans les souches de délétion et de complémentation des STA *sprG*/SprF. De plus, des résultats préliminaires montrent qu'une carence nutritive active le STA *sprG1*/SprF1 chez la souche N315 de *S. aureus*. Nous pourrions envisager que la carence nutritive rencontrée dans les biofilms puisse conduire à la traduction des peptides encodées par *sprG1* et avoir une fonction biologique dans cet environnement particulier.

L'antitoxine SprF1 est capable de s'associer au ribosome.

L'étude de l'impact de l'antitoxine SprF1 sur la traduction de *S. aureus* a débuté lors d'une collaboration au cours de laquelle l'antitoxine SprF1 a été retrouvée parmi une nouvelle classe d'ARNreg pouvant s'associer aux ribosomes. Chez *S. aureus*, il a été démontré que certaines toxines de type II comme YoeB sont dépendantes de leur association au ribosome pour exercer leur toxicité par clivage des ARNm et inhiber l'initiation de la traduction (Larson & Hergenrother, 2014), mais cela n'a jamais été démontré pour une antitoxine de type I.

Nous avons démontré le caractère non traductible de l'association de SprF1 au ribosome et que celui se fixe de manière préférentielle sur les ribosomes 70S. La technique de cryomicroscopie électronique sera employée pour identifier avec précision la localisation de SprF1 sur les ribosomes 70S. Nous devons ensuite poursuivre l'étude de l'étape de la traduction inhibée par SprF1. Nos résultats semblent indiquer que l'étape ciblée par SprF1 soit l'initiation de la traduction mais nous devons tester si SprF1 ne pourrait pas inhiber également l'étape d'élongation de la traduction ou favoriser la dissociation des ribosomes et la dégradation des protéines et ARN ribosomaux. Cela a été démontré pour la toxine de type II HipA d'*E. coli* qui, lors de la réponse stringente, inhibe la traduction en induisant la dissociation des ribosomes et leur dégradation par la protéase Lon, ainsi que par la RNase I pour les ARN ribosomaux (Cho *et al.*, 2015).

De plus, nous avons montré qu'une séquence riche en purines (A₇GAAAA₁₂) dans la partie 5' de SprF1 parait essentielle à sa fixation aux ribosomes. Afin de confirmer l'implication de l'antitoxine SprF1 dans l'entrée en persistance de *S. aureus* via une atténuation de la traduction globale de la bactérie, nous devons réaliser une souche N315 délétée de *sprG1/sprF1*

et complémentée avec un plasmide de surexpression de SprF1 délétée de la séquence riche en purines. Cette souche sera ensuite utilisée pour reproduire les expériences de survie en présence de ciprofloxacine et de vancomycine afin de valider que le phénotype observé lors des premières expériences dépend bien de l'action de SprF1 sur la traduction. Nous devons ensuite identifier les stress favorisant la fixation de SprF1 au ribosome, et également ceux à l'initiative de son décrochage. Finalement, nous devons étudier si cette capacité de fixation aux ribosomes est aussi conservée pour les autres antitoxines SprF. Les alignements de séquences des gènes *sprF* de la souche HG003 de *S. aureus* indiquent que la séquence riche en purines AGAAAA est absente chez *sprF2* et *sprF4*, alors que chez *sprF3*, la guanine est remplacée par une cytosine (**Figure 41**).



Figure 41. Alignements des séquences nucléotidiques des gènes sprF de la souche HG003 de *S. aureus*, incluant les séquences promotrices.

Les boîtes TATA sont surlignées en vert. Sur la séquence de sprF1, la zone riche en purines impliquée dans la fixation aux ribosomes est surlignée en jaune.

L'antitoxine SprF1 est une antitoxine à doubles fonctions.

Notre étude montre pour la première fois qu'une antitoxine de type I a une double fonction. En effet, nous avons démontré que l'antitoxine SprF1 possède deux fonctions. Par sa région 3', SprF1 est une antitoxine qui régule l'expression de la toxine *sprG1* et par une séquence spécifique de sa région 5', SprF1 est un ARN qui atténue la traduction de *S. aureus* et semble participer à l'entrée en persistance lors d'un stress antibiotique. Dans la littérature, des antitoxines à doubles fonctions ont été mises en évidence pour les STA de type II, via leur capacité à se fixer aux régions promotrices. Chez *S. aureus* NCTC8325, l'antitoxine SavR (STA SavRS) est capable de se fixer sur les promoteurs des gènes de virulence *hla* et *efb* pour réprimer leur expression suggérant une implication de cette antitoxine dans la régulation de gènes de virulence (Wen *et al.*, 2018). Chez *E. coli*, l'antitoxine de type II MqsA peut réprimer l'expression du régulateur majeur de la réponse au stress chez *E. coli* σ^{S} (gène *rpoS*), en se fixant sur son promoteur et ainsi réprimer de manière indirecte les gènes dont l'expression est activée par σ^{S} (Wang *et al.*, 2011). Enfin, chez *P. aeruginosa*, l'antitoxine HigA du STA de type II HigAB régule l'expression de *mvfR* qui est un important régulateur de la virulence de cette bactérie. Fixée sur le promoteur de *mvfR*, HigA réprime l'expression de ce régulateur, répression levée lorsque la toxine HigB se fixe sur HigA et permettant alors l'expression de gènes de virulence dont l'expression est activée par MvfR (Guo *et al.*, 2019). Ces quelques exemples illustrent la capacité des antitoxines de type II à participer activement à la régulation de processus cellulaire indépendamment de leur action de neutralisation de leur toxine.

Pendant ma thèse, nous avons donc identifié deux nouveaux STA de type I exprimés par *S. aureus*. Notre étude des interactions croisées entre les STA homologues *sprG*/SprF a révélé que des régulations croisées pouvaient avoir lieu entre les ARN *sprG* et SprF mais que cellesci n'avaient pas d'impact sur la neutralisation spécifique de chaque toxine SprG par son antitoxine SprF. Comme de nombreux STA de type I, nous avons démontré que l'expression des ARN *sprG* et SprF pouvait varier en réponse à des stress environnementaux. Nous avons montré que les toxines SprG2 et SprG3 sont bactériostatiques, contrairement aux peptides encodés par *sprG1* qui sont bactéricides. Cela suggère que ces toxines exerceraient des fonctions biologiques différentes. De plus, nous avons démontré que l'antitoxine SprF1 pourrait participer à l'entrée en persistance de *S. aureus*, en atténuant la traduction globale. Les STA *sprG*/SprF sont d'ailleurs très conservés dans tous les génomes séquencés de *S. aureus* ce qui souligne qu'ils auraient un rôle important. De nombreuses pistes sont encore à l'étude pour la recherche de leur fonction biologique mais les résultats obtenus à présent semblent indiquer que les STA *sprG*/SprF pourraient participer à l'adaptation de *S. aureus* aux antibiotiques et donc à sa pathogénie.

Annexe

			;	I								G	ה					T			m			D	c					в	Ĺ											A							301011	Calution
INDOLIGATI	I niamine-dichloride Rihoflavin	Pyridoxamine-2HCl	Ca-D-Panthothenic acid	Nicotinic acid	Biotin	p-Aminobenzoic acid	Cyanocobalamine	Cofactors	MoNa2O4		CuCl2		H3BU3	Minci2 (tertanydrate)		Trace elements		2, 2'-Bipyridine		MgSO4	KCI	NaCl		Potassium phosphate buffer (pH 7.2)	Sodium phosphate buffer (pH 7.2)	Salts, buffer, bipyridine	Ulea	Glucose	Succinic acid	Pyruvic acid	Maleic acid	Fumaric acid	Citric acid	Organic acids	Valine	Tryptophane	Threonine	Serine	Proline	Phenylalanine	Ornithine	Lysine	Leucin	Histidine	Glycine	Glutamic acid	Cysteine	Arginine (hydrochloride)		Campa-1104
100	200	300	100	200	20	80	100	[µg/l]	36	24	2	OGT	100	200	100	[µg/l]		0.2	Final concentration [mM]	0.5	20	125	Final concentration [mM]	5	5	Final concentration [mM]	3000	700	200	100	10	5	20	Concentration in SNM [µM]	100	20	200	120	150	150	100	150	300	50	150	100	10	100		Conservation in CNM [11M]
																		156.18	MW	120.4	74.55	58.44	MW	136,09/174,2	137,99/141,96	MW	00.00	180.16	270.2	110	116.07	116.07	192.12	MW	117.15	204.23	119.1	105.1	115.1	165.2	168.62	146.19	131.2	155.15	75.05	147.13	121.16	210.7	DU Do	
																		0.0031236	Concentration en masse (g/100ml)	0.00602	0.149	0.7305	Concentration en masse (g/100ml)	0,680/0,870	0,685/0,705	masse (g/l)	Concentration en	300 3	54.04	11	1.1607	0.58035	3.8424	Concentration en masse (mg/l)	11.715	4.0846	23.82	12.612	17.265	24.78	16.862	21.9285	39.36	7.7575	11.2575	14.713	1.2116	21.07	10 26	Concentration en
200	200	300	100	200	20	80	100	1000X mg/l	360	240	20	OUGT	1000	TUUU	1000	10000X mg/l		3.1236	mg/100ml	6.02	149	730.5	mg/100ml	13,6/17,42	13,7/14,19	100mM g/l	0000	30030	5404	1100	116.07	58.035	384.24	100X mg/l	1171.5	408.46	2382	1261.2	1726.5	2478	1686.2	2192.85	3936	775.75	1125.75	1471.3	121.16	2107	1/225	
10	20	30	10	20	2	8	10	mg/400ml	36	24	2	06T	100	IUU	100	mg/100ml	10000X			120.4	2980	14610	10X mg/200ml	1,36/1,742	1,37/1,419	g/100ml	100mM	3003	540.4	110	11.607	5.8035	38.424	100X mg/100ml	117.15	40.846	238.2	126.12	172.65	247.8	168.62	219.285	393.6	77.575	112.575	147.13	12.116	210.7	11002 /3111	50X
10		-20°	Marc 4°	Marc 4°	Marc 4°	Marc 4°	4°		talcon MS	Idicult IVIS	falcon MS	Talcon IVIS	AJ	AG	AG	5		S		AG	AD	AD						AG			AG		falcon MS		AD	AD	AD	AD	AD	AD			AD	AD	AD	AD	AD	AD	2	2

Calcium	Sulphate	Magnesium	Phosphate	Potassium	Chloride	Sodium	Inorganic lons	compris dans
0	0.5	0.5	10	25	145	130	[mM]	les différentes
								solutions

Solution H
Solution G
Solution F
Solution E
Solution D
Solution C
Solution B
Solution A

Annexe : Composition du milieu SNM3. Le milieu SNM3 est obtenu par mélange de volumes préétablis des solutions A à H.

Références bibliographiques

- Aakre, C.D., Phung, T.N., Huang, D., 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.
- Agarwal, S., Tiwari, P., Deep, A., Kidwai, S., Gupta, S., Thakur, K.G., Singh, R., 2018. System-Wide Analysis Unravels the Differential Regulation and In Vivo Essentiality of Virulence-Associated Proteins B and C Toxin-Antitoxin Systems of Mycobacterium tuberculosis. J. Infect. Dis. 217, 1809–1820.
- Akarsu, H., Bordes, P., Mansour, M., Bigot, D.-J., Genevaux, P., Falquet, L., 2019. TASmania: A bacterial Toxin-Antitoxin Systems database. PLoS Comput. Biol. 15, e1006946.
- Allegranzi, B., Bischoff, P., de Jonge, S., Kubilay, N.Z., Zayed, B., Gomes, S.M., Abbas, M., Atema, J.J., Gans, S., van Rijen, M., Boermeester, M.A., Egger, M., Kluytmans, J., Pittet, D., Solomkin, J.S., WHO Guidelines Development Group, 2016. New WHO recommendations on preoperative measures for surgical site infection prevention: an evidence-based global perspective. Lancet Infect Dis 16, e276– e287.
- Alonzo, F., Kozhaya, L., Rawlings, S.A., Reyes-Robles, T., DuMont, A.L., Myszka, D.G., Landau, N.R., Unutmaz, D., Torres, V.J., 2013. CCR5 is a receptor for Staphylococcus aureus leukotoxin ED. Nature 493, 51–55.
- Amato, S.M., Fazen, C.H., Henry, T.C., Mok, W.W.K., Orman, M.A., Sandvik, E.L., Volzing, K.G., Brynildsen, M.P., 2014. The role of metabolism in bacterial persistence. Front Microbiol 5, 70.
- Arnion, H., Korkut, D.N., Masachis Gelo, S., Chabas, S., Reignier, J., Iost, I., Darfeuille, F., 2017. Mechanistic insights into type I toxin antitoxin systems in Helicobacter pylori: the importance of mRNA folding in controlling toxin expression. Nucleic Acids Res. 45, 4782–4795.
- Arya, R., Princy, S.A., 2013. An insight into pleiotropic regulators Agr and Sar: molecular probes paving the new way for antivirulent therapy. Future Microbiol 8, 1339–1353.
- Atwood, D.N., Loughran, A.J., Courtney, A.P., Anthony, A.C., Meeker, D.G., Spencer, H.J., Gupta, R.K., Lee, C.Y., Beenken, K.E., Smeltzer, M.S., 2015. Comparative impact of diverse regulatory loci on Staphylococcus aureus biofilm formation. Microbiologyopen 4, 436–451.
- Baba, T., Bae, T., Schneewind, O., Takeuchi, F., Hiramatsu, K., 2008. Genome sequence of Staphylococcus aureus strain Newman and comparative analysis of staphylococcal genomes: polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands. J. Bacteriol. 190, 300–310.
- Balaban, N.Q., Helaine, S., Lewis, K., Ackermann, M., Aldridge, B., Andersson, D.I., Brynildsen, M.P.,
 Bumann, D., Camilli, A., Collins, J.J., Dehio, C., Fortune, S., Ghigo, J.-M., Hardt, W.-D., Harms, A.,
 Heinemann, M., Hung, D.T., Jenal, U., Levin, B.R., Michiels, J., Storz, G., Tan, M.-W., Tenson, T.,
 Van Melderen, L., Zinkernagel, A., 2019. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. Nat. Rev. Microbiol.
- Balaban, N.Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., Leibler, S., 2004. Bacterial persistence as a phenotypic switch. Science 305, 1622–1625.

- Bateman, B.T., Donegan, N.P., Jarry, T.M., Palma, M., Cheung, A.L., 2001. Evaluation of a tetracyclineinducible promoter in Staphylococcus aureus in vitro and in vivo and its application in demonstrating the role of sigB in microcolony formation. Infect. Immun. 69, 7851–7857.
- Bates, D.M., von Eiff, C., McNamara, P.J., Peters, G., Yeaman, M.R., Bayer, A.S., Proctor, R.A., 2003. Staphylococcus aureus menD and hemB mutants are as infective as the parent strains, but the menadione biosynthetic mutant persists within the kidney. J. Infect. Dis. 187, 1654–1661.
- Berg, T., Firth, N., Apisiridej, S., Hettiaratchi, A., Leelaporn, A., Skurray, R.A., 1998. Complete nucleotide sequence of pSK41: evolution of staphylococcal conjugative multiresistance plasmids. J. Bacteriol. 180, 4350–4359.
- Berghoff, B.A., Hoekzema, M., Aulbach, L., Wagner, E.G.H., 2017. Two regulatory RNA elements affect TisB-dependent depolarization and persister formation. Mol. Microbiol. 103, 1020–1033.
- Bernard, P., Kézdy, K.E., Van Melderen, L., Steyaert, J., Wyns, L., Pato, M.L., Higgins, P.N., Couturier, M., 1993. The F plasmid CcdB protein induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by gyrase. J. Mol. Biol. 234, 534–541.
- Berube, B.J., Bubeck Wardenburg, J., 2013. Staphylococcus aureus α-toxin: nearly a century of intrigue. Toxins (Basel) 5, 1140–1166.
- Besier, S., Ludwig, A., Ohlsen, K., Brade, V., Wichelhaus, T.A., 2007. Molecular analysis of the thymidineauxotrophic small colony variant phenotype of Staphylococcus aureus. Int. J. Med. Microbiol. 297, 217– 225.
- Bloom-Ackermann, Z., Steinberg, N., Rosenberg, G., Oppenheimer-Shaanan, Y., Pollack, D., Ely, S., Storzi, N., Levy, A., Kolodkin-Gal, I., 2016. Toxin-Antitoxin systems eliminate defective cells and preserve symmetry in Bacillus subtilis biofilms. Environ. Microbiol.
- Bohn, C., Rigoulay, C., Chabelskaya, S., Sharma, C.M., Marchais, A., Skorski, P., Borezée-Durant, E., Barbet, R., Jacquet, E., Jacq, A., Gautheret, D., Felden, B., Vogel, J., Bouloc, P., 2010. Experimental discovery of small RNAs in Staphylococcus aureus reveals a riboregulator of central metabolism. Nucleic Acids Res. 38, 6620–6636.
- Boisset, S., Geissmann, T., Huntzinger, E., Fechter, P., Bendridi, N., Possedko, M., Chevalier, C., Helfer, A.C., Benito, Y., Jacquier, A., Gaspin, C., Vandenesch, F., Romby, P., 2007. Staphylococcus aureus RNAIII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism. Genes Dev. 21, 1353–1366.
- Bosi, E., Monk, J.M., Aziz, R.K., Fondi, M., Nizet, V., Palsson, B.Ø., 2016. Comparative genome-scale modelling of Staphylococcus aureus strains identifies strain-specific metabolic capabilities linked to pathogenicity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 113, E3801-3809.
- Botka, T., Růžičková, V., Konečná, H., Pantůček, R., Rychlík, I., Zdráhal, Z., Petráš, P., Doškař, J., 2015. Complete genome analysis of two new bacteriophages isolated from impetigo strains of Staphylococcus aureus. Virus Genes 51, 122–131.

- Boundy, S., Safo, M.K., Wang, L., Musayev, F.N., O'Farrell, H.C., Rife, J.P., Archer, G.L., 2013. Characterization of the Staphylococcus aureus rRNA methyltransferase encoded by orfX, the gene containing the staphylococcal chromosome Cassette mec (SCCmec) insertion site. J. Biol. Chem. 288, 132–140.
- Brantl, S., 2012. Bacterial type I toxin-antitoxin systems. RNA Biol 9, 1488-1490.
- Brantl, S., Jahn, N., 2015. sRNAs in bacterial type I and type III toxin-antitoxin systems. FEMS Microbiol. Rev. 39, 413–427.
- Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O., Balaban, N.Q., 2016. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. Nat. Rev. Microbiol. 14, 320–330.
- Brielle, R., Pinel-Marie, M.-L., Felden, B., 2016. Linking bacterial type I toxins with their actions. Curr. Opin. Microbiol. 30, 114–121.
- Bronesky, D., Desgranges, E., Corvaglia, A., François, P., Caballero, C.J., Prado, L., Toledo-Arana, A., Lasa, I., Moreau, K., Vandenesch, F., Marzi, S., Romby, P., Caldelari, I., 2019. A multifaceted small RNA modulates gene expression upon glucose limitation in Staphylococcus aureus. EMBO J. 38.
- Bronesky, D., Wu, Z., Marzi, S., Walter, P., Geissmann, T., Moreau, K., Vandenesch, F., Caldelari, I., Romby,
 P., 2016. Staphylococcus aureus RNAIII and Its Regulon Link Quorum Sensing, Stress Responses,
 Metabolic Adaptation, and Regulation of Virulence Gene Expression. Annu. Rev. Microbiol. 70, 299–316.
- Bronner, S., Monteil, H., Prévost, G., 2004. Regulation of virulence determinants in Staphylococcus aureus: complexity and applications. FEMS Microbiol. Rev. 28, 183–200.
- Bronner, S., Stoessel, P., Gravet, A., Monteil, H., Prévost, G., 2000. Variable expressions of Staphylococcus aureus bicomponent leucotoxins semiquantified by competitive reverse transcription-PCR. Appl. Environ. Microbiol. 66, 3931–3938.
- Bronsard, J., Pascreau, G., Sassi, M., Mauro, T., Augagneur, Y., Felden, B., 2017. sRNA and cis-antisense sRNA identification in Staphylococcus aureus highlights an unusual sRNA gene cluster with one encoding a secreted peptide. Sci Rep 7, 4565.
- Brückner, R., 1997. Gene replacement in Staphylococcus carnosus and Staphylococcus xylosus. FEMS Microbiol. Lett. 151, 1–8.
- Bui, L.M.G., Conlon, B.P., Kidd, S.P., 2017. Antibiotic tolerance and the alternative lifestyles of Staphylococcus aureus. Essays Biochem. 61, 71–79.
- Bui, L.M.G., Kidd, S.P., 2015. A full genomic characterization of the development of a stable Small Colony Variant cell-type by a clinical Staphylococcus aureus strain. Infect. Genet. Evol. 36, 345–355.
- Bui, L.M.G., Turnidge, J.D., Kidd, S.P., 2015. The induction of Staphylococcus aureus biofilm formation or Small Colony Variants is a strain-specific response to host-generated chemical stresses. Microbes Infect. 17, 77–82.

- Bukowski, M., Hyz, K., Janczak, M., Hydzik, M., Dubin, G., Wladyka, B., 2017. Identification of novel mazEF/pemIK family toxin-antitoxin loci and their distribution in the Staphylococcus genus. Sci Rep 7, 13462.
- Bukowski, M., Lyzen, R., Helbin, W.M., Bonar, E., Szalewska-Palasz, A., Wegrzyn, G., Dubin, G., Dubin, A., Wladyka, B., 2013. A regulatory role for Staphylococcus aureus toxin-antitoxin system PemIKSa. Nat Commun 4, 2012.
- Bukowski, M., Wladyka, B., Dubin, G., 2010. Exfoliative toxins of Staphylococcus aureus. Toxins (Basel) 2, 1148–1165.
- Bur, S., Preissner, K.T., Herrmann, M., Bischoff, M., 2013. The Staphylococcus aureus extracellular adherence protein promotes bacterial internalization by keratinocytes independent of fibronectinbinding proteins. J. Invest. Dermatol. 133, 2004–2012.
- Burgui, S., Gil, C., Solano, C., Lasa, I., Valle, J., 2018. A Systematic Evaluation of the Two-Component Systems Network Reveals That ArIRS Is a Key Regulator of Catheter Colonization by Staphylococcus aureus. Front Microbiol 9, 342.
- Busch, A., Richter, A.S., Backofen, R., 2008. IntaRNA: efficient prediction of bacterial sRNA targets incorporating target site accessibility and seed regions. Bioinformatics 24, 2849–2856.
- Bush, K., Bradford, P.A., 2016. β-Lactams and β-Lactamase Inhibitors: An Overview. Cold Spring Harb Perspect Med 6.
- Carrier, M.-C., Lalaouna, D., Massé, E., 2018. Broadening the Definition of Bacterial Small RNAs: Characteristics and Mechanisms of Action. Annu. Rev. Microbiol. 72, 141–161.
- Castro-Roa, D., Garcia-Pino, A., De Gieter, S., van Nuland, N.A.J., Loris, R., Zenkin, N., 2013. The Fic protein Doc uses an inverted substrate to phosphorylate and inactivate EF-Tu. Nat. Chem. Biol. 9, 811–817.
- Chabelskaya, S., Bordeau, V., Felden, B., 2014. Dual RNA regulatory control of a Staphylococcus aureus virulence factor. Nucleic Acids Res 42, 4847–4858.
- Chabelskaya, S., Gaillot, O., Felden, B., 2010. A Staphylococcus aureus small RNA is required for bacterial virulence and regulates the expression of an immune-evasion molecule. PLoS Pathog. 6, e1000927.
- Chan, W.T., Espinosa, M., 2016. The Streptococcus pneumoniae pezAT Toxin-Antitoxin System Reduces β-Lactam Resistance and Genetic Competence. Front Microbiol 7, 1322.
- Chan, W.T., Espinosa, M., Yeo, C.C., 2016. Keeping the Wolves at Bay: Antitoxins of Prokaryotic Type II Toxin-Antitoxin Systems. Front Mol Biosci 3, 9.
- Charpentier, E., Anton, A.I., Barry, P., Alfonso, B., Fang, Y., Novick, R.P., 2004. Novel cassette-based shuttle vector system for gram-positive bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 70, 6076–6085.
- Cheng, A.G., McAdow, M., Kim, H.K., Bae, T., Missiakas, D.M., Schneewind, O., 2010. Contribution of coagulases towards Staphylococcus aureus disease and protective immunity. PLoS Pathog. 6, e1001036.
- Cheung, A.L., Nishina, K., Manna, A.C., 2008. SarA of Staphylococcus aureus binds to the sarA promoter to regulate gene expression. J. Bacteriol. 190, 2239–2243.

- Cheung, A.L., Schmidt, K., Bateman, B., Manna, A.C., 2001. SarS, a SarA homolog repressible by agr, is an activator of protein A synthesis in Staphylococcus aureus. Infect. Immun. 69, 2448–2455.
- Chevalier, C., Boisset, S., Romilly, C., Masquida, B., Fechter, P., Geissmann, T., Vandenesch, F., Romby, P., 2010. Staphylococcus aureus RNAIII binds to two distant regions of coa mRNA to arrest translation and promote mRNA degradation. PLoS Pathog. 6, e1000809.
- Cheverton, A.M., Gollan, B., Przydacz, M., Wong, C.T., Mylona, A., Hare, S.A., Helaine, S., 2016. A Salmonella Toxin Promotes Persister Formation through Acetylation of tRNA. Mol. Cell 63, 86–96.
- Cho, J., Rogers, J., Kearns, M., Leslie, M., Hartson, S.D., Wilson, K.S., 2015. Escherichia coli persister cells suppress translation by selectively disassembling and degrading their ribosomes. Mol. Microbiol. 95, 352–364.
- Chukwudi, C.U., Good, L., 2015. The role of the hok/sok locus in bacterial response to stressful growth conditions. Microb. Pathog. 79, 70–79.
- Clark, N.C., Weigel, L.M., Patel, J.B., Tenover, F.C., 2005. Comparison of Tn1546-like elements in vancomycin-resistant Staphylococcus aureus isolates from Michigan and Pennsylvania. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 470–472.
- Clements, M.O., Foster, S.J., 1999. Stress resistance in Staphylococcus aureus. Trends Microbiol. 7, 458–462.
- Clements, M.O., Watson, S.P., Poole, R.K., Foster, S.J., 1999. CtaA of Staphylococcus aureus is required for starvation survival, recovery, and cytochrome biosynthesis. J. Bacteriol. 181, 501–507.
- Cohen, N.R., Lobritz, M.A., Collins, J.J., 2013. Microbial persistence and the road to drug resistance. Cell Host Microbe 13, 632–642.
- Conlon, B.P., 2014. Staphylococcus aureus chronic and relapsing infections: Evidence of a role for persister cells: An investigation of persister cells, their formation and their role in S. aureus disease. Bioessays 36, 991–996.
- Conlon, B.P., Nakayasu, E.S., Fleck, L.E., LaFleur, M.D., Isabella, V.M., Coleman, K., Leonard, S.N., Smith, R.D., Adkins, J.N., Lewis, K., 2013. Activated ClpP kills persisters and eradicates a chronic biofilm infection. Nature 503, 365–370.
- Conlon, B.P., Rowe, S.E., Gandt, A.B., Nuxoll, A.S., Donegan, N.P., Zalis, E.A., Clair, G., Adkins, J.N., Cheung, A.L., Lewis, K., 2016. Persister formation in Staphylococcus aureus is associated with ATP depletion. Nat Microbiol 1, 16051.
- Conlon, K.M., Humphreys, H., O'Gara, J.P., 2002. icaR encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of ica operon expression and biofilm formation in Staphylococcus epidermidis. J. Bacteriol. 184, 4400–4408.
- Courvalin, P., 2006. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. Clin. Infect. Dis. 42 Suppl 1, S25-34.
- Cox, K.E.L., Schildbach, J.F., 2017. Sequence of the R1 plasmid and comparison to F and R100. Plasmid 91, 53–60.

- Cue, D., Lei, M.G., Lee, C.Y., 2013. Activation of sarX by Rbf is required for biofilm formation and icaADBC expression in Staphylococcus aureus. J. Bacteriol. 195, 1515–1524.
- Darfeuille, F., Unoson, C., Vogel, J., Wagner, E.G.H., 2007. An antisense RNA inhibits translation by competing with standby ribosomes. Mol. Cell 26, 381–392.
- Dastgheyb, S.S., Otto, M., 2015. Staphylococcal adaptation to diverse physiologic niches: an overview of transcriptomic and phenotypic changes in different biological environments. Future Microbiol 10, 1981–1995.
- Domka, J., Lee, J., Bansal, T., Wood, T.K., 2007. Temporal gene-expression in Escherichia coli K-12 biofilms. Environ. Microbiol. 9, 332–346.
- Donegan, N.P., 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.
- Donegan, N.P., Thompson, E.T., Fu, Z., Cheung, A.L., 2010. Proteolytic regulation of toxin-antitoxin systems by ClpPC in Staphylococcus aureus. J. Bacteriol. 192, 1416–1422.
- Dörr, T., Lewis, K., Vulić, M., 2009. SOS response induces persistence to fluoroquinolones in Escherichia coli. PLoS Genet. 5, e1000760.
- DuMont, A.L., Yoong, P., Liu, X., Day, C.J., Chumbler, N.M., James, D.B.A., Alonzo, F., Bode, N.J., Lacy, D.B., Jennings, M.P., Torres, V.J., 2014. Identification of a crucial residue required for Staphylococcus aureus LukAB cytotoxicity and receptor recognition. Infect. Immun. 82, 1268–1276.
- Durand, S., Jahn, N., Condon, C., Brantl, S., 2012. Type I toxin-antitoxin systems in Bacillus subtilis. RNA Biol 9, 1491–1497.
- Edwards, A.M., 2012. Phenotype switching is a natural consequence of Staphylococcus aureus replication. J. Bacteriol. 194, 5404–5412.
- Eyraud, A., Tattevin, P., Chabelskaya, S., Felden, B., 2014. A small RNA controls a protein regulator involved in antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. Nucleic Acids Res. 42, 4892–4905.
- Fernández-García, L., Blasco, L., Lopez, M., Bou, G., García-Contreras, R., Wood, T., Tomas, M., 2016. Toxin-Antitoxin Systems in Clinical Pathogens. Toxins (Basel) 8.
- Fiandt, M., Szybalski, W., Malamy, M.H., 1972. Polar mutations in lac, gal and phage lambda consist of a few IS-DNA sequences inserted with either orientation. Mol. Gen. Genet. 119, 223–231.
- Fineran, P.C., Blower, T.R., Foulds, I.J., Humphreys, D.P., Lilley, K.S., Salmond, G.P.C., 2009. The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106, 894–899.
- Firth, N., Jensen, S.O., Kwong, S.M., Skurray, R.A., Ramsay, J.P., 2018. Staphylococcal Plasmids, Transposable and Integrative Elements. Microbiol Spectr 6.
- Fisher, R.A., Gollan, B., Helaine, S., 2017. Persistent bacterial infections and persister cells. Nat. Rev. Microbiol. 15, 453–464.
- Fitzgerald, J.R., 2014. Evolution of Staphylococcus aureus during human colonization and infection. Infect. Genet. Evol. 21, 542–547.
- Folli, C., Levante, A., Percudani, R., Amidani, D., Bottazzi, S., Ferrari, A., Rivetti, C., Neviani, E., Lazzi, C., 2017. Toward the identification of a type I toxin-antitoxin system in the plasmid DNA of dairy Lactobacillus rhamnosus. Sci Rep 7, 12051.
- Foster, T.J., 2017. Antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. Current status and future prospects. FEMS Microbiol. Rev. 41, 430–449.
- Foster, T.J., Geoghegan, J.A., Ganesh, V.K., Höök, M., 2014. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of Staphylococcus aureus. Nat. Rev. Microbiol. 12, 49–62.
- Fournier, B., Hooper, D.C., 2000. A new two-component regulatory system involved in adhesion, autolysis, and extracellular proteolytic activity of Staphylococcus aureus. J. Bacteriol. 182, 3955–3964.
- Fozo, E.M., Kawano, M., Fontaine, F., Kaya, Y., Mendieta, K.S., Jones, K.L., Ocampo, A., Rudd, K.E., Storz, G., 2008. Repression of small toxic protein synthesis by the Sib and OhsC small RNAs. Mol. Microbiol. 70, 1076–1093.
- Fozo, E.M., Makarova, K.S., Shabalina, S.A., Yutin, N., Koonin, E.V., Storz, G., 2010. Abundance of type I toxin-antitoxin systems in bacteria: searches for new candidates and discovery of novel families. Nucleic Acids Res. 38, 3743–3759.
- Frampton, R., Aggio, R.B.M., Villas-Bôas, S.G., Arcus, V.L., Cook, G.M., 2012. Toxin-antitoxin systems of Mycobacterium smegmatis are essential for cell survival. J. Biol. Chem. 287, 5340–5356.
- Franch, T., Gultyaev, A.P., Gerdes, K., 1997. Programmed cell death by hok/sok of plasmid R1: processing at the hok mRNA 3'-end triggers structural rearrangements that allow translation and antisense RNA binding. J. Mol. Biol. 273, 38–51.
- Francia, M.V., Haas, W., Wirth, R., Samberger, E., Muscholl-Silberhorn, A., Gilmore, M.S., Ike, Y., Weaver, K.E., An, F.Y., Clewell, D.B., 2001. Completion of the nucleotide sequence of the Enterococcus faecalis conjugative virulence plasmid pAD1 and identification of a second transfer origin. Plasmid 46, 117– 127.
- Fraunholz, M., Sinha, B., 2012. Intracellular Staphylococcus aureus: live-in and let die. Front Cell Infect Microbiol 2, 43.
- Fridman, O., Goldberg, A., Ronin, I., Shoresh, N., Balaban, N.Q., 2014. Optimization of lag time underlies antibiotic tolerance in evolved bacterial populations. Nature 513, 418–421.
- Fu, Z., Tamber, S., Memmi, G., Donegan, N.P., Cheung, A.L., 2009. Overexpression of MazFsa in Staphylococcus aureus induces bacteriostasis by selectively targeting mRNAs for cleavage. J. Bacteriol. 191, 2051–2059.
- Gallegos, M.T., Schleif, R., Bairoch, A., Hofmann, K., Ramos, J.L., 1997. Arac/XylS family of transcriptional regulators. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61, 393–410.
- Gao, W., Chua, K., Davies, J.K., Newton, H.J., Seemann, T., Harrison, P.F., Holmes, N.E., Rhee, H.-W., Hong, J.-I., Hartland, E.L., Stinear, T.P., Howden, B.P., 2010. Two novel point mutations in clinical Staphylococcus aureus reduce linezolid susceptibility and switch on the stringent response to promote persistent infection. PLoS Pathog. 6, e1000944.

- Gefen, O., Balaban, N.Q., 2009. The importance of being persistent: heterogeneity of bacterial populations under antibiotic stress. FEMS Microbiol. Rev. 33, 704–717.
- Geiger, T., Francois, P., Liebeke, M., Fraunholz, M., Goerke, C., Krismer, B., Schrenzel, J., Lalk, M., Wolz, C., 2012. The stringent response of Staphylococcus aureus and its impact on survival after phagocytosis through the induction of intracellular PSMs expression. PLoS Pathog. 8, e1003016.
- Geissmann, T., Chevalier, C., Cros, M.-J., Boisset, S., Fechter, P., Noirot, C., Schrenzel, J., François, P., Vandenesch, F., Gaspin, C., Romby, P., 2009. A search for small noncoding RNAs in Staphylococcus aureus reveals a conserved sequence motif for regulation. Nucleic Acids Res. 37, 7239–7257.
- Geoghegan, J.A., Corrigan, R.M., Gruszka, D.T., Speziale, P., O'Gara, J.P., Potts, J.R., Foster, T.J., 2010. Role of surface protein SasG in biofilm formation by Staphylococcus aureus. J. Bacteriol. 192, 5663– 5673.
- Gerdes, K., Bech, F.W., Jørgensen, S.T., Løbner-Olesen, A., Rasmussen, P.B., Atlung, T., Boe, L., Karlstrom, O., Molin, S., von Meyenburg, K., 1986. Mechanism of postsegregational killing by the hok gene product of the parB system of plasmid R1 and its homology with the relF gene product of the E. coli relB operon. EMBO J. 5, 2023–2029.
- Germain-Amiot, N., Augagneur, Y., Camberlein, E., Nicolas, I., Lecureur, V., Rouillon, A., Felden, B., 2019. A novel Staphylococcus aureus cis-trans type I toxin-antitoxin module with dual effects on bacteria and host cells. Nucleic Acids Res. 47, 1759–1773.
- Gill, S.R., Fouts, D.E., Archer, G.L., Mongodin, E.F., Deboy, R.T., Ravel, J., Paulsen, I.T., Kolonay, J.F., Brinkac, L., Beanan, M., Dodson, R.J., Daugherty, S.C., Madupu, R., Angiuoli, S.V., Durkin, A.S., Haft, D.H., Vamathevan, J., Khouri, H., Utterback, T., Lee, C., Dimitrov, G., Jiang, L., Qin, H., Weidman, J., Tran, K., Kang, K., Hance, I.R., Nelson, K.E., Fraser, C.M., 2005. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain and a biofilm-producing methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis strain. J. Bacteriol. 187, 2426–2438.
- Goerke, C., Pantucek, R., Holtfreter, S., Schulte, B., Zink, M., Grumann, D., Bröker, B.M., Doskar, J., Wolz, C., 2009. Diversity of prophages in dominant Staphylococcus aureus clonal lineages. J. Bacteriol. 191, 3462–3468.
- Goldmann, O., Tuchscherr, L., Rohde, M., Medina, E., 2016. α -Hemolysin enhances Staphylococcus aureus internalization and survival within mast cells by modulating the expression of β 1 integrin. Cell. Microbiol. 18, 807–819.
- Greenfield, T.J., Ehli, E., Kirshenmann, T., Franch, T., Gerdes, K., Weaver, K.E., 2000. The antisense RNA of the par locus of pAD1 regulates the expression of a 33-amino-acid toxic peptide by an unusual mechanism. Mol. Microbiol. 37, 652–660.
- Greenfield, T.J., Franch, T., Gerdes, K., Weaver, K.E., 2001. Antisense RNA regulation of the par postsegregational killing system: structural analysis and mechanism of binding of the antisense RNA, RNAII and its target, RNAI. Mol. Microbiol. 42, 527–537.

- Groicher, K.H., Firek, B.A., Fujimoto, D.F., Bayles, K.W., 2000. The Staphylococcus aureus lrgAB operon modulates murein hydrolase activity and penicillin tolerance. J. Bacteriol. 182, 1794–1801.
- Grosz, M., Kolter, J., Paprotka, K., Winkler, A.-C., Schäfer, D., Chatterjee, S.S., Geiger, T., Wolz, C., Ohlsen,
 K., Otto, M., Rudel, T., Sinha, B., Fraunholz, M., 2014. Cytoplasmic replication of Staphylococcus aureus upon phagosomal escape triggered by phenol-soluble modulin α. Cell. Microbiol. 16, 451–465.
- Guo, Y., Quiroga, C., Chen, Q., McAnulty, M.J., Benedik, M.J., Wood, T.K., Wang, X., 2014. RalR (a DNase) and RalA (a small RNA) form a type I toxin-antitoxin system in Escherichia coli. Nucleic Acids Res. 42, 6448–6462.
- Guo, Y., Sun, C., Li, Y., Tang, K., Ni, S., Wang, X., 2019. Antitoxin HigA inhibits virulence gene mvfR expression in Pseudomonas aeruginosa. Environ. Microbiol.
- Gurnev, P.A., Ortenberg, R., Dörr, T., Lewis, K., Bezrukov, S.M., 2012. Persister-promoting bacterial toxin TisB produces anion-selective pores in planar lipid bilayers. FEBS Lett. 586, 2529–2534.
- Habib, G., Zhu, Q., Sun, B., 2018. Bioinformatics and Functional Assessment of Toxin-Antitoxin Systems in Staphylococcus aureus. Toxins (Basel) 10.
- Han, K., Kim, K.-S., Bak, G., Park, H., Lee, Y., 2010. Recognition and discrimination of target mRNAs by Sib RNAs, a cis-encoded sRNA family. Nucleic Acids Res. 38, 5851–5866.
- Haubert, L., Kroning, I.S., Iglesias, M.A., da Silva, W.P., 2017. First report of the Staphylococcus aureus isolate from subclinical bovine mastitis in the South of Brazil harboring resistance gene dfrG and transposon family Tn916-1545. Microb. Pathog. 113, 242–247.
- Hauryliuk, V., Atkinson, G.C., Murakami, K.S., Tenson, T., Gerdes, K., 2015. Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. Nat. Rev. Microbiol. 13, 298–309.
- Heilmann, C., Schweitzer, O., Gerke, C., Vanittanakom, N., Mack, D., Götz, F., 1996. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming Staphylococcus epidermidis. Mol. Microbiol. 20, 1083– 1091.
- Helaine, S., Cheverton, A.M., Watson, K.G., Faure, L.M., Matthews, S.A., Holden, D.W., 2014. Internalization of Salmonella by macrophages induces formation of nonreplicating persisters. Science 343, 204–208.
- Herbert, S., Ziebandt, A.-K., Ohlsen, K., Schäfer, T., Hecker, M., Albrecht, D., Novick, R., Götz, F., 2010. Repair of global regulators in Staphylococcus aureus 8325 and comparative analysis with other clinical isolates. Infect. Immun. 78, 2877–2889.
- Horn, J., Stelzner, K., Rudel, T., Fraunholz, M., 2018. Inside job: Staphylococcus aureus host-pathogen interactions. Int. J. Med. Microbiol. 308, 607–624.
- Horsburgh, M.J., Aish, J.L., White, I.J., Shaw, L., Lithgow, J.K., Foster, S.J., 2002. sigmaB modulates virulence determinant expression and stress resistance: characterization of a functional rsbU strain derived from Staphylococcus aureus 8325-4. J. Bacteriol. 184, 5457–5467.
- Howden, B.P., Peleg, A.Y., Stinear, T.P., 2014. The evolution of vancomycin intermediate Staphylococcus aureus (VISA) and heterogenous-VISA. Infect. Genet. Evol. 21, 575–582.

- Huntzinger, E., Boisset, S., Saveanu, C., Benito, Y., Geissmann, T., Namane, A., Lina, G., Etienne, J., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Jacquier, A., Vandenesch, F., Romby, P., 2005. Staphylococcus aureus RNAIII and the endoribonuclease III coordinately regulate spa gene expression. EMBO J. 24, 824–835.
- Hurdle, J.G., O'Neill, A.J., Ingham, E., Fishwick, C., Chopra, I., 2004. Analysis of mupirocin resistance and fitness in Staphylococcus aureus by molecular genetic and structural modeling techniques. Antimicrob. Agents Chemother. 48, 4366–4376.
- Hurdle, J.G., O'Neill, A.J., Mody, L., Chopra, I., Bradley, S.F., 2005. In vivo transfer of high-level mupirocin resistance from Staphylococcus epidermidis to methicillin-resistant Staphylococcus aureus associated with failure of mupirocin prophylaxis. J. Antimicrob. Chemother. 56, 1166–1168.
- Ingavale, S., van Wamel, W., Luong, T.T., Lee, C.Y., Cheung, A.L., 2005. Rat/MgrA, a regulator of autolysis, is a regulator of virulence genes in Staphylococcus aureus. Infect. Immun. 73, 1423–1431.
- Inoshima, I., Inoshima, N., Wilke, G.A., Powers, M.E., Frank, K.M., Wang, Y., Bubeck Wardenburg, J., 2011. A Staphylococcus aureus pore-forming toxin subverts the activity of ADAM10 to cause lethal infection in mice. Nat. Med. 17, 1310–1314.
- Jahn, N., Brantl, S., 2013. One antitoxin--two functions: SR4 controls toxin mRNA decay and translation. Nucleic Acids Res. 41, 9870–9880.
- Jahn, N., Preis, H., Wiedemann, C., Brantl, S., 2012. BsrG/SR4 from Bacillus subtilis--the first temperaturedependent type I toxin-antitoxin system. Mol. Microbiol. 83, 579–598.
- James, K.L., Mogen, A.B., Brandwein, J.N., Orsini, S.S., Ridder, M.J., Markiewicz, M.A., Bose, J.L., Rice, K.C., 2019. Interplay of Nitric Oxide Synthase (NOS) and SrrAB in Modulation of Staphylococcus aureus Metabolism and Virulence. Infect. Immun. 87.
- Jansen, A., Türck, M., Szekat, C., Nagel, M., Clever, I., Bierbaum, G., 2007. Role of insertion elements and yycFG in the development of decreased susceptibility to vancomycin in Staphylococcus aureus. Int. J. Med. Microbiol. 297, 205–215.
- Jenul, C., Horswill, A.R., 2018. Regulation of Staphylococcus aureus Virulence. Microbiol Spectr 6.
- Jiang, Y., Pogliano, J., Helinski, D.R., 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.
- Jin, Z., Jiang, Q., Fang, B., Sun, B., 2019. The ArlR-MgrA regulatory cascade regulates PIA-dependent and protein-mediated biofilm formation in Rbf-dependent and Rbf-independent pathways. Int. J. Med. Microbiol. 309, 85–96.
- Josse, J., Laurent, F., Diot, A., 2017. Staphylococcal Adhesion and Host Cell Invasion: Fibronectin-Binding and Other Mechanisms. Front Microbiol 8, 2433.
- Jousselin, A., Kelley, W.L., Barras, C., Lew, D.P., Renzoni, A., 2013. The Staphylococcus aureus thiol/oxidative stress global regulator Spx controls trfA, a gene implicated in cell wall antibiotic resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 57, 3283–3292.
- Jurėnas, D., Garcia-Pino, A., Van Melderen, L., 2017. Novel toxins from type II toxin-antitoxin systems with acetyltransferase activity. Plasmid 93, 30–35.

- Kadlec, K., Schwarz, S., 2009. Identification of a novel trimethoprim resistance gene, dfrK, in a methicillinresistant Staphylococcus aureus ST398 strain and its physical linkage to the tetracycline resistance gene tet(L). Antimicrob. Agents Chemother. 53, 776–778.
- Kahl, B.C., Becker, K., Löffler, B., 2016. Clinical Significance and Pathogenesis of Staphylococcal Small Colony Variants in Persistent Infections. Clin. Microbiol. Rev. 29, 401–427.
- Kahl, B.C., Belling, G., Becker, P., Chatterjee, I., Wardecki, K., Hilgert, K., Cheung, A.L., Peters, G., Herrmann, M., 2005. Thymidine-dependent Staphylococcus aureus small-colony variants are associated with extensive alterations in regulator and virulence gene expression profiles. Infect. Immun. 73, 4119– 4126.
- Kathirvel, M., Buchad, H., Nair, M., 2016. Enhancement of the pathogenicity of Staphylococcus aureus strain Newman by a small noncoding RNA SprX1. Med. Microbiol. Immunol. 205, 563–574.
- Kato, F., Yabuno, Y., Yamaguchi, Y., Sugai, M., Inouye, M., 2017. Deletion of mazF increases Staphylococcus aureus biofilm formation in an ica-dependent manner. Pathog Dis 75.
- Kawano, M., Aravind, L., Storz, G., 2007. An antisense RNA controls synthesis of an SOS-induced toxin evolved from an antitoxin. Mol. Microbiol. 64, 738–754.
- Kawano, M., Oshima, T., Kasai, H., Mori, H., 2002. Molecular characterization of long direct repeat (LDR) sequences expressing a stable mRNA encoding for a 35-amino-acid cell-killing peptide and a cisencoded small antisense RNA in Escherichia coli. Mol. Microbiol. 45, 333–349.
- Kawano, M., Reynolds, A.A., Miranda-Rios, J., Storz, G., 2005. Detection of 5'- and 3'-UTR-derived small RNAs and cis-encoded antisense RNAs in Escherichia coli. Nucleic Acids Res. 33, 1040–1050.
- Ko, Y.-P., Kang, M., Ganesh, V.K., Ravirajan, D., Li, B., Höök, M., 2016. Coagulase and Efb of Staphylococcus aureus Have a Common Fibrinogen Binding Motif. MBio 7, e01885-01815.
- Ko, Y.-P., Kuipers, A., Freitag, C.M., Jongerius, I., Medina, E., van Rooijen, W.J., Spaan, A.N., van Kessel,
 K.P.M., Höök, M., Rooijakkers, S.H.M., 2013. Phagocytosis escape by a Staphylococcus aureus protein
 that connects complement and coagulation proteins at the bacterial surface. PLoS Pathog. 9, e1003816.
- Kohler, C., von Eiff, C., Liebeke, M., McNamara, P.J., Lalk, M., Proctor, R.A., Hecker, M., Engelmann, S., 2008. A defect in menadione biosynthesis induces global changes in gene expression in Staphylococcus aureus. J. Bacteriol. 190, 6351–6364.
- Kohler, C., von Eiff, C., Peters, G., Proctor, R.A., Hecker, M., Engelmann, S., 2003. Physiological characterization of a heme-deficient mutant of Staphylococcus aureus by a proteomic approach. J. Bacteriol. 185, 6928–6937.
- Köser, C.U., Holden, M.T.G., Ellington, M.J., Cartwright, E.J.P., Brown, N.M., Ogilvy-Stuart, A.L., Hsu, L.Y., Chewapreecha, C., Croucher, N.J., Harris, S.R., Sanders, M., Enright, M.C., Dougan, G., Bentley, S.D., Parkhill, J., Fraser, L.J., Betley, J.R., Schulz-Trieglaff, O.B., Smith, G.P., Peacock, S.J., 2012. Rapid whole-genome sequencing for investigation of a neonatal MRSA outbreak. N. Engl. J. Med. 366, 2267–2275.

- Koyanagi, S., Lévesque, C.M., 2013. Characterization of a Streptococcus mutans intergenic region containing a small toxic peptide and its cis-encoded antisense small RNA antitoxin. PLoS ONE 8, e54291.
- Kriegeskorte, A., Grubmüller, S., Huber, C., Kahl, B.C., von Eiff, C., Proctor, R.A., Peters, G., Eisenreich,W., Becker, K., 2014. Staphylococcus aureus small colony variants show common metabolic features in central metabolism irrespective of the underlying auxotrophism. Front Cell Infect Microbiol 4, 141.
- Kriegeskorte, A., König, S., Sander, G., Pirkl, A., Mahabir, E., Proctor, R.A., von Eiff, C., Peters, G., Becker, K., 2011. Small colony variants of Staphylococcus aureus reveal distinct protein profiles. Proteomics 11, 2476–2490.
- Krismer, B., Liebeke, M., Janek, D., Nega, M., Rautenberg, M., Hornig, G., Unger, C., Weidenmaier, C., Lalk, M., Peschel, A., 2014. Nutrient limitation governs Staphylococcus aureus metabolism and niche adaptation in the human nose. PLoS Pathog. 10, e1003862.
- Krismer, B., Weidenmaier, C., Zipperer, A., Peschel, A., 2017. The commensal lifestyle of Staphylococcus aureus and its interactions with the nasal microbiota. Nat. Rev. Microbiol. 15, 675–687.
- Kristiansen, K.I., Weel-Sneve, R., Booth, J.A., Bjørås, M., 2016. Mutually exclusive RNA secondary structures regulate translation initiation of DinQ in Escherichia coli. RNA 22, 1739–1749.
- Kullik, I., Giachino, P., Fuchs, T., 1998. Deletion of the alternative sigma factor sigmaB in Staphylococcus aureus reveals its function as a global regulator of virulence genes. J. Bacteriol. 180, 4814–4820.
- Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K., Nagai, Y., Lian, J., Ito, T., Kanamori, M., Matsumaru, H., Maruyama, A., Murakami, H., Hosoyama, A., Mizutani-Ui, Y., Takahashi, N.K., Sawano, T., Inoue, R., Kaito, C., Sekimizu, K., Hirakawa, H., Kuhara, S., Goto, S., Yabuzaki, J., Kanehisa, M., Yamashita, A., Oshima, K., Furuya, K., Yoshino, C., Shiba, T., Hattori, M., Ogasawara, N., Hayashi, H., Hiramatsu, K., 2001. Whole genome sequencing of meticillin-resistant Staphylococcus aureus. Lancet 357, 1225–1240.
- Kwiecinski, J., Jacobsson, G., Karlsson, M., Zhu, X., Wang, W., Bremell, T., Josefsson, E., Jin, T., 2013. Staphylokinase Promotes the Establishment of Staphylococcus aureus Skin Infections While Decreasing Disease Severity. J Infect Dis 208, 990–999.
- Laarman, A., Milder, F., van Strijp, J., Rooijakkers, S., 2010. Complement inhibition by gram-positive pathogens: molecular mechanisms and therapeutic implications. J. Mol. Med. 88, 115–120.
- Lannergård, J., von Eiff, C., Sander, G., Cordes, T., Seggewiss, J., Peters, G., Proctor, R.A., Becker, K., Hughes, D., 2008. Identification of the genetic basis for clinical menadione-auxotrophic small-colony variant isolates of Staphylococcus aureus. Antimicrob. Agents Chemother. 52, 4017–4022.
- Larson, A.S., Hergenrother, P.J., 2014. Light activation of Staphylococcus aureus toxin YoeBSa1 reveals guanosine-specific endoribonuclease activity. Biochemistry 53, 188–201.
- Le, K.Y., Otto, M., 2015. Quorum-sensing regulation in staphylococci-an overview. Front Microbiol 6, 1174.
- Le Lam, T.N., Morvan, C., Liu, W., Bohn, C., Jaszczyszyn, Y., Bouloc, P., 2017. Finding sRNA-associated phenotypes by competition assays: An example with Staphylococcus aureus. Methods 117, 21–27.
- Le Loir, Y., and Gautier, M. 2010. Staphylococcus aureus. Monographies de microbiologie.

- Le Pabic, H., Germain-Amiot, N., Bordeau, V., Felden, B., 2015. A bacterial regulatory RNA attenuates virulence, spread and human host cell phagocytosis. Nucleic Acids Res. 43, 9232–9248.
- Lehnherr, H., Maguin, E., Jafri, S., 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.
- Lei, M.G., Lee, C.Y., 2018. Repression of Capsule Production by XdrA and CodY in Staphylococcus aureus. Journal of Bacteriology 200, e00203-18.
- Lei, M.G., Lee, C.Y., 2015. RbsR Activates Capsule but Represses the rbsUDK Operon in Staphylococcus aureus. Journal of Bacteriology 197, 3666–3675.
- Leimer, N., Rachmühl, C., Palheiros Marques, M., Bahlmann, A.S., Furrer, A., Eichenseher, F., Seidl, K., Matt, U., Loessner, M.J., Schuepbach, R.A., Zinkernagel, A.S., 2016. Nonstable Staphylococcus aureus Small-Colony Variants Are Induced by Low pH and Sensitized to Antimicrobial Therapy by Phagolysosomal Alkalinization. J. Infect. Dis. 213, 305–313.
- Levin-Reisman, I., Ronin, I., Gefen, O., Braniss, I., Shoresh, N., Balaban, N.Q., 2017. Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. Science 355, 826–830.
- Lewis, K., 2001. Riddle of biofilm resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 45, 999–1007.
- Lina, G., Bohach, G.A., Nair, S.P., Hiramatsu, K., Jouvin-Marche, E., Mariuzza, R., International Nomenclature Committee for Staphylococcal Superantigens, 2004. Standard nomenclature for the superantigens expressed by Staphylococcus. J. Infect. Dis. 189, 2334–2336.
- Lindsay, J.A., 2014. Staphylococcus aureus genomics and the impact of horizontal gene transfer. Int. J. Med. Microbiol. 304, 103–109.
- Lindsay, J.A., Holden, M.T.G., 2004. Staphylococcus aureus: superbug, super genome? Trends Microbiol. 12, 378–385.
- Liu, J., Chen, D., Peters, B.M., Li, L., Li, B., Xu, Z., Shirliff, M.E., 2016. Staphylococcal chromosomal cassettes mec (SCCmec): A mobile genetic element in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Microb. Pathog. 101, 56–67.
- Liu, Q., Yeo, W.-S., Bae, T., 2016. The SaeRS Two-Component System of Staphylococcus aureus. Genes (Basel) 7.
- Liu, Y., Manna, A.C., Pan, C.-H., Kriksunov, I.A., Thiel, D.J., Cheung, A.L., Zhang, G., 2006. Structural and function analyses of the global regulatory protein SarA from Staphylococcus aureus. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 2392–2397.
- Lobato-Márquez, D., Díaz-Orejas, R., García-Del Portillo, F., 2016. Toxin-antitoxins and bacterial virulence. FEMS Microbiol. Rev. 40, 592–609.
- Lobato-Márquez, D., Moreno-Córdoba, I., Figueroa, V., Díaz-Orejas, R., García-del Portillo, F., 2015. Distinct type I and type II toxin-antitoxin modules control Salmonella lifestyle inside eukaryotic cells. Sci Rep 5, 9374.

- Löffler, B., Hussain, M., Grundmeier, M., Brück, M., Holzinger, D., Varga, G., Roth, J., Kahl, B.C., Proctor, R.A., Peters, G., 2010. Staphylococcus aureus panton-valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. PLoS Pathog. 6, e1000715.
- Loughran, A.J., Atwood, D.N., Anthony, A.C., Harik, N.S., Spencer, H.J., Beenken, K.E., Smeltzer, M.S., 2014. Impact of individual extracellular proteases on Staphylococcus aureus biofilm formation in diverse clinical isolates and their isogenic sarA mutants. Microbiologyopen 3, 897–909.
- Luong, T.T., Newell, S.W., Lee, C.Y., 2003. Mgr, a novel global regulator in Staphylococcus aureus. J. Bacteriol. 185, 3703–3710.
- Lyon, B.R., Skurray, R., 1987. Antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus: genetic basis. Microbiol. Rev. 51, 88–134.
- Maikova, A., Peltier, J., Boudry, P., Hajnsdorf, E., Kint, N., Monot, M., Poquet, I., Martin-Verstraete, I., Dupuy, B., Soutourina, O., 2018. Discovery of new type I toxin-antitoxin systems adjacent to CRISPR arrays in Clostridium difficile. Nucleic Acids Res. 46, 4733–4751.
- Malachowa, N., DeLeo, F.R., 2010. Mobile genetic elements of Staphylococcus aureus. Cell. Mol. Life Sci. 67, 3057–3071.
- Malachowa, N., Kobayashi, S.D., Porter, A.R., Braughton, K.R., Scott, D.P., Gardner, D.J., Missiakas, D.M., Schneewind, O., DeLeo, F.R., 2016. Contribution of Staphylococcus aureus Coagulases and Clumping Factor A to Abscess Formation in a Rabbit Model of Skin and Soft Tissue Infection. PLoS ONE 11, e0158293.
- Manina, G., Dhar, N., McKinney, J.D., 2015. Stress and host immunity amplify Mycobacterium tuberculosis phenotypic heterogeneity and induce nongrowing metabolically active forms. Cell Host Microbe 17, 32–46.
- Manna, A.C., Cheung, A.L., 2006. Expression of SarX, a negative regulator of agr and exoprotein synthesis, is activated by MgrA in Staphylococcus aureus. J. Bacteriol. 188, 4288–4299.
- Manna, A.C., Cheung, A.L., 2003. sarU, a sarA homolog, is repressed by SarT and regulates virulence genes in Staphylococcus aureus. Infect. Immun. 71, 343–353.
- Manna, A.C., Ingavale, S.S., Maloney, M., van Wamel, W., Cheung, A.L., 2004. Identification of sarV (SA2062), a new transcriptional regulator, is repressed by SarA and MgrA (SA0641) and involved in the regulation of autolysis in Staphylococcus aureus. J. Bacteriol. 186, 5267–5280.
- Masachis, S., Darfeuille, F., 2018. Type I Toxin-Antitoxin Systems: Regulating Toxin Expression via Shine-Dalgarno Sequence Sequestration and Small RNA Binding. Microbiol Spectr 6.
- Mashruwala, A.A., Guchte, A. van de, Boyd, J.M., 2017. Impaired respiration elicits SrrAB-dependent programmed cell lysis and biofilm formation in Staphylococcus aureus. Elife 6.
- Mašlaňová, I., Doškař, J., Varga, M., Kuntová, L., Mužík, J., Malúšková, D., Růžičková, V., Pantůček, R., 2013. Bacteriophages of Staphylococcus aureus efficiently package various bacterial genes and mobile genetic elements including SCCmec with different frequencies. Environ Microbiol Rep 5, 66–73.

- Masuda, H., Tan, Q., Awano, N., Wu, K.-P., 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.
- Mauro, T., Rouillon, A., Felden, B., 2016. Insights into the regulation of small RNA expression: SarA represses the expression of two sRNAs in Staphylococcus aureus. Nucleic Acids Res. 44, 10186–10200.
- Mechler, L., Herbig, A., Paprotka, K., Fraunholz, M., Nieselt, K., Bertram, R., 2015. A novel point mutation promotes growth phase-dependent daptomycin tolerance in Staphylococcus aureus. Antimicrob. Agents Chemother. 59, 5366–5376.
- Meißner, C., Jahn, N., Brantl, S., 2016. In Vitro Characterization of the Type I Toxin-Antitoxin System bsrE/SR5 from Bacillus subtilis. J. Biol. Chem. 291, 560–571.
- Memmi, G., Nair, D.R., Cheung, A., 2012. Role of ArIRS in autolysis in methicillin-sensitive and methicillinresistant Staphylococcus aureus strains. J. Bacteriol. 194, 759–767.
- Merghni, A., Bekir, K., Kadmi, Y., Dallel, I., Janel, S., Bovio, S., Barois, N., Lafont, F., Mastouri, M., 2017. Adhesiveness of opportunistic Staphylococcus aureus to materials used in dental office: In vitro study. Microbial Pathogenesis 103, 129–134.
- Michiels, J.E., Van den Bergh, B., Verstraeten, N., Michiels, J., 2016. Molecular mechanisms and clinical implications of bacterial persistence. Drug Resist. Updat. 29, 76–89.
- Miller, W.R., Bayer, A.S., Arias, C.A., 2016. Mechanism of Action and Resistance to Daptomycin in Staphylococcus aureus and Enterococci. Cold Spring Harb Perspect Med 6.
- Mitchell, G., Lamontagne, C.-A., Brouillette, E., Grondin, G., Talbot, B.G., Grandbois, M., Malouin, F., 2008. Staphylococcus aureus SigB activity promotes a strong fibronectin-bacterium interaction which may sustain host tissue colonization by small-colony variants isolated from cystic fibrosis patients. Mol. Microbiol. 70, 1540–1555.
- Monk, I.R., Shah, I.M., Xu, M., Tan, M.-W., Foster, T.J., 2012. Transforming the untransformable: application of direct transformation to manipulate genetically Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis. MBio 3.
- Moormeier, D.E., Bose, J.L., Horswill, A.R., Bayles, K.W., 2014. Temporal and stochastic control of Staphylococcus aureus biofilm development. MBio 5, e01341-01314.
- Morrison, J.M., Anderson, K.L., Beenken, K.E., Smeltzer, M.S., Dunman, P.M., 2012a. The staphylococcal accessory regulator, SarA, is an RNA-binding protein that modulates the mRNA turnover properties of late-exponential and stationary phase Staphylococcus aureus cells. Front Cell Infect Microbiol 2, 26.
- Morrison, J.M., Miller, E.W., Benson, M.A., Alonzo, F., Yoong, P., Torres, V.J., Hinrichs, S.H., Dunman, P.M., 2012b. Characterization of SSR42, a novel virulence factor regulatory RNA that contributes to the pathogenesis of a Staphylococcus aureus USA300 representative. J. Bacteriol. 194, 2924–2938.
- Mrak, L.N., Zielinska, A.K., Beenken, K.E., Mrak, I.N., Atwood, D.N., Griffin, L.M., Lee, C.Y., Smeltzer, M.S., 2012. saeRS and sarA act synergistically to repress protease production and promote biofilm formation in Staphylococcus aureus. PLoS ONE 7, e38453.

- Müller, P., Jahn, N., Ring, C., Maiwald, C., Neubert, R., Meißner, C., Brantl, S., 2016. A multistress responsive type I toxin-antitoxin system: bsrE/SR5 from the B. subtilis chromosome. RNA Biol 13, 511–523.
- Münzenmayer, L., Geiger, T., Daiber, E., Schulte, B., Autenrieth, S.E., Fraunholz, M., Wolz, C., 2016. Influence of Sae-regulated and Agr-regulated factors on the escape of Staphylococcus aureus from human macrophages. Cell. Microbiol. 18, 1172–1183.
- Muraih, J.K., Pearson, A., Silverman, J., Palmer, M., 2011. Oligomerization of daptomycin on membranes. Biochim. Biophys. Acta 1808, 1154–1160.
- Newsom, S.W.B., 2008. Ogston's coccus. Journal of Hospital Infection 70, 369-372.
- Nielsen, A.K., Thorsted, P., Thisted, T., Wagner, E.G., Gerdes, K., 1991. The rifampicin-inducible genes srnB from F and pnd from R483 are regulated by antisense RNAs and mediate plasmid maintenance by killing of plasmid-free segregants. Mol. Microbiol. 5, 1961–1973.
- Novick, R.P., Christie, G.E., Penadés, J.R., 2010. The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria. Nat. Rev. Microbiol. 8, 541–551.
- Novick, R.P., Richmond, M.H., 1965. nature and interactions of the genetic elements governing penicillinase synthesis in staphylococcus aureus. J. Bacteriol. 90, 467–480.
- Novick, R.P., Ross, H.F., Projan, S.J., Kornblum, J., Kreiswirth, B., Moghazeh, S., 1993. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. EMBO J. 12, 3967–3975.
- Oliveira, D., Borges, A., Simões, M., 2018. Staphylococcus aureus Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases. Toxins (Basel) 10.
- Oliveira, D.C., Tomasz, A., de Lencastre, H., 2002. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of meticillin-resistant Staphylococcus aureus. Lancet Infect Dis 2, 180–189.
- Otto, M., 2018. Staphylococcal Biofilms. Microbiol Spectr 6.
- Otto, M., 2014. Staphylococcus aureus toxins. Curr. Opin. Microbiol. 17, 32-37.
- Pader, V., Hakim, S., Painter, K.L., Wigneshweraraj, S., Clarke, T.B., Edwards, A.M., 2016. Staphylococcus aureus inactivates daptomycin by releasing membrane phospholipids. Nat Microbiol 2, 16194.
- Page, R., Peti, W., 2016. Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. Nat. Chem. Biol. 12, 208–214.
- Paharik, A.E., Horswill, A.R., 2016. The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, Regulation, and Host Response. Microbiol Spectr 4.
- Painter, K.L., Strange, E., Parkhill, J., Bamford, K.B., Armstrong-James, D., Edwards, A.M., 2015. Staphylococcus aureus adapts to oxidative stress by producing H2O2-resistant small-colony variants via the SOS response. Infect. Immun. 83, 1830–1844.
- Peacock, S.J., Paterson, G.K., 2015. Mechanisms of Methicillin Resistance in Staphylococcus aureus. Annu. Rev. Biochem. 84, 577–601.

- Pedersen, K., Gerdes, K., 1999. Multiple hok genes on the chromosome of Escherichia coli. Mol. Microbiol. 32, 1090–1102.
- Pedersen, K., Zavialov, A.V., Pavlov, M.Y., Elf, J., Gerdes, K., Ehrenberg, M., 2003. The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site. Cell 112, 131–140.
- Periasamy, S., Joo, H.-S., Duong, A.C., Bach, T.-H.L., Tan, V.Y., Chatterjee, S.S., Cheung, G.Y.C., Otto, M., 2012. How Staphylococcus aureus biofilms develop their characteristic structure. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109, 1281–1286.
- Pichon, C., Felden, B., 2005. Small RNA genes expressed from Staphylococcus aureus genomic and pathogenicity islands with specific expression among pathogenic strains. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102, 14249–14254.
- Pinel-Marie, M.-L., Brielle, R., Felden, B., 2014. Dual toxic-peptide-coding Staphylococcus aureus RNA under antisense regulation targets host cells and bacterial rivals unequally. Cell Rep 7, 424–435.
- Pishchany, G., Dickey, S.E., Skaar, E.P., 2009. Subcellular localization of the Staphylococcus aureus heme iron transport components IsdA and IsdB. Infect. Immun. 77, 2624–2634.
- Posner, M.G., Upadhyay, A., Abubaker, A.A., Fortunato, T.M., Vara, D., Canobbio, I., Bagby, S., Pula, G., 2016. Extracellular Fibrinogen-binding Protein (Efb) from Staphylococcus aureus Inhibits the Formation of Platelet-Leukocyte Complexes. J. Biol. Chem. 291, 2764–2776.
- Pozzi, C., Waters, E.M., Rudkin, J.K., Schaeffer, C.R., Lohan, A.J., Tong, P., Loftus, B.J., Pier, G.B., Fey,
 P.D., Massey, R.C., O'Gara, J.P., 2012. Methicillin resistance alters the biofilm phenotype and attenuates virulence in Staphylococcus aureus device-associated infections. PLoS Pathog. 8, e1002626.
- Price-Whelan, A., Poon, C.K., Benson, M.A., Eidem, T.T., Roux, C.M., Boyd, J.M., Dunman, P.M., Torres, V.J., Krulwich, T.A., 2013. Transcriptional Profiling of Staphylococcus aureus During Growth in 2 M NaCl Leads to Clarification of Physiological Roles for Kdp and Ktr K+ Uptake Systems. mBio 4.
- Ramage, H.R., Connolly, L.E., Cox, J.S., 2009. Comprehensive functional analysis of Mycobacterium tuberculosis toxin-antitoxin systems: implications for pathogenesis, stress responses, and evolution. PLoS Genet. 5, e1000767.
- Reif, C., Löser, C., Brantl, S., 2018. Bacillus subtilis Type I antitoxin SR6 Promotes Degradation of Toxin yonT mRNA and Is Required to Prevent Toxic yoyJ Overexpression. Toxins (Basel) 10.
- Riffaud, C., Pinel-Marie, M.-L., Pascreau, G., Felden, B., 2019. Functionality and cross-regulation of the four SprG/SprF type I toxin-antitoxin systems in Staphylococcus aureus. Nucleic Acids Res. 47, 1740–1758.
- Roberts, C., Anderson, K.L., Murphy, E., Projan, S.J., Mounts, W., Hurlburt, B., Smeltzer, M., Overbeek, R., Disz, T., Dunman, P.M., 2006. Characterizing the effect of the Staphylococcus aureus virulence factor regulator, SarA, on log-phase mRNA half-lives. J. Bacteriol. 188, 2593–2603.
- Roch, M., Clair, P., Renzoni, A., Reverdy, M.-E., Dauwalder, O., Bes, M., Martra, A., Freydière, A.-M., Laurent, F., Reix, P., Dumitrescu, O., Vandenesch, F., 2014. Exposure of Staphylococcus aureus to subinhibitory concentrations of β-lactam antibiotics induces heterogeneous vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus. Antimicrob. Agents Chemother. 58, 5306–5314.

- Rochat, T., Bohn, C., Morvan, C., Le Lam, T.N., Razvi, F., Pain, A., Toffano-Nioche, C., Ponien, P., Jacq, A., Jacquet, E., Fey, P.D., Gautheret, D., Bouloc, P., 2018. The conserved regulatory RNA RsaE down-regulates the arginine degradation pathway in Staphylococcus aureus. Nucleic Acids Res. 46, 8803–8816.
- Romilly, C., Lays, C., Tomasini, A., Caldelari, I., Benito, Y., Hammann, P., Geissmann, T., Boisset, S.,
 Romby, P., Vandenesch, F., 2014. A non-coding RNA promotes bacterial persistence and decreases virulence by regulating a regulator in Staphylococcus aureus. PLoS Pathog. 10, e1003979. Rycroft, J.A.,
 Gollan, B., Grabe, G.J., Hall, A., Cheverton, A.M., Larrouy-Maumus, G., Hare, S.A., Helaine, S., 2018.
 Activity of acetyltransferase toxins involved in Salmonella persister formation during macrophage infection. Nat Commun 9, 1993.
- Sala, A., Bordes, P., Genevaux, P., 2014. Multiple toxin-antitoxin systems in Mycobacterium tuberculosis. Toxins (Basel) 6, 1002–1020.
- Sandberg, A., Jensen, K.S., Baudoux, P., Van Bambeke, F., Tulkens, P.M., Frimodt-Møller, N., 2010. Intraand extracellular activities of dicloxacillin against Staphylococcus aureus in vivo and in vitro. Antimicrob. Agents Chemother. 54, 2391–2400.
- Santos-Beneit, F., Ordóñez-Robles, M., Martín, J.F., 2017. Glycopeptide resistance: Links with inorganic phosphate metabolism and cell envelope stress. Biochem. Pharmacol. 133, 74–85.
- Sassi, M., Augagneur, Y., Mauro, T., Ivain, L., Chabelskaya, S., Hallier, M., Sallou, O., Felden, B., 2015. SRD: a Staphylococcus regulatory RNA database. RNA 21, 1005–1017.
- Sassi, M., Felden, B., Augagneur, Y., 2014. Draft Genome Sequence of Staphylococcus aureus subsp. aureus Strain HG003, an NCTC8325 Derivative. Genome Announc 2.
- Sayed, N., Jousselin, A., Felden, B., 2011. A cis-antisense RNA acts in trans in Staphylococcus aureus to control translation of a human cytolytic peptide. Nat. Struct. Mol. Biol. 19, 105–112.
- Sayed, N., Nonin-Lecomte, S., Réty, S., Felden, B., 2012. Functional and structural insights of a Staphylococcus aureus apoptotic-like membrane peptide from a toxin-antitoxin module. J. Biol. Chem. 287, 43454–43463.
- Schaaff, F., Bierbaum, G., Baumert, N., Bartmann, P., Sahl, H.-G., 2003. Mutations are involved in emergence of aminoglycoside-induced small colony variants of Staphylococcus aureus. Int. J. Med. Microbiol. 293, 427–435.
- Schmidt, A., Bénard, S., Cyr, S., 2015. Hospital Cost of Staphylococcal Infection after Cardiothoracic or Orthopedic Operations in France: A Retrospective Database Analysis. Surg Infect (Larchmt) 16, 428– 435.
- Schmitz, F.J., Fluit, A.C., Hafner, D., Beeck, A., Perdikouli, M., Boos, M., Scheuring, S., Verhoef, J., Köhrer, K., Von Eiff, C., 2000. Development of resistance to ciprofloxacin, rifampin, and mupirocin in methicillin-susceptible and -resistant Staphylococcus aureus isolates. Antimicrob. Agents Chemother. 44, 3229–3231.

- Schneider, M., Mühlemann, K., Droz, S., Couzinet, S., Casaulta, C., Zimmerli, S., 2008. Clinical characteristics associated with isolation of small-colony variants of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. J. Clin. Microbiol. 46, 1832–1834.
- Schuster, C.F., Bertram, R., 2016. Toxin-Antitoxin Systems of Staphylococcus aureus. Toxins (Basel) 8.
- Schuster, C.F., Mechler, L., Nolle, N., Krismer, B., Zelder, M.-E., Götz, F., Bertram, R., 2015. The MazEF Toxin-Antitoxin System Alters the β-Lactam Susceptibility of Staphylococcus aureus. PLoS ONE 10, e0126118.
- Schwartbeck, B., Birtel, J., Treffon, J., Langhanki, L., Mellmann, A., Kale, D., Kahl, J., Hirschhausen, N., Neumann, C., Lee, J.C., Götz, F., Rohde, H., Henke, H., Küster, P., Peters, G., Kahl, B.C., 2016.
 Dynamic in vivo mutations within the ica operon during persistence of Staphylococcus aureus in the airways of cystic fibrosis patients. PLoS Pathog. 12, e1006024.
- Sevin, E.W., Barloy-Hubler, F., 2007. RASTA-Bacteria: a web-based tool for identifying toxin-antitoxin loci in prokaryotes. Genome Biol. 8, R155. Sharma, C.M., Hoffmann, S., Darfeuille, F., Reignier, J., Findeiss, S., Sittka, A., Chabas, S., Reiche, K., Hackermüller, J., Reinhardt, R., Stadler, P.F., Vogel, J., 2010. The primary transcriptome of the major human pathogen Helicobacter pylori. Nature 464, 250–255.
- Shinji, H., Yosizawa, Y., Tajima, A., Iwase, T., Sugimoto, S., Seki, K., Mizunoe, Y., 2011. Role of fibronectin-binding proteins A and B in in vitro cellular infections and in vivo septic infections by Staphylococcus aureus. Infect. Immun. 79, 2215–2223.
- Short, F.L., Pei, X.Y., Blower, T.R., Ong, S.-L., Fineran, P.C., Luisi, B.F., Salmond, G.P.C., 2013. Selectivity and self-assembly in the control of a bacterial toxin by an antitoxic noncoding RNA pseudoknot. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 110, E241-249.
- Silvaggi, J.M., Perkins, J.B., Losick, R., 2005. Small untranslated RNA antitoxin in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 187, 6641–6650.
- Solecki, O., Mosbah, A., Baudy Floc'h, M., Felden, B., 2015. Converting a Staphylococcus aureus toxin into effective cyclic pseudopeptide antibiotics. Chem. Biol. 22, 329–335.
- Somerville, G.A., Proctor, R.A., 2009. At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in Staphylococci. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 73, 233–248.
- Spaan, A.N., Henry, T., van Rooijen, W.J.M., Perret, M., Badiou, C., Aerts, P.C., Kemmink, J., de Haas, C.J.C., van Kessel, K.P.M., Vandenesch, F., Lina, G., van Strijp, J.A.G., 2013a. The staphylococcal toxin Panton-Valentine Leukocidin targets human C5a receptors. Cell Host Microbe 13, 584–594.
- Spaan, A.N., Surewaard, B.G.J., Nijland, R., van Strijp, J.A.G., 2013b. Neutrophils versus Staphylococcus aureus: a biological tug of war. Annu. Rev. Microbiol. 67, 629–650.
- Sreeramoju, P., Porbandarwalla, N.S., Arango, J., Latham, K., Dent, D.L., Stewart, R.M., Patterson, J.E., 2011. Recurrent skin and soft tissue infections due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus requiring operative debridement. Am. J. Surg. 201, 216–220.

- Surewaard, B.G.J., de Haas, C.J.C., Vervoort, F., Rigby, K.M., DeLeo, F.R., Otto, M., van Strijp, J. a. G., Nijland, R., 2013. Staphylococcal alpha-phenol soluble modulins contribute to neutrophil lysis after phagocytosis. Cell. Microbiol. 15, 1427–1437.
- Svensson, S.L., Sharma, C.M., 2016. Small RNAs in Bacterial Virulence and Communication. Microbiol Spectr 4.
- Tettelin, H., Riley, D., Cattuto, C., Medini, D., 2008. Comparative genomics: the bacterial pan-genome. Curr. Opin. Microbiol. 11, 472–477.
- Thomer, L., Schneewind, O., Missiakas, D., 2016. Pathogenesis of Staphylococcus aureus Bloodstream Infections. Annu Rev Pathol 11, 343–364.
- Tillotson, L.E., Jenssen, W.D., Moon-McDermott, L., Dubin, D.T., 1989. Characterization of a novel insertion of the macrolides-lincosamides-streptogramin B resistance transposon Tn554 in methicillinresistant Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis. Antimicrob. Agents Chemother. 33, 541–550.
- Tomasini, A., François, P., Howden, B.P., Fechter, P., Romby, P., Caldelari, I., 2014. The importance of regulatory RNAs in Staphylococcus aureus. Infect. Genet. Evol. 21, 616–626.
- Tomasini, A., Moreau, K., Chicher, J., Geissmann, T., Vandenesch, F., Romby, P., Marzi, S., Caldelari, I., 2017. The RNA targetome of Staphylococcus aureus non-coding RNA RsaA: impact on cell surface properties and defense mechanisms. Nucleic Acids Res. 45, 6746–6760.
- Tong, S.Y.C., Davis, J.S., Eichenberger, E., Holland, T.L., Fowler, V.G., 2015. Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. Clin. Microbiol. Rev. 28, 603–661.
- Tranchemontagne, Z.R., Camire, R.B., O'Donnell, V.J., Baugh, J., Burkholder, K.M., 2016. Staphylococcus aureus Strain USA300 Perturbs Acquisition of Lysosomal Enzymes and Requires Phagosomal Acidification for Survival inside Macrophages. Infect. Immun. 84, 241–253.
- Trotonda, M.P., Tamber, S., Memmi, G., Cheung, A.L., 2008. MgrA represses biofilm formation in Staphylococcus aureus. Infect. Immun. 76, 5645–5654.
- Truong-Bolduc, Q.C., Dunman, P.M., Strahilevitz, J., Projan, S.J., Hooper, D.C., 2005. MgrA is a multiple regulator of two new efflux pumps in Staphylococcus aureus. J. Bacteriol. 187, 2395–2405.
- Truong-Bolduc, Q.C., Hooper, D.C., 2010. Phosphorylation of MgrA and its effect on expression of the NorA and NorB efflux pumps of Staphylococcus aureus. J. Bacteriol. 192, 2525–2534.
- Tuchscherr, L., Heitmann, V., Hussain, M., Viemann, D., Roth, J., von Eiff, C., Peters, G., Becker, K., Löffler,
 B., 2010. Staphylococcus aureus small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence. J. Infect. Dis. 202, 1031–1040.
- Tuchscherr, L., Löffler, B., 2016. Staphylococcus aureus dynamically adapts global regulators and virulence factor expression in the course from acute to chronic infection. Curr. Genet. 62, 15–17.
- Ulrich, M., Bastian, M., Cramton, S.E., Ziegler, K., Pragman, A.A., Bragonzi, A., Memmi, G., Wolz, C., Schlievert, P.M., Cheung, A., Döring, G., 2007. The staphylococcal respiratory response regulator

SrrAB induces ica gene transcription and polysaccharide intercellular adhesin expression, protecting Staphylococcus aureus from neutrophil killing under anaerobic growth conditions. Mol. Microbiol. 65, 1276–1287.

- Urish, K.L., DeMuth, P.W., Kwan, B.W., Craft, D.W., Ma, D., Haider, H., Tuan, R.S., Wood, T.K., Davis, C.M., 2016. Antibiotic-tolerant Staphylococcus aureus Biofilm Persists on Arthroplasty Materials. Clin. Orthop. Relat. Res. 474, 1649–1656.
- Valero, A., Pérez-Rodríguez, F., Carrasco, E., Fuentes-Alventosa, J.M., García-Gimeno, R.M., Zurera, G., 2009. Modelling the growth boundaries of Staphylococcus aureus: Effect of temperature, pH and water activity. International Journal of Food Microbiology 133, 186–194.
- van Belkum, A., Verkaik, N.J., de Vogel, C.P., Boelens, H.A., Verveer, J., Nouwen, J.L., Verbrugh, H.A., Wertheim, H.F.L., 2009. Reclassification of Staphylococcus aureus nasal carriage types. J. Infect. Dis. 199, 1820–1826.
- Van Melderen, L., 2010. Toxin-antitoxin systems: why so many, what for? Curr. Opin. Microbiol. 13, 781–785.
- Van Melderen, L., Saavedra De Bast, M., 2009. Bacterial toxin-antitoxin systems: more than selfish entities? PLoS Genet. 5, e1000437.
- van Wamel, W.J.B., Rooijakkers, S.H.M., Ruyken, M., van Kessel, K.P.M., van Strijp, J.A.G., 2006. The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of Staphylococcus aureus are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages. J. Bacteriol. 188, 1310–1315.
- Vaudaux, P., Francois, P., Bisognano, C., Kelley, W.L., Lew, D.P., Schrenzel, J., Proctor, R.A., McNamara, P.J., Peters, G., Von Eiff, C., 2002. Increased expression of clumping factor and fibronectin-binding proteins by hemB mutants of Staphylococcus aureus expressing small colony variant phenotypes. Infect. Immun. 70, 5428–5437.
- Verstraeten, N., Knapen, W.J., Kint, C.I., Liebens, V., Van den Bergh, B., Dewachter, L., Michiels, J.E., Fu, Q., David, C.C., Fierro, A.C., Marchal, K., Beirlant, J., Versées, W., Hofkens, J., Jansen, M., Fauvart, M., Michiels, J., 2015. Obg and Membrane Depolarization Are Part of a Microbial Bet-Hedging Strategy that Leads to Antibiotic Tolerance. Mol. Cell 59, 9–21.
- von Eiff, C., Heilmann, C., Proctor, R.A., Woltz, C., Peters, G., Götz, F., 1997. A site-directed Staphylococcus aureus hemB mutant is a small-colony variant which persists intracellularly. J. Bacteriol. 179, 4706– 4712.
- Walker, J.N., Crosby, H.A., Spaulding, A.R., Salgado-Pabón, W., Malone, C.L., Rosenthal, C.B., Schlievert, P.M., Boyd, J.M., Horswill, A.R., 2013. The Staphylococcus aureus ArlRS two-component system is a novel regulator of agglutination and pathogenesis. PLoS Pathog. 9, e1003819.
- Wang, J., Stephan, R., Zurfluh, K., Hächler, H., Fanning, S., 2015. Characterization of the genetic environment of blaESBL genes, integrons and toxin-antitoxin systems identified on large transferrable plasmids in multi-drug resistant Escherichia coli. Front. Microbiol. 5.

- Wang, R., Braughton, K.R., Kretschmer, D., Bach, T.-H.L., Queck, S.Y., Li, M., Kennedy, A.D., Dorward, D.W., Klebanoff, S.J., Peschel, A., DeLeo, F.R., Otto, M., 2007. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. Nat. Med. 13, 1510–1514.
- 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., Benedik, M.J., Page, R., Wood, T.K., 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., Wood, T.K., 2013. Type II toxin/antitoxin MqsR/MqsA controls type V toxin/antitoxin GhoT/GhoS. Environ. Microbiol. 15, 1734– 1744.
- Waters, C.M., Bassler, B.L., 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 21, 319–346.
- Weaver, K.E., Jensen, K.D., Colwell, A., Sriram, S.I., 1996. Functional analysis of the Enterococcus faecalis plasmid pAD1-encoded stability determinant par. Mol. Microbiol. 20, 53–63.
- Weaver, K.E., Reddy, S.G., Brinkman, C.L., Patel, S., Bayles, K.W., Endres, J.L., 2009. Identification and characterization of a family of toxin-antitoxin systems related to the Enterococcus faecalis plasmid pAD1 par addiction module. Microbiology (Reading, Engl.) 155, 2930–2940.
- Weel-Sneve, R., Kristiansen, K.I., Odsbu, I., Dalhus, B., Booth, J., Rognes, T., Skarstad, K., Bjørås, M., 2013. Single transmembrane peptide DinQ modulates membrane-dependent activities. PLoS Genet. 9, e1003260.
- Wen, J., Harp, J.R., Fozo, E.M., 2017. The 5' UTR of the type I toxin ZorO can both inhibit and enhance translation. Nucleic Acids Res. 45, 4006–4020.
- Wen, J., Won, D., Fozo, E.M., 2014. The ZorO-OrzO type I toxin-antitoxin locus: repression by the OrzO antitoxin. Nucleic Acids Res. 42, 1930–1946.
- Wen, W., Liu, B., Xue, L., Zhu, Z., Niu, L., Sun, B., 2018. Autoregulation and Virulence Control by the Toxin-Antitoxin System SavRS in Staphylococcus aureus. Infect. Immun. 86.
- Wertheim, H., Vos, M., Ott, A., van Belkum, A., Voss, A., Kluytmans, J., van Keulen, P., Vandenbroucke-Grauls, C., Meester, M., Verbrugh, H., n.d. Risk and outcome of nosocomial Staphylococcus aureus bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers.
- Wertheim, H.F.L., Melles, D.C., Vos, M.C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H.A., Nouwen, J.L., 2005. The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections. Lancet Infect Dis 5, 751–762.
- Wilcox, B., Osterman, I., Serebryakova, M., Lukyanov, D., Komarova, E., Gollan, B., Morozova, N., Wolf, Y.I., Makarova, K.S., Helaine, S., Sergiev, P., Dubiley, S., Borukhov, S., Severinov, K., 2018. Escherichia coli ItaT is a type II toxin that inhibits translation by acetylating isoleucyl-tRNAIle. Nucleic Acids Res. 46, 7873–7885.
- Wilmaerts, D., Bayoumi, M., Dewachter, L., Knapen, W., Mika, J.T., Hofkens, J., Dedecker, P., Maglia, G., Verstraeten, N., Michiels, J., 2018. The Persistence-Inducing Toxin HokB Forms Dynamic Pores That Cause ATP Leakage. MBio 9.

- Wolter, D.J., Emerson, J.C., McNamara, S., Buccat, A.M., Qin, X., Cochrane, E., Houston, L.S., Rogers, G.B., Marsh, P., Prehar, K., Pope, C.E., Blackledge, M., Déziel, E., Bruce, K.D., Ramsey, B.W., Gibson, R.L., Burns, J.L., Hoffman, L.R., 2013. Staphylococcus aureus small-colony variants are independently associated with worse lung disease in children with cystic fibrosis. Clin. Infect. Dis. 57, 384–391.
- Xie, Y., Wei, Y., Shen, Y., Li, X., Zhou, H., Tai, C., Deng, Z., Ou, H.-Y., 2018. TADB 2.0: an updated database of bacterial type II toxin-antitoxin loci. Nucleic Acids Res. 46, D749–D753.
- Xue, T., Zhang, X., Sun, H., Sun, B., 2014. ArtR, a novel sRNA of Staphylococcus aureus, regulates α-toxin expression by targeting the 5' UTR of sarT mRNA. Med. Microbiol. Immunol. 203, 1–12.
- Yamaguchi, T., Hayashi, T., Takami, H., Ohnishi, M., Murata, T., Nakayama, K., Asakawa, K., Ohara, M., Komatsuzawa, H., Sugai, M., 2001. Complete nucleotide sequence of a Staphylococcus aureus exfoliative toxin B plasmid and identification of a novel ADP-ribosyltransferase, EDIN-C. Infect. Immun. 69, 7760–7771.
- Yamaguchi, Y., Park, J.-H., 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.
- Yarwood, J.M., McCormick, J.K., Paustian, M.L., Orwin, P.M., Kapur, V., Schlievert, P.M., 2002. Characterization and expression analysis of Staphylococcus aureus pathogenicity island 3. Implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. J. Biol. Chem. 277, 13138–13147.
- Yarwood, J.M., McCormick, J.K., Schlievert, P.M., 2001. Identification of a novel two-component regulatory system that acts in global regulation of virulence factors of Staphylococcus aureus. J. Bacteriol. 183, 1113–1123.
- Yonemoto, K., Chiba, A., Sugimoto, S., Sato, C., Saito, M., Kinjo, Y., Marumo, K., Mizunoe, Y., 2019. Redundant and Distinct Roles of Secreted Protein Eap and Cell Wall-Anchored Protein SasG in Biofilm Formation and Pathogenicity of Staphylococcus aureus. Infect. Immun. 87.
- Yoshizumi, S., Zhang, Y., Yamaguchi, Y., Chen, L., Kreiswirth, B.N., Inouye, M., 2009. Staphylococcus aureus YoeB homologues inhibit translation initiation. J. Bacteriol. 191, 5868–5872.
- Zeghouf, M., Li, J., Butland, G., Borkowska, A., Canadien, V., Richards, D., Beattie, B., Emili, A., Greenblatt, J.F., 2004. Sequential Peptide Affinity (SPA) system for the identification of mammalian and bacterial protein complexes. J. Proteome Res. 3, 463–468.
- Zhang, S., Ma, R., Liu, X., Zhang, X., Sun, B., 2015. Modulation of ccrAB Expression and SCCmec Excision by an Inverted Repeat Element and SarS in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob. Agents Chemother. 59, 6223–6232.
- Zhang, Y., Inouye, M., 2009. The inhibitory mechanism of protein synthesis by YoeB, an Escherichia coli toxin. J. Biol. Chem. 284, 6627–6638.
- Zuker, M., 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic Acids Res. 31, 3406–3415.

Autres sources

NCBI : <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/154</u> INSERM : <u>https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/infections-nosocomiales</u> ecdc : <u>https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx</u>

UNIVERSITE BIOLOGIE BRETAGNE SANTE LOIRE



Etude fonctionnelle et régulations croisées de systèmes toxine-antitoxine de type l exprimés par *Staphylococcus aureus*

Mots clés : *Staphylococcus aureus,* systèmes toxine-antitoxine, ARN régulateurs, tolérance et persistance aux antibiotiques

Résumé : Staphylococcus aureus (S. aureus) est un pathogène humain majeur dont l'impact sur la santé publique est majoré par les phénomènes de résistance et de tolérance aux antibiotiques. Au cours de cette thèse, nous avons identifié deux nouveaux systèmes toxine-antitoxine (STA) de type I appartenant au core génome et exprimés par S. aureus nommés sprG2/SprF2, sprG3/SprF3. Ces nouveaux STA sont homologues au STA sprG1/SprF1 localisé dans un îlot de pathogénie. Nous avons montré que des interactions croisées influençant le niveau des ARN sprG et SprF pouvaient avoir lieu entre les STA homologues sprG/SprF, mais que celles-ci n'avaient pas d'impact sur la neutralisation spécifique de chaque toxine SprG par son antitoxine SprF. Nous avons démontré que les peptides encodés par sprG2 et sprG3 sont bactériostatiques, contrairement aux peptides encodés par sprG1 qui sont bactéricides. Nous avons démontré que l'expression des ARN sprG et SprF pouvait varier en réponse à des stress environnementaux comme un stress hyperosmotique ou un stress oxydatif. Pour le STA sprG1/SprF1, nous avons démontré que l'antitoxine SprF1 pourrait participer à l'entrée en persistance de S. aureus, en atténuant la traduction globale via son association aux ribosomes. Ainsi, SprF1 est le premier exemple d'une antitoxine ARN avec une double fonction de neutralisation de la toxine sprG1 via son extrémité 3' et de fixation aux ribosomes pour atténuer la traduction de S. aureus via son extrémité 5'. Ensemble, ces travaux de thèse suggèrent que les STA sprG/SprF seraient impliqués dans l'adaptation de S. aureus au stress antibiotique ou dans l'échappement au système immunitaire.

Functionality and cross-regulation of type I toxin-antitoxin systems expressed in Staphylococcus aureus

Keywords : *Staphylococcus aureus*, toxin-antitoxin systems, regulatory RNA, antibiotic tolerance and persistence

Abstract: Staphylococcus aureus (S. aureus) is a human pathogen that causes nosocomial and community-associated infections. The antibiotic resistance and tolerance of S. aureus increase its impact on public health. During my PhD thesis, we identified two novel type I toxin-antitoxin systems (TAS) located in the core genome and expressed in S. aureus named sprG2/SprF2 and sprG3/SprF3. These TAS are homologues of the sprG1/SprF1 TAS, encoded in a pathogenicity island. We showed that cross-interactions affecting sprG and SprF RNA level can occur between sprG/SprF homologous TAS, but without any impact on the specific neutralization of a sprG toxin by its SprF antitoxin. We demonstrated that overexpression of sprG2- and sprG3-encoded peptide induce bacteriostasis, as opposed to the *sprG1*-encoded peptides that induced *S. aureus* death. We showed that sprG and SprF RNA levels can be modulated by environmental triggers such as hyperosmotic and oxidative stresses. Concerning sprG1/SprF1, we demonstrated in S. aureus strain N315 that the SprF1 antitoxin could be involved in persister cells formation, by a translation attenuation mechanism via its association with the ribosomes. SprF1 is the first example of an untranslated RNA antitoxin with a dual function that neutralize sprG1 toxin and that bind to ribosome to attenuate S. aureus translation. Altogether, these thesis experiments suggest an involvement of the sprG/SprF TAS in S. aureus adaptation to antibiotic stress or in the escape of the immune system.