



**HAL**  
open science

# SprG1/SprF1, un système toxine-antitoxine de staphylococcus aureus : caractérisation, analyse du targetome de l'antitoxine SprF1 et lien avec la tolérance aux antibiotiques

Emeline Ostyn

## ► To cite this version:

Emeline Ostyn. SprG1/SprF1, un système toxine-antitoxine de staphylococcus aureus : caractérisation, analyse du targetome de l'antitoxine SprF1 et lien avec la tolérance aux antibiotiques. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2024. Français. NNT : 2024URENB016 . tel-04948520

**HAL Id: tel-04948520**

**<https://theses.hal.science/tel-04948520v1>**

Submitted on 14 Feb 2025

**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.

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES

ECOLE DOCTORALE N° 637

*Sciences de la Vie et de la Santé*

Spécialité : Microbiologie, Virologie, Parasitologie

Par **Emeline OSTYN**

## **SprG1/SprF1, un système toxine-antitoxine de *Staphylococcus aureus* : caractérisation, analyse du targetome de l'antitoxine SprF1 et lien avec la tolérance aux antibiotiques**

Thèse présentée et soutenue à l'Université de Rennes, le mercredi 19 juin 2024

Unité de recherche : INSERM U1230 – Bacterial RNAs and Medicine (BRM)

### Rapporteurs avant soutenance :

Sophie HELAINE      Assistant Professor  
Olga SOUTOURINA    Professeure d'Université

Harvard Medical School, Boston, Etats-Unis  
I2BC, CNRS UMR9198, Gif-sur-Yvette

### Composition du Jury :

Présidente : Olga SOUTOURINA

Professeure d'Université      I2BC, CNRS UMR9198, Gif-sur-Yvette

Examineurs : Sophie HELAINE  
Olga SOUTOURINA  
Laurence VAN MELDEREN  
Jérôme JOSSE

Assistant Professor  
Professeure d'Université  
Professeure d'Université  
Maître de Conférences  
Harvard Medical School, Boston, Etats-Unis  
I2BC, CNRS UMR9198, Gif-sur-Yvette  
Université libre de Bruxelles, Gosselies, Belgique  
CIRI, INSERM U1111 - CNRS UMR5308, Lyon

Dir. de thèse : Marie-Laure PINEL-MARIE

Maître de Conférences      Université de Rennes, INSERM U1230 BRM, Rennes

Co-dir. de thèse : Yoann AUGAGNEUR

Professeur d'Université      Université de Rennes, INSERM U1230 BRM, Rennes



# Remerciements

15 octobre 2020 - 19 juin 2024...3 ans, 8 mois et 4 jours...A présent, le clap de fin retentit, par ces derniers mots je clôture mes presque 4 années de thèse rythmées de joies, de réussites, de doutes et de certains échecs. Ces années ont surtout été marquées par de nombreuses rencontres qui ont toutes participé à la réussite de ce travail et, je tiens à les en remercier.

Tout d'abord, je souhaiterais remercier les membres de mon jury **Sophie Helaine**, **Olga Soutourina**, **Laurence Van Melderen** et **Jérôme Josse** pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie également l'AID, la région Bretagne et la FRM pour le financement de ce projet.

A mes directeurs de thèse, **Marie-Laure Pinel-Marie** et **Yoann Augagneur**, un immense merci. Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude pour votre encadrement, votre disponibilité et vos précieux conseils qui m'ont accompagnée tout au long de ma thèse. Merci de m'avoir encouragée dans mes projets « extra-laboratoire » comme lors de ma participation à « Ma thèse en 180s » ou au « TED<sup>x</sup>Rennes Youth ». **Marie-Laure**, on n'a pas vu le temps passer ! Merci pour ta gentillesse, c'était toujours agréable de discuter de sciences (mais pas que) avec toi. Une petite mention spéciale pour ta positivité et ton optimisme constants, notamment devant certains de mes résultats pour lesquels je ne savais pas trop quoi penser. **Yoann**, je savais que je pouvais toujours te demander de l'aide, en particulier lorsque mes manips ne fonctionnaient pas comme prévu (Ah, la joie des clonages, ces plasmides n'en font qu'à leur tête). Merci d'avoir essayé de me transmettre ta rigueur et tes connaissances scientifiques.

Bien sûr, si mes années de thèse se sont si bien passées, et si c'était toujours un plaisir de venir travailler, c'est grâce à vous, « les Staphounets » de la première heure : **Chachou**, **JB**, **Laurence**, **Marie**, **Maë** et **Chloé**. On en a placardé des photos sur le mur des activités (carnaval, courses d'orientation, escape game...) et on en a vécu des péripéties : les Staphounets se perdent à Brocéliande, les Staphounets font une escapade kayak tumultueuse, les Staphounets cherchent un étang au moulin, les Staphounets vont pêcher des palourdes...ça en fait des histoires à raconter...mais après tous ces moments partagés est arrivé le plus dur des chapitres, les Staphounets se séparent pour vivre chacun de nouvelles aventures...

**Chachou**, tu as été la première à partir du labo et tu as laissé un grand vide derrière toi. Tu étais toujours l'une des premières à proposer d'organiser une sortie ou un weekend... c'est vrai qu'après ton départ, les weekends se sont faits plus rares ! Je suis contente de savoir que tu te plaisais tant à Marseille !

**JB**, merci pour ta joie de vivre et ton sourire communicatif. Grâce à toi on a bien ri avec ta fameuse « danse à la JB » et tes magnifiques dessins à l'esquissé...le Mont-Saint-Michel ne sera plus jamais convoité par la Bretagne et la Normandie.

**Laurence**, ma consœur du système SprG1/SprF1, tu as été la première à me faire découvrir le centre de Rennes (et pourtant tu es arrivée après moi !). Merci de m'avoir si souvent écoutée (me plaindre parfois) en essayant toujours de me donner un conseil ou de trouver une solution. Ton énergie m'épuisera toujours !

**Marie**, mille mercis... quand tu es arrivée dans mon bureau, je ne savais pas que ce serait le début d'une si belle amitié. Je sais que je pouvais toujours compter sur ton enthousiasme quand je te parlais de mes projets graphiques ! Je garde précieusement en mémoire tous les moments que l'on a passés ensemble : nos longues discussions, les séances piscines, les mille et un tours au parc des Gayeulles, les après-midi jeux de société...et j'espère qu'on en ajoutera beaucoup d'autres à cette liste. Je te remercie aussi de m'avoir tant de fois laissé squatter ton canapé si confortable, notamment dans une période où j'avais du mal à rester seule chez moi (pardon d'avoir si souvent vidé tes paquets de pâtes).

**Chloé** et **Maë**, mes sœurs de thèse...du fond du cœur...**MERCI** ! Je n'aurais jamais pensé créer une si forte complicité avec vous mais maintenant je peux le dire : Vous avez rendu ma thèse inoubliable ! Les mots que j'écrirai ici ne suffiront pas pour vous dire à quel point votre soutien a été essentiel pour moi. J'ai toujours pu compter sur vous, dans les bons et les mauvais moments, et souvent une simple discussion avec vous pouvait illuminer ma journée. Alors, je dis merci à toutes nos failles temporelles, nos ralliements potins et à tous ces moments mémorables qui ont contribué à mon bonheur quotidien. **Maë**, merci de m'avoir tant fait rire avec tes anecdotes rocambolesques qui n'arrivent qu'à toi (je ne serai pas toujours là pour t'empêcher de les divulguer devant un public non approprié), c'était toujours agréable de faire des sorties avec toi (même si parfois on pouvait atterrir à Bedée plutôt qu'à Pleumeleuc). **Chloé**, nos séances souffrances du mardi et nos dates McDo me manqueront.

Merci pour ton écoute et d'être parfois restée tard le soir pour me tenir compagnie le temps que je finisse mes manip. J'espère qu'on restera longtemps en contact, «I'll always be around wherever life takes you», comme dirait Imagine Dragons. Si mon bureau vous semble vide, dites-vous que toutes nos discussions, nos fous rires, continueront à résonner dans chacune des pièces du labo et qu'ils vous accompagneront jusqu'à la fin de vos thèses.

Au cours de ces années, les Staphounets ont accueilli de nombreux adeptes : **Kévin H., Elisabete, Simon, Julie** (merci pour les barbecues et les soirées raclettes dans ta maison du bout du monde), **Delphine** (merci d'être venue me faire des petits coucou le samedi quand tu voyais de la lumière dans mon bureau), **Charlotte M., Claire** (quelle bonne idée ces afterworks et merci pour tous ces petits gâteaux bretons), **Malo**. Et les derniers arrivés : **Albane** (j'ai beaucoup aimé partager des failles temporelles avec toi et partir à la recherche de ton sac à dos), **Nour, Hugo et Benjamin**. Merci à tous pour les bons moments partagés ensemble et d'avoir apporté une dose de fraîcheur et de bonne humeur au labo ! J'aurais aimé rester encore un peu pour pouvoir passer plus de temps avec vous.

Travailler dans un labo, c'est aussi l'occasion de rencontrer de nombreuses personnes qui viennent passer quelques mois pour un stage de recherche, je pense notamment à **Yvon, Julia, Anaïs P., Gabriella, Adrien** (quel bonheur ces kilos de gavottes !), **Loïza, Aminata**,... Un message particulier pour deux d'entre eux avec qui j'ai eu la chance de travailler :

**Thomas V.**, mon acolyte de début de thèse avec qui j'ai fait mes premiers pas en culture cellulaire. Merci pour tous nos papotages dans ton « bureau cagibi ». Mon seul regret ? Que tu aies dû partir 3 mois plus tôt que prévu...mais une thèse en Italie ça ne se refuse pas !

**Hugo**, les résultats de ton stage de M1 n'ont pas toujours été ceux attendus, mais tu as gardé ta motivation jusqu'à la fin ! Merci pour ta bonne humeur, pour ces quelques mois de cohabitation dans le bureau et pour nos petites discussions qui venaient en rompre le silence. Je te souhaite le meilleur pour ta thèse !

Je n'oublie pas de remercier également l'ensemble des membres de l'U1230 : **Noëlla**, tu n'as pas la tâche la plus facile au labo mais c'est sûr qu'il tournerait beaucoup moins bien sans toi (merci pour les restos et les soirées passés ensemble, quel déhanché au club 80 !), **Astrid** (merci pour les séances psychologies et pour tes théories qui nous font parfois beaucoup rire), **Vincent, Valérie** (l'AKTA a résisté mais je te remercie d'avoir essayé de le refaire fonctionner),

**Sveta, Hélène, Sophie M., Anne, Nathalie** et **Tiphaine** (merci pour les organisations de congrès, les réservations de trains et d'hôtels. Tu es au top !). Un grand merci pour tous vos conseils scientifiques et j'ai beaucoup aimé pouvoir partager des afterworks, des repas de Noël, des raclettes party et des barbecues de fin d'année avec vous !

Un petit mot spécial pour **Médusa**, mon compagnon de thèse insolite, un champignon étrange qui a poussé dans l'un de mes milieux de culture. J'ai promis de te garder jusqu'à la fin de ma thèse, malheureusement, tu vas bientôt finir javéliné !

En dehors du laboratoire, je souhaiterais aussi remercier **Marc Hallier**. Un grand merci pour ton aide pour les ribosomes et pour ces discussions scientifiques passionnantes qui m'ont donné beaucoup d'idées pour la discussion de ce manuscrit.

J'ai aussi une pensée pour **Delphine Lechardeur**, qui m'a encadrée lors de mon stage de Master 2. Faire une thèse n'était pas forcément mon objectif avant mon M2, mais tu m'as transmis ton goût pour la recherche et tu m'as encouragée à continuer. Je te remercie également de m'avoir donné l'opportunité de participer à mon premier article scientifique.

Au-delà des frontières bretonnes, j'aimerais écrire quelques mots pour mes amies de longues dates (elles sont loin les années collèges et lycées !) : **Marina, Agathe** et **Kérianne**. Je sais que ça n'a pas été facile de garder le contact mais sachez que j'ai souvent pensé à vous et que j'apprécie toujours nos moments passés ensemble.

A ma famille,

**Thierry**, merci d'avoir toujours été disponible pour m'aider, me conseiller et répondre à mes questions. Je te remercie aussi d'avoir été si présent pour mon installation en Bretagne. J'aurais tant aimé que tu puisses lire ces lignes qui, je l'espère, te parviendront par-delà les étoiles.

A mes grands-parents, **Mamie, Papy**, je suis heureuse et reconnaissante d'avoir pu passer une grande partie de mon enfance à vos côtés, vous avez une place spéciale dans mon cœur. Je vous remercie d'être là pour moi, à votre façon, même si vous ne comprenez pas forcément en quoi consiste mon travail quotidien (non Mamie, je sais que je te parlais souvent de mes « cultures », mais je ne travaille pas dans l'agriculture).

**Alexis**, mon frère, je sais qu'on ne se le dit pas souvent mais sache que tu comptes énormément pour moi. Entre ton travail et le mien, nous n'avons pas eu l'occasion de passer beaucoup de temps ensemble ces dernières années. Heureusement, on pouvait tout de même profiter de quelques jours de vacances chaque été pour rester de longues heures à la plage et essayer de battre notre record de km à vélo !

**Maman**, tu m'as toujours soutenue dans mes choix et je sais que si j'ai pu réaliser cette thèse, c'est grâce à toi. Pourtant, comme tu me l'as récemment rappelé, au début de ma thèse « c'était pas gagné ». C'est vrai, les premiers mois, entre le confinement et le fait d'avoir dû quitter la maison dans laquelle j'ai grandi, ça a été très compliqué... Mais tu as été là pour moi, pour m'écouter pleurer de longues minutes au téléphone et me remonter le moral jusqu'à ce que j'aie mieux. Au fond, je savais que je ne pouvais pas abandonner, pas après tout ce que tu avais fait pour moi pour mon emménagement en Bretagne. A présent je peux le dire, tu avais raison « Quand on va en Bretagne on pleure 2 fois, quand on arrive et quand on repart » parce que oui, maintenant, je n'ai plus envie d'en partir. Maman, merci de m'avoir si bien accompagnée dans tous les moments de ma vie. Je t'aime infiniment !

Je ne pourrai pas achever ces remerciements sans un petit mot pour toi, **Erwann**. Bientôt 8 ans partagés ensemble, je sais que mon travail a pris beaucoup de place ces derniers temps et que ça n'a pas été facile de gérer la distance. Merci d'avoir été si patient et d'être si souvent venu me voir dans ma petite maison bretonne. J'espère que la fin de ma thèse marquera aussi un nouveau départ pour nous.

Finalement, le plus dur dans la thèse ce n'est ni les manips qui ne fonctionnent pas, ni la rédaction du manuscrit, non, le plus dur c'est de devoir dire au revoir à toutes les personnes formidables que l'on a rencontrées au cours de ces années et avec qui tant d'heures heureuses se sont écoulées. Personnellement ce qui me rend le plus triste, c'est de me dire qu'après ce 19 juin 2024, je ne pourrai plus, comme je pouvais le faire presque tous les jours depuis plus de 3 ans, vous dire un mot simple et pourtant si important à mes yeux...**à demain...**





# Sommaire

---

Liste des figures .....	3
Liste des tableaux .....	6
Liste des abréviations.....	7
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>11</b>
<b>I. Antibiotiques vs bactéries : La guerre est déclarée</b> .....	<b>12</b>
i. Découverte des antibiotiques...et de l'antibiorésistance .....	12
ii. L'antibiorésistance .....	13
ii.i. Caractéristiques .....	13
ii.ii. Une menace pour la santé publique .....	15
<b>II. <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	<b>18</b>
i. Découverte et caractéristiques.....	18
ii. La colonisation humaine .....	20
iii. Un agent pathogène .....	23
iii.i. Infections humaines causées par <i>S. aureus</i> .....	23
iii.i.i. Les infections suppuratives superficielles .....	24
iii.i.ii. Les infections suppuratives systémiques.....	24
iii.i.iii. Les infections toxiques .....	26
iii.ii. Un arsenal de facteurs de virulence .....	27
iii.ii.i. Les adhésines et la colonisation de l'hôte .....	27
iii.ii.ii. Les facteurs sécrétés .....	30
iii.iii. Régulation de la virulence de <i>S. aureus</i> .....	33
iii.iii.i. Les systèmes à deux composants .....	34
iii.iii.ii. Les facteurs sigma et les facteurs de transcription.....	36
iii.iii.iii. Les ARN régulateurs .....	37
iv. <i>S. aureus</i> contre le système immunitaire et les antibiotiques .....	41
iv.i. Inhibition de la phagocytose et survie intracellulaire .....	41
iv.ii. Les Small Colony Variants.....	45
iv.iii. Une vie sous forme de biofilms.....	46
iv.iv. Résistance aux antibiotiques .....	49
<b>III. La persistance/tolérance aux antibiotiques</b> .....	<b>51</b>
i. Définition et historique .....	51
ii. Résistance, tolérance, persistance : quelles différences ? .....	52
iii. Détection des bactéries tolérantes/persistantes .....	53
iv. Mécanismes impliqués dans la formation des persisters.....	54
iv.i. Réponse SOS, réponse stringente et quorum-sensing .....	55
iv.ii. L'hibernation des ribosomes.....	57
iv.iii. Les bactéries persistantes métaboliquement actives .....	58
v. La tolérance/persistance chez <i>S. aureus</i> .....	58
vi. Impact clinique et traitements .....	59
vi.i. Les persisters et les échecs thérapeutiques .....	59
vi.ii. Les persisters : acteurs de la dissémination de la résistance et de la virulence ? .....	60
vi.iii. Stratégies thérapeutiques anti-persisters.....	61

<b>IV. Les systèmes toxine-antitoxine</b> .....	63
i. Caractéristiques générales .....	63
i.i. Définition .....	63
i.ii. Classification des systèmes TA .....	64
i.iii. Régulation de l'expression des systèmes TA.....	67
<b>Article 1</b> .....	69
i.iv. Fonctions biologiques et applications .....	98
ii. Les systèmes TA de type I et la persistance aux antibiotiques.....	100
iii. Les systèmes TA de type I chez <i>S. aureus</i> .....	102
iii.i. Systèmes SprA/SprA <sub>AS</sub> .....	102
iii.ii. Systèmes SprG/SprF.....	102
<b>CONTEXTE DE LA THESE</b> .....	107
<b>RESULTATS</b> .....	111
<b>I. Partie 1 : Etude de la régulation de l'expression du système SprG1/SprF1 et de son implication dans la formation de biofilms</b> .....	112
i. Régulation de l'expression du locus <i>sprG1/sprF1</i> .....	112
ii. Rôle de SprG1/SprF1 sur la formation de biofilms .....	119
<b>II. Partie 2 : Identification des cibles moléculaires de SprF1</b> .....	124
i. Recherche des cibles ARN de SprF1.....	126
<b>Article 2</b> .....	131
ii. Résultats complémentaires.....	173
ii.i. Interaction des antitoxines SprF2, SprF3 et SprF4 avec <i>yidC</i> et <i>rpmE2</i> .....	173
ii.ii. La tolérance induite par la surexpression de <i>rpmE2</i> est dose dépendante .....	176
iii. Recherche des cibles protéiques de SprF1.....	179
<b>III. Partie 3 : Impact du système SprG1/SprF1 sur le protéome de <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	180
<b>Article 3</b> .....	183
<b>CONCLUSION</b> .....	213
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b> .....	217
<b>COMMUNICATIONS</b> .....	235
Communications orales .....	236
Communications par affiches .....	237
Enseignements et diffusion scientifique .....	243
<b>RÉFÉRENCES</b> .....	245
Références internet .....	246
Références bibliographiques .....	247

## Liste des figures

---

<b>Figure 1</b> : Chronologie de la découverte des antibiotiques et des résistances associées.....	13
<b>Figure 2</b> : Mécanismes de résistance aux antibiotiques utilisés par les bactéries. ....	14
<b>Figure 3</b> : Nombre de décès dus aux bactéries résistantes en Europe en 2015.....	16
<b>Figure 4</b> : Consommation d'antibiotiques en Europe en 2021.....	16
<b>Figure 5</b> : Liste des agents pathogènes prioritaires pour la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques.....	17
<b>Figure 6</b> : Observation de <i>Staphylococcus aureus</i> par microscopie électronique.....	18
<b>Figure 7</b> : Carte d'identité de la bactérie <i>Staphylococcus aureus</i> .....	19
<b>Figure 8</b> : Mécanismes d'adhésion de <i>Staphylococcus aureus</i> aux cellules épithéliales de la cavité nasale humaine.....	21
<b>Figure 9</b> : Effet des membres du microbiote sur la colonisation nasale de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	22
<b>Figure 10</b> : Localisation des infections humaines causées par <i>Staphylococcus aureus</i> .....	23
<b>Figure 11</b> : Les adhésines produites par <i>Staphylococcus aureus</i> et impliquées dans la colonisation de l'hôte.....	27
<b>Figure 12</b> : Vue d'ensemble des facteurs de virulence sécrétés par <i>S. aureus</i> .....	30
<b>Figure 13</b> : Formation de pores membranaires par l' $\alpha$ -hémolysine.....	31
<b>Figure 14</b> : Représentation de quelques facteurs impliqués dans la régulation de la virulence de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	33
<b>Figure 15</b> : Fonctionnement du système de quorum-sensing Agr.....	35
<b>Figure 16</b> : Localisation génomique des ARN régulateurs et mécanismes d'action.....	37
<b>Figure 17</b> : Stratégies utilisées par <i>Staphylococcus aureus</i> pour se défendre contre le système immunitaire.....	42
<b>Figure 18</b> : Stratégies mises en place par <i>Staphylococcus aureus</i> pour survivre dans le phagolysosome.....	44
<b>Figure 19</b> : Etapes de la formation du biofilm par <i>Staphylococcus aureus</i> .....	46
<b>Figure 20</b> : Organisation génétique de l'opéron <i>icaADBC</i> et formation du PIA.....	47
<b>Figure 21</b> : Mécanismes de résistance de <i>Staphylococcus aureus</i> à la pénicilline, la méticilline et la vancomycine.....	50
<b>Figure 22</b> : Chronologie de quelques découvertes en lien avec les bactéries persistantes.....	51
<b>Figure 23</b> : Différences entre résistance, tolérance et persistance aux antibiotiques.....	52
<b>Figure 24</b> : Exemples de méthodes utilisées pour détecter les bactéries tolérantes et persistantes aux antibiotiques.....	54
<b>Figure 25</b> : Représentation des principales voies de signalisation impliquées dans la formation des bactéries persistantes.....	56
<b>Figure 26</b> : Etapes de la formation des ribosomes 100S chez <i>Staphylococcus aureus</i> .....	57
<b>Figure 27</b> : Réservoirs de bactéries persistantes au sein de l'hôte.....	60
<b>Figure 28</b> : Approches thérapeutiques visant à éliminer les bactéries persistantes.....	61

<b>Figure 29</b> : Aperçu de la diversité des cibles cellulaires sur lesquelles peuvent agir les toxines issues de systèmes toxine-antitoxine. ....	63
<b>Figure 30</b> : Classification des huit types de systèmes toxine-antitoxine. ....	64
<b>Figure 31</b> : Principales fonctions biologiques et applications des systèmes TA.....	99
<b>Figure 32</b> : Rôle des systèmes TA de type I TisB/IstR-1 et HokB/SokB dans la persistance aux antibiotiques. ....	101
<b>Figure 33</b> : Localisation génomique des systèmes TA de type I <i>sprA1/sprA1<sub>AS</sub></i> et <i>sprA2/sprA2<sub>AS</sub></i> dans la souche NCTC8325 de <i>Staphylococcus aureus</i> et cibles des toxines SprA1 et SprA2. ....	103
<b>Figure 34</b> : Localisation génomique des systèmes <i>sprG2/sprF2</i> , <i>sprG3/sprF3</i> et <i>sprG4/sprF4</i> dans la souche NCTC8325 de <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	103
<b>Figure 35</b> : Localisation génomique et caractéristiques du système SprG1/SprF1 de <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	105
<b>Figure 36</b> : Représentation des trois objectifs de ce travail de thèse.....	109
<b>Figure 37</b> : Effet de différents stress sur le niveau d'expression de <i>sprG1</i> et SprF1. ....	114
<b>Figure 38</b> : Rôle de régulateurs transcriptionnels sur le niveau des ARN <i>sprG1</i> et SprF1..	116
<b>Figure 39</b> : Etude de l'activité des promoteurs <i>psprF1</i> et <i>psprG1</i> à l'aide d'une fusion transcriptionnelle. ....	118
<b>Figure 40</b> : Rôle du système SprG1/SprF1 sur la formation de biofilms. ....	120
<b>Figure 41</b> : Quantification de la production de PIA. ....	122
<b>Figure 42</b> : Rôle du système SprG1/SprF1 sur la formation de biofilms en présence de ciprofloxacine. ....	123
<b>Figure 43</b> : Niveau d'expression des ARN <i>sprG1</i> et SprF1 en condition planctonique et en biofilm.....	123
<b>Figure 44</b> : Aperçu des différentes étapes de l'analyse MAPS.....	124
<b>Figure 45</b> : L'induction à l'anhydrotétracycline des constructions MS2-SprF1 et SprF1-MS2 n'est pas toxique. ....	125
<b>Figure 46</b> : Purification de la protéine MBP-MS2p par chromatographie.....	126
<b>Figure 47</b> : Profil des bibliothèques d'ADNc avant l'analyse RNA-seq.....	127
<b>Figure 48</b> : La protéine YidC-FLAG est localisée à la membrane.....	129
<b>Figure 49</b> : SprF1, une antitoxine de type I multifonctionnelle.....	130
<b>Figure 50</b> : Identification des zones d'interactions potentielles entre les antitoxines SprF2, SprF3 et SprF4 et l'ARNm <i>yidC</i> .....	173
<b>Figure 51</b> : Identification des zones d'interactions potentielles entre les antitoxines SprF2, SprF3 et SprF4 et l'ARNm <i>rpmE2</i> .....	174
<b>Figure 52</b> : La délétion des quatre systèmes SprG/SprF n'a pas d'effet sur l'expression de la protéine YidC. ....	175
<b>Figure 53</b> : Le plasmide pCN33- <i>rpmE2</i> entraîne une surexpression de l'ARNm <i>rpmE2</i> . ....	176
<b>Figure 54</b> : La surexpression de l'ARNm <i>rpmE2</i> par le plasmide pCN33 ne modifie pas la croissance bactérienne.....	177
<b>Figure 55</b> : La surexpression de l'ARNm <i>rpmE2</i> par le plasmide pCN33 n'a pas d'effet sur la tolérance à la ciprofloxacine. ....	178

<b>Figure 56</b> : Visualisation des protéines enrichies dans les conditions MS2-SprF1 et SprF1-MS2 en comparaison de la condition MS2 seule. ....	179
<b>Figure 57</b> : Résumé des principaux résultats de ce travail de thèse.....	214
<b>Figure 58</b> : Organisation génétique de cinq prophages de la famille $\phi$ Sa3 issus de différentes souches de <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	222
<b>Figure 59</b> : Structures prédictives des ARN SprF1, MS2-SprF1 et SprF1-MS2.....	224
<b>Figure 60</b> : Séquence de l'ARNm <i>rpmE2</i> . ....	225
<b>Figure 61</b> : Représentation schématique de l'intégration des protéines membranaires <i>via</i> le translocon SecYEG ou l'insertase YidC.....	228
<b>Figure 62</b> : Courbes de survie à la ciprofloxacine. ....	230

## Liste des tableaux

---

<b>Tableau 1</b> : Fonctions des cytotoxines de <i>S aureus</i> et infections humaines associées. ....	32
<b>Tableau 2</b> : Principaux ARNreg exprimés par <i>S. aureus</i> : cibles identifiées et fonctions. ....	40
<b>Tableau 3</b> : Mécanismes d'internalisation de <i>S. aureus</i> dans les cellules eucaryotes. ....	43
<b>Tableau 4</b> : Principaux régulateurs participant à la vie du biofilm. ....	48
<b>Tableau 5</b> : Liste des cibles de SprF1 identifiées par l'analyse MAPS. ....	127
<b>Tableau 6</b> : Valeurs de CMI de la ciprofloxacine. ....	177
<b>Tableau 7</b> : Valeurs des MDK <sub>99</sub> et MDK <sub>99,99</sub> de la ciprofloxacine. ....	178

## Liste des abréviations

---

<b><math>\sigma</math>B</b> : Facteur sigma B	<b>MSCRAMM</b> : Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecule
<b>ADAM-10</b> : A Disintegrin and Metalloprotease 10	<b>MSSA</b> : <i>S. aureus</i> sensible à la méticilline
<b>ADNc</b> : ADN complémentaire	<b>MS2</b> : Aptamère MS2
<b>ADNe</b> : ADN extracellulaire	<b>NEAT</b> : Near iron Transporter
<b>Agr</b> : Accessory gene regulator	<b>NET</b> : Neutrophil extracellular traps
<b>AIP</b> : Peptide auto-inducteur	<b>OMS</b> : Organisation Mondiale de la Santé
<b>ARNm</b> : ARN messenger	<b>ORF</b> : Cadre ouvert de lecture
<b>ARNreg</b> : ARN régulateur	<b>PBPs</b> : Penicillin binding proteins
<b>aTc</b> : Anhydrotétracycline	<b>PBS</b> : Tampon phosphate salin
<b>Atl</b> : Autolysine	<b>PIA</b> : Adhésine polysaccharide intercellulaire
<b>Aur</b> : Auréolysine	<b>PMF</b> : Force proton-motrice
<b>Bbp</b> : Bone-sialo binding protein	<b>PNA</b> : Peptide Nucleic Acids
<b>BHI</b> : Brain Heart Infusion	<b>PSK</b> : Post-segregational killing
<b>BSa</b> : Bactériémie à <i>S. aureus</i>	<b>PSMs</b> : Phenol-Soluble Modulins
<b>C5a et C3a</b> : Complement component	<b>PVL</b> : Leucocidine de Panton-Valentine
<b>CHIPS</b> : Chemotaxis inhibitory protein of <i>Staphylococcus</i>	<b>QS</b> : Quorum-sensing
<b>Cif</b> : Clumping factor	<b>RBS</b> : Ribosome Binding Site
<b>CMB</b> : Concentration minimale bactéricide	<b>RBP</b> : Protéine liant les ARN
<b>CMI</b> : Concentration minimale inhibitrice	<b>RLU</b> : Luminescence
<b>Coa</b> : Coagulase	<b>RMF</b> : Ribosome Modulation Factor
<b>CWA</b> : Cell Wall-Anchored	<b>RNA-seq</b> : Séquençage des ARN
<b>CXCR2</b> : Chemokine receptor 2	<b>RNS</b> : Reactive Nitrogen Species
<b>DO</b> : Densité optique	<b>RNases</b> : Ribonucléases
<b>Eap</b> : Extracellular adherence protein	<b>ROS</b> : Reactive Oxygen Species
<b>EDIN</b> : Epidermal cell differentiation inhibitor	<b>Rpm</b> : Revolutions per minute
<b>Efb</b> : Extracellular fibrinogen-binding protein	<b>Rsa</b> : RNA of <i>S. aureus</i>
<b>Ei</b> : Endocardite infectieuse	<b>RT-qPCR</b> : PCR quantitative après transcription inverse
<b>Emp</b> : Extracellular matrix and plasma binding protein	<b>SaeRS</b> : <i>S. aureus</i> exoprotein expression
<b>Esp</b> : Extracellular serine protease	<b>Sak</b> : Staphylokinase
<b>ETs</b> : Toxines exfoliatives	<b>Sar</b> : Staphylococcal accessory regulator
<b>FLIPr</b> : FPR inhibitory protein	<b>SasG</b> : Surface protein G
<b>fMLP</b> : N-Formylmethionine-leucyl-phenylalanine	<b>Sbi</b> : Staphylococcal binding of IgG
<b>FnBP</b> : Fibronectin Binding Protein	<b>SCCmec</b> : Staphylococcal cassette chromosome <i>mec</i>
<b>FPR</b> : Formyl peptide receptor	<b>SCIN</b> : Staphylococcal complement inhibitor
<b>GFP</b> : Green Fluorescent Protein	<b>SCTM</b> : Syndrome de choc toxique menstruel
<b>HPF</b> : Hibernation Promoting Factor	<b>SCV</b> : Small Colony Variants
<b>Ica</b> : Intercellular adhesion	<b>SdrD</b> : Serine-aspartate repeat protein
<b>IEC</b> : Immune evasion cluster	<b>SERAM</b> : Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules
<b>IgG</b> : Immunoglobuline G	<b>SEs</b> : Entérotoxines pyrogènes
<b>IL-8</b> : Interleukine 8	<b>SI</b> : Système immunitaire
<b>Isd</b> : Iron-regulated surface determinant	<b>SNM3</b> : Synthetic nasal medium
<b>Kd</b> : Constante de dissociation	<b>Spa</b> : Protéine A
<b>Luk</b> : Leucocidine	<b>Spr</b> : Small pathogenicity island RNA
<b>MAPS</b> : MS2-Affinity Purification Coupled With RNA Sequencing	<b>SREC-I</b> : Scavenger receptor class F type I
<b>MBP</b> : Maltose Binding Protein	<b>SRP</b> : Signal recognition particle
<b>MDK</b> : Minimum duration for killing	<b>SrrAB</b> : Staphylococcal respiration response
<b>MH</b> : Mueller Hinton	<b>TA</b> : Toxine-Antitoxine
<b>MRSA</b> : <i>S. aureus</i> résistant à la méticilline	<b>TCS</b> : Two-component systems

**Teg** : Transcript from experimental method from Geneva  
**TSB** : Tryptic Soy Broth  
**TSST-1** : Toxic shock syndrome toxin-1  
**UFC** : Unité formant colonie  
**UTR** : Untranslated regions  
**VISA** : Vancomycin intermediately resistant *S. aureus*  
**VRSA** : Vancomycin resistant *S. aureus*  
**vWbp** : Protéine liant le facteur de von Willebrand  
**WTA** : Wall Teichoic Acid

—————“—————  
I have not failed. I've just found  
10 000 ways that won't work.  
(Thomas A. Edison 1847-1931)  
—————”—————





---

# Introduction

---

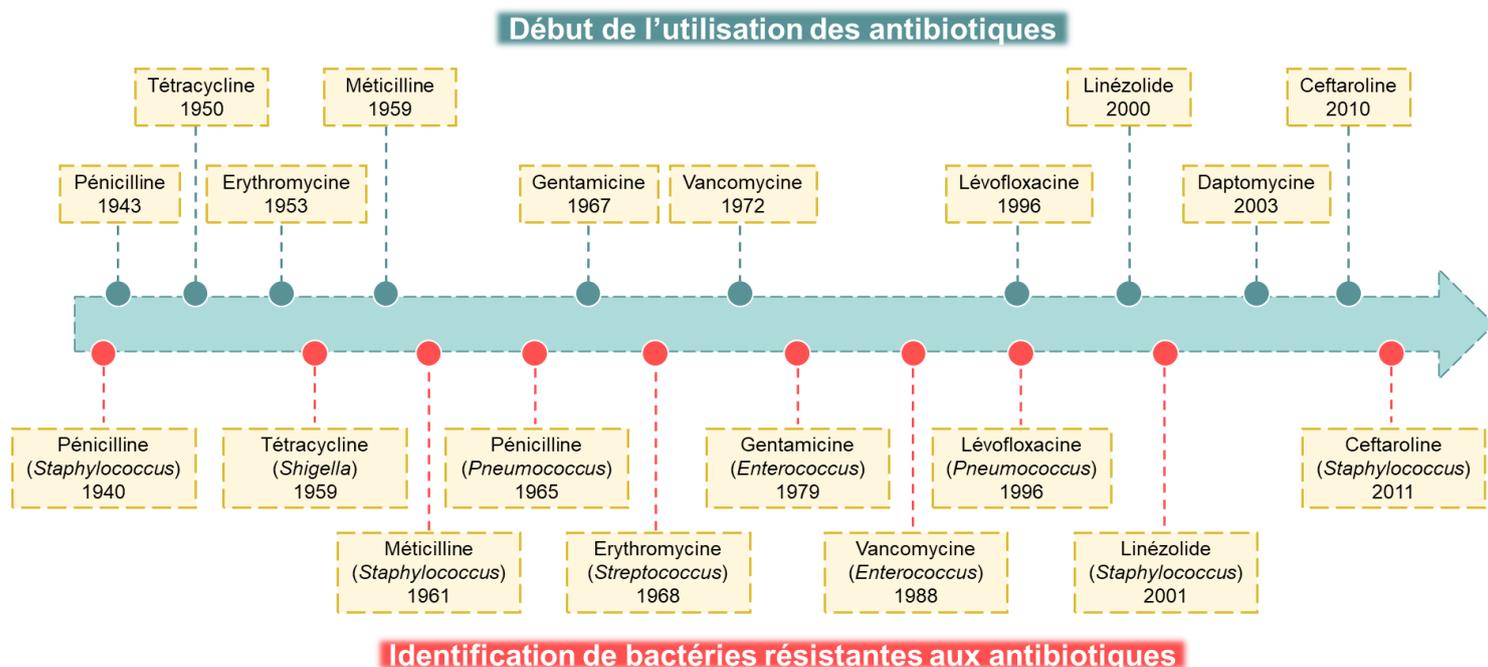
# I. Antibiotiques vs bactéries : La guerre est déclarée

## i. Découverte des antibiotiques...et de l'antibiorésistance

Entre 1347 et 1352, la peste noire a causé la mort de plus de 25 millions d'Européens (Glatter & Finkelman, 2021). De mars à septembre 1832, 100 000 personnes décèdent en France à cause d'un autre fléau : le choléra (Bourdelaïs & Raulot, 1987). Les responsables de ces tragédies ?... Des bactéries ! Ces organismes microscopiques peuvent causer de nombreuses infections chez l'Homme et, pendant longtemps, aucun traitement ne permettait de les combattre. Ainsi, au début du XX<sup>e</sup> siècle, alors que des maladies d'origine bactérienne comme la syphilis et la tuberculose font des ravages au sein de la population, les scientifiques commencent à s'intéresser aux infections bactériennes (Hutchings *et al.*, 2019). La première utilisation clinique d'un antibiotique date de 1890. Rudolf Emmerich et Oscar Löw utilisent un extrait issu de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, la Pyocyanase, comme traitement contre le choléra et le typhus. En 1910, le Salvarsan, un dérivé de l'arsenic mis au point par le médecin allemand Paul Ehrlich, est utilisé comme traitement contre la syphilis (Hutchings *et al.*, 2019). Cependant, ces premiers traitements sont peu efficaces et peu sûrs. Les premiers antimicrobiens à large spectre utilisés en clinique sont les sulfamides. Le chef de file de cette famille est le Prontosil, dont l'efficacité antibactérienne a été démontrée en Allemagne en 1935 par Gerhard Domagk (Otten, 1986). Ce dernier a rapidement utilisé ce nouveau traitement pour sauver sa fille de l'amputation d'un bras.

C'est avec la découverte puis l'utilisation du plus connu des antibiotiques, la pénicilline, que débute l'Age d'or des antibiotiques (1940-1990). La pénicilline a été découverte, par hasard, en 1928 par Alexander Fleming, un médecin britannique. Au retour de ses vacances, il s'aperçoit que des moisissures (*Penicillium notatum*) se sont développées dans une culture de staphylocoques et qu'elles en ont bloqué la croissance (Fleming, 1929). Cependant, Fleming ne parvient pas à isoler la molécule responsable de cette inhibition de croissance. Ce n'est qu'en 1938, à l'université d'Oxford, qu'Howard Florey et Ernst Boris Chain s'intéressent à la découverte de Fleming et réussissent, en 1940, à purifier la substance responsable : la pénicilline (Chain *et al.*, 1940). Cette dernière étant difficile à produire en grande quantité, les deux scientifiques demandent de l'aide aux laboratoires pharmaceutiques du Royaume-Uni mais, du fait de la Seconde Guerre Mondiale, ces derniers rejettent leur demande. Finalement, c'est avec l'aide des laboratoires pharmaceutiques américains que la production à grande échelle de la pénicilline est lancée. A partir de 1943, la pénicilline peut donc être utilisée en clinique. Efficace contre beaucoup de bactéries comme le gonocoque, le pneumocoque, le méningocoque, les bacilles du tétanos, de la diphtérie et de la syphilis, elle permet de sauver des milliers de vie. Jusque dans les années 1990, les recherches basées sur l'étude des composés naturels produits par les microorganismes ont permis de découvrir de nombreuses classes d'antibiotiques (Figure 1).

Malheureusement, lorsqu'un nouvel antibiotique est utilisé en clinique, des bactéries résistantes à cet antibiotique sont rapidement mises en évidence. Dans le cas de la pénicilline, des staphylocoques résistants avaient même été identifiés avant le début de son application clinique. Pour la lévofloxacine, des pneumocoques résistants ont été découverts dès 1966, c'est-à-dire l'année du début de son utilisation. De ce fait, l'utilisation des antibiotiques semble intimement liée avec l'émergence de bactéries résistantes : ce phénomène, c'est l'antibiorésistance (**Figure 1**).



**Figure 1 : Chronologie de la découverte des antibiotiques et des résistances associées.** Les dates des découvertes sont en bleu et celles des résistances en rouge. (Source : rapport Centers for Disease Control and prevention, 2013 [1])

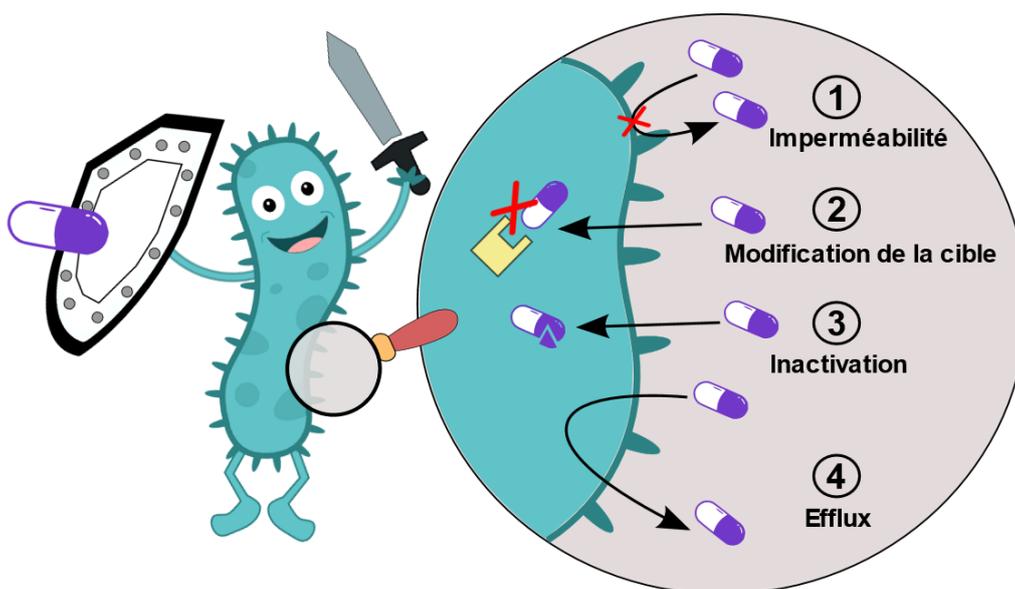
## ii. L'antibiorésistance

### ii.i. Caractéristiques

Les antibiotiques sont des molécules, naturelles ou synthétiques, qui permettent de traiter les infections bactériennes en tuant les bactéries (effet bactéricide) ou bien en empêchant leur multiplication (effet bactériostatique). Ils sont classés en plusieurs familles et peuvent agir sur les bactéries en perturbant des mécanismes essentiels à la vie cellulaire (réplication, transcription, traduction, synthèse de la paroi...). L'antibiorésistance est définie comme la capacité des bactéries à contrer l'action des antimicrobiens. Dans ce cas, l'antibiotique n'est plus efficace pour inhiber la croissance bactérienne. La résistance est due à la présence d'un (ou plusieurs) gène(s) de résistance au sein de la bactérie ce qui en fait un mécanisme génétiquement héritable. La résistance des bactéries aux antibiotiques peut être naturelle ou acquise ([Reygaert, 2018](#)). La résistance naturelle est une caractéristique présente chez toutes les bactéries de la même espèce ou du même genre bactérien. Au contraire, la résistance acquise n'est présente que chez certaines souches d'une même espèce ou du même genre.

L'apparition de la résistance acquise est due à des modifications génétiques : des mutations ou l'acquisition, par transfert horizontal, de gènes de résistance souvent portés par des éléments génétiques mobiles comme les plasmides et les transposons. Quatre mécanismes peuvent être à l'origine de la résistance des bactéries aux antibiotiques (**Figure 2**) :

- **Imperméabilité** : Ce premier mécanisme consiste à bloquer l'entrée de l'antibiotique dans la cellule bactérienne en modifiant la perméabilité membranaire ([Christaki et al., 2020](#)). Dans ce cas, des mutations peuvent modifier la fonction ou l'expression des porines, protéines membranaires formant des canaux qui permettent la diffusion de petites molécules hydrophiles à travers la membrane. L'action des antibiotiques hydrophiles comme les  $\beta$ -lactamines, les quinolones et les tétracyclines est donc impactée par ce mécanisme de résistance.
- **Modification de la cible** : La modification de la cible est à l'origine d'une perte d'affinité entre l'antibiotique et sa cible ([Christaki et al., 2020](#)). Par exemple, chez les entérocoques porteurs du gène de résistance *vanA*, le dipeptide terminal D-Alanine-D-Alanine du peptidoglycane est remplacé par un dipeptide D-Alanine-D-Lactate ce qui bloque la fixation de la vancomycine. Cette dernière ne peut donc plus inhiber la synthèse de la paroi.
- **Inactivation** : La résistance par inactivation de l'antibiotique est due à la production d'enzymes qui agissent soit en modifiant ou en détruisant l'antibiotique. Par exemple, les  $\beta$ -lactamases sont impliquées dans la résistance aux  $\beta$ -lactamines. Ces enzymes hydrolysent la liaison amide de l'anneau  $\beta$ -lactame ce qui détruit l'antibiotique ([Darby et al., 2023](#)).
- **Efflux** : Les systèmes d'efflux sont composés de protéines membranaires qui permettent le transport actif, à l'extérieur de la cellule bactérienne, de composés toxiques comme les antibiotiques. Chez *Escherichia coli*, le système d'efflux AcrAB-TolC confère une résistance à plusieurs antibiotiques dont l'érythromycine ([Darby et al., 2023](#); [Nishino et al., 2021](#)).



**Figure 2** : Mécanismes de résistance aux antibiotiques utilisés par les bactéries.

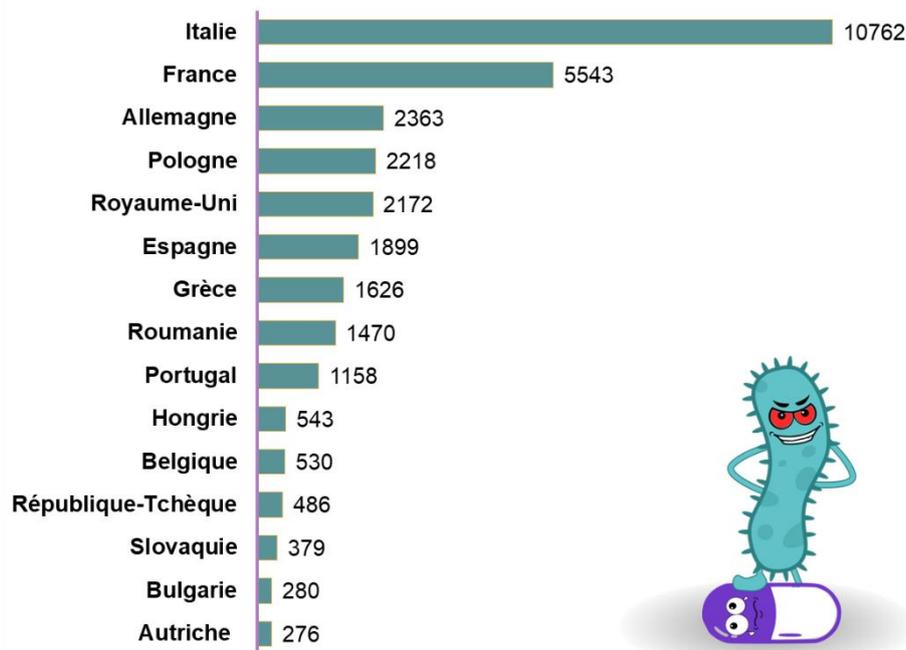
## ii.ii. Une menace pour la santé publique

Dès 1945, Alexander Fleming avait déjà mis en garde la société sur la dangerosité liée à l'apparition des bactéries résistantes :

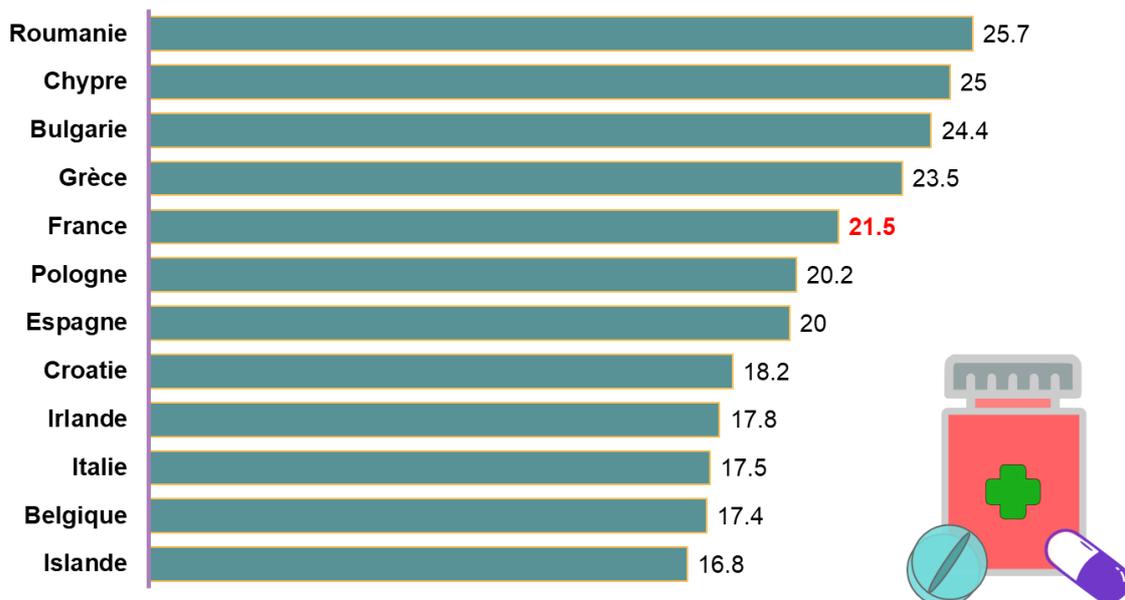
*« La personne irréfléchie qui joue avec un traitement à base de pénicilline est moralement responsable de la mort de l'homme qui succombe à une infection par l'organisme résistant à la pénicilline. »*

Cependant, de nouveaux antibiotiques étant régulièrement découverts à cette époque, cet avertissement ne fut pas suffisamment pris en compte. Ainsi, entre 1940 et 1990, les antibiotiques ont été massivement utilisés en santé humaine, animale et dans l'élevage. Dans l'élevage, ils étaient utilisés comme facteurs de croissance ([Economou & Gousia, 2015](#)), pratique interdite dans l'Union européenne depuis 2006 [2]. Cette surconsommation et ce mésusage a favorisé l'émergence de bactéries résistantes contre lesquelles les traitements antibiotiques sont devenus inefficaces. Certaines bactéries sont même multirésistantes, c'est-à-dire résistantes à plusieurs familles d'antibiotiques ce qui augmente le temps d'hospitalisation des patients et conduit parfois à des impasses thérapeutiques. L'antibiorésistance a causé 700 000 victimes dans le monde en 2014 et plus de 1,2 millions en 2019 ([Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022](#)). Sans nouveaux moyens efficaces de lutte, ce chiffre pourrait atteindre les 10 millions de morts par an à partir de 2050, soit une personne toutes les 3 secondes [3]. L'antibiorésistance devancerait alors le cancer en devenant la première cause de mortalité dans le monde et engendrerait un surcoût de 100 000 milliards de dollars à l'économie mondiale. Dans cette ère post-antibiotiques, des infections courantes et de simples petites blessures, soignées depuis des décennies, pourraient à nouveau devenir mortelles.

La France n'est pas épargnée par ce phénomène. En 2015, 5543 personnes ont perdu la vie à cause des bactéries résistantes ce qui en faisait le deuxième pays d'Europe où la mortalité due à l'antibiorésistance était la plus élevée ([Cassini et al., 2019](#)) ([Figure 3](#)). Pour contrer ce phénomène, le Ministère de la santé a élaboré des campagnes nationales de prévention pour limiter la surconsommation d'antibiotiques en ville et à l'hôpital. En novembre 2001, les Français ont donc découvert la première campagne de prévention contre l'antibiorésistance avec son célèbre slogan qui clamait haut et fort « **Les antibiotiques, c'est pas automatique** ». Entre 2001 et 2004, une baisse de 20% de la consommation d'antibiotiques a été enregistrée suite à cette campagne [4]. Cependant, depuis 2010, la tendance est à la hausse avec une augmentation de 5,4% entre 2010 et 2015. La France consomme donc encore trop d'antibiotiques [5]. Avec une consommation de 21,5 doses quotidiennes pour 1 000 habitants, en 2021, c'est le 5e pays d'Europe le plus consommateur d'antibiotiques ([Figure 4](#)).



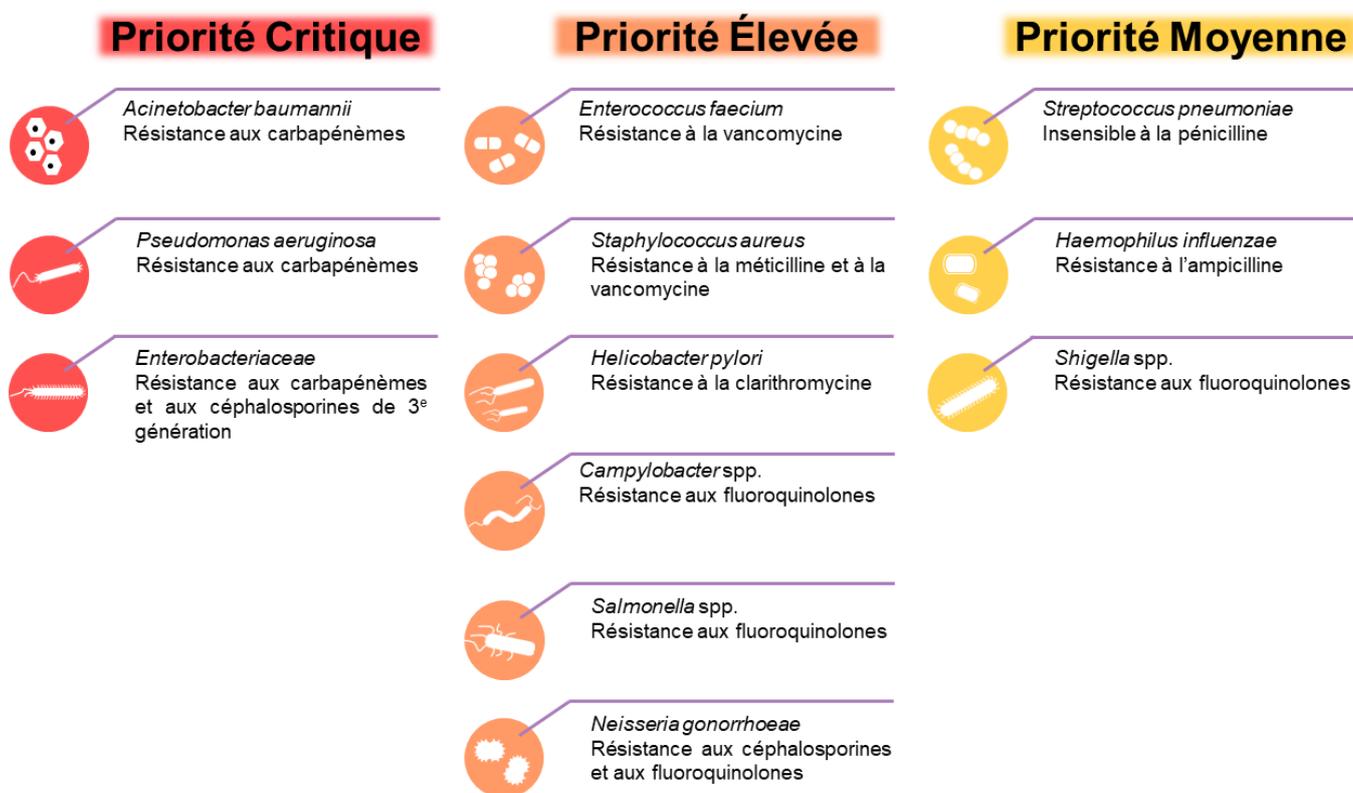
**Figure 3 : Nombre de décès dus aux bactéries résistantes en Europe en 2015.** (Données issues de Cassini *et al.*, 2019).



**Figure 4 : Consommation d'antibiotiques en Europe en 2021.** Les valeurs représentent la dose quotidienne d'antibiotiques pour 1 000 habitants par jour. (Source : Rapport ECDC 2021 [5]).

Face à la menace croissante de la résistance aux antibiotiques, la recherche et le développement de nouveaux traitements est primordiale. Cependant, la découverte de nouvelles classes d'antibiotiques est ralentie depuis la fin des années 70. En effet, les dernières grandes familles d'antibiotiques à avoir été mises sur le marché sont les lipopeptides en 1987 et les oxazolidinones en 2003. Selon un rapport publié par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), sur les 12 molécules mises sur le marché entre 2017 et 2021, seulement deux (vaborbactam et léfamuline) appartiennent à de nouvelles classes chimiques mais agissent sur des cibles bactériennes déjà connues (inhibiteur de  $\beta$ -lactamases pour le vaborbactam et inhibition de la synthèse protéique pour la léfamuline) [6].

Ce ralentissement de la découverte de nouveaux antibiotiques est en partie dû à la diminution de l'investissement de l'industrie pharmaceutique dans la recherche et le développement de nouveaux antimicrobiens. Contrairement aux maladies chroniques, comme, par exemple, les maladies cardiaques, le traitement des infections bactériennes est généralement de courte durée ce qui empêche les laboratoires pharmaceutiques d'avoir un retour sur investissement suffisant. En 2020, afin de pallier le manque d'investissement pour le développement de nouveaux antimicrobiens, plus de 20 laboratoires ont lancé le Fonds d'action contre l'antibiorésistance (AMR Action Fund) [7]. L'objectif de cette initiative est d'investir près d'un milliard de dollars dans des entreprises de biotechnologies travaillant sur des traitements antibactériens innovants dans le but de rendre disponible de 2 à 4 nouveaux antibiotiques d'ici à 2030. Afin d'orienter les recherches, l'OMS a publié en 2017 une liste des agents pathogènes les plus menaçants pour la santé humaine et contre lesquels il devient urgent d'obtenir de nouveaux antibiotiques (Figure 5).



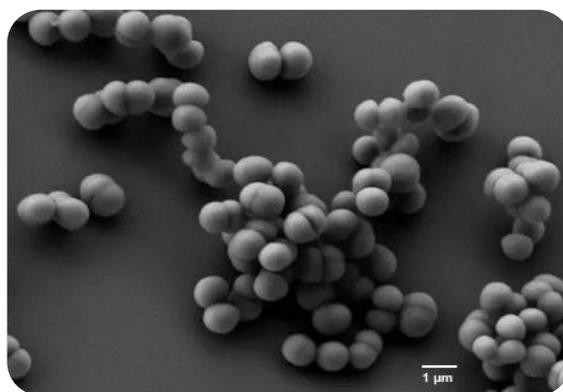
**Figure 5 : Liste des agents pathogènes prioritaires pour la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques.** (Source : Liste OMS 2017 [8]).

Dans cette classification, l'ensemble des bactéries du groupe ESKAPEE sont retrouvées. Cet acronyme fait référence à 7 pathogènes : *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. et *Escherichia coli*. Ces derniers sont les responsables de la plupart des infections nosocomiales et contiennent de nombreux gènes de résistance. En 2019, au niveau mondial, ils ont causé 70% des décès dus aux bactéries résistantes (Kurbatfinski *et al.*, 2023). Parmi ces bactéries, **S. aureus**, modèle étudié dans ce travail, est classé en priorité élevée pour la recherche et le développement de nouveaux traitements.

## II. *Staphylococcus aureus*

### i. Découverte et caractéristiques

L'histoire de la bactérie *Staphylococcus aureus*, plus connue sous le nom de Staphylocoque doré, débute en 1878 lorsque le médecin allemand Robert Koch a observé au microscope des bactéries en amas dans le pus de furoncles (Le Loir *et al.*, 2010). Le nom du genre *Staphylococcus* (du grec *staphylé* : grappe et *kokkos* : grain) fut proposé en 1881 par Alexander Ogston qui isola à partir d'abcès post-opératoires des bactéries regroupées sous forme de grappes de raisin (Ogston, 1882) (Figure 6). C'est finalement Anton Rosenbach qui décrivit en 1884 les premières espèces du genre *Staphylococcus* et il nomma l'une d'elle *Staphylococcus aureus*, *aureus* signifiant « doré » en latin, en référence à la couleur dorée de ses colonies. Cette coloration est due à la production d'un pigment caroténoïde nommé staphyloxanthine (Le Loir *et al.*, 2010).



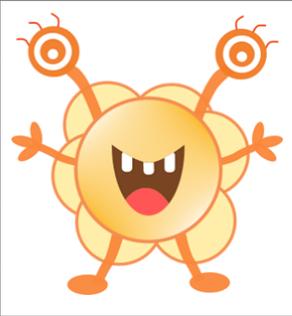
**Figure 6 : Observation de *Staphylococcus aureus* par microscopie électronique à balayage.** Grossissement x8500. Echelle = 1 µm. Crédit photo : Institut Pasteur : Stéphanie Guadagnini et Olivier Chesneau.

L'ensemble des informations décrites dans cette partie est résumé sur la carte d'identité de *S. aureus*, présentée en Figure 7. *S. aureus*, du genre *Staphylococcus* et de la famille des *Staphylococcaceae*, est une bactérie à Gram-positif, c'est-à-dire que sa membrane cytoplasmique est surmontée par une épaisse couche de peptidoglycane (Le Loir *et al.*, 2010). Cette bactérie se présente sous forme de coques immobiles, non sporulant, d'environ 1 µm de diamètre. Les coques sont le plus souvent regroupés en grappes de raisin. Sur milieu solide, les colonies de *S. aureus*, d'un diamètre de 1 à 3 mm, sont rondes, opaques et lisses. Bien que ce soit une bactérie neutrophile et mésophile (croissance optimale à pH 7-7,5 et à une température comprise entre 30 et 37 °C), *S. aureus* peut aussi s'adapter à des environnements plus extrêmes avec des gammes de températures variant de 7 à 48,5 °C et de pH variant de 4 à 10 (Valero *et al.*, 2009). Le métabolisme de cette bactérie est de type aéro-anaérobie facultatif, c'est-à-dire qu'elle peut utiliser la respiration aérobie, la respiration anaérobie avec le nitrate comme accepteur final d'électrons ou la fermentation, pour se développer. Le génome de *S. aureus* est porté par un seul chromosome composé d'environ 2,8 millions de paires de bases avec un contenu en guanine et cytosine d'environ 33% (Petit & Read, 2018).

Au niveau biochimique, la cinquantaine d'espèces identifiées au sein du genre *Staphylococcus* est divisée en deux groupes selon leur capacité à produire une coagulase : les staphylocoques à coagulase positive (dont *S. aureus*) et les staphylocoques à coagulase négative (Naïtali *et al.*, 2017). La coagulase est une enzyme qui entraîne la coagulation du sang et ce sont généralement les staphylocoques pathogènes qui la produisent. Aussi, *S. aureus* peut produire une catalase ce qui permet de le distinguer d'autres coques à Gram-positif comme, par exemple, les streptocoques (Missiakas & Schneewind, 2013).

En ce qui concerne son habitat, *S. aureus* est une bactérie ubiquitaire présente sur la peau et les muqueuses des animaux à sang chaud (mammifères terrestres et marins, oiseaux), notamment chez l'humain (Le Loir *et al.*, 2010). Par sa capacité d'adaptation, en particulier sa résistance à l'oxydation, à la dessiccation et à de fortes concentrations de NaCl, cette bactérie peut aussi être retrouvée dans de nombreux environnements : dans les sols, l'eau, les poussières, l'air, le milieu hospitalier ou encore dans la nourriture. La présence de *S. aureus* dans ces environnements est le plus souvent due à une contamination par l'Homme ou les animaux (Naïtali *et al.*, 2017). En effet, la peau et les muqueuses des animaux à sang chaud constituent l'habitat préférentiel de *S. aureus*. De nombreuses études se sont d'ailleurs intéressées à la présence de cette bactérie chez l'humain afin de mieux comprendre les facteurs à l'origine de cette colonisation.

CARTE BACTÉRIENNE D'IDENTITÉ



**Nom :** *Staphylococcus aureus*

**Forme :** Coque

**Gram :** Positif

**Métabolisme :** Aéro-anaérobie facultatif

**Habitat :** Animaux à sang chaud (mammifères, oiseaux)

**Caractéristiques biochimiques :**  
Coagulase et catalase positif

Classification

**Ordre :** *Bacillales*

**Famille :** *Staphylococcaceae*

**Genre :** *Staphylococcus*

Conditions de culture

**Température :** 7 - 48,5 °C

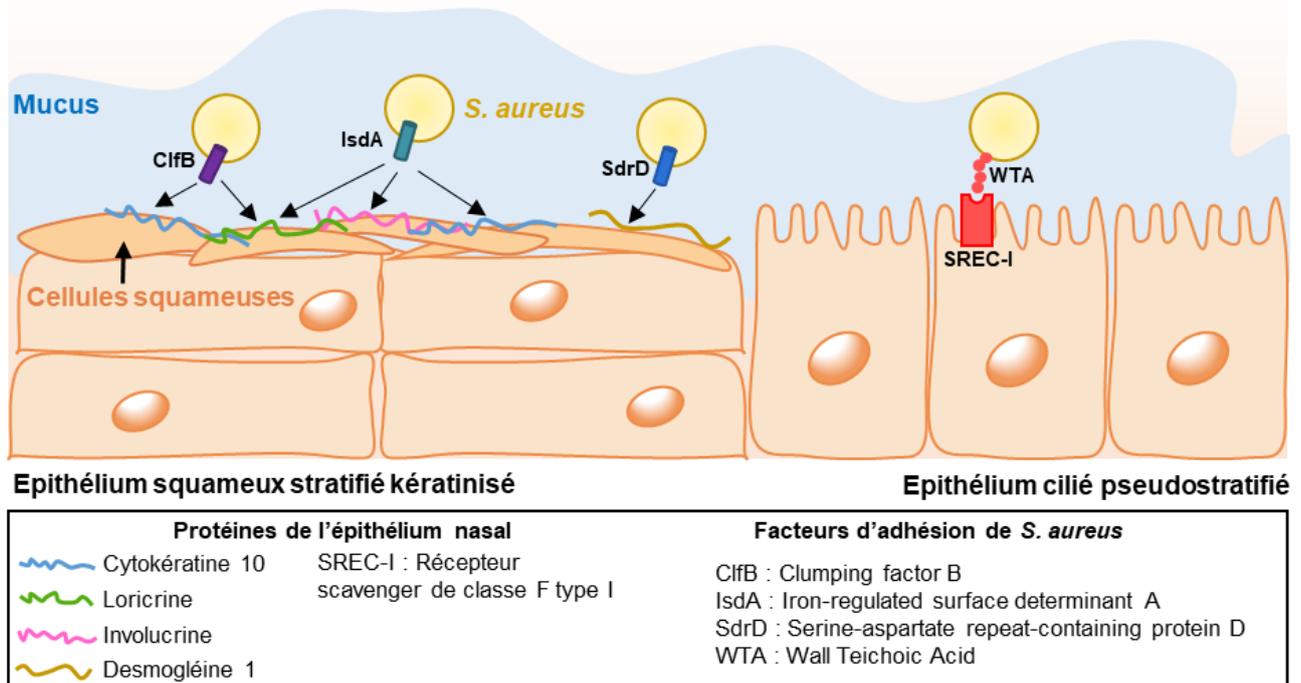
**pH :** 4-10

**Figure 7 :** Carte d'identité de la bactérie *Staphylococcus aureus*.

## ii. La colonisation humaine

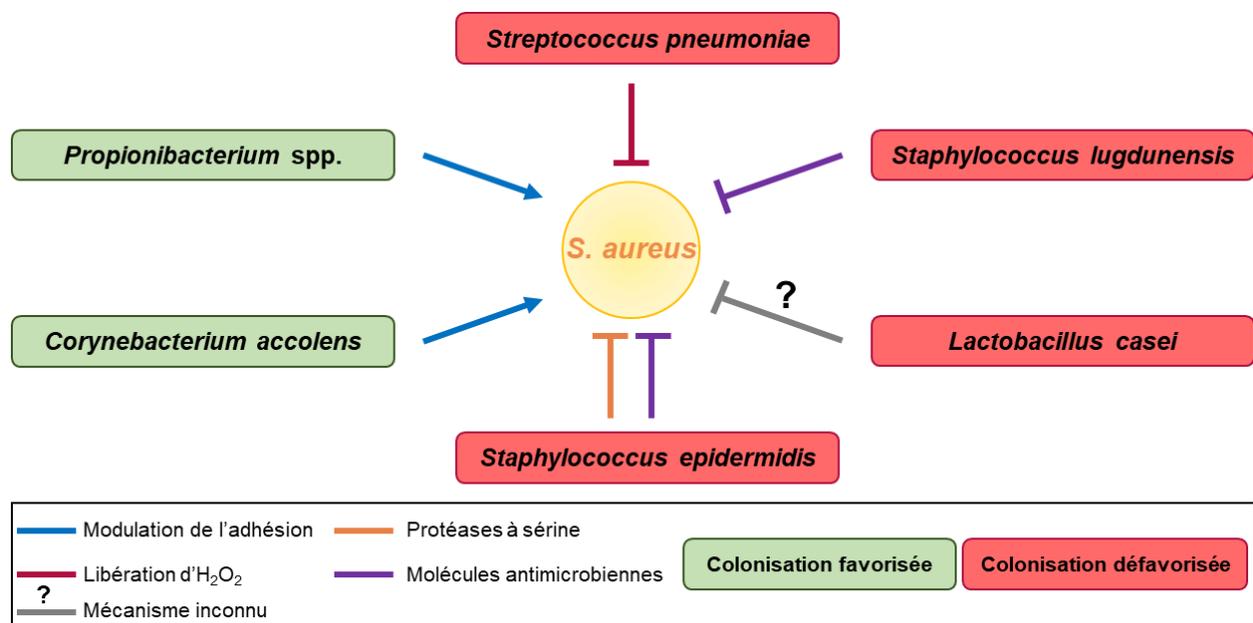
*S. aureus* appartient à la flore commensale de l'humain et sa présence est généralement asymptomatique chez l'individu en bonne santé. Préférentiellement localisé au niveau de la muqueuse de la cavité naso-pharyngée, d'autres zones du corps humain, comme la peau, le périnée, les aisselles et les zones génitales, peuvent être colonisées par cette bactérie (Wertheim *et al.*, 2005). Au sein de la population humaine, environ 20% des individus sont considérés comme des porteurs permanents, 60% sont des porteurs intermittents et 20% ne sont pas porteurs de la bactérie (Kluytmans *et al.*, 1997). Bien que plusieurs facteurs aient été décrits comme impliqués dans le portage de *S. aureus*, les raisons pour lesquelles seules certaines personnes sont colonisées restent mal comprises. En général, la colonisation est favorisée chez les hommes (Nouwen *et al.*, 2001), chez les femmes sous contraception hormonale (Zanger *et al.*, 2012) et chez les enfants (Armstrong-Esther, 1976). Aussi, les personnes diabétiques (Lipsky *et al.*, 1987), infectées par le VIH (Kotpal *et al.*, 2016), hospitalisées ou sous dialyse (Kluytmans *et al.*, 1997) sont davantage colonisées que les individus en bonne santé. En revanche, la génétique des individus ne semble pas impliquée dans le portage de *S. aureus* (Liu *et al.*, 2015).

Bien que l'environnement nasal soit pauvre en nutriments (sucres, acides aminés) et que la circulation d'air en continue y favorise le stress oxydant, *S. aureus* s'est adapté à ces contraintes (Laux *et al.*, 2019). Grâce à la production d'une catalase, il peut se défendre contre le stress oxydant et la sécrétion de protéases lui permet de dégrader les protéines de l'hôte présentes dans les sécrétions nasales (albumine, lactoferrine, mucine) afin de les utiliser comme sources de nutriments. La colonisation de *S. aureus* dans les fosses nasales nécessite une solide adhésion aux cellules épithéliales, notamment pour résister à la clairance mucociliaire (Laux *et al.*, 2019). Dans la cavité nasale antérieure, *S. aureus* se fixe sur les cellules squameuses de l'épithélium tandis que, dans la cavité nasale postérieure, il adhère aux cellules épithéliales ciliées. Les mécanismes d'adhésion utilisés par *S. aureus* dépendent du type de cellules épithéliales présentes dans la cavité nasale (Figure 8). L'adhésion de *S. aureus* aux cellules squameuses est médiée par des protéines ancrées dans sa paroi. Par exemple, les protéines ClfB (Clumping factor B) et IsdA (Iron-regulated surface determinant A) se lient à la cytokératine 10 et à la loricrine, protéines de la matrice extracellulaire des cellules squameuses. La protéine IsdA interagit aussi avec une autre protéine de la matrice, l'involucrine. De son côté, la protéine SdrD (Serine-aspartate repeat-containing protein D) permet l'adhésion aux cellules squameuses en se fixant à la desmoglécine 1 (Laux *et al.*, 2019). Dans la cavité nasale postérieure, l'adhésion sur les cellules épithéliales ciliées se fait grâce à l'interaction entre les polymères d'acides teichoïques (WTA pour Wall Teichoic Acid), localisés dans la paroi, et le récepteur SREC-I (Scavenger receptor class F type I) des cellules épithéliales. Le polymère WTA est crucial pour la colonisation nasale de *S. aureus* (Weidenmaier *et al.*, 2004). La capacité de fixation aux cellules épithéliales nasales est diminuée chez un mutant déficient en WTA. De plus, la glycosylation du WTA est essentielle à la colonisation des muqueuses nasales (Winstel *et al.*, 2015).



**Figure 8 : Mécanismes d'adhésion de *Staphylococcus aureus* aux cellules épithéliales de la cavité nasale humaine.** La protéine ClfB se fixe à la cytokératine 10 et à la loritrine. IsdA peut se lier à la cytokératine 10, à la loritrine et à l'involucrine. SdrD adhère à la desmogléine 1. Le polymère WTA se fixe sur le récepteur SREC-I. (D'après [Laux et al., 2019](#)).

Un paramètre supplémentaire impliqué dans la colonisation de *S. aureus* est la présence d'autres bactéries dans le microbiote nasal. Ce dernier est principalement composé de Firmicutes, d'Actinobactéries et de Protéobactéries ([Laux et al., 2019](#)). Certaines de ces bactéries peuvent entrer en compétition avec *S. aureus* et l'empêcher de coloniser les muqueuses nasales ([Figure 9](#)). Par exemple, en produisant la protéase Esp (Extracellular serine protease), *Staphylococcus epidermidis* agit négativement sur la colonisation de *S. aureus* ([Iwase et al., 2010](#)). La protéase Esp dégrade les protéines de surface IsdA et SdrD ce qui empêche *S. aureus* d'adhérer aux cellules épithéliales ([Sugimoto et al., 2013](#)). De son côté, *Staphylococcus lugdunensis* sécrète une molécule antimicrobienne nommée lugdunine qui a une activité bactéricide sur *S. aureus* ([Zipperer et al., 2016](#)). *Streptococcus pneumoniae* modifie l'environnement nasal en produisant du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), ce qui induit la réponse SOS chez *S. aureus* ([Selva et al., 2009](#)). Par la suite, la réponse SOS permet l'activation des systèmes de réparation de l'ADN mais peut aussi activer les prophages présents dans le génome de *S. aureus*. L'activation de ces prophages entraîne la production d'enzymes lytiques et donc la mort de *S. aureus*. Enfin, *Lactobacillus casei*, bactérie lactique qui s'est adaptée à l'environnement nasal, a un effet négatif sur la colonisation nasale de *S. aureus* mais le mécanisme impliqué reste encore à être déterminé ([Boeck et al., 2020](#)). D'autres bactéries peuvent, en revanche, favoriser la colonisation ([Figure 9](#)). C'est, par exemple, le cas de *Corynebacterium accolens* ou de *Propionibacterium* spp. Ce dernier, en libérant la coproporphyrine III, promeut la colonisation des muqueuses nasales par *S. aureus* ([Wollenberg et al., 2014](#)).



**Figure 9 : Effet des membres du microbiote sur la colonisation nasale de *Staphylococcus aureus*.** Les flèches représentent des interactions favorables à la colonisation de *S. aureus* et les traits aux extrémités droites sont des interactions défavorables. Les mécanismes d'interactions sont précisés dans le texte. (D'après [Laux et al., 2019](#)).

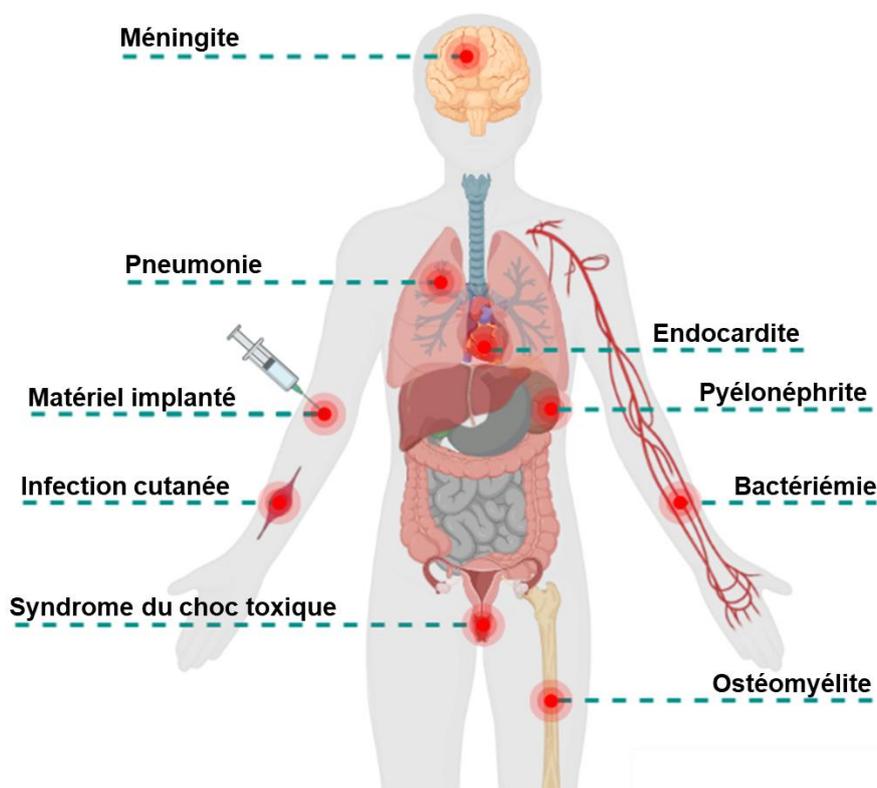
*S. aureus* est un colonisateur asymptomatique fréquent de la peau et des muqueuses nasales de l'Homme. Cependant, c'est aussi un pathogène opportuniste redoutable à l'origine de nombreuses infections. La colonisation nasale accroît le risque de développer des infections invasives notamment chez les personnes immunodéprimées ou hospitalisées. Plusieurs études ont montré que la colonisation nasale de *S. aureus* constitue un réservoir qui augmente la probabilité de développer une infection autogène ([Von Eiff et al., 2001](#)). En effet, ce sont souvent les propres souches colonisatrices du patient qui causent l'infection. Le portage nasal, par exemple lors d'éternuements, favorise la dissémination et la transmission de *S. aureus* dans l'environnement et à d'autres individus. Les raisons pour lesquelles une souche colonisatrice devient invasive ne sont pas encore bien comprises. En 2012, une étude a suggéré que des mutations perte de fonction, localisées dans un gène codant un régulateur transcriptionnel de la famille AraC, étaient à l'origine de la transition d'une souche colonisatrice vers un état invasif ([Young et al., 2012](#)). Cependant, plus récemment, une équipe Suisse s'est aussi intéressée à cette problématique et leur étude n'a pas permis de comprendre la transition entre l'état colonisateur et invasif ([Räz et al., 2023](#)). En comparant les paires de souches de *S. aureus* colonisatrices et invasives issues de 10 patients atteints d'infections invasives aiguës, cette étude a montré que les souches colonisatrices et invasives ont un phénotype similaire et présentent une faible variation génétique. Afin de limiter les risques d'infections autogènes, notamment chez les patients hospitalisés ou avant une opération chirurgicale, des processus de décolonisation permettent d'éradiquer temporairement *S. aureus* de la muqueuse nasale. L'application de mupirocine en pommade au niveau du nez pendant 5 jours diminue le taux de portage de 91% ([Doebbeling et al., 1993](#)). Cependant, l'efficacité de cette décolonisation pose encore question ([Sakr et al., 2019](#)). Certaines études montrent que la décolonisation est bénéfique pour limiter la survenue d'infections invasives tandis que d'autres concluent que le risque d'infection est similaire avec ou sans application de mupirocine.

### iii. Un agent pathogène

Au sein du genre *Staphylococcus*, *S. aureus* est l'espèce la plus pathogène. Il peut être responsable de nombreuses infections chez l'humain mais aussi chez d'autres animaux. Chez les vaches, les chèvres et les brebis, les infections à *S. aureus* les plus courantes sont les mammites, c'est-à-dire une inflammation de la glande mammaire. Dans la suite de cette introduction, seules les infections humaines seront abordées.

#### iii.i. Infections humaines causées par *S. aureus*

Les infections humaines causées par *S. aureus* sont des infections communautaires ou nosocomiales (infections contractées dans un établissement de santé). Selon le dernier rapport de Santé publique France publié en 2022, *S. aureus* est identifié dans 12% des infections nosocomiales ce qui en fait le deuxième agent responsable d'infections nosocomiales en France derrière *Escherichia coli* [9]. Ce pathogène est l'auteur de diverses infections qui peuvent être localisées dans la plupart des organes (Figure 10) (Tong *et al.*, 2015). Leur degré de gravité est variable : elles peuvent être superficielles ou engager le pronostic vital du patient. La colonisation marque souvent le point de départ de l'infection qui se déclenche suite à une brèche dans la barrière cutanéo-muqueuse (Cheung *et al.*, 2021). Cette brèche peut être causée par une blessure, une opération chirurgicale ou une implantation de matériel médical (cathéter, prothèse). Des pathologies ou traitements provoquant un affaiblissement des défenses immunitaires du patient peuvent aussi conduire au développement d'une infection. .



**Figure 10 : Localisation des infections humaines causées par *Staphylococcus aureus*.** (Figure réalisée à l'aide de BioRender).

Suite à la rupture de la barrière cutané-muqueuse, c'est l'étape d'invasion. Cette étape, caractérisée par la prolifération des bactéries et la production de facteurs de virulence qui détruisent les tissus de l'hôte, est à l'origine d'**infections suppuratives superficielles ou systémiques**. De plus, *S. aureus* peut causer des **infections toxiques** engendrées par l'ingestion de toxines ou la production de toxines chez l'hôte.

### iii.i.i. Les infections suppuratives superficielles

Les infections suppuratives superficielles sont localisées au niveau des couches superficielles (épiderme) et profondes du tissu cutané (derme/hypoderme) ou des tissus mous (tissus de soutien des organes). *S. aureus* est, avec les streptocoques, la bactérie la plus fréquemment responsable de ces infections. Par exemple, l'impétigo est une infection très contagieuse de l'épiderme qui existe sous deux formes : l'impétigo croûteux et bulleux (Linz *et al.*, 2023). La forme croûteuse touche généralement les enfants de moins de 10 ans et ne provoque pas de fièvre. Elle est caractérisée par l'apparition de vésicules, notamment au niveau du visage autour du nez et de la bouche, qui se transforment rapidement en croûtes jaunâtres. La forme bulleuse est plus sévère que la forme croûteuse et concerne plutôt les nourrissons. Dans ce cas, de grosses vésicules similaires à des ampoules se développent autour de l'anus ou des organes génitaux. Cette forme peut s'accompagner de fièvre. *S. aureus* peut causer d'autres infections cutanées comme la folliculite (infection superficielle du follicule pileux), les furoncles (infection profonde du follicule pileux) ou l'anthrax (agglomération de furoncles) (Linz *et al.*, 2023). En ce qui concerne les infections des tissus mous, *S. aureus* peut être responsable de la fasciite nécrosante ou « maladie mangeuse de chair ». L'apport sanguin au niveau des tissus mous atteints par cette maladie est insuffisant ce qui entraîne leur nécrose.

En dehors de la fasciite nécrosante, ces infections cutanées sont généralement bénignes mais elles peuvent servir de porte d'entrée vers la circulation sanguine et permettre la diffusion hématogène de *S. aureus* à d'autres organes. Cette diffusion peut donc causer des infections suppuratives systémiques.

### iii.i.ii. Les infections suppuratives systémiques

- **Bactériémies** : Une bactériémie correspond à la présence de bactéries dans le sang. Avant l'apparition des antibiotiques, 80% des bactériémies à *S. aureus* (BSa) étaient mortelles (Tong *et al.*, 2015). Aujourd'hui, le risque de mourir d'une BSa est d'environ 20% (Van Hal *et al.*, 2012). Dans les pays industrialisés, pour 100 000 personnes, 10 à 30 cas de BSa sont enregistrés chaque année (Tong *et al.*, 2015). Une bactériémie doit rapidement être prise en charge afin d'éviter le déclenchement d'un choc septique. Ce dernier est caractérisé par une hypotension artérielle associée à un apport sanguin insuffisant aux organes (poumons, reins, cœur, cerveau) ce qui entraîne leur dysfonctionnement. Le risque de développer une BSa est augmenté lors de la pose d'un cathéter intraveineux et est trois fois plus élevé chez les personnes colonisées par

*S. aureus* au niveau de la muqueuse nasale. En effet, dans 80% des cas, la bactériémie est due aux souches colonisatrices du patient. Cependant, le risque de mourir d'une BSA est supérieur chez les personnes non colonisées par *S. aureus* (Wertheim *et al.*, 2004). Une adaptation du système immunitaire (SI) de l'hôte à la souche colonisatrice avec présence d'anticorps IgG anti-staphylococcique déjà présents dans le sang pourrait expliquer cette différence (Van den Berg *et al.*, 2015).

- **Endocardites infectieuses** : *S. aureus* est la principale cause d'endocardites infectieuses (EI) et représente 40% des cas (Lalanne *et al.*, 2023). Le taux de mortalité est élevé et varie entre 22 et 66% (Tong *et al.*, 2015). L'EI est une infection du cœur due à la prolifération des bactéries au niveau de l'endocarde et des valves cardiaques (natives ou prothétiques). Certaines personnes sont plus à risque de développer une EI comme les personnes âgées de plus de 60 ans, les hommes, les personnes ayant des antécédents cardiaques (implantation d'une prothèse valvulaire cardiaque par exemple) ou encore les consommateurs de drogues injectables (Le Loir *et al.*, 2010).
- **Infections ostéoarticulaires** : Les infections ostéoarticulaires les plus communes sont les ostéomyélites, l'arthrite articulaire septique ou encore les infections sur prothèses (genou, hanche). *S. aureus* est le pathogène le plus souvent impliqué dans ces infections (Urish & Cassat, 2020). Les ostéomyélites sont des infections localisées au niveau des os et provoquent une inflammation puis une nécrose de l'os. Les personnes diabétiques, dont la glycémie est mal contrôlée, sont à risque de développer des infections au niveau des pieds (Kavanagh *et al.*, 2018). Ces infections, souvent causées par *S. aureus*, peuvent rapidement s'étendre aux os du pied. En effet, 12 à 20% des patients diabétiques présentant un ulcère aux pieds vont développer une ostéomyélite et ils risquent l'amputation.
- **Infections pulmonaires** : *S. aureus*, bien que peu fréquemment responsable, peut être à l'origine de pneumonies, c'est-à-dire des infections du tissu pulmonaire. Ces infections peuvent être communautaires ou nosocomiales. Une infection virale préalable, comme la grippe, peut favoriser le développement d'une pneumonie causée par *S. aureus* (Langouët-Astrié *et al.*, 2022). L'intubation des patients hospitalisés peut participer à l'apparition d'une pneumonie nosocomiale à *S. aureus* ce qui, par exemple, a été le cas pour des patients atteints de la COVID-19 (O'Toole, 2021). Aussi, l'accumulation de mucus dans les voies respiratoires des personnes atteintes de la mucoviscidose favorise les infections pulmonaires récurrentes. Les enfants touchés par cette maladie sont particulièrement à risque de développer une infection pulmonaire à *S. aureus* (Razvi *et al.*, 2009).

Enfin, dans de plus rares cas, *S. aureus* peut causer des infections du tractus urinaire (pyélonéphrite) et du système nerveux central (méningite). Ces infections ne seront donc pas décrites dans ce manuscrit.

### iii.i.iii. Les infections toxiques

La production de toxines dans l'organisme ou bien l'ingestion de toxines présentes dans les aliments sont deux sources d'infections toxiques à *S. aureus*. Les toxines évoquées ci-dessous seront détaillées dans la partie iii.ii.

- **Le syndrome de choc toxique menstruel (SCTM)** : Le SCTM est une maladie infectieuse aiguë due à la libération dans le sang d'une exotoxine produite par *S. aureus*, la toxine **TSST-1**. En France, le SCTM touche une vingtaine de personnes chaque année [10]. Les femmes colonisées au niveau vaginal par une souche de *S. aureus* productrice de la toxine TSST-1 sont particulièrement à risque de développer un SCTM (Schlievert & Davis, 2020). Décrit pour la première fois dans les années 1980, ce syndrome est associé à la mauvaise utilisation des protections intimes internes (tampons et coupes menstruelles). Une utilisation prolongée supérieure à 6h ou le port d'une protection interne pendant la nuit sont des facteurs qui favorisent la survenue d'un SCTM. Une forte fièvre, des douleurs musculaires et une hypotension artérielle sont des symptômes caractéristiques de cette infection.
- **La pneumonie nécrosante** : La pneumonie nécrosante est une infection pulmonaire rare due à la production, par *S. aureus*, de la **leucocidine de Panton-Valentine** (Labandeira-Rey *et al.*, 2007). Cette toxine est à l'origine d'une nécrose des poumons et entraîne une insuffisance respiratoire. Cette infection survient notamment chez les enfants et les jeunes adultes et sa mortalité est proche de 75%.
- **Le syndrome d'exfoliation généralisée** : *S. aureus* peut produire des **toxines exfoliatives** (ETs) à l'origine du syndrome d'exfoliation généralisée (Le Loir *et al.*, 2010). Ces toxines s'attaquent aux jonctions entre les cellules de la couche cornée de l'épiderme ce qui entraîne une nécrose puis une desquamation de l'épiderme. Ce sont notamment les nouveaux nés et les jeunes enfants qui sont touchés par ce syndrome.
- **Toxi-infections alimentaire collective (TIAC)** : Une TIAC est définie par l'apparition de symptômes similaires, au niveau gastro-intestinal, chez au moins 2 personnes ayant consommé un repas identique. L'une des premières TIAC attribuée à *S. aureus* date du printemps 1918, lors du siège de Verdun (Naïtali *et al.*, 2017). Environ 2000 soldats allemands se sont plaints de douleurs intestinales après avoir consommé un plat de saucisses. Les TIAC causées par *S. aureus* sont dues à l'ingestion d'**entérotoxines pyrogènes** thermorésistantes (SEs). En 2021, sur les 1309 TIAC déclarées en France, *S. aureus* était l'agent pathogène confirmé ou suspecté dans 17% des cas ce qui le classe en 2<sup>e</sup> position derrière *Bacillus cereus* [11]. Les aliments les plus souvent mis en cause étaient les viandes, les poissons et les produits laitiers. Il est estimé que 10<sup>6</sup> UFC (Unité formant colonie) par gramme d'aliments sont nécessaires pour que la production de toxines atteigne un seuil dangereux (Naïtali *et al.*, 2017). Les symptômes (nausées,

vomissements, douleurs abdominales) apparaissent en moyenne 3h après l'ingestion de l'aliment contaminé.

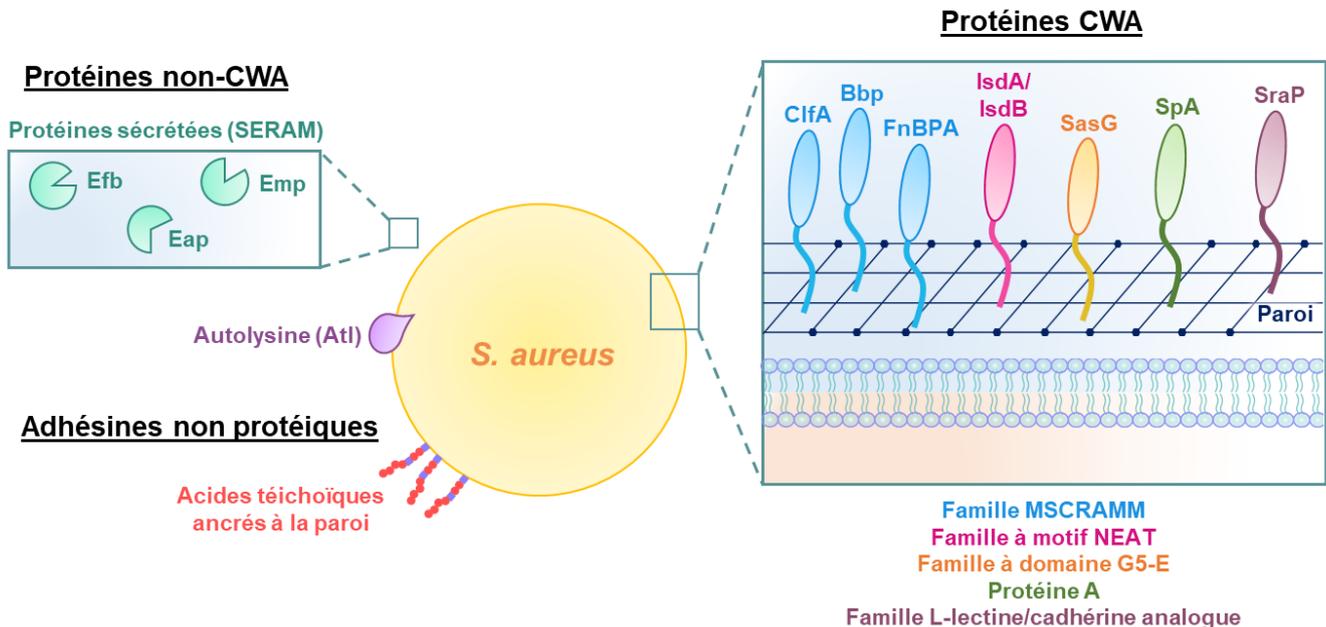
*S. aureus* peut donc causer une grande diversité de pathologies. Ces dernières sont favorisées par la capacité de ce pathogène à produire de nombreux facteurs de virulence impliqués dans les différentes étapes de l'infection.

### iii.ii. Un arsenal de facteurs de virulence

La première étape clé d'une infection bactérienne repose sur l'adhésion des bactéries aux cellules de l'hôte. *S. aureus* utilise un large panel d'**adhésines** afin de coloniser la plupart des tissus du corps humain et, dans certains cas, d'être internalisé dans les cellules. L'évasion et l'invasion constituent les autres étapes de l'infection. Pour cela, *S. aureus* se multiplie et produit des **facteurs sécrétés** lui permettant d'échapper au SI de l'hôte (évasion, voir partie II.iv.) et d'étendre l'infection (invasion).

#### iii.ii.i. Les adhésines et la colonisation de l'hôte

L'adhésion de *S. aureus* aux cellules de l'hôte est essentielle pour résister à la clairance mucociliaire, au flux sanguin dans les vaisseaux ou encore à la desquamation des cellules mortes de la peau (Berry *et al.*, 2022). L'adhésion se fait par l'intermédiaire d'adhésines regroupées en trois catégories : les adhésines CWA (Cell Wall-Anchored), les protéines non CWA et les adhésines non protéiques (Figure 11).



**Figure 11 : Les adhésines produites par *Staphylococcus aureus* et impliquées dans la colonisation de l'hôte.** Les adhésines sont regroupées en trois catégories et sont détaillées dans le texte. (D'après Berry *et al.*, 2022).

Les **protéines CWA** sont des protéines de surface ancrées à la paroi bactérienne qui partagent une structure commune : un peptide signal en N-terminal, un domaine hydrophobe, des

acides aminés chargés positivement et un peptide signal d'ancrage en C-terminal. Ce dernier permet l'interaction covalente entre les protéines CWA et le peptidoglycane (Berry *et al.*, 2022).

Les protéines CWA sont classées en cinq familles selon leur structure et leur fonction : la famille **MSCRAMM** (Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecule), la famille à **motif NEAT** (Near iron Transporter), la famille à **domaine G5-E**, la **protéine A** et la famille **L-lectine/cadhérine analogue** (Figure 11).

- **Famille MSCRAMM** : Les membres de cette famille adhèrent aux composants de la matrice extracellulaire de l'hôte comme, par exemple, le collagène, le fibrinogène et la fibronectine (Foster *et al.*, 2014). Ces protéines contiennent au moins deux domaines adjacents « IgG-like » dans la région N-terminale leur permettant de se fixer à leur ligand. Cette famille inclut les facteurs d'agglutination ClfA et ClfB (Clumping factor A et B), la protéine Bbp (Bone-sialo binding protein), les protéines liant la fibronectine FnBPA et FnBPB (Fibronectin-binding protein A et B), les protéines SdrC, SdrD et SdrE (Serine-aspartate repeat protein C, D et E) et la protéine Cna qui se lie au collagène (Figure 11). Certaines de ces protéines peuvent adhérer à plusieurs composants de la matrice extracellulaire. Par exemple, la protéine ClfB se fixe au fibrinogène, à la cytokératine K10 et K8 et à la loricine. De leur côté, les protéines FnBP peuvent se lier à l'élastine, le plasminogène, la fibronectine et le fibrinogène. Leur liaison à la fibronectine favorise l'internalisation de *S. aureus* dans les cellules non-phagocytaires (kératinocytes, ostéoblastes, fibroblastes) *via* l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  (Speziale & Pietrocola, 2020). Par ailleurs, la protéine Bbp se fixe au fibrinogène mais peut aussi interagir avec la sialo-protéine osseuse présente dans la matrice extracellulaire à proximité des cellules osseuses (Berry *et al.*, 2022). Cette interaction participe au développement des ostéomyélites.
- **Famille à motif NEAT** : Au cours d'une infection, grâce à leur motif NEAT, les protéines de cette famille sont impliquées dans la capture d'hème libre ou lié à l'hémoglobine ce qui permet à la bactérie de survivre au sein de l'hôte lors d'une carence en fer. Les représentants de cette famille sont les protéines IsdA, IsdB, IsdC et IsdH (Iron-regulated surface determinants A, B, C et H) (Foster *et al.*, 2014). Cependant, la fonction des protéines Isd n'est pas limitée à la capture de l'hème. La protéine IsdA participe à la colonisation nasale en adhérant aux cellules squameuses de l'épithélium (Figure 11) (voir partie II.ii.). De plus, en se fixant à la sous-unité  $\beta 3$  de certaines intégrines, IsdB favorise l'internalisation de *S. aureus* dans les cellules non-phagocytaires (Zapotoczna *et al.*, 2013).
- **Famille à domaine G5-E** : Les protéines G5-E contiennent des domaines protéiques G5 c'est-à-dire 5 résidus glycine en tandem séparés par une région E composée de 50 acides aminés (Berry *et al.*, 2022). La protéine SasG (Surface protein G) appartient à cette famille (Figure 11). Elle est impliquée dans l'adhérence de *S. aureus* aux cellules épithéliales nasales mais son ligand reste à être identifié.

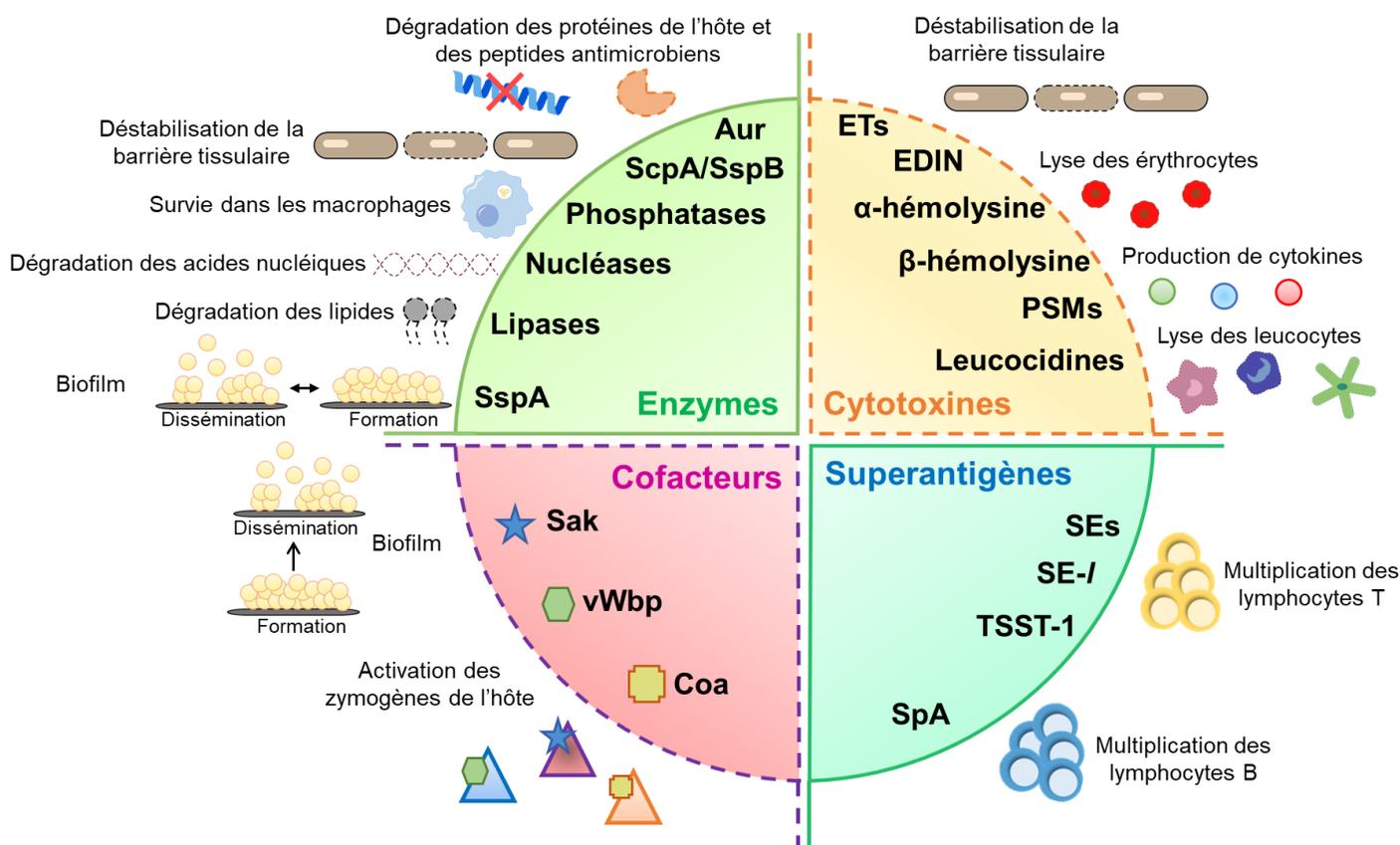
- **Protéine A** : La protéine A (SpA) est l'une des protéines de surface les plus abondantes chez *S. aureus* mais elle peut aussi être libérée dans le milieu extracellulaire (**Figure 11**). Au niveau structural, la région N-terminale de la SpA contient cinq modules homologues qui se répètent, chacun composé d'un faisceau de trois hélices (**Berry et al., 2022**). Ces domaines permettent à la protéine A d'adhérer à plusieurs ligands comme par exemple à la région Fc des immunoglobulines G, au facteur de von Willebrand ou encore au récepteur TNFR1 (Tumor Necrosis Factor Receptor 1). Une autre étude a aussi montré que la protéine A peut interagir avec l'héparine, un glycosaminoglycane produit par les mastocytes (**Shi et al., 2021**).
- **Famille L-lectine/cadhérine analogue** : La protéine SraP (Serine-rich adhesin of Platelets) est le seul membre de cette famille (**Figure 11**). Elle a une forte affinité pour les plaquettes ce qui peut participer au développement d'EI (**Siboo et al., 2005**). Aussi, par son domaine L-Lectine analogue en N-terminal, SraP peut se fixer à l'acide N-acétylneuraminique présent à la surface des cellules de l'hôte ce qui favorise notamment l'invasion des cellules épithéliales (**Yang et al., 2014**).

Les **protéines non CWA** comprennent l'**autolysine** (Atl) et des protéines secrétées nommées **SERAM** (Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules) (**Heilmann, 2011**) (**Figure 11**). Ces dernières incluent les protéines Eap (Extracellular adherence protein), Emp (Extracellular matrix and plasma binding protein) et Efb (Extracellular fibrinogen-binding protein). Ces protéines contribuent à la colonisation de l'hôte en adhérant à plusieurs molécules comme le fibrinogène, la fibronectine, le collagène ou encore la vitronectine. Bien que secrétées, elles peuvent aussi adhérer à la surface de *S. aureus* par un mécanisme encore inconnu. Par leur fixation à des composants de la matrice extracellulaire osseuse (collagène, vitronectine, sialo-protéine osseuse) les protéines Eap et Emp participent à la survenue des ostéomyélites (**Berry et al., 2022**). De plus, la protéine Eap favorise l'internalisation de *S. aureus* dans les cellules endothéliales *via* la stimulation de la protéine disulfure isomérase et l'activation des intégrines  $\alpha 5 \beta 1$  (**Leidecker et al., 2023**). Une autre adhésine non CWA utilisée par *S. aureus* pour coloniser l'hôte est l'autolysine (**Heilmann, 2011**). Cette protéine est associée à la surface bactérienne de façon non covalente par l'intermédiaire de liaisons ioniques et hydrophobes. Elle possède des propriétés enzymatiques (hydrolyse du peptidoglycane) et adhésives. En effet, la protéine Atl peut se fixer, entre autres, au fibrinogène, à la fibronectine, à l'héparine, à la gélatine, à la kératine et à la protéine Hsc70 (Heat shock cognate protein 70). Son interaction avec cette dernière protéine participe à l'internalisation de *S. aureus* dans les cellules endothéliales (**Hirschhausen et al., 2010**).

Enfin, les **adhésines non protéiques** sont des glycopolymères (**Berry et al., 2022**). Par exemple, les acides téichoïques ancrés à la paroi permettent la colonisation nasale en interagissant avec le récepteur SREC-I des cellules épithéliales (**Figures 8 et 11**).

### iii.ii.ii. Les facteurs sécrétés

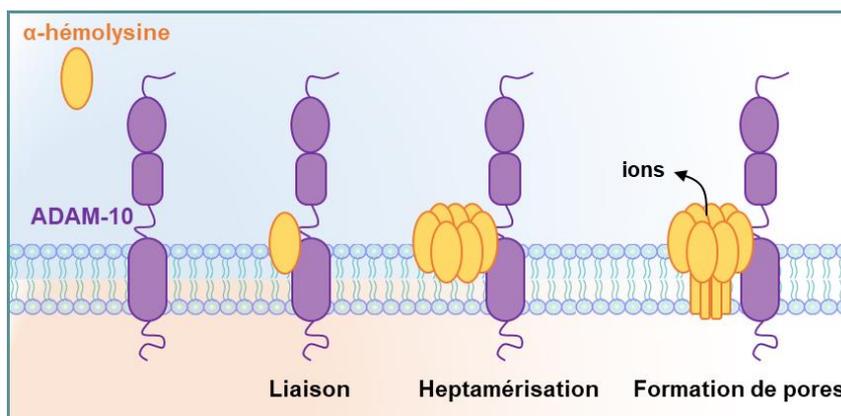
Une fois l'étape de colonisation effectuée, *S. aureus* peut sécréter de nombreux facteurs de virulence regroupés en quatre catégories : les cytotoxines, les superantigènes, les cofacteurs et les enzymes (Figure 12). Ces facteurs sécrétés peuvent intervenir dans l'échappement aux défenses immunitaires de l'hôte (e.g. lyse des leucocytes), l'acquisition de nutriments nécessaires à la prolifération de *S. aureus* (e.g. dégradation des acides nucléiques/protéines) et/ou l'extension du foyer infectieux (e.g. déstabilisation de la barrière tissulaire) (Tam & Torres, 2019).



**Figure 12 : Vue d'ensemble des facteurs de virulence sécrétés par *Staphylococcus aureus*.** ETS : Exfoliative toxins, EDIN : Epidermal Cell Differentiation Inhibitor, PSMs : Phenol-Soluble Modulins, SEs : Staphylococcal enterotoxins, SE-I : Staphylococcal enterotoxin-like superantigens, TSST-1 : Toxic shock syndrome toxin 1, SpA : Staphylococcal protein A, Coa : Coagulase, vWbp : von Willebrand factor binding protein, Sak : Staphylokinase, SspA : Staphylococcal serine protease A, ScpA/SspB : Staphopain A/Staphopain B, Aur : Aureolysin. Les facteurs sécrétés sont détaillés dans le texte. (D'après Tam & Torres, 2019).

Les toxines produites par *S. aureus* ayant une activité superantigénique sont : la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1), les entérotoxines (SEs et SE-I) et la protéine A (SpA) (Tam & Torres, 2019). Ces toxines sont à l'origine d'une dérégulation du SI en induisant l'expansion clonale des lymphocytes T ou B et la production massive de cytokines. De leur côté, les cofacteurs (Staphylokinase (Sak), Coagulase (Coa) et la protéine liant le facteur de von Willebrand (vWbp)) favorisent la survie ou la dissémination de *S. aureus* en impactant le système de coagulation de l'hôte par fixation sur les zymogènes (plasmine, prothrombine). Dans la suite de ce manuscrit, quelques cytotoxines et enzymes seront décrites.

Les **cytotoxines** participent à la déstabilisation des barrières tissulaires et/ou à la lyse des cellules par formation de pores dans les membranes (Ahmad-Mansour *et al.*, 2021). Les cytotoxines comprennent les hémolysines, les toxines exfoliatives (ETs), les Phenol-Soluble Modulins (PSMs), les leucocidines et les Epidermal Cell Differentiation Inhibitor (EDIN). Parmi les hémolysines, l' $\alpha$ -hémolysine est l'un des facteurs de virulence les plus étudiés chez *S. aureus* (Tableau 1). Cette toxine est codée par le gène *hla* localisé dans le core génome de *S. aureus* et présent chez environ 95% des souches. L' $\alpha$ -hémolysine peut causer la lyse de différents types cellulaires comme, par exemple, les érythrocytes, les cellules épithéliales et endothéliales ou encore les kératinocytes. La lyse de ces cellules est due à l'interaction de l' $\alpha$ -hémolysine avec le récepteur cellulaire ADAM-10 (A Disintegrin and Metalloprotease 10) (Figure 13) (Tam & Torres, 2019). Cette interaction permet l'heptamérisation de l' $\alpha$ -hémolysine et donc la formation de pores membranaires structurés en tonneau- $\beta$  ce qui conduit à un efflux d'ions et à la lyse cellulaire. De plus, la fixation de l' $\alpha$ -hémolysine sur le récepteur ADAM-10 active le domaine métalloprotéase du récepteur ce qui conduit au clivage des jonctions adhérentes entre les cellules endothéliales (cadhérine-E) (Cheung *et al.*, 2021). La déstabilisation de la barrière endothéliale engendrée favorise ainsi la dissémination de *S. aureus* au sein de l'hôte.



**Figure 13 : Formation de pores membranaires dans les cellules de l'hôte par l' $\alpha$ -hémolysine.** ADAM-10 : récepteur membranaire de l' $\alpha$ -hémolysine. (Adapté de Tam & Torres, 2019).

*S. aureus* produit également des leucocidines qui s'attaquent aux leucocytes comme les neutrophiles, les macrophages ou les monocytes (Tam & Torres, 2019). Ces toxines forment des pores membranaires et sont composées de deux sous-unités protéiques (S et F). Certaines de ces leucocidines sont associées aux infections humaines comme, par exemple, les toxines LukED, LukAB et, la plus connue, LukSF-PV ou leucocidine de Panton Valentine (PVL) qui a une activité leucotoxique cent fois plus élevée que les autres (Ahmad-Mansour *et al.*, 2021). Le locus *pvl*, codant la PVL, est présent sous forme de prophage dans le génome de *S. aureus*. A noter que 90% des souches associées à une pneumonie nécrosante portent le locus *pvl* (Tam & Torres, 2019) (Tableau 1). Pour former des pores membranaires, la sous-unité S de la PVL (LukS-PV) s'associe aux récepteurs C5aR ou C5L2 présents sur les leucocytes. Suite à cette interaction, la sous-unité F (LukF-PV) est recrutée puis une oligomérisation avec trois dimères LukSF-PV supplémentaires permet la formation d'un pore membranaire.

Les PSMs sont une classe de petits peptides amphiphiles de 20 à 45 acides aminés structurés en hélice- $\alpha$  et ayant une activité cytolytique (Tam & Torres, 2019). Ces peptides sont impliqués dans divers mécanismes participant à la virulence de *S. aureus* comme la lyse des érythrocytes et des leucocytes et la formation de biofilm (Tableau 1). La lyse des cellules par les PSMs ne nécessite pas de récepteur membranaire ce qui explique la diversité des cellules pouvant être lysées par ces peptides.

Enfin, les EDIN sont des toxines qui pénètrent dans les cellules et induisent la formation de larges tunnels temporaires entre les cellules endothéliales ce qui perturbe l'intégrité de l'endothélium (Ahmad-Mansour *et al.*, 2021). La formation de ces tunnels participe à la dissémination de *S. aureus* au cours de l'infection (Tableau 1). Par exemple, l'utilisation d'un modèle murin de bactériémie à *S. aureus* a montré que les EDIN contribuent à la formation de foyers d'infections secondaires (Munro *et al.*, 2010).

**Tableau 1 : Fonctions des cytotoxines de *S. aureus* et infections humaines associées.** Seules les toxines évoquées dans le texte sont présentées. (Adapté de Ahmad-Mansour *et al.*, 2021).

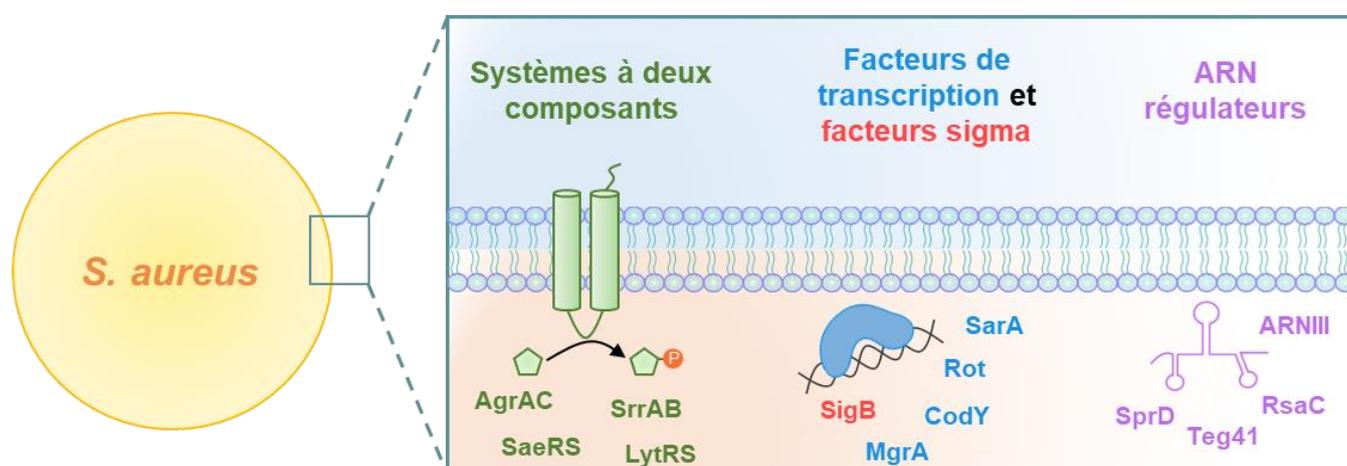
Cytotoxine	Fonctions	Infections associées
<b><math>\alpha</math>-hémolysine</b>	- Formation de pores membranaires - Lyse des érythrocytes, des cellules épithéliales, endothéliales et des kératinocytes	- Pneumonies - Bactériémies
<b>Leucocidine de Pantone Valentine (PVL)</b>	- Formation de pores membranaires - Lyse des neutrophiles, monocytes et macrophages	- Pneumonies - Bactériémies - Fasciite nécrosante - Infections de la peau et des tissus mous
<b>Phenol-Soluble Modulins (PSMs)</b>	- Formation de pores membranaires - Lyse des érythrocytes et leucocytes	- Bactériémies - Infections cutanées
<b>Epidermal Cell Differentiation Inhibitor (EDIN)</b>	- Formation de tunnels transcellulaires - Perturbation de la barrière endothéliale	- Pneumonies - Bactériémies - Ulcères du pied du diabétique

Une autre catégorie de facteurs de virulence produits par *S. aureus* sont les **enzymes** (Tam & Torres, 2019). Ces dernières participent notamment à l'extension du foyer infectieux, à l'échappement au SI et à l'acquisition de nutriments nécessaires à la prolifération bactérienne. La dégradation du tissu conjonctif par la hyaluronidase, qui hydrolyse l'acide hyaluronique, et par la staphopaine A (ScpA), qui clive l'élastine, favorise la dissémination de *S. aureus*. De leur côté, les lipases dégradent les lipides membranaires ce qui permet à *S. aureus* de franchir les barrières cutanées de l'hôte. La protéase à sérine SspA clive les protéines de surface FnBPs ce qui réduit l'adhésion bactérienne, favorise la déstructuration du biofilm et augmente la dissémination de *S. aureus*. Les nucléases et certaines protéases sont impliquées dans l'échappement au SI. *S. aureus* produit deux nucléases (Nuc1 et Nuc2) permettant la dégradation des acides nucléiques (ADN et ARN) qui peuvent ensuite être utilisés comme source de nutriments.

De plus, la sécrétion des nucléases permet à *S. aureus* d'échapper au piège extracellulaire des neutrophiles (NET) (Howden *et al.*, 2023), pièges essentiellement composés d'ADN et de protéines afin d'emprisonner les micro-organismes pathogènes. De leur côté, l'auréolysine (Aur) et la staphopaine B (SspB) sont deux protéases qui dégradent les peptides antimicrobiens comme le peptide LL-37 produit par les cellules épithéliales, les neutrophiles et les lymphocytes. Enfin, les phosphatases sécrétées PtpA (Protein-tyrosine phosphatase A) et SapS (Secreted acid phosphatase S) sont d'autres enzymes impliquées dans la pathogénicité de *S. aureus* (Ahmad-Mansour *et al.*, 2022; Gannoun-Zaki *et al.*, 2018). En effet, la délétion des gènes *pptA* ou *sapS* diminue la capacité de *S. aureus* à survivre dans les macrophages. Plusieurs modèles d'infections (souris, poisson zèbre) ont aussi montré une augmentation de la survie des individus infectés par la souche  $\Delta sapS$  comparée à la souche parentale (Ahmad-Mansour *et al.*, 2022).

### iii.iii. Régulation de la virulence de *S. aureus*

L'ensemble des facteurs de virulence précédemment décrits participent aux différentes étapes de l'infection (colonisation, évasion, invasion). Afin d'assurer le bon déroulement de ces étapes, l'expression de ces facteurs est finement et temporellement contrôlée. Ainsi, au début de l'infection, *S. aureus* produit essentiellement des protéines de surface nécessaires à son adhésion aux cellules de l'hôte (Repoila & Darfeuille, 2009). Au moment de l'invasion, l'expression des gènes codant pour des protéines de surface est réprimée et des toxines impliquées dans la dissémination de *S. aureus* sont produites. La production de ces facteurs de virulence est médiée par un réseau de régulation complexe incluant de nombreux acteurs qui répondent à différents signaux environnementaux (densité cellulaire, disponibilité en nutriments, température...) (Cheung *et al.*, 2004). Ces systèmes de régulation regroupent les systèmes à deux composants, les facteurs de transcription et facteurs sigma et les ARN régulateurs (Figure 14). Au vu du nombre impressionnant de facteurs de régulation présents chez *S. aureus*, seuls quelques exemples pour chaque catégorie seront présentés.

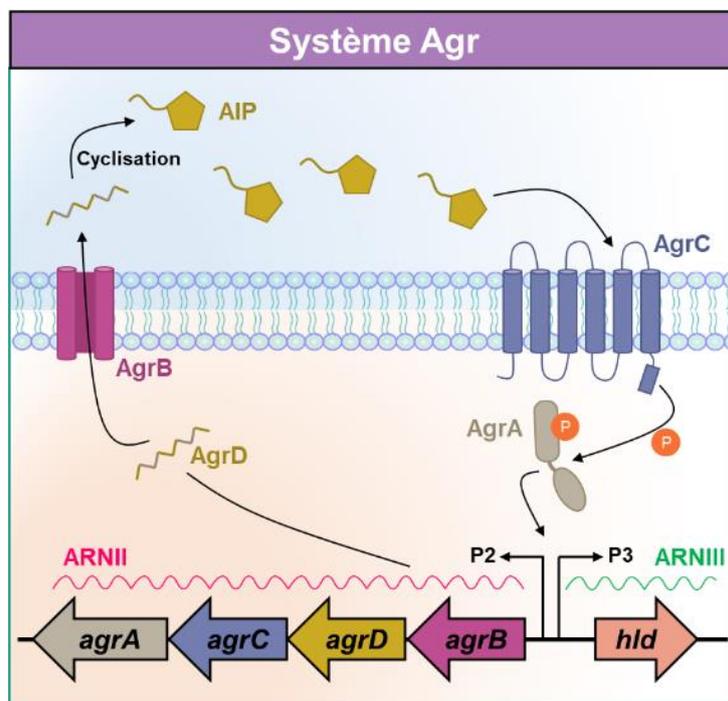


**Figure 14 :** Représentation de quelques facteurs impliqués dans la régulation de la virulence de *Staphylococcus aureus*. Les facteurs mentionnés sur cette figure sont détaillés dans le texte.

### iii.iii.i. Les systèmes à deux composants

Les **systèmes à deux composants** (TCS) perçoivent des signaux permettant l'adaptation des bactéries à leur environnement. Ils sont constitués de deux protéines : une protéine membranaire et une protéine cytoplasmique (**Figure 14**). La protéine membranaire, de type histidine kinase, est un senseur qui s'autophosphoryle en réponse à un signal environnemental. Ce groupement phosphate est ensuite transféré à la protéine cytoplasmique qui est un régulateur de réponse. Une fois phosphorylé, le régulateur peut agir sur l'expression de ses gènes cibles en se fixant à leur promoteur. Chez *S. aureus*, seize TCS ont été identifiés et certains d'entre eux, comme les systèmes AgrAC, SrrAB, SaeRS et LytRS sont impliqués dans la régulation de la pathogénicité de *S. aureus* (Jenul & Horswill, 2019).

Le TCS le plus étudié est le système AgrAC (Accessory gene regulator) (Le & Otto, 2015). C'est un système de quorum-sensing (QS) qui permet aux bactéries de communiquer entre elles *via* la production d'un peptide auto-inducteur (AIP). Le locus *agr* contient deux unités de transcription opposées permettant la synthèse de deux ARN : l'ARNII transcrit à partir du promoteur P2 et l'ARNIII transcrit à partir du promoteur P3 (**Figure 15**). L'ARNII contient les gènes *agrB*, *agrD*, *agrC* et *agrA* qui codent pour des protéines respectivement impliquées dans le transport de l'AIP vers le milieu extracellulaire, la biosynthèse de l'AIP, la perception du signal et la régulation des gènes cibles. L'endopeptidase transmembranaire AgrB permet la sécrétion et une première maturation du peptide AgrD vers le milieu extracellulaire. Une fois sécrété, le peptide est cyclisé et mûri pour former l'AIP. Lorsque la densité bactérienne augmente et que la concentration en AIP atteint un certain seuil, l'AIP se fixe à la protéine membranaire AgrC, ce qui induit l'autophosphorylation d'AgrC et la phosphorylation d'AgrA. Une fois activé, le régulateur AgrA peut lier et activer les promoteurs P2 et P3 et des promoteurs contrôlant l'expression des gènes codant les PSMs. L'activation du promoteur P3 entraîne la production de l'ARNIII qui est l'effecteur majeur du système Agr. L'ARNIII est un ARN régulateur qui induit l'expression de gènes codant des toxines/enzymes impliquées dans l'invasion et l'inhibition de gènes codant des protéines de surface. Le transcrit ARNIII contient aussi un cadre ouvert de lecture qui code pour la  $\delta$ -hémolysine (*hld*). Au vu des nombreux gènes qu'il régule, le système Agr participe aux infections causées par *S. aureus* comme les infections cutanées, les pneumonies, les endocardites ou encore les ostéomyélites (Butrico & Cassat, 2020; Jenul & Horswill, 2019). Cependant, le système Agr n'est pas essentiel à la survenue des infections puisque des souches de *S. aureus* ayant un système Agr déficient peuvent toujours être à l'origine d'infections systémiques comme les bactériémies (Lee *et al.*, 2020). Le système de QS Agr permet aussi à *S. aureus* de communiquer avec d'autres espèces bactériennes. Par exemple, des peptides AIP inhibiteurs produits par certains Staphylocoques (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*) permettent de bloquer le système Agr et, en conséquence, de protéger *S. aureus* de l'infection par des phages (Yang *et al.*, 2023).



**Figure 15 : Fonctionnement du système de quorum-sensing Agr.** AIP : Peptide auto-inducteur, P2, P3 : Promoteurs P2 et P3, P : Phosphorylation du régulateur AgrA. Le fonctionnement du système Agr est décrit dans le texte.

Parmi les autres TCS, les systèmes **SrrAB**, **SaeRS** et **LytRS** peuvent être cités :

- SrrAB (Staphylococcal respiration response) est composé du senseur membranaire SrrB et du régulateur de réponse SrrA (Bronner *et al.*, 2004). Ce système est activé en condition d'hypoxie et permet l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la respiration anaérobie ou la fermentation (alcool déshydrogénase, lactate déshydrogénase). En condition anaérobie, les ménaquinones (transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire) réduites s'accumulent à la membrane (Tiwari *et al.*, 2020). Cette accumulation induit la réduction des cystéines localisées dans la région C-terminale de SrrB ce qui active SrrB et permet la phosphorylation de SrrA. Une fois activé, SrrA inhibe l'expression du locus *agr* et des gènes codant la protéine A et la toxine TSST-1 (Pragman *et al.*, 2004). La disponibilité en oxygène étant limitée dans l'environnement osseux, SrrAB contribue au développement des ostéomyélites (Wilde *et al.*, 2015). Enfin, ce système permet aussi à *S. aureus* de se défendre contre le stress oxydant médié par l'oxyde nitrique ou le peroxyde d'hydrogène (Kinkel *et al.*, 2013; Mashruwala & Boyd, 2017).
- Le système SaeRS (*S. aureus* exoprotein expression) est constitué de l'histidine kinase SaeS et de la protéine cytoplasmique SaeR (Liu *et al.*, 2016). Le locus *sae* contient quatre gènes (*saeP*, *saeQ*, *saeR* et *saeS*) et deux promoteurs (P1 et P3). Les gènes *saeR* et *saeS* peuvent être transcrits à partir du promoteur P1 ou P3. Le promoteur P3 est constitutif tandis que le promoteur P1 est autorégulé par SaeR et réprimé en condition de pH bas (pH 5,5) ou en présence de fortes concentrations en sel (NaCl 1M). Divers signaux environnementaux peuvent activés SaeS comme, par exemple, la sécrétion de certains peptides antimicrobiens par les neutrophiles. Cependant, les mécanismes expliquant comment ces signaux sont reconnus par SaeS restent à être identifiés. SaeRS est un régulateur majeur de la virulence de *S. aureus* puisqu'il est responsable de la

production de plus de vingt facteurs de virulence comme l' $\alpha$ -hémolysine, la coagulase, la nucléase, la toxine TSST-1, les adhésines FnBPA et FnBPB et certaines leucocidines.

- L'autolyse de *S. aureus* est en partie régulée par le système LytRS. Ce dernier est composé du senseur membranaire LytS et du régulateur LytR (Brunskill & Bayles, 1996). Lors d'une altération du potentiel électrique membranaire, LytS phosphoryle LytR ce qui permet de l'activer. Une fois activé, LytR agit positivement sur l'expression de l'opéron *IrgAB*. Les protéines LrgA et LrgB permettent de contrôler la lyse bactérienne en diminuant l'activité des muréines hydrolases (Groicher *et al.*, 2000).

### iii.iii.ii. Les facteurs sigma et les facteurs de transcription

Les **facteurs sigma** ainsi que **les facteurs de transcription** sont d'autres facteurs protéiques qui participent à la régulation de la virulence de *S. aureus* (Figure 14) :

- Le facteur alternatif **sigma B** ( $\sigma^B$ ) :

En s'associant avec l'ARN polymérase, les facteurs sigma participent à l'étape d'initiation de la transcription en se fixant sur des séquences d'ADN spécifiques localisées dans le promoteur des gènes. Tandis que sigma A est un facteur général de la transcription et permet l'expression des gènes de ménage chez *S. aureus*, le facteur alternatif sigma B permet de réguler la transcription de gènes impliqués dans la réponse aux stress (Jenul & Horswill, 2019). En effet, certaines conditions environnementales comme un stress oxydant, acide ou thermique peuvent activer  $\sigma^B$ . Ce dernier régule, de manière directe ou indirecte, plus de 200 gènes dont des gènes associés à la virulence, la formation de biofilms ou encore à la résistance aux antibiotiques.  $\sigma^B$  influence aussi l'expression d'autres régulateurs comme le système Agr ou le facteur de transcription SarA.

- Les facteurs de transcription de la famille **Sar** :

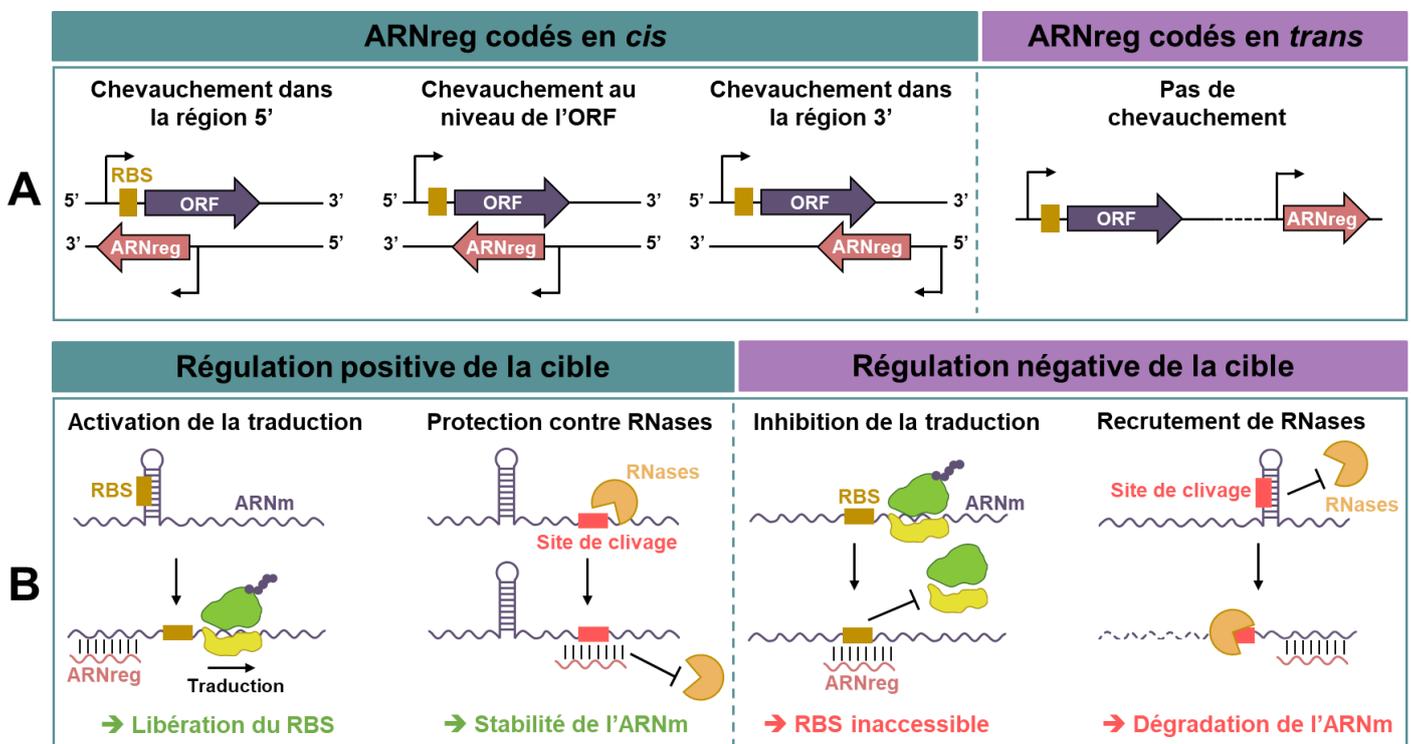
La famille Sar (Staphylococcal accessory regulator) est composée de 11 régulateurs protéiques : SarA, SarR, SarS, SarT, SarU, SarV, SarX, SarY, SarZ, MgrA et Rot (Cheung *et al.*, 2008). SarA est le principal représentant de cette famille et se fixe sous la forme d'un dimère au niveau du promoteur de ses gènes cibles afin d'activer ou de réprimer leur transcription (Jenul & Horswill, 2019). Par exemple, SarA agit positivement sur l'expression du système Agr et sur l'expression du gène codant la toxine TSST-1. Au contraire, SarA réprime la transcription du gène codant la protéine A (Chien *et al.*, 1999) et peut aussi réprimer l'expression des ARN régulateurs SprC et Srn\_9340 (Mauro *et al.*, 2016). MgrA et Rot sont deux autres régulateurs de la famille Sar. MgrA favorise l'expression du système Agr, des gènes *cap* impliqués dans la formation de la capsule et inhibe la production de la protéine A (Jenul & Horswill, 2019). De son côté, Rot (Repressor of toxins) active l'expression de protéines de surface comme la protéine A et réprime plusieurs toxines comme l'entérotoxine B et l' $\alpha$ -hémolysine.

- Le régulateur **CodY** :

CodY est un autre régulateur présent chez *S. aureus*. Ce facteur de transcription, en détectant la disponibilité en nutriments par interaction directe avec certains métabolites (GTP, acides aminés à chaîne ramifiée) est notamment impliqué dans la transition entre la phase exponentielle et stationnaire de croissance (Majerczyk *et al.*, 2010). En effet, en présence de nutriments, CodY réprime la transcription de gènes du métabolisme, en particulier ceux de la biosynthèse des acides aminés. CodY peut aussi réprimer le système Agr, des gènes codant des cytotoxines (*hla*, *lukSF-PV*) et des protéases (*sspA*, *sspB*) (Majerczyk *et al.*, 2010).

### iii.iii.iii. Les ARN régulateurs

En plus des régulateurs protéiques précédemment décrits, *S. aureus* compte aussi dans son réseau de régulation des ARN nommés **ARN régulateurs** (ARNreg) (Figure 14). Ces derniers sont généralement des ARN non codants de petites tailles (entre 50 et 500 nucléotides) impliqués dans la virulence et l'adaptation des bactéries à leur environnement (Fröhlich & Vogel, 2009; Quereda & Cossart, 2017; Waters & Storz, 2009). Les cibles régulées par les ARNreg peuvent être des protéines ou des ARN (Storz *et al.*, 2011). Les ARNreg ciblant des ARN sont séparés en deux classes selon leur locus d'expression par rapport à leur(s) cible(s) : les ARNreg antisens codés en *cis* et ceux codés en *trans* (Figure 16A) (Svensson & Sharma, 2016).



**Figure 16 : Localisation génomique des ARN régulateurs et mécanismes d'action.** (A) Représentation schématique de la localisation des ARNreg codés en *cis* et en *trans*. (B) Mécanismes de régulation de l'expression des ARNm par les ARNreg. RBS : Ribosome Binding Site, ORF : Cadre ouvert de lecture.

Les ARNreg codés en *cis* sont exprimés à partir du brin opposé au gène codant l'ARN messager (ARNm) cible. Au vu de cette localisation, la complémentarité entre l'ARNreg et sa cible est parfaite. Cette région complémentaire peut être située au niveau de la région 5'-UTR (Untranslated regions), du cadre ouvert de lecture (ORF) ou de la région 3'-UTR de l'ARNm. De leur côté, les ARNreg codés en *trans* sont exprimés à partir d'un locus génomique distant de celui de leurs cibles ce qui leur permet de réguler plusieurs ARNm (Papenfort & Vogel, 2009). Au niveau mécanistique, les ARNreg peuvent activer ou réprimer l'expression d'un ARNm (Figure 16B) (Svensson & Sharma, 2016). En se fixant sur un ARNm, l'ARNreg peut permettre d'activer la traduction de cet ARNm en libérant la zone de fixation du ribosome (ou RBS pour Ribosome Binding site) ou en le protégeant de l'action des RNases (Ribonucléases). Au contraire, un ARNreg peut inhiber la traduction d'un ARNm en bloquant l'accès au RBS ou en favorisant le recrutement de RNases qui vont dégrader l'ARNm.

Chez *S. aureus*, des centaines d'ARNreg putatifs ont été mis en évidence grâce à des approches de séquençage à haut débit et/ou à des analyses *in silico* (Menard *et al.*, 2022). Ils sont répertoriés dans la base de données SRD (Sassi *et al.*, 2015). Des analyses complémentaires ont permis de valider expérimentalement certains de ces ARNreg candidats et d'identifier les cibles qu'ils régulent. Parmi ces ARNreg, le plus étudié et le mieux décrit est l'ARNIII, l'effecteur du système de QS Agr. C'est un ARN de 514 nucléotides avec une structure complexe comprenant 14 tiges boucles lui permettant de réguler de nombreuses cibles (Bronesky *et al.*, 2016). L'ARNIII s'accumule en phase post-exponentielle de croissance et permet la transition entre un état colonisateur et un état invasif en réprimant l'expression de protéines de surface et en activant l'expression de toxines sécrétées. A ce jour, neuf cibles directes de l'ARNIII ont été identifiées (Tableau 2). L'ARNIII régule négativement certains gènes comme, par exemple, ceux codant la coagulase, la protéine A ou le facteur de transcription Rot. Par ailleurs, les cibles activées par l'ARNIII comprennent les gènes codant l' $\alpha$ -hémolysine ou le facteur de transcription MgrA.

La plupart des autres ARNreg validés expérimentalement chez *S. aureus* sont regroupés sous trois acronymes : les Spr (Small pathogenicity island RNA) (Pichon & Felden, 2005), les Rsa (RNA of *S. aureus*) dont les ARNreg participent à la régulation de la virulence et/ou du métabolisme (Geissmann *et al.*, 2009; Marchais *et al.*, 2009) et les Teg (Transcript from experimental method from Geneva) composés de 163 ARNreg candidats dont seulement deux ont été validés expérimentalement (Beaume *et al.*, 2010). Les cibles et fonctions de ces ARNreg sont présentées dans le Tableau 2. Les Spr seront les seuls ARNreg détaillés dans cette introduction.

L'histoire des Spr débute en 2005 lorsque des analyses bio-informatiques et transcriptomiques ont permis l'identification de sept ARNreg (Pichon & Felden, 2005). Ces derniers, tous localisés sur des îlots de pathogénicité, ont été nommés de SprA à SprG pour « Small pathogenicity island RNA ». En général, ces ARNreg participent à la virulence de *S. aureus* et, à l'exception de SprB, les fonctions et cibles des autres ARNreg Spr ont pu être identifiées. Le premier ARNreg Spr dont la

fonction a été décrite est l'ARN SprD (Chabelskaya *et al.*, 2010). En utilisant un modèle murin de septicémie, les auteurs ont montré que la souche N315 de *S. aureus* est plus virulente que la souche N315 délétée pour le gène *sprD* ( $\Delta sprD$ ). En effet, trois semaines après l'inoculation, toutes les souris infectées par la souche parentale sont mortes tandis que celles infectées par la souche  $\Delta sprD$  ont toutes survécu. Dans cette même étude, l'ARNm du gène *sbi*, codant la protéine Sbi impliquée dans l'échappement de *S. aureus* au SI, a été identifié comme une cible de SprD. Plus précisément, SprD inhibe la traduction de la protéine Sbi en se fixant au niveau du RBS de l'ARNm *sbi*. Contrairement à SprD, l'ARNreg SprC atténue la virulence de *S. aureus* (Le Pabic *et al.*, 2015). Dans un modèle d'infection murin, la souche Newman de *S. aureus* délétée de *sprC* ( $\Delta sprC$ ) est plus virulente que la souche Newman parentale. De plus, la phagocytose par des macrophages humains est augmentée pour la souche  $\Delta sprC$  par rapport à la souche parentale. Ce phénotype peut s'expliquer du fait de la cible de SprC. En effet, SprC inhibe la traduction de l'ARNm *atl* qui code l'autolysine, une protéine qui participe à l'internalisation des bactéries au sein des cellules de l'hôte (Hirschhausen *et al.*, 2010). Ainsi, dans la souche  $\Delta sprC$ , l'autolysine n'est plus réprimée ce qui pourrait favoriser la phagocytose. En ce qui concerne SprX, en condition de surexpression, la fixation de cet ARNreg au niveau du RBS de l'ARNm *spoVG* inhibe la traduction de SpoVG, protéine impliquée dans la formation de la capsule, ce qui diminue la résistance aux glycopeptides (Eyraud *et al.*, 2014). Un autre ARNreg Spr, non identifié lors de l'analyse de 2005, est l'ARNreg SprY (Le Huyen *et al.*, 2021). Dans la souche HG003 de *S. aureus*, le gène *sprY* est localisé sur le prophage  $\phi$  12. En se fixant par complémentarité de base au niveau de la 13<sup>e</sup> tige boucle de l'ARNIII, SprY empêche l'ARNIII de réguler ses cibles (par exemple le gène *rot*) ce qui cause une diminution de l'activité hémolytique et de la virulence de *S. aureus*.

De leur côté, les ARN SprA, SprF et SprG appartiennent à des systèmes toxine-antitoxine de type I et seront décrits dans la partie IV de cette introduction.

**Tableau 2 : Principaux ARNreg exprimés par *Staphylococcus aureus* : cibles identifiées et fonctions.** Les cibles dont l'expression est activée par l'ARNreg sont en vert et les cibles réprimées sont en rouge. Les cibles en noir sont des cibles pour lesquelles l'effet de l'ARNreg n'est pas connu. Dans le cas de la fixation de SprY sur l'ARNIII, SprY semble agir comme un ARN éponge sur l'ARNIII. (Adapté de [Menard et al., 2022](#)).

ARNreg	ARNm cibles	Fonction	Références
ARNIII	<i>spa</i> , <i>sbi</i> , <i>coa</i> , <i>lytM</i> , <i>sa1000</i> , <i>rot</i> , <i>mgrA</i> , <i>hla</i> , <i>map</i> , <i>rpiRc</i>	Provirus	(Bronesky et al., 2016; Liu et al., 2011; Hallier et al., 2024)
<b>ARNreg Spr</b>			
SprC	<i>atl</i>	Antivirulent	(Le Pabic et al., 2015)
SprD	<i>sbi</i>	Provirus	(Chabelskaya et al., 2010)
SprX	<i>spoVG</i> , <i>walR</i> , <i>ecb</i> , <i>clfB</i> , <i>hld</i>	Résistance aux glycopeptides	(Buchad & Nair, 2021; Eyraud et al., 2014; Ivain et al., 2017)
SprY	<i>RNAIII</i>	Antivirulent	(Le Huyen et al., 2021)
<b>ARNreg Rsa</b>			
RsaA	<i>mgrA</i> , <i>flip-r</i> , <i>ssaA</i>	Antivirulent	(Tomasini et al., 2017)
RsaC	<i>sodA</i> , <i>sarA</i>	Provirus/Métabolisme	(Lalaouna, Baude, et al., 2019; Szafranska et al., 2014)
RsaD	<i>alsS</i>	Métabolisme	(Augagneur et al., 2020)
RsaE	<i>rocF</i>	Métabolisme	(McKellar et al., 2022; Rochat et al., 2018)
RsaF	<i>hysA</i> , <i>splD</i>	Inconnue	(Patel & Nair, 2021)
RsaG	<i>rex</i> , <i>tcar</i> , <i>sarA</i> , <i>idh1</i> , <i>ccpA</i>	Métabolisme	(Desgranges et al., 2022)
RsaI	<i>glcU_2</i> , <i>fn3K</i> , <i>icaR</i>	Métabolisme	(Bronesky et al., 2019)
<b>ARNreg Teg</b>			
Teg41	<i>psma</i>	Provirus	(Zapf et al., 2019)
Teg49	<i>sarA</i> , <i>spr</i>	Inconnue	(Cengher et al., 2022)

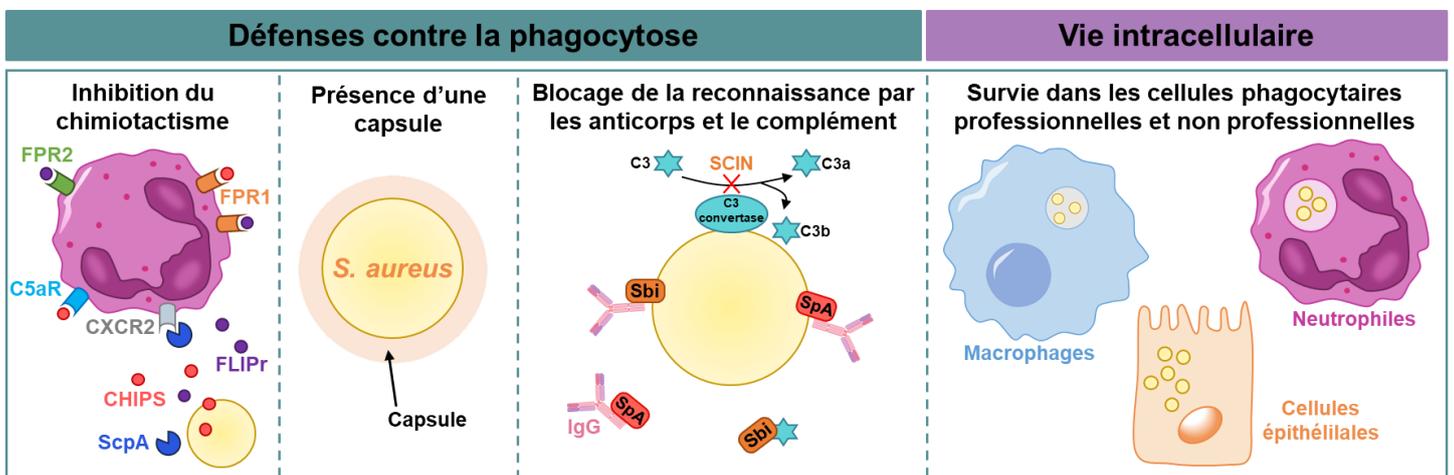
#### iv. *S. aureus* contre le système immunitaire et les antibiotiques

Lors de l'infection de l'hôte, *S. aureus* fait face à plusieurs adversaires : le système immunitaire et les antibiotiques. Pour se défendre, *S. aureus* peut se protéger de la phagocytose, survivre dans les cellules de l'hôte, ralentir sa croissance en formant des Small Colony Variants (SCV), vivre au sein d'un biofilm ou bien utiliser des mécanismes pour résister/persister aux antibiotiques. Ainsi, l'ensemble de ces stratégies sont des obstacles qui compliquent le traitement des infections.

##### iv.i. Inhibition de la phagocytose et survie intracellulaire

Comme précédemment évoqué dans cette introduction, *S. aureus* peut se défendre des attaques de l'hôte en utilisant des toxines qui détruisent les cellules immunitaires ou des superantigènes qui dérèglent le SI (Tam & Torres, 2019). Lors d'une infection, les cellules immunitaires phagocytaires (neutrophiles, macrophages) sont réquisitionnées pour internaliser les pathogènes afin de les éliminer (McGuinness *et al.*, 2016). Ces cellules sont attirées dans la zone infectée par chimiotactisme, ce qui nécessite des molécules chimioattractantes comme, par exemple, les molécules C5a et C3a (Complement component), IL-8 (Interleukine 8) ou le peptide fMLP (N-Formylmethionine-leucyl-phenylalanine) produit par les bactéries (de Jong *et al.*, 2019). L'une des stratégies employée par *S. aureus* pour bloquer la phagocytose est donc d'empêcher l'arrivée des neutrophiles au niveau du site infecté (de Jong *et al.*, 2019) (Figure 17). Pour cela, il dispose, par exemple, de la protéine sécrétée CHIPS (Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus*) qui se fixe sur les récepteurs FPR1 (Formyl peptide receptor 1) et C5aR (C5a receptor), récepteurs de molécules chimioattractantes exprimés à la membrane des neutrophiles (Postma *et al.*, 2004). Cette fixation empêche les récepteurs FPR1 et C5aR de reconnaître leur ligand endogène, à savoir, respectivement, les molécules fMLP et C5a, ce qui inhibe le chimiotactisme. La protéine FLIPr (FPR inhibitory protein) inhibe le chimiotactisme par un même mécanisme en se fixant sur les récepteurs FPR1 et FPR2 (Prat *et al.*, 2006). De son côté, la staphopaine A (ScpA) empêche les neutrophiles de reconnaître les molécules chimioattractantes (e.g. Interleukine 8) en dégradant le récepteur membranaire CXCR2 (Chemokine receptor 2) localisé sur les cellules immunitaires (Laarman *et al.*, 2012).

Une fois les cellules immunitaires arrivées au site d'infection, la prochaine étape consiste à éliminer les bactéries par phagocytose (Cheung *et al.*, 2021). Pour cela, les bactéries sont opsonisées, c'est à dire que leur surface est recouverte par des anticorps ou des molécules appartenant au système du complément. L'un des mécanismes de défense utilisé par les bactéries pour se protéger de la phagocytose est de masquer les antigènes présents à leur surface en produisant une capsule polysaccharidique (Figure 17). Chez *S. aureus*, 13 sérotypes de capsule ont été décrits (Visansirikul *et al.*, 2020). Les sérotypes les plus abondants sont les sérotypes 5 et 8 qui sont respectivement retrouvés chez 25% et 50% des souches cliniques (O'Riordan & Lee, 2004). Cependant, les souches cliniques ne possèdent pas toutes une capsule ce qui indique que *S. aureus* peut se protéger de la phagocytose par d'autres mécanismes (Boyle-Vavra *et al.*, 2015).



**Figure 17 : Stratégies utilisées par *Staphylococcus aureus* pour se défendre contre le système immunitaire.** FPR : Formyl peptide receptor, C5aR : C5a receptor, CXCR2 : Chemokine receptor, CHIPS : Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus*, FLIPr : FPR inhibitory protein, SCIN : Staphylococcal complement inhibitor, ScpA : Staphopaine A, IgG : Immunoglobuline G, SpA : Protéine A, Sbi : Staphylococcal binding of IgG. La C3 convertase et les molécules C3, C3a et C3b appartiennent au complément.

*S. aureus* produit aussi des molécules lui permettant d'empêcher la fixation des anticorps ou des molécules du complément à sa surface (par exemple la molécule C3b) (Figure 17). La protéine A est la première molécule décrite comme ayant des propriétés anti-phagocytaires du fait de sa fixation sur la région Fc des anticorps (Cruz et al., 2022; Lee et al., 2021). Or, cette région est normalement reconnue par les récepteurs Fc des cellules phagocytaires ce qui permet d'enclencher le processus de phagocytose. Une autre protéine produite par *S. aureus* et liant les anticorps est la protéine Sbi (Staphylococcal binding of IgG) (Zhang et al., 1998). Dans sa région N-terminale, cette protéine contient deux domaines liant la région Fc des anticorps et deux domaines pouvant se fixer à la molécule C3 (molécule du complément) (Smith et al., 2011). Contrairement à la protéine A, la protéine Sbi se fixe à la région Fc des anticorps uniquement lorsqu'elle est ancrée à la membrane bactérienne (Smith et al., 2011). Lorsqu'elle est sécrétée, la protéine Sbi se fixe à la molécule C3 ce qui empêche sa conversion en anaphylatoxine C3a et en opsonine C3b. La conversion de la molécule C3 en C3a et C3b est également inhibée par une autre protéine de *S. aureus* : la protéine SCIN (Staphylococcal complement inhibitor) (Rooijackers et al., 2005). Cette protéine agit en bloquant l'activité de la C3 convertase, complexe enzymatique du complément, qui adhère à la surface bactérienne et qui permet la transformation de la molécule C3 en C3a et C3b.

Un autre moyen utilisé par *S. aureus* pour se protéger du SI et des antibiotiques est de se dissimuler dans les cellules phagocytaires non professionnelles ou professionnelles (Figure 17). Bien que longtemps considéré comme un pathogène extracellulaire, de nombreuses études ont montré que *S. aureus* peut aussi être un pathogène intracellulaire facultatif. En effet, il peut être internalisé et survivre dans les cellules épithéliales et endothéliales, les ostéoblastes mais aussi les fibroblastes (Bayles et al., 1998; Dziewanowska et al., 2000; Ellington et al., 1999; Hirschhausen et al., 2010). La survie de *S. aureus* dans les macrophages et les neutrophiles a également été observée (Gresham et al., 2000; Koziel et al., 2009). De plus, une étude a montré que la plupart des isolats cliniques peuvent être internalisés et se répliquer dans plusieurs lignées cellulaires (cellules épithéliales et endothéliales, ostéoblastes, macrophages) (Rodrigues Lopes et al., 2022).

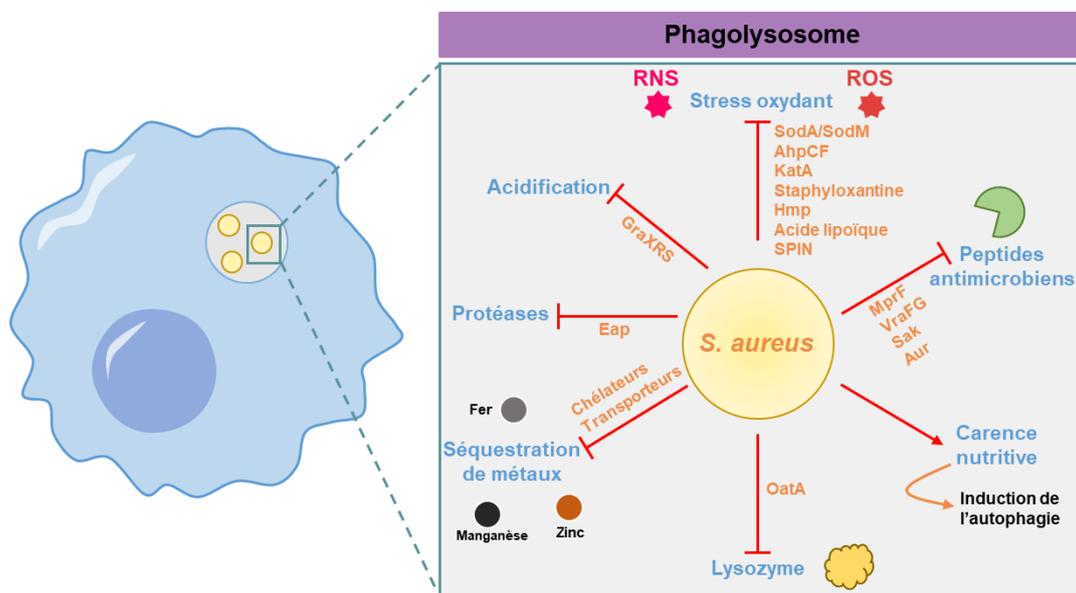
En dehors de la phagocytose, l'internalisation de *S. aureus* peut être médiée par certaines adhésines présentes à sa surface (Josse *et al.*, 2017). Par exemple, la fixation des protéines FnBPA et FnBPB sur les intégrines  $\alpha 5\beta 1$  via un pont de fibronectine permet l'endocytose de *S. aureus* par un mécanisme « zipper-like ». Ce mécanisme est dû à un réarrangement du cytosquelette et fait intervenir des filaments d'actine et de septine (Robertin *et al.*, 2023). Les autres mécanismes d'internalisation sont présentés dans le **Tableau 3**.

**Tableau 3 : Mécanismes d'internalisation de *S. aureus* dans les cellules eucaryotes.** FnBP : Fibronectin Binding Protein, ClfA : Clumping factor A, SdrD : Serine-aspartate repeat-containing protein D, IsdB : Iron regulated surface determinant B, SraP : Serine-rich adhesin of Platelets, Eap : Extracellular adherence protein, SEB : Staphylococcal enterotoxin B. (Adapté de Josse *et al.*, 2017).

Molécule impliquée dans l'internalisation	Récepteur sur l'hôte	Type de cellule	Références
FNBPA/FNBPB	Intégrine $\alpha 5\beta 1$	Epithéliale, Kératinocyte, Fibroblaste	(Fowler <i>et al.</i> , 2000; Kintarak <i>et al.</i> , 2004; Sinha <i>et al.</i> , 1999)
FNBPA/FNBPB	Hsp60	Kératinocyte	(Dziewanowska <i>et al.</i> , 2000)
Autolysine	Hsc70	Endothéliale	(Hirschhausen <i>et al.</i> , 2010)
ClfA	Annexine A2	Epithéliale	(Ashraf <i>et al.</i> , 2017)
ClfA	Intégrine $\alpha V\beta 3$	Endothéliale	(McDonnell <i>et al.</i> , 2016)
SdrD	Desmogléine 1	Kératinocyte, Cellules épithéliales nasales	(Askarian <i>et al.</i> , 2016; Corrigan <i>et al.</i> , 2009)
IsdB	Intégrine	Epithéliale	(Zapotoczna <i>et al.</i> , 2013)
SraP	Acide N-acétylneuraminique	Epithéliale	(Yang <i>et al.</i> , 2014)
Tet38	CD36	Epithéliale	(Truong-Bolduc <i>et al.</i> , 2017)
Eap	Inconnu	Fibroblaste, Kératinocyte	(Bur <i>et al.</i> , 2013; Hagggar <i>et al.</i> , 2003)
GapC	Inconnu	Epithéliale	(Kerro-Dego <i>et al.</i> , 2012)
SEB	Inconnu	Mastocyte	(Hayes <i>et al.</i> , 2020)

Selon le type cellulaire dans lequel *S. aureus* est internalisé, son devenir diffère (Moldovan & Fraunholz, 2019). Lorsqu'il est internalisé dans des cellules phagocytaires non professionnelles, *S. aureus* s'échappe de l'endosome et se réplique dans le cytosol. Au contraire, s'il est internalisé par des cellules phagocytaires professionnelles, il peut survivre et se répliquer dans le phagolysosome. Cependant, le phagolysosome est un environnement hostile pour les bactéries puisque de nombreux mécanismes y sont mis en place pour éliminer les agents pathogènes : stress oxydant, acidification, peptides antimicrobiens, carence nutritive (Hommes & Surewaard, 2022; Pidwill *et al.*, 2020) (**Figure 18**). Pour chacun des stress rencontrés dans le phagolysosome, *S. aureus* dispose de mécanismes spécifiques capables de neutraliser l'effet de ces stress :

- **Lutte contre le stress oxydant** : Production de la staphyloxanthine qui a des propriétés antioxydantes et/ou production d'enzymes capables d'éliminer les espèces réactives de l'oxygène ou de l'azote : superoxydes dismutases (SodA et SodM), catalase A (KatA), alkyl-hydroperoxidase reductase (AhpCF), flavohémoglobine (Hmp) (**Figure 18**).
- **Lutte contre l'acidification** : Utilisation du système à deux composants GraXRS qui répond à un pH bas et qui est impliqué dans la résistance à l'acidification (**Figure 18**) (Flannagan *et al.*, 2018).
- **Lutte contre les peptides antimicrobiens et les protéases** : Modification du potentiel membranaire bactérien (augmentation des charges positives à la surface membranaire) par MprF (Multiple peptide resistance factor) ou VraFG pour bloquer l'action des antimicrobiens chargés positivement. La production d'enzymes qui détruisent les peptides antimicrobiens (Auréolysine, Staphylokinase) est aussi possible. De plus, l'acétylation du peptidoglycane par l'enzyme OatA (O-acetyltransferase) permet d'empêcher sa dégradation par le lysozyme. La protéine Eap inhibe l'activité de certaines protéases de l'hôte comme l'élastase du neutrophile ou la cathepsine G (**Figure 18**).
- **Lutte contre la carence nutritive** : Le phagolysosome est un environnement pauvre en métaux et en nutriments essentiels à la survie de *S. aureus*. Pour capter ces métaux, *S. aureus* produit des transporteurs à métaux et des agents chélateurs (Transporteurs du manganèse (MntH, MntABC), staphyloferrine (sidérophore)). *S. aureus* peut aussi induire l'autophagie de la cellule dans laquelle il est internalisé afin d'obtenir les nutriments nécessaires à sa prolifération (**Figure 18**).



**Figure 18 : Stratégies mises en place par *Staphylococcus aureus* pour survivre dans le phagolysosome.** Les molécules permettant à *S. aureus* de survivre dans le phagosome sont en orange. Les mécanismes de défense sont décrits dans le texte. ROS : Reactive Oxygen Species, RNS : Reactive Nitrogen Species, Sod : Superoxyde dismutase, AhpCF : Alkyl hydroperoxidase reductase, KatA : Catalase A, Hmp : Flavohémoglobine, SPIN : Staphylococcal peroxidase inhibitor, MprF : Multiple peptide resistance factor, VraFG : ABC transporteur, Sak : Staphylokinase, Aur : Auréolysine, OatA : O-acetyltransferase, Eap : Extracellular adherence protein, GraXRS : Système à deux composants. (D'après Hommes et Surewaard, 2022).

Finalement, les mécanismes de défense précédemment décrits permettent la survie de *S. aureus* dans les premières lignes de défense de l'hôte. En se dissimulant dans celles-ci, cela lui permet de les utiliser comme un Cheval de Troie propice à la dissémination et à la chronicité des infections (Li *et al.*, 2017; Thwaites & Gant, 2011).

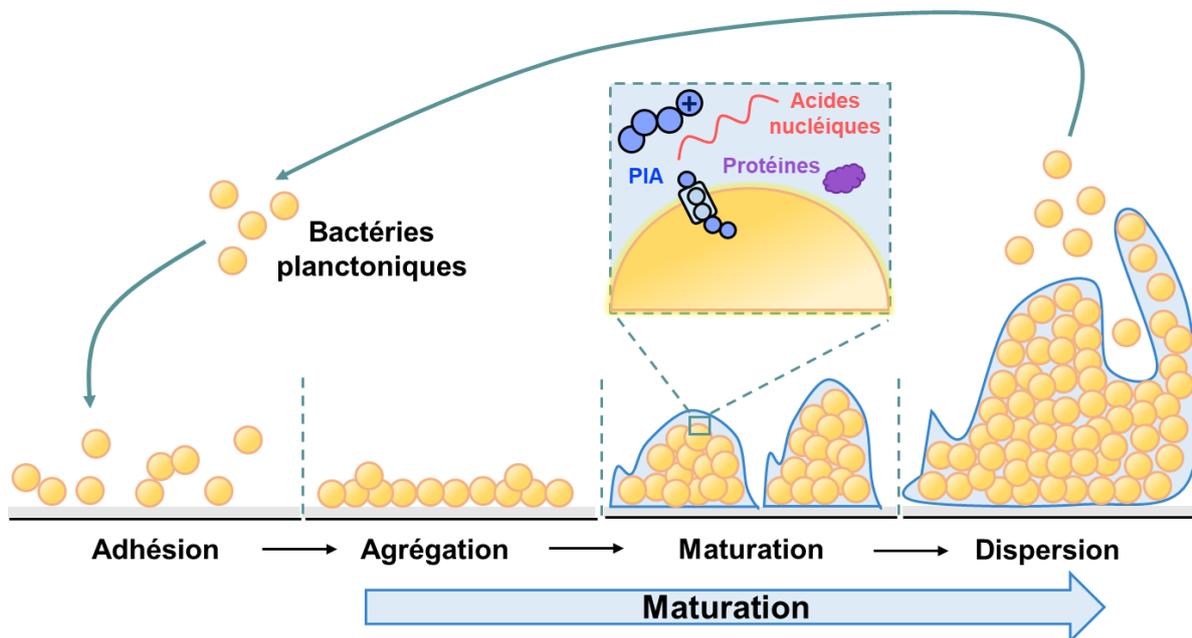
#### iv.ii. Les Small Colony Variants

Dès 1995, les infections chroniques et récurrentes causées par *S. aureus* ont été associées à la formation de bactéries ayant un phénotype morphologique altéré : les SCV (Proctor *et al.*, 1995). Plus tard, d'autres études ont confirmé l'implication des SCV dans une diversité d'infections chroniques (endocardites, ostéomyélites, infections respiratoires chez les patients atteints de mucoviscidose) (Kahl *et al.*, 2016). Ces infections sont favorisées du fait de la résistance accrue des SCV à plusieurs antimicrobiens comme les aminosides, la ciprofloxacine, la daptomycine ou encore les peptides antimicrobiens cationiques (Zhou *et al.*, 2022). De plus, en limitant la réponse inflammatoire de l'hôte, les SCV sont particulièrement bien adaptés à la vie intracellulaire (Tuchscher *et al.*, 2010). Cette adaptation est en partie due à une déficience du système Agr chez les SCV ce qui cause une baisse de la production de l'ARNIII (Huitema *et al.*, 2021). Un niveau faible de l'ARNIII se traduit par une augmentation de la production des facteurs d'adhésion et une diminution des facteurs de virulence ce qui favorise la survie intracellulaire des SCV. Récemment, une étude a montré que la survie prolongée des SCV au sein des voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose pourrait favoriser l'apparition de résistance chez ces bactéries (Millette *et al.*, 2023). Comparées aux souches parentales, les colonies formées par les SCV sur milieu gélosé sont dix fois plus petites et ne sont pas pigmentées (production faible de la staphyloxantine) (Proctor *et al.*, 2006). Aussi, les SCV sont non hémolytiques (diminution de la production des hémolysines) et se répliquent lentement. Au niveau génétique, les SCV contiennent le plus souvent des mutations localisées dans des gènes impliqués dans la biosynthèse de la ménadione, de l'hémine ou de la thymidine ce qui les rend auxotrophes pour ces composés (Zhou *et al.*, 2022). La ménadione et l'hémine participent à la biosynthèse de composants présents dans la chaîne de transport des électrons (cytochromes, ménaquinones). Les SCV auxotrophes pour l'hémine et la ménadione sont donc caractérisés par une baisse de la production d'ATP. Des mutations au niveau de gènes nécessaires à la biosynthèse des acides gras insaturés ou au fonctionnement du cycle de Krebs ont également été détectées. Bien que les mécanismes à l'origine de la formation des SCV ne soient pas encore bien compris, certaines conditions environnementales peuvent favoriser leur formation : vie intracellulaire, biofilm, pH acide, choc thermique froid, carence nutritive, antibiotiques et désinfectants (triclosan) (Guo *et al.*, 2022). *P. aeruginosa*, en produisant du 2-n-heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxide et de la pyocyanine, participe aussi à la formation de SCV par *S. aureus* (Gounani *et al.*, 2020). Cependant, les SCV ont généralement un phénotype instable ce qui leur permet de retrouver rapidement leur phénotype original pour, de nouveau, infecter leur hôte (Tuchscher *et al.*, 2011).

### iv.iii. Une vie sous forme de biofilms

Le biofilm, terme proposé par J. William Costerton en 1978 (Costerton *et al.*, 1978), est défini comme une communauté microbienne structurée, attachée à une surface et entourée par une matrice extracellulaire. Ce mode de vie permet aux bactéries de se protéger des conditions hostiles qu'elles peuvent rencontrer dans l'environnement et au cours de l'infection : antibiotiques, désinfectants, température, phagocytose, carence nutritive. Ainsi, les bactéries présentes dans le biofilm sont généralement 10 à 1000 fois plus résistantes aux antibiotiques que les bactéries planctoniques (Mah & O'Toole, 2001). Plusieurs facteurs peuvent expliquer ceci. Premièrement, le biofilm constitue une barrière qui ralentit ou bloque la diffusion de certains antibiotiques comme les aminosides, les  $\beta$ -lactamines ou les céphalosporines (Rowe *et al.*, 2021). De plus, au sein du biofilm, différentes sous-populations de bactéries présentant un métabolisme altéré et un ralentissement de croissance peuvent coexister (SCV, bactéries tolérantes/persistantes (voir chapitre III) ce qui rend les antibiotiques inefficaces (Stewart, 2002). La diminution de la sensibilité des biofilms aux antibiotiques complique le traitement des infections et il est estimé que 80% des infections sont associées à des biofilms, en particulier les infections sur matériel implanté (Reffuveille *et al.*, 2017).

La formation d'un biofilm par *S. aureus* est un processus complexe qui peut être divisé en 4 étapes principales : l'adhésion, l'agrégation intercellulaire, la maturation et la dispersion (Figure 19).

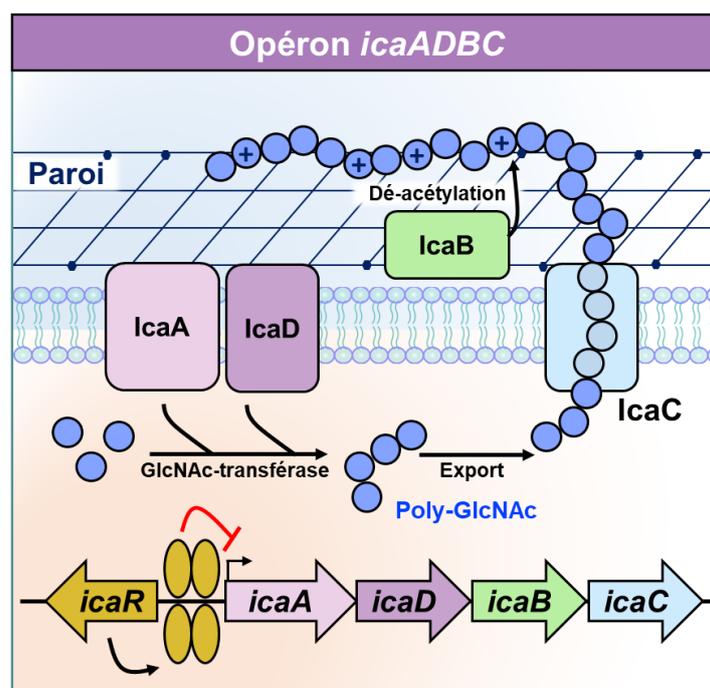


**Figure 19 : Etapes de la formation du biofilm par *Staphylococcus aureus*.** Le PIA, les acides nucléiques et les protéines sont des composants de la matrice extracellulaire du biofilm.

L'étape d'**adhésion**, au cours de laquelle les bactéries planctoniques s'attachent à une surface biotique ou abiotique, initie la formation du biofilm (Schilcher & Horswill, 2020). L'attachement aux surfaces biotiques (tissus de l'hôte) est médié par des protéines CWA notamment celles de la famille des MSCRAMMs (FnBP, ClfA, ClfB, protéines Sdr).

*S. aureus* peut aussi former des biofilms sur des surfaces abiotiques comme les plans de travail dans le milieu agroalimentaire ou hospitalier et les dispositifs médicaux (implants, prothèses, cathéters). Par exemple, des biofilms peuvent se développer sur le titane et le cobalt qui sont des biomatériaux et donc favoriser les infections sur matériel implanté (François *et al.*, 2023). Dans le cas de ces surfaces, l'adhésion des bactéries se fait principalement *via* des interactions hydrophobes et électrostatiques (Schilcher & Horswill, 2020). D'autres acteurs peuvent intervenir comme la protéine AtlA qui contribue à l'attachement au verre ou au polystyrène mais aussi les WTA dont la charge positive permet l'interaction avec des surfaces plastiques.

Une fois que les bactéries ont adhéré au support, c'est l'étape d'**agrégation intercellulaire**. Les bactéries commencent à proliférer et à se lier entre elles pour initier la formation de la structure tridimensionnelle du biofilm (Schilcher & Horswill, 2020). Puis, au cours de la **maturation**, les bactéries produisent la matrice extracellulaire qui entoure le biofilm et qui est composée de polysaccharides, de protéines et d'ADN extracellulaire (ADNe) (Figure 19). Selon la composition de la matrice, les biofilms formés par *S. aureus* peuvent être divisés en 2 catégories : les biofilms avec une matrice de polysaccharides et ceux avec une matrice protéique. A noter que les souches de *S. aureus* sensibles à la méticilline ont tendance à former un biofilm de polysaccharides tandis que les souches résistantes à la méticilline (voir partie II.iv.iv.) forment plutôt un biofilm de type protéique. Le composant majeur des biofilms ayant une matrice de polysaccharides est le poly- $\beta$ (1-6)-N-acetylglucosamine (PNAG) aussi connu sous le nom d'adhésine polysaccharide intercellulaire (PIA) (Nguyen *et al.*, 2020). Les gènes nécessaires à la biosynthèse du PIA sont regroupés dans le locus *ica* (intercellular adhesion) qui est composé de l'opéron *icaADBC* et du gène *icaR* codant pour un facteur de transcription (Figure 20).



**Figure 20 : Organisation génétique de l'opéron *icaADBC* et formation du PIA.** La synthèse du PIA est détaillée dans le texte. GlcNAc : N-acétylglucosamine. (D'après Nguyen *et al.*, 2020).

La synthèse du PIA nécessite deux N-acétylglucosamine transférases (IcaA et IcaD) qui permettent la production d'un polymère de N-acétylglucosamine à partir de monomères d'UDP-N-acétylglucosamine (Nguyen *et al.*, 2020). La protéine IcaC exporte ensuite le PIA à la surface de la bactérie. Puis, l'enzyme IcaB, localisée dans la paroi, introduit des charges positives au PIA en le désacétylant. Ces charges positives permettent l'attachement du PIA à la surface des bactéries et participent à l'interaction des bactéries entre elles au sein du biofilm. La production du PIA et la transcription de l'opéron *icaADBC* sont contrôlées par certains facteurs environnementaux comme l'anaérobiose, le glucose, les antibiotiques mais aussi par le régulateur IcaR qui réprime l'opéron *icaADBC*. Pour les biofilms protéiques, la matrice est produite indépendamment de l'opéron *icaADBC* (Zapotoczna *et al.*, 2016). Elle est composée de protéines de surface (Bap (Biofilm-associated protein), SasG, FnBP, Clf...), de protéines secrétées (Emp et Eap) et d'ADNe.

Finalement, la **dispersion** est la dernière étape de la vie du biofilm (Schilcher & Horswill, 2020). Les bactéries se détachent et se dispersent pour coloniser d'autres surfaces. Les principaux responsables de cette étape sont les protéases, les nucléases et les PSMs. Les protéases détruisent les protéines de la matrice : la protéase SspA dégrade les adhésines FnBP et Bap et l'auréolysine dégrade les protéines Bap et ClfB. De leur côté, les nucléases déstructurent le biofilm en clivant l'ADNe. Les PSMs, du fait de leur nature amphiphile, favorisent la maturation et la dispersion du biofilm en perturbant les interactions non covalentes entre les composants de la matrice.

L'ensemble des étapes de la formation du biofilm est finement contrôlé par de nombreux acteurs comme des régulateurs protéiques et des ARNreg (Peng *et al.*, 2022). Ces derniers sont détaillés dans le **tableau 4**. Récemment, une étude s'est attelée à la découverte de nouveaux gènes impliqués dans la formation du biofilm et a identifié les gènes *manA*, *narH* et *fruB* (Long *et al.*, 2023). Ces gènes contribuent à la formation du biofilm par *S. aureus* mais le mécanisme exact reste à élucider.

**Tableau 4 : Principaux régulateurs participant à la vie du biofilm.** (D'après Schilcher & Horswill, 2020 et Peng *et al.*, 2022).

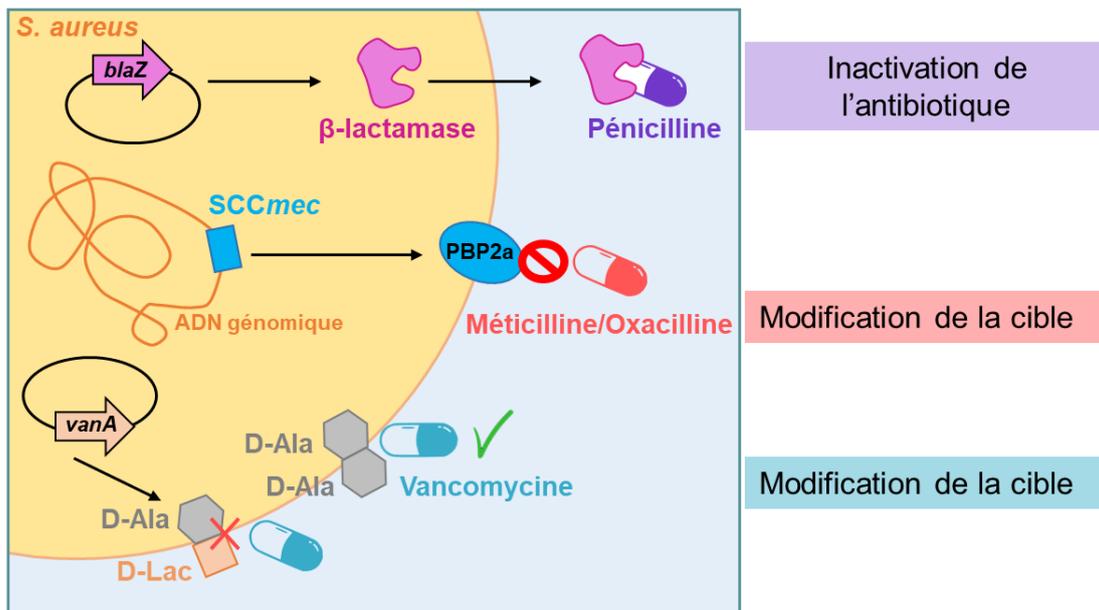
Régulateur	Fonctions dans le biofilm
<b>Régulateurs protéiques</b>	
<b>Agr</b>	Dispersion du biofilm : Inhibition des adhésines, activation des protéases et des PSMs
<b>SaeRS</b>	Maturation du biofilm par activation des nucléases et donc lyse de l'ADNe de la matrice
<b>LytSR</b>	Régulation de la lyse cellulaire et donc de la quantité d'ADNe dans la matrice
<b>SarA</b>	Formation du biofilm : Répression des protéases et activation de la production du PIA
<b>CodY</b>	Formation du biofilm : Répression des protéases et activation de la production du PIA
<b>Rot</b>	Formation du biofilm : Activation des adhésines et répression des protéases
<b>MgrA</b>	Dispersion du biofilm : Répression des adhésines
<b>SigB</b>	Formation du biofilm : Activation des adhésines et répression des nucléases et protéases
<b>ARNreg</b>	
<b>RsaA</b>	Inhibe la synthèse de MgrA ce qui favorise la formation du biofilm
<b>RsaE</b>	Répression de <i>icaR</i> ce qui favorise la formation du PIA
<b>RsaF</b>	Régulation positive de <i>hysA</i> ce qui diminue la formation du biofilm
<b>RsaI</b>	Répression de <i>icaR</i> ce qui favorise la formation du PIA

#### iv.iv. Résistance aux antibiotiques

En 2017, l'OMS a classé le Staphylocoque doré en priorité élevée pour la recherche et le développement de nouveaux traitements (**Figure 5**). En effet, en plus d'être un pathogène responsable de diverses infections, *S. aureus* menace la santé mondiale en raison de sa capacité à acquérir des résistances à plusieurs classes d'antibiotiques. Peu après la mise sur le marché de la pénicilline, des souches de *S. aureus* résistantes à cet antibiotique ont été identifiées ([Nikolic & Mudgil, 2023](#)). Ces souches ont acquis le gène *blaZ* porté par un transposon qui peut être localisé sur un plasmide conjugatif ou intégré dans le chromosome. Ce gène code pour une enzyme nommée  $\beta$ -lactamase qui, en hydrolysant l'anneau  $\beta$ -lactame de la pénicilline, inhibe son action (**Figure 20**). Aujourd'hui, suite au transfert horizontal de ce gène par conjugaison et transduction, 99% des souches cliniques de *S. aureus* sont résistantes à la pénicilline ([Vestergaard et al., 2019](#)). Face à l'émergence de ces souches résistantes, des  $\beta$ -lactamines hémi-synthétiques résistantes aux  $\beta$ -lactamases ont été développées (e.g. méticilline, oxacilline). Cependant, comme pour la pénicilline, des souches de *S. aureus* résistantes à ces nouvelles molécules ont rapidement été mises en évidence.

- **Résistance à la méticilline**

La méticilline est un antibiotique bactéricide qui se fixe sur des transpeptidases nommées PBPs (Penicillin binding proteins) afin d'inhiber la synthèse du peptidoglycane. Les premières souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline (MRSA) ont été identifiées au Royaume-Uni en 1961, soit deux ans après le début de l'utilisation clinique de cet antibiotique ([Lakhundi & Zhang, 2018](#)). Ces souches sont résistantes à la méticilline grâce à l'acquisition d'un élément génétique mobile : une cassette chromosomique *SCCmec* (Staphylococcal cassette chromosome *mec*). Les cassettes *SCCmec* sont composées de deux complexes génétiques essentiels : le complexe *mec* et *ccr* ([Vestergaard et al., 2019](#)). Le complexe *mec* contient le gène *mecA* ou *mecC* qui codent pour une PBP alternative, la PBP2a. Cette dernière a une faible affinité pour la plupart des  $\beta$ -lactamines ce qui confère une résistance à la méticilline mais aussi aux autres antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines (**Figure 21**). Le complexe *ccr* contient des gènes qui codent pour des recombinases qui permettent l'intégration de la cassette dans le chromosome de *S. aureus*. L'intégration se fait au niveau du site *attB* localisé en 3' du gène *rlmH* qui code pour une ARNr méthyltransférase. Récemment, une étude a montré qu'au sein du biofilm l'induction de la compétence naturelle de *S. aureus* peut permettre le transfert horizontal de la cassette *SCCmec* ([Maree et al., 2022](#)). Depuis leur découverte au Royaume-Uni, les MRSA se sont disséminées partout dans le monde et représentent donc un problème majeur de santé publique ([Lee et al., 2018](#)). En 2019, la résistance de *S. aureus* aux antibiotiques a coûté la vie à 178 000 personnes dans le monde ([Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022](#)). A elles seules, les MRSA ont été responsables de 121 000 morts, soit 68% des décès dus à *S. aureus*.



**Figure 21 : Mécanismes de résistance de *Staphylococcus aureus* à la pénicilline, à la méticilline et à la vancomycine.** Les mécanismes à l'origine de la résistance sont précisés à droite.

- **Résistance à la vancomycine**

Afin de traiter les infections causées par les souches MRSA, la vancomycine est rapidement devenue l'antibiotique privilégié (Nikolic & Mudgil, 2023). Ce dernier est un glycopeptide qui perturbe l'assemblage du peptidoglycane en se liant au dipeptide D-Ala-D-Ala, un précurseur du peptidoglycane. Chez *S. aureus*, deux types de résistance à la vancomycine ont été décrits : les souches résistantes (VRSA) et les souches avec une résistance intermédiaire (VISA). Les VISA ont une sensibilité réduite à la vancomycine en raison de mutations chromosomiques qui peuvent causer une augmentation de l'épaisseur ou de la synthèse de la paroi. Bien que peu répandues, des souches VRSA ont aussi été mises en évidence. La première a été découverte en 2002 aux Etats-Unis lorsque, durant une co-infection avec *Enterococcus faecalis*, une souche MRSA a acquis un plasmide conjugatif d'*E. faecalis* portant l'opéron *vanA* (Nikolic & Mudgil, 2023). Cet opéron, en permettant la modification du dipeptide D-Ala-D-Ala en D-Ala-D-Lac (Figure 21), empêche la vancomycine de se lier à sa cible ce qui entraîne une résistance à cet antibiotique.

*S. aureus* peut aussi être résistant à de nombreux autres antibiotiques comme la daptomycine, les aminosides, les fluoroquinolones, les macrolides ou à l'association triméthoprime et sulfaméthoxazole (Mlynarczyk-Bonikowska *et al.*, 2022). Ces trois dernières résistances ont coûté la vie à 54 200 personnes en 2019 (Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022).

La résistance intrinsèque ou acquise n'est pas l'unique moyen de lutte utilisé par les bactéries pour se défendre contre les antibiotiques (Conlon, 2014). Comme les animaux qui « font le mort » pour échapper à leurs prédateurs, les bactéries peuvent entrer en état de dormance en ralentissant leur métabolisme et leur croissance afin de bloquer l'action des antibiotiques. Ces bactéries dormantes peuvent être des SCV ou bien des bactéries **tolérantes/persistantes** aux antibiotiques.

### III. La persistance/tolérance aux antibiotiques

#### i. Définition et historique

Les bactéries persistantes sont définies comme une sous-population de bactéries ayant la capacité de survivre transitoirement à des concentrations létales d'antibiotiques et de reprendre leur croissance à l'arrêt du traitement. Elles ont été observées pour la première fois en 1942 par Gladys Hobby et ses collaborateurs (Hobby *et al.*, 1942) (Figure 22). Ils ont remarqué qu'une sous-population (< 1%) de *S. aureus* pouvait survivre à la pénicilline alors que la population initiale était sensible à cet antibiotique. Deux ans plus tard, Joseph Bigger, un scientifique Irlandais, a confirmé ces observations et a nommé ces bactéries les « **Persisters** » (Bigger, 1944). Suite à ces découvertes, les recherches autour des bactéries persistantes ont été délaissées pendant près de 40 ans. En 1983, Moyed et Bertrand ont mis en évidence qu'une mutation gain de fonction dans le gène *hipA* (allèle *hipA7*) chez *E. coli* était à l'origine d'une augmentation du nombre de persisters après traitement à l'ampicilline (Moyed & Bertrand, 1983). En 2004, en montrant que les persisters pouvaient se former spontanément dans la population avant le traitement antibiotique, l'étude de N. Balaban a relancé les recherches autour des bactéries persistantes (Balaban *et al.*, 2004). Par la suite, de nombreuses études se sont intéressées aux mécanismes à l'origine de la formation des persisters. Pour n'en citer que quelques-unes, ces études ont par exemple montré que la formation de persisters est favorisée par la réponse SOS, la vie intracellulaire et la réponse stringente (Dörr *et al.*, 2010; Helaine *et al.*, 2014; Verstraeten *et al.*, 2015). Finalement, 121 scientifiques se sont réunis en 2018 au séminaire EMBO en Suisse afin d'établir un consensus définissant les lignes directrices permettant l'étude de la tolérance et de la persistance aux antibiotiques (Balaban *et al.*, 2019).

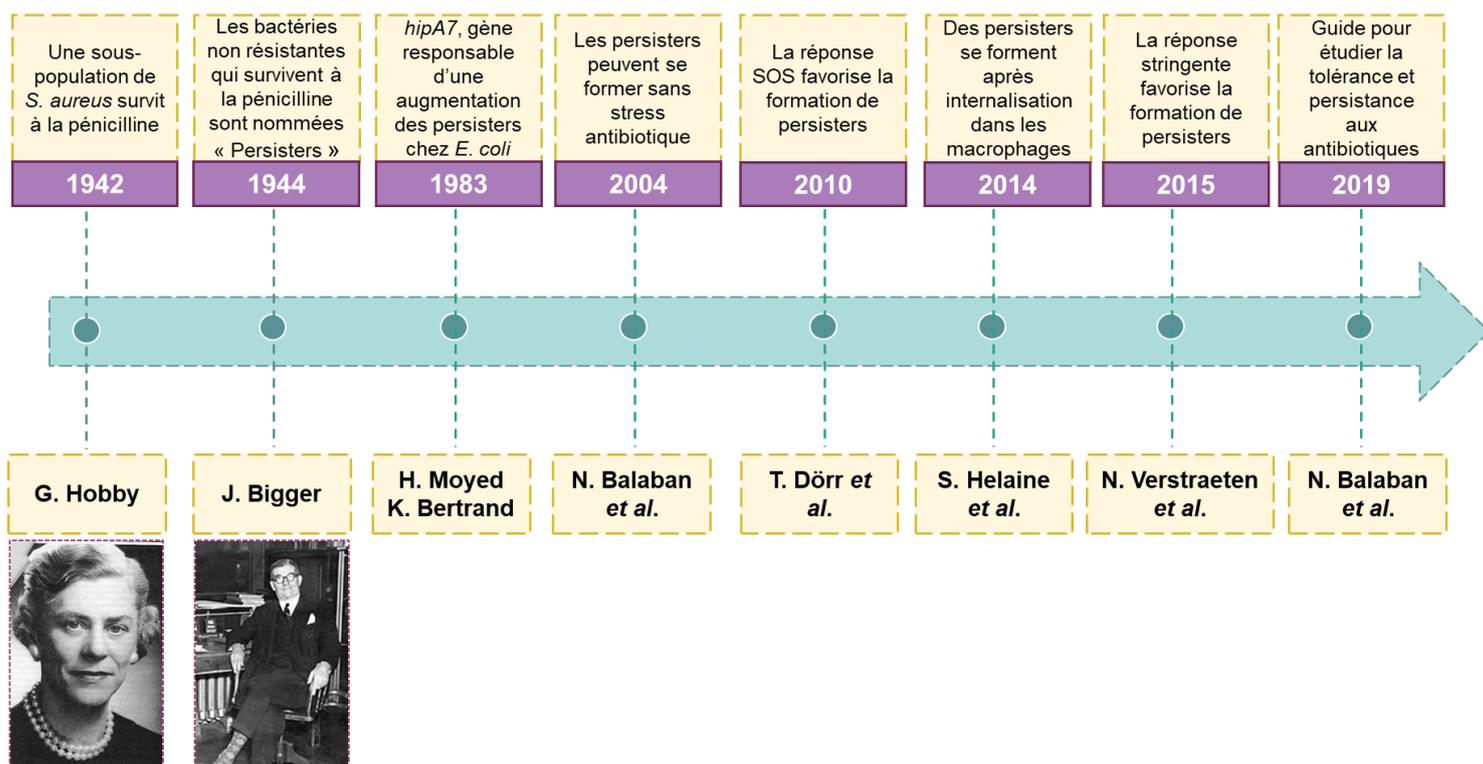
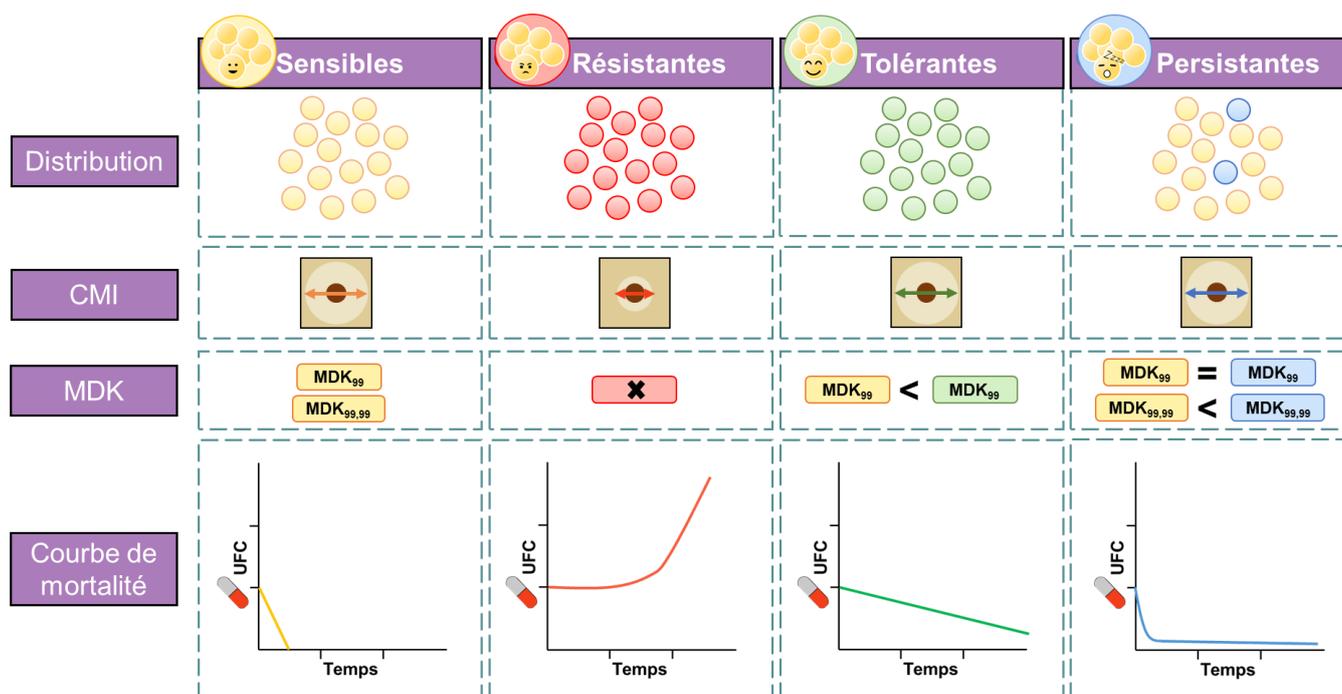


Figure 22 : Chronologie de quelques découvertes en lien avec les bactéries persistantes.

## ii. Résistance, tolérance, persistance : quelles différences ?

L'effet d'un traitement antibiotique sur une population bactérienne dépend du type de bactéries présentes dans cette population (Gollan *et al.*, 2019). En effet, les bactéries peuvent être **sensibles**, **résistantes**, **tolérantes** ou **persistantes** aux antibiotiques (Figure 23). Les bactéries **résistantes** continuent de proliférer en présence de l'antibiotique et la résistance peut être déterminée en mesurant la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'un antibiotique, c'est à dire la plus petite concentration permettant d'inhiber la croissance bactérienne. La caractéristique principale des bactéries résistantes est donc une augmentation de leur CMI par rapport à la CMI des bactéries sensibles. La concentration minimale bactéricide (CMB), c'est-à-dire la plus petite concentration entraînant la mort bactérienne, est un autre paramètre utilisé pour déterminer l'effet bactéricide d'un antibiotique. Ces bactéries peuvent aussi transmettre leur(s) gène(s) de résistance à leur descendance, il s'agit de la résistance acquise. La **tolérance**, c'est la capacité d'une population bactérienne à survivre plus longtemps à un antibiotique bactéricide. Cela s'explique notamment parce que ces bactéries tolérantes ont une croissance plus lente que les bactéries sensibles en raison de modifications de l'expression génique ou de facteurs environnementaux. Ainsi, la tolérance est caractérisée par une CMI identique à celle des bactéries sensibles et une augmentation de la MDK<sub>99</sub> (Minimum duration for killing), c'est à dire la durée minimale nécessaire à l'éradication de 99% de la population. Alors que la résistance et la tolérance concerne l'ensemble de la population, la **persistance** concerne une sous-population de bactéries tolérantes au sein d'une population sensible. Les valeurs de CMI et de MDK<sub>99</sub> des bactéries persistantes sont identiques à celles des bactéries sensibles. Cependant, la MDK<sub>99,99</sub> c'est à dire la durée minimale nécessaire à l'éradication de 99,99% de la population, est augmentée.



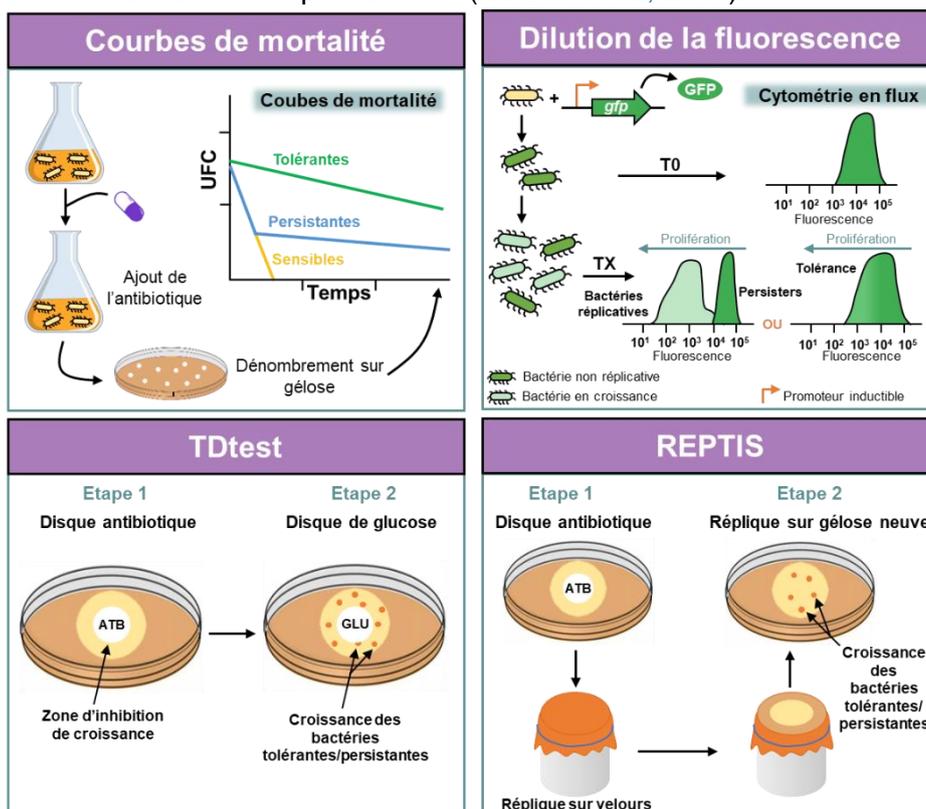
**Figure 23 : Différences entre la résistance, la tolérance et la persistance aux antibiotiques.** UFC : Unité formant colonie, CMI : Concentration minimale inhibitrice, MDK : Minimum duration for killing. (D'après Gollan *et al.*, 2019).

Contrairement aux bactéries résistantes qui peuvent se multiplier en présence de l'antibiotique auquel elles sont résistantes, les bactéries tolérantes et persistantes ralentissent leur métabolisme ou entrent en état de dormance pour échapper à l'action bactéricide d'un antibiotique. Ainsi, *in vitro*, suite à un traitement par un antibiotique bactéricide, la présence de persisters dans une population est révélée par une courbe de mortalité biphasique : dans un premier temps, les bactéries sensibles à l'antibiotique sont rapidement tuées, puis le changement de pente de la courbe indique que le taux de mortalité diminue ce qui révèle la présence de persisters dans la population (**Figure 22**). Par ailleurs, tandis que la résistance est souvent spécifique d'un antibiotique, les bactéries peuvent être tolérantes ou persistantes à différentes classes d'antibiotiques. Enfin, la tolérance et la persistance sont généralement considérées comme des phénomènes non-héréditaires mais, des mutations dans certains gènes, par exemple dans le gène *hipA7* chez *E. coli* (Moyed & Bertrand, 1983) ou le gène *shpB1* chez *Salmonella* (Slattery *et al.*, 2013), peuvent causer un phénotype d'hyper-persistance.

### iii. Détection des bactéries tolérantes/persistantes

La détection de bactéries tolérantes/persistantes aux antibiotiques au sein d'une population est complexe du fait que ces bactéries ont un phénotype transitoire et, dans le cas de la persistance, elles ne représentent qu'une faible fraction de la population. Quelques exemples de méthodes utilisées pour identifier ces bactéries sont présentés dans la **Figure 24**. Comme précédemment évoqué, la **courbe de mortalité** est la méthode traditionnelle utilisée pour mettre en évidence les bactéries tolérantes/persistantes (Huemer *et al.*, 2020). Pour cela, les bactéries sont cultivées en présence d'un antibiotique bactéricide et dénombrées par étalements sur gélose à différents temps après l'ajout de l'antibiotique. L'allure de la courbe obtenue permet de distinguer les types de bactéries présents dans la culture étudiée. La **dilution de fluorescence**, méthode de microfluidique couplée à la cytométrie en flux, permet de suivre les divisions bactériennes à l'échelle de la cellule (Gollan *et al.*, 2019). Les bactéries utilisées pour ces analyses comportent, au niveau chromosomique ou sur un plasmide, un gène codant pour un fluorochrome (e.g. mCherry, GFP) sous contrôle d'un promoteur inductible (e.g. arabinose, IPTG, Anhydrotétracycline). Lorsque l'expression du fluorochrome est induite, toute la population émet de la fluorescence. Après élimination de l'inducteur, les bactéries en croissance diluent à chaque division leur réserve de molécules fluorescentes tandis que les bactéries qui ne se divisent pas conservent leur fluorescence. Ainsi, deux populations sont visibles en cytométrie en flux : les bactéries en croissance qui ont perdu la fluorescence et les bactéries non répliquatives (tolérantes/persistantes) qui ont conservé la fluorescence. Si la population étudiée est tolérante, un seul groupement de bactéries ayant conservé la fluorescence est visible en cytométrie en flux (Michaux *et al.*, 2022) (**Figure 23**). Cette méthode fonctionne aussi bien *in vitro* que *in vivo* dans des modèles d'infections cellulaires (e.g. macrophages) (Helaine *et al.*, 2010).

Dans le contexte clinique, d'autres méthodes ont été développées pour détecter ces bactéries comme le **Tolerance Disk test** (TDtest) qui se fait en deux étapes. Premièrement, un disque antibiotique est placé sur la gélose ce qui inhibe la croissance bactérienne. Le disque antibiotique est ensuite remplacé par un disque de glucose ce qui permet aux bactéries tolérantes de reprendre leur croissance (Gefen *et al.*, 2017). Une limite de ce test est que des traces d'antibiotiques peuvent subsister dans la gélose et bloquer la reprise de la croissance. La **méthode REPTIS** (Replica Plating Tolerance Isolation System) permet de remédier à cette limite. Après l'étape du disque antibiotique, les bactéries sont transférées par réplique sur velours sur une gélose neuve ce qui favorise la croissance des bactéries tolérantes/persistantes (Matsuo *et al.*, 2019).



**Figure 24 :** Exemples de méthodes utilisées pour détecter les bactéries tolérantes/persistantes aux antibiotiques. Les méthodes sont décrites dans le texte.

#### iv. Mécanismes impliqués dans la formation des persisters

Les bactéries persistantes ont été mises en évidence chez de nombreuses espèces bactériennes : chez des bactéries à Gram-négatif comme *Acinetobacter baumannii*, *E. coli* ou *Pseudomonas aeruginosa* et chez des bactéries à Gram-positif comme *Enterococcus faecium*, *Mycobacterium tuberculosis* ou *S. aureus* (Van den Bergh *et al.*, 2017). Dans une population bactérienne, les persisters peuvent se former spontanément mais, dans la plupart des cas, ils sont induits par un signal environnemental (Balaban *et al.*, 2019). Ce signal peut être une carence nutritive, l'exposition à un antibiotique, la densité bactérienne, un pH bas, un stress osmotique ou oxydant (Huemer *et al.*, 2020). En réponse à ces stress, divers mécanismes comme l'activation de certaines voies de signalisation, les systèmes toxine-antitoxine, la formation de ribosomes 100S ou le transport actif par des pompes d'efflux peuvent être impliqués dans la formation de persisters. La

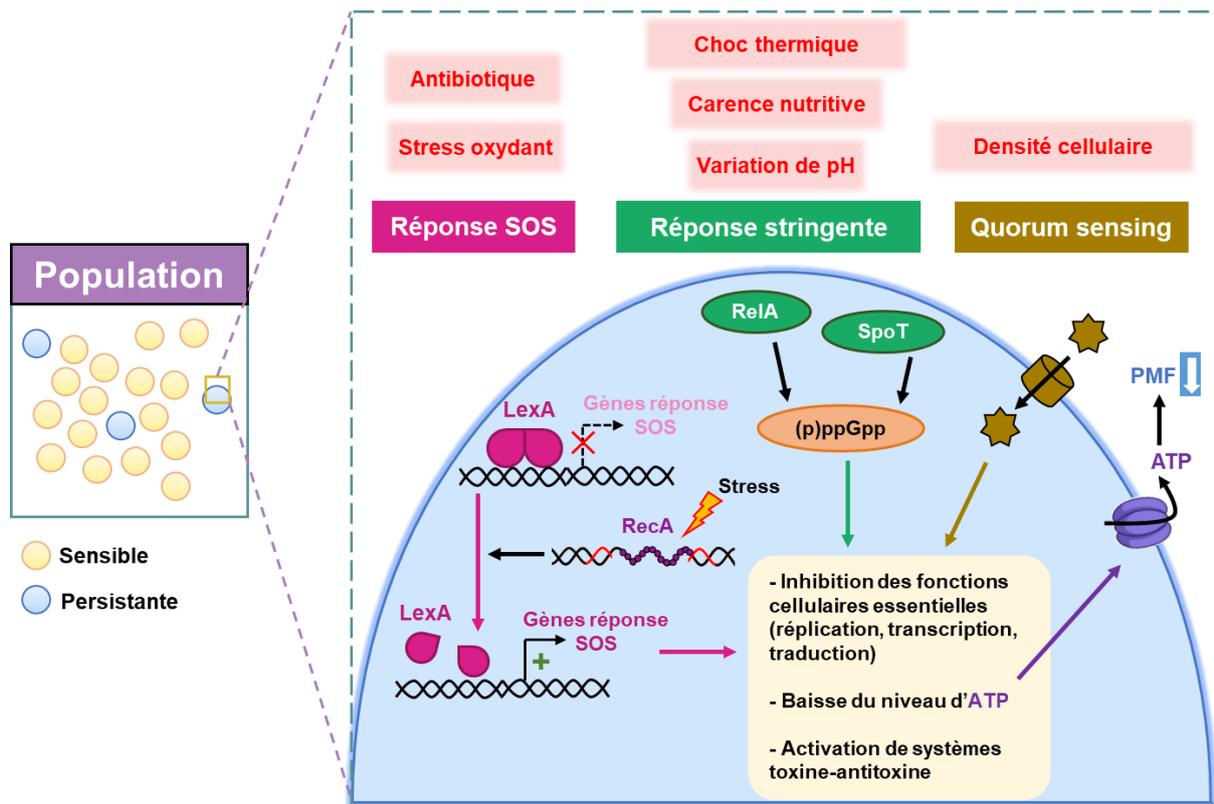
formation de ces bactéries étant multifactorielle, aucun des systèmes décrits dans cette partie ne peut expliquer à lui seul la capacité d'une bactérie à devenir persistante.

#### iv.i. Réponse SOS, réponse stringente et quorum-sensing

Parmi les voies de signalisation connues pour réguler la réponse aux stress, certaines, comme la réponse SOS, la réponse stringente et le QS, sont également impliquées dans la formation des bactéries persistantes (**Figure 25**).

- **La réponse SOS :** La réponse SOS est un mécanisme conservé qui permet la réparation de l'ADN lorsque des dommages sont détectés ([Maslowska et al., 2019](#)). Ces dommages peuvent être causés par un stress oxydant, une exposition aux UV ou certains antibiotiques comme les fluoroquinolones. Les deux acteurs majeurs de la réponse SOS sont le répresseur LexA et l'activateur RecA (**Figure 25**). Brièvement, lorsque cette voie de signalisation est inactive, LexA réprime les gènes appartenant au régulon SOS en se fixant au niveau de leur promoteur. Si l'ADN est endommagé, RecA est activée et se fixe aux fragments d'ADN simple brin ce qui forme un filament nucléoprotéique, conduit au clivage de LexA et donc à l'activation des gènes du régulon SOS comme *dinG* ou *uvrABCD*. Plusieurs études ont mis en évidence un lien entre la réponse SOS et la formation de persisters. Par exemple, chez *E. coli*, la délétion de *recA* cause une diminution de la formation de persisters après un traitement à l'ampicilline, à la norfloxacine, à la gentamicine ou à la ciprofloxacine ([Dörr et al., 2009](#); [Wu et al., 2015](#)). De plus, en induisant l'expression d'une protéine LexA non clivable (LexA3) qui bloque la réponse SOS, le nombre de persisters diminue ([Debbia et al., 2001](#); [Dörr et al., 2009](#)). En revanche, l'activation constitutive de la réponse SOS favorise la formation de persisters ([Dörr et al., 2009](#)). D'autres études se sont intéressées au transcriptome des persisters. Par exemple, chez *E. coli*, *recA* est surexprimé chez des persisters isolés suite à un traitement à l'ampicilline ([Keren et al., 2004](#)) et, chez des persisters intracellulaires de *S. aureus*, certains gènes du régulon SOS comme *uvrA* et *uvrB* sont surexprimés ([Peyrusson et al., 2020](#)). Enfin, les protéines DinG et UvrD participent aussi à la persistance puisque des mutants délétés des gènes codant ces protéines forment moins de persisters après un traitement à la ciprofloxacine ([Theodore et al., 2013](#)).
- **La réponse stringente :** La carence nutritive étant un stress pouvant induire la formation de persisters, des études ont analysé le lien potentiel entre la réponse stringente et les bactéries persistantes. En effet, la réponse stringente est un système de réponse au stress activé lors d'une carence nutritive, un choc thermique ou une variation de pH ([Irving et al., 2021](#)). L'activation de ce système induit une accumulation des alarmones (p)ppGpp (guanosine pentaphosphate et guanosine tétraphosphate) qui sont produites par des synthétases appartenant à la famille RSH (RelA/SpoT homologues) (**Figure 25**). En lien avec la protéine DksA, le (p)ppGpp se lie à l'ARN polymérase pour reprogrammer le transcriptome en inhibant l'expression des gènes responsables de la croissance et en régulant positivement l'expression des gènes nécessaires à

la survie (biosynthèse d'acides aminés, import de nutriments). Chez *E. coli*, la délétion de *relA* (Liu *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2015) ou la double délétion *relA/spoT* (Fung *et al.*, 2010) entraînent une diminution de la fraction de persisters. De plus, les gènes *relA* et *spoT* sont surexprimés chez les persisters (Pu *et al.*, 2016). La délétion de *relA* chez *P. aeruginosa* donne des résultats similaires à ceux observés chez *E. coli*, à savoir une diminution de la survie après traitement à l'ofloxacine (Viducic *et al.*, 2006). DksA est aussi impliquée dans la persistance puisque un mutant délété de *dksA* chez *E. coli* forme moins de persisters après un traitement à l'ofloxacine (Hansen *et al.*, 2008). Chez *S. aureus*, le (p)ppGpp favorise la tolérance aux antibiotiques ciblant la synthèse de la paroi comme l'ampicilline et la vancomycine (Geiger *et al.*, 2014).



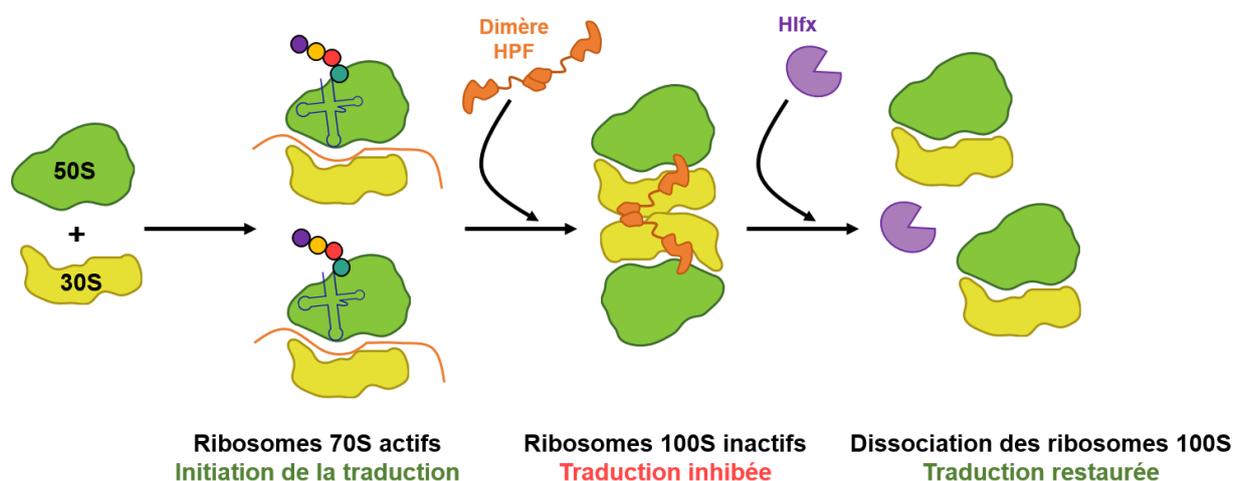
**Figure 25 :** Représentation des principales voies de signalisation impliquées dans la formation des bactéries persistantes. PMF : Force proton-motrice.

- Le quorum-sensing :** Le QS est un processus permettant aux bactéries de communiquer entre elles *via* de petites molécules appelées auto-inducteurs, ce qui leur permet d'adapter leur comportement en fonction de la densité cellulaire. Chez *P. aeruginosa*, deux molécules de QS, la pyocyanine et la 3-OC<sub>12</sub>-HSL, augmentent le nombre de persisters (Möker *et al.*, 2010). De façon similaire, la délétion du système *lasI/R*, produisant le 3-OC<sub>12</sub>-HSL, est à l'origine d'une diminution de la tolérance à l'ofloxacine (Kayama *et al.*, 2009). L'indole, une autre molécule de QS, participe à la persistance d'*E. coli* (Vega *et al.*, 2012). Chez *Streptococcus mutans*, l'alarmone CSP (Competence-stimulating-pheromone) induit la formation de persisters suite à des stress environnementaux (Leung & Lévesque, 2012). Enfin, chez *Legionella pneumophila*, une étude a montré que le système de QS Lqs contrôle la formation de persisters intracellulaires (macrophages, amibes) (Personnic *et al.*, 2019).

Les voies de signalisation précédemment décrites participent donc à la formation de bactéries tolérantes/persistantes en modulant l'activité de fonctions cellulaires essentielles aux bactéries (réplication, transcription, traduction) mais elles peuvent aussi causer une baisse d'ATP intracellulaire (**Figure 25**). Or, chez *S. aureus* et *E. coli*, la formation de persisters est associée à une baisse de la concentration intracellulaire d'ATP (Conlon *et al.*, 2016; Shan *et al.*, 2017). En effet, en traitant des bactéries en phase exponentielle de croissance avec de l'arséniate, un composé connu pour inhiber la synthèse d'ATP, la fraction de bactéries persistantes augmente. Finalement, des études ont montré que l'activation de la réponse SOS ou de la réponse stringente peut induire une baisse d'ATP *via* la régulation de systèmes toxine-antitoxine ce qui favorise la formation de persisters. Ces mécanismes seront détaillés dans la partie IV de cette introduction.

#### iv.ii. L'hibernation des ribosomes

Les ribosomes bactériens sont des complexes ribonucléoprotéiques composés de deux sous-unités : la sous-unité 50S constituée de deux ARN ribosomiaux (23S et 5S) et d'une trentaine de protéines ribosomiales et la sous-unité 30S composée de l'ARN ribosomal 16S et d'environ 20 protéines ribosomiales (Prossliner *et al.*, 2018). L'association de ces deux sous-unités permet la formation d'un ribosome 70S actif responsable de la synthèse protéique. Lors de certains stress, comme une carence nutritive, deux ribosomes 70S peuvent s'assembler pour former un ribosome 100S inactif : c'est l'hibernation des ribosomes. Bien que le rôle biologique des ribosomes 100S ne soit pas encore bien compris, ce processus semble favoriser la survie des bactéries en cas de stress. Chez les Gammaproteobacteria, comme *E. coli*, les deux acteurs majeurs responsables de la formation des ribosomes 100S sont le facteur RMF (Ribosome Modulation Factor) et HPF (Hibernation Promoting Factor). Chez la plupart des autres bactéries, dont *S. aureus*, l'homologue de la protéine HPF se dimérise et est suffisant pour former les ribosomes 100S (**Figure 26**) (Prossliner *et al.*, 2018).



**Figure 26 : Etapes de la formation des ribosomes 100S chez *Staphylococcus aureus*.** HPF : Hibernation Promoting Factor. (D'après Prossliner *et al.*, 2018).

La dissociation de ces ribosomes peut être spontanée ou nécessiter l'intervention de la GTPase Hflx. Chez *S. aureus*, en plus de Hflx, les facteurs RRF (Ribosome-Recycling Factor) et EF-G (GTPase Elongation Factor G) participent à la dissociation des ribosomes 100S (Basu *et al.*, 2020). Par ailleurs, les ribosomes 100S peuvent être impliqués dans la pathogénie des bactéries. Par exemple, chez *Listeria monocytogenes*, une étude a montré que la survie d'une souche délétée du gène *hpf*, qui ne forme donc pas de ribosomes 100S, est diminuée dans un modèle d'infection murin (Kline *et al.*, 2015). De plus, en 2020, un lien entre les ribosomes 100S et la formation de bactéries persistantes a été établi (Song & Wood, 2020). Les auteurs ont montré que des bactéries *E. coli* délétées des gènes *hpf* ou *rmf* formaient moins de bactéries persistantes suite à un traitement à la ciprofloxacine ou à l'ampicilline. De façon similaire, les auteurs ont aussi mis en évidence une augmentation des ribosomes 100S chez les persisters. L'entrée en hibernation des ribosomes peut aussi favoriser la formation de persisters par *Mycobacterium tuberculosis* ce qui complique le traitement des infections (Li, Y. *et al.*, 2021).

#### iv.iii. Les bactéries persistantes métaboliquement actives

Bien que les bactéries persistantes soient souvent considérées comme dormantes, certaines découvertes remettent en question cette définition. En effet, des études ont montré que des persisters intracellulaires formés par *M. tuberculosis*, *S. aureus* ou *Salmonella Typhimurium* maintiennent une activité métabolique (transcription, traduction) afin de se protéger des stress rencontrés au sein des cellules de l'hôte (Moldoveanu *et al.*, 2021). Ainsi, des persisters internalisés dans les macrophages sont capables d'activer l'expression d'un système de sécrétion de type III afin de modifier la polarisation des macrophages d'un phénotype pro-inflammatoire (M1) vers un phénotype anti-inflammatoire (M2) ce qui favorise la survie de *Salmonella* dans ces cellules (Stapels *et al.*, 2018). Par ailleurs, les bactéries persistantes peuvent aussi se protéger des antibiotiques en activant des transporteurs membranaires (Zou *et al.*, 2021). Par exemple, la pompe d'efflux TolC est capable d'exporter des antibiotiques réduisant ainsi leur concentration intracellulaire ce qui favorise la persistance d'*E. coli* (Pu *et al.*, 2016). Récemment, il a également été montré que, chez *Salmonella Typhimurium*, le système d'efflux AcrAB-TolC participe à la persistance intracellulaire à la ciprofloxacine (Ronneau *et al.*, 2024). En lien avec les études précédentes, des analyses protéomiques ont aussi montré que l'expression de transporteurs membranaires est augmentée chez les persisters (Sulaiman *et al.*, 2018).

#### v. La tolérance/persistance chez *S. aureus*

Les mécanismes impliqués dans la formation de bactéries tolérantes/persistantes ont davantage été étudiés chez les bactéries à Gram-négatif que chez les bactéries à Gram-positif. Cependant, de plus en plus de recherches s'intéressent à la formation de persisters par *S. aureus*. Au cours d'une infection, la survie de *S. aureus* dans les cellules de l'hôte contribue à la rechute des infections. Afin de caractériser ces bactéries intracellulaires, une étude a utilisé la méthode de la dilution de fluorescence et a démontré la présence de persisters dans les macrophages suite à un

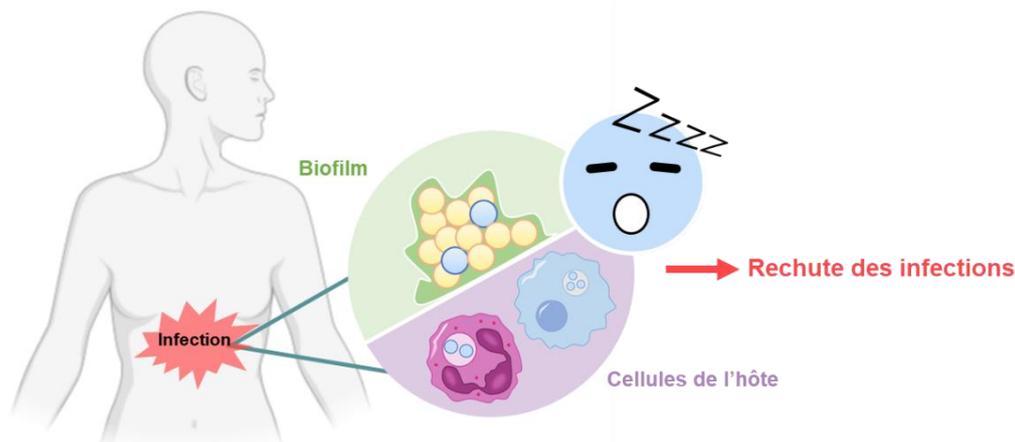
traitement à l'oxacilline (Peyrusson *et al.*, 2020). Cette tolérance intracellulaire aux antibiotiques est favorisée par la production de ROS (Reactive Oxygen Species) par les macrophages (Rowe *et al.*, 2020) et l'état de dormance des bactéries peut être plus ou moins profond selon la quantité de ROS présente dans les cellules (Peyrusson *et al.*, 2022). Parmi ces ROS, le peroxy-nitrite semble être le principal médiateur de la tolérance aux antibiotiques (Beam *et al.*, 2021). Le peroxy-nitrite, en réduisant l'activité de l'aconitase par nitration des résidus tyrosine de cette enzyme, induit une perturbation du cycle de Krebs et donc une réduction de la concentration intracellulaire d'ATP ce qui favorise l'entrée en dormance des bactéries. Dans la littérature, plusieurs études ont récemment mis en évidence d'autres mécanismes qui participent à la tolérance de *S. aureus* aux antibiotiques. Par exemple, la délétion de l'opéron *msaABCR*, qui contrôle l'activité du Cycle de Krebs, induit une hyperactivité métabolique associée à une augmentation d'ATP intracellulaire ce qui diminue la tolérance aux antibiotiques (Pandey *et al.*, 2021). De même, la délétion du gène *phoU1* ou *phoU2* entraîne une augmentation du niveau d'ATP ce qui pourrait expliquer la diminution de la tolérance de ces mutants à la vancomycine et à la lévofloxacine (Shang *et al.*, 2020). La régulation de la phosphorylation des protéines semble aussi être un mécanisme participant à la tolérance aux antibiotiques. En effet, la délétion du gène *stp*, codant pour la seule sérine-thréonine phosphatase fonctionnelle annotée chez *S. aureus*, favorise la tolérance aux antibiotiques en causant une réduction de l'activité traductionnelle et de la concentration intracellulaire d'ATP (Huemer *et al.*, 2023). De façon intéressante, l'ajout d'un surnageant issu d'une culture de *S. aureus* en phase stationnaire diminue la fréquence de persisters d'une culture de *S. aureus* traitée à la ciprofloxacine en phase exponentielle (Bojer *et al.*, 2018). Suite à cette observation, Bojer *et al.* ont démontré que la diminution du nombre de persisters était due à la présence de PSM $\alpha$  dans le surnageant de la culture stationnaire. Le rôle des PSMs dans la persistance a ensuite été confirmé puisque la délétion du locus *psmA* favorise la persistance aux antibiotiques (Bojer *et al.*, 2018). Similairement, l'ajout de PSM $\alpha$  synthétiques dans une culture de *S. aureus* entraîne une baisse du nombre de persisters suite à un traitement à la ciprofloxacine (Baldry *et al.*, 2020).

## vi. Impact clinique et traitements

### vi.i. Les persisters et les échecs thérapeutiques

La capacité des bactéries à survivre aux antibiotiques favorise la chronicité et la récurrence des infections, ce qui constitue un problème majeur de santé publique. Si le rôle des bactéries résistantes dans l'échec des traitements est bien connu, les preuves de l'implication des bactéries tolérantes/persistantes aux antibiotiques dans ces échecs s'accumulent. Plusieurs études ont par exemple montré que, chez un même patient, les isolats cliniques issus d'infections récurrentes sont souvent identiques aux isolats issus de l'infection d'origine (Fisher *et al.*, 2017). Ces résultats suggèrent qu'une partie des bactéries de l'infection primaire, pouvant être considérées comme des bactéries tolérantes/persistantes, n'ont pas été complètement éradiquées par le traitement antibiotique et ont causé la rechute de l'infection. Par ailleurs, des bactéries *E. coli* présentant un

phénotype d'hyper-persistence en raison de mutations dans le gène *hipA*, dont la mutation *hipA7*, ont été identifiées dans le cas d'infections urinaires récurrentes (Schumacher *et al.*, 2015). Pour *P. aeruginosa*, des niveaux élevés de persisters ont été retrouvés dans des isolats issus d'infections pulmonaires de patients atteints de la mucoviscidose (Mulcahy *et al.*, 2010). En utilisant la méthode REPTIS, Herren *et al.* ont démontré la présence de bactéries tolérantes aux antibiotiques dans des isolats cliniques de *S. aureus* (Herren *et al.*, 2022). Enfin, les bactéries tolérantes/persistantes peuvent être retrouvées dans les biofilms ou au sein des cellules de l'hôte (Fisher *et al.*, 2017) (Figure 27). Ces deux modes de vie sont souvent utilisés par les bactéries lors d'infections et peuvent donc constituer un réservoir à l'origine de la rechute des infections.



**Figure 27 : Réservoirs de bactéries persistantes au sein de l'hôte.** Les bactéries sensibles sont représentées en jaune et les persistantes en bleu.

#### vi.ii. Les persisters : acteurs de la dissémination de la résistance et de la virulence ?

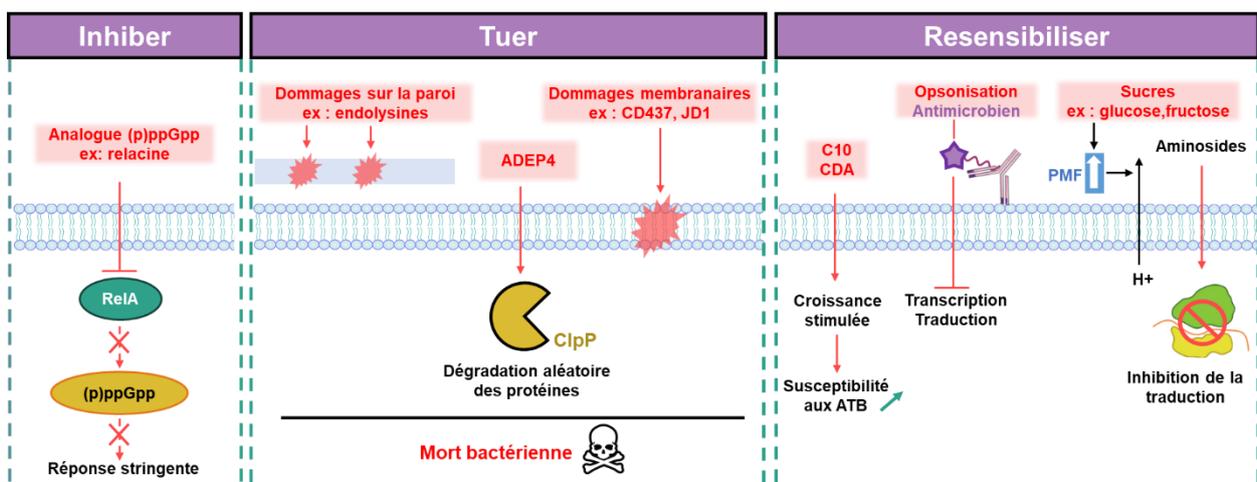
La persistance aux antibiotiques, en plus de son rôle dans les infections chroniques, a des conséquences évolutives puisqu'elle peut faciliter l'apparition de bactéries résistantes ou virulentes (Bakkeren *et al.*, 2020). Plusieurs études ont mis en évidence un lien entre les bactéries tolérantes/persistantes et l'apparition de mutations chromosomiques permettant l'émergence de bactéries résistantes (Levin-Reisman *et al.*, 2017; Windels *et al.*, 2019). *In vitro*, Windels *et al.* ont ainsi montré que la persistance est corrélée à des taux de mutations plus élevés ce qui favorise la résistance (Windels *et al.*, 2019). Ce phénomène a aussi été observé chez des patients présentant des bactériémies causées par des MRSA (Liu, J. *et al.*, 2020). Les persisters peuvent aussi contribuer à la diffusion des gènes de résistance par transfert horizontal. Par exemple, dans un modèle d'infection murin, des persisters de *Salmonella* Typhimurium, localisés dans l'intestin, forment un réservoir de bactéries qui contiennent naturellement des plasmides de résistance. Lorsque ces bactéries sortent de leur dormance, elles ont la capacité de transférer ces plasmides à d'autres entérobactéries (Bakkeren *et al.*, 2019). De façon similaire, les bactéries persistantes peuvent aussi être un réservoir d'éléments génétiques mobiles (bactériophages, plasmides conjugatifs) contenant des facteurs de virulence (Bakkeren *et al.*, 2020). Une fois sorties de leur dormance, ces bactéries peuvent disséminer ces éléments et donc les gènes de virulence.

### vi.iii. Stratégies thérapeutiques anti-persisters

En entrant dans un état métabolique ralenti, les persisters se protègent de l'action des antibiotiques actuels qui s'attaquent le plus souvent à des bactéries actives. Ainsi, afin de lutter contre les persisters, trois stratégies thérapeutiques sont envisagées : inhiber leur formation, les tuer directement ou les réveiller pour qu'ils soient de nouveau sensibles aux antibiotiques (Huemer *et al.*, 2020).

#### 1. Inhiber la formation des persisters :

La première stratégie pour lutter contre la persistance aux antibiotiques serait de les empêcher de se former en ciblant les voies de signalisation impliquées dans leur formation comme la réponse SOS ou la réponse stringente. Ainsi, l'utilisation de bactériophages modifiés produisant la protéine LexA3 non clivable, en association avec une quinolone, bloque efficacement la réponse SOS et améliore l'élimination des bactéries persistantes (Lu & Collins, 2009). L'utilisation d'analogues du (p)ppGpp, par exemple la relacine, permet d'inhiber les protéines Rel responsables de la synthèse du (p)ppGpp ce qui bloque la réponse stringente et perturbe la formation de persisters (Wexselblatt *et al.*, 2012) (Figure 28). Cependant, les persisters peuvent se former avant l'apparition des premiers symptômes de l'infection ce qui complique l'application de cette stratégie thérapeutique.



**Figure 28 : Exemples d'approches thérapeutiques visant à éliminer les bactéries persistantes.** ATB : Antibiotiques, CDA : cis-2-decenoic, PMF : Force proton-motrice.

#### 2. Tuer les persisters :

Les persisters ayant un métabolisme ralenti, les cibles les plus prometteuses pour les éliminer sont la membrane bactérienne et la paroi (Figure 28). Les enzymes dégradant le peptidoglycane, par exemple les endolysines, pourraient donc être utilisées comme molécules anti-persisters. Les endolysines sont produites par les bactériophages pour dégrader le peptidoglycane de leur hôte ce qui entraîne la lyse cellulaire et la libération de nouveaux virions. Ainsi, plusieurs études ont montré que des endolysines synthétiques ou issues de bactériophages diminuent le nombre de persisters (Gutiérrez *et al.*, 2014; Röhrig *et al.*, 2020). De son côté, la membrane peut être endommagée par des rétinoïdes synthétiques. Par exemple, les molécules CD437 et CD1530 altèrent la bicouche

lipidique de souches MRSA et favorisent l'élimination des persisters (Kim, W. *et al.*, 2018). La dépolarisation membranaire médiée par la molécule aromatique JD1 conduit également à une diminution du nombre de persisters chez *S. aureus* (Dombach *et al.*, 2021). Une autre approche pouvant être employée pour éradiquer directement les persisters consiste à réactiver des cibles bactériennes. L'activation de la protéase ClpP chez *S. aureus* par la molécule ADEP4 entraîne un clivage non spécifique des protéines et donc la mort des bactéries persistantes (Conlon *et al.*, 2013). Enfin, Maffei *et al.*, ont récemment isolé le bactériophage Paride, un phage de *P. aeruginosa* qui peut se répliquer et induire un cycle lytique dans les bactéries en dormance ce qui cause leur mort (Maffei *et al.*, 2024). L'utilisation de ce phage pourrait donc permettre de développer une nouvelle thérapie capable d'éliminer directement les bactéries en dormance.

### 3. Resensibiliser les persisters :

La dernière alternative envisagée pour combattre les persisters consiste à les faire sortir de leur dormance afin de les resensibiliser à l'action des antibiotiques (Figure 28). Certains composés comme les molécules C10 (Kim *et al.*, 2011) ou cis-2-decenoic (Marques *et al.*, 2014) sont capables de stimuler la croissance des bactéries *E. coli* et *P. aeruginosa* persistantes ce qui permet de les rendre de nouveau sensibles à l'action des antibiotiques. L'utilisation de métabolites comme le fructose ou le glucose, en association avec la gentamicine, est associée à une diminution du niveau de persisters chez *E. coli* et *S. aureus* (Allison *et al.*, 2011). Ces métabolites permettent d'augmenter la force proton-motrice ce qui stimule l'influx des aminosides à l'intérieur de la bactérie. Récemment, une étude a montré que la production d'espèces réactives de l'azote (RNS) par les macrophages maintient les persisters intracellulaires de *Salmonella* dans leur état de dormance (Ronneau *et al.*, 2023). Ce maintien s'explique du fait que les RNS perturbent le cycle de Krebs ce qui induit une diminution de la respiration cellulaire et de la production d'ATP. De façon intéressante, l'utilisation du L-NAME (L-NG-Nitroarginine methyl ester), un inhibiteur de l'oxyde nitrique synthase produit par les macrophages, permet de resensibiliser les persisters intracellulaires de *Salmonella* à la céfotaxime. Cette étude donne donc de nouvelles pistes pour le développement d'antimicrobiens capables de resensibiliser les persisters aux antibiotiques. Une autre approche susceptible d'éliminer les persisters consiste à conjuguer un antimicrobien avec un anticorps (Lehar *et al.*, 2015). L'anticorps joue le rôle d'opsonine afin de favoriser la phagocytose des bactéries puis, l'antimicrobien est activé à l'intérieur du phagolysosome pour tuer les bactéries.

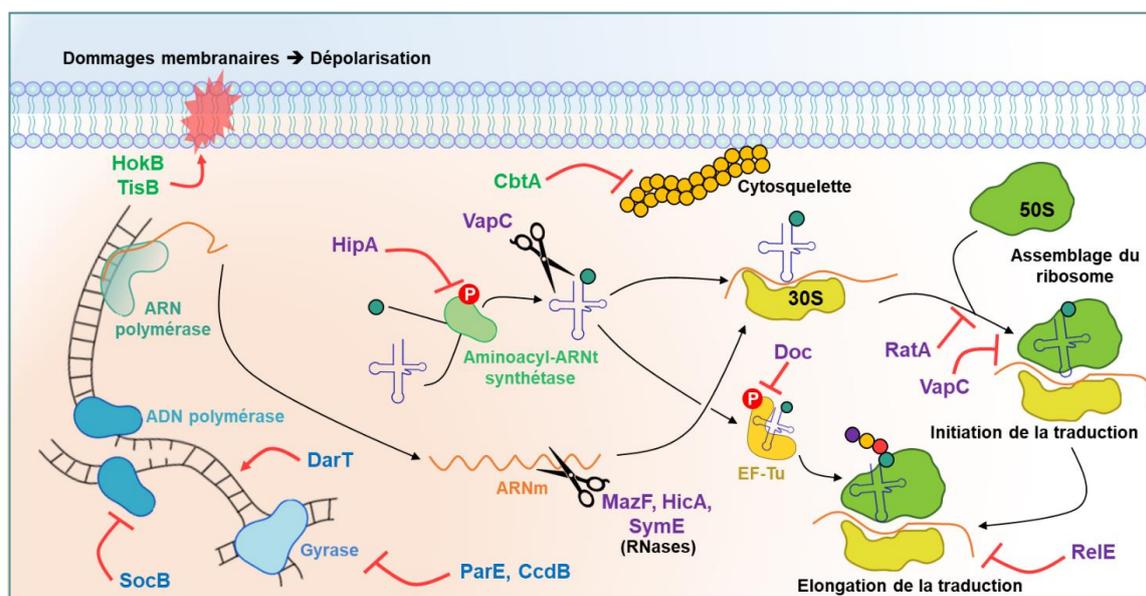
Finalement, comprendre les mécanismes à l'origine de la formation des bactéries tolérantes/persistantes aux antibiotiques est donc primordial pour mettre en place des thérapies capables de les éliminer. Parmi les systèmes utilisés par *S. aureus* pour réguler la formation de bactéries persistantes, des travaux récents ont mis en évidence le rôle d'un système toxine-antitoxine (Pinel-Marie *et al.*, 2021). Une meilleure compréhension de ces systèmes pourrait ainsi conduire au développement de thérapies ciblant les persisters.

## IV. Les systèmes toxine-antitoxine

### i. Caractéristiques générales

#### i.i. Définition

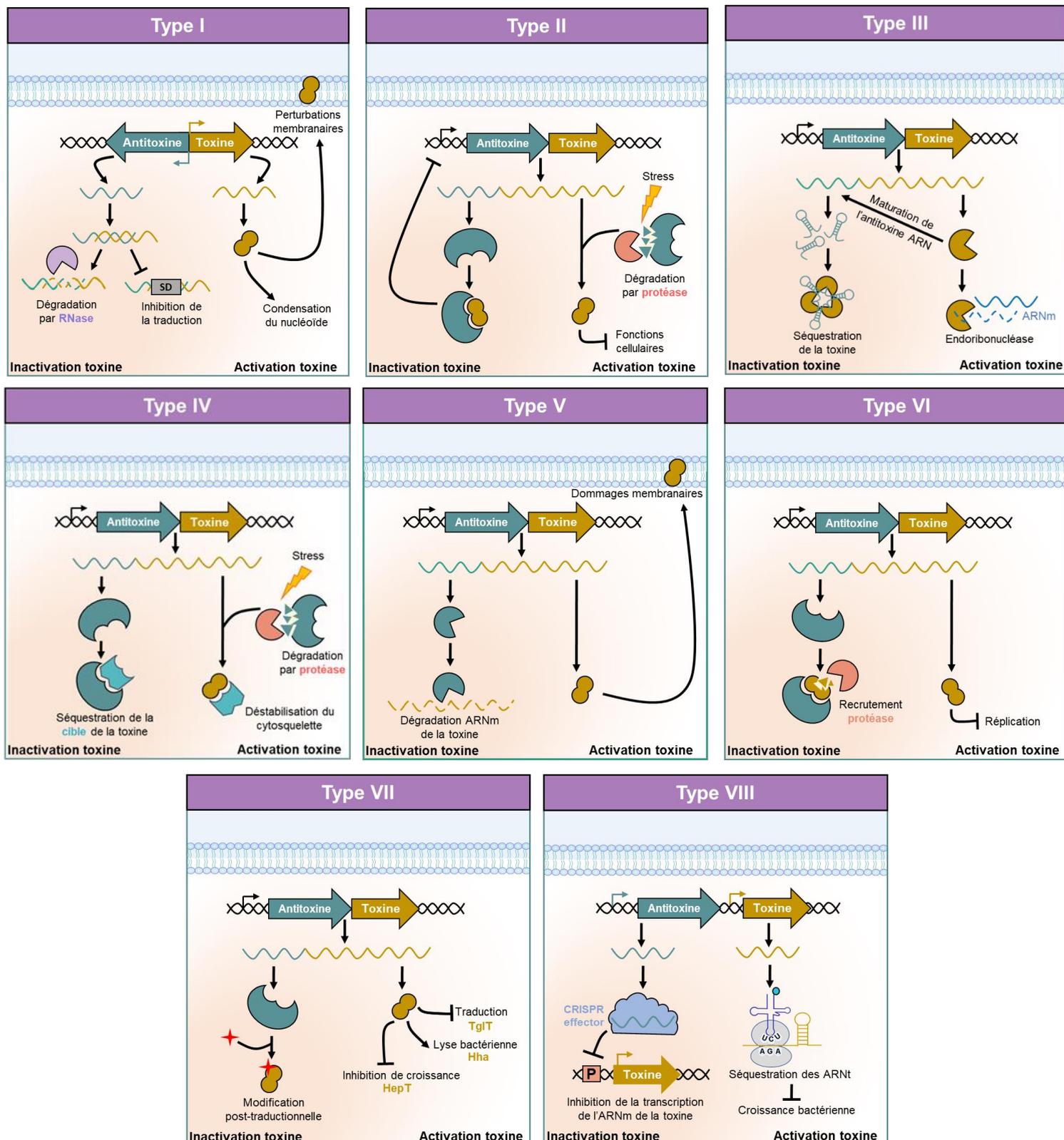
Les systèmes toxine-antitoxine (TA) sont des éléments génétiques généralement composés de deux gènes : l'un codant une toxine dont la surexpression induit un arrêt de croissance ou la mort bactérienne et le second codant une antitoxine qui neutralise l'action de la toxine (Jurénas *et al.*, 2022). Initialement découverts sur des plasmides, ces systèmes ont ensuite été identifiés dans les génomes des bactéries et des archées. Les systèmes TA chromosomiques sont souvent localisés sur des éléments génétiques mobiles comme les prophages et les transposons. Ces dernières années, l'identification de nouveaux systèmes TA a été facilitée grâce au développement d'outils bio-informatiques comme TADB (base de données des systèmes TA de type II) (Shao *et al.*, 2011) ou T1Tadb (base de données des systèmes TA de type I) (Tourasse & Darfeuille, 2021). Au sein des génomes, les systèmes TA peuvent être nombreux et parfois présents en plusieurs copies ce qui est à l'origine d'une redondance fonctionnelle. En condition de stress, lorsque l'antitoxine est dégradée par des RNases ou des protéases, les toxines peuvent interférer avec des cibles variées impliquées dans diverses fonctions cellulaires (réplication, traduction, division cellulaire). Afin de souligner cette diversité, les cibles de plusieurs toxines sont présentées dans la **Figure 29**.



**Figure 29 : Aperçu de la diversité des cibles cellulaires sur lesquelles peuvent agir les toxines issues de systèmes toxine-antitoxine.** Les toxines agissant sur la réplication sont écrites en bleu, celles agissant sur la traduction en violet et celles ayant d'autres actions en vert. **HokB** et **TisB** induisent la formation de pores membranaires, **CbtA** inhibe la polymérisation du cytosquelette, **SocB** inhibe l'ADN polymérase, **DarT** cause une ADP-ribosylation de l'ADN, **ParE** et **CcdB** inhibent la gyrase, **MazF**, **HicA**, **SymE** et **RelE** clivent les ARN, **HipA** réprime les aminoacyl-ARNt synthétases en les phosphorylant, **VapC** clive les ARNt et l'ARN ribosomal 23S, **Doc** inactive le facteur d'élongation EF-Tu en le phosphorylant, **RatA** bloque l'assemblage des ribosomes. (D'après Jurénas *et al.*, 2022).

## i.ii. Classification des systèmes TA

Les systèmes TA sont classés en huit types selon la nature de l'antitoxine (ARN ou protéine) et le mécanisme par lequel l'antitoxine inhibe l'activité de sa toxine (**Figure 30**) :



**Figure 30 : Classification des huit types de systèmes toxine-antitoxine.** Les systèmes sont décrits dans le texte.

- **Type I :**

Le premier système TA de type I à avoir été découvert est le système Hok/Sok localisé sur le plasmide R1 d'*E. coli* (Gerdes *et al.*, 1986). Ces systèmes sont constitués d'une antitoxine ARN qui s'apparie sur l'ARNm de la toxine pour inhiber sa traduction et/ou entraîner sa dégradation par des RNases (Singh *et al.*, 2021). Comme pour le système Hok/Sok, la plupart des antitoxines de type I sont codées en *cis*-antisens ce qui signifie que les gènes codant la toxine et l'antitoxine sont localisés sur les brins d'ADN opposés de manière chevauchante. Cette disposition permet un appariement parfait entre l'ARNm de la toxine et l'antitoxine. Les antitoxines peuvent aussi être codées en *trans* et, dans ce cas, les gènes codant la toxine et l'antitoxine sont localisés dans des régions génomiques distantes, la complémentarité de séquence entre ces deux ARN est donc partielle (e.g. système TisB/IstR-1). Les toxines de type I sont classées en deux catégories : les toxines associées à la membrane et les toxines cytosoliques (Brielle *et al.*, 2016). Les toxines associées à la membrane sont des peptides hydrophobes généralement composés de moins de 60 acides aminés. Dans la plupart des cas, leur toxicité est due à une dépolarisation et/ou perméabilisation membranaire entraînant une diminution de la concentration intracellulaire d'ATP (Nonin-Lecomte *et al.*, 2021). Certaines de ces toxines peuvent aussi causer une condensation du nucléoïde. Du côté des toxines de type I cytosoliques, les deux seules décrites à ce jour sont RaiR et SymE qui agissent en clivant, respectivement, l'ADN ou l'ARN (Guo, Y. *et al.*, 2014; Kawano *et al.*, 2007).

- **Type II :**

Les systèmes TA de type II sont les systèmes les plus étudiés et les plus abondants dans les génomes bactériens (Fraikin *et al.*, 2020). Ils sont composés d'une antitoxine protéique qui neutralise la toxine protéique par interaction directe protéine-protéine. Les gènes codant ces systèmes sont organisés en opéron et, généralement, le gène codant pour l'antitoxine est localisé en amont de celui codant pour la toxine (Singh *et al.*, 2021). Dans certains cas, cette organisation génétique est inversée : le gène codant la toxine est placé en amont de celui de l'antitoxine. L'expression de ces opérons est autorégulée par l'antitoxine selon un mécanisme surnommé « coopérativité conditionnelle » (Fraikin *et al.*, 2020). En effet, les antitoxines de type II contiennent un domaine de liaison à l'ADN qui leur permet de se fixer au promoteur de l'opéron pour réprimer la transcription du système. L'affinité de l'antitoxine pour le promoteur de l'opéron est renforcée lorsque cette dernière forme un complexe avec sa toxine. Cependant, quand le ratio toxine/antitoxine est en faveur de la toxine, la répression du système est levée. En conditions de stress, les antitoxines instables sont rapidement dégradées par des protéases comme Lon, ClpAP et ClpXP ce qui entraîne la libération des toxines. Ces dernières peuvent ensuite exercer leur fonction : dégradation des ARN (e.g. MazF, HicA), inhibition de la réplication en ciblant la gyrase (e.g. CcdB, ParE) et inhibition des aminoacyl-ARNt synthétases (e.g. HipA) (Figure 29).

- **Type III :**

Ces systèmes sont constitués d'une antitoxine ARN et d'une toxine protéique (Qiu *et al.*, 2022). Contrairement aux systèmes de type I, l'antitoxine ARN agit en séquestrant la toxine. Au niveau génétique, les gènes de l'antitoxine et de la toxine sont organisés en opéron avec le gène codant l'antitoxine localisé en amont du gène de la toxine. Le transcrit de l'antitoxine contient environ 200 nucléotides lors de sa transcription initiale et est caractérisé par la présence de plusieurs séquences identiques répétées (Sarpong & Murphy, 2021). Cet ARN est ensuite mûri par la toxine du système qui est une endonucléase et qui permet de séparer par clivage les séquences répétées. Suite au clivage, les fragments d'antitoxine forment un complexe avec la toxine afin de bloquer son activité.

- **Types IV, V, VI et VII :**

Dans les systèmes TA de type IV, V, VI et VII l'antitoxine et la toxine sont des protéines.

Dans le cas des systèmes TA de **type IV**, l'antitoxine n'interagit pas directement avec la toxine pour inhiber sa toxicité mais avec les cibles de cette dernière. CbtA/CbeA est le premier système de type IV décrit (Heller *et al.*, 2017). La toxine CbtA se fixe sur des protéines du cytosquelette (MreB, FtsZ) pour empêcher la polymérisation de ce dernier, ce qui induit une modification morphologique des bactéries (Figure 29). Pour contrer CbtA, l'antitoxine CbeA interagit directement avec MreB et FtsZ.

L'antitoxine des systèmes TA de **type V** est une RNase qui dégrade l'ARNm qui code pour la toxine afin d'inhiber sa traduction (Qiu *et al.*, 2022). GhoT/GhoS est, à ce jour, le seul représentant des systèmes TA de type V (Wang *et al.*, 2012). La toxicité de GhoT est due à la formation de pores membranaires qui induisent une réduction de la concentration intracellulaire d'ATP (Kim, J.-S. *et al.*, 2018).

Les systèmes de **type VI** sont aussi représentés que par un seul membre : le système SocAB (Aakre *et al.*, 2013). La toxine SocB bloque la réplication en se fixant sur le complexe  $\beta$  de l'ADN polymérase (Figure 29). Pour contrecarrer ce phénomène, l'antitoxine SocA se fixe sur sa toxine et agit comme un adaptateur permettant le recrutement de la protéase ClpXP et ainsi la dégradation de SocB.

Comme illustré sur la Figure 30, les antitoxines de **Type VII** neutralisent leur toxine par le biais de modifications post-traductionnelles (oxydation, phosphorylation, polyadénylation) (Wang *et al.*, 2021). Trois systèmes TA de type VII ont été décrits : Hha/TomB, TgIT/TakA et HepT/MntA. Ces toxines ont chacune des modes d'action différents : Hha est à l'origine d'une lyse cellulaire, TgIT bloque la traduction et HepT inhibe la croissance bactérienne en clivant les ARNm.

- **Type VIII :**

Derniers systèmes TA décrits, les systèmes de type VIII sont composés d'une antitoxine et d'une toxine de type ARN (Qiu *et al.*, 2022). Dans le cas du système SdsR/RyeA, la surexpression de l'ARN SdsR entraîne la mort des bactéries (Choi *et al.*, 2018). Pour empêcher cette mort cellulaire, l'antitoxine RyeA forme un complexe avec l'ARN SdsR ce qui favorise sa dégradation par la RNase III. Un autre exemple de système TA de type VIII est le système CreT/CreA dont le mécanisme d'action est présenté sur la **Figure 30** (Li, M. *et al.*, 2021). CreT est un ARN bactériostatique qui séquestre certains ARN de transfert pour inhiber la croissance bactérienne. En formant un complexe avec une protéine Cas du système CRISPR, l'antitoxine CreA s'apparie partiellement avec le promoteur du gène *creT* pour réprimer sa transcription.

- **Cas particuliers :**

En plus des 8 types de systèmes TA précédemment présentés, quelques cas particuliers ont été décrits dans la littérature. Par exemple, le système DarTG est un système hybride de type II/IV dans lequel l'antitoxine DarG peut interagir avec la toxine DarT pour inhiber son expression (type II), mais peut également agir sur la cible de DarT (type IV) (Jankevicius *et al.*, 2016). Chez *E. coli*, une étude a mis en évidence la présence d'un système TA dans lequel la toxine et l'antitoxine sont fusionnées en une seule protéine (Zhang *et al.*, 2022). Ce système nommé CapRel<sup>SJ46</sup> est un mécanisme de défense contre les bactériophages. Le domaine N-terminal permet de bloquer la traduction et la formation de nouveaux phages *via* la pyrophosphorylation des ARN de transfert. Au contraire, le domaine C-terminal agit comme une antitoxine en bloquant l'activité de la région N-terminale. Plus récemment, chez le phytopathogène *Acidovorax citrulli*, le système putatif de type II Aave\_1720-Aave\_1719 a été mis en évidence par des analyses bio-informatiques (Wang, X. *et al.*, 2023). La caractérisation expérimentale de ce système a montré que ce dernier est composé de la toxine Aave\_1720 qui est une ribonucléase et de l'antitoxine Aave\_1719. La particularité de ce système réside dans le fait que l'antitoxine peut bloquer l'activité de la toxine par deux mécanismes : séquestration de la toxine (caractéristique des systèmes de type II) et dégradation de l'ARNm codant la toxine grâce à son activité RNase (caractéristique des systèmes de type V).

### **i.iii. Régulation de l'expression des systèmes TA**

A l'image de la grande diversité des systèmes TA, les signaux environnementaux influençant leur expression sont variés et complexes. Afin de compiler les connaissances sur ce sujet, nous préparons une revue intitulée « **Insight into the environmental cues modulating the expression of bacterial toxin-antitoxin systems** ». Cette revue est présentée à la page suivante.



## Article 1

---

### Insight into the environmental cues modulating the expression of bacterial toxin-antitoxin systems

# Insight into the environmental cues modulating the expression of bacterial toxin-antitoxin systems

Emeline Ostyn<sup>a</sup>, Yoann Augagneur<sup>a</sup>, Marie-Laure Pinel-Marie<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Univ Rennes, INSERM, BRM - UMR\_S 1230, F-35000 Rennes, France

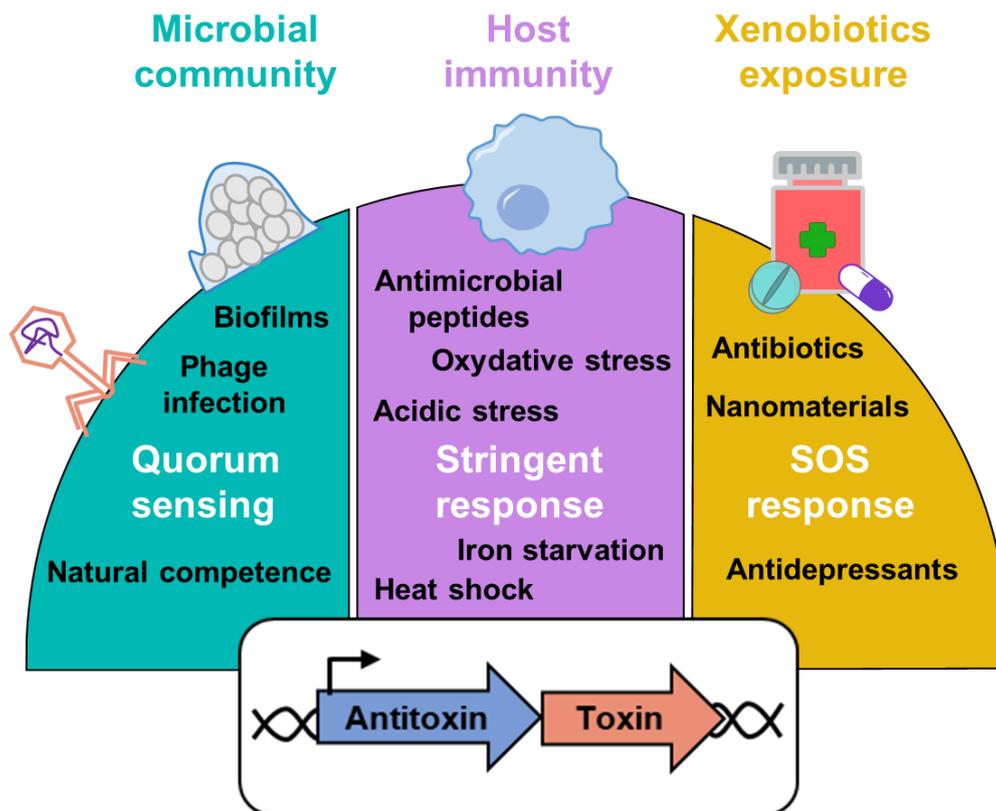
\* Correspondence: marie-laure.pinel@univ-rennes.fr

**Abstract:** Bacteria require sophisticated sensing mechanisms to adjust their metabolism in response to stressful conditions and survive in hostile environments. Among them, toxin-antitoxin systems (TAS) play a crucial role in bacterial adaptation to environmental challenges. TAS are considered as stress-responsive elements consisting of both toxin and antitoxin genes, typically organized in operons or encoded on complementary DNA strands. Under specific conditions, the degradation of the antitoxin releases the toxin, which can disrupt essential cellular processes and inhibit bacterial growth. These systems are categorized into eight types based on the nature of the antitoxin (RNA or protein) and the mode of action of toxin inhibition. Despite the identification of thousands of TAS loci on bacterial and archaeal chromosomes, as well as on mobile genetic elements, their precise biological functions remain elusive and a matter of debate. TAS are implicated in various roles, including genetic elements maintenance, phages infection defense, biofilm and persisters formation. In this review, we aim to underscore the diversity and complexity of the environmental cues that can influence TAS expression. A comprehensive understanding of how these genetic modules are regulated could provide insights into TAS functions and facilitate the development of innovative antimicrobial strategies.

**Keywords:** Toxin-antitoxin systems, regulation, environmental cues, microbial community, host immunity, antibiotic

## INTRODUCTION

Forty years ago, the first toxin-antitoxin system (TAS), a type II TAS named CcdA/CcdB, was discovered on the *Escherichia coli* mini-F plasmid (Ogura and Hiraga, 1983). Since then, many TAS were discovered in bacterial and archaeal genomes. TAS are genetic modules composed of two genes: one encoding a stable toxin whose overexpression leads to growth arrest or cell death and the other one encoding a labile antitoxin which counteracts toxin's activity. Under certain conditions, the antitoxin no longer inhibits the toxin, allowing it to act on essential cellular processes such as DNA replication, translation, ATP synthesis and cell division (Jurénas *et al.*, 2022). TAS distribution is not homogeneous within bacterial genomes. They are abundant in free-living prokaryotes but seem to be absent in obligate host-associated organisms such as *Chlamydia trachomatis* (Pandey and Gerdes, 2005). Moreover, the TAS repertoire vary from one species to another. For instance, at least 93 TAS were identified in *Mycobacterium tuberculosis* (Sundaram *et al.*, 2023), whereas 35 were described in *E. coli* K-12 MG1655 (Harms *et al.*, 2018). As interest in TAS increases, bioinformatics tools have been developed to facilitate their identification and annotation. The first one, RASTA-Bacteria, appeared in 2007 to identify toxin-antitoxin loci in prokaryotes (Sevin and Barloy-Hubler, 2007), followed by TADB 3.0 (Guan *et al.*, 2023), TASmania (Akarsu *et al.*, 2019) and T1TAdb (Tourasse and Darfeuille, 2021). Ongoing efforts to characterize TAS revealed that they are classified into eight types, according to the antitoxin's mode of action and nature (RNA in types I, III, VIII and protein in types II, IV, V, VI, VII) (Singh *et al.*, 2021). Toxins are proteins in all types of TAS, except in the recently discovered type VIII TAS where it is an RNA (Choi *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2021). As mentioned above, TAS were initially discovered on plasmids (Gerdes *et al.*, 1986; Ogura and Hiraga, 1983). Thus, the first biological function described for TAS was plasmid maintenance, also called post-segregational killing (PSK). Briefly, following the loss of the plasmid carrying a TAS, the unstable antitoxin is rapidly degraded leaving the stable toxin free to induce bacterial death. For TAS located on bacterial chromosomes, various novel biological functions were identified such as mobile genetic element maintenance, biofilm formation, antibiotic resistance and persistence (Pinel-Marie *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2015; Yao *et al.*, 2015). These systems are also considered as stress response managers to tolerate environmental changes (Buts *et al.*, 2005). Under favorable growth conditions, antitoxins are sufficient to inactivate their cognate toxin and counteract toxicity. This general mechanism of regulation mediated by antitoxins is essential for maintaining bacterial homeostasis and has been extensively described (Bonabal and Darfeuille, 2023; Jurénas *et al.*, 2022). However, under environmental cues, antitoxins can be rapidly degraded allowing toxins to provoke fatal damage. It is noteworthy that the environmental cues influencing TAS expression are still inadequately documented. In this review, we provide insight into the regulation of TAS expression, both at the RNA and the protein levels, when bacteria are i) present within a microbial community, ii) targeted by the host's immune response and iii) exposed to xenobiotics, as depicted in **Figure 1**.



**Figure 1:** Mechanisms involved in the regulation of toxin-antitoxin systems expression discussed in this review.

## 1. Influence of the microbial environment on TAS expression

In natural environments, bacteria reside within microbial communities, sharing a common living space where they can interact as predators of some microorganisms, preys of phages or other microorganisms, or as symbionts in biofilms. In this section, we will focus and summarize the current state of art on the regulation of TAS expression during natural competence, phage infection, and biofilm formation. All these events are mainly under the control of the quorum-sensing (QS). These community-mediated effects on TAS expression are summarized in [Table 1](#).

**Table 1: Role of the microbial community on toxin-antitoxin systems expression.**

Environmental event	Toxin-Antitoxin system	Type	Bacteria	Expression	References
Natural competence	ToxTA	II	<i>Haemophilus influenzae</i>	Upregulation	Findlay Black <i>et al.</i> , 2020
	ChpSB, HigBA, HicAB	II	<i>Escherichia coli</i>	Upregulation	Sinha <i>et al.</i> , 2009, Turnbull and Gerdes, 2017
Phage infection	ToxIN	III	<i>Escherichia coli</i>	Antitoxin degradation	Guegler and Laub, 2021
	AvcID	III	<i>Vibrio cholerae</i>	Antitoxin degradation	Hsueh <i>et al.</i> , 2022
Biofilms	RelBE	II	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>relBE</i> upregulation	Mahmoudi <i>et al.</i> , 2022
	SprG1/SprF1	I	<i>Staphylococcus aureus</i>	Upregulation of <i>sprG1</i>	Karimaei <i>et al.</i> , 2021
	ParDE <sub>4</sub>	II	<i>Caulobacter crescentus</i>	Downregulation	Berne <i>et al.</i> , 2023
Quorum sensing	SmuATR	II	<i>Streptococcus mutans</i>	Upregulation	Perry <i>et al.</i> , 2009, Dufour <i>et al.</i> , 2018
	PumAB	II	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Upregulation	Hernández-Ramírez <i>et al.</i> , 2020
	MazEF, ChpBIK	II	<i>Escherichia coli</i>	Endoribonucleolytic activities of MazF and ChpBK are enhanced	Belitsky <i>et al.</i> , 2011

### 1.1. TAS expression during natural competence

Natural competence is the ability of bacteria to acquire foreign DNA from their environment. DNA uptake is a source of nucleotides, chemicals elements and energy. This mechanism also participates to horizontal gene transfer and, therefore, to bacterial evolution, antibiotic resistance and virulence gene acquisition. In *Haemophilus influenzae*, competence genes expression is controlled by two transcription factors: CRP (cAMP receptor protein) and the competence activator Sxy (Jaskólska and Gerdes, 2015). Under sugar starvation, an increase in intracellular cAMP level leads to CRP activation. CRP binds DNA promoters at a CRP canonical site to activate the transcription of *sxy* and sugar utilization genes. Then, CRP and Sxy act together to bind to CRP-S sites, which differ with standard CRP sites because they depend on both CRP and Sxy for activation. These CRP-S sites are located on promoters of competence genes, leading to DNA uptake and natural transformation. The *toxA* gene, encoding the type II antitoxin of the ToxTA TAS, contains a CRP-S site on its promoter (Findlay Black *et al.*, 2020). RNA-sequencing analysis showed that *toxT* and *toxA* transcript levels are upregulated in a competence-inducing starvation medium, while

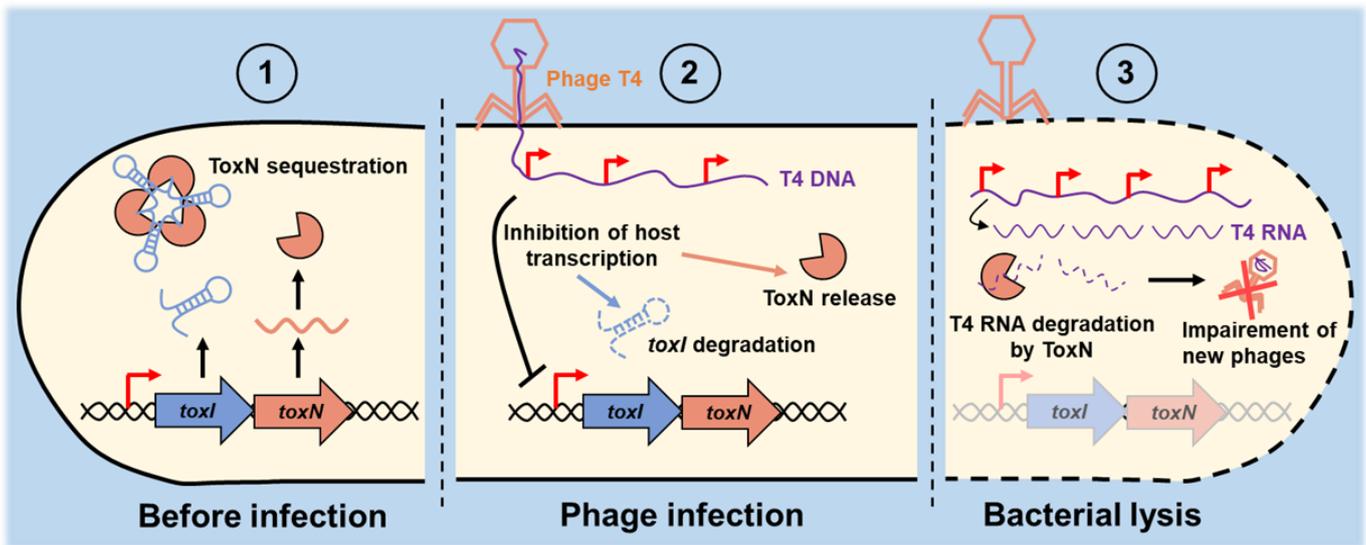
deletion of either *crp* or *sxy* genes prevents this upregulation. These results demonstrate that *toxTA* operon is controlled by the CRP-Sxy complex, involved in the regulation of competence genes (Findlay Black *et al.*, 2020). In the same study, the authors showed that the deletion of *toxA* results in an increase of *toxT* transcript and in a decrease in transformation efficiency. However, deletion of *toxT* has no impact on bacterial competence. Thus, the exact role of ToxT on natural competence in *H. influenzae* has yet to be elucidated. ToxTA is not the only example of a TAS controlled by CRP-Sxy. Even though *E. coli* is not considered naturally competent, overexpression of *sxy* causes upregulation of the *chpSB* and *higBA* type II TAS and the *hokD* type I toxin genes (Sinha *et al.*, 2009). Moreover, *hicAB* operon is controlled by two promoters and one of them, the P1 promoter, contains a CRP-S site and is also regulated by the CRP-Sxy complex in *E. coli* (Turnbull and Gerdes, 2017).

## 1.2. TAS expression during phage infection

Phages are categorized based on their life cycles as lytic or temperate phages. Upon infecting a bacterium, lytic phages initiate a cycle leading to the production and release of viral particles into the environment during host lysis. Temperate phages, on the other hand, can enter either a lytic or a lysogenic cycle. During the lysogenic cycle, the phage genome integrates into the bacterial chromosome, as "prophage." The prophage replicates together with the bacterial genome until environmental triggers, such as nutrient deprivation, induce phage activation into the lytic cycle. In response to phage infections, bacteria have evolved phage defence mechanisms including CRISPR-Cas and abortive infection (Abi) systems (Kelly *et al.*, 2023).

Interestingly, one of the emerging functions of TAS is their role as phage defence systems (Kelly *et al.*, 2023). During phages infection, TAS can be activated to prevent phage replication and, thus, protect the bacterial population, as this is the case for Abi systems. The first TAS involved in the defence against T4 phage infection is the *E. coli* type I *hok/sok* system (Pecota and Wood, 1996). Since then, other studies demonstrated the involvement of many TAS in anti-phage mechanisms (Kelly *et al.*, 2023; Saunier *et al.*, 2024). Among them, the AbiEi/AbiEii TAS was initially identified as an Abi system providing phage defence in *Lactococcus lactis* (Garvey *et al.*, 1995), and later shown to consist of the AbiEi antitoxin and the AbiEii toxin acting as a type IV TA system (Dy *et al.*, 2014). In *E. coli*, the type II/IV TA hybrid system, DarTG, prevents the production of new phages by ADP-ribosylation of phage DNA (LeRoux *et al.*, 2022). In *Pseudomonas aeruginosa*, overexpression of the CrlA type II antitoxin protects against phages infection, independently of the CrIT type II toxin, a toxin that cleaves mRNAs (Ni *et al.*, 2022). However, in most cases, the link between TAS activation and phage defence is lacking. One of the well documented TAS activation by phage infection is the ToxIN type III TAS (Guegler and Laub, 2021). This system, composed of the *toxI* RNA antitoxin encoded by 5.5 repeats of 36 bp, and the endoribonuclease ToxN toxin, protects *E. coli* against phages. Indeed, T4 phage infection induces a transcriptional shutoff in *E. coli*. Thus, *toxI* RNA (half-life: 2.5 min) is rapidly degraded, allowing the release of the ToxN toxin. ToxN cleaves viral

transcripts at a GAAAU motif and prevents the production of new phages (**Figure 2**). The infected bacteria die, but neighbouring bacteria are protected. In this case, T4 phage infection prevented by ToxIN is a consequence of ToxI RNA antitoxin instability but is not due to an increase in ToxN expression ([Guegler and Laub, 2021](#)).



**Figure 2: T4 phage infection leads to host shut-off transcription, ToxI antitoxin degradation and ToxN release.** ToxI antitoxin is presented in blue and ToxN toxin in orange.

AvcID is a type III TAS composed of the AvcD deoxycytidine deaminase toxin and the AvcI RNA antitoxin expressed by *Vibrio cholerae* ([Hsueh et al., 2022](#)). This system protects bacteria against phage infections by disrupting cytosine availability. T5 phage infection induces transcriptional arrest in the bacterial host. Thus, AvcI RNA is rapidly degraded and AvcD toxin deaminates dCTP to dUTP leading to an increase in uracil incorporation in phage DNA. This mechanism causes the formation of deficient T5 virions. Later, it was demonstrated that expression of *avcID* locus from *Vibrio parahaemolyticus* expressed heterologously in *E. coli* host protects bacteria against T5 but not T7 phages ([Hsueh et al., 2023](#)). Indeed, AvcID protects against longer replicating phages like T5, but is ineffective against faster replicating phages like T7. The authors demonstrated that prevention of phage infection by AvcID depends on the length of the phage replication cycle.

### 1.3. TAS expression in biofilms

Biofilms are structured, surface-attached microbial communities embedded in an extracellular matrix composed of polysaccharides, extracellular DNA and other components. This lifestyle protects bacteria from hostile environmental conditions, such as host immune response and antibiotics, and, consequently, is associated with therapeutic treatment failures ([Vuotto and Donelli, 2019](#)).

TAS can participate in biofilm formation or disruption. For instance, RelBE, a type II TAS composed of the RelB antitoxin and the RelE endoribonuclease, promotes biofilm formation in *V. cholerae* (Wang *et al.*, 2015). Similarly, the *relBE* locus is upregulated in stronger biofilm-producing *P. aeruginosa* isolates (Mahmoudi *et al.*, 2022). In *Staphylococcus aureus*, relative expression of *mazF*, *relE1* and *relE2* type II toxin mRNAs and *sprG1* type I toxin mRNA are upregulated in biofilm compared to planktonic bacteria (Karimaei *et al.*, 2021). However, the potential role of these upregulations on biofilm formation has not been elucidated yet. Another example of a TAS regulated under biofilm conditions, is the ParDE<sub>4</sub> type II TAS, consisting of the ParD antitoxin and the ParE gyrase inhibitor in *Caulobacter crescentus* (Berne *et al.*, 2023), a gram-negative bacterium living in lakes and streams. In this bacterium, when living conditions in biofilm deteriorate, extracellular DNA (eDNA) is used as a signal to mediate biofilm dispersal. Interestingly, deletion of the ParDE<sub>4</sub> TAS results in an increase in biofilm formation and a decrease in eDNA release (Berne *et al.*, 2023). Further investigations, using a transcriptional *lacZ* reporter system, demonstrated that the *parDE<sub>4</sub>* promoter activity decreases in areas where oxygen availability is reduced within the biofilm. Taken together, these results suggest that, when oxygen availability is reduced, ParD<sub>4</sub> antitoxin is rapidly degraded by proteases allowing the ParE<sub>4</sub> toxin to induce programmed cell death, promoting eDNA release and biofilm disruption.

#### 1.4. TAS expression and quorum sensing

Quorum sensing (QS) is a cell-to-cell communication system used to coordinate social behaviors across bacterial populations in a cell density-dependent manner. QS involves the production of diffusible or secreted signalling molecules. When the bacterial population density increases, signals molecules accumulate in the extracellular medium and interact with their cognate receptors. This induces targets genes expression to contribute to bacterial adaptation, survival, and successful interactions with other organisms.

The *Streptococcus mutans* ComCDE QS system is composed of the ComC signal peptide precursor, which, after modifications, generates the CSP (competence-stimulating peptide) alarmone (Perry *et al.*, 2009). Extracellular CSP is detected by the ComD membrane receptor that leads to ComE response regulator activation. Then, ComE activates the promoters of CSP-responsive genes. Transcriptomic study showed that the SmuATR chromosomal type II TAS is a member of the CSP regulon (Perry *et al.*, 2009). This tripartite system, composed of the SmuA antitoxin, SmuT toxin and SmuR transcriptional repressor, is up-regulated by the CSP alarmone (Dufour *et al.*, 2018; Perry *et al.*, 2009). Noteworthy, CSP alarmone is involved in persister cells formation, a subpopulation of bacteria initially described by Joseph Bigger in 1944 (Bigger, 1944), that can transiently survive to antibiotics and resume growth after antibiotics removal (Balaban *et al.*, 2019). Thus, the use of deletion mutants lacking *smuAT* and *smuATR*, both preincubated with or without the CSP alarmone prior to ofloxacin treatment, illustrated the involvement of the SmuATR

TAS in the CSP-inducible persister phenotype (Dufour *et al.*, 2018). However, further studies are needed to demonstrate that ComE can bind the promoter of *smuATR* locus.

The plasmid-encoded PumAB type II TAS of *P. aeruginosa* is another TAS regulated by QS (Hernández-Ramírez *et al.*, 2020). This system is involved in plasmid stability and PumA toxin is associated with bacterial virulence (Hernández-Ramírez *et al.*, 2017). In *P. aeruginosa*, LasI–LasR and RhII–RhIR are two QS pathways leading to the expression of QS responsive genes (Lee and Zhang, 2015). LasI and RhII are two acyl-homoserine lactone synthases that produce QS signal molecules, 3-oxo-C12-AHL or C4-AHL, respectively. RT-qPCR analysis showed that the plasmid-derived *pumA* mRNA level decreases in the *P. aeruginosa lasI/rhII* double mutant strain compared to parental strain (Hernández-Ramírez *et al.*, 2020). In the same study, the authors demonstrated that, in the *lasI/rhII* double mutant, virulence conferred by *pumA* decreases in a lettuce leaf or in *Caenorhabditis elegans* infection models. Interestingly, extracellular addition of 3-oxo-C12-AHL or C4-AHL restored *pumA* mRNA relative expression level and *pumA* conferred virulence in *C. elegans*. The authors showed that PumA-mediated virulence is exacerbated when 3-oxo-C12-AHL is added in the culture medium in contrast to the addition of C4-AHL. It seems that LasIR QS system is more effective to induce *pumA* mRNA expression than the RhIIR QS system. Taken together, these results suggest that *pumA* gene expression and virulence mediated by PumA are QS dependent.

In *E. coli*, when subjected to stress, such as heat shock, oxidative stress, or DNA damage (Hazan *et al.*, 2004), the MazEF type II TAS induces cell death. Specifically, *mazF* encodes the MazF endoribonuclease, while *mazE* encodes the MazE type II antitoxin. The MazEF-mediated cell death can also be mediated by the QS factor called EDF (Extracellular death factor) (Belitsky *et al.*, 2011). EDF is a linear pentapeptide composed of the following amino acids: N-N-W-N-N (Kolodkin-Gal *et al.*, 2007). EDF participates in MazF mediated toxicity at the posttranscriptional level by enhancing its endoribonucleolytic activity (Belitsky *et al.*, 2011). The tryptophan residue of the EDF peptide is essential to increase MazF endoribonucleolytic activity and to prevent the interaction between MazF and MazE antitoxin. Using affinity column purification, with EDF immobilized on the column, a direct interaction between EDF and MazF was demonstrated. Endoribonucleolytic activity of ChpBK, a MazF homologous toxin, from the *chpBIK* chromosomal type II TAS in *E. coli*, is also enhanced by EDF (Belitsky *et al.*, 2011). Moreover, EDF enhances the endoribonucleolytic activity of two MazF toxins (3 and 6) in *M. tuberculosis* (Nigam *et al.*, 2018). Noteworthy, MazF participates in EDF production (Kolodkin-Gal and Engelberg-Kulka, 2008; Kumar *et al.*, 2016). EDF is generated from the *zwf* gene. This gene encodes the Zwf protein (glucose-6-phosphate dehydrogenase) composed of 491 amino acids and involved in pentose phosphate pathway. Under stressful conditions (heat shock, antibiotic exposure), MazF cleaves the *zwf* mRNA in two different sites (Kumar *et al.*, 2016). One of these cleavages halts the ribosome on *zwf* mRNA, leading to *trans*-translation system activation and EDF production.

To summarize, in this section, we reported examples demonstrating that TAS expression can be influenced **i)** by transcriptional regulators associated with natural competence or QS, **ii)** through antitoxin degradation following phage infection and **iii)** within biofilms.

## 2. Influence of the host's immune response and their related stresses on TAS expression

During infection, some bacteria survive within their host's immune cells (macrophages, neutrophils) while being confronted to various stresses such as acid stress, nutrient starvation or oxidative stress (Weiss and Schaible, 2015). Here, we present the effect of stressful conditions encountered by bacteria during host infection on TAS expression in ESKAPEE or non ESKAPEE pathogens (Table 2). ESKAPEE refers to seven pathogens (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. and *Escherichia coli*) which are often responsible for healthcare-associated infections and have developed resistance to many antibiotics (Pendleton et al., 2013).

**Table 2: Impact of host stresses on toxin-antitoxin systems expression.**

Bacteria	Toxin-Antitoxin system	Type	Stress	Regulation	References
<b>ESKAPEE</b>					
<i>Staphylococcus aureus</i>	SprA1/SprA1 <sub>AS</sub>	I	Acid and oxidative stress	Downregulation of the antitoxin RNA and upregulation of the toxin level	Sayed et al., 2012
	SprA2/SprA2 <sub>AS</sub>	I	Starvation and osmotic stress	Downregulation of the antitoxin	Germain-Amiot et al., 2019
	SprG1/SprF1, SprG2/SprF2, SprG3/SprF3 (HG003 strain)	I	Osmotic and oxidative stress	Downregulation of the antitoxin (except sprF4)	Riffaud et al., 2019
	SprG1/SprF1 (N315 strain)	I	Hyperosmotic stress	Upregulation of SprF1 RNA	Pinel-Marie et al., 2021
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PacTA	II	Iron starvation	Upregulation of the system	Song et al., 2022
	HigBA	II	Antimicrobial peptide (LL-37)	Upregulation	Song et al., 2024
<i>Escherichia coli</i>	HokB/SokB	I	Stringent response	Upregulation of hokB	Verstraeten et al., 2015
<b>Non-ESKAPEE</b>					
<i>Salmonella</i>	14 putative TAS	II	Nutrient starvation, Macrophages	Upregulation	Helaine et al., 2014
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	MbcTA	II	Nutrient starvation, oxidative or nitric stresses, macrophages	Upregulation	Ariyachaokun et al., 2020
<i>Xenorhabdus nematophila</i>	HipBA <sup>Xn2</sup>	II	Nutrient starvation, heat shock	Upregulation	Yadav and Rathore, 2022

## 2.1. Influence of the host's immune system on TAS expression in ESKAPEE

### ***Staphylococcus aureus***

*S. aureus*, a Gram-positive bacterium, is a major public health threat which can cause a wide range of infections (Tong *et al.*, 2015). Several studies investigated the effect of different stresses, encountered by *S. aureus* during host infection, on the RNA level of type I TAS. In this bacterium, two major type I TAS have been extensively characterized: the SprA/SprA<sub>AS</sub> and the SprG/SprF systems which are present, respectively, in two or four copies in the *S. aureus* genome (Germain-Amiot *et al.*, 2019; Riffaud *et al.*, 2019; Sayed *et al.*, 2012). Expression of the SprA<sub>AS</sub> antitoxin RNA, that belongs to the SprA1/SprA<sub>AS</sub> TAS, is decreased by 25% after acid stress and by 50% under oxidative stress (Sayed *et al.*, 2012). Consequently, SprA1 toxin level is upregulated under acidic and oxidative conditions, although no variation in *sprA1* RNA level was observed. Thus, under acidic and oxidative conditions, the decrease of SprA<sub>AS</sub> level promotes SprA1 expression (Sayed *et al.*, 2012). For the SprA2/SprA<sub>AS</sub> TAS, SprA<sub>AS</sub> RNA level decreases during nutritive starvation or after osmotic stress (Germain-Amiot *et al.*, 2019). Since SprA<sub>AS</sub> RNA level was not impacted by osmotic stress (Sayed *et al.*, 2012), this indicates that these homologous TAS do not respond to the same triggers. Moreover, SprA<sub>AS</sub> RNA level decreases at low temperature (18°C) but is upregulated in acid stress. Unlike SprA<sub>AS</sub>, there is no difference in *sprA2* mRNA level under nutritive starvation. However, *sprA2* mRNA level expression is significantly decreased after oxidative stress which is not the case for the antitoxin (Germain-Amiot *et al.*, 2019). Thus, *sprA2* and SprA<sub>AS</sub> RNA expression are not driven by the same stresses. The effect of stresses on expression of the four SprG/SprF homologous TAS (SprG1/SprF1, SprG2/SprF2, SprG3/SprF3 and SprG4/SprF4) was also investigated in the *S. aureus* HG003 strain (Riffaud *et al.*, 2019). RNA expression level of the SprF antitoxins is decreased during osmotic and oxidative stresses apart from SprF4 which is not affected by these stresses. Also, SprF1 and *sprG1* RNA levels decrease after *S. aureus* internalization in THP-1 macrophages. However, as *sprG1* mRNA level is not influenced by oxidative stress, this suggests that the decrease of *sprG1* mRNA level in macrophages is due to another trigger that remain to be uncovered. Furthermore, a separate study performed in *S. aureus* N315 strain, demonstrated that during hyperosmotic stress, the level of SprF1 RNA increases as a result of enhanced stability. Subsequently, SprF1 accumulates on polysomes to attenuate protein synthesis (Pinel-Marie *et al.*, 2021).

Interestingly, the transcriptional regulator SarA is involved in *sprG2* and *sprA2<sub>AS</sub>* expression in *S. aureus* (Oriol *et al.*, 2021). SarA, a winged-helix DNA-binding protein, binds in dimeric form to specific DNA sequences to regulate its targets (Liu *et al.*, 2006). Numerous studies have been conducted to identify the SarA regulon. For instance, SarA allows the production of the Toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1), a superantigenic exotoxin, by activating the *tst* gene (Andrey *et al.*, 2010) and positively regulates the *mazEF* type II TAS (Donegan and Cheung, 2009). SarA can also repress genes such as the *spa* gene coding for protein A, an immune evasion factor (Gao and

Stewart, 2004). The SarA regulon includes small regulatory RNAs (sRNAs) such as RNAIII, SprC, and srn\_9340 (Mauro *et al.*, 2016). In 2021, another study looked at expanding the SarA regulon using transcriptomic and chromatin immunoprecipitation approaches (Oriol *et al.*, 2021). Among the new SarA identified targets, two genes belonging to type I TAS were identified: *sprG2*, encoding the SprG2 toxin and belonging to the SprG2/SprF2 TAS and *sprA2<sub>AS</sub>*, encoding the SprA2<sub>AS</sub> antitoxin from the SprA2/SprA2<sub>AS</sub> TAS. In a *sarA* deleted strain, northern blot experiments demonstrated that *sprG2* and SprA2<sub>AS</sub> RNA level increases. Also, EMSA showed that SarA can directly and specifically bind *sprG2* and *sprA2<sub>AS</sub>* promoters. Taken together, these results demonstrate that SarA is a repressor of *sprG2* and *sprA2<sub>AS</sub>* expression due to promoter binding. Interestingly, in the conditions used in this study, the homologous TAS, SprG1/SprF1, SprG3/SprF3, SprG4/SprF4 and SprA1/SprA1<sub>AS</sub>, were not found to be regulated by SarA. This indicates that homologous systems do not necessarily belong to the same regulon, complexifying our understanding of TAS regulation network. Therefore, searching for a link between SarA, host immunity stresses and TAS regulation could be of interest.

### ***Pseudomonas aeruginosa***

The Gram-negative bacterium, *P. aeruginosa*, is a common environmental organism but also a significant opportunistic pathogen, particularly in patients with cystic fibrosis, due to its ability to form biofilms (Laborda *et al.*, 2022). Ten type II TAS were experimentally characterized in *P. aeruginosa* (M. Li *et al.*, 2023). Type II TAS are generally organized in operons and two genetic organization have been described (Fraikin *et al.*, 2020). On one hand, the antitoxin gene is encoded before the toxin gene whereas, on the other hand, the toxin gene is upstream the antitoxin gene. In the first organization, the TAS locus is transcribed from a single promoter whereas in the second organization, two promoters are present. One is involved in the transcription of the whole locus and the second, located in the toxin gene, is only responsible for the antitoxin gene expression. These two genetic organizations are autoregulated thanks to the DNA-binding domain of the antitoxins which act as transcriptional repressors. When the toxin:antitoxin ratio is in favor of the antitoxin, the toxin helps the antitoxin to repress the operon; however, when the toxin concentration is high, derepression occurs, a phenomenon known as “conditional cooperativity” (Fraikin *et al.*, 2020). A recent study showed that excess toxin leads to transition from a hexameric TA complex to an octameric complex, resulting in DNA deformation and derepression of the operon (Grabe *et al.*, 2024). In *P. aeruginosa*, the *pacTA* locus, encoding the PacTA type II TAS, is located on the chromosome and is composed of the toxin gene upstream the antitoxin gene (M. Li *et al.*, 2023). This system consists of the PacA antitoxin and the PacT toxin, containing a GCN5-related N-acetyltransferase (GNAT) domain, which can arrest translation *via* tRNAs acetylation. Under iron starvation, the *pacTA* or *pacT* mutant strains growth is impaired compared to the parental strain (Song *et al.*, 2022). Moreover, proteome analysis showed that in a *pacTA* deletion mutant strain, iron uptake genes, such as *feoC* and *feoB* encoding ferrous iron transport proteins or *pigA*, encoding a

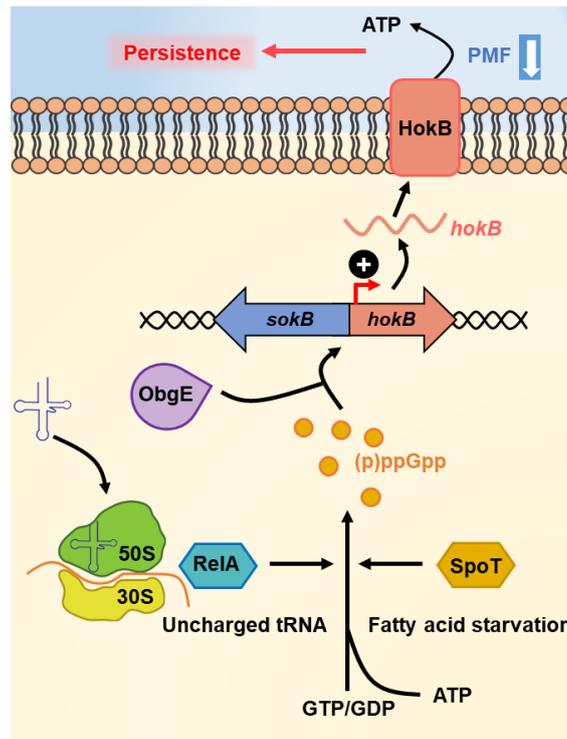
heme oxygenase, are downregulated. These genes are under the control of Fur, the major regulator of iron homeostasis. It is a repressor of genes involved in iron import and storage. Interestingly, the PacT toxin can bind the Fur repressor and this association attenuates the DNA binding ability of Fur. Taken together, these results indicate that the PacTA TAS is involved in iron homeostasis. In case of iron starvation, the expression of *pacT* is induced which allows the association of PacT toxin with Fur. This association prevents Fur binding to its regulon thus leading to an activation of genes involved in iron import and storage. However, how the *pacTA* promoter senses iron starvation is not currently elucidated.

To combat invading bacteria, the host innate immune system can produce antimicrobial compounds such as the LL-37 peptide. In *P. aeruginosa*, LL-37 recognition by the CprS sensor, a component of the CprRS two-component system, triggers the phosphorylation of the CprR regulator (Song *et al.*, 2024). Upon activation, this regulator binds a palindromic region within the *higBA* type II TAS locus, thereby increasing the production of the endonuclease HigB toxin. Subsequently, overexpression of HigB induces the expression of a type III secretion system, which enable the bacteria to modulate the host immune response.

### ***Escherichia coli***

*E. coli* is a Gram-negative bacterium commonly found in humans and animals' intestinal flora. However, pathogenic strains, such as the enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) or the enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), are responsible for human diseases. Under environmental stress conditions such as nutrient starvation, the stringent response is induced in *E. coli*. This response is mediated by the (p)ppGpp alarmone (3',5'-bispyrophosphate) and affects vital cellular processes to enable bacteria to adapt to this stressful environment (Irving *et al.*, 2021). (p)ppGpp is synthesized/hydrolyzed by proteins that belong to the RSH superfamily (RelA/SpoT homologues). This family is composed of long RSH enzymes, containing a (p)ppGpp hydrolase and synthetase domains, small alarmone synthetases (SAS) and small alarmone hydrolases (SAH). (p)ppGpp allows the expression of the type II *mazEF* TAS in *E. coli* (Aizenman *et al.*, 1996). When the amount of (p)ppGpp is artificially increased, by inducing *relA* gene with IPTG, *mazEF* RNA expression leads to bacterial death. Since then, others demonstrated a link between stringent response and TAS regulation. In *E. coli*, transcription of the *hicAB* type-II TAS is upregulated under amino acid starvation (Jørgensen *et al.*, 2009) and the *hokB* type I toxin gene expression is induced by (p)ppGpp and is ObgE dependent (Verstraeten *et al.*, 2015). Overexpression of *obg* gene, encoding the ObgE GTPase, requires (p)ppGpp to enhance persister cells formation in *E. coli*. Interestingly, *hokB* deletion abolished the ObgE mediated persistence phenotype. These results demonstrate that ObgE mediates persistence by transcriptional activation of *hokB*. Then, HokB, a 49 amino acid peptide, forms pores into the membrane with an estimated diameter of 0.59–0.64 nm (Wilmaerts *et al.*, 2018). Pore formation provokes membrane depolarization, ATP leakage and, therefore, persister cells formation (Figure 3). Recently, the mechanism involved in pore formation by HokB was deciphered (Wilmaerts *et al.*,

2019). The periplasmic C46 residue of HokB is essential for HokB dimerization and pore formation. The periplasmic oxidoreductase DsbA, by forming a disulfide bond between two HokB C46 residues, is involved in HokB dimerization. Thus, membrane depolarization, ATP leakage and persister cells formation do not occur in a cysteine 46-to-serine substitution mutant, because pore formation is abolished. HokB monomerization by the DsbC oxidoreductase and, then, degradation by the DegQ protease, are responsible for pore disassembly, membrane repolarization and ATP production which contribute to HokB persister cells awakening (Wilmaerts *et al.*, 2019).



**Figure 3: ObgE GTPase and stringent response activate *hokB* transcription in *Escherichia coli*.** Interaction between ObgE GTPase and (p)ppGpp alarmone, produced by RelA or SpoT synthetases under nutrient starvation, increases *hokB* transcription. Thus, HokB toxin, by causing pores formation, ATP depletion and membrane depolarization, is involved in bacterial persistence. PMF: Proton motive force.

## 2.2. Influence of the host's immune system on TAS expression in non-ESKAPEE

### **Salmonella**

*Salmonella* belongs to the Enterobacteriaceae family and is an intracellular pathogen. Some species of this genus cause salmonellosis after ingestion of contaminated food. In the *Salmonella* genome, 14 putative type II TAS were identified and the mRNA levels of all of them are upregulated after phagocytic uptake in bone marrow– derived macrophages (Helaine *et al.*, 2014). This overexpression is related to the stringent response activation through (p)ppGpp production by the RelA and SpoT synthase after *Salmonella* internalization by macrophages. Indeed, in a *relA/spoT* double mutant, these 14 TAS are no longer overexpressed. In parallel, transient acidification of the culture medium or starvation induced by serine hydroxamate activated the expression of both antitoxin and toxin transcripts for the 14 TAS. Thus, the activation of these systems by stresses encountered in macrophages can promote persister cells formation. In a typhoid fever mouse model,

the authors also demonstrated that the ShpAB type II TAS contributes to the formation of persister cells (Helaine *et al.*, 2014).

### ***Mycobacterium tuberculosis***

*M. tuberculosis* belongs to the Mycobacteriaceae family and is the causative agent of tuberculosis. In this pathogen, the *mbcTA* locus encodes the MbcA antitoxin and the MbcT toxin which leads to phosphorolysis of NAD<sup>+</sup> to trigger bacterial death (Freire *et al.*, 2019). The transcriptional regulation of this system has been studied using the *mbcA* antitoxin promoter and a fluorescent reporter system (Ariyachaokun *et al.*, 2020). With this approach, the authors demonstrated that *mbcA* promoter expression increases upon nutritive starvation, oxidative or nitric stresses. *mbcA* promoter is also induced after phagocytosis in human or murine macrophages. It is probable that *mbcA* promoter activation in macrophages is due to nutritive starvation, oxidative or nitric stresses encountered by *M. tuberculosis* after its internalization.

### ***Xenorhabdus nematophila***

The study of TAS expression is not limited to human pathogenic bacteria. Indeed, in *Xenorhabdus nematophila*, an entomopathogenic bacterium, the transcriptional regulation of the type II HipBA<sup>Xn2</sup> TAS has been investigated (Yadav and Rathore, 2022). The two genes are organized in an operon with *hipB* antitoxin gene located upstream of *hipA* toxin gene, encoding a serine/threonine kinase. Transcriptional regulation of the HipBA<sup>Xn2</sup> TAS under stress conditions was analyzed by RT-qPCR and by cloning the promoter of these genes in fusion with a  $\beta$ -galactosidase reporter. Various stresses, such as nutritive starvation or heat shock were shown to upregulate *hipBA*<sup>Xn2</sup> promoter activity. Similarly, in the same stressful conditions, RT-qPCR experiments confirmed that *hipA*<sup>Xn2</sup> and *hipB*<sup>Xn2</sup> transcript levels were upregulated. These results suggest that this TAS may be involved in *X. nematophila* adaptation to these stressful conditions.

## **3. Influence of xenobiotics exposure on TAS expression**

In this third section of the review, we will discuss the effect of xenobiotics on the regulation of TAS expression in ESKAPEE and non ESKAPEE pathogens. The examples presented in this section are summarized in **Table 3**.

**Table 3: Effect of xenobiotics exposure on toxin-antitoxin systems expression.**

Bacteria	Toxin-Antitoxin system	Type	Xenobiotic	Expression	References
<b>ESKAPEE</b>					
<i>Staphylococcus aureus</i>	SprG1/SprF1	I	Vancomycin	Upregulation of SprF1 RNA	Pinel-Marie <i>et al.</i> , 2021
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	RelEB1 RelEB2 MazEF VapBC HipBA doc/phd	II	Nalidixic acid, Ceftazidime	Downregulation	Narimisa <i>et al.</i> , 2020
	RelEB1 MazEF HipBA doc/phd	II	Gentamicin	Upregulation	Narimisa <i>et al.</i> , 2020
	RelEB2 VapBC	II	Gentamicin	Downregulation	Narimisa <i>et al.</i> , 2020
<i>Acinetobacter baumannii</i>	HicAB	II	Ciprofloxacin	Upregulation	Kashyap <i>et al.</i> , 2021
	HigBA2	II	Rifampicin	Downregulation	Armalytè <i>et al.</i> , 2018
<i>Escherichia coli</i>	TisB/IstR-1	I	Ciprofloxacin, ofloxacin (SOS-response)	Induction of <i>tisB</i> mRNA	Dörr <i>et al.</i> , 2010, Cayron <i>et al.</i> , 2024
	ZorO-OrzO	I	Kanamycin	Upregulation?	Bogati <i>et al.</i> , 2021
	HipBA	II	Nanoalumina	Upregulation of <i>hipB</i> toxin gene	Wang <i>et al.</i> , 2022
	HipBA, MazEF, YefM-YoeB	II	Antidepressants	Upregulation of the antitoxin and toxin genes	Y. Wang <i>et al.</i> , 2023
<b>Non ESKAPEE</b>					
<i>Vibrio cholerae</i>	HigBA	II	Chloramphenicol, Kanamycin and Spectinomycin	Upregulation	Budde <i>et al.</i> , 2007
<i>Helicobacter pylori</i>	HP0315/HP0316, HP0892/HP0893, HP0894/HP0895, HP0967/HP0968	II	Chloramphenicol, Kanamycin	Upregulation	Cárdenas-Mondragón <i>et al.</i> , 2016

### 3.1. Influence of xenobiotics exposure on TAS expression in ESKAPEE

#### *Staphylococcus aureus*

In *S. aureus*, it was elegantly demonstrated that SprF1 is a dual-function type I antitoxin. With its 3'-end, SprF1 acts as an antitoxin to counteract SprG1 toxicity against competing bacteria and host cells (Pinel-Marie *et al.*, 2014). Additionally, thanks to a purine-rich sequence located at its 5'-end, SprF1 interacts with a subset of polysomes and ribosomes, potentially promoting translation

attenuation and antibiotic persister cells formation (Pinel-Marie *et al.*, 2021). In this study, the authors observed that the level of SprF1 RNA increased following vancomycin exposure, while it remained stable when subjected to ciprofloxacin. Conversely, the level of *sprG1* RNA substantially decreased. These findings emphasize the response of *S. aureus* to antibiotic exposure, wherein reduction of SprG1-encoded peptide toxicity is essential to improve antibiotic persister cells formation, achieved by increasing SprF1 RNA antitoxin level.

### ***Klebsiella pneumoniae***

*Klebsiella pneumoniae* is an opportunistic gram-negative pathogen known to cause hospital-acquired infections. As TAS are stress responsive modules, the expression of various type II TAS after sub-inhibitory exposure to different antibiotics has been explored (Narimisa *et al.*, 2020). Using RT-qPCR analysis, the authors demonstrated that exposure of *K. pneumoniae* with nalidixic acid or ceftazidime results in a decrease in the expression of all the type II TAS studied (*relE1/relB1*, *relE2/relB2*, *vapC/vapB*, *mazF/mazE*, *hipA/hipB* and *doc/phd*). Interestingly, when exposed to gentamicin, all the type II TAS studied do not show the same expression profile: *relE1/relB1*, *mazF/mazE*, *hipA/hipB* and *doc/phd* were upregulated whereas *relE2/relB2* and *vapC/vapB* expression decreased. This study suggests that homologous TAS can differently respond to the same antibiotic stress as *relE1/relB1* expression is upregulated by gentamicin and *relE2/relB2* is downregulated. The KacAT type II TAS provides another example of a TAS induced by antibiotics in *K. pneumoniae*. Specifically, treatment with meropenem elevates the transcript levels of *kacA* and *kacT* (P. Li *et al.*, 2023). The authors elucidated that meropenem treatment enhances the production of the Lon protease, resulting to the degradation of the KacA antitoxin. Consequently, with the toxin-antitoxin molecular ratio being in favour of the toxin, repression of the *kacAT* promoter is relieved, resulting in an increased transcription of *kacA* and *kacT*. These findings provide light on how TA ratio is controlled under antibiotics exposure to modulate TAS transcription.

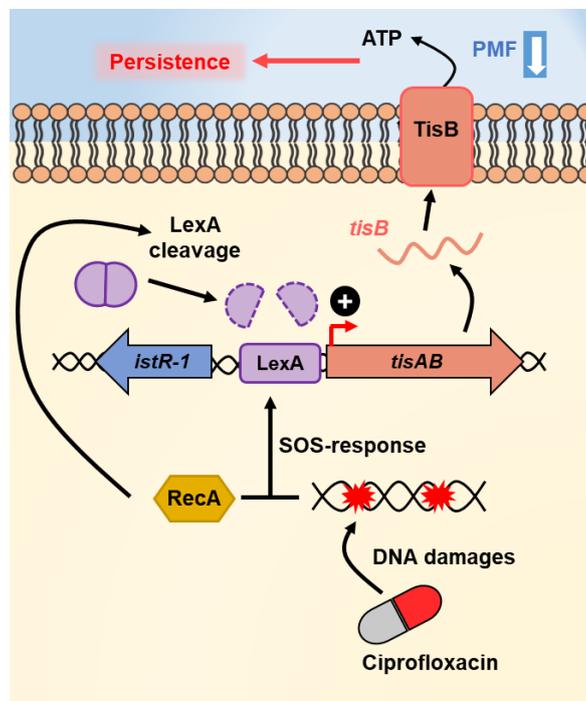
### ***Acinetobacter baumannii***

*A. baumannii* is an emerging threat due to extensive antimicrobial resistance (Ibrahim *et al.*, 2021) and is ranked as a critical priority for the development of new therapeutic strategies by the WHO (Tacconelli *et al.*, 2018). Like other pathogens, *A. baumannii* can form persister cells, which complicates treatments (Kashyap *et al.*, 2021). A transcriptomic study was performed to decipher genes driving survival and persistence of *A. baumannii* after ciprofloxacin exposure (Kashyap *et al.*, 2021). Ciprofloxacin induces DNA damages leading to activation of the SOS-response for DNA repair. In normal growth conditions, LexA binds to SOS-response genes promoters to repress their expression. When single stranded DNA is detected in the bacterium, RecA is activated leading to LexA cleavage. As expected, genes involved in SOS-response, including *recA*, *umuC*, *umuD* and *ddrR*, were upregulated after ciprofloxacin treatment in *A. baumannii* (Kashyap *et al.*, 2021). Moreover, the authors demonstrated that *hicAB* transcript, belonging to the type II HicAB TAS

encoding the HicA endonuclease, is up-regulated. These results suggest that ciprofloxacin-induced *hicAB* gene expression is controlled by the SOS-response. Another study showed an effect of antibiotics on the RNA level of the HigBA type II TAS. This system is composed of the HigB endoribonuclease toxin and the HigA antitoxin, which is present into two copies in *A. baumannii*, with *higBA1* localized in the chromosome and *higBA2* located on the pAB120 plasmid (Armalyt  et al., 2018). The authors noted that treatment with gentamicin or meropenem did not modulate the RNA levels of *higB2* or *higA2*, whereas rifampicin induced a decrease in *higB2* and *higA2* RNA levels, suggesting that TAS expression is specifically influenced by antibiotics.

### ***Escherichia coli***

As previously mentioned for the *hicAB* TAS expressed by *A. baumannii*, the first and well described TAS that is under the control of the SOS-response in *E. coli* is the *tisB/istR-1* type I TAS (Vogel et al., 2004). This system was discovered in 2001 through genome wide analysis (Argaman et al., 2001; Wassarman et al., 2001). Then, in 2004, it was shown that TisB toxin is produced from the *tisAB* mRNA whose expression is controlled by LexA and the SOS-response (Vogel et al., 2004). The authors demonstrated that, in a *E. coli* K12 WT strain, deletion of either *istR-1*, *tisAB* or the entire *istR-1-tisAB* locus has no effect on bacterial growth. Conversely, in a *E. coli* K12 *lexA51*-deficient strain with a constitutive SOS-response, deletion of *istR-1* was impossible. Thus, whereas *istR-1* antitoxin is constitutively expressed from a sigma 70 promoter, transcription of *tisAB* is under the control of the SOS-response regulator LexA. Other studies demonstrated that ciprofloxacin SOS-dependent induction of *tisB* is associated with persistence (D rr et al., 2010) (Figure 4). After ciprofloxacin treatment, DNA damages led to SOS response activation and *tisB* mRNA translation. Then, TisB, a 29 amino-acid pore-forming toxin, provokes membrane damages, proton motive force breakdown and ATP depletion which contributes to persisters formation. Furthermore, by utilizing an *E. coli* mutant where *tisB* expression no longer relies on the SOS-response, resulting in an increase formation of persisters, the authors observed differential responses to antibiotics within the same family (Edelmann et al., 2021). While *tisB* overexpression confers protection against ciprofloxacin, it paradoxically increases susceptibility to mitomycin C, a DNA-damaging agent. Additionally, recent findings indicate that the TisB toxin orchestrates metabolic disruptions following ofloxacin treatment, a DNA gyrase inhibitor (Cayron et al., 2024). Upon activation of the SOS-response by ofloxacin, *tisB* expression is induced. Subsequently, TisB promotes cytoplasmic condensation, followed by proton motive force collapse and intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation. Apart from the *tisB/istR-1* TAS, SOS-response induces other type I TAS in *E. coli* such as *symE/symR*, *hokE/sokE* or *dinQ/agrB* (Fernández De Henestrosa et al., 2000; Weel-Sneve et al., 2013). In these systems, only the toxin gene is regulated by the SOS response. Conversely, in the *yafN/yafO* type II TAS of *E. coli*, antitoxin and toxin genes are both up-regulated by SOS response (Singletary et al., 2009).



**Figure 4: SOS-response activates *hokB* transcription in *Escherichia coli*.** Ciprofloxacin treatment induces DNA damages and SOS-response activation. Following LexA cleavage by RecA, *tisB* mRNA is transcribed and the TisB toxin is produced. TisB acts as a pore-forming toxin causing membrane damages, ATP depletion and proton motive force (PMF) breakdown and, subsequently, persister cells formation.

The chromosomally encoded type I TAS ZorO-OrzO is composed of the ZorO toxin and OrzO antitoxin. In *E. coli*, *zorO-orzO* overexpression improved bacterial growth in the presence of aminoglycosides and increased the minimum inhibitory concentration (MIC) against these antibiotics (Bogati *et al.*, 2021). These effects were not observed for other antibiotics tested. This suggests a role of the system in the response to aminoglycosides and highlights that TAS is to some extent antibiotic-specific. However, endogenous expression of this system under aminoglycosides stress was not studied. Thus, the mechanism of *zorO-orzO* locus regulation under these conditions remains to be deciphered (Bogati *et al.*, 2021).

In view of the growing emergence of multidrug-resistant bacteria to antibiotics, new therapeutic strategies are needed to fight bacterial infections. Among these strategies, nanomaterials with bactericidal effects could be used (Wang *et al.*, 2022). However, as for antibiotics, some bacteria can survive to nanomaterials exposure. Indeed, it was shown that ROS production and QS are involved in *E. coli* persister cells formation after nanoalumina treatment (Wang *et al.*, 2022). RT-qPCR analysis demonstrated that *hipB* toxin gene expression was significantly upregulated after nanoalumina treatment. This result suggests that this toxin may participate in persister cells formation although its deletion has no effect on the persisters fraction, indicating that more than a single player is involved in persister formation following nanoalumina treatment.

Recently, the effect of drugs not used for the treatment of bacterial infections, but to which bacteria may be exposed while living in their host's body, was tested on bacterial resistance and persistence. For instance, antidepressants, widely consumed drugs, could contribute to antibiotic resistance and persistence in *E. coli* (Y. Wang *et al.*, 2023). Using genome-wide RNA sequencing,

the authors showed that, toxin and antitoxin genes of, among others, HipBA, MazEF, YefM-YoeB type II TAS, are upregulated when bacteria are exposed to Sertraline or Duloxetine, two antidepressants drugs.

### 3.2. Influence of xenobiotics exposure on TAS expression in non-ESKAPEE

#### ***Vibrio cholerae***

The Gram-negative bacterium *V. cholerae* is responsible for the diarrheal disease cholera. In *V. cholerae*, several putative TAS were found in a superintegron on chromosome II. Among them, expression of the *higBA* type II TAS was studied (Budde *et al.*, 2007). Like other type II TAS, *higBA* genes are transcribed from the same promoter that is repressed by HigA. *higBA* transcription is induced after exposure to chloramphenicol, kanamycin and spectinomycin (Budde *et al.*, 2007). However, endogenous activation of *higB* gene, in these conditions, is not bactericidal and raises the question of the role of HigBA activation after antibiotic exposure in *V. cholerae*. Interestingly, in *A. baumannii*, gentamicin, an aminoglycoside belonging to the same family such as kanamycin, has no effect on *higBA2* expression (Kashyap *et al.*, 2021). Thus, in different bacterial species, a homologous TAS can have a different regulation pattern. Moreover, as in *C. crescentus* *higBA* is upregulated by ciprofloxacin (Qi *et al.*, 2021), it could be interesting to study ciprofloxacin effect on *higBA* expression in *V. cholerae*.

#### ***Helicobacter pylori***

*Helicobacter pylori*, a gram-negative bacterium, poses the greatest risk for the development of stomach cancer thanks to its ability to survive in acid environment (Camilo *et al.*, 2017). Using RT-qPCR, expression of four type II TAS (HP0315/HP0316, HP0892/HP0893, HP0894/HP0895, HP0967/HP0968) belonging to the Vap family was studied after antibiotic treatments (ampicillin, chloramphenicol, tetracycline, kanamycin) (Cárdenas-Mondragón *et al.*, 2016). Chloramphenicol and kanamycin, which interfere with protein synthesis, induce an upregulation in the expression of genes encoding the toxin or the antitoxin of the four TAS studied. In contrast, ampicillin, which inhibits cell wall synthesis, has no effect on *hp0894/hp0895* genes and decreases *hp0967/hp0968* expression. Moreover, for the two other TAS, ampicillin upregulates the toxin gene but has no effect on the antitoxin gene expression.

Collectively, these results demonstrate the complexity of TAS regulation, as homologous systems exhibit divergent responses to identical antibiotics. Moreover, the expression of TAS can also be influenced by other drugs, such as antidepressants.

### General discussion, concluding remarks and therapeutic opportunities

In this review, we highlight the diversity and complexity of the mechanisms involved in the regulation of TAS expression. In their environment, bacteria are confronted to numerous stresses to

which they must quickly and finely adapt by modulating the expression of genes and proteins. Among the arsenal that enable bacteria to adapt to these stresses, TAS are being extensively studied as general stress response modules. Environmental stresses play an important role in TAS regulation as antibiotics, nutrient starvation, temperature, to name only a few, can upregulate or downregulate their expression. Environmental factors can also participate in toxin activity regulation through its antitoxin. For instance, activity of the type VII TomB antitoxin is oxygen dependent (Marimon *et al.*, 2016). When oxygen is available, TomB increases oxidation of its cognate toxin, HhA, which introduces a negative charge on the toxin and destabilizes its structure, thereby reducing its toxicity. In most cases, antibiotics increase TAS expression. However, these studies often focus on type I and II TAS and information on other TAS families is lagging behind. Moreover, these studies do not thoroughly describe molecular mechanisms involved. Indeed, TAS expression is measured using RT-qPCR which cannot distinguish whether the expression modification is due to a transcriptional regulation or to an RNA stability modification. Some studies have explored in more details the effect of antibiotics on the expression of TAS. For instance, ciprofloxacin, by inducing DNA damages, activates the SOS-response which promotes the expression of *tisB* toxin mRNA (Vogel *et al.*, 2004). Despite evidences that environmental stresses can affect TAS expression, the role of TAS during stress response is controversial. First, stimulation of TAS expression under stress conditions does not necessarily imply toxin production following these stresses. Indeed, a study demonstrated that, in *E. coli*, even if type II TAS are upregulated under amino acid starvation or chloramphenicol treatment, these upregulations are not linked to an active toxin liberation (LeRoux *et al.*, 2020). Secondly, even if *mazEF* and *relBE* TAS expression is triggered by various stress conditions (Hazan *et al.*, 2004), deletion of five type II TAS in *E. coli*, including *mazEF* and *relBE*, has no impact on stress responses under amino acid starvation, acidic stress or rifampicin treatment (Tsilibaris *et al.*, 2007). These results raise questions regarding the potential role of these systems in stress adaptation. However, TAS are present in multiple copies in bacterial genomes and this redundancy can compensate the deletion of certain systems. To better understand the role of these systems, it would be interesting to study the effect of environmental stresses on TAS expression at transcriptional and translational level. To this end, the nFCM-TC-FIAsH strategy has been developed to monitor, at the single cell level, the quantitative production of the MqsA type II antitoxin following different stresses (Wu *et al.*, 2019). Using this method, the authors observed that MqsA is degraded by a bile acid stress and produced after heat shock. This strategy could also be developed to study toxin production. The FASTBAC-Seq (Functional Analysis of Toxin–Antitoxin Systems in Bacteria by Deep Sequencing) is another ingenious strategy used to study TAS chromosomal expression (Le Rhun *et al.*, 2023; Masachis *et al.*, 2018). This method, developed in *H. pylori* and *E. coli*, allows the identification of single-nucleotide substitutions involved in toxin expression or toxin activity inhibition. In response to environmental stresses, TAS expression can be triggered by signalling pathways such as SOS-response, stringent response or QS. Transcription factors can also act on TAS transcription. All these levels of regulation make the study of TAS expression more complex.

Antibiotic resistance is a major public health threat. TAS can contribute to this threat by promoting the formation of biofilms or persisters, mechanisms favouring escape from antibiotic treatments (Kędzierska and Hayes, 2016). Thus, there is an urgent need for the development of novel antimicrobial agents and TAS appear as promising new antibacterial targets. Several therapeutic strategies using TAS can be used. One of these strategies is to use antimicrobial peptides derived from toxins. Pep16 and Pep19 are two peptides derived from the SprA1 type I toxin of *S. aureus* (Nicolas *et al.*, 2019; Solecki *et al.*, 2015). For instance, these two modified peptides are effective against methicillin-resistant *S. aureus* in a mouse sepsis infection model. ParELC3 is another example of a toxin-derived peptide (Sanches *et al.*, 2021). This peptide is a bacterial topoisomerases inhibitor and can be transported within the bacteria using rhamnolipid-based liposomes. A second strategy is the direct activation of the toxin to promote cell death. To this end, preventing toxin-antitoxin interaction or blocking antitoxin expression are two potential approaches (Kang *et al.*, 2018; Lee and Lee, 2016; Równicki *et al.*, 2020). In *M. tuberculosis*, mutation of two amino acids in the antitoxin VapB2 or VapB21 prevents interaction with the toxins VapC2 and VapC21, respectively (Chauhan *et al.*, 2022). VapB antitoxins can no longer inhibit VapC toxicity which causes cell death. Thus, preventing VapB-VapC interactions could enable the development of new bactericidal antitubercular agents. Finally, TAS can also be used in combination with another therapeutic strategy to improve it. Association of the CreTA type VIII TAS with a CRISPR antimicrobials approach promotes *A. baumannii* multidrug resistant clinical isolates elimination (R. Wang *et al.*, 2023). Finally, a CcdB type II toxin-intein-based tool was engineered to target only pathogenic *V. cholerae* bacteria without harming the other members of host microbiota (López-Igual *et al.*, 2019). Moreover, TAS can be used as biotechnological tools in health or agriculture areas. In agriculture, agrochemicals are required to prevent plants bacterial diseases. However, these agrochemicals can be toxic to the environment and alternatives methods must be found. Some studies demonstrated that TAS can be used to struggle against bacterial phytopathogen. For example, it is possible to impair *Xanthomonas citri subsp. citri* growth using MqsR toxin from the MqsRA type II TAS (de Souza-Neto *et al.*, 2022). *Xanthomonas citri subsp. citri* is the causative agent of the citrus canker. Using transgenic citrus plants overexpressing MqsR toxin, the authors demonstrated a reduction of citrus canker symptoms. MazEF type II TAS could also be used to develop new insecticides (Zhang *et al.*, 2021). In the medical area, the Kid toxin from the Kid-Kis type II TAS can be used to specifically kill cancer cells by inducing apoptosis in human cells (Turnbull *et al.*, 2019).

In conclusion, understanding the regulation of TAS would make it possible to study them under physiological conditions rather than using overexpression, which is often used nowadays. This will also give us a better understanding of their biological functions in order to use them to develop new promising therapeutic strategies to combat antibiotic-resistant bacteria and to treat recurrent infectious diseases.

## REFERENCES

- Aizenman, E., Engelberg-Kulka, H., Glaser, G., 1996. An *Escherichia coli* chromosomal “addiction module” regulated by guanosine [corrected] 3',5'-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 6059–6063. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.12.6059>
- 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006946>
- Andrey, D.O., Renzoni, A., Monod, A., Lew, D.P., Cheung, A.L., Kelley, W.L., 2010. Control of the *Staphylococcus aureus* toxic shock tst promoter by the global regulator SarA. *J. Bacteriol.* 192, 6077–6085. <https://doi.org/10.1128/JB.00146-10>
- Argaman, L., Hershberg, R., Vogel, J., Bejerano, G., Wagner, E.G., Margalit, H., Altuvia, S., 2001. Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*. *Curr. Biol. CB* 11, 941–950. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(01\)00270-6](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00270-6)
- Ariyachaokun, K., Grabowska, A.D., Gutierrez, C., Neyrolles, O., 2020. Multi-Stress Induction of the *Mycobacterium tuberculosis* MbcTA Bactericidal Toxin-Antitoxin System. *Toxins* 12, 329. <https://doi.org/10.3390/toxins12050329>
- Armalyté, J., Jurénas, D., Krasauskas, R., Čepauskas, A., Sužiedėlienė, E., 2018. The higBA Toxin-Antitoxin Module From the Opportunistic Pathogen *Acinetobacter baumannii* - Regulation, Activity, and Evolution. *Front. Microbiol.* 9, 732. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00732>
- 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.* 17, 441–448. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0196-3>
- Belitsky, M., Avshalom, H., Erental, A., Yelin, I., Kumar, S., London, N., Sperber, M., Schueler-Furman, O., Engelberg-Kulka, H., 2011. The *Escherichia coli* extracellular death factor EDF induces the endoribonucleolytic activities of the toxins MazF and ChpBK. *Mol. Cell* 41, 625–635. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.02.023>
- Berne, C., Zappa, S., Brun, Y.V., 2023. eDNA-stimulated cell dispersion from *Caulobacter crescentus* biofilms upon oxygen limitation is dependent on a toxin-antitoxin system. *eLife* 12, e80808. <https://doi.org/10.7554/eLife.80808>
- Bigger, Joseph W., 1944. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. *The Lancet*, Originally published as Volume 2, Issue 6320 244, 497–500. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)74210-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)74210-3)
- Bogati, B., Wadsworth, N., Barrera, F., Fozo, E.M., 2021. Improved growth of *Escherichia coli* in aminoglycoside antibiotics by the zor-orz toxin-antitoxin system. *J. Bacteriol.* 204, JB0040721. <https://doi.org/10.1128/JB.00407-21>
- Bonabal, S., Darfeuille, F., 2023. Preventing toxicity in toxin-antitoxin systems: An overview of regulatory mechanisms. *Biochimie* S0300-9084(23)00174–8. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2023.07.013>
- Budde, P.P., Davis, B.M., Yuan, J., Waldor, M.K., 2007. Characterization of a higBA toxin-antitoxin locus in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 189, 491–500. <https://doi.org/10.1128/JB.00909-06>
- Buts, L., Lah, J., Dao-Thi, M.-H., Wyns, L., Loris, R., 2005. Toxin-antitoxin modules as bacterial metabolic stress managers. *Trends Biochem. Sci.* 30, 672–679. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.10.004>
- Camilo, V., Sugiyama, T., Touati, E., 2017. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 22 Suppl 1. <https://doi.org/10.1111/hel.12405>
- Cárdenas-Mondragón, M.G., Ares, M.A., Panunzi, L.G., Pacheco, S., Camorlinga-Ponce, M., Girón, J.A., Torres, J., De la Cruz, M.A., 2016. Transcriptional Profiling of Type II Toxin–Antitoxin Genes of *Helicobacter pylori* under Different Environmental Conditions: Identification of HP0967–HP0968 System. *Front. Microbiol.* 7, 1872. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01872>

- Cayron, J., Oms, T., Schlechtweg, T., Zedek, S., Van Melderen, L., 2024. TisB protein is the single molecular determinant underlying multiple downstream effects of ofloxacin in *Escherichia coli*. *Sci. Adv.* 10, eadk1577. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adk1577>
- Chauhan, U., Barth, V.C., Woychik, N.A., 2022. tRNA fMet Inactivating *Mycobacterium tuberculosis* VapBC Toxin-Antitoxin Systems as Therapeutic Targets. *Antimicrob. Agents Chemother.* 66, e01896-21. <https://doi.org/10.1128/aac.01896-21>
- Choi, J.S., Kim, W., Suk, S., Park, H., Bak, G., Yoon, J., Lee, Y., 2018. The small RNA, SdsR, acts as a novel type of toxin in *Escherichia coli*. *RNA Biol.* 15, 1319–1335. <https://doi.org/10.1080/15476286.2018.1532252>
- de Souza-Neto, R.R., Carvalho, I.G.B., Martins, P.M.M., Picchi, S.C., Tomaz, J.P., Caserta, R., Takita, M.A., de Souza, A.A., 2022. MqsR toxin as a biotechnological tool for plant pathogen bacterial control. *Sci. Rep.* 12, 2794. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06690-x>
- 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. <https://doi.org/10.1128/JB.01713-08>
- Dörr, T., Vulić, M., Lewis, K., 2010. Ciprofloxacin Causes Persister Formation by Inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biol.* 8, e1000317. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000317>
- Dufour, D., Mankovskaia, A., Chan, Y., Motavaze, K., Gong, S.-G., Lévesque, C.M., 2018. A tripartite toxin-antitoxin module induced by quorum sensing is associated with the persistence phenotype in *Streptococcus mutans*. *Mol. Oral Microbiol.* 33, 420–429. <https://doi.org/10.1111/omi.12245>
- Dy, R.L., Przybilski, R., Semeijn, K., Salmond, G.P.C., Fineran, P.C., 2014. A widespread bacteriophage abortive infection system functions through a Type IV toxin-antitoxin mechanism. *Nucleic Acids Res.* 42, 4590–4605. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1419>
- Edelmann, D., Leinberger, F.H., Schmid, N.E., Oberpaul, M., Schäberle, T.F., Berghoff, B.A., 2021. Elevated Expression of Toxin TisB Protects Persister Cells against Ciprofloxacin but Enhances Susceptibility to Mitomycin C. *Microorganisms* 9, 943. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050943>
- Fernández De Henestrosa, A.R., Ogi, T., Aoyagi, S., Chafin, D., Hayes, J.J., Ohmori, H., Woodgate, R., 2000. Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 35, 1560–1572. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01826.x>
- Findlay Black, H., Mastromatteo, S., Sinha, S., Ehrlich, R.L., Nislow, C., Chang Mell, J., Redfield, R.J., 2020. A competence-regulated toxin-antitoxin system in *Haemophilus influenzae*. *PLoS One* 15, e0217255. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217255>
- Fraikin, N., Goormaghtigh, F., Van Melderen, L., 2020. Type II Toxin-Antitoxin Systems: Evolution and Revolutions. *J. Bacteriol.* 202. <https://doi.org/10.1128/JB.00763-19>
- Freire, D.M., Gutierrez, C., Garza-Garcia, A., Grabowska, A.D., Sala, A.J., Ariyachaokun, K., Panikova, T., Beckham, K.S.H., Colom, A., Pogenberg, V., Cianci, M., Tuukkanen, A., Boudehen, Y.-M., Peixoto, A., Botella, L., Svergun, D.I., Schnappinger, D., Schneider, T.R., Genevoux, P., de Carvalho, L.P.S., Wilmanns, M., Parret, A.H.A., Neyrolles, O., 2019. An NAD<sup>+</sup> Phosphorylase Toxin Triggers *Mycobacterium tuberculosis* Cell Death. *Mol. Cell* 73, 1282-1291.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.01.028>
- Gao, J., Stewart, G.C., 2004. Regulatory elements of the *Staphylococcus aureus* protein A (Spa) promoter. *J. Bacteriol.* 186, 3738–3748. <https://doi.org/10.1128/JB.186.12.3738-3748.2004>
- Garvey, P., Fitzgerald, G.F., Hill, C., 1995. Cloning and DNA sequence analysis of two abortive infection phage resistance determinants from the lactococcal plasmid pNP40. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 4321–4328. <https://doi.org/10.1128/aem.61.12.4321-4328.1995>
- Gerdes, K., Rasmussen, P.B., Molin, S., 1986. Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 3116–3120. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.10.3116>
- Germain-Amiot, N., Augagneur, Y., Camberlein, E., Nicolas, I., Lecreur, 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. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1257>

- Grabe, G.J., Giorgio, R.T., Wieczór, M., Gollan, B., Sargen, M., Orozco, M., Hare, S.A., Helaine, S., 2024. Molecular stripping underpins derepression of a toxin-antitoxin system. *Nat. Struct. Mol. Biol.* <https://doi.org/10.1038/s41594-024-01253-2>
- Guan, J., Chen, Y., Goh, Y.-X., Wang, M., Tai, C., Deng, Z., Song, J., Ou, H.-Y., 2023. TADB 3.0: an updated database of bacterial toxin-antitoxin loci and associated mobile genetic elements. *Nucleic Acids Res.* gkad962. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad962>
- Guegler, C.K., Laub, M.T., 2021. Shutoff of host transcription triggers a toxin-antitoxin system to cleave phage RNA and abort infection. *Mol. Cell* 81, 2361-2373.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.03.027>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.01.003>
- Hazan, R., Sat, B., Engelberg-Kulka, H., 2004. *Escherichia coli* mazEF-mediated cell death is triggered by various stressful conditions. *J. Bacteriol.* 186, 3663–3669. <https://doi.org/10.1128/JB.186.11.3663-3669.2004>
- 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. <https://doi.org/10.1126/science.1244705>
- Hernández-Ramírez, K.C., Chávez-Jacobo, V.M., Valle-Maldonado, M.I., Patiño-Medina, J.A., Díaz-Pérez, S.P., Jácome-Galarza, I.E., Ortiz-Alvarado, R., Meza-Carmen, V., Ramírez-Díaz, M.I., 2017. Plasmid pUM505 encodes a Toxin-Antitoxin system conferring plasmid stability and increased *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Microb. Pathog.* 112, 259–268. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.09.060>
- Hernández-Ramírez, K.C., Valerio-Arellano, B., Valle-Maldonado, M.I., Ruíz-Herrera, L.F., Meza-Carmen, V., Ramírez-Díaz, M.I., 2020. Virulence Conferred by PumA Toxin from the Plasmid-Encoded PumAB Toxin-Antitoxin System is Regulated by Quorum System. *Curr. Microbiol.* 77, 2535–2543. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02083-3>
- Hsueh, B.Y., Ferrell, M.J., Sanath-Kumar, R., Bedore, A.M., Waters, C.M., 2023. Replication cycle timing determines phage sensitivity to a cytidine deaminase toxin/antitoxin bacterial defense system. *PLOS Pathog.* 19, e1011195. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011195>
- Hsueh, B.Y., Severin, G.B., Elg, C.A., Waldron, E.J., Kant, A., Wessel, A.J., Dover, J.A., Rhoades, C.R., Ridenhour, B.J., Parent, K.N., Neiditch, M.B., Ravi, J., Top, E.M., Waters, C.M., 2022. Phage defence by deaminase-mediated depletion of deoxynucleotides in bacteria. *Nat. Microbiol.* 7, 1210–1220. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01162-4>
- Ibrahim, S., Al-Saryi, N., Al-Kadmy, I.M.S., Aziz, S.N., 2021. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as an emerging concern in hospitals. *Mol. Biol. Rep.* 48, 6987–6998. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06690-6>
- Irving, S.E., Choudhury, N.R., Corrigan, R.M., 2021. The stringent response and physiological roles of (pp)pGpp in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 19, 256–271. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00470-y>
- Jaskólska, M., Gerdes, K., 2015. CRP-dependent Positive Autoregulation and Proteolytic Degradation Regulate Competence Activator Sxy of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 95, 833–845. <https://doi.org/10.1111/mmi.12901>
- Jørgensen, M.G., Pandey, D.P., Jaskólska, M., Gerdes, K., 2009. HicA of *Escherichia coli* defines a novel family of translation-independent mRNA interferases in bacteria and archaea. *J. Bacteriol.* 191, 1191–1199. <https://doi.org/10.1128/JB.01013-08>
- Jurénas, D., Fraikin, N., Goormaghtigh, F., Van Melderen, L., 2022. Biology and evolution of bacterial toxin-antitoxin systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 20, 335–350. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00661-1>
- Kang, S.-M., Kim, D.-H., Jin, C., Lee, B.-J., 2018. A Systematic Overview of Type II and III Toxin-Antitoxin Systems with a Focus on Druggability. *Toxins* 10, 515. <https://doi.org/10.3390/toxins10120515>
- Karimaei, S., Kazem Aghamir, S.M., Foroushani, A.R., Pourmand, M.R., 2021. Antibiotic tolerance in biofilm persister cells of *Staphylococcus aureus* and expression of toxin-antitoxin system genes. *Microb. Pathog.* 159, 105126. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105126>

- Kashyap, S., Sharma, P., Capalash, N., 2021. Potential genes associated with survival of *Acinetobacter baumannii* under ciprofloxacin stress. *Microbes Infect.* 23, 104844. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2021.104844>
- Kędzierska, B., Hayes, F., 2016. Emerging Roles of Toxin-Antitoxin Modules in Bacterial Pathogenesis. *Mol. Basel Switz.* 21, 790. <https://doi.org/10.3390/molecules21060790>
- Kelly, A., Arrowsmith, T.J., Went, S.C., Blower, T.R., 2023. Toxin-antitoxin systems as mediators of phage defence and the implications for abortive infection. *Curr. Opin. Microbiol.* 73, 102293. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2023.102293>
- Kolodkin-Gal, I., Engelberg-Kulka, H., 2008. The extracellular death factor: physiological and genetic factors influencing its production and response in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 190, 3169–3175. <https://doi.org/10.1128/JB.01918-07>
- Kolodkin-Gal, I., Hazan, R., Gaathon, A., Carmeli, S., Engelberg-Kulka, H., 2007. A linear pentapeptide is a quorum-sensing factor required for mazEF-mediated cell death in *Escherichia coli*. *Science* 318, 652–655. <https://doi.org/10.1126/science.1147248>
- Kumar, S., Kolodkin-Gal, I., Vesper, O., Alam, N., Schueler-Furman, O., Moll, I., Engelberg-Kulka, H., 2016. *Escherichia coli* Quorum-Sensing EDF, A Peptide Generated by Novel Multiple Distinct Mechanisms and Regulated by trans-Translation. *mBio* 7, e02034-02015. <https://doi.org/10.1128/mBio.02034-15>
- Laborda, P., Hernando-Amado, S., Martínez, J.L., Sanz-García, F., 2022. Antibiotic Resistance in *Pseudomonas*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1386, 117–143. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-08491-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-031-08491-1_5)
- Le Rhun, A., Tourasse, N.J., Bonabal, S., Iost, I., Boissier, F., Darfeuille, F., 2023. Profiling the intragenic toxicity determinants of toxin-antitoxin systems: revisiting hok/Sok regulation. *Nucleic Acids Res.* 51, e4. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac940>
- Lee, J., Zhang, L., 2015. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell* 6, 26–41. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x>
- Lee, K.-Y., Lee, B.-J., 2016. Structure, Biology, and Therapeutic Application of Toxin-Antitoxin Systems in Pathogenic Bacteria. *Toxins* 8, 305. <https://doi.org/10.3390/toxins8100305>
- LeRoux, M., Culviner, P.H., Liu, Y.J., Littlehale, M.L., Laub, M.T., 2020. Stress can induce the transcription of toxin-antitoxin systems without activating toxin. *Mol. Cell* 79, 280-292.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.05.028>
- LeRoux, M., Srikant, S., Teodoro, G.I.C., Zhang, T., Littlehale, M.L., Doron, S., Badiie, M., Leung, A.K.L., Sorek, R., Laub, M.T., 2022. The DarTG toxin-antitoxin system provides phage defense by ADP-ribosylating viral DNA. *Nat. Microbiol.* 7, 1028–1040. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01153-5>
- Li, M., Gong, L., Cheng, F., Yu, H., Zhao, D., Wang, R., Wang, T., Zhang, S., Zhou, J., Shmakov, S.A., Koonin, E.V., Xiang, H., 2021. Toxin-antitoxin RNA pairs safeguard CRISPR-Cas systems. *Science* 372. <https://doi.org/10.1126/science.abe5601>
- Li, M., Guo, N., Song, G., Huang, Y., Wang, L., Zhang, Y., Wang, T., 2023. Type II Toxin–Antitoxin Systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins* 15, 164. <https://doi.org/10.3390/toxins15020164>
- Li, P., Goh, Y.-X., Ilic, B., Tai, C., Deng, Z., Chen, Z., Djordjevic, M., Ou, H.-Y., 2023. Antibiotic-induced degradation of antitoxin enhances the transcription of acetyltransferase-type toxin-antitoxin operon. *J. Antimicrob. Chemother.* 78, 1066–1075. <https://doi.org/10.1093/jac/dkad048>
- 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510439103>
- López-Igual, R., Bernal-Bayard, J., Rodríguez-Patón, A., Ghigo, J.-M., Mazel, D., 2019. Engineered toxin-intein antimicrobials can selectively target and kill antibiotic-resistant bacteria in mixed populations. *Nat. Biotechnol.* 37, 755–760. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0105-3>
- Mahmoudi, M., Sadeghifard, N., Maleki, A., Yeo, C.C., Ghafourian, S., 2022. relBE toxin-antitoxin system as a reliable anti-biofilm target in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Appl. Microbiol.* 133, 683–695. <https://doi.org/10.1111/jam.15585>

- Marimon, O., Teixeira, J.M.C., Cordeiro, T.N., Soo, V.W.C., Wood, T.L., Mayzel, M., Amata, I., García, J., Morera, A., Gay, M., Vilaseca, M., Orekhov, V.Y., Wood, T.K., Pons, M., 2016. An oxygen-sensitive toxin-antitoxin system. *Nat. Commun.* 7, 13634. <https://doi.org/10.1038/ncomms13634>
- Masachis, S., Tourasse, N.J., Chabas, S., Bouchez, O., Darfeuille, F., 2018. Chapter Four - FASTBAC-Seq: Functional Analysis of Toxin-Antitoxin Systems in Bacteria by Deep Sequencing, in: Carpousis, A.J. (Ed.), *Methods in Enzymology, High-Density Sequencing Applications in Microbial Molecular Genetics*. Academic Press, pp. 67–100. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2018.08.033>
- 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. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw777>
- Narimisa, N., Amraei, F., Kalani, B.S., Mohammadzadeh, R., Jazi, F.M., 2020. Effects of sub-inhibitory concentrations of antibiotics and oxidative stress on the expression of type II toxin-antitoxin system genes in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 21, 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.09.005>
- Ni, M., Lin, J., Gu, J., Lin, S., He, M., Guo, Y., 2022. Antitoxin CrIA of CrITA Toxin-Antitoxin System in a Clinical Isolate *Pseudomonas aeruginosa* Inhibits Lytic Phage Infection. *Front. Microbiol.* 13, 892021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.892021>
- Nicolas, I., Bordeau, V., Bondon, A., Baudy-Floc'h, M., Felden, B., 2019. Novel antibiotics effective against gram-positive and -negative multi-resistant bacteria with limited resistance. *PLoS Biol.* 17, e3000337. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000337>
- Nigam, A., Kumar, S., Engelberg-Kulka, H., 2018. Quorum Sensing Extracellular Death Peptides Enhance the Endoribonucleolytic Activities of *Mycobacterium tuberculosis* MazF Toxins. *mBio* 9, e00685-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.00685-18>
- Ogura, T., Hiraga, S., 1983. Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 4784–4788. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.15.4784>
- Oriol, C., Cengher, L., Manna, A.C., Mauro, T., Pinel-Marie, M.-L., Felden, B., Cheung, A., Rouillon, A., 2021. Expanding the *Staphylococcus aureus* SarA Regulon to Small RNAs. *mSystems* 6, e0071321. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00713-21>
- Pandey, D.P., Gerdes, K., 2005. Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res.* 33, 966–976. <https://doi.org/10.1093/nar/gki201>
- Pecota, D.C., Wood, T.K., 1996. Exclusion of T4 phage by the hok/sok killer locus from plasmid R1. *J. Bacteriol.* 178, 2044–2050.
- Pendleton, J.N., Gorman, S.P., Gilmore, B.F., 2013. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 11, 297–308. <https://doi.org/10.1586/eri.13.12>
- Perry, J.A., Jones, M.B., Peterson, S.N., Cvitkovitch, D.G., Lévesque, C.M., 2009. Peptide alarmone signalling triggers an auto-active bacteriocin necessary for genetic competence. *Mol. Microbiol.* 72, 905–917. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06693.x>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.012>
- Pinel-Marie, M.-L., Brielle, R., Riffaud, C., Germain-Amiot, N., Polacek, N., Felden, B., 2021. RNA antitoxin SprF1 binds ribosomes to attenuate translation and promote persister cell formation in *Staphylococcus aureus*. *Nat. Microbiol.* 6, 209–220. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00819-2>
- Qi, Q., Kamruzzaman, M., Iredell, J.R., 2021. The higBA-Type Toxin-Antitoxin System in IncC Plasmids Is a Mobilizable Ciprofloxacin-Inducible System. *mSphere* 6, e0042421. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00424-21>
- 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. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1256>
- Równicki, M., Lasek, R., Trylska, J., Bartosik, D., 2020. Targeting Type II Toxin-Antitoxin Systems as Antibacterial Strategies. *Toxins* 12, 568. <https://doi.org/10.3390/toxins12090568>

- Sanches, B.C.P., Rocha, C.A., Martin Bedoya, J.G., Silva, V.L. da, Silva, P.B. da S., Fusco-Almeida, A.M., Chorilli, M., Contiero, J., Crusca, E., Marchetto, R., 2021. Rhamnolipid-Based Liposomes as Promising Nano-Carriers for Enhancing the Antibacterial Activity of Peptides Derived from Bacterial Toxin-Antitoxin Systems. *Int. J. Nanomedicine* Volume 16, 925–939. <https://doi.org/10.2147/IJN.S283400>
- Saunier, M., Fortier, L.-C., Soutourina, O., 2024. RNA-based regulation in bacteria-phage interactions. *Anaerobe* 87, 102851. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2024.102851>
- 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.402693>
- Sevin, E.W., Barloy-Hubler, F., 2007. RASTA-Bacteria: a web-based tool for identifying toxin-antitoxin loci in prokaryotes. *Genome Biol.* 8, R155. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-8-r155>
- Singh, G., Yadav, M., Ghosh, C., Rathore, J.S., 2021. Bacterial toxin-antitoxin modules: classification, functions, and association with persistence. *Curr. Res. Microb. Sci.* 2, 100047. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100047>
- Singletary, L.A., Gibson, J.L., Tanner, E.J., McKenzie, G.J., Lee, P.L., Gonzalez, C., Rosenberg, S.M., 2009. An SOS-Regulated Type 2 Toxin-Antitoxin System. *J. Bacteriol.* 191, 7456–7465. <https://doi.org/10.1128/JB.00963-09>
- Sinha, S., Cameron, A.D.S., Redfield, R.J., 2009. Sxy Induces a CRP-S Regulon in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 191, 5180–5195. <https://doi.org/10.1128/JB.00476-09>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.12.016>
- Song, Y., Zhang, S., Zhao, N., Nong, C., He, Y., Bao, R., 2024. *Pseudomonas aeruginosa* two-component system CprRS regulates HigBA expression and bacterial cytotoxicity in response to LL-37 stress. *PLoS Pathog.* 20, e1011946. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011946>
- Song, Yingjie, Zhang, S., Ye, Z., Song, Yongyan, Chen, L., Tong, A., He, Y., Bao, R., 2022. The novel type II toxin-antitoxin PacTA modulates *Pseudomonas aeruginosa* iron homeostasis by obstructing the DNA-binding activity of Fur. *Nucleic Acids Res.* 50, 10586–10600. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac867>
- Sundaram, K., Vajravelu, L.K., Paul, A.J., 2023. Functional characterization of toxin-antitoxin system in *Mycobacterium tuberculosis*. *Indian J. Tuberc.* 70, 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.ijtb.2022.05.010>
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D.L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outterson, K., Patel, J., Cavaleri, M., Cox, E.M., Houchens, C.R., Grayson, M.L., Hansen, P., Singh, N., Theuretzbacher, U., Magrini, N., WHO Pathogens Priority List Working Group, 2018. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* 18, 318–327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
- 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. <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>
- Tourasse, N.J., Darfeuille, F., 2021. T1TAdb: the database of type I toxin-antitoxin systems. *RNA N. Y. N* 27, 1471–1481. <https://doi.org/10.1261/rna.078802.121>
- Tsilibaris, V., Maenhaut-Michel, G., Mine, N., Van Melderen, L., 2007. What Is the Benefit to *Escherichia coli* of Having Multiple Toxin-Antitoxin Systems in Its Genome? *J. Bacteriol.* 189, 6101–6108. <https://doi.org/10.1128/JB.00527-07>
- Turnbull, A., Bermejo-Rodríguez, C., Preston, M.A., Garrido-Barros, M., Pimentel, B., de la Cueva-Méndez, G., 2019. Targeted Cancer Cell Killing by Highly Selective miRNA-Triggered Activation of a Prokaryotic Toxin-Antitoxin System. *ACS Synth. Biol.* 8, 1730–1736. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00172>
- Turnbull, K.J., Gerdes, K., 2017. HicA toxin of *Escherichia coli* derepresses hicAB transcription to selectively produce HicB antitoxin. *Mol. Microbiol.* 104, 781–792. <https://doi.org/10.1111/mmi.13662>

- 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. Opg and Membrane Depolarization Are Part of a Microbial Bet-Hedging Strategy that Leads to Antibiotic Tolerance. *Mol. Cell* 59, 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.011>
- Vogel, J., Argaman, L., Wagner, E.G.H., Altuvia, S., 2004. The small RNA IstR inhibits synthesis of an SOS-induced toxic peptide. *Curr. Biol. CB* 14, 2271–2276. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.12.003>
- Vuotto, C., Donelli, G., 2019. Novel Treatment Strategies for Biofilm-Based Infections. *Drugs* 79, 1635–1655. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01184-z>
- Wang, R., Shu, X., Zhao, H., Xue, Q., Liu, C., Wu, A., Cheng, F., Wang, L., Zhang, Y., Feng, J., Wu, N., Li, M., 2023. Associate toxin-antitoxin with CRISPR-Cas to kill multidrug-resistant pathogens. *Nat. Commun.* 14, 2078. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37789-y>
- Wang, S., Zhao, C., Xue, B., Li, C., Zhang, X., Yang, X., Li, Y., Yang, Y., Shen, Z., Wang, J., Qiu, Z., 2022. Nanoalumina triggers the antibiotic persistence of *Escherichia coli* through quorum sensing regulators IrsF and qseB. *J. Hazard. Mater.* 436, 129198. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129198>
- Wang, Y., Wang, H., Hay, A.J., Zhong, Z., Zhu, J., Kan, B., 2015. Functional RelBE-Family Toxin-Antitoxin Pairs Affect Biofilm Maturation and Intestine Colonization in *Vibrio cholerae*. *PLoS One* 10, e0135696. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135696>
- Wang, Y., Yu, Z., Ding, P., Lu, J., Mao, L., Ngiam, L., Yuan, Z., Engelstädter, J., Schembri, M.A., Guo, J., 2023. Antidepressants can induce mutation and enhance persistence toward multiple antibiotics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 120, e2208344120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2208344120>
- Wassarman, K.M., Repoila, F., Rosenow, C., Storz, G., Gottesman, S., 2001. Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays. *Genes Dev.* 15, 1637–1651. <https://doi.org/10.1101/gad.901001>
- 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003260>
- Weiss, G., Schaible, U.E., 2015. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol. Rev.* 264, 182–203. <https://doi.org/10.1111/imr.12266>
- Wilmaerts, D., Bayoumi, M., Dewachter, L., Knapen, W., Mika, J.T., Hofkens, J., Dedeker, P., Maglia, G., Verstraeten, N., Michiels, J., 2018. The Persistence-Inducing Toxin HokB Forms Dynamic Pores That Cause ATP Leakage. *mBio* 9, e00744-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.00744-18>
- Wilmaerts, D., Dewachter, L., De Loose, P.-J., Bollen, C., Verstraeten, N., Michiels, J., 2019. HokB Monomerization and Membrane Repolarization Control Persisters Awakening. *Mol. Cell* 75, 1031-1042.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.06.015>
- Wu, L., Zhang, M., Song, Y., Deng, M., He, S., Su, L., Chen, Y., Wood, T.K., Yan, X., 2019. Deciphering the Antitoxin-Regulated Bacterial Stress Response via Single-Cell Analysis. *ACS Chem. Biol.* 14, 2859–2866. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.9b00721>
- Yadav, M., Rathore, J.S., 2022. Functional and transcriptional analysis of chromosomal encoded hipBAXn2 type II toxin-antitoxin (TA) module from *Xenorhabdus nematophila*. *Microb. Pathog.* 162, 105309. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105309>
- Yao, X., Chen, T., Shen, X., Zhao, Y., Wang, M., Rao, X., Yin, S., Wang, J., Gong, Y., Lu, S., Le, S., Tan, Y., Tang, J., Fuquan, H., Li, M., 2015. The chromosomal SezAT toxin-antitoxin system promotes the maintenance of the SsPI-1 pathogenicity island in epidemic *Streptococcus suis*. *Mol. Microbiol.* 98, 243–257. <https://doi.org/10.1111/mmi.13116>
- Zhang, Q., Zhou, Y., Li, Y., Ali, B., Zhu, Z., 2021. Functional characterization of Kid-Kis and MazF-MazE in Sf9 cells and *Mythimna separata* embryos. *Pestic. Biochem. Physiol.* 174, 104814. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104814>

#### i.iv. Fonctions biologiques et applications

Initialement découverts sur des plasmides, les deux premiers systèmes TA à avoir été décrits (*ccdA/ccdB* et *hok/sok*) sont impliqués dans le maintien de leur plasmide par un mécanisme nommé PSK pour post-segregational killing (Figure 31) (Gerdes *et al.*, 1986; Ogura & Hiraga, 1983). Dans ce processus, suite à la perte du plasmide portant le système TA, l'antitoxine instable est rapidement dégradée ce qui permet l'activation de la toxine et cause la mort de la bactérie. Récemment, un outil permettant d'étudier le mécanisme PSK à l'échelle de la cellule a été développé afin de visualiser la perte du plasmide et le devenir des bactéries suite à cette perte (Fraikin & Van Melderen, 2024). Les auteurs ont observé que les bactéries ayant perdu le plasmide portant le système de type II *ccdAB* ont des caractéristiques démontrant la présence de dommages à l'ADN au sein des cellules, comme une morphologie filamenteuse et une réponse SOS active. Finalement, l'activation de la toxine CcdB chez ces bactéries peut entraîner leur mort soit parce que la réponse SOS n'a pas permis de réparer les dommages à l'ADN ou bien parce que des prophages ont été activés et ont induit une lyse des bactéries. Plus tard, la découverte de systèmes TA chromosomiques a révélé que le rôle de ces systèmes n'est pas limité au maintien des plasmides et qu'ils peuvent aussi participer au maintien d'autres éléments génétiques mobiles comme les îlots de pathogénicité, les transposons ou les prophages. Par exemple, chez *Clostridioides difficile*, le système TA de type I localisé sur le prophage phiCD630-1 favorise la stabilité de cet élément génétique (Peltier *et al.*, 2020).

Pour les systèmes TA chromosomiques, d'autres fonctions, décrites dans la suite de cette introduction, comme la défense contre les bactériophages, le contrôle du cycle de vie du biofilm ou encore la formation de bactéries persistantes, peuvent leur être attribuées (Figure 31).

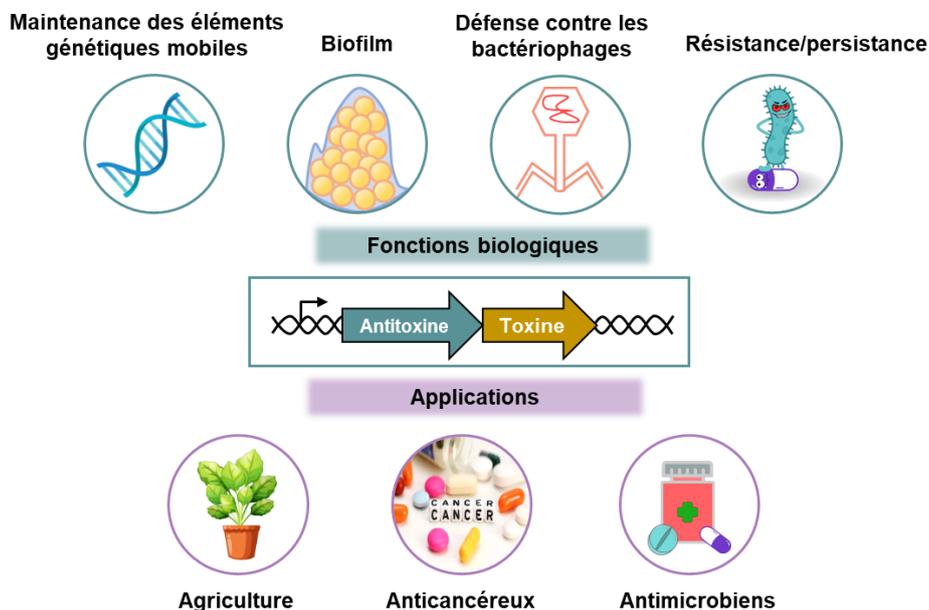
- **Rôle des systèmes TA dans l'infection par les bactériophages :**

Lorsque les bactéries sont infectées par des bactériophages, certaines peuvent se sacrifier (infection abortive) pour empêcher la réplication du phage et prévenir sa propagation au sein du reste de la population (Egido *et al.*, 2022). Le premier système TA décrit comme étant impliqué dans un mécanisme d'infection abortive est le système de type I *hok/sok* chez *E. coli* (Pecota & Wood, 1996). Le mécanisme par lequel le système chromosomique de type III ToxIN participe à la défense contre les phages est l'un des mieux documenté (Guegler & Laub, 2021). Lorsqu'il infecte *E. coli*, le phage T4 induit un arrêt de la transcription chez sa cellule hôte ce qui cause la dégradation rapide de l'antitoxine ARN ToxI et permet la libération de la toxine ToxN. Cette dernière clive les transcrits viraux ce qui bloque la production de nouveaux phages.

- **Rôle des systèmes TA dans le cycle de vie du biofilm :**

Dans la littérature, quelques études ont montré un rôle des systèmes TA dans le cycle de vie du biofilm. Par exemple, pour le système de type II MazEF chez *S. aureus*, la délétion du gène codant la toxine MazF augmente la formation de biofilm (Ma *et al.*, 2019). Chez *E. coli*, l'expression

de l'ARN codant la toxine MqsR issue du système de type II *mqsRA* est augmentée en condition de biofilm (Ren *et al.*, 2004) et sa délétion entraîne une diminution de la formation de biofilm (González Barrios *et al.*, 2006). Ces résultats ont néanmoins été remis en question puisque, dans une autre étude, l'implication de ce système dans la formation de biofilm n'a pas été confirmée (Fraikin *et al.*, 2019).



**Figure 31 : Principales fonctions biologiques et applications des systèmes toxine-antitoxine.**

- **Rôle des systèmes TA dans la formation de bactéries persistantes :**

La mise en lumière d'un lien entre les systèmes TA et la formation de bactéries persistantes remonte au début des années 80 lorsqu'une étude a montré qu'une mutation gain de fonction dans le gène *hipA* (gène codant la toxine du système de type II HipBA) favorisait la formation de persisters chez *E. coli* (Moyed & Bertrand, 1983). Chez *Salmonella*, une mutation dans le gène *shpB* (antitoxine du système de type II ShpBA) confère également un phénotype d'hyper-persistence (Slattery *et al.*, 2013). De plus, la délétion de ce système chez *Salmonella* diminue la fraction de persisters dans des modèles d'infections *in vitro* (macrophages) et *in vivo* (souris) (Helaine *et al.*, 2014). Les systèmes de type II ne sont pas les seuls pour lesquels un rôle dans la persistance a été décrit. Par exemple, les systèmes de type I TisB/IstR-1, HokB/SokB (voir partie IV.ii.) et de type V GhoST (Wang *et al.*, 2012) participent aussi à la formation de persisters. Cependant, au sein de la communauté scientifique, le lien entre les systèmes TA et la persistance est controversé (Ronneau & Helaine, 2019). En effet, bien qu'un système TA soit associé à un phénotype de persistance, sa délétion n'a souvent pas d'effet sur la fraction de persisters (Verstraeten *et al.*, 2015), notamment en raison de la redondance des systèmes TA dans les génomes. Cette redondance se révèle également problématique puisque la délétion de 10 systèmes de type II chez *E. coli* n'a pas non plus permis d'observer d'effet sur la persistance (Goormaghtigh *et al.*, 2018).

- **Applications des systèmes TA :**

Ces dernières années, les fonctions biologiques des systèmes TA ont été détournées afin de les utiliser comme outils biotechnologiques et thérapeutiques (**Figure 31**). Récemment, deux stratégies innovantes ont ainsi été proposées pour combattre les bactéries résistantes aux antibiotiques. Dans un cas, le système de type II CcdAB a été utilisé afin de spécifiquement tuer *Vibrio cholerae* au sein d'une population mixte (López-Igual *et al.*, 2019). Une autre étude prometteuse a développé la stratégie ATTACK (AssociaTes TA and CRISPR-Cas to Kill multidrug resistant pathogens), c'est-à-dire l'association du système TA CreTA avec le système CRISPR-Cas, pour tuer une souche clinique d'*Acinetobacter baumannii* (Wang, R. *et al.*, 2023). Dans cette approche, le système CRISPR-Cas a été programmé pour cliver le gène *oxa23*, conférant une résistance aux carbapénèmes, ce qui permet de resensibiliser la bactérie à ces antibiotiques. Lorsque le système CRISPR-Cas est inefficace, la toxine CreT est activée et élimine la bactérie. Par ailleurs, l'utilisation de peptides antimicrobiens dérivés de toxines issues de systèmes TA est aussi envisagée pour éliminer les bactéries résistantes. Par exemple, Pep16 et Pep19, deux peptides dérivés de la toxine de type I SprA1 de *S. aureus*, sont efficaces contre des souches MRSA dans des modèles d'infection chez la souris (Nicolas *et al.*, 2019; Solecki *et al.*, 2015). Les systèmes TA peuvent aussi permettre de développer de nouvelles thérapies anticancéreuses. Preston *et al.* ont par exemple construit un système synthétique portant le système de type II Kis/Kid (Preston *et al.*, 2016). Dans les cellules humaines cancéreuses produisant l'oncoprotéine E6, l'antitoxine est dégradée ce qui permet à la toxine Kid d'induire l'apoptose des cellules cancéreuses. Dans le domaine agricole, l'utilisation de plantes transgéniques produisant la toxine de type II MqsR permet de limiter les symptômes du chancre des agrumes, maladie causée par la bactérie *Xanthomonas citri* (de Souza-Neto *et al.*, 2022).

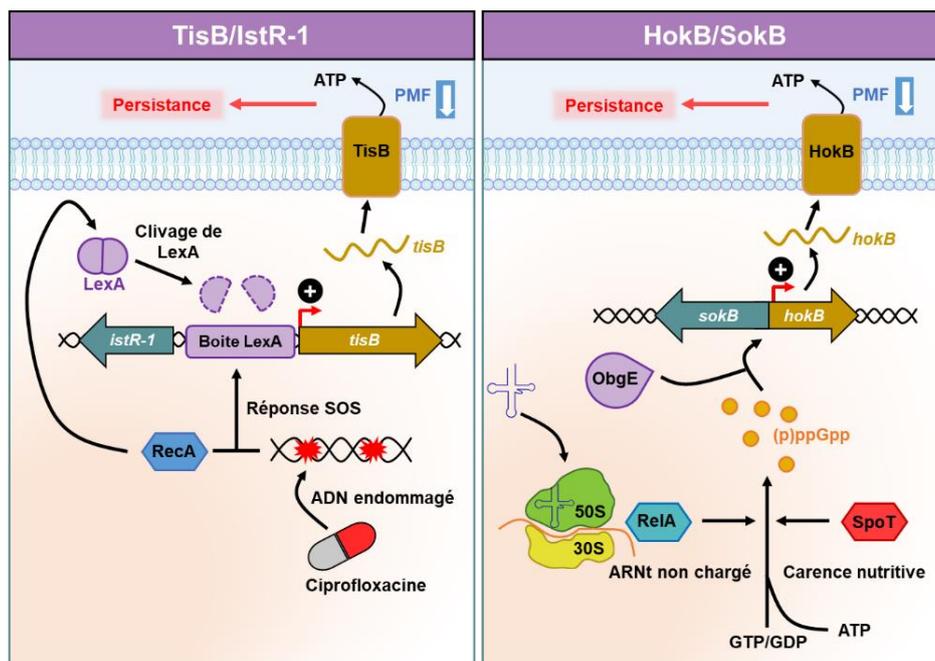
## ii. Les systèmes TA de type I et la persistance aux antibiotiques

Parmi les systèmes TA impliqués dans la formation de bactéries persistantes, TisB/IstR-1 et HokB/SokB, deux systèmes TA de type I, sont les mieux décrits :

- **Système TisB/IstR-1 :**

Chez *E. coli*, le système TisB/IstR-1 est composé de la toxine TisB et de l'antitoxine ARN IstR-1. TisB est une toxine de 29 acides aminés localisée dans la membrane bactérienne dont la surexpression induit la formation de pores membranaires, une dépolarisation membranaire et une baisse rapide de la concentration intracellulaire d'ATP ce qui conduit à la mort des bactéries (Unoson & Wagner, 2008). Tandis que le gène *istR-1* est transcrit à partir d'un promoteur  $\sigma^{70}$  constitutif, le promoteur du gène *tisB* contient une boîte LexA et sa transcription est donc dépendante de la réponse SOS (Vogel *et al.*, 2004). En condition normale de croissance, la transcription de *tisB* est réprimée par LexA. Aussi, pour bloquer la traduction de TisB en cas de fuite transcriptionnelle, l'antitoxine IstR-1 forme un complexe avec cet ARNm afin d'induire sa dégradation par la RNase III

(Darfeuille *et al.*, 2007). Plus tard, une étude a montré que lors d'un traitement à la ciprofloxacine, la délétion de *tisB* réduit la fraction de persisters tandis que la délétion de *istR-1* augmente le nombre de persisters (Dörr *et al.*, 2010). Ces résultats suggèrent que TisB est impliqué dans la formation de persisters et un modèle de ce mécanisme est présenté sur la **Figure 32**. Brièvement, lors d'un traitement avec un antibiotique causant des dommages à l'ADN (e.g. ciprofloxacine), ces dommages sont reconnus par RecA ce qui entraîne le clivage de LexA et donc l'expression de *tisB* (Dörr *et al.*, 2010). Une fois produit, TisB forme des pores dans la membrane ce qui induit une baisse de la force proton-motrice et une diminution de la quantité intracellulaire d'ATP. En conséquence, TisB permet un ralentissement du métabolisme et la formation de bactéries persistantes.



**Figure 32 : Rôle des systèmes TA de type I TisB/IstR-1 et HokB/SokB dans la persistance aux antibiotiques.** PMF : Force proton-motrice.

- **Système HokB/SokB :**

A l'image de la toxine TisB, la production de la toxine HokB, à partir du locus *hokB/sokB*, participe également à la formation de bactéries persistantes aux antibiotiques chez *E. coli* (**Figure 32**) (Verstraeten *et al.*, 2015). Bien que la délétion de *hokB* n'ait pas d'effet sur la formation de persisters, sa surexpression augmente le nombre de persisters après traitement à l'ofloxacine ou à la tobramycine. Des analyses complémentaires ont permis de montrer que le phénotype de persistance causé par HokB est médié par la fixation de l'alarmone (p)ppGpp, synthétisée par les enzymes RelA et/ou SpoT, sur la GTPase ObgE (Verstraeten *et al.*, 2019). Cette association active la transcription de *hokB* et donc la production de HokB. Cette toxine membranaire de 49 acides aminés induit la formation de pores, une dépolarisation membranaire ainsi qu'un efflux d'ATP, mécanismes favorisant la persistance aux antibiotiques (Wilmaerts *et al.*, 2018). La dimérisation des peptides HokB, via la création d'un pont disulfure entre les cystéines 46 de chaque monomère, est essentielle à la formation de pores membranaires et donc à la genèse de persisters (Wilmaerts *et*

*al.*, 2019). Au contraire, la réduction de ces ponts disulfures par l'oxydoréductase DsbC entraîne la monomérisation puis la dégradation des peptides HokB par la protéase DegQ. La disparition de ces pores est à l'origine d'une repolarisation membranaire et d'une production d'ATP ce qui permet aux bactéries persistantes de reprendre leur croissance.

### iii. Les systèmes TA de type I chez *S. aureus*

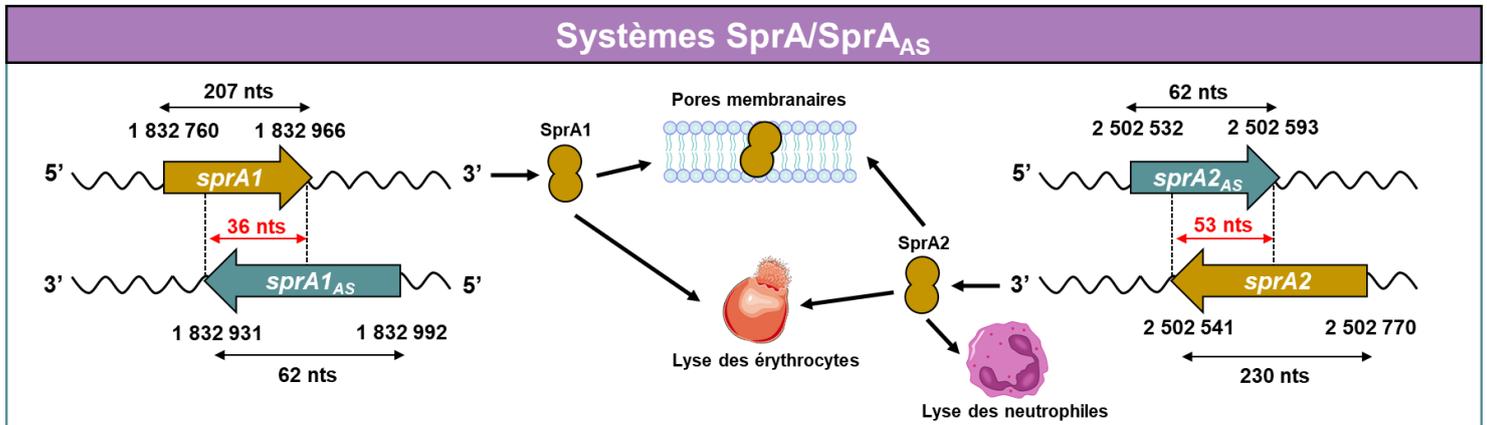
Comme chez la plupart des bactéries, le génome de *S. aureus* contient de nombreux gènes codant des systèmes TA qui ont pu être détectés notamment grâce à des analyses bio-informatiques (Fozo *et al.*, 2010; Habib *et al.*, 2018). Certains de ces systèmes ont été caractérisés expérimentalement comme par exemple les systèmes TA de type I SprA/SprA<sub>AS</sub> (Germain-Amiot *et al.*, 2019; Sayed *et al.*, 2011) et SprG/SprF (Pinel-Marie *et al.*, 2014; Riffaud *et al.*, 2019) et les systèmes de type II MazEF (Ma *et al.*, 2019), YefM-YoeB et Omega/Epsilon/Zeta (Schuster & Bertram, 2016). Les deux systèmes TA de type I précédemment évoqués ont fait l'objet de plusieurs publications au sein du laboratoire INSERM U1230 BRM. Le système SprG1/SprF1, en particulier, est au centre de ce travail de thèse.

#### iii.i. Systèmes SprA/SprA<sub>AS</sub>

Selon les souches de *S. aureus*, entre deux et cinq homologues des systèmes *sprA/sprA<sub>AS</sub>* sont présents dans le génome (Pichon & Felden, 2005). Chez *S. aureus* Newman, souche dans laquelle ils ont été caractérisés expérimentalement, deux homologues ont été identifiés : *sprA1/sprA1<sub>AS</sub>* localisé dans l'îlot de pathogénicité vSαβ et *sprA2/sprA2<sub>AS</sub>* situé dans le core génome (Figure 33) (Germain-Amiot *et al.*, 2019; Sayed *et al.*, 2011). Les gènes *sprA1* et *sprA2* codent, respectivement, pour les toxines SprA1 et SprA2 qui sont des peptides membranaires hydrophobes structurés en hélice α (Sayed *et al.*, 2012; Fermon *et al.*, en préparation).

Lorsqu'ils sont surexprimés, ces peptides inhibent la croissance de *S. aureus* (Germain-Amiot *et al.*, 2019; Sayed *et al.*, 2012) en formant des pores membranaires ce qui entraîne une dépolarisation membranaire et une fuite d'ATP (Fermon *et al.*, en préparation). L'utilisation de peptides SprA1 et SprA2 synthétiques a montré que ces toxines ont une activité hémolytique sur les érythrocytes humains et que SprA2 peut aussi lyser les neutrophiles (Figure 33) (Germain-Amiot *et al.*, 2019; Sayed *et al.*, 2011). Les gènes *sprA1<sub>AS</sub>* et *sprA2<sub>AS</sub>* sont codés en antisens par rapport aux gènes codant leur toxine respective avec une région chevauchante au niveau de leur extrémité 3'. Néanmoins, c'est l'extrémité 5' des antitoxines qui se lie de façon imparfaite à l'extrémité 5' des ARNm codant les toxines de ces systèmes. L'interaction entre l'antitoxine et l'ARNm codant sa toxine se fait au niveau du RBS ce qui permet de bloquer la traduction des toxines. Les antitoxines SprA<sub>AS</sub> sont donc codées en *cis*-antisens mais agissent en *trans*. L'étude approfondie des systèmes SprA1/SprA1<sub>AS</sub> et SprA2/SprA2<sub>AS</sub> a permis de mettre en évidence certaines conditions environnementales qui modulent l'expression des ARN et/ou peptides de ces systèmes. Par exemple, le niveau de l'ARN SprA1<sub>AS</sub> est diminué suite à un stress acide (pH 4,5) ou oxydant tandis

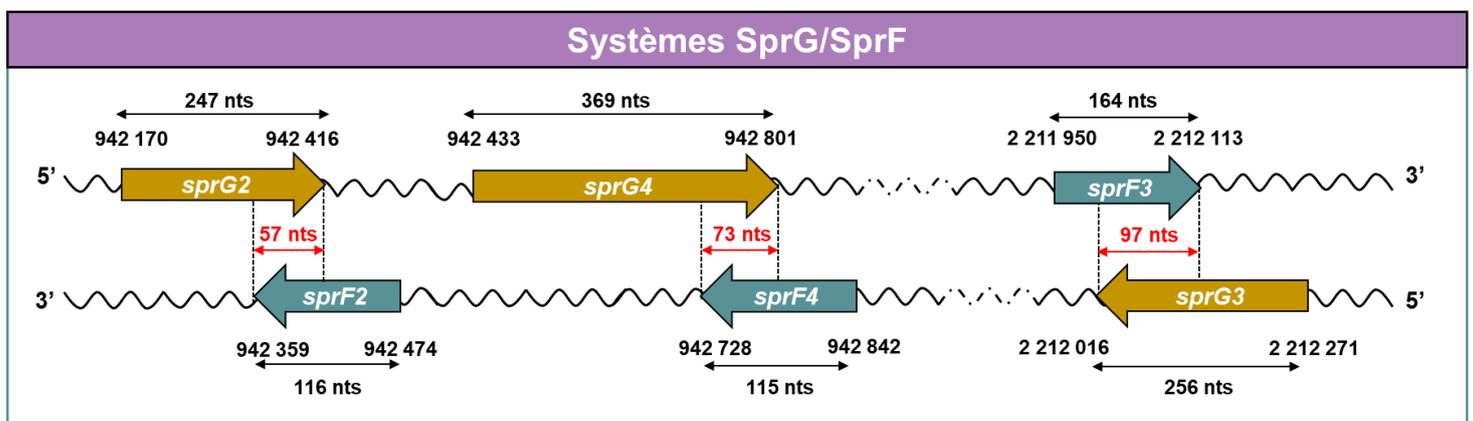
que la production du peptide SprA1 est augmentée dans ces conditions (Sayed *et al.*, 2012). Du côté de SprA2/SprA2<sub>AS</sub>, un stress osmotique ou un milieu carencé provoque une baisse du niveau de SprA2<sub>AS</sub> (Germain-Amiot *et al.*, 2019). Cependant, le lien entre ces stress et la fonction biologique de ces systèmes n'est pas encore élucidé.



**Figure 33 :** Localisation génomique des systèmes TA de type I *sprA1/sprA1<sub>AS</sub>* et *sprA2/sprA2<sub>AS</sub>* dans la souche NCTC8325 de *Staphylococcus aureus* et cibles des toxines SprA1 et SprA2.

### iii.ii. Systèmes SprG/SprF

Les systèmes SprG/SprF sont présents en quatre exemplaires (*sprG1/sprF1*, *sprG2/sprF2*, *sprG3/sprF3* et *sprG4/sprF4*) au sein du génome de plusieurs souches de *S. aureus* comme dans les souches N315, HG003 et Newman (Pinel-Marie *et al.*, 2014). Tandis que *sprG2/sprF2*, *sprG3/sprF3* et *sprG4/sprF4* sont localisés dans le core génome (Figure 34), les gènes codant le système SprG1/SprF1 sont situés dans un îlot de pathogénicité (au niveau du prophage Φ13 chez HG003). Ainsi, certaines souches de *S. aureus* (e.g. souche COL) ne contiennent pas ce dernier système. La surexpression d'un seul gène *sprG*, codant une toxine SprG, est suffisante pour entraîner une inhibition de la croissance de *S. aureus* (Pinel-Marie *et al.*, 2014; Riffaud *et al.*, 2019).



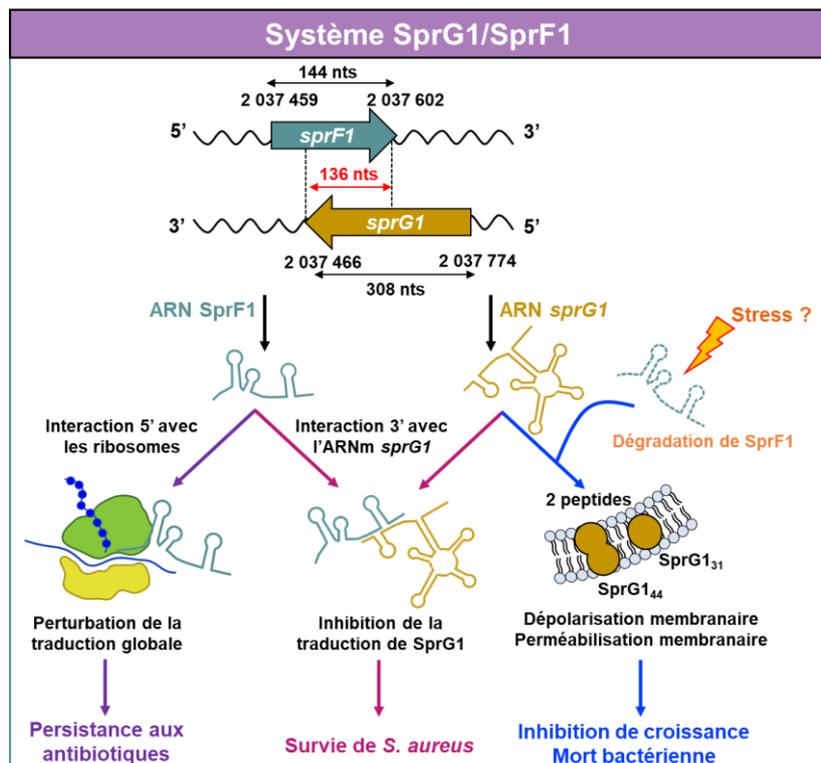
**Figure 34 :** Localisation génomique des systèmes *sprG2/sprF2*, *sprG3/sprF3* et *sprG4/sprF4* dans la souche NCTC8325 de *Staphylococcus aureus*.

La toxicité de chacune de ces toxines est contrecarrée par son antitoxine SprF apparentée qui s'apparie de façon parfaite, *via* son extrémité 3', à l'ARN de la toxine afin de bloquer sa production (Pinel-Marie *et al.*, 2014; Riffaud *et al.*, 2019). De façon surprenante, l'ARN codant la toxine SprG4 n'est pas détecté en northern blot dans la souche HG003. Cette absence d'expression pourrait s'expliquer du fait de la présence de mutations au niveau de la boîte TATA du promoteur du gène *sprG4*. Par ailleurs, bien que des interactions croisées entre les systèmes SprG/SprF aient été détectées *in vitro* et *in vivo* au niveau ARN, comme par exemple entre les ARN *sprG2* et SprF4, le contrôle de la toxicité, engendrée par l'induction de l'expression des toxines SprG, est spécifique à chaque couple SprG/SprF (Riffaud *et al.*, 2019). De façon intéressante, le niveau d'expression de l'ensemble des antitoxines SprF est diminué au cours d'un stress oxydant mais seul le niveau d'expression des ARN *sprG1* et SprF1 est diminué après phagocytose de *S. aureus* par des macrophages humains (Riffaud *et al.*, 2019), suggérant un rôle de ce système dans l'adaptation au stress oxydant auquel est exposé *S. aureus* après son internalisation dans les cellules de l'hôte.

**SprG1/SprF1**, système le mieux caractérisé de la famille SprG/SprF, est composé de l'antitoxine ARN SprF1 et de deux toxines membranaires : SprG1<sub>31</sub> et SprG1<sub>44</sub> (pour 31 et 44 acides aminés respectivement) (Figure 35) (Pinel-Marie *et al.*, 2014). En effet, l'une des particularités de ce système est que l'ARN *sprG1* contient deux cadres ouverts de lecture ce qui permet la production de ces deux peptides. Le peptide SprG1<sub>44</sub> contient donc 13 acides aminés supplémentaires dans son domaine N-terminal par rapport au peptide SprG1<sub>31</sub>. L'étude récente du mécanisme d'action de ces peptides a permis de montrer que la mort de *S. aureus*, causée par leur surexpression, est due à une dépolarisation membranaire couplée à la formation de mésosomes (=invaginations membranaires) (Fermon *et al.*, 2023). De plus, une diminution du niveau d'ATP intracellulaire, puis une perméabilisation membranaire tardive ont également été observées. Cette perméabilisation ne semble néanmoins pas être due à la formation de pores membranaires par les peptides SprG1. Cependant, les conditions permettant l'expression naturelle de ces peptides au sein de la bactérie restent encore à être déterminées afin de mieux comprendre leur(s) fonction(s) biologique(s). Enfin, ces peptides étant sécrétés dans le milieu extracellulaire, l'effet de peptides synthétiques sur les cellules de l'hôte et sur plusieurs bactéries pathogènes a été analysé (Pinel-Marie *et al.*, 2014). Ces analyses ont montré que SprG1<sub>31</sub> et SprG1<sub>44</sub> ont une activité hémolytique contre les érythrocytes et un effet antibactérien sur des bactéries à Gram-positif comme *S. aureus* et à Gram-négatif comme *E. coli* ou *P. aeruginosa*.

En parallèle des résultats précédemment décrits, une étude menée au laboratoire, et visant à identifier des ARN régulateurs associés aux ribosomes de *S. aureus*, a permis de mettre en évidence une autre particularité du système SprG1/SprF1, à savoir la capacité de SprF1 à interagir directement avec les ribosomes (Figure 35) (Pinel-Marie *et al.*, 2021). Afin d'étudier l'effet potentiel de SprF1 sur la traduction, l'incorporation de méthionine-[<sup>35</sup>S] dans les protéines en cours de synthèse a été analysée. Ces expériences ont montré une augmentation significative de

l'incorporation de méthionine-[<sup>35</sup>S] chez la souche N315 délétée de *sprG1/sprF1* par rapport à la souche parentale, phénotype complémenté avec les souches surexprimant SprF1 ou le système TA SprG1/SprF1 entier. De plus, des analyses complémentaires ont montré que SprF1 se fixe préférentiellement aux ribosomes 70S traductionnellement actifs, sa fixation sur les deux sous-unités ribosomales 50S et 30S est également possible. Plus précisément, la liaison entre SprF1 et les ribosomes est médiée par une séquence nucléotidique riche en purines (AGAAAA) localisée dans la région 5' de l'ARN SprF1. L'ensemble de ces résultats a donc montré que la fixation de SprF1 sur les ribosomes interfère avec l'étape d'initiation de la traduction ce qui cause une réduction globale de la traduction (Pinel-Marie *et al.*, 2021).



**Figure 35 : Localisation génomique et caractéristiques du système SprG1/SprF1 de *Staphylococcus aureus*.** En conditions normales de croissance, l'antitoxine SprF1 s'apparie avec l'ARN *sprG1* afin d'inhiber la production des toxines SprG1<sub>31</sub> et SprG1<sub>44</sub> (milieu). En conditions de stress, l'antitoxine SprF1 est dégradée et/ou son expression est diminuée ce qui permet la production des toxines SprG1 et l'inhibition de la croissance de *S. aureus* (droite). SprF1 peut aussi interagir avec les ribosomes ce qui favorise la formation de bactéries persistantes aux antibiotiques (gauche).

La suite de ce travail a consisté à comprendre pourquoi *S. aureus* modulait la synthèse protéique via SprF1 (Pinel-Marie *et al.*, 2021). Les bactéries persistantes étant en partie caractérisées par une inhibition de leur traduction, le rôle de SprF1 sur l'entrée en persistance des bactéries a donc été appréhendé. L'utilisation indépendante de deux antibiotiques bactéricides, la ciprofloxacine ou la vancomycine, a montré une diminution du nombre de persisters chez la souche N315 délétée de *sprG1/sprF1* par rapport à la souche parentale. Ce phénotype a aussi été observé pour une souche exprimant l'ARN SprF1 tronqué de la séquence riche en purines et ne pouvant donc plus interagir avec les ribosomes. Finalement, l'antitoxine SprF1 entraîne une atténuation de

la traduction de *S. aureus* et favorise ainsi la formation de bactéries persistantes aux antibiotiques. La nouveauté de cette étude est à souligner puisque, ici, c'est l'antitoxine et non la toxine qui est impliquée dans la persistance. De plus, cette étude a mis en évidence la dualité de l'antitoxine SprF1 qui, grâce à son extrémité 3', neutralise la toxicité des peptides encodés par l'ARN *sprG1*, 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 35**).



---

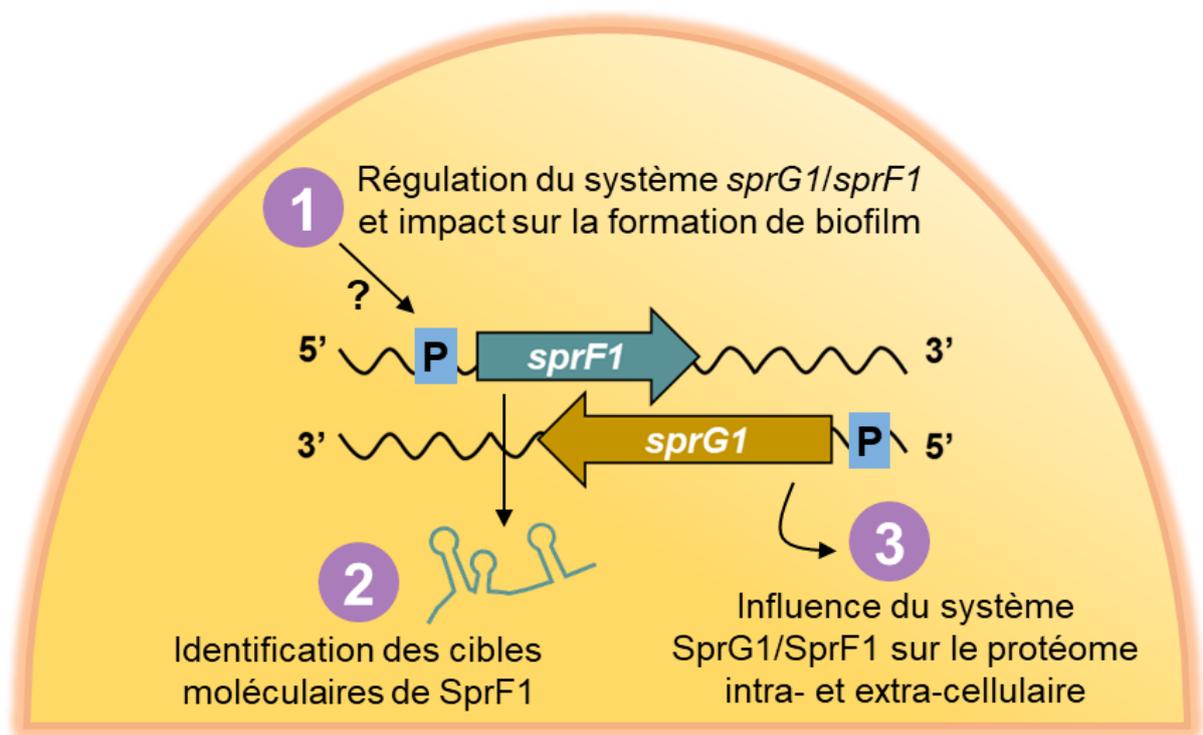
# Contexte de la thèse

---

Parfois qualifiée de pandémie silencieuse, la capacité des bactéries à survivre aux traitements antibiotiques représente l'une des plus grandes menaces pour la santé publique. Bien que la résistance soit un phénomène bien connu, beaucoup reste à découvrir concernant la persistance/tolérance. Parmi les bactéries pathogènes les plus préoccupantes, *S. aureus*, en raison de l'émergence de souches multi-résistantes aux antibiotiques, est classé en priorité élevée pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques par l'Organisation Mondiale de la Santé. De plus, la capacité de *S. aureus* à produire des biofilms, à survivre dans les cellules de l'hôte et à former des bactéries au métabolisme ralenti, contribue à l'échec des antibiothérapies. Comprendre les mécanismes à l'origine de la formation des persisters pourrait donc permettre de mieux lutter contre les infections chroniques à *S. aureus*. Récemment, au sein du laboratoire d'accueil, une étude a montré que le système TA de type I SprG1/SprF1, plus précisément l'antitoxine SprF1, participe à la formation de persisters (Pinel-Marie *et al.*, 2021). Les systèmes TA sont constitués de deux gènes, l'un codant une toxine stable pouvant inhiber la croissance ou causer la mort des bactéries en condition de surexpression et l'autre codant une antitoxine labile qui neutralise l'action de la toxine. Identifié en 2005 par des analyses bio-informatiques et transcriptomiques (Pichon & Felden, 2005), le système SprG1/SprF1 est composé des toxines SprG1<sub>31</sub> et SprG1<sub>44</sub>, dont la surexpression induit la mort de *S. aureus*, et de l'antitoxine ARN SprF1 qui s'apparie à l'ARNm *sprG1* pour inhiber sa traduction (Pinel-Marie *et al.*, 2014; Riffaud *et al.*, 2019). Pendant longtemps, les antitoxines étaient seulement considérées comme impliquées dans l'inhibition de l'action de leur toxine. Pourtant, quelques études ont montré que l'antitoxine peut avoir d'autres rôles. Par exemple, l'antitoxine protéique de type II HigA module la virulence de *P. aeruginosa* en se fixant sur le promoteur des régulateurs transcriptionnels ExsA et AmrZ pour réprimer leur expression (Song *et al.*, 2021). Chez *S. aureus*, l'antitoxine SavR du système TA de type II SavRS, peut se lier seule ou en complexe avec la toxine SavS sur le promoteur des gènes de virulence *hla* (codant l' $\alpha$ -hémolysine) et *efb* (codant la protéine extracellulaire liant le fibrinogène) pour réprimer leur transcription (Wen *et al.*, 2018). Dans un modèle d'abcès sous-cutané chez la souris, la délétion du locus *savRS* entraîne donc une augmentation de la virulence. Toujours chez *S. aureus*, SprF1 est une antitoxine bifonctionnelle qui, par son extrémité 3', se lie avec l'ARNm *sprG1* afin d'inhiber la traduction des toxines SprG1<sub>31</sub> et SprG1<sub>44</sub> et, *via* son extrémité 5', interagit avec les ribosomes ce qui entraîne une réduction de la traduction et favorise la formation de bactéries persistantes.

Malgré plusieurs années de recherches, les signaux régulant l'expression du locus *sprG1/sprF1* ainsi que la (les) fonction(s) biologique(s) de ce système restent encore mal compris. C'est pourquoi, mes travaux de thèse se sont articulés en trois parties afin : (1) d'étudier l'impact des conditions environnementales, auxquelles est exposé *S. aureus* au cours de l'infection de l'hôte, sur l'expression du système SprG1/SprF1 et d'étudier le rôle de ce système dans la formation de biofilms par *S. aureus*, (2) d'identifier les cibles moléculaires de SprF1 afin de mieux comprendre son rôle dans la formation de bactéries persistantes et (3) d'analyser l'influence du système SprG1/SprF1 sur le protéome de *S. aureus* (Figure 36). Ainsi, la première partie de ce travail a

consisté à étudier l'impact de différents stress environnementaux (stress osmotique, carence nutritive, réponse stringente...) sur le niveau d'expression des ARN *sprG1* et *SprF1*. Aussi, le potentiel rôle du système *SprG1/SprF1* sur la formation de biofilm a été analysé. Dans un second temps, j'ai utilisé la technique MAPS afin d'identifier puis valider les cibles ARNm de l'antitoxine *SprF1*. Enfin, en collaboration avec le laboratoire du Dr. Benedykt WLADYKA en Pologne, je me suis intéressée à l'effet du système *SprG1/SprF1* sur le protéome intra- et extra-cellulaire de *S. aureus*.



**Figure 36 :** Représentation des trois objectifs de ce travail de thèse.





---

# Résultats

---

# I. Partie 1 : Etude de la régulation de l'expression du système SprG1/SprF1 et de son implication dans la formation de biofilms

## i. Régulation de l'expression du locus *sprG1/sprF1*

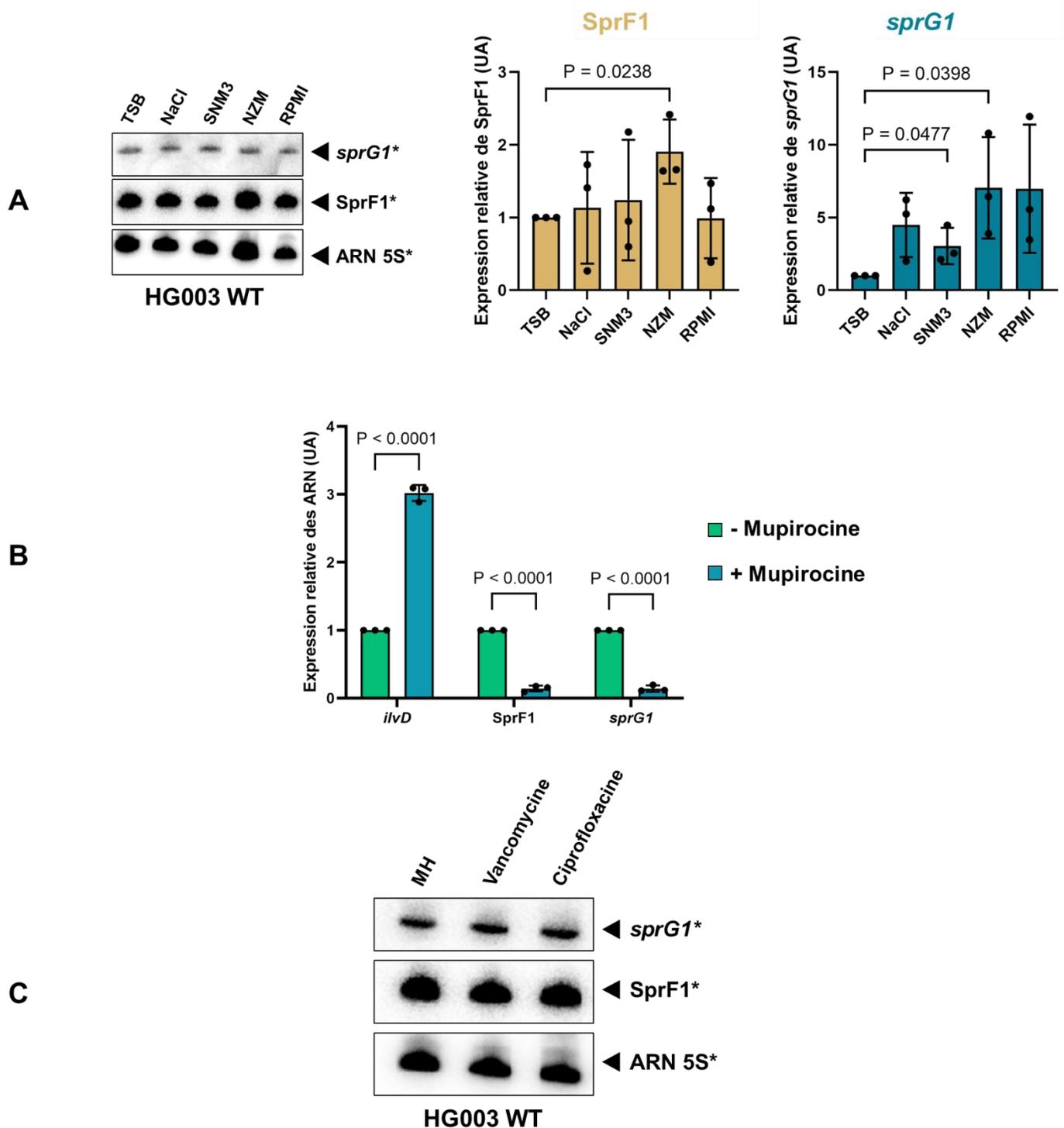
Les systèmes TA sont décrits comme des modules de réponse aux stress permettant aux bactéries de s'adapter aux modifications rencontrées dans leur environnement (stress oxydant, choc thermique, pH, antibiotiques, carence nutritive...) (Buts *et al.*, 2005). L'influence de ces stress sur la régulation de l'expression des systèmes TA a, par exemple, été observée pour le système TA de type I *bsrG/SR4* chez *Bacillus subtilis* (Jahn *et al.*, 2012). Les auteurs ont démontré qu'un choc thermique à 48°C entraîne une diminution de la stabilité de l'ARNm codant la toxine BsrG. Chez *S. aureus*, des recherches menées au sein du laboratoire INSERM U1230 ont montré que le niveau d'expression de l'antitoxine ARN SprA1<sub>AS</sub> est diminué lors d'un stress acide ou oxydant (Sayed *et al.*, 2012), tandis qu'un stress osmotique ou une carence nutritive entraîne une diminution du niveau d'expression de l'antitoxine ARN SprA2<sub>AS</sub> (Germain-Amiot *et al.*, 2019). Plus récemment, une étude a montré que la croissance des bactéries *E. coli* surexprimant la toxine ZorO, issue du système de type I *zorO-orzO*, est favorisée en présence de kanamycine ou de gentamicine (Bogati *et al.*, 2021). Ces résultats suggèrent que le système *zorO-orzO* participe à l'adaptation des bactéries à un stress antibiotique. Cependant, les signaux responsables de la régulation de l'expression des systèmes TA peuvent être nombreux ce qui complique la compréhension de la régulation de ces systèmes (Ostyn *et al.*, en préparation).

Dans la première partie de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'étude des signaux pouvant réguler l'expression des gènes *sprG1* et *sprF1*, gènes codant le système TA de type I SprG1/SprF1 de *S. aureus*. Pour cela, nous avons utilisé la souche HG003 de *S. aureus*, dérivée de la souche NCTC8325 et utilisée au laboratoire comme souche de référence pour l'étude des mécanismes de régulation (Herbert *et al.*, 2010). Dans ce travail, nous avons choisi d'analyser l'effet de stress rencontrés par *S. aureus* au cours de la colonisation/infection humaine sur l'expression de *sprG1* et *sprF1*. De précédentes études menées au laboratoire ayant déjà montré qu'un stress acide (pH 5,5) n'a pas d'effet sur le niveau des ARN *sprG1* et *sprF1*, les stress retenus pour cette étude ont été les suivants : stress osmotique, carence nutritive et antibiotiques (Figure 37). Pour ces expériences, une culture de nuit en milieu TSB (Tryptic Soy Broth) de la souche HG003 a été diluée à une densité optique à 600 nm (DO<sub>600nm</sub>) de 0,1 puis cultivée à 37°C avec agitation jusqu'en phase exponentielle de croissance (2h). La culture a ensuite été divisée en cinq et centrifugée 10 min à 4500 rpm afin d'éliminer le milieu de culture. Pour mimer les stress, les bactéries ont ensuite été re-suspendues dans différents milieux : **TSB** pour la condition contrôle, **TSB + NaCl 1M** pour le stress osmotique (stress pouvant être rencontré par *S. aureus* dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose (Goerke & Wolz, 2010)), milieu **SNM3** qui mime l'environnement nasal pauvre en nutriments rencontré par *S. aureus* lors de la colonisation (Krismer

*et al.*, 2014), milieu **NZM** ou **RPMI** pour la carence nutritive à laquelle *S. aureus* peut être confronté au sein du phagolysosome. Après 1h d'incubation à 37°C dans ces milieux, les culots bactériens ont été lysés afin d'obtenir les ARN totaux par extraction au phénol/chloroforme. Les ARN ont ensuite été analysés par northern blot, à l'aide de sondes radiomarquées par de l'ATP $\gamma$ <sup>32</sup>P, et par RT-qPCR (PCR quantitative après transcription inverse). Visuellement, les expériences de northern blot n'ont pas mis en évidence des variations du niveau des ARN *sprG1* et *SprF1* pour les stress testés (**Figure 37A gauche**). Néanmoins, par RT-qPCR, nous avons observé une augmentation significative du niveau de *SprF1* suite à un stress d'une heure en milieu carencé NZM (**Figure 37A droite**). Une augmentation du niveau de l'ARN *sprG1* dans deux milieux carencés (SNM3 et NZM) a également été mise en évidence. Ces résultats suggèrent que la carence nutritive est un signal influençant l'expression du système *SprG1/SprF1*. Cependant, des analyses complémentaires sont nécessaires afin de déterminer si ces augmentations sont dues à une augmentation de l'activité des promoteurs *sprG1* et *sprF1* ou à une augmentation de la stabilité des ARN.

Lors d'une carence nutritive, la réponse stringente, et par conséquent la synthèse de (p)ppGpp, peut se mettre en place pour favoriser la survie des bactéries (*Irving et al.*, 2021). Puisque la carence nutritive semble influencer l'expression du système *SprG1/SprF1*, nous nous sommes demandés si cet effet pouvait être dû à l'activation de la réponse stringente. Pour ce faire, la souche HG003 a été cultivée en milieu TSB à 37°C jusqu'en phase exponentielle de croissance (2h). La culture a ensuite été soumise à un traitement à la mupirocine à une concentration de 0.03 µg/ml pendant 15 minutes. En effet, la mupirocine est un antibiotique qui inhibe l'isoleucyl-ARNt synthétase ce qui permet d'induire la réponse stringente *via* la synthèse de (p)ppGpp (*Pathania et al.*, 2021). Le niveau d'expression des ARN a ensuite été étudié par RT-qPCR. Afin de valider l'activation de la réponse stringente par la mupirocine, nous avons, tout d'abord, analysé le niveau d'expression de l'ARN *ilvD* dont le promoteur est activé par le (p)ppGpp. Comme attendu, nous avons observé une augmentation significative du niveau de l'ARN *ilvD* après ajout de la mupirocine ce qui confirme l'activation de la réponse stringente (**Figure 37B**). Au contraire, le niveau des ARN *sprG1* et *SprF1* est fortement diminué en présence de mupirocine. Ces résultats suggèrent donc que l'augmentation du niveau des ARN *sprG1* et *SprF1* précédemment observée en milieu carencé n'est pas causée par l'activation de la réponse stringente. Ainsi, le lien entre la carence nutritive et la régulation du système *SprG1/SprF1* reste à élucider.

Enfin, l'effet d'un stress antibiotique sur la régulation du système *SprG1/SprF1*, a également été étudié. La souche HG003 a été cultivée en milieu MH (Mueller Hinton) à 37°C jusqu'en phase exponentielle de croissance (2h) puis traitée par 60 µg/ml de vancomycine (100X CMI) ou 8 µg/ml de ciprofloxacine (128X CMI) pendant 30 min. Après extraction des ARN, ces derniers ont été analysés par northern blot (**Figure 37C**). Cependant, dans les conditions testées, les traitements à la vancomycine ou à la ciprofloxacine n'ont pas eu d'effet sur le niveau des ARN *sprG1* et *SprF1*.



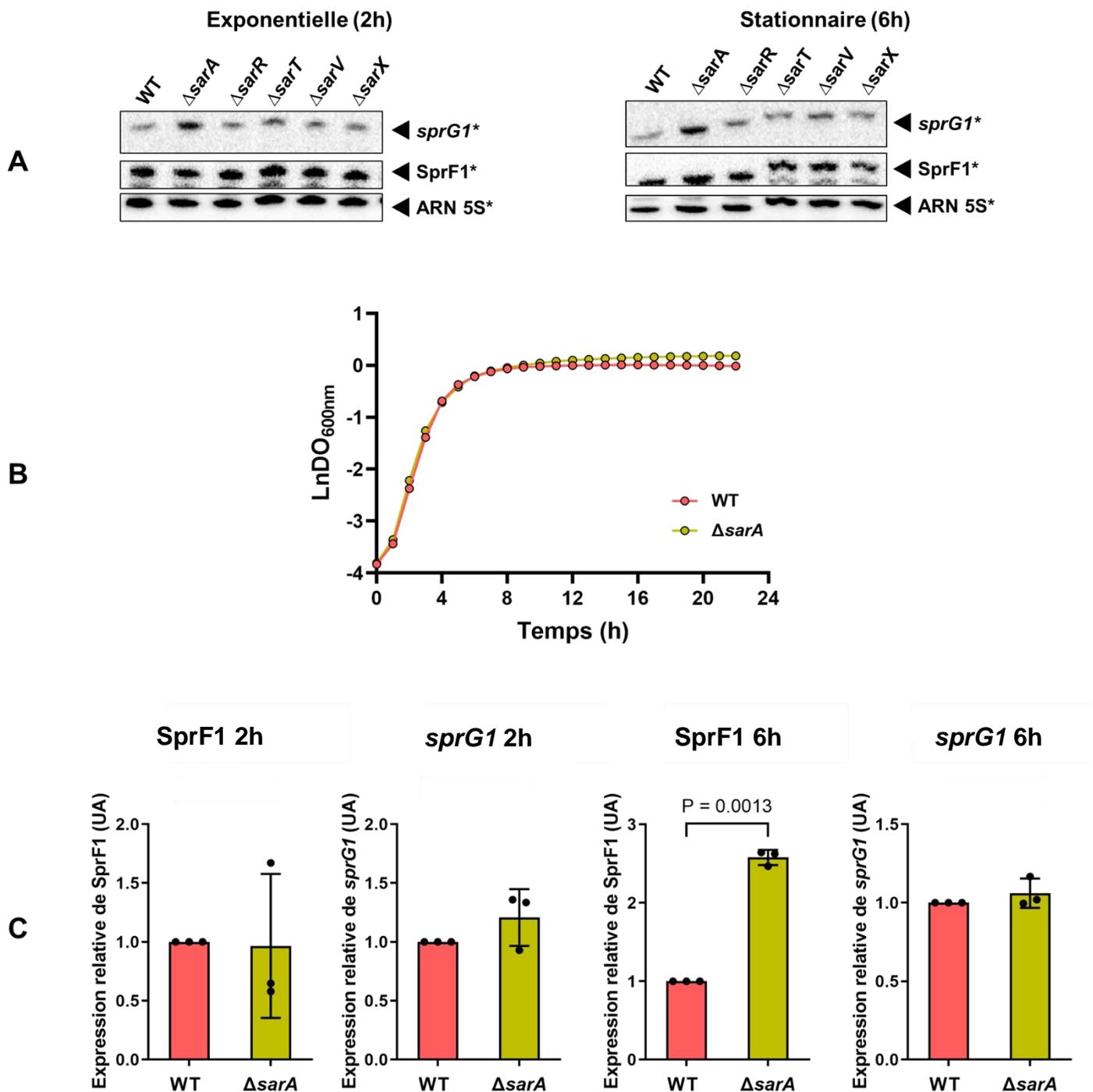
**Figure 37 : Effet de différents stress sur le niveau d'expression des ARN *sprG1* et SprF1.** (A) Visualisation par northern blot (gauche) et niveau d'expression mesuré par RT-qPCR (droite) des ARN *sprG1* et SprF1 extraits de la souche HG003 suite à un stress de 1h à 37°C en milieu TSB, TSB + NaCl 1M, SNM3, NZM ou RPMI. L'ARN 5S est utilisé comme contrôle de dépôt. Pour la RT-qPCR, les données ont été normalisées par rapport au niveau d'expression de l'ARNm *gyrB* et comparées au niveau d'expression de l'ARN mesuré dans le milieu TSB contrôle, arbitrairement fixé à 1 (n = 3). Statistiques déterminées par un test *t* de Student. UA : Unité arbitraire. (B) Niveau d'expression mesuré par RT-qPCR des ARN *ilvD*, SprF1 et *sprG1* chez la souche HG003 en phase exponentielle de croissance (2h) avec (+) ou sans (-) traitement de 15 min à la mupirocine (n = 3). Les données ont été normalisées par rapport au niveau d'expression de l'ARNm *gyrB* et comparées au niveau d'expression de l'ARN mesuré en absence de mupirocine, arbitrairement fixé à 1. Statistiques déterminées par un test ANOVA. UA : Unité arbitraire. (C) Visualisation par northern blot des ARN *sprG1* et SprF1 extraits de la souche HG003 suite à un stress de 30 min avec 60 µg/ml de vancomycine ou 8 µg/ml de ciprofloxacine. L'ARN 5S est utilisé comme contrôle de dépôt. MH : milieu Mueller Hinton contrôle sans stress antibiotique.

La régulation de l'expression des systèmes TA pouvant aussi être influencée par des facteurs de transcription ([Ostyn et al., en préparation](#)), nous avons étudié l'effet de plusieurs régulateurs transcriptionnels sur le niveau des ARN *sprG1* et *SprF1*. Chez *S. aureus*, les régulateurs transcriptionnels les mieux décrits sont ceux appartenant à la famille SarA composée de onze régulateurs ([Cheung et al., 2008](#)). De façon intéressante, une étude a montré que le régulateur SarA réprime l'expression du gène *sprG2* qui code la toxine *SprG2*, toxine appartenant au système *SprG2/SprF2*, un homologue du système *SprG1/SprF1* ([Oriol et al., 2021](#)). Ces résultats nous ont donc conduit à investiguer le rôle de 5 régulateurs de la famille SarA sur le niveau des ARN *sprG1* et *SprF1*. Pour cela, les souches HG003 WT ou délétées d'un régulateur de la famille SarA ( $\Delta sarA$ ,  $\Delta sarR$ ,  $\Delta sarT$ ,  $\Delta sarV$ ,  $\Delta sarX$ ) ont été cultivées en milieu TSB jusqu'en phase exponentielle (2h) ou stationnaire (6h) de croissance puis les ARN ont été extraits et analysés par northern blot (**Figure 38A**). De façon similaire à ce qui a été décrit pour *sprG2* ([Oriol et al., 2021](#)), une première expérience nous a permis d'observer une augmentation de la quantité de transcrit *sprG1* dans la souche  $\Delta sarA$  en phase exponentielle et stationnaire de croissance (**Figure 38A**). La délétion de *sarA* ne semble cependant pas avoir d'effet sur le niveau de l'ARN *SprF1*. De plus, en comparaison avec la souche WT, la délétion de *sarR*, *sarT*, *sarV* ou *sarX* ne modifie pas le niveau des ARN *sprG1* et *SprF1*.

Suite à ces premières observations, nous avons décidé de se focaliser sur l'étude du niveau de transcrit des ARN *sprG1* et *SprF1* dans les souches HG003 WT et  $\Delta sarA$ , souches ayant des cinétiques de croissance similaires en milieu TSB (**Figure 38B**). Pour cela, les ARN extraits en phase exponentielle (2h) et stationnaire (6h) de croissance de trois expériences indépendantes ont été analysés par RT-qPCR (**Figure 38C**). En phase exponentielle de croissance, la délétion de *sarA* n'a pas d'effet sur le niveau des ARN *sprG1* et *SprF1* et, en phase stationnaire, nous avons observé une augmentation significative du niveau de *SprF1* dans la souche  $\Delta sarA$ . De façon surprenante, tandis que les expériences de northern blot ont montré une augmentation du niveau de *sprG1* à 6h (**Figure 38A**), c'est une augmentation du niveau de *SprF1* qui a été observée à 6h par les analyses de RT-qPCR. Finalement, la divergence de ces résultats complique leur interprétation et ne permet pas de conclure quant au rôle de SarA sur le niveau des ARN *sprG1* et *SprF1*.

Afin de déterminer si l'augmentation du niveau de *SprF1* observée en phase stationnaire de croissance pour la souche  $\Delta sarA$  (**Figure 38C**) pourrait être causée par une augmentation de l'activité du promoteur de *sprF1*, nous avons construit, à l'aide du plasmide pTCV ([Poyart & Trieu-Cuot, 1997](#)), des fusions transcriptionnelles entre le promoteur de *sprF1* (-80 nucléotides en amont du +1 de transcription et +30 nucléotides en aval) ou *sprG1* (-140 nucléotides en amont du +1 de transcription et +30 nucléotides en aval) et un gène rapporteur codant la  $\beta$ -galactosidase. Les plasmides pTCV-*psprF1*, pTCV-*psprG1* ou le plasmide contrôle pTCV ont été transformés dans les souches HG003 WT ou  $\Delta sarA$  et ces transformations n'ont pas eu d'effet sur la cinétique de croissance de ces deux souches en milieu TSB (**Figure 39A**). L'activité des promoteurs *psprF1* et

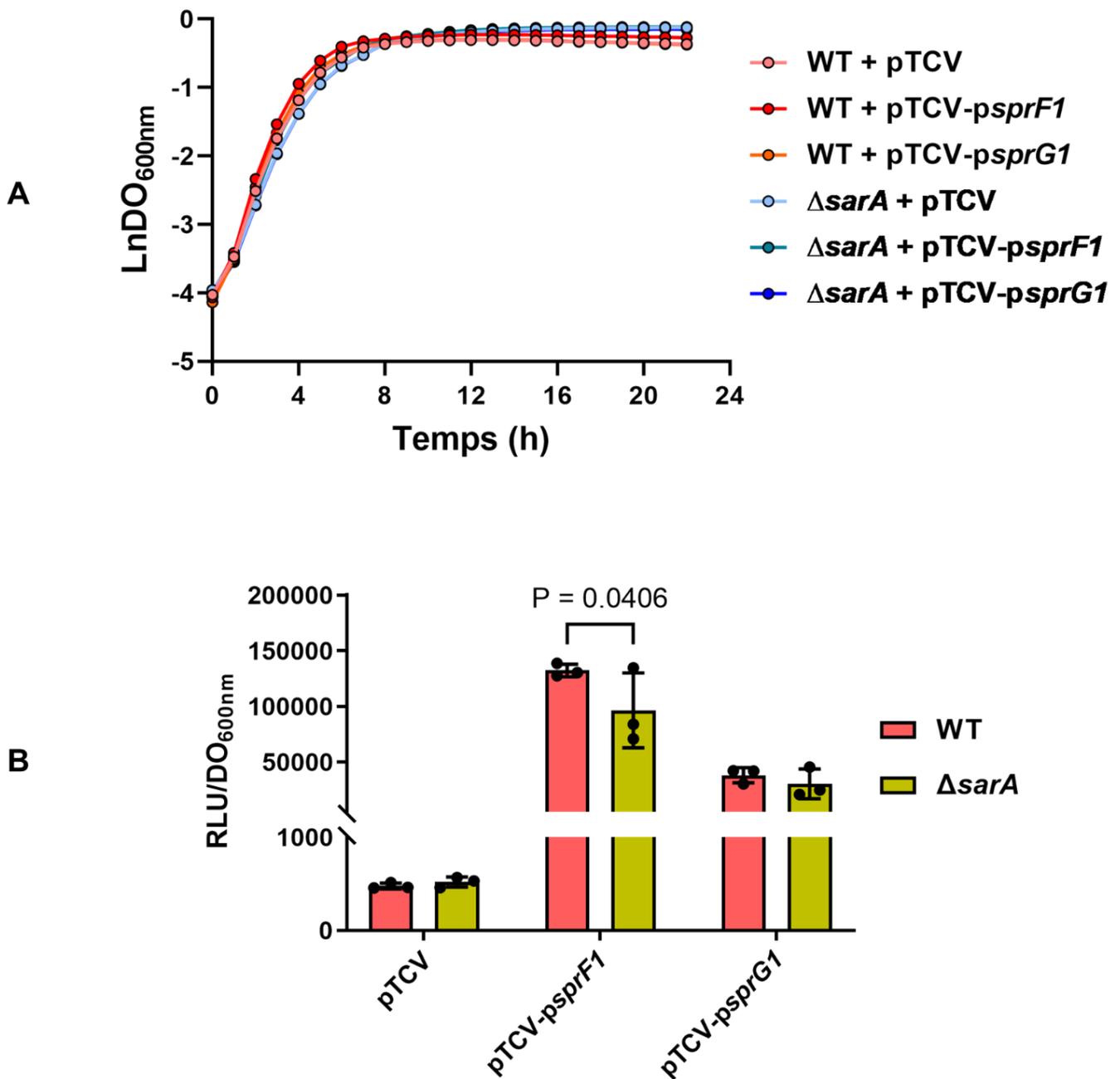
*psprG1* a ensuite été mesurée par quantification de la luminescence émise par l'activité de la  $\beta$ -galactosidase comme précédemment décrit (Lechardeur *et al.*, 2012).



**Figure 38 : Rôle de régulateurs transcriptionnels sur le niveau des ARN *sprG1* et SprF1.** (A) Visualisation par northern blot des ARN *sprG1* et SprF1 extraits, en phase exponentielle (2h) ou stationnaire (6h) de croissance, des souches HG003 WT,  $\Delta sarA$ ,  $\Delta sarR$ ,  $\Delta sarT$ ,  $\Delta sarV$  et  $\Delta sarX$  cultivées en milieu TSB. L'ARN 5S est utilisé comme contrôle de dépôt. (n = 1). (B) Cinétiques de croissance en microplaque 96 puits des souches HG003 WT et  $\Delta sarA$  cultivées en milieu TSB (n = 3). La DO<sub>600nm</sub> est mesurée toutes les heures par un lecteur de plaque (Biotek Synergy 2, Agilent). (C) Niveau d'expression mesuré par RT-qPCR des ARN *sprG1* et SprF1 en phase exponentielle (2h) ou stationnaire (6h) de croissance pour les souches HG003 WT et  $\Delta sarA$  (n = 3). Les données ont été normalisées par rapport au niveau d'expression de l'ARNm *gyrB* et comparées au niveau d'expression de l'ARN mesuré chez la souche WT, arbitrairement fixé à 1. Statistiques déterminées par un test *t* de Student avec correction de Welch. UA : Unité arbitraire.

Pour cela, les souches HG003 WT ou  $\Delta sarA$  contenant les plasmides pTCV, pTCV-*psprF1* ou pTCV-*psprG1* ont été cultivées en milieu TSB jusqu'en phase stationnaire de croissance (6h). Puis, 50  $\mu$ l de culture ont été mis en contact avec 50  $\mu$ l de réactif  $\beta$ -*glo* (Promega). Après une incubation de 10 min dans le noir, la luminescence (RLU) a été mesurée à l'aide d'un lecteur microplaque et normalisée par rapport à la  $DO_{600nm}$  (**Figure 39B**). Ces analyses ont permis de montrer que l'activité du promoteur *sprG1* est similaire dans la souche WT et  $\Delta sarA$  tandis que nous avons observé une diminution de l'activité du promoteur *sprF1* dans la souche  $\Delta sarA$ . Ce dernier résultat n'est pas en adéquation avec celui observé par RT-qPCR qui montrait une augmentation du niveau de SprF1 dans la souche  $\Delta sarA$  (**Figure 38C**).

En conclusion, l'ensemble des résultats de cette partie ont montré que la carence nutritive semble être un signal environnemental pouvant influencer la régulation de l'expression du système SprG1/SprF1. Cette régulation ne semble cependant pas liée à l'activation de la réponse stringente. De plus, au vu de l'ambiguïté de nos résultats, nous ne pouvons pas conclure quant au rôle du facteur de transcription SarA sur la régulation de l'expression des gènes *sprG1* ou *sprF1*.

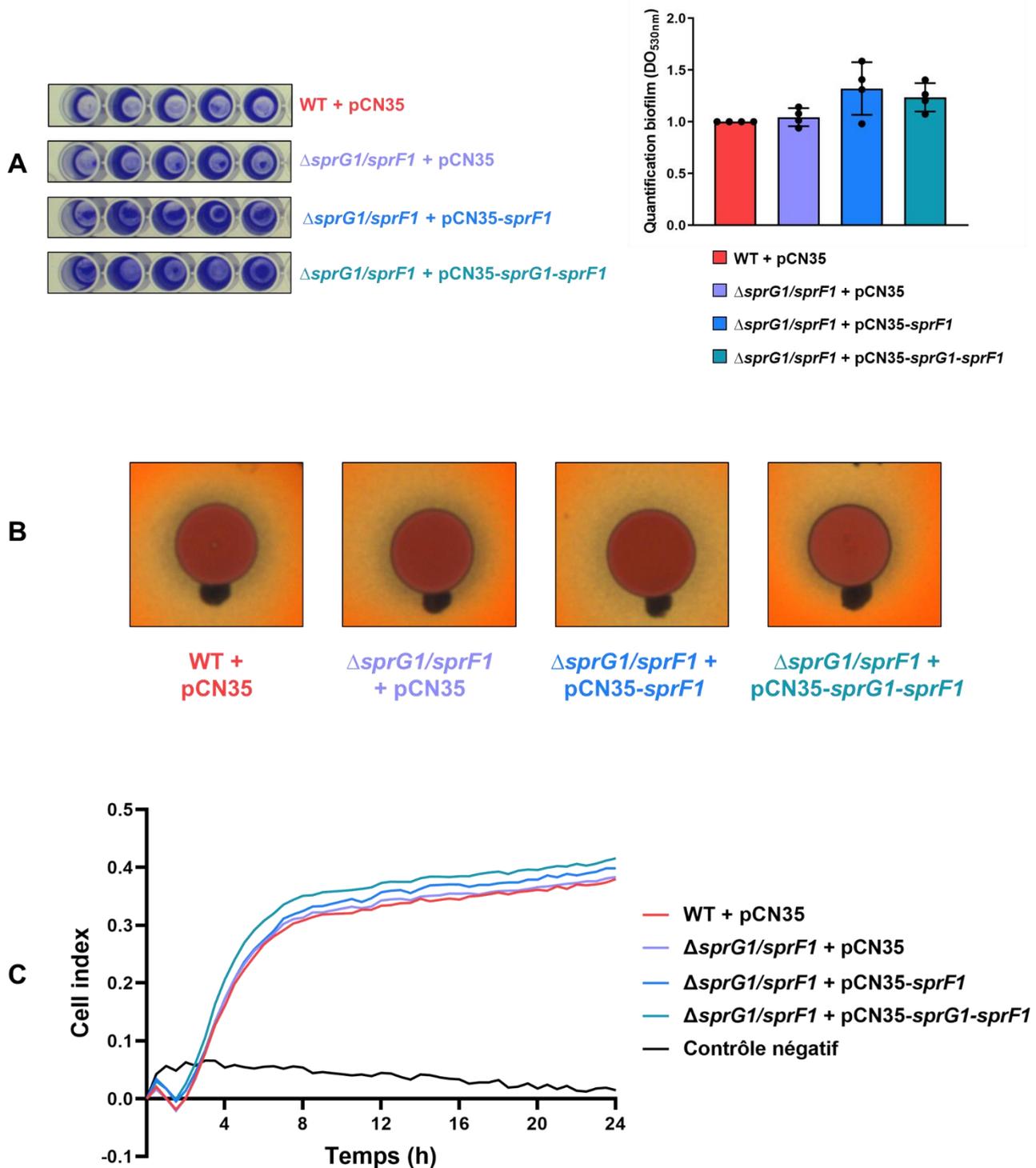


**Figure 39 : Etude de l'activité des promoteurs *psprF1* et *psprG1* à l'aide d'une fusion transcriptionnelle.** (A) Cinétiques de croissance en microplaque 96 puits des souches HG003 WT et  $\Delta sarA$  contenant les plasmides pTCV, pTCV-*psprF1* ou pTCV-*psprG1* cultivées en milieu TSB (n = 3). La DO<sub>600nm</sub> est mesurée toutes les heures par un lecteur de plaque (Biotek Synergy 2, Agilent). (B) Mesure de l'activité des promoteurs *psprF1* et *psprG1* en phase stationnaire de croissance chez les souches HG003 WT et  $\Delta sarA$  contenant les plasmides pTCV, pTCV-*psprF1* ou pTCV-*psprG1*. La luminescence (RLU) et la DO<sub>600nm</sub> ont été mesurées par un lecteur de plaque (Biotek Synergy 2, Agilent) (n = 3). Statistiques déterminées par un test ANOVA.

## ii. Rôle de SprG1/SprF1 sur la formation de biofilms

*S. aureus* est un organisme capable de former du biofilm, c'est-à-dire une communauté bactérienne enchâssée dans une matrice extracellulaire. Ce mode de vie, notamment en raison de la formation de biofilms sur le matériel médical implanté, est responsable de nombreuses infections bactériennes (Reffuveille *et al.*, 2017). En effet, la matrice extracellulaire protège les bactéries de l'action des antibiotiques et cet environnement favorise la formation de bactéries présentant un ralentissement de leur métabolisme (tolérance/persistance) (Rowe *et al.*, 2021; Stewart, 2002). La régulation du cycle de vie du biofilm est un mécanisme complexe et finement régulé faisant intervenir de nombreux acteurs, dont certains systèmes TA. Par exemple, chez *S. aureus*, la délétion de *mazF*, codant la toxine MazF du système TA de type II MazEF, entraîne une augmentation de la formation de biofilms (Ma *et al.*, 2019). Les auteurs ont montré que MazF régule la formation de biofilms par répression de l'opéron *icaADBC*. De façon intéressante, une étude a montré que le niveau de transcrit *sprG1* est augmenté en condition de biofilms (Karimaei *et al.*, 2021). De plus, il est clairement établi que le biofilm constitue un environnement propice à la formation de bactéries persistantes. Sachant, enfin, que l'antitoxine SprF1 favorise la formation des persisters (Pinel-Marie *et al.*, 2021), nous avons donc étudié le rôle du système SprG1/SprF1 sur la formation de biofilms.

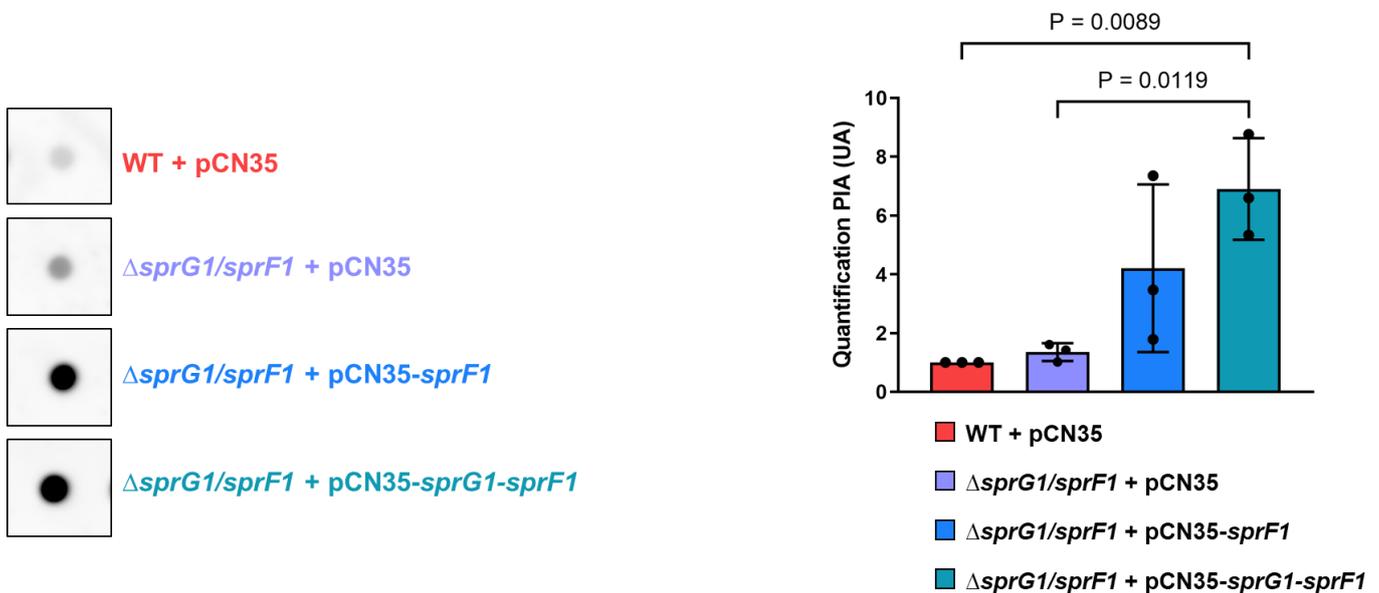
Dans un premier temps, la formation de biofilms par les souches HG003 WT + pCN35,  $\Delta sprG1/sprF1$  + pCN35 (souche délétée du locus *sprG1/sprF1*),  $\Delta sprG1/sprF1$  + pCN35-*sprF1* (souche surexprimant l'ARN SprF1) et  $\Delta sprG1/sprF1$  + pCN35-*sprG1-sprF1* (souche surexprimant le système SprG1/SprF1) a été analysée par coloration au Crystal violet (Figure 40A). Pour cela, les souches ont été cultivées en milieu TSB supplémenté par 1% de glucose, le glucose favorisant la formation de biofilms par *S. aureus* (Liu, Y. *et al.*, 2020). Après dilution des cultures à  $DO_{600nm}=0,1$  en TSB + 1% glucose, ces dernières ont été ensemencées dans une plaque 96 puits. Suite à une étape d'adhésion des bactéries au support pendant 2h à 37°C, le milieu a été éliminé, remplacé par du milieu TSB + 1% glucose frais et les biofilms ont été incubés 20 h à 37°C en condition statique. Le milieu a ensuite été éliminé et les biofilms lavés avec du PBS (Tampon phosphate salin). Les biofilms ont été séchés 40 min à 37°C puis colorés avec une solution de Crystal violet à 0,1% pendant 10 min à température ambiante. Enfin, le Crystal violet a été solubilisé par une solution d'acide acétique 30%. La formation de biofilms dans les puits a été quantifiée en mesurant la  $DO_{530nm}$ . Par ces expériences, nous n'avons pas observé de différence significative de formation de biofilms entre les souches exprimant différents niveaux du système SprG1/SprF1 (Figure 40A). Ces résultats sont similaires à ceux observés sur une gélose au rouge Congo (Figure 40B). Sur cette gélose, la production de biofilms est visible par la présence d'un halo noir autour des bactéries. Visuellement, la formation de biofilms par les souches exprimant différents niveaux de SprG1/SprF1 est semblable.



**Figure 40 : Rôle du système SprG1/SprF1 sur la formation de biofilms.** (A) Visualisation de la coloration du biofilm au Crystal violet (gauche). La formation du biofilm visualisée en Crystal violet a été quantifiée par mesure de la DO<sub>530nm</sub>. Les données ont été comparées à la formation de biofilms quantifiée pour la souche HG003 WT + pCN35, arbitrairement fixée à 1 (n = 3) (droite). (B) Visualisation de la production de biofilms sur gélose au rouge Congo. Les souches HG003 WT + pCN35,  $\Delta sprG1/sprF1$  + pCN35,  $\Delta sprG1/sprF1$  + pCN35-*sprF1* et  $\Delta sprG1/sprF1$  + pCN35-*sprG1-sprF1* ont été diluées à DO<sub>600nm</sub> = 0,2 en milieu TSB et déposées en gouttes de 5  $\mu$ l sur milieu BHI (Brain Heart Infusion) agar + 0,8 % rouge Congo. Le résultat a été observé après une incubation de 48 h à 37°C. (C) Suivi en temps réel de la formation de biofilms par mesure de l'impédance. Les souches ont été diluées à DO<sub>600nm</sub> = 0,1 en milieu TSB + 1 % glucose et ensemencées en triplicat (100  $\mu$ l) dans les puits d'une E-plate (n = 3). L'impédance a été mesurée à l'aide du système xCELLigence (ACEA Bioscience Inc., San Diego, CA). Les puits du contrôle négatif ont été ensemencés avec du milieu TSB + 1 % glucose sans bactéries.

En parallèle des analyses de coloration du biofilm, nous avons suivi la formation de biofilms en temps réel par mesure de l'impédance (Gutiérrez *et al.*, 2016). Pour ce faire, les souches HG003 WT + pCN35,  $\Delta sprG1/sprF1$  + pCN35,  $\Delta sprG1/sprF1$  + pCN35-*sprF1* et  $\Delta sprG1/sprF1$  + pCN35-*sprG1-sprF1* ont été diluées à  $DO_{600nm} = 0,1$  en milieu TSB + 1% glucose etensemencées dans une plaque 16 puits (E-plate) dont les puits sont recouverts de microélectrodes en or. L'attachement des bactéries, et donc la formation de biofilms au fond des puits, se traduit par une augmentation du signal d'impédance qui est détecté par les électrodes. Tandis que le signal d'impédance mesuré dans les puits contrôles est constant au cours du temps, le signal d'impédance augmente dans les puits contenant des bactéries, ce qui indique que du biofilm s'est formé (Figure 40C). Au cours des premières heures, la dynamique de formation de biofilms est similaire pour les différentes souches testées. Après 24h, les souches surexprimant l'antitoxine SprF1 ou le système SprG1/SprF1 ont tendance à former davantage de biofilms. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus visuellement avec la méthode de coloration au Crystal violet (Figure 40A).

L'analyse de la composition de la matrice extracellulaire du biofilm est un autre paramètre permettant d'étudier la formation du biofilm. Nous nous sommes donc demandés si le système SprG1/SprF1 pouvait influencer la composition de la matrice du biofilm. Chez *S. aureus*, l'un des composants majeurs de la matrice est le PIA produit par l'opéron *icaADBC*. La production de PIA par les souches HG003 WT + pCN35,  $\Delta sprG1/sprF1$  + pCN35,  $\Delta sprG1/sprF1$  + pCN35-*sprF1* et  $\Delta sprG1/sprF1$  + pCN35-*sprG1-sprF1* a donc été quantifiée (Figure 41). Pour quantifier le PIA présent dans la matrice du biofilm, des biofilms produits par les quatre souches bactériennes étudiées ont été obtenus en plaque 12 puits selon le protocole précédemment décrit. Après 20h d'incubation à 37°C, les biofilms ont été lavés avec du PBS et recouverts par 1 ml de PBS. Puis, une sonication de 20 min à 40kHz a permis de décrocher le biofilm des puits. Ce dernier a ensuite été récupéré par centrifugation et repris dans une solution d'EDTA 0,5 M pH 8. Après une incubation de 5 min à 100°C suivie d'une centrifugation, un traitement à la protéinase K à la concentration de 4 mg/ml a été réalisé pendant 30 min à 37°C afin de dégrader l'ensemble des protéines et de conserver les glucides, dont le PIA. Les échantillons ont ensuite été déposés en gouttes de 20  $\mu$ l sur une membrane de nitrocellulose. Après lavages, la membrane a été incubée pendant 2h à température ambiante en présence d'une solution de lectine couplée à la peroxydase et capable de se lier au PIA. La production de PIA a ensuite été révélée par chimiluminescence (Figure 41). Le résultat de ces expériences ne nous a pas permis d'observer de différence significative de la production du PIA entre les souches WT et  $\Delta sprG1/sprF1$ . En revanche, la production de PIA est augmentée de façon significative pour la souche surexprimant le système SprG1/SprF1.

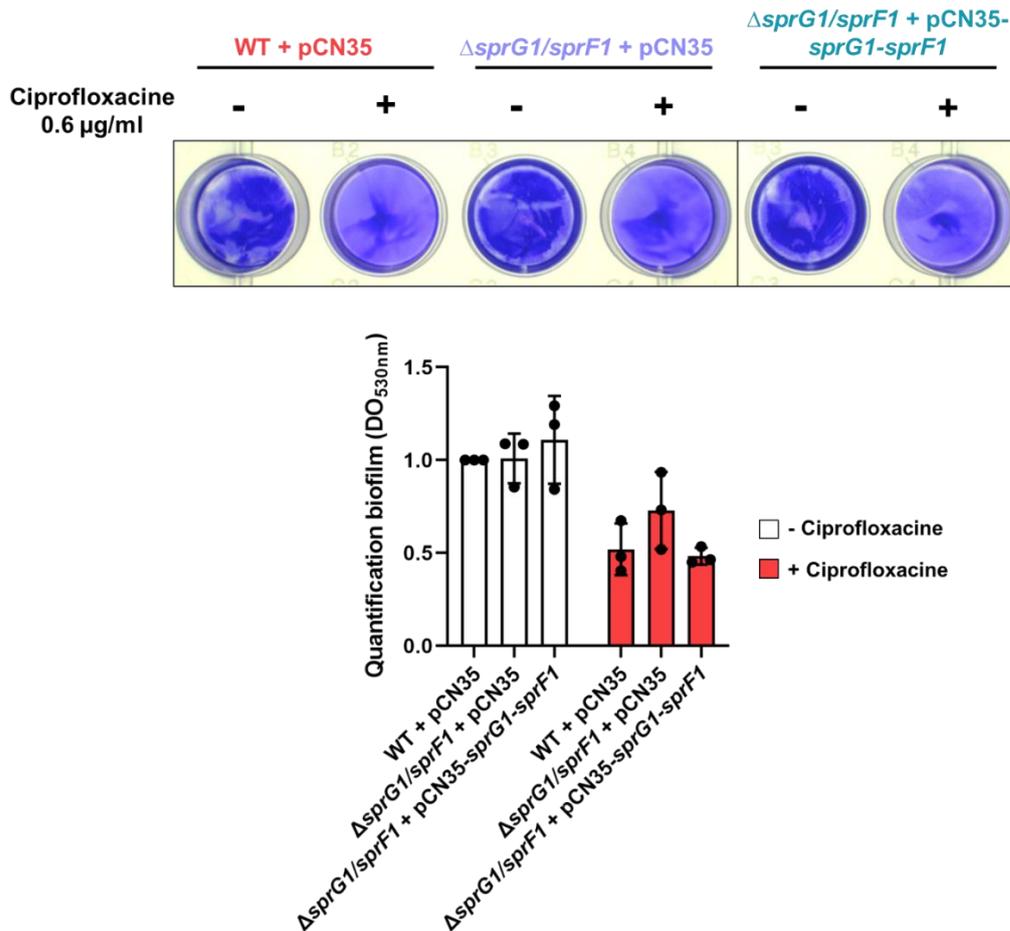


**Figure 41 : Quantification de la production de PIA.** Visualisation par chimiluminescence (lectine couplée à la HRP (Horseradish peroxidase)) du PIA présent dans la matrice du biofilm, produit en plaque 12 puits, des souches HG003 WT + pCN35,  $\Delta sprG1/sprF1 + pCN35$ ,  $\Delta sprG1/sprF1 + pCN35-sprF1$  et  $\Delta sprG1/sprF1 + pCN35-sprG1-sprF1$  (gauche). Quantification de la production de PIA visualisée par chimiluminescence à l'aide du logiciel ImageQuantTL. Les données ont été comparées à la production de PIA quantifiée pour la souche HG003 WT + pCN35, arbitrairement fixée à 1 (n = 3) (droite). Statistiques déterminées par un test ANOVA. UA : Unité arbitraire.

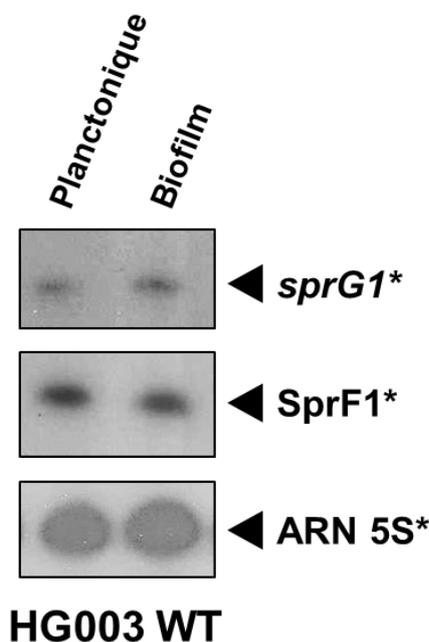
Bien que les précédents résultats ne nous permettent pas d'établir un lien entre l'augmentation de la production de PIA en condition de surexpression du système SprG1/SprF1 et la formation de biofilms par *S. aureus*, nous avons, tout de même, étudié le rôle potentiel de ce système sur la formation de biofilms en présence de ciprofloxacine, connu pour traverser efficacement le biofilm (Rowe *et al.*, 2021). Comme attendu, l'ajout de la ciprofloxacine diminue la biomasse du biofilm (Figure 42). Cependant, cette diminution est similaire entre les souches HG003 WT + pCN35, délétée du système SprG1/SprF1 ( $\Delta sprG1/sprF1 + pCN35$ ) ou surexprimant le système ( $\Delta sprG1/sprF1 + pCN35-sprG1-sprF1$ ). Ces résultats suggèrent donc que dans ces conditions, même en présence d'un antibiotique, le système SprG1/SprF1 ne participe pas à la formation du biofilm.

Comme évoqué précédemment, une étude a montré une augmentation de l'ARN *sprG1* en condition de biofilms (Karimaei *et al.*, 2021). Nous avons donc analysé le niveau d'expression des ARN *sprG1* et *SprF1* en condition de biofilms. Pour cela, des biofilms de la souche HG003 WT ont été produits en plaque 6 puits. Après 20h d'incubation à 37°C, le surnageant a été récupéré et centrifugé. Le culot bactérien (= bactéries décrochées du biofilm) a ensuite été lysé et les ARN extraits. Pour obtenir les ARN du biofilm, le biofilm a été décroché des puits par une solution de phénol pH 4 et les ARN ont été extraits. Les ARN issus des bactéries décrochées du biofilm et présentes dans le biofilm ont ensuite été analysés par northern blot (Figure 43). Ces expériences nous ont montré que le niveau d'expression des ARN *sprG1* et *SprF1* est similaire en condition planctonique et en biofilm. Ces observations sont en adéquation avec les précédents résultats de

ce travail qui suggèrent que le système SprG1/SprF1 n'est pas impliqué de façon prépondérante dans la formation de biofilms par *S. aureus*.



**Figure 42 : Rôle du système SprG1/SprF1 sur la formation de biofilms en présence de ciprofloxacin.** Visualisation de la formation du biofilm par coloration au Crystal violet en absence (-) ou en présence (+) de 0.6 μg/ml de ciprofloxacin ajoutée avant le début de la formation du biofilm (haut). La formation du biofilm visualisée en Crystal violet a été quantifiée par mesure de la DO<sub>530nm</sub>. Les données ont été comparées à la formation de biofilms quantifiée pour la souche HG003 WT + pCN35 en absence de ciprofloxacin, arbitrairement fixée à 1 (n = 3) (bas).



**Figure 43 : Niveau d'expression des ARN *sprG1* et *SprF1* en condition planctonique et en biofilm.** Visualisation en northern blot, par des sondes radiomarquées, des ARN *sprG1* et *SprF1* extraits de la souche HG003 WT en condition planctonique et en biofilm (n = 1). L'ARN 5S est utilisé comme contrôle de dépôt.

## II. Partie 2 : Identification des cibles moléculaires de SprF1

L'antitoxine ARN SprF1 est une antitoxine bifonctionnelle capable de se lier à l'ARN *sprG1* pour inhiber sa traduction, mais aussi aux ribosomes ce qui favorise la formation de bactéries persistantes aux antibiotiques (Pinel-Marie *et al.*, 2021). Cette découverte nous a conduit à rechercher de façon plus large les cibles moléculaires de SprF1 pour décrypter les mécanismes moléculaires de régulation impliqués dans la formation de persisters par SprF1.

Afin d'identifier les ARNm cibles de SprF1, nous avons utilisé une approche bio-informatique et une approche expérimentale. Pour les analyses bio-informatiques, les outils de prédiction CopraRNA (Wright *et al.*, 2014) et RNAPredator (Eggenhofer *et al.*, 2011) ont été employés. Nous avons ainsi mis en évidence 6 cibles ARNm communes entre ces deux analyses (dont les ARNm *sprG1* et *yidC*), ce qui suggère qu'elles pourraient représenter des cibles pertinentes de SprF1 (Article 2, Figure 1A).

En parallèle de ces analyses *in silico*, nous avons utilisé la technique MAPS (MS2 Affinity Purification coupled with RNA Sequencing) qui permet d'identifier de façon globale les cibles directes (ARN et protéines) d'un ARN dans une condition donnée. Cette technique consiste à fusionner un aptamère MS2 sur notre ARN d'intérêt puis à purifier par affinité les complexes appâts-cibles du fait de l'affinité de l'ARN *ms2* pour la protéine MS2p immobilisée sur la résine d'amylose sous la forme d'une chimère MS2-maltose binding-protein (MBP) (Figure 44) (Lalaouna *et al.*, 2017).

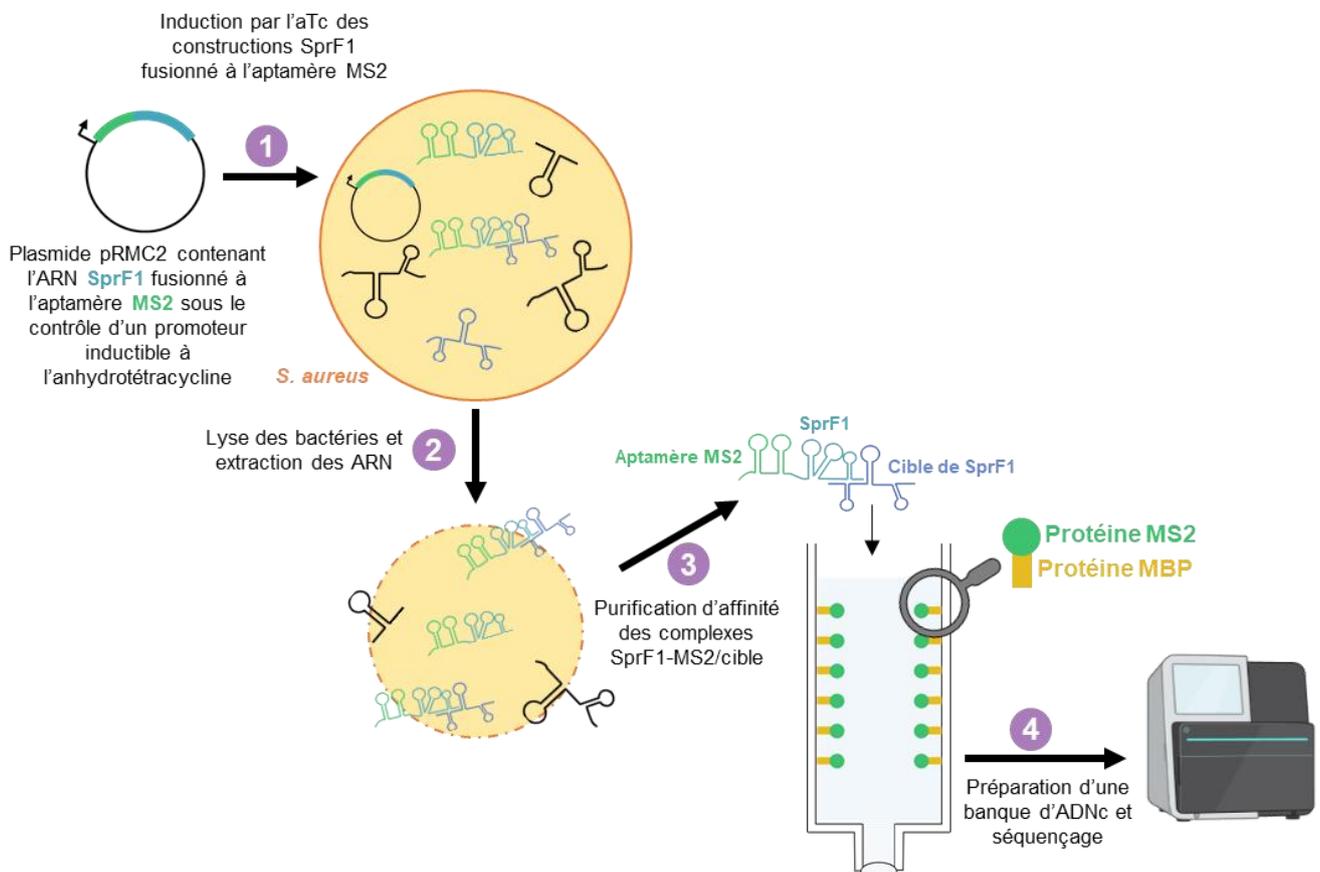
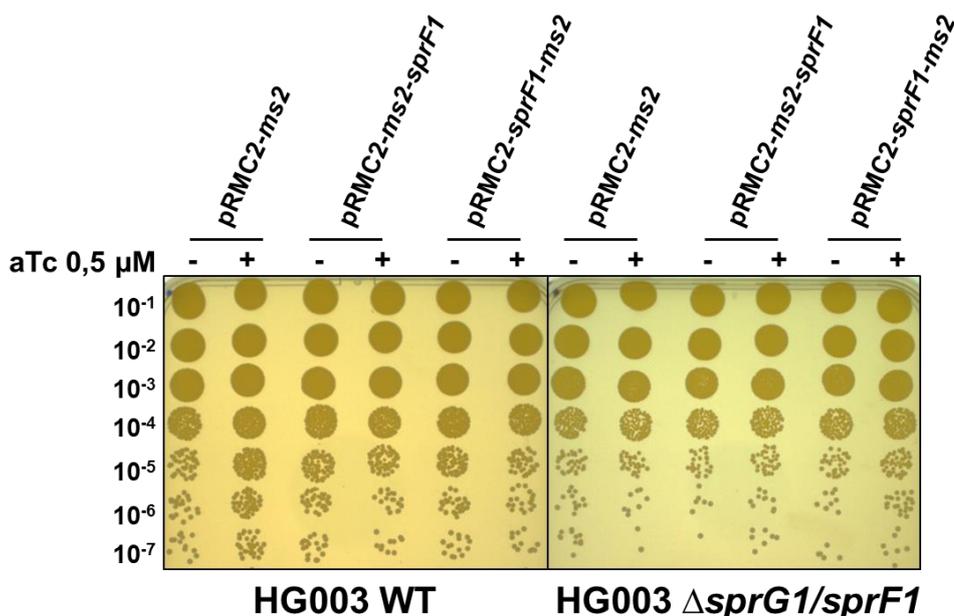


Figure 44 : Aperçu des différentes étapes de l'analyse MAPS.

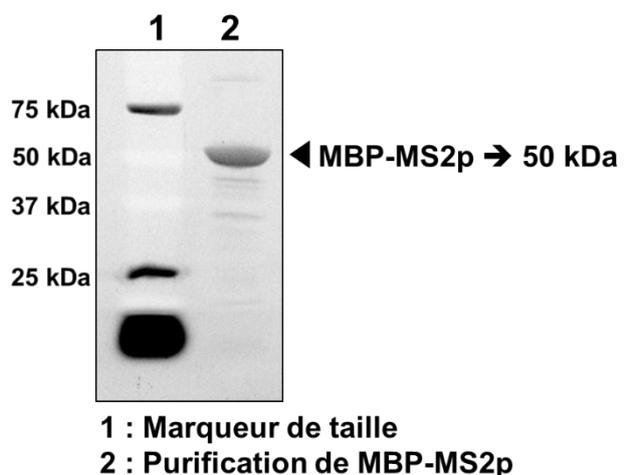
Pour utiliser cette technique, l'ARN SprF1 fusionné à l'aptamère MS2 a été cloné dans le plasmide pRMC2 sous le contrôle d'un promoteur inducible à l'anhydrotétracycline (aTc) pour augmenter transitoirement l'expression de l'antitoxine SprF1 couplée à l'aptamère MS2 et pour favoriser les interactions avec ses partenaires (ARN ou protéines) (**Figure 44**). Selon la structure de l'ARN d'intérêt et la région d'interaction avec sa cible, la localisation de l'aptamère MS2 en 5' ou en 3' de l'ARN étudié peut-être déterminante. Nous avons donc décidé de fusionner l'aptamère MS2 à l'extrémité 5' de l'ARN SprF1, dénommé MS2-SprF1, et à l'extrémité 3' de l'ARN SprF1, dénommé SprF1-MS2. Après intégration des séquences géniques *sprF1-ms2* et *ms2-sprF1* dans le plasmide pRMC2, les plasmides pRMC2-*ms2*, pRMC2-*ms2-sprF1* et pRMC2-*sprF1-ms2* ont été transformés dans la souche HG003 parentale de *S. aureus* (WT) et son mutant dépourvu du système SprG1/SprF1 ( $\Delta sprG1/sprF1$ ). Puis, les bactéries ont été cultivées jusqu'en phase exponentielle de croissance (2h) à 37°C en milieu TSB. De l'aTc à une concentration finale de 0,5  $\mu$ M a ensuite été ajouté pendant 5 min pour induire l'expression des ARN MS2-SprF1 et SprF1-MS2 (**Article 2, Figure S2B**). A noter que cette induction n'est pas toxique pour les bactéries (**Figure 45**).



**Figure 45 : L'induction à l'anhydrotétracycline des constructions MS2-SprF1 et SprF1-MS2 n'est pas toxique.** Les souches HG003 WT et  $\Delta sprG1/sprF1$  portant les plasmides pRMC2-*ms2*, pRMC2-*ms2-sprF1* ou pRMC2-*sprF1-ms2* ont été cultivées en milieu TSB jusqu'en phase exponentielle de croissance (2h). Après 5 minutes d'induction en présence (+) ou en absence (-) d'aTc, les bactéries ont été diluées ( $10^{-1}$  à  $10^{-7}$ ) et déposées en gouttes de 10  $\mu$ l sur milieu BHI agar. Les résultats ont été observés après 24h d'incubation à 37°C.

Après induction, les lysats bactériens ont été purifiés sur une résine d'amylose pré-chargée avec la protéine de fusion MBP-MS2p (protéine MS2 fusionnée à la Maltose Binding Protein) que nous avons produite chez *E. coli* puis purifiée par chromatographie sur colonnes d'affinité (Étiquettes Histidine et MBP) et échangeuse d'ions (**Figure 46**). La liaison de l'aptamère MS2 de

l'ARN SprF1 au domaine MS2p immobilisé sur la résine a permis de retenir les complexes SprF1/cible ARN et SprF1/cible protéique.

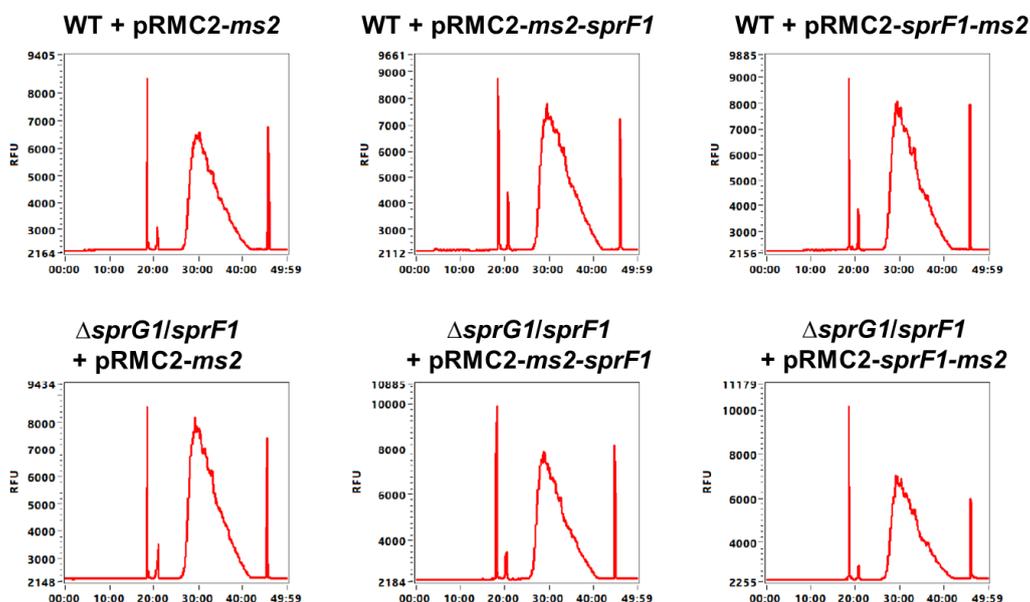


**Figure 46 : Purification de la protéine MBP-MS2p par chromatographie.** Visualisation de la protéine MBP-MS2p, déposée sur SDS-PAGE et révélée par coloration au SYPRORuby, après production chez *E. coli* et purification par chromatographie (colonnes d'affinité et échangeuse d'ions).

### i. Recherche des cibles ARN de SprF1

Les complexes SprF1/cible ARN ont ensuite été décrochés de la colonne par une solution de phénol. Dans un premier temps, nous avons confirmé, par northern blot, l'enrichissement des ARN MS2-SprF1 et SprF1-MS2 dans la fraction d'élution de la colonne ce qui valide l'interaction de l'aptamère MS2 avec la protéine MS2p greffée sur la colonne (**Article 2, Figure S2C**). Compte-tenu que l'ARN SprF1 appartient à un système toxine-antitoxine, nous savons que l'une de ses cibles est l'ARN *sprG1*. Par northern blot, nous avons montré que l'ARN *sprG1* est également enrichi dans la fraction d'élution de la colonne (**Article 2, Figure S2C**).

Suite à ces différentes validations, des banques d'ADN complémentaire (ADNc), dont la qualité a été vérifiée au Bioanalyzer (**Figure 47**), ont été réalisées à partir des ARN décrochés de la résine pour effectuer un séquençage ARN haut-débit sur un appareil MiSeq (Illumina). Les cibles interagissant avec SprF1 ont été identifiées par détermination des ARNm différentiellement enrichis entre la condition contrôle (pRMC2-*ms2*) et les conditions pRMC2-*ms2-sprF1* ou pRMC2-*sprF1-ms2* en utilisant le pipeline HTSeq/DESeq2 sous la plateforme Galaxy. Ces analyses nous ont permis de mettre en évidence 11 nouvelles cibles ARN potentielles de SprF1 et nous avons également identifié l'ARN *sprG1* ce qui a validé notre approche (**Tableau 5 et Article 2, Tableau 1**). Parmi ces 11 cibles, 8 ont uniquement été retrouvées pour la souche WT tandis que les 3 autres (*yidC*, *rpmE2* et SAOUHSC\_01789) ont été retrouvées pour les deux souches. L'ARNm *yidC* code la protéine YidC, une insertase membranaire présumée. De son côté, l'ARNm *rpmE2* code la protéine ribosomale L31 située dans la sous-unité 50S du ribosome, ce qui pourrait relier la liaison de SprF1 aux ribosomes et la formation de persisters. SAOUHSC\_01789 n'étant pas annoté, nous avons écarté cette cible des analyses ultérieures. En combinant nos analyses *in silico* et MAPS, nous avons montré que l'ARNm *yidC* est une cible commune à l'ensemble de ces analyses ce qui renforce la probabilité que *yidC* soit une cible de SprF1 (**Article 2, Figure 1C**).



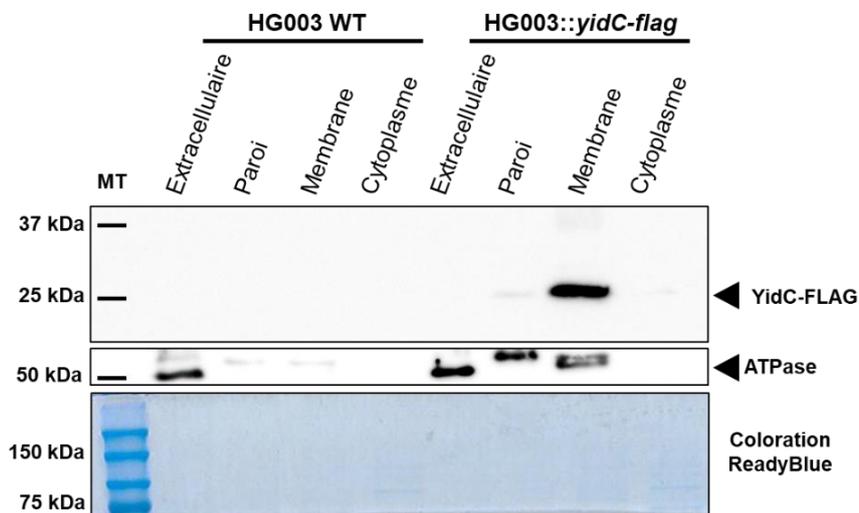
**Figure 47 : Profil des bibliothèques d'ADNc avant l'analyse RNA-seq.** La qualité des bibliothèques d'ADNc préparées à partir des ARN élués de la colonne d'affinité MBP-MS2p a été contrôlée au Bioanalyser avant de procéder au séquençage. Les profils présentés sont ceux obtenus pour les échantillons d'un réplicat biologique (Souches HG003 WT et  $\Delta sprG1/sprF1$  portant les plasmides pRMC2-*ms2*, pRMC2-*ms2-sprF1* ou pRMC2-*sprF1-ms2*).

**Tableau 5 : Liste des cibles de SprF1 identifiées par l'analyse MAPS.** Les énergies d'interaction entre SprF1 et ses cibles ARNm ont été calculées à l'aide d'IntaRNA. Pour *sprG1*, la séquence de l'ARNm utilisée est issue de la base de données SRD (srd.genouest.org). Pour les 11 autres cibles, les séquences utilisées pour calculer l'énergie d'interaction correspondent aux séquences codantes portées par les ARNm auxquelles ont été ajoutés 50 nucléotides en amont du codon d'initiation et 50 nucléotides en aval du codon STOP.

Identifiant	Nom du gène	Produit	Energie d'interaction (kcal/mol)
SAOUHSC_02176	<i>sprG1</i>	Toxines SprG1	-159,45
SAOUHSC_02327	<i>yidC</i>	Protéine insertase ?	-16
SAOUHSC_02361	<i>rpmE2</i>	Protéine ribosomale L31 (sous-unité 50S)	-7,34
SAOUHSC_00826	-	Protéine hypothétique	-4,01
SAOUHSC_01803	-	Protéine hypothétique	-7,4
SAOUHSC_01504	<i>fer</i>	Ferredoxine	-3,69
SAOUHSC_02816	-	Protéine hypothétique	-5,2
SAOUHSC_00335	-	Protéine hypothétique	-10,57
SAOUHSC_00334	-	Protéine hypothétique	-7,34 et -6,06
SAOUHSC_01789	-	Protéine hypothétique	-3,12
SAOUHSC_00529	<i>fusA</i>	Facteur d'élongation G	-10,36
SAOUHSC_02491	<i>secY</i>	Sous-unité SecY du système d'export Sec	-7,49

Par la suite, après avoir déterminé les coordonnées des extrémités des ARNm *rpmE2* et *yidC*, nous avons utilisé le logiciel IntaRNA afin d'identifier les zones d'interaction potentielles entre SprF1 et ces deux ARNm (**Article 2, Figure S3**). Différentes zones d'interaction ont ainsi pu être mise en évidence : une zone d'interaction de 11 nucléotides avec un bilan énergétique de -15,97 kcal/mol pour SprF1/*yidC* et une zone d'interaction de 15 nucléotides avec un bilan énergétique de -7,91 kcal/mol pour SprF1/*rpmE2* (**Article 2, Figure 2**). Pour vérifier que les régions prédites sont responsables de la liaison entre SprF1/*yidC* et SprF1/*rpmE2*, des expériences de retard sur gel ont été réalisées. Pour visualiser un complexe entre SprF1 et *yidC*, ce dernier étant un long ARN (979 nucléotides), nous avons choisi de réaliser les expériences d'interaction en utilisant une version tronquée de l'ARN *yidC*. Cet ARN de 161 nucléotides (*yidC*<sub>161</sub>) contient la zone prédite d'interaction avec SprF1 et adopte une structure tige-boucle similaire à la structure de l'ARN *yidC* entier (prédictions réalisées par le logiciel Mfold (Zuker, 2003)). L'observation d'un complexe entre SprF1 et *yidC*<sub>161</sub> avec une constante de dissociation (Kd) de 0,25 µM nous a permis de valider l'interaction entre ces deux ARN (**Article 2, Figure 3A**). L'ajout en excès (100X) d'un autre ARN (SprB) n'a pas modifié l'interaction entre SprF1 et *yidC*<sub>161</sub> tandis qu'un excès de SprF1 non marqué a déplacé le complexe, ce qui suggère que l'interaction entre ces deux ARN est spécifique *in vitro*. De plus, l'utilisation de l'ARN *yidC*<sub>150</sub>, délété des 11 nucléotides prédits pour être responsables de l'interaction avec SprF1, empêche la formation d'un complexe SprF1/*yidC* ce qui confirme que cette région est impliquée dans la liaison de ces ARN (**Article 2, Figure 3B**). En ce qui concerne *rpmE2*, un complexe SprF1/*rpmE2* a également été observé par retard sur gel (**Article 2, Figure 3C**). Nous n'avons pas été en mesure de déterminer un Kd, suggérant une faible affinité *in vitro* entre SprF1 et *rpmE2*. De plus, de façon surprenante, la délétion de la zone prédite d'interaction sur l'ARNm *rpmE2* (*rpmE2*<sub>361</sub>) n'a pas permis d'abolir la liaison entre *rpmE2* et SprF1 (**Article 2, Figure 3D**).

Après avoir validé l'interaction de SprF1 avec les ARNm *yidC* et *rpmE2*, nous avons étudié le rôle de SprF1 sur l'abondance de ces deux ARN. Pour cela, nous avons analysé, par RT-qPCR, la quantité relative des ARN *rpmE2* et *yidC* dans différents contextes génétiques (souches HG003 WT + pCN35,  $\Delta sprG1/sprF1$  + pCN35 et  $\Delta sprG1/sprF1$  + pCN35-*sprF1*). Que ce soit en phase exponentielle ou stationnaire de croissance, la délétion ou la surexpression de SprF1 n'a pas d'effet significatif sur la quantité des ARN *rpmE2* et *yidC* (**Article 2, Figures 4B et 4C**). Ces résultats suggèrent que l'interaction de SprF1 avec les ARNm *yidC* et *rpmE2* n'influence pas leur niveau d'expression. Nous nous sommes donc demandés si SprF1 pouvait moduler la traduction de ces deux cibles. Dans ce but, nous avons utilisé les plasmides pBT2-*yidC-flag* et pBT2-*rpmE2-flag* pour intégrer, au chromosome, une étiquette FLAG en amont du codon STOP des protéines YidC et RpmE2 dans les souches HG003 WT et  $\Delta sprG1/sprF1$ . A noter que l'ajout d'un FLAG en C-terminal de YidC ne modifie pas sa localisation membranaire (**Figure 48**).



**Figure 48 : La protéine YidC-FLAG est localisée à la membrane.** A partir des protéines extraites des souches HG003 WT et HG003::*yidC-flag* en phase exponentielle de croissance (2h) par fractionnement (protéines extracellulaires, de paroi, de membrane et du cytoplasme), la protéine YidC-FLAG a été visualisée par western blot à l'aide d'un anticorps anti-FLAG. La protéine ATPase a été visualisée à l'aide d'un anticorps anti-ATPase (contrôle de fractionnement). Le gel coloré au ReadyBlue est utilisé comme contrôle de dépôt.

Par western blot à l'aide d'un anticorps anti-FLAG, nous avons donc étudié l'expression des protéines YidC-FLAG et RpmE2-FLAG en phase exponentielle de croissance (2-3h) dans différents contextes génétiques (souche parentale, délétée de *sprG1/sprF1* ou surexprimant SprF1) (**Article 2, Figures 4D et 4E**). Tandis que la délétion du locus *sprG1/sprF1* n'a aucun effet sur l'expression de la protéine YidC-FLAG, l'expression de YidC-FLAG a été diminuée d'environ 20 % lorsque SprF1 est surexprimée, ce qui suggère que SprF1 peut perturber la traduction de YidC. Le niveau de RpmE2-FLAG a, quant à lui, été réduit de 50 % dans la souche  $\Delta$ *sprG1/sprF1*::*rpmE2-flag* + pCN35 et rétabli dans la souche  $\Delta$ *sprG1/sprF1*::*rpmE2-flag* + pCN35-*sprF1*, ce qui indique que SprF1 peut promouvoir l'expression de RpmE2. Dans l'ensemble, ces données suggèrent que la liaison de SprF1 avec *yidC* ou *rpmE2* pourrait moduler le niveau des protéines YidC et RpmE2 en phase exponentielle de croissance.

Enfin, du fait que l'ARNm *rpmE2* code une protéine ribosomale et que SprF1 favorise la formation de persisters *via* sa fixation aux ribosomes, nous avons émis l'hypothèse que l'interaction de SprF1 avec l'ARNm *rpmE2* pourrait être impliquée dans la persistance aux antibiotiques. Le gène *rpmE2* étant un gène essentiel (**Chaudhuri et al., 2009**), cette hypothèse a été étudiée en condition de surexpression de *rpmE2* en utilisant le plasmide pCN35 à fort taux de copies. Le plasmide pCN35-*rpmE2* a ensuite été transformé dans les souches HG003 WT et  $\Delta$ *sprG1/sprF1*. Dans un premier temps, la surexpression de *rpmE2* à partir du plasmide pCN35-*rpmE2* a été validée par RT-qPCR (**Article 2, Figure S7**). Après s'être assuré que la CMI de la ciprofloxacine et de la cloxacilline était identique pour les quatre souches testées (HG003 WT et  $\Delta$ *sprG1/sprF1* portant le plasmide pCN35 ou pCN35-*rpmE2*) (**Article 2, Tableau S6**), des courbes de survie ont été réalisées (**Article 2, Figures 6A et 6B**). Nous avons ainsi mis en évidence que la surexpression de *rpmE2* entraîne

une augmentation de la tolérance à la ciprofloxacine et à la cloxacilline, deux bactéricides appartenant à des familles d'antibiotiques différentes. Par la suite, nous avons cherché à identifier le mécanisme responsable du phénotype de tolérance induit par la surexpression de *rpmE2*. Chez *E. coli*, la protéine ribosomale RpmE2 est impliquée dans la dimérisation des ribosomes 70S en ribosomes 100S (Ueta *et al.*, 2017), lesquels peuvent favoriser la formation des bactéries persistantes (Song & Wood, 2020). Ainsi, nous avons analysé les profils ribosomaux des souches HG003 WT + pCN35 et WT + pCN35-*rpmE2*. De manière qualitative, aucune différence de formation des ribosomes 100S n'a été observée entre ces deux souches (Article 2, Figure S8).

En conclusion, ce travail suggère que SprF1 est une antitoxine multifonctionnelle dont la fonction n'est pas limitée à l'inhibition de la toxicité de SprG1 envers *S. aureus* puisque, par son interaction avec d'autres cibles, SprF1 peut aussi intervenir au sein d'un réseau de régulation plus complexe qu'il faut continuer à explorer (Figure 49). Nos expériences de MAPS ont mis en évidence 11 nouvelles cibles ARN potentielles de SprF1 et nous avons choisi de focaliser notre travail sur les ARNm *yidC* et *rpmE2*. Tout d'abord, nous avons confirmé l'interaction de SprF1 avec ces deux ARNm, *in vitro*, par des expériences de retard sur gel. La fixation de SprF1 sur ces cibles n'a pas d'effet sur le niveau d'expression de ces ARNm mais peut moduler dans une certaine mesure la quantité de protéine traduite. Par ailleurs, la surexpression de *rpmE2* favorise la tolérance des bactéries aux antibiotiques. Cependant, le phénotype identifié est similaire entre les souches HG003 WT et  $\Delta$ *sprG1/sprF1*, ce qui ne permet pas de conclure sur l'implication du complexe SprF1/*rpmE2* dans ce phénotype.

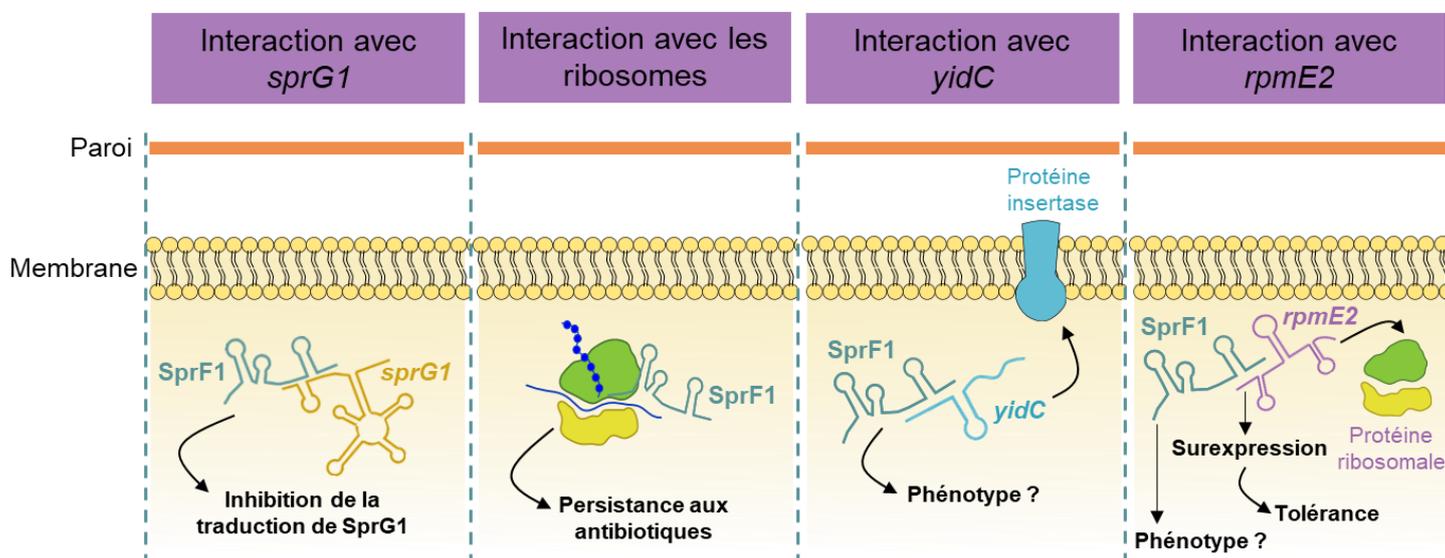


Figure 49 : SprF1, une antitoxine de type I multifonctionnelle.

L'ensemble des résultats décrits dans cette partie a permis la soumission d'un article intitulé « **A search for molecular targets of the RNA antitoxin SprF1 revealed that RpmE2 is involved in antibiotic tolerance in *Staphylococcus aureus*** » par Emeline Ostyn, Marc Hallier, Stéphane Dréano, Yoann Augagneur et Marie-Laure Pinel-Marie dans Microbiological research en avril 2024. Cet article est présenté à la page suivante.

## Article 2

---

**A search for molecular targets of the RNA antitoxin SprF1 revealed that RpmE2 is involved in antibiotic tolerance in *Staphylococcus aureus***

# A search for molecular targets of the RNA antitoxin SprF1 revealed that RpmE2 is involved in antibiotic tolerance in *Staphylococcus aureus*

Emeline Ostyn<sup>a</sup>, Marc Hallier<sup>b</sup>, Stéphane Dréano<sup>c</sup>, Yoann Augagneur<sup>a\*</sup>, Marie-Laure Pinel-Marie<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Université de Rennes, BRM (Bacterial RNAs and Medicine) UMR\_S 1230, Rennes, France

<sup>b</sup>Université de Rennes, QCPS (Quality Control in Protein Synthesis), IGDR UMR CNRS 6290, F-35042 Rennes, France

<sup>c</sup>Université de Rennes, CNRS UMR 6290 IGDR, BIOSIT, Molecular Bases of Tumorigenesis: VHL Disease Team, Rennes, France

\* Corresponding authors at: Université de Rennes, BRM (Bacterial RNAs and Medicine) UMR\_S 1230, Rennes, France

E-mail addresses: marie-laure.pinel@univ-rennes.fr; yoann.augagneur@univ-rennes.fr

Yoann Augagneur and Marie-Laure Pinel-Marie are co-last authors.

**Abstract:** Slow-growing bacteria, referred as tolerant or persistent, emerge as a major health issue since they are associated with antibiotic treatment failures and relapsing infections. Among others, type I toxin-antitoxin (TA) systems have been linked to slow-growing bacteria formation. They are composed of a peptide toxin whose overexpression confers growth stasis or cell death, and of an RNA antitoxin that base-pairs with the cognate toxin mRNA to inhibit its translation. In the human pathogen *Staphylococcus aureus*, it was recently shown that the SprF1 antitoxin is able to bind ribosomes to inhibit global translation and promote persister cells formation. Here, we used *in silico* analysis and MS2-affinity purification coupled with RNA sequencing (MAPS) to expand the RNA targetome of SprF1 and better understand its role in *S. aureus* antibiotic adaptation. We experimentally uncovered 12 mRNAs targets interacting with SprF1 and demonstrated that SprF1 directly interacts with *yidC*, encoding a protein insertase, and *rpmE2*, encoding the ribosomal protein L31, to either decrease or increase their protein expression. Finally, we showed that *rpmE2* overexpression is associated with antibiotic tolerance which could contribute to the persister phenotype mediated by SprF1. Altogether, these findings highlight that some type I RNA antitoxins behave like typical regulatory RNAs, by interacting with several targets through various regulatory motifs to participate in bacterial adaptation.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, toxin-antitoxin systems, SprF1 antitoxin, RpmE2, antibiotic tolerance

## 1. INTRODUCTION

Bacterial ability to survive antibiotic therapies is one of the major threats for human health. In 2019, antibiotic resistant bacteria were responsible for more than 1,2 million deaths worldwide (Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022). Although antibiotic resistance is well-studied, other emerging mechanisms, such as antibiotic tolerance and persistence, are also involved in treatment failures (Fisher *et al.*, 2017). Tolerant and persistent bacteria are slow-growing bacteria often hidden in host phagocytic or non-phagocytic cells and in biofilms, complicating antibiotic therapy and promoting infection relapse. Antibiotic tolerance and persistence refer to an increase in bacterial survival in the presence of an antibiotic without minimum inhibitory concentration (MIC) modification (Gollan *et al.*, 2019). Whereas tolerance encompasses the whole bacterial population, persisters are defined as a subpopulation of transiently antibiotic tolerant bacteria that can resume growth after antibiotic removal. Several triggers such as the stringent response (Liu *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2015), the SOS response (Dörr *et al.*, 2009), ribosomes hibernation (Song and Wood, 2020), quorum-sensing (Personnic *et al.*, 2019) or toxin-antitoxin (TA) systems (Helaine *et al.*, 2014) are described as being involved in slow-growing bacteria formation. TA systems are genetic modules composed of two genes. One encodes a stable toxin causing cell death or growth arrest, while the other one encodes a labile antitoxin that neutralizes the toxin's activity (Jurénas *et al.*, 2022). Based on current knowledges, TA systems are divided into eight types depending on the antitoxin nature and its mode of action. Antitoxins can be non-coding RNAs (Types I, III and VIII) or proteins (Types II, IV, V, VI, VII). The link between TA systems and persister formation dates back to the early eighties, when a study showed that a gain-of-function mutation in the *hipA* gene, encoding the HipA type II toxin, favoured the formation of persisters in *Escherichia coli* (Moyed and Bertrand, 1983). Although the role of TA systems in persister formation is also a matter of debate (Ronneau and Helaine, 2019), the involvement of two type I toxins, TisB and HokB, in persisters formation is well established (Dörr *et al.*, 2010; Verstraeten *et al.*, 2015). HokB and TisB are two membrane-associated type I toxins from the TisB/IstR-1 and HokB/SokB TA systems. When activated, these toxins induce membrane pore formation and ATP efflux which leads to the formation of persistent bacteria (Dörr *et al.*, 2010; Verstraeten *et al.*, 2015). Recently, another study conducted in *Staphylococcus aureus*

demonstrated that, not a toxin, but a type I RNA antitoxin promotes persisters formation (Pinel-Marie *et al.*, 2021). In this study, it was shown that the SprF1 RNA antitoxin, which belongs to the SprG1/SprF1 type I TA system (Pinel-Marie *et al.*, 2014), interacts with ribosomes to slow-down translation and promote persister cells formation. SprF1 represses *sprG1* expression, which encodes two toxic peptides, SprG1<sub>44</sub> and SprG1<sub>31</sub>, shown to cause membrane depolarization and intracellular ATP depletion, leading to bacterial death when overexpressed (Fermon *et al.*, 2023; Pinel-Marie *et al.*, 2014). Therefore, SprF1 appears as a bifunctional antitoxin which, through its 3'end, interacts with *sprG1* mRNA to promote its degradation and, through a purine-rich sequence located at its 5'-end, binds ribosomes to inhibit overall translation and confer antibiotic persistence (Pinel-Marie *et al.*, 2021, 2014). SprF1 is not the sole example of an antitoxin whose mode of action goes beyond the *stricto sensu* inhibition of its cognate toxin (Riffaud *et al.*, 2020). For instance, in *S. aureus*, the SavR antitoxin of the SavRS type II TA system binds alone, or in complex with its toxin, the promoter of *hla* (encoding  $\alpha$ -haemolysin) and *efb* (encoding extracellular fibrinogen-binding protein) to repress their transcription (Wen *et al.*, 2018). Similarly, HigA, a type II antitoxin, modulates *Pseudomonas aeruginosa* virulence by repressing *exsA* and *amrZ* transcription, two genes encoding transcriptional factors (Song *et al.*, 2021).

In this study, we search for additional molecular targets of SprF1 to better understand its contribution in *S. aureus* adaptation and antibiotic persistence. We combined a bioinformatic approach and MS2 affinity purification coupled with RNA sequencing (MAPS) to unveil the SprF1 targetome. Besides *sprG1*, we identified several novel SprF1 mRNAs target candidates. Among them, we showed that SprF1 interacts with *yidC* and *rpmE2* mRNAs *in vitro* and modifies the YidC and RpmE2 protein levels. Finally, we showed that *rpmE2* overexpression, encoding 50S ribosomal protein L31 type B, promotes *S. aureus* antibiotic tolerance. Taken together, our results confirm that type I RNA antitoxins can act as typical regulatory RNAs (sRNAs) by binding several RNAs to regulate their expression or activity.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Consensus motif analysis

To identify a consensus interaction motif for SprF1 on its targets, we used the Gapped Local Alignment of Motifs tool GLAM2 v.5.5.5 (from the MEME suite) (Bailey *et al.*, 2009). To this end, the predicted interaction regions of 20 targets obtained with the CopraRNA analysis in start codon were aligned.

### 2.2. Strains and growth conditions

All strains used in this study are listed in **Supplementary Table S1**. The XL1-blue *Escherichia coli* strain was grown at 37°C and 160 rpm in Lysogeny Broth (LB) or on LB agar plate. When necessary, 100 µg/ml ampicillin was added to the medium. *Staphylococcus aureus* strains were grown at 37°C, 160 rpm, in Tryptic Soy Broth (TSB) or on Brain Heart Infusion (BHI) agar plates. When needed, chloramphenicol was used at 10 µg/ml. To monitor growth, overnight cultures were diluted to an optical density at 600 nm (OD<sub>600nm</sub>) of 0.1 in 96-well microplates. OD<sub>600nm</sub> was measured every hour during 22h using a Bio-Tek 2 instrument (Agilent).

### 2.3. Plasmid constructions

Plasmids and primers used in this study are listed in **Supplementary Tables S2 and S3**. To generate an anhydrotetracycline (aTc)-inducible *ms2-sprF1* construct, *sprF1* was amplified by PCR with primers 1-2 and cloned into pRMC2-*ms2* vector (Le Huyen *et al.*, 2021) digested with SacI and EcoRI enzymes (New England Biolabs). To fuse *sprF1* with *ms2* at its 3' end in pRMC2, *sprF1-ms2* DNA fragment was obtained by two-step PCR using primers 3-6 and cloned into the KpnI/SacI sites of pRMC2 plasmid (Corrigan and Foster, 2009), yielding pRMC2-*sprF1-ms2*. To construct pCN35-*rpmE2* plasmid, *rpmE2* and its endogenous promoter was amplified by PCR with primers 46-47 and cloned in pCN35 vector (Charpentier *et al.*, 2004). HG003::*yidC-flag*, HG003::*rpmE2-flag*, HG003  $\Delta$ *sprG1/sprF1::yidC-flag* and HG003  $\Delta$ *sprG1/sprF1::rpmE2-flag* were obtained by double homologous recombination using the temperature-sensitive pBT2 plasmid (Brückner, 1997) as previously described (Pinel-Marie *et al.*, 2014). Chromosomal insertion of a *flag* sequence at the 3' end of *yidC* or *rpmE2* were performed by generating a *yidC-flag* or *rpmE2-flag* fragment by PCR

to obtain pBT2-*yidC-flag* and pBT2-*rpmE2-flag*, respectively. All PCR DNA fragments were amplified from *S. aureus* HG003 genomic DNA using KOD Hot Start polymerase (Merck). PCR products were ligated in the relevant plasmid using T4 DNA ligase (New England Biolabs) and plasmid constructs verified by Sanger sequencing using 3130xl Genetic Analyzer capillary electrophoresis laser-coupled system (ABI PRISM). All plasmids were transformed in *E. coli* XL1 blue by heat shock at 42°C, then into shuttle *S. aureus* RN4220 strain and finally, into *S. aureus* HG003 strain by electroporation as described (Monk *et al.*, 2015).

#### 2.4. MS2-affinity purification coupled with RNA sequencing (MAPS)

*S. aureus* HG003 (WT) or  $\Delta$ *sprG1/sprF1* strains carrying pRMC2-*ms2*, pRMC2-*ms2-sprF1* or pRMC2-*sprF1-ms2* plasmids were grown overnight in TSB supplemented with 10 µg/ml chloramphenicol. Precultures were diluted to an OD<sub>600nm</sub> of 0.1 in 250 ml TSB + 10 µg/ml chloramphenicol and grown at 37°C, 160 rpm, until the exponential growth phase (2h). To induce the expression of *ms2-sprF1* or *sprF1-ms2*, cultures were incubated 5 min with aTc at a final concentration of 0.5 µM. Cells were pelleted by centrifugation (4500 rpm, 10 min, 4°C) and resuspended in 1 ml of ice-cold Buffer A (20 mM Hepes pH 7.5, 200 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT) as described (Hallier *et al.*, 2024). Cells were mechanically lysed using a FastPrep apparatus (MP Biomedicals) with 500 µl of 0.1 mm glass beads (Sigma). The bacterial lysates were clarified by a 30 min centrifugation at 30,000 g and at 4°C before passing the samples through an affinity column. For each, 250 µl of amylose resin were precoated with 5 nmoles of MS2-maltose binding protein purified in buffer A as described (Said *et al.*, 2009) and incubated 40 min at 4°C with 1.5 ml of clarified lysates. RNAs were extracted at different points of the protocol: total RNAs taken before passage through the column (input), RNAs that passed through the column (flow-through), RNAs recovered after the last washing of the column (wash), and eluted RNAs (target fraction). Columns were washed 6 times by centrifugation (13,000 x g, 2 min) with 1 ml of buffer A. RNAs were eluted with 500 µl of phenol pH 4, extracted with phenol/chloroform:isoamylalcohol (25:24:1) and precipitated with three volumes of cold absolute ethanol and 0.3 M sodium acetate. Prior RNA-seq, eluted RNAs were treated with Amplification Grade DNase I (ThermoFisher, USA) and their integrity were assessed with a Bioanalyzer (Agilent Technologies). The cDNA libraries were prepared using the

NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs, USA) following the manufacturer's instructions. After libraries quality control using Bioanalyzer, they were sequenced on an Illumina MiSeq platform (paired-end, 150 cycles). RNA-Seq reads were mapped onto *S. aureus* NCTC8325 genome and counted as previously described (Hallier *et al.*, 2024; Sassi *et al.*, 2022). mRNAs specifically enriched when SprF1 was used as a bait were determined using DESeq2 (Love *et al.*, 2014). RNA-seq data of this study were submitted to the Sequence Read Archive (SRA) storehouse and are available under the Bio Project accession no. PRJNA1081812.

## 2.5. RNA extractions, northern blots and RT-qPCR

To isolate total RNAs, bacteria were collected by centrifugation at 4,500 rpm for 10 min at 4°C. Pellets were resuspended in 500 µl lysis buffer (0.5% SDS, 20 mM sodium acetate, 1 mM EDTA, pH 5.5), and mechanically disrupted with 0.1 mm glass beads in the presence of phenol (pH 4) using a FastPrep-24 5G instrument (MP Biomedicals). Total RNAs were purified by phenol/chloroform extraction and ethanol/sodium acetate precipitation as previously described (Fermon *et al.*, 2023). DNA oligonucleotides probes used for northern blots are listed in **Supplementary Table S3**. RNAs were loaded and separated on a denaturing 8% urea-PAGE gel, then transferred onto a ZetaProbe GT membrane (Bio-Rad). The membrane was hybridized in ExpressHyb solution (Ozyme) with specific probes (**Supplementary Table S3**) radio-labeled with [ $\gamma$ 32P]-ATP. After removal of unspecific binding through several washes, membranes were exposed and scanned with a PhosphorImager (Typhoon FLA 9500). To perform quantitative real-time PCR (RT-qPCR) assay, 2 µg of total RNAs were treated with DNase I amplification grade (Invitrogen, Carlsbad, USA) for 30 min at 25 °C. cDNAs were synthesized using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit following the manufacturer's recommendations (Applied Biosystems), then amplified in a StepOnePlus Real-Time PCR instrument (GE Healthcare) using Real Master MIX SYBR Green Kit (Life Technologies) according to manufacturer's instructions and specific primers (**Supplementary Table S3**). The  $\Delta\Delta$ Ct method was utilized to calculate the relative transcript levels, with *gyrB* mRNA serving as an internal control.

## 2.6. RACE mapping

Primers used are displayed in [Supplementary Table S3](#). After total RNAs extraction from *S. aureus* HG003, 5 µg of RNAs were treated with Terminator 5'-phosphate dependent exonuclease (Lucigen, Biosearch Technologies), and then with RNA 5'-polyphosphatase (Lucigen, Biosearch Technologies) ([Bronsard et al., 2017](#)). RACE mapping (rapid amplification of cDNA ends) was performed for *rpmE2* and *yidC* mRNAs as previously described ([Pinel-Marie et al., 2014](#)).

## 2.7. *In vitro* transcription and gel retardation assay

RNAs were transcribed from PCR-amplified templates using HG003 genomic DNA and forward primers containing a T7 promoter sequence ([Supplementary Table S3](#)). 200 ng of PCR product was used as a template for *in vitro* transcription with a MEGAscript T7 Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific). RNAs were purified on an 8% urea-PAGE gel, eluted overnight at 37 °C in elution buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% SDS), then ethanol precipitated. SprF1 or SprF1<sub>inv</sub> RNAs were dephosphorylated with CIP alkaline phosphatase (New England Biolabs) and their 5'-ends labelled with 0.5 µl of [<sup>32</sup>P]-ATP (5 µCi; PerkinElmer) using T4 polynucleotide kinase (PNK, New England Biolabs) according to manufacturer's protocol. Labelled RNAs were purified on G-50 columns (Amersham) and quantified using the Qubit RNA Assay Kit (Invitrogen). Gel retardation assays were performed as described ([Antal et al., 2005](#)). Briefly, 0.05 or 0.02 pmol of radiolabelled SprF1 or SprF1<sub>inv</sub> probes were incubated with increasing amount (pmol) of native *rpmE2* and *yidC* RNAs or their transcript variants (deleted/mutated for their predicted interaction region). Samples were loaded and separated on a native 6% polyacrylamide gel. Gels were dried and radiolabelled RNAs detected by a Typhoon FLA 9500 Phosphorimager. To determine the dissociation constant (K<sub>d</sub>), data were quantified with ImageQuant software (GE Healthcare Life Science).

## 2.8. Protein extractions and western blots

Overnight cultures of HG003::*yidC-flag* or HG003::*rpmE2-flag* strains were diluted to an OD<sub>600nm</sub> of 0.1 in TSB and grown at 37°C under agitation. At different growth phase, 2 ml were centrifuged (13,000 rpm, 5 min, 4°C) to collect total protein extracts. Pellets were resuspended in

50 µl of lysis buffer (50 mM Tris-EDTA, pH 7.7, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µg/mL lysostaphin), incubated 15 min at 37°C and sonicated. Proteins were then quantified using the Qubit Protein Assay Kit (Invitrogen). For western blots assay, 1 µg of protein resuspended in Laemmli buffer (60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 40 mM DTT, 2% SDS, 10% Glycerol) was loaded and separated onto a 4–16% Tris-Glycine SDS-PAGE. After migration at 50 V for 30 min, and then at 120 V for 1h in electrophoresis buffer (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS), proteins were transferred onto Amersham Hybond-P PVDF membrane (GE Healthcare) at 100 V, 4°C for 1 h. After blocking, YidC-FLAG or RpmE2-FLAG proteins were hybridized with 1:2000 monoclonal mouse anti-FLAG M2 horseradish peroxidase (HRP) antibodies (Sigma-Aldrich), then revealed using an Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent kit and visualized with LAS 4000 imager (GE Healthcare). To compare protein expression between different strains, data from western blot images were quantified with ImageQuant software (GE Healthcare Life Science). ReadyBlue Protein Gel staining (Sigma-Aldrich) was done as a loading control.

## 2.9. MIC determination

Ciprofloxacin and cloxacillin Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values were determined using the broth microdilution method as detailed in (Wiegand *et al.*, 2008). Briefly, three to five colonies from fresh agar plates were transferred in saline solution to obtain a suspension's turbidity at 0.5 McFarland. This suspension was then diluted to the hundredth in Mueller Hinton broth (MH, Oxoid). 50 µl of this solution was brought into contact with increasing antibiotic concentrations in 96-well plates and incubated 24 h at 37°C in static condition before visually determining the MIC. Antibiotics were assayed in concentration ranging from 0.002 µg/ml to 2 µg/ml.

## 2.10. Time-kill kinetics assays

Overnight cultures of HG003 strains carrying the appropriate plasmids were diluted to an OD<sub>600nm</sub> of 0.1 in MH and grown at 37°C with agitation until exponential phase (2 h). After dilution and spreading on BHI agar plates for CFU counting (t = 0), cultures were challenged with 6.25 µg/ml of ciprofloxacin (100x MIC) or 3.1 µg/ml of cloxacillin (100x MIC). At each time point (t = 2–48 h), a 500 µl sample was collected, washed and plated to enumerate the surviving bacteria. CFU numbers

were used to draw time-kill curves to determine the minimum duration for killing 99% (MDK<sub>99</sub>) and 99.99% (MDK<sub>99.99</sub>) of the population.

### 2.11. Measurement of intracellular ATP

*S. aureus* strains were grown at 37°C in TSB supplemented with chloramphenicol 10 µg/ml and samples collected at different time points during the growth. For each time point, cultures (1 ml at 1h, 500 µl at 2h and 500 µl at 3h) were centrifuged at 13,000 rpm for 3 min and pellets were resuspended in MH (1 ml at 1h, 500 µl at 2h and 600 µl at 3h). In duplicate, 50 µl of bacteria were incubated with an equal volume of BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay (Promega) at 37°C in a black 96-well microplate. After a 4 min incubation in the dark, OD<sub>600nm</sub> and luminescence (RLU) were measured using a Biotek Synergy 2 microplate reader (Agilent). Luminescence values were normalized with OD<sub>600nm</sub>.

### 2.12. Sucrose density gradient fractionation

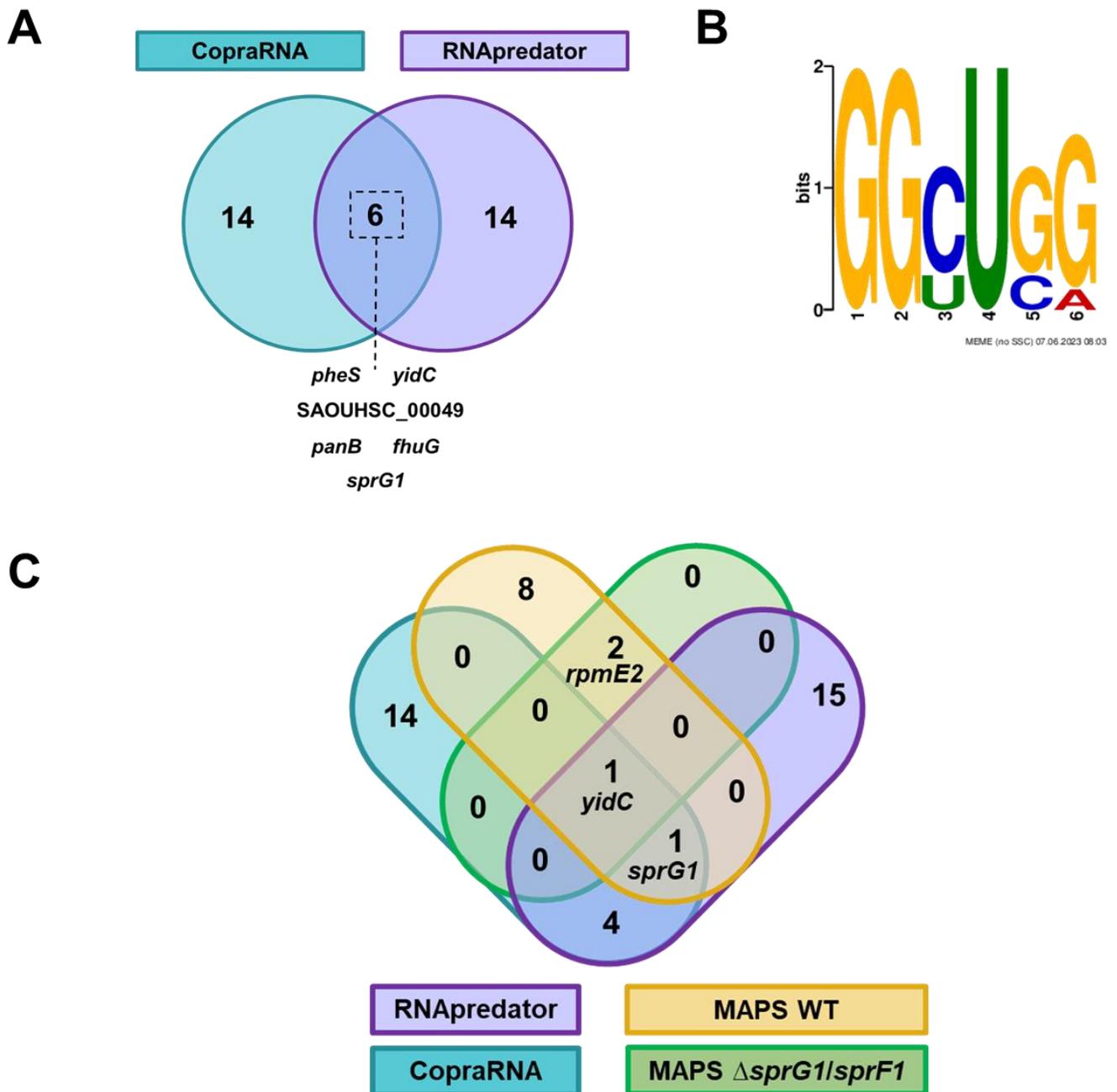
Exponentially grown *S. aureus* HG003 WT + pCN35 or WT + pCN35-*rpmE2* were harvested at OD<sub>600nm</sub> = 1.8 and resuspended in buffer A (20 mM HEPES pH 7.5, 10.5 mM MgOAc, 100 mM NH<sub>4</sub>Cl, 0.5 mM EDTA pH 8). Cells were mechanically lysed using a FastPrep apparatus (MP Biomedicals) with 500 µl of 0.1 mm glass beads (Sigma) in buffer A. The bacterial lysates were clarified by a 30 min centrifugation at 30,000 g and at 4°C. Three units of OD<sub>260nm</sub> of lysate were layered on 5–25% sucrose (w/v) gradient prepared in buffer A and equilibrated using a BioComp Gradient Master. Gradients were then centrifuged at 210,000 g at 4°C in a SW41 rotor for 2.5 h. Fractionation was performed using a BioComp Triax fractionation system.

### 3. RESULTS

#### 3.1. Identification of SprF1 targets using *in silico* predictions and MAPS

To unveil additional SprF1 RNA targets, we used predictive and experimental approaches. First, CopraRNA and RNAPredator (Eggenhofer *et al.*, 2011; Wright *et al.*, 2014) were employed to generate a list of putative RNA targets (Tables S4 and S5). Among the first 20 hits obtained from each algorithm, six were in common, suggesting that they could represent relevant SprF1 RNA targets (Fig. 1A). This includes *pheS*, *yidC*, *panB*, *fhuG*, SAOUHSC\_0049 mRNAs and the already characterized target *sprG1* mRNA (Fermon *et al.*, 2023; Pinel-Marie *et al.*, 2014). In addition, we tested whether we could decipher a consensus target interaction motif. To this end, the predicted interaction regions of the 20 targets obtained by CopraRNA were aligned using GLAM2 (Bailey *et al.*, 2009). A 6 nucleotides MEME consensus motif with 3 fixed positions (GGNUNN) was obtained and worked for 8 of 20 targets (Fig. 1B and S1). Apart from SAOUHSC\_00049 that did not contain a consensus motif, the five mRNA targets found in common between CopraRNA and RNAPredator, exhibit the motif. In addition to *in silico* analyses, we carried out MS2-affinity purification coupled with RNA sequencing (MAPS) (Lalaouna *et al.*, 2017). To this end, an MS2 aptamer was fused at the 5' or 3' end of SprF1 and the chimeras expressed under the control of an anhydrotetracycline (aTc) inducible promoter in HG003 wild type (WT) or in  $\Delta sprG1/sprF1$  strain to avoid SprF1 titration by *sprG1* mRNA. Overall, the presence of an insert in pRMC2 did not alter the bacterial fitness in TSB (Fig. S2A). Then, northern blot indicated that a 5 min induction using aTc was sufficient to overexpress *ms2*-SprF1 and SprF1-*ms2* (Fig. S2B). Therefore, MAPS was carried out at 2 h of growth and after a 5 min aTc induction. Target fraction, obtained after RNA elution, showed an enrichment of the SprF1 chimeras demonstrating an effective MS2p binding (Fig. S2C). Similarly, detection of *sprG1* in the target fraction of HG003 (left panel) validated successful recovery of SprF1-target complexes, whereas it was absent in the complexes extracted from  $\Delta sprG1/sprF1$  strain (Fig. S2C, right panel). After RNAseq, DESeq2 was used to identify significantly enriched RNAs in strains overexpressing the SprF1 chimeras (fold-change >2 and p-value  $\leq 0.05$ ) versus strains expressing MS2 alone. We collated the data from the four MAPS experiments (WT and  $\Delta sprG1/sprF1$ , *ms2*

fused with the 5' or 3' end of SprF1) and identified a total of 12 SprF1 putative RNA targets (Table 1).



**Figure 1: Identification of SprF1 mRNAs targets using *in silico* and MAPS approaches.** (A) Venn diagram showing cooperation between RNApredator and CopraRNA to predict SprF1 mRNA targets. Common targets are among the first 20 targets predicted by RNApredator and the first 20 targets predicted by CopraRNA (10 first CopraRNA targets obtained using a window around the start codon (-50 to +200) and 10 first CopraRNA targets surrounding the stop codon (-200 to +50)). (B) MEME consensus interaction motif of SprF1 with its RNA targets, determined using the GLAM2 tool. (C) Venn diagram showing the number of common RNA targets of SprF1 between *in silico* and MAPS analyses.

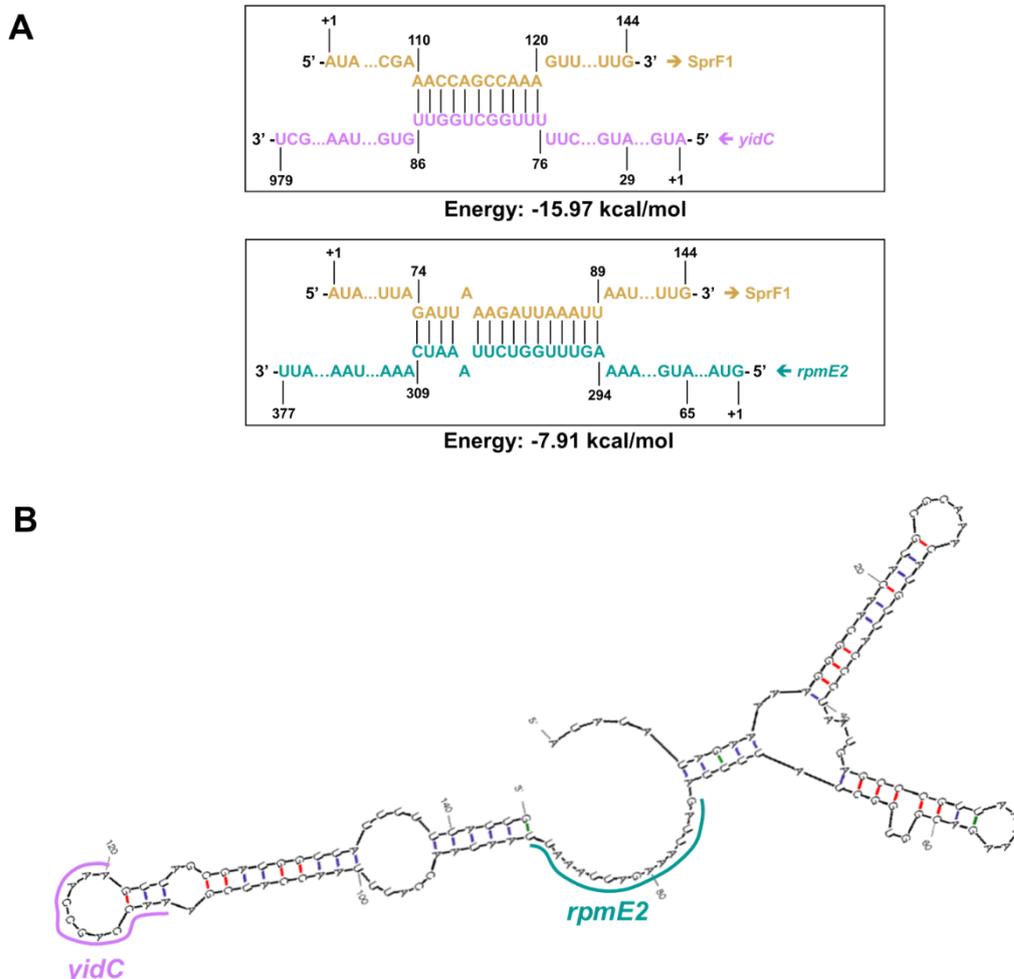
**Table 1. List of RNAs significantly co-purified with MS2 fused to SprF1.** Targets enriched only with the HG003 WT strain are indicated by an asterisk. The other targets were enriched in the WT and  $\Delta sprG1/sprF1$  ( $\Delta\Delta$ ) strains. RNA fold change and *p*-values were calculated using DESeq2 from three independent experiments. The values are indicated according to the strain and to the location of the MS2 aptamer on SprF1. A minus sign indicates that the target was not significantly enriched in this condition.

Gene ID	Gene name	Product	RNA fold change				<i>p</i> -value			
			WT MS2-SprF1	WT SprF1-MS2	$\Delta\Delta$ MS2-SprF1	$\Delta\Delta$ SprF1-MS2	WT MS2-SprF1	WT SprF1-MS2	$\Delta\Delta$ MS2-SprF1	$\Delta\Delta$ SprF1-MS2
SAOUHSC_02176*	<i>sprG1</i>	SprG1 toxin	12.13	24.87	-	-	4.45E-06	3.48E-04	-	-
SAOUHSC_02327	<i>yidC</i>	Protein insertase?	8.69	6.72	20.10	17.11	5.66E-06	3.24E-05	2.93E-10	3.55E-05
SAOUHSC_02361	<i>rpmE2</i>	50S ribosomal protein L31	17.09	-	7.49	-	6.96E-24	-	9.87E-04	-
SAOUHSC_00826*	-	Uncharacterized protein	8.26	-	-	-	3.59E-04	-	-	-
SAOUHSC_01803*	-	Uncharacterized protein	4.11	-	-	-	3.14E-03	-	-	-
SAOUHSC_01504*	<i>fer</i>	Ferredoxin	6.23	-	-	-	8.66E-03	-	-	-
SAOUHSC_02816*	-	Uncharacterized protein	5.59	-	-	-	4.12E-02	-	-	-
SAOUHSC_00335*	-	Uncharacterized protein	4.56	-	-	-	5.36E-02	-	-	-
SAOUHSC_00334*	-	Uncharacterized protein	-	22.81	-	-	-	7.38E-07	-	-
SAOUHSC_01789	-	Uncharacterized protein	-	11.02	-	5.88	-	1.67E-05	-	5.16E-02
SAOUHSC_00529*	<i>fusA</i>	Elongation factor G	-	2.24	-	-	-	2.81E-02	-	-
SAOUHSC_02491*	<i>secY</i>	Preprotein translocase subunit SecY	-	3.33	-	-	-	2.88E-02	-	-

Among them, three mRNAs (*yidC*, *rpmE2* and SAOUHSC\_01789) were retrieved in the two genetic backgrounds, regardless of the chimera used, whereas nine (including *sprG1*) were only found with the WT strain (Table 1). Specifically, in the WT expressing *ms2*-SprF1, *yidC* and *rpmE2* were enriched by 8.69- and 17.09-fold, respectively. Conversely, SAOUHSC\_01789 was enriched by 11.02-fold in the WT only under overexpression of SprF1-*ms2*. Then, we combined *in silico* and MAPS outputs and showed that *yidC* is a common hit in all analyses, strengthening the likelihood that it is a potent SprF1 target (Fig. 1C). *yidC* encodes a putative membrane insertase allowing membrane proteins insertion and is conserved in Gram-positive and Gram-negative bacteria with homologues in chloroplasts and in mitochondria (Oswald *et al.*, 2021). With regard to *rpmE2* and SAOUHSC\_01789, none of these targets were recovered *in silico* (Fig. 1C). Since SAOUHSC\_01789 was annotated as uncharacterized protein, we discarded it from subsequent analyses and focused on *yidC* and *rpmE2*, the latter encoding a 50S ribosomal protein (L31) which could link SprF1 role in persister formation and ribosome binding (Pinel-Marie *et al.*, 2021).

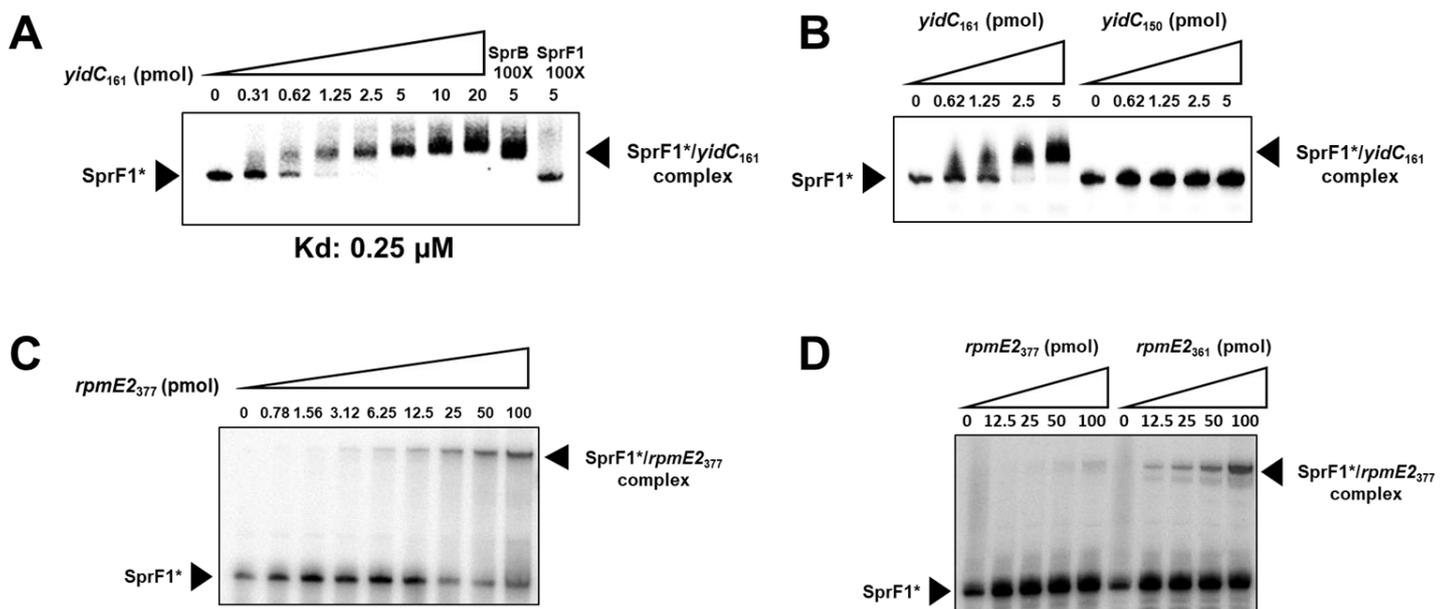
### 3.2. *yidC* and *rpmE2* interact with SprF1 *in vitro*

To investigate and characterize the molecular interactions between SprF1 and its putative targets *in vitro*, we first determined the mRNA boundaries of *yidC* and *rpmE2* by RACE. Using terminator 5'-phosphate dependent exonuclease and RNA 5'-polyphosphatase to enrich mRNAs that contain a 5' triphosphate Transcription Start Site (TSS), we found that the *yidC* transcript is of 979 nucleotides length and that *rpmE2* mRNA is of 377 (Fig. S3). Based on the *yidC* and *rpmE2* mRNAs mapped sequences, we used the IntaRNA program (Mann *et al.*, 2017), to predict inter-molecular base-pairings (Fig. 2A). For *yidC*, a 11 nucleotides region, localized shortly after the AUG start codon, was predicted to interact with nucleotides +110 to +120 of SprF1 with a robust energy of -15.97 kcal/mol (Fig. 2A, 2B and S3A). Interestingly, the MEME consensus motif (GGCUGG) belongs to the RNA sequence predicted to form a duplex with SprF1 (Fig. 1B, 2A and S3A).



**Figure 2: Putative interactions between SprF1 and *yidC* or *rpmE2* mRNAs and secondary structure prediction. (A)** Prediction of the base-pairing region between SprF1 and *yidC* or *rpmE2* using IntaRNA software. The predicted energies of interaction are indicated below the boxes. **(B)** Secondary structure of the SprF1 RNA using the Mfold program. The putative interaction region between SprF1 and *yidC* is underlined in purple and the one between SprF1 and *rpmE2* is in green.

Regarding *rpmE2*, a 16 nucleotides region, localized just before the UAA stop codon, was predicted to interact with nucleotides +74 to +89 of SprF1 with a moderate energy of -7.91 kcal/mol (Fig. 2A, 2B and S3B). Based on Mfold RNA secondary structure prediction and IntaRNA, the SprF1 nucleotides involved in targets recognition are distant, suggesting that SprF1 may interact with several targets using independent motifs (Fig. 2B). Additionally, the SprF1 nucleotide sequences predicted to interact with *yidC* and *rpmE2* belong to a stem-loop or a single strand region, respectively. To verify that these predicted base-pairing are involved in the interaction between SprF1 and *yidC* or *rpmE2*, gel retardation assays were carried out (Fig. 3 and S4). Since *yidC* gene encodes an mRNA of 979 nucleotides, we generated a 161-nucleotides fragment (*yidC*<sub>161</sub>) which contains the predicted interaction site. SprF1 formed a complex with *yidC*<sub>161</sub> *in vitro*, with an estimated apparent Kd of ~0.25  $\mu$ M (Fig. 3A).

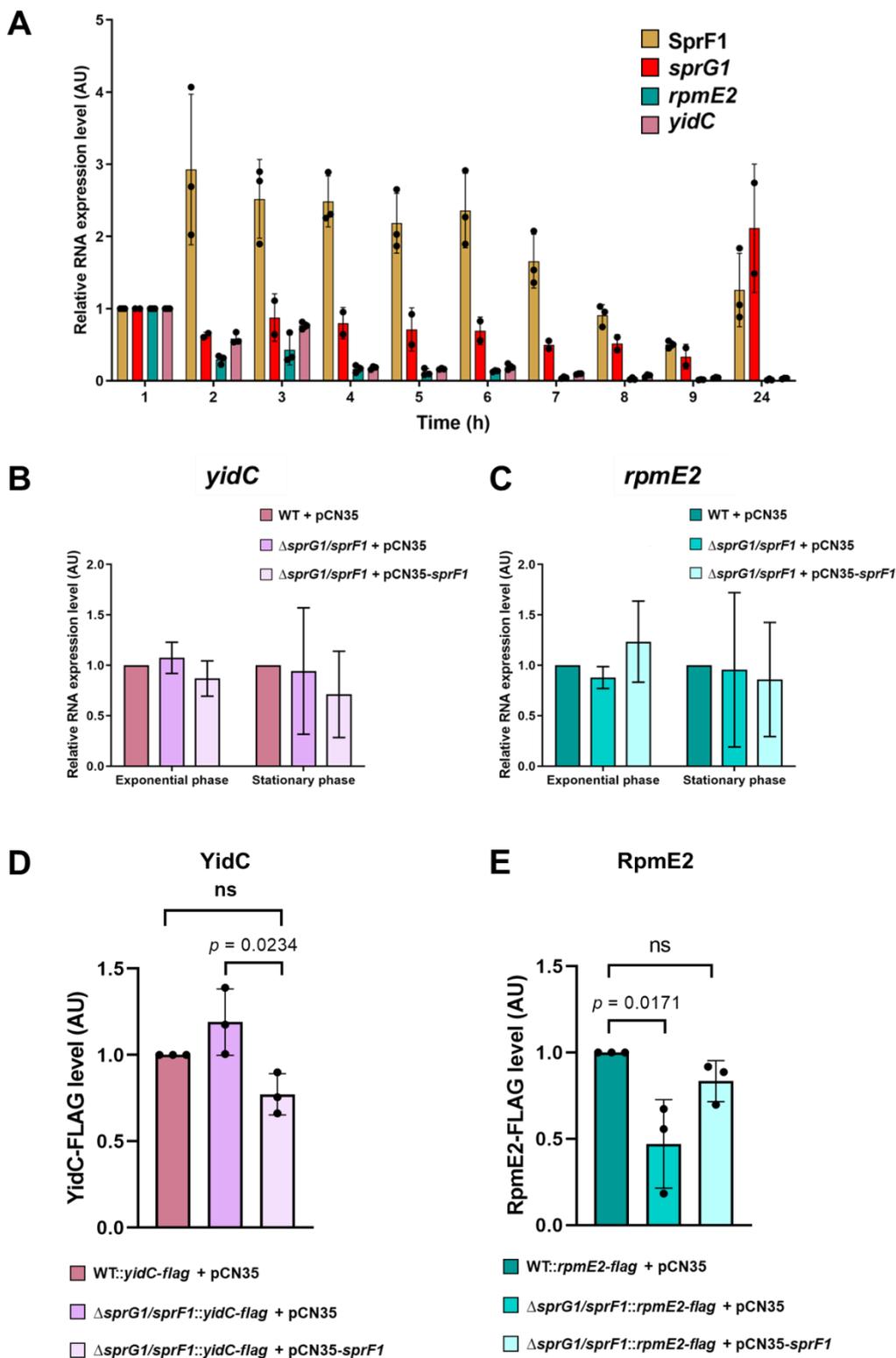


**Figure 3: Electrophoretic mobility shift assays to monitor SprF1 binding to *yidC* or *rpmE2* mRNAs.** (A) The SprF1 radiolabeled antitoxin (0.05 pmol) was incubated with increasing amount (0 to 20 pmol) of a *yidC* mRNA transcript containing the predicted interaction zone (*yidC*<sub>161</sub>). Competition assays were done with a 100-fold molar excess of SprB sRNA (5 pmol) or with a 100-fold molar excess of unlabeled SprF1 (5 pmol) compared to radiolabeled SprF1. The Kd value (0.25  $\mu$ M) was established as the *yidC* mRNA concentration that allows 50% of SprF1 binding. (B) The SprF1 radiolabeled antitoxin (0.05 pmol) was incubated with increasing amount (0 to 5 pmol) of the *yidC*<sub>161</sub> RNA or with a *yidC*<sub>150</sub> RNA deleted for the sequence predicted to interact with SprF1. (C) The SprF1 radiolabeled RNA (0.05 pmol) was incubated with increasing amount (0 to 100 pmol) of a *rpmE2*<sub>377</sub> mRNA. (D) The SprF1 radiolabeled RNA (0.05 pmol) was incubated with increasing amount (0 to 100 pmol) of the *rpmE2*<sub>377</sub> mRNA or with a *rpmE2*<sub>361</sub> RNA deleted for the sequence predicted to interact with SprF1.

The addition of an excess (100X) of another RNA (SprB) did not disturb the interaction between SprF1 and *yidC*<sub>161</sub> whereas an excess of unlabeled SprF1 displaced the complex, suggesting that the interaction is specific (**Fig. 3A, last two lanes**). To strengthen this hypothesis, we performed additional EMSAs. First, the production of a *yidC* transcript lacking the predicted base-pairing region (*yidC*<sub>150</sub>) did not retard the migration of SprF1 (**Fig. 3B**). Second, we conducted compensatory mutations experiments (**Fig. S4**). To evidence that the six nucleotides that belong to the MEME motif are critical for *yidC* recognition, a SprF1 transcript variant (SprF1<sub>inv</sub>) mutated in the MEME motif and a *yidC* compensatory mutated transcript (*yidC*<sub>161\_inv</sub>) were used. As anticipated, a complex was observed between SprF1<sub>inv</sub> and *yidC*<sub>161\_inv</sub> but not between SprF1<sub>inv</sub> and *yidC*<sub>161</sub> or *yidC*<sub>161\_inv</sub> and SprF1, confirming the role of the MEME motif (**Fig. S3A and S4**). Regarding *rpmE2*, its interaction with SprF1 was not as robust as the one observed between *yidC* and SprF1 (**Fig. 3C and 3D**). A large amount of *rpmE2* was required to obtain a SprF1/*rpmE2* complex but was not sufficient to bind all radiolabelled SprF1, preventing the determination of an accurate K<sub>d</sub>. Deletion of a 16 nucleotides region of *rpmE2* predicted to interact with SprF1 was not sufficient to impede the formation of the SprF1/*rpmE2* complex suggesting that another region, not predicted by IntaRNA, may be involved (**Fig. 3D**). Taken together, our data indicate that SprF1 RNA antitoxin can interact with *yidC* and *rpmE2* mRNAs *in vitro*.

### 3.3. Role of SprF1 on *rpmE2* and *yidC* RNA and protein level

To further investigate the role of SprF1 onto *yidC* and *rpmE2* expression, we monitored their transcript level every hour during bacterial growth (**Fig. 4A**). Overall, SprF1 transcript level quickly increases (around three-fold) then progressively decreases to a minimum after 9h of growth. Conversely, the RNA level of *yidC* and *rpmE2* gradually decrease overtime. In parallel, we monitored *sprG1*, whose transcript level decreases overtime except under late stationary phase where it increases by around two-fold. We also compared the molecular ratio between SprF1 and the three targets. It revealed that the antitoxin RNA level is higher than *sprG1* (its known target), *yidC* and *rpmE2* (**Fig. S5**), suggesting that there is enough SprF1 available within the bacterium to regulate more than one mRNA target.



**Figure 4: SprF1 antitoxin represses the expression of YidC and stabilizes the expression of RpmE2.** (A) Expression level of SprF1, *sprG1*, *yidC* and *rpmE2* during growth. RNA transcript levels were monitored every hour by RT-qPCR. Data were normalized to the level of *gyrB* mRNA. Then, each RNA transcript level was compared to the RNA level at 1h of growth, which was set to 1. Error bars show the means and standard deviations of three independent biological replicates (n = 3). AU refers to arbitrary unit. (B-C) Effect of SprF1 on *yidC* and *rpmE2* mRNAs expression. Transcript levels were compared during exponential (2h) or stationary (6h) phases for HG003 WT + pCN35,  $\Delta$ *sprG1/sprF1* + pCN35 and  $\Delta$ *sprG1/sprF1* + pCN35-*sprF1* strains. Data were normalized to the level of *gyrB* mRNA expression. The RNA level in HG003 WT + pCN35 strain was set to 1. Error bars show the means and standard deviations of at least three independent biological replicates. Statistical significance was calculated with a two-tailed unpaired *t*-test. AU refers to arbitrary unit. (D-E) SprF1 modulates YidC-FLAG and RpmE2-FLAG proteins expression. After protein extraction during exponential phase (3-4h), the expression of YidC-FLAG or RpmE2-FLAG proteins were analyzed by western blots by using anti-FLAG antibodies. To compare YidC-FLAG (D) or RpmE2-FLAG (E) expression between the strains, data from western blot images were quantified with ImageQuant software. Proteins expression were compared to the protein expression in the HG003 WT::*yidC-flag* + pCN35 or WT::*rpmE2-flag* + pCN35 strains, which were set to 1. Error bars show the means and standard deviations of three independent experiments (n = 3). Statistical significance was calculated with one-way ANOVA. AU refers to arbitrary unit.

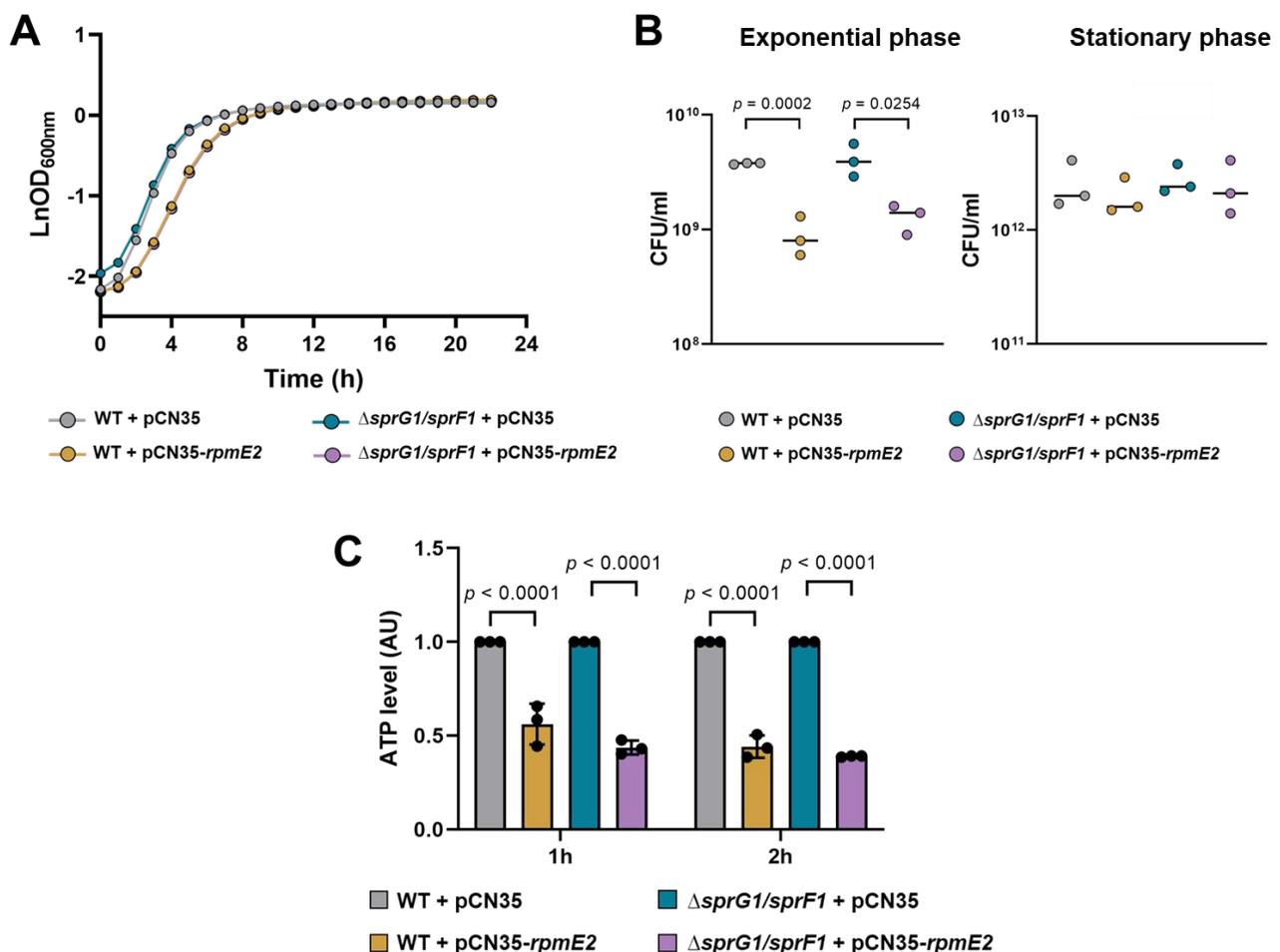
Then, to verify whether the expression of SprF1 could alter target mRNA level, the *yidC* and *rpmE2* relative expression levels were compared in the WT + pCN35,  $\Delta sprG1/sprF1$  + pCN35 (deleted for *sprG1/sprF1* TA system) and  $\Delta sprG1/sprF1$  + pCN35-*sprF1* (overexpressing *sprF1*) strains (**Fig. 4B and 4C**). Whether in exponential or stationary growth phase, no significant differences were observed in the deleted or overexpressing strain, indicating that SprF1 has no impact on the *yidC* and *rpmE2* transcript levels.

Considering *yidC* and *rpmE2* mRNAs are at their highest level during the exponential growth (**Fig. 4A**), we therefore questioned whether SprF1 is able to modulate their translational level at this specific phase. To that aim, a FLAG epitope was added at the 3' end of *yidC* or *rpmE2* gene in WT and  $\Delta sprG1/sprF1$  strains. Proteins levels were visualized by chemiluminescence using an anti-FLAG antibody. First, we verified that the antibody could specifically detect the tagged proteins (**Fig. S6**). Protein bands located near 25 kDa and 15 kDa were indeed detected, corresponding to YidC-FLAG and RpmE2-FLAG proteins, respectively. Conversely, no signal was detected in the strains lacking FLAG epitope. Then, YidC and RpmE2 expression was monitored in exponential phase (3-4 h) (**Fig. 4D and 4E**). Whereas the deletion of *sprG1/sprF1* locus has no effect on YidC-FLAG protein expression, YidC-FLAG decreased by around 20% ( $p = 0.0234$ ) in the  $\Delta sprG1/sprF1$  strain upon SprF1 overexpression, suggesting that the RNA antitoxin may impede YidC translation (**Fig. 4D**). In contrast, RpmE2-FLAG level was reduced by around 50% ( $p = 0.0171$ ) in the  $\Delta sprG1/sprF1::rpmE2-flag$  + pCN35 strain and restored in the  $\Delta sprG1/sprF1::rpmE2-flag$  + pCN35-*sprF1* strain, indicating that SprF1 expression is beneficial to promote RpmE2 expression (**Fig. 4E**). Altogether, these data show that SprF1 binding onto *yidC* or *rpmE2* can modulate their protein levels during exponential growth phase.

### 3.4. *rpmE2* overexpression mediates antibiotic tolerance

So far, our study showed that, besides *sprG1*, SprF1 can also interact and regulate the expression of other players. Previous work demonstrated the role of SprF1 in antibiotic persistence through its binding onto ribosomes (Pinel-Marie *et al.*, 2021), and it is known that ribosomal protein level is altered (up- or down-regulated) in persisters (Huemer *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2024). Knowing that *rpmE2* encodes a ribosomal protein and is essential in *S. aureus* (Chaudhuri *et al.*, 2009), we

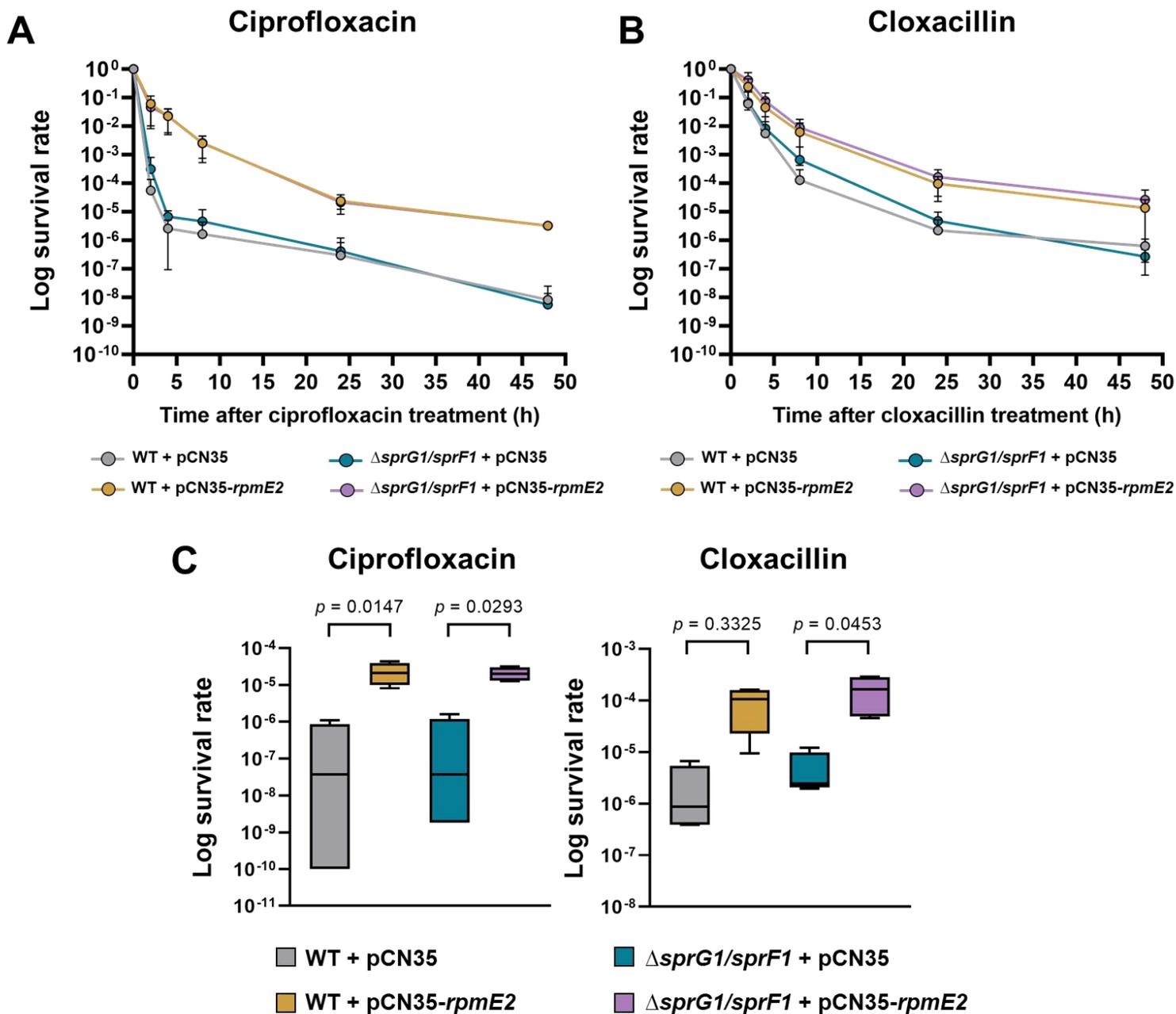
investigated its potential role in persister formation by cloning *rpmE2* under the control of its endogenous promoter into the pCN35 high-copy number plasmid, allowing its overexpression (Fig. S7). To determine whether *rpmE2* overexpression has an impact on overall bacterial fitness, we conducted growth assays in TSB. Interestingly, *rpmE2* overexpression led to a growth delay in both WT and  $\Delta sprG1/sprF1$  strains (Fig. 5A). We therefore wondered whether this OD<sub>600nm</sub> delay was due to a reduction in bacterial CFU or to a reduction of bacterial size. CFU counting revealed that, in exponential growth phase (4h), the number of bacteria is significantly reduced, indicating that the growth delay was due to a decreased number of bacteria (Fig. 5B). In contrast, during the stationary growth phase (8h) (*i.e* when the final OD<sub>600nm</sub> are similar) CFU numbers were in the same order.



**Figure 5: *rpmE2* overexpression impairs *Staphylococcus aureus* growth and alter intracellular ATP level.** (A) Growth curves of *S. aureus* HG003 WT and  $\Delta sprG1/sprF1$  strains carrying pCN35 or pCN35-*rpmE2* plasmids. Cells were grown in TSB supplemented with 10  $\mu$ g/ml chloramphenicol. Error bars depict means and standard deviation of three biological replicates (n = 3). (B) At exponential (4h) or stationary (8h) phases, samples were collected and plated to enumerate the CFU number. Error bars depict means and standard deviation of three biological replicates (n = 3). Statistical significance was calculated with a two-tailed unpaired *t*-test. (C) HG003 WT and  $\Delta sprG1/sprF1$  strains carrying pCN35 or pCN35-*rpmE2* plasmids were cultured in TSB medium. At each time point, bacteria were resuspended in MH and incubated with BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay. Luminescence values were normalized with OD<sub>600nm</sub> and compared to the value obtained for the WT + pCN35 or  $\Delta sprG1/sprF1$  + pCN35 strains which were set to 1. Error bars depict means and standard deviation of three biological replicates (n = 3). Statistical significance was calculated with the two-way ANOVA. AU refers to arbitrary unit.

Therefore, we attributed the growth delay to an overall alteration of *S. aureus* metabolism, which would be slowed down. Thus, we investigated the ATP level at the beginning of bacterial growth (**Fig. 5C**). A significant drop in intracellular ATP concentration was measured in strains overexpressing *rpmE2* that could explain why these strains take longer to enter in exponential phase of growth.

Next, to find out whether the overexpression of *rpmE2* has an impact on *S. aureus* tolerance and/or persistence, time-kill assays were carried out using ciprofloxacin or cloxacillin at 100x the MIC (**Fig. 6 and Table S6**). In the presence of ciprofloxacin, persister formation was evidenced by a typical biphasic killing curve for the WT + pCN35 and  $\Delta sprG1/sprF1$  + pCN35 strains (**Fig. 6A**). Conversely, the overexpression of *rpmE2* significantly modified the shape of the curve suggesting that *rpmE2* overexpression rather induce tolerance to ciprofloxacin. Cloxacillin, on the other hand, already induced a tolerant phenotype for the parental strains, which was exacerbated when *rpmE2* is overexpressed (**Fig. 6B**). Hence, we observed a significant increase in the survival of strains overexpressing *rpmE2* 24h after ciprofloxacin or cloxacillin treatment (**Fig. 6C**). Determination of MDK<sub>99</sub> and MDK<sub>99,99</sub> values showed a 5-fold increase and a 9-fold increase for the MDK<sub>99</sub> and the MDK<sub>99,99</sub> under ciprofloxacin, respectively. A 2-fold increase and a 2-fold increase was measured for the MDK<sub>99</sub> and for the MDK<sub>99,99</sub> under cloxacillin, confirming that *rpmE2* overexpression increases tolerance to antibiotics (**Table 2**). However, time-kill assays revealed that the deletion of *sprF1* did not modify the tolerant phenotype induced by *rpmE2*, suggesting that in our experimental conditions, SprF1 do not modulate the effect of *rpmE2* overexpression. Collectively, these results demonstrate that *rpmE2* overexpression leads to an increase in tolerance against antibiotics belonging to different classes.



**Figure 6: *rpmE2* overexpression leads to *Staphylococcus aureus* antibiotic tolerance.** Bacteria were cultured in MH medium during 2h before ciprofloxacin (100x MIC) (A) or cloxacillin (100x MIC) (B) addition. At each time point, samples were collected, washed and plated to enumerate the survivors. Data were normalized to CFU values before antibiotic addition (t = 0). The results are shown as time-kill curves and error bars depict means and standard deviation of 4 independent experiments (n = 4). (C) 24h ciprofloxacin or cloxacillin survival of HG003 WT and  $\Delta sprG1/sprF1$  strains carrying pCN35 or pCN35-*rpmE2* plasmids. Box plot shows distribution of 4 independent experiments data (n = 4). Statistical significance was calculated with one-way ANOVA.

**Table 2. Ciprofloxacin and cloxacillin MDK<sub>99</sub> and MDK<sub>99,99</sub> values.** MDK values refer to the minimum duration for killing 99% (MDK<sub>99</sub>) or 99.99% of the population (MDK<sub>99,99</sub>) after antibiotic treatment. MDK<sub>99</sub> and MDK<sub>99,99</sub> values were determined for HG003 WT + pCN35, WT + pCN35-*rpmE2*,  $\Delta$ *sprG1/sprF1* + pCN35 and  $\Delta$ *sprG1/sprF1* + pCN35-*rpmE2* strains after ciprofloxacin or cloxacillin treatment.

Strain	Ciprofloxacin		Cloxacillin	
	MDK <sub>99</sub> (h)	MDK <sub>99,99</sub> (h)	MDK <sub>99</sub> (h)	MDK <sub>99,99</sub> (h)
WT + pCN35	1	2	3.4	9
WT + pCN35- <i>rpmE2</i>	5	18.8	7	24
$\Delta$ <i>sprG1/sprF1</i> + pCN35	1.2	2.6	4	14
$\Delta$ <i>sprG1/sprF1</i> + pCN35- <i>rpmE2</i>	5	18.8	8	30

Finally, we sought to identify the mechanism underlying the tolerant phenotype induced by *rpmE2* overexpression. In *E. coli*, RpmE2 is involved in ribosomes 70S dimerization into 100S ribosomes (Ueta *et al.*, 2017), which are inactive and can lead to the formation of persistent bacteria (Song and Wood, 2020). We therefore analyzed by sucrose density gradient fractionation whether the overexpression of *rpmE2* modified the fractionation profile and especially the amount of 100S ribosomes between WT + pCN35 and WT + pCN35-*rpmE2*. Although we could detect the different ribosomal fractions (Fig. S8A and S8B), superposition of fractionation profiles did not evidence any effect of RpmE2 onto ribosomes hibernation. Taken together, our results suggest that RpmE2-mediated antibiotic tolerance is not driven by 100S ribosomes dimer formation in *S. aureus*.

#### 4. DISCUSSION

TA systems are widespread modules in bacteria in which it is considered that the antitoxin's function is often restricted to inhibiting the cognate toxin activity. However, within the last few years emerged the concept that some antitoxin may exhibited bifunctional activities (Pinel-Marie *et al.*, 2021; Song *et al.*, 2021). Here, we used *in silico* and MAPS approaches to identify additional mRNA targets of the bifunctional SprF1 RNA antitoxin. Of these, we recovered the *sprG1* mRNA, a known SprF1 target, confirming the robustness of these methods to unveil novel SprF1 targets (Fig. 1C). To deepen the contribution of SprF1 in *S. aureus* adaptation, we focused on *yidC* and *rpmE2* mRNAs (Table 1). *yidC* encodes an insertase protein that enable the bacterium to adapt to its environment by modulating the protein composition of its membrane (Fuchs *et al.*, 2018; Oswald *et al.*, 2021).

*rpmE2* encodes a ribosomal protein located in the 50S subunit of the ribosome (Fuchs *et al.*, 2018) and is referred as an essential gene (Chaudhuri *et al.*, 2009). First, we confirmed by gel retardation assays that SprF1 can interact with these two mRNAs *in vitro* (Fig. 2 and 3). These experiments showed that SprF1 has a higher affinity for *yidC* than for *rpmE2*, in agreement with *in silico* predictions (Fig. 2A). Moreover, *yidC* was found in both *in silico* and MAPS analyses, whereas *rpmE2* was only retrieved in the MS2-SprF1 MAPS conditions (Fig. 1C and Table 1). Although the duplex formation between SprF1 and *rpmE2* is predicted to occur in the middle of the SprF1 primary nucleotide sequence (Fig. 2B), the addition of the *ms2* sequence at the 3' end of SprF1 may impact its secondary structure and affect its ability to efficiently bind its targets. A similar trend was observed with the addition of the aptamer at the 5' end of RNAIII, preventing the identification of already known targets (Hallier *et al.*, 2024). In parallel, the use of GLAM2 supports the fact that there is not a binding motif on *rpmE2* that is shared with other targets as opposition to *yidC* which contains the 6 nucleotides MEME interaction motif (Fig. 1A, 1B, S1 and S3A). The absence of this motif may provide an explanation for the low affinity between *rpmE2* and SprF1 (Fig. 3C and S3B), although it cannot be excluded that a third party is needed to stabilize the interaction between SprF1 and *rpmE2*. Indeed, whereas RNA binding proteins, such as the RNA matchmaker Hfq, play a crucial role in sRNA-mediated regulation, the presence and contribution of such a protein is not yet elucidated (Felden and Augagneur, 2021). Recent advances in *S. aureus* on RNA-RNA interactome using CLASH suggest that, to some extent, RNase III is necessary to purify sRNA-mRNA complexes (McKellar *et al.*, 2022; Mediati *et al.*, 2022). Whether RNase III or another protein intervene in the regulation of *rpmE2* expression by SprF1 remains to be discovered.

Based on the analysis of transcript levels, SprF1 does not have any effect on *yidC* and *rpmE2* mRNA levels, suggesting that RNase III is probably not recruited to degrade the RNA duplexes. However, our results suggest that the RNA antitoxin regulates their expression at the translational level. The decrease in YidC-FLAG protein expression under SprF1 overexpression suggests that SprF1 may inhibit YidC translation, with a precise mechanism of action not yet elucidated. Interestingly, YidC is responsible for integrating the c subunit of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATPase into the membrane (Xie and Dalbey, 2008). Thus, inhibition of YidC expression by SprF1 could therefore reduce the

integration of the ATPase at the membrane, causing a decrease in ATP concentration and promoting the formation of persisters (Beam *et al.*, 2021). In our MAPS analysis, we also identified *secY* as a putative SprF1 target (Table 1). This mRNA encodes a subunit of the Sec apparatus that, as YidC, transports proteins across the cytoplasmic membrane (Oswald *et al.*, 2021). By identifying two targets involved in inner membrane proteins insertion, our results suggest that SprF1 may be involved in the regulation of the membrane proteins insertion pathways. Indeed, it is now admitted that many regulatory RNAs are devoted to specific pathways and biological processes (Coronel-Tellez *et al.*, 2022), and this may be the case for RNA antitoxins.

Conversely to YidC-FLAG, our study indicate that SprF1 is an activator of RpmE2 expression. This suggest that SprF1, through various regulatory regions is able to bind either *yidC*, *rpmE2* or *sprG1*. This is supported by the study of their relative molecular ratio (Fig. S5) and the prediction and characterization of the interacting domains. Also, these domains do not overlap with the 5' purine-rich sequence, known to interact with ribosomes to attenuate translation initiation and promote persisters formation (Pinel-Marie *et al.*, 2021).

Analysis of the effect of *rpmE2* revealed that its overexpression contributes to ciprofloxacin and cloxacillin tolerance. Previous studies showed that *rpmE2* expression is increased in *S. aureus* persisters (Huemer *et al.*, 2021) and that the expression of ribosomal proteins is modified in persisters (Liu *et al.*, 2024). These observations corroborate our results regarding the tolerance induced by *rpmE2* overexpression. Although we showed that SprF1 interacts with *rpmE2*, *rpmE2* overexpression induces an identical tolerant phenotype in the HG003 WT and  $\Delta$ *sprG1/sprF1* strains. This suggests that, in these conditions, the SprF1 transcript level may not be sufficient to regulate RpmE2 expression and that the *in vivo* regulation is probably fine. Additionally, ribosome fractionation assays showed that *rpmE2* overexpression does not promote ribosomal hibernation, suggesting that the function of RpmE2 in *S. aureus* differs from its *E. coli* ortholog (Ueta *et al.*, 2017). However, our results do not exclude the hypothesis that, upon antibiotic exposure, RpmE2 overexpression could modulate ribosome hibernation to induce antibiotic tolerance. To test this hypothesis, it might be interesting to compare the ribosomes fractionation profiles of the HG003 WT and WT *rpmE2* overexpressing strains in antibiotic-tolerance conditions.

Overall, our data show that SprF1 is a multifaceted type I RNA antitoxin enable to interact with several mRNA targets. Apart from its main function, which is to regulate the expression of the cognate toxin SprG1, SprF1 could be implicated in *S. aureus* adaptation to antibiotic stress to favour the formation of persisters, not only by binding the ribosome (Pinel-Marie *et al.*, 2021), but also by regulating RpmE2 expression.

### Author contributions

**EO:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Software, Writing - original draft, Writing - review & editing. **MH:** Data curation, Formal analysis, Methodology. **SD:** Data curation. **YA:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Software, Supervision, Validation, Visualization, Writing - review & editing, Writing - original draft. **M-LP-M:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Project administration, Resources, Software, Supervision, Validation, Visualization, Writing - review & editing, Writing - original draft.

### Acknowledgements

We are most grateful to Biogenouest Genomics, AnaEE-Fr and the EcogenO core facility of Rennes (OSUR) for its technical support.

### Funding

This work was funded by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the University of Rennes, Agence de l'Innovation et Défense (AID) (to E.O.), Région Bretagne (to E.O.) and the French Medical Research Foundation (FRM), Grant number: FDT202304016391 (to E.O.).

**Conflict of interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.

## REFERENCES

- Antal, M., Bordeau, V., Douchin, V., Felden, B., 2005. A small bacterial RNA regulates a putative ABC transporter. *J Biol Chem* 280, 7901–7908. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413071200>
- Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* 399, 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Bailey, T.L., Boden, M., Buske, F.A., Frith, M., Grant, C.E., Clementi, L., Ren, J., Li, W.W., Noble, W.S., 2009. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res* 37, W202-208. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp335>
- Beam, J.E., Wagner, N.J., Shook, J.C., Bahnson, E.S.M., Fowler, V.G., Rowe, S.E., Conlon, B.P., 2021. Macrophage-produced peroxydinitrite induces antibiotic tolerance and supersedes intrinsic mechanisms of persister formation. *Infect Immun* 89, e0028621. <https://doi.org/10.1128/IAI.00286-21>
- 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. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04786-3>
- Brückner, R., 1997. Gene replacement in *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus xylosus*. *FEMS Microbiol Lett* 151, 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10387.x>
- 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.6076-6085.2004>
- Chaudhuri, R.R., Allen, A.G., Owen, P.J., Shalom, G., Stone, K., Harrison, M., Burgis, T.A., Lockyer, M., Garcia-Lara, J., Foster, S.J., Pleasance, S.J., Peters, S.E., Maskell, D.J., Charles, I.G., 2009. Comprehensive identification of essential *Staphylococcus aureus* genes using Transposon-Mediated Differential Hybridisation (TMDH). *BMC Genomics* 10, 291. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-291>
- Coronel-Tellez, R.H., Pospiech, M., Barrault, M., Liu, W., Bordeau, V., Vasnier, C., Felden, B., Sargueil, B., Bouloc, P., 2022. sRNA-controlled iron sparing response in *Staphylococci*. *Nucleic Acids Res* 50, 8529–8546. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac648>
- Corrigan, R.M., Foster, T.J., 2009. An improved tetracycline-inducible expression vector for *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* 61, 126–129. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2008.10.001>
- Dörr, T., Lewis, K., Vulić, M., 2009. SOS response induces persistence to fluoroquinolones in *Escherichia coli*. *PLoS Genet* 5, e1000760. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000760>
- Dörr, T., Vulić, M., Lewis, K., 2010. Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biol* 8, e1000317. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000317>
- Eggenhofer, F., Tafer, H., Stadler, P.F., Hofacker, I.L., 2011. RNApredator: fast accessibility-based prediction of sRNA targets. *Nucleic Acids Res* 39, W149-154. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr467>
- Felden, B., Augagneur, Y., 2021. Diversity and versatility in small RNA-mediated regulation in bacterial pathogens. *Front Microbiol* 12, 719977. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.719977>
- Fermon, L., Burel, A., Ostyn, E., Dréano, S., Bondon, A., Chevance, S., Pinel-Marie, M.-L., 2023. Mechanism of action of *sprG1*-encoded type I toxins in *Staphylococcus aureus*: from membrane alterations to mesosome-like structures formation and bacterial lysis. *Front Microbiol* 14, 1275849. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1275849>
- Fisher, R.A., Gollan, B., Helaine, S., 2017. Persistent bacterial infections and persister cells. *Nat Rev Microbiol* 15, 453–464. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.42>
- Fuchs, S., Mehlan, H., Bernhardt, J., Hennig, A., Michalik, S., Surmann, K., Pané-Farré, J., Giese, A., Weiss, S., Backert, L., Herbig, A., Nieselt, K., Hecker, M., Völker, U., Mäder, U., 2018. AureoWiki-The repository of the *Staphylococcus aureus* research and annotation community. *Int J Med Microbiol* 308, 558–568. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.11.011>
- Gollan, B., Grabe, G., Michaux, C., Helaine, S., 2019. Bacterial persisters and infection: past, present, and progressing. *Annu. Rev. Microbiol.* 73, 359–385. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115650>

- Hallier, M., Bronsard, J., Dréano, S., Sassi, M., Cattoir, V., Felden, B., Augagneur, Y., 2024. RNAIII is linked with the pentose phosphate pathway through the activation of RpiRc in *Staphylococcus aureus*. *mSphere* e0034823. <https://doi.org/10.1128/msphere.00348-23>
- 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. <https://doi.org/10.1126/science.1244705>
- Huemer, M., Mairpady Shambat, S., Bergada-Pijuan, J., Söderholm, S., Boumasmoud, M., Vulin, C., Gómez-Mejía, A., Antelo Varela, M., Tripathi, V., Götschi, S., Marques Maggio, E., Hasse, B., Brugger, S.D., Bumann, D., Schuepbach, R.A., Zinkernagel, A.S., 2021. Molecular reprogramming and phenotype switching in *Staphylococcus aureus* lead to high antibiotic persistence and affect therapy success. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118, e2014920118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2014920118>
- Jurénas, D., Fraikin, N., Goormaghtigh, F., Van Melderen, L., 2022. Biology and evolution of bacterial toxin-antitoxin systems. *Nat Rev Microbiol* 20, 335–350. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00661-1>
- Lalaouna, D., Prévost, K., Eyraud, A., Massé, E., 2017. Identification of unknown RNA partners using MAPS. *Methods* 117, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.11.011>
- Le Huyen, K.B., Gonzalez, C.D., Pascreau, G., Bordeau, V., Cattoir, V., Liu, W., Boulloc, P., Felden, B., Chabelskaya, S., 2021. A small regulatory RNA alters *Staphylococcus aureus* virulence by titrating RNAIII activity. *Nucleic Acids Res* 49, 10644–10656. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab782>
- Liu, S., Huang, Y., Jensen, S., Laman, P., Kramer, G., Zaat, S.A.J., Brul, S., 2024. Molecular physiological characterization of the dynamics of persister formation in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 68, e0085023. <https://doi.org/10.1128/aac.00850-23>
- Liu, S., Wu, N., Zhang, S., Yuan, Y., Zhang, W., Zhang, Y., 2017. Variable persister gene interactions with (p)ppGpp for persister formation in *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 8, 1795. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01795>
- Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15, 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Mann, M., Wright, P.R., Backofen, R., 2017. IntaRNA 2.0: enhanced and customizable prediction of RNA-RNA interactions. *Nucleic Acids Res* 45, W435–W439. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx279>
- McKellar, S.W., Ivanova, I., Arede, P., Zapf, R.L., Mercier, N., Chu, L.-C., Mediati, D.G., Pickering, A.C., Briaud, P., Foster, R.G., Kudla, G., Fitzgerald, J.R., Caldelari, I., Carroll, R.K., Tree, J.J., Granneman, S., 2022. RNase III CLASH in MRSA uncovers sRNA regulatory networks coupling metabolism to toxin expression. *Nat Commun* 13, 3560. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31173-y>
- Mediati, D.G., Wong, J.L., Gao, W., McKellar, S., Pang, C.N.I., Wu, S., Wu, W., Sy, B., Monk, I.R., Biazik, J.M., Wilkins, M.R., Howden, B.P., Stinear, T.P., Granneman, S., Tree, J.J., 2022. RNase III-CLASH of multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* reveals a regulatory mRNA 3'UTR required for intermediate vancomycin resistance. *Nat Commun* 13, 3558. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31177-8>
- Monk, I.R., Tree, J.J., Howden, B.P., Stinear, T.P., Foster, T.J., 2015. Complete bypass of restriction systems for major *Staphylococcus aureus* lineages. *mBio* 6, e00308-00315. <https://doi.org/10.1128/mBio.00308-15>
- Moyed, H.S., Bertrand, K.P., 1983. *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J Bacteriol* 155, 768–775. <https://doi.org/10.1128/jb.155.2.768-775.1983>
- Oswald, J., Njenga, R., Natriashvili, A., Sarmah, P., Koch, H.-G., 2021. The dynamic SecYEG translocon. *Front Mol Biosci* 8, 664241. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.664241>
- Personnic, N., Striednig, B., Lezan, E., Manske, C., Welin, A., Schmidt, A., Hilbi, H., 2019. Quorum sensing modulates the formation of virulent *Legionella* persisters within infected cells. *Nat Commun* 10, 5216. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13021-8>
- 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 Reports* 7, 424–435. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.012>

- Pinel-Marie, M.-L., Brielle, R., Riffaud, C., Germain-Amiot, N., Polacek, N., Felden, B., 2021. RNA antitoxin SprF1 binds ribosomes to attenuate translation and promote persister cell formation in *Staphylococcus aureus*. *Nat Microbiol* 6, 209–220. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00819-2>
- Riffaud, C., Pinel-Marie, M.-L., Felden, B., 2020. Cross-regulations between bacterial toxin–antitoxin systems: evidence of an interconnected regulatory network? *Trends in Microbiology* 28, 851–866. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.05.016>
- Ronneau, S., Helaine, S., 2019. Clarifying the link between toxin–antitoxin modules and bacterial persistence. *Journal of Molecular Biology* 431, 3462–3471. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.03.019>
- Said, N., Rieder, R., Hurwitz, R., Deckert, J., Urlaub, H., Vogel, J., 2009. *In vivo* expression and purification of aptamer-tagged small RNA regulators. *Nucleic Acids Res* 37, e133. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp719>
- Sassi, M., Bronsard, J., Pascreau, G., Emily, M., Donnio, P.-Y., Revest, M., Felden, B., Wirth, T., Augagneur, Y., 2022. Forecasting *Staphylococcus aureus* infections using genome-wide association studies, machine learning, and transcriptomic approaches. *mSystems* 7, e0037822. <https://doi.org/10.1128/msystems.00378-22>
- Song, S., Wood, T.K., 2020. ppGpp ribosome dimerization model for bacterial persister formation and resuscitation. *Biochem Biophys Res Commun* 523, 281–286. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.01.102>
- Song, Y., Zhang, S., Luo, G., Shen, Y., Li, C., Zhu, Y., Huang, Q., Mou, X., Tang, X., Liu, T., Wu, S., Tong, A., He, Y., Bao, R., 2021. Type II antitoxin HigA is a key virulence regulator in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Infect Dis* 7, 2930–2940. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.1c00401>
- Ueta, M., Wada, C., Bessho, Y., Maeda, M., Wada, A., 2017. Ribosomal protein L31 in *Escherichia coli* contributes to ribosome subunit association and translation, whereas short L31 cleaved by protease 7 reduces both activities. *Genes Cells* 22, 452–471. <https://doi.org/10.1111/gtc.12488>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.011>
- 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, e00032-18. <https://doi.org/10.1128/IAI.00032-18>
- Wiegand, I., Hilpert, K., Hancock, R.E.W., 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc* 3, 163–175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
- Wright, P.R., Georg, J., Mann, M., Sorescu, D.A., Richter, A.S., Lott, S., Kleinkauf, R., Hess, W.R., Backofen, R., 2014. CopraRNA and IntaRNA: predicting small RNA targets, networks and interaction domains. *Nucleic Acids Res* 42, W119-123. <https://doi.org/10.1093/nar/gku359>
- Wu, N., He, L., Cui, P., Wang, W., Yuan, Y., Liu, S., Xu, T., Zhang, S., Wu, J., Zhang, W., Zhang, Y., 2015. Ranking of persister genes in the same *Escherichia coli* genetic background demonstrates varying importance of individual persister genes in tolerance to different antibiotics. *Front Microbiol* 6, 1003. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01003>
- Xie, K., Dalbey, R.E., 2008. Inserting proteins into the bacterial cytoplasmic membrane using the Sec and YidC translocases. *Nat Rev Microbiol* 6, 234–244. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3595>

## SUPPLEMENTARY DATA

**Supplementary Table 1. Bacterial strains used in this study.**

Strains	Characteristics	References
<i>Escherichia coli</i>		
XL1- Blue	$\Delta(\text{ara-leu})$ 7697 $\text{araD139}$ $\text{fhuA}$ $\Delta\text{lacX74}$ $\text{galK16}$ $\text{galE15}$ $\text{e14-}\phi\text{80dlacZ}\Delta\text{M15}$ $\text{recA1}$ $\text{relA1}$ $\text{endA1}$ $\text{nupG}$ $\text{rpsL}$ (StrR) $\text{rph}$ $\text{spoT1}$ $\Delta(\text{mrr-hsdRMS-mcrBC})$	
<i>Staphylococcus aureus</i>		
RN4220	Restriction-defective derivative of 8325-4	Kreiwirth <i>et al.</i> , 1983
HG003	<i>rsbU</i> and <i>tcaR</i> restored strain 8325	Herbert <i>et al.</i> , 2010
HG003 $\Delta\text{sprG1}/\text{sprF1}$	HG003 strain deleted for <i>sprG1</i> and <i>sprF1</i>	Riffaud <i>et al.</i> , 2019
HG003:: <i>yidC-flag</i>	HG003 WT containing an in-frame fusion of a nucleotide sequence encoding a Flag tag at the 3' end of the chromosomal <i>yidC</i> gene	This study
HG003:: <i>rpmE2-flag</i>	HG003 WT containing an in-frame fusion of a nucleotide sequence encoding a Flag tag at the 3' end of the chromosomal <i>rpmE2</i> gene	This study
HG003 $\Delta\text{sprG1}/\text{sprF1}::\text{yidC-flag}$	HG003 $\Delta\text{sprG1}/\text{sprF1}$ containing an in-frame fusion of a nucleotide sequence encoding a Flag tag at the 3' end of the chromosomal <i>yidC</i> gene	This study
HG003 $\Delta\text{sprG1}/\text{sprF1}::\text{rpmE2-flag}$	HG003 $\Delta\text{sprG1}/\text{sprF1}$ containing an in-frame fusion of a nucleotide sequence encoding a Flag tag at the 3' end of the chromosomal <i>rpmE2</i> gene	This study

**Supplementary Table 2. List of plasmids used in this study.**

<b>Plasmids</b>	<b>Characteristics</b>	<b>References</b>
pRMC2	Shuttle vector, Cat <sup>R</sup> ( <i>cat194</i> ), pC194 replicon, anhydrotetracycline-inducible promoter	Corrigan and Foster, 2009
pRMC2- <i>ms2</i>	pRMC2 with <i>ms2</i> tag under control of an anhydrotetracycline-inducible promoter	Le Huyen <i>et al.</i> , 2021
pRMC2- <i>ms2-sprF1</i>	pRMC2 with <i>sprF1</i> fused in 5' to <i>ms2</i> tag	This study
pRMC2- <i>sprF1-ms2</i>	pRMC2 with <i>sprF1</i> fused in 3' to <i>ms2</i> tag	This study
pCN35	Modified high-copy-number shuttle vector with Amp <sup>R</sup> in <i>E. coli</i> and Cat <sup>R</sup> in <i>S. aureus</i>	Charpentier <i>et al.</i> , 2004
pCN35- <i>sprF1</i>	pCN35 with <i>sprF1</i> under the control of its endogenous promoter	Pinel-Marie <i>et al.</i> 2014
pCN35- <i>rpmE2</i>	pCN35 with <i>rpmE2</i> under the control of its endogenous promoter	This study
pBT2	Low-copy-number shuttle vector for allelic exchange with Amp <sup>R</sup> in <i>E. coli</i> and temperature-sensitive replication with Cat <sup>R</sup> in <i>S. aureus</i>	Brückner, 1997
pBT2- <i>yidC-flag</i>	pBT2 containing a 3XFLAG sequence before the termination codon of the internal coding sequence of YidC	This study
pBT2- <i>rpmE2-flag</i>	pBT2 containing a 3XFLAG sequence before the termination codon of the internal coding sequence of RpmE2	This study

**Supplementary Table 3. DNA primers used in this study.**

Number	Primer name	Sequences	Utilization
<b>MAPS</b>			
1	<i>ms2-sprF1</i> for	ATCG <b>GAGCTC</b> ATATATAGAAAAAGGG CAAC	Amplification of <i>sprF1</i> DNA fragment to be inserted between <b>SacI/EcoRI</b> in the pRMC2- <i>ms2</i> plasmid
2	<i>ms2-sprF1</i> rev	ATCG <b>GAATTC</b> AAATAACCATCGCTAA CTTTGGC	
3	<i>sprF1-ms2</i> for	ATCG <b>GGTACC</b> ATATATAGAAAAAGGG CAAC	Two steps PCR to obtain the <i>sprF1-ms2</i> fragment inserted between <b>KpnI/SacI</b> in the pRMC2 plasmid
4	<i>ms2</i> Tag for	CAGACCCTGATGGTGTCTGAAAAACG TACCCTGATGGTGTACGTGGTTATTAA TTTAATC	
5	<i>ms2</i> Tag rev	CGTACCCATCAGGGTACGTTTTTCA GACCCATCAGGGTCTGTTTAACCAT CGAAACCA	
6	<i>sprF1-ms2</i> rev	ATCG <b>GAGCTC</b> AAATAACCATCGCTAA CTT	
<b>Northern blot</b>			
7	5S rRNA probe	CGTAAGTTCGACTACATCG	Detection of 5S rRNA
8	SprF1 probe	TAACTTTGGCTGGTTTCGATGGTT	Detection of SprF1
9	<i>sprG1</i> probe	CAGCCAAAGTTAGCGATGGT	Detection of <i>sprG1</i>
10	<i>ms2</i> probe	GAAAAACGTACCCTGATGGTGTACG	Detection of <i>ms2</i>
11	<i>rpmE2</i> probe	TGACGTCCAGTGTAGAATGGATGTG	Detection of <i>rpmE2</i>
<b>RACE mapping</b>			
12	RACE- <i>yidC</i> for 1	GAGAGCACAACGGCGGCAGC	Determination of <i>yidC</i> 5' and 3' –end coordinates using RACE mapping
13	RACE- <i>yidC</i> for 2	GGCAAAAACACACAAGTTGTG	
14	RACE- <i>yidC</i> rev 1	TTGGATCTACGAATGTATTGTAG	
15	RACE- <i>yidC</i> rev 2	TTAGAATAGTCACAACCAGCC	
16	RACE- <i>rpmE2</i> for 1	GACGTGTGGAACGTTTCAAC	Determination of <i>rpmE2</i> 5' and 3' –end coordinates using RACE mapping
17	RACE- <i>rpmE2</i> for 2	GTTTGGTCTTAAATCAAACAAC	
18	RACE- <i>rpmE2</i> rev 1	GTAGTATCTAAAAGATTACTTGGTG	
19	RACE- <i>rpmE2</i> rev 2	GATACTCAGGATGAATTCCTTG	

**Supplementary Table 3. DNA primers used in this study.**

Number	Primers	Sequences	Utilization
<b>RT-qPCR</b>			
20	<i>gyrB</i> RT-qPCR for	GGTGGCGACTTTGATCTAGC	Detection of <i>gyrB</i> mRNA by RT-qPCR
21	<i>gyrB</i> RT-qPCR rev	TAATATGCGCTCCATCCACA	
22	<i>sprF1</i> RT-qPCR for	GTGAGCCCGTTAAAAAGACG	Detection of <i>SprF1</i> RNA by RT-qPCR
23	<i>sprF1</i> RT-qPCR rev	GGCTGGTTTTCGATGGTTAAA	
24	<i>sprG1</i> RT-qPCR for	TAAGGAGGTGGTGCCTATGG	Detection of <i>sprG1</i> mRNA by RT-qPCR
25	<i>sprG1</i> RT-qPCR rev	CAGCCAAAGTTAGCGATGGT	
26	<i>yidC</i> RT-qPCR for	ATGCCAGACGAACAACGTCA	Detection of <i>yidC</i> mRNA by RT-qPCR
27	<i>yidC</i> RT-qPCR rev	GAACTACAAGGAACGCCGCA	
28	<i>rpmE2</i> RT-qPCR for	GAAATGATGGAGTGGGAAGATGG	Detection of <i>rpmE2</i> mRNA by RT-qPCR
29	<i>rpmE2</i> RT-qPCR rev	GTTGAAACGTTCCACACGTCC	
<b>In vitro transcription/EMSA</b>			
30	T7- <i>sprF1</i>	TAATACGACTCACTATAGGGATATATAGAAAA AGGGCAAC	Primers used to generate <i>SprF1</i> DNA template used for <i>SprF1</i> transcription
31	<i>sprF1</i> rev	AACCATCGCTAACTTTGGCT	
32	T7- <i>yidC</i>	TAATACGACTCACTATAGGGATGTGAATATAA TGATAGAGGTG	Primers used to generate <i>yidC</i> DNA template used for <i>yidC</i> <sub>161</sub> transcription
33	<i>yidC</i> rev	CCAATACATTTTTTCATTGGATCTACG	
34	T7- <i>rpmE2</i>	TAATACGACTCACTATAGGGGTATTGGGTAA AAACTCACAA	Primers used to generate <i>rpmE2</i> DNA template used for <i>rpmE2</i> <sub>377</sub> transcription
35	<i>rpmE2</i> rev	AATAAAAAAGCTGTCTACAATTCCATTATAGG ATGCAGACAG	
36	<i>sprF1</i> <sub>inv</sub> rev	TTTCGATGGTTAAATGGTTATTAATTTAATC	Primers used with T7- <i>sprF1</i> primer to generate <i>SprF1</i> <sub>inv</sub> DNA template used for <i>SprF1</i> <sub>inv</sub> transcription
37	<i>sprF1</i> <sub>inv</sub> rev 2	CAATAAAAAATAACCATCGCTAACTTTCCAGC CTTTTCGATGGTTAAATGGTTA	
38	<i>yidC</i> <sub>inv</sub> rev	GGTTTAGAATAGTCACAAGGCTGGAAAAAGA CCATAATAC	Primers used with T7- <i>yidC</i> and <i>yidC</i> rev primers to generate <i>yidC</i> <sub>inv</sub> DNA template used for <i>yidC</i> <sub>161_inv</sub> transcription
39	<i>yidC</i> <sub>inv</sub> for	AGGTATTATGGTCTTTTTCCAGCCTTGTGACT ATTCTAAACC	
40	<i>sprF1</i> <sub>150</sub> F1	GGGATGTGAATATAATGATAGAGGTGGAAAA ATGAAGAAAAAAGCGTTACTACCATTATTTTT AGGTATTATGGTCTTGTGAC	DNA fragments used with T7- <i>yidC</i> and <i>yidC</i> rev primers to generate <i>yidC</i> DNA template used for <i>yidC</i> <sub>150</sub> transcription
41	<i>sprF1</i> <sub>150</sub> F2	CCAATACATTTTTTCATTGGATCTACGAATGTA TTGTAGAAAAACCCACTACGTTTTTCAGGTTT AGAATAGTCACAAGACCATAATACCT	

**Supplementary Table 3. DNA primers used in this study.**

Number	Primers	Sequences	Utilization
42	<i>rpmE2</i> <sub>361</sub> rev	CTATATTAGTTGTTTTTTGTTGAAACGTTCC ACACG	Primers used with T7- <i>rpmE2</i> primer to generate <i>rpmE2</i> DNA template used for <i>rpmE2</i> <sub>361</sub> transcription
43	<i>rpmE2</i> <sub>361</sub> rev 2	AATAAAAAAGCTGTCTACAATTCCATTATAG GATGCAGACAGCTTAACGATTACTATATTAG TTGTTTTTTGTTGAAACGTTCCAC	
44	SprB-for	TAATACGACTCACTATAGGGTAAAAATAAG ACGACAT	Primers used to generate <i>sprB</i> DNA template used for SprB transcription
45	SprB-rev	AAATAAAAAACCATTCC	
<b>Genetic constructions</b>			
46	<i>rpmE2</i> -pCN for	ATCGGGATCCTCGCAAACCTTAAAAGGTCT A	Amplification of <i>rpmE2</i> DNA fragment to be inserted between <b>BamHI/KpnI</b> in the pCN35 plasmid
47	<i>rpmE2</i> -pCN rev	ATCGGGTACCAGCTATTCTAATTTGTTG CTTC	

**Supplementary Table 4. List of SprF1 putative RNA targets predicted by CopraRNA.** The first 10 SprF1 targets (in yellow) were obtained by extracting the mRNA sequence surrounding the start codon (-50 to +200) and the 10 other SprF1 targets (in blue) were obtained by focusing on the stop codon (-200 to + 50).

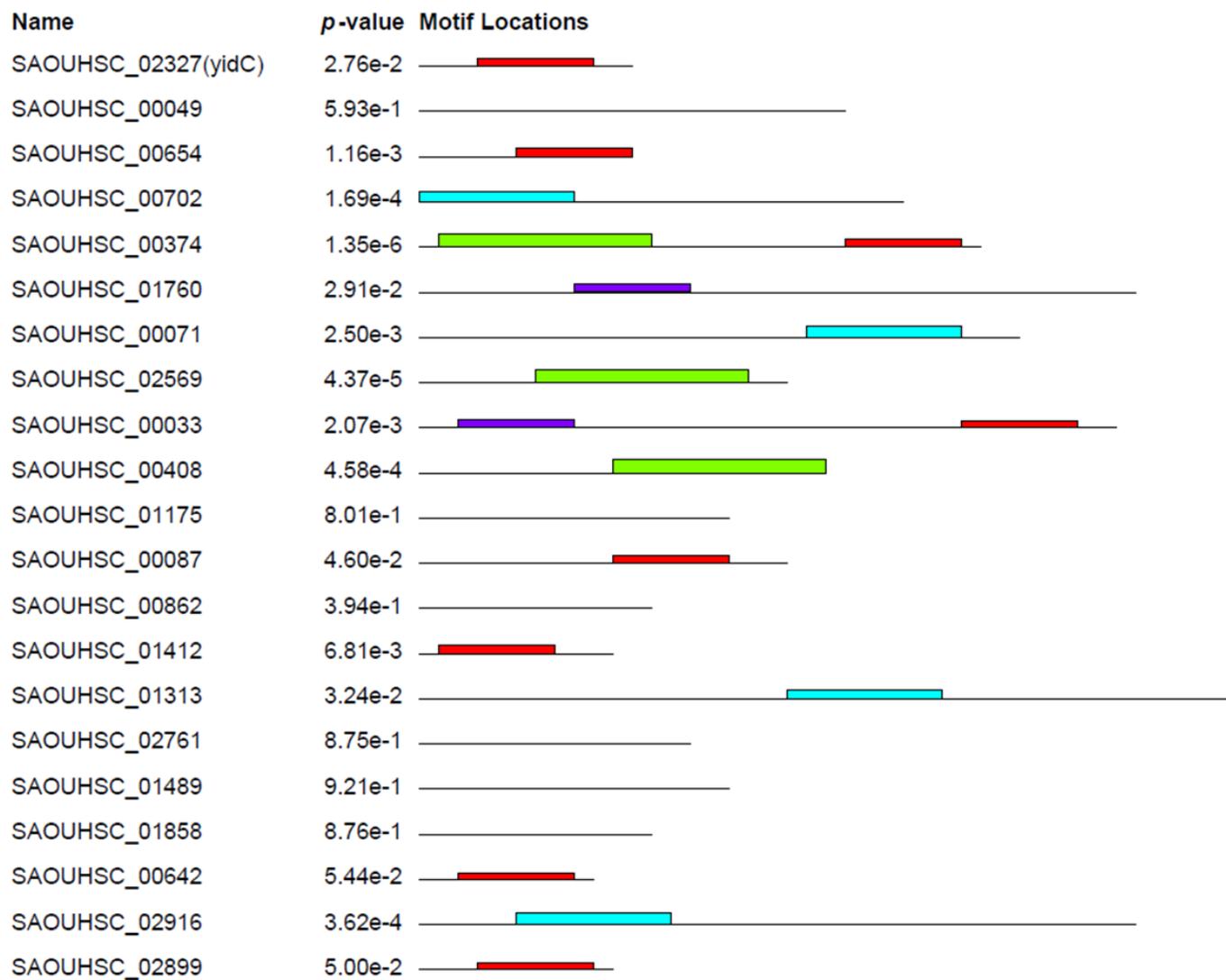
Gene ID	Gene name	Product	Energy (kcal/mol)	p-value
SAOUHSC_02176	<i>sprG1</i>	Toxic peptides SprG1 <sub>44</sub> and SprG1 <sub>31</sub>	-94.95	0
SAOUHSC_02391	-	Hypothetical protein	-55.74	0
SAOUHSC_00966	-	Hypothetical protein	-42.87	1.00E-07
SAOUHSC_02327	<i>yidC</i>	Protein insertase?	-16	0.0010132
SAOUHSC_00049	-	Hypothetical protein	-14.18	0.0024194
SAOUHSC_00654	<i>fhuG</i>	Ferrichrome ABC transporter permease	-12.6	0.005306
SAOUHSC_00702	-	Hypothetical protein	-12.58	0.0053599
SAOUHSC_00374	<i>guaB</i>	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	-12.41	0.0058427
SAOUHSC_01760	-	Hypothetical protein	-12.32	0.0061164
SAOUHSC_00071	<i>sirC</i>	Lipoprotein SirC	-12.05	0.007021
SAOUHSC_00967	-	Hypothetical protein	-35.74	0
SAOUHSC_01092	<i>pheS</i>	Phenylalanyl-tRNA synthetase subunit alpha	-16.13	0
SAOUHSC_02919	<i>panB</i>	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase	-13.62	0.0004668
SAOUHSC_01333	<i>lexA</i>	LexA repressor	-12.42	0.001965
SAOUHSC_00659	-	Hypothetical protein	-12.29	0.0039542
SAOUHSC_01843	-	Hypothetical protein	-11.83	0.0042673
SAOUHSC_00408	-	Hypothetical protein	-11.78	0.0057593
SAOUHSC_01766	<i>folC</i>	Folypolyglutamate synthase/dihydrofolate synthase	-11.67	0.0061451
SAOUHSC_01590	-	Hypothetical protein	-11.3	0.0076459
SAOUHSC_01699	<i>aroE</i>	Shikimate 5-dehydrogenase	-11.01	0.0090784

**Supplementary Table 5. List of SprF1 putative RNA targets predicted by RNApredator.** The table presents the first 20 SprF1 targets based on their predicted energy.

Gene ID	Gene name	Product	Energy (kcal/mol)	z-Score
SAOUHSC_02176	<i>sprG1</i>	Toxic peptides SprG1 <sub>44</sub> and SprG1 <sub>31</sub>	-29.08	-11.6
SAOUHSC_00113	<i>adhE</i>	Bifunctional acetaldehyde-CoA/alcohol dehydrogenase	-16.64	-5.18
SAOUHSC_00049	-	Hypothetical protein	-16.45	-5.09
SAOUHSC_02327	<i>yidC</i>	Protein insertase?	-16.12	-4.92
SAOUHSC_01682	<i>dnaJ</i>	Chaperone protein DnaJ	-15.60	-4.65
SAOUHSC_01092	<i>pheS</i>	Phenylalanyl-tRNA synthetase subunit alpha	-14.88	-4.28
SAOUHSC_01093	<i>pheT</i>	Phenylalanyl-tRNA synthetase subunit beta	-14.59	-4.13
SAOUHSC_01497	<i>ansA</i>	L-asparaginase	-13.78	-3.71
SAOUHSC_02919	<i>panB</i>	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase	-13.56	-3.6
SAOUHSC_00246	-	Drug transporter	-13.32	-3.47
SAOUHSC_02918	<i>panC</i>	Pantoate--beta-alanine ligase	-13.32	-3.47
SAOUHSC_01798	-	Hypothetical protein	-13.27	-3.45
SAOUHSC_01352	<i>parC</i>	DNA topoisomerase IV subunit A	-12.76	-3.18
SAOUHSC_01412	-	Hypothetical protein	-12.71	-3.16
SAOUHSC_00413	-	Hypothetical protein	-12.69	-3.15
SAOUHSC_00654	<i>fhuG</i>	Ferrichrome ABC transporter permease	-12.59	-3.1
SAOUHSC_00919	-	Hypothetical protein	-12.49	-3.05
SAOUHSC_02862	<i>clpL</i>	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpC	-12.47	-3.04
SAOUHSC_00633	-	Hypothetical protein	-12.31	-2.95
SAOUHSC_01354	<i>alsT</i>	Sodium:alanine symporter family protein	-11.98	-2.78

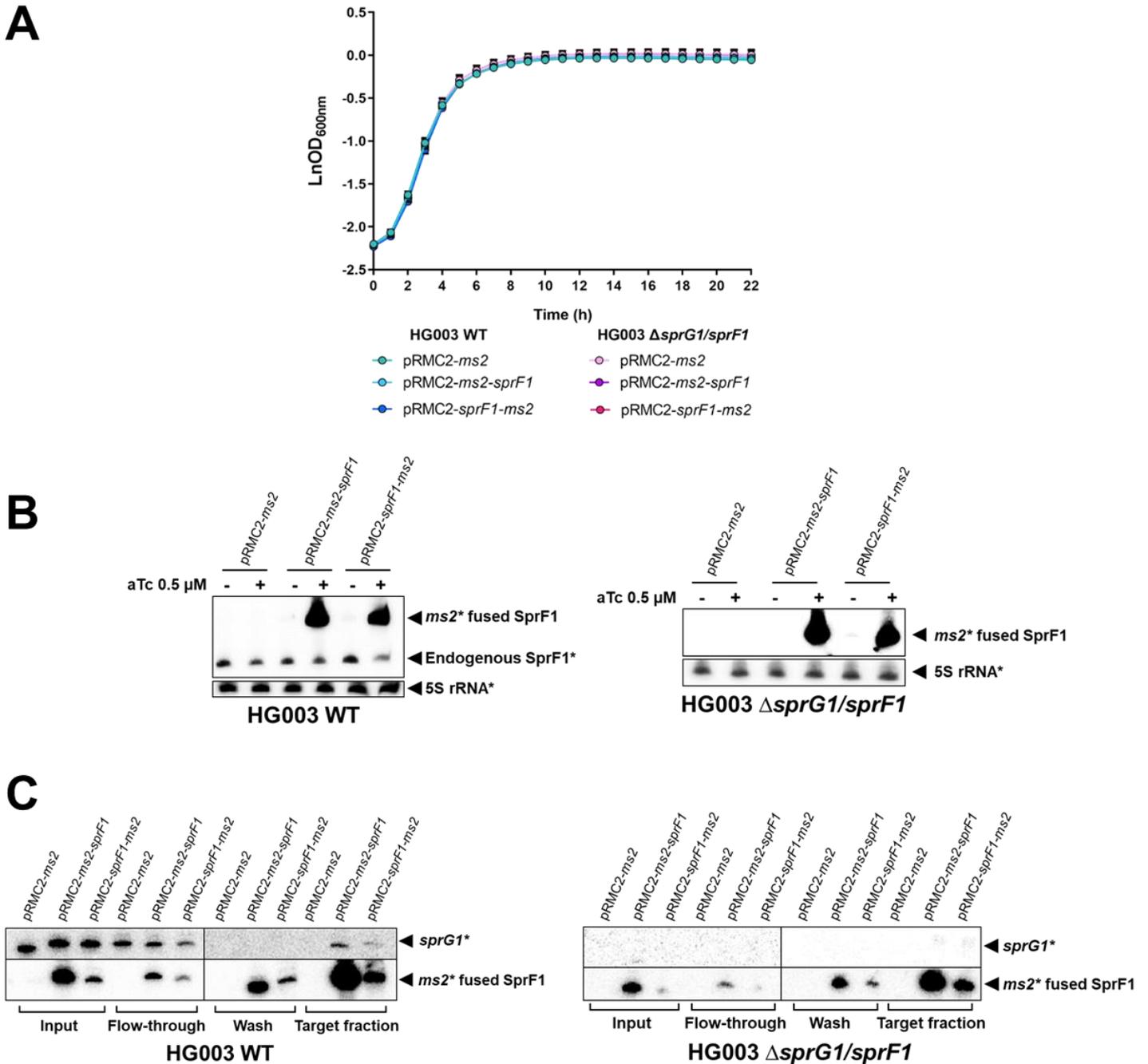
**Supplementary Table 6. Ciprofloxacin and cloxacillin MICs.** MIC values were determined in triplicate using the broth microdilution method for HG003 WT + pCN35, WT + pCN35-*rpmE2*,  $\Delta$ *sprG1/sprF1* + pCN35, and  $\Delta$ *sprG1/sprF1* + pCN35-*rpmE2* strains.

Strain	Ciprofloxacin	Cloxacillin
WT + pCN35	0.0625 µg/ml	0.0031 µg/ml
WT + pCN35- <i>rpmE2</i>	0.0625 µg/ml	0.0031 µg/ml
$\Delta$ <i>sprG1/sprF1</i> + pCN35	0.0625 µg/ml	0.0031 µg/ml
$\Delta$ <i>sprG1/sprF1</i> + pCN35- <i>rpmE2</i>	0.0625 µg/ml	0.0031 µg/ml



Motif	Symbol	Motif Consensus
1.		GGCUGG
2.		AGCCAUYG
3.		AUCUARAUGG
4.		GCCAMR

**Figure S1: MEME motif of SprF1.** The interaction zone of 20 putative SprF1 targets identified by the CopraRNA start codon analysis were aligned using the GLAM2 tool to find MEME motifs consensus. Four motifs (highlighted in red, blue, green and purple) were identified.



**Figure S2: Steps validation before to perform MAPS.** (A) Growth curves of *S. aureus* HG003 WT or  $\Delta$ *sprG1/sprF1* strains carrying pRMC2-*ms2*, pRMC2-*ms2-sprF1* or pRMC2-*sprF1-ms2* plasmids. Cells were grown in TSB supplemented with 10  $\mu$ g/ml chloramphenicol. Error bars depict means and standard deviation of three biological replicates ( $n = 3$ ). (B) Northern blot detecting MS2 fused SprF1 constructs using radiolabeled MS2 probe. Total RNAs were extracted after 2 h of growth and 5 min induction with (+) or without (-) aTc in the HG003 WT or  $\Delta$ *sprG1/sprF1* strains and 5  $\mu$ g of RNA were analyzed by northern blot. Endogenous SprF1 expression was detected with radiolabeled SprF1 probe and 5S rRNA was used as the internal control. (C) Northern blot targeting MS2 fused SprF1 constructs in the HG003 WT or  $\Delta$ *sprG1/sprF1* strains using radiolabeled MS2 probe during the MS2 chromatography affinity purification process. 100 ng of RNAs extracted before passage through the column (input), passed through the column (flow-through), recovered after the last washing of the column (wash) and eluted (target fraction) were loaded on urea polyacrylamide gel. Detection of *sprG1* was used as a purification control.

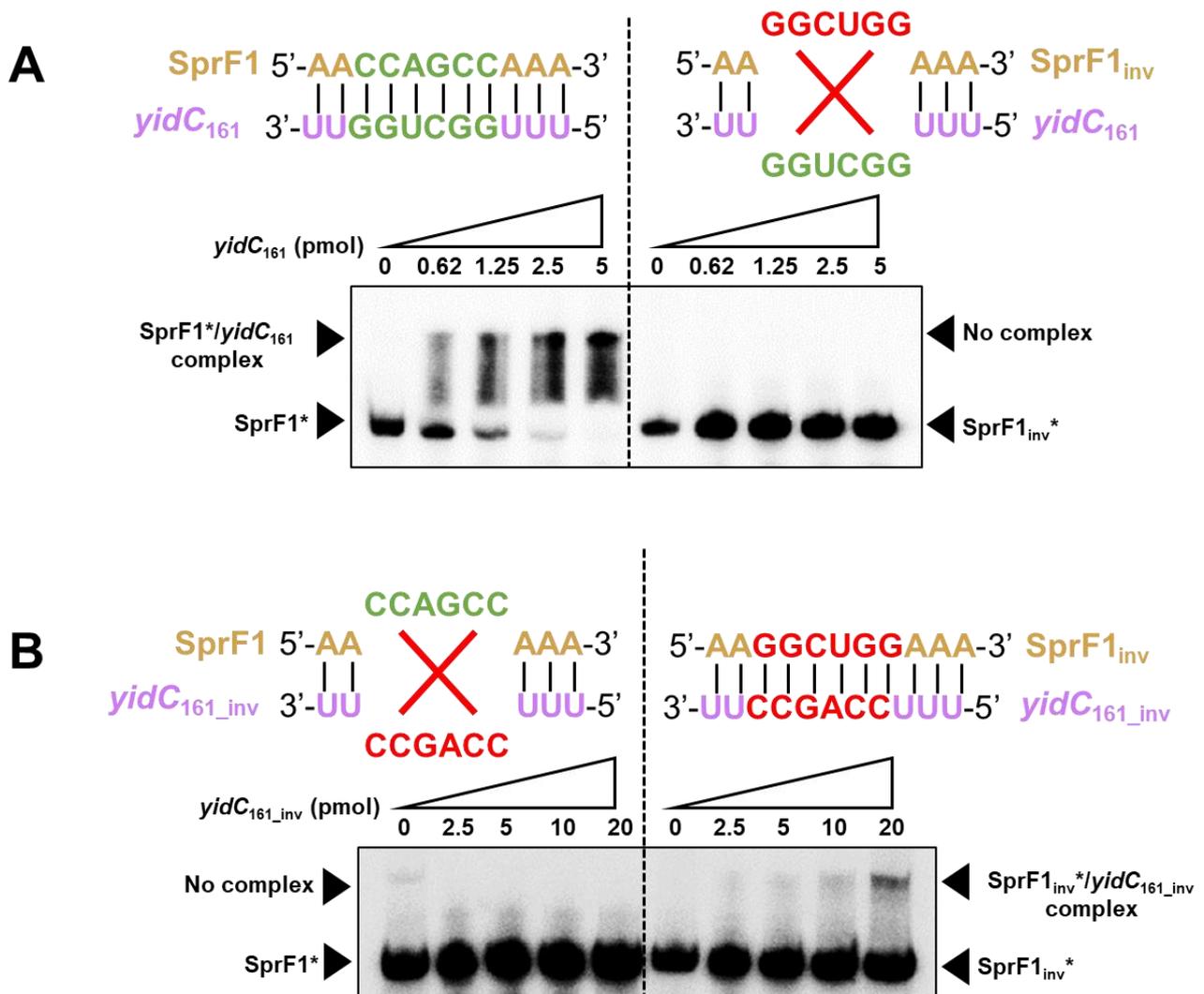
## A *yidC* mRNA: 979 nt

+1 (2159248)  
5' **A**UGUGAAUUAUAAUGAUAGAGGUGGAAAA**AUG**AAGAAAAAGCGUUACUACCAUUUUUUUA  
GGUAAUUAUGGUCUU**UUUGGCUGGUU**GUGACUAUUCUAAACCUGAAAAACGUAGUGGGUUUU  
UCUACAAUACAUUCGUAGAUCCAAUGAAAAAUGUAUUGGAUUGGUUGGGAAAAUACUUUUUA  
AACGACAAUUAUGGUUUAGCUAUUAUUAUCCUUGUAUUGGUAAUUCGUUUUUUUUUUUUACC  
AUUCAUGUUGUCAAAACUAUAAAAUAGUCAUAUGAUGCGUCAAAAAAUGAAAGUUGCAAAGCC  
AGAAGUUGAAAAAUUCAAGAAAAAGUGAAACGUGCGCGUACACAAGAAGAAAAAUGGCUGC  
AAACCAAGAAUUAUGCAAGUAUUAUAAAAGUAUGACAUGAACCCGAUUUAGAGUAUGUUGGG  
UUGUUUACCAAUGCUAAUCCAUUACCAUCAUCAUGGGAUUAUACUUUGUACUUAAGACC  
AACUUGUAGAUGGUUUUGUUUUAAUUAUCCACACUUCUUAUGGUUCGAUUUAGGACGUCCUGAU  
AUUUGGAUUACA AUUUAUUGCCGGUGUUUUUAUACUUUAUCCAAGCAUAUGUAUCAAGUAAAAC  
GAUGCCAGACGAACAACGUCAAUUGGGUUACAUGAUGAUGGUCAUUUCACCAAUUUAUGAUUA  
UCUGGAUUUCAUUAAGCUCAGCAUCAGCACUUGGUUUUGUACUGGUCAGUCAGUGCGGCGUU  
CCUUGUAGUUCAAACACACUUUGCGAACAUUUUAUUAUGAAAAAGUCGCUAAAAAAGAAGUACA  
ACCUUUCAUUGAAGCGUAUGAAAGAGAGCACAAACGGCGGCAGCAAUAAAAAAGGCCAAAAACAC  
ACAAGUUGUGUCUAAAAAGAAAAAGAA**UAA**CCUUAGCAAGUCCAAUAAUGUGCACCCUAAA  
AGUUGAAGAUAAUUUUUAAACUUUAUAGGGCGCACAUUUUUUUCGCU\_3'  
2158270

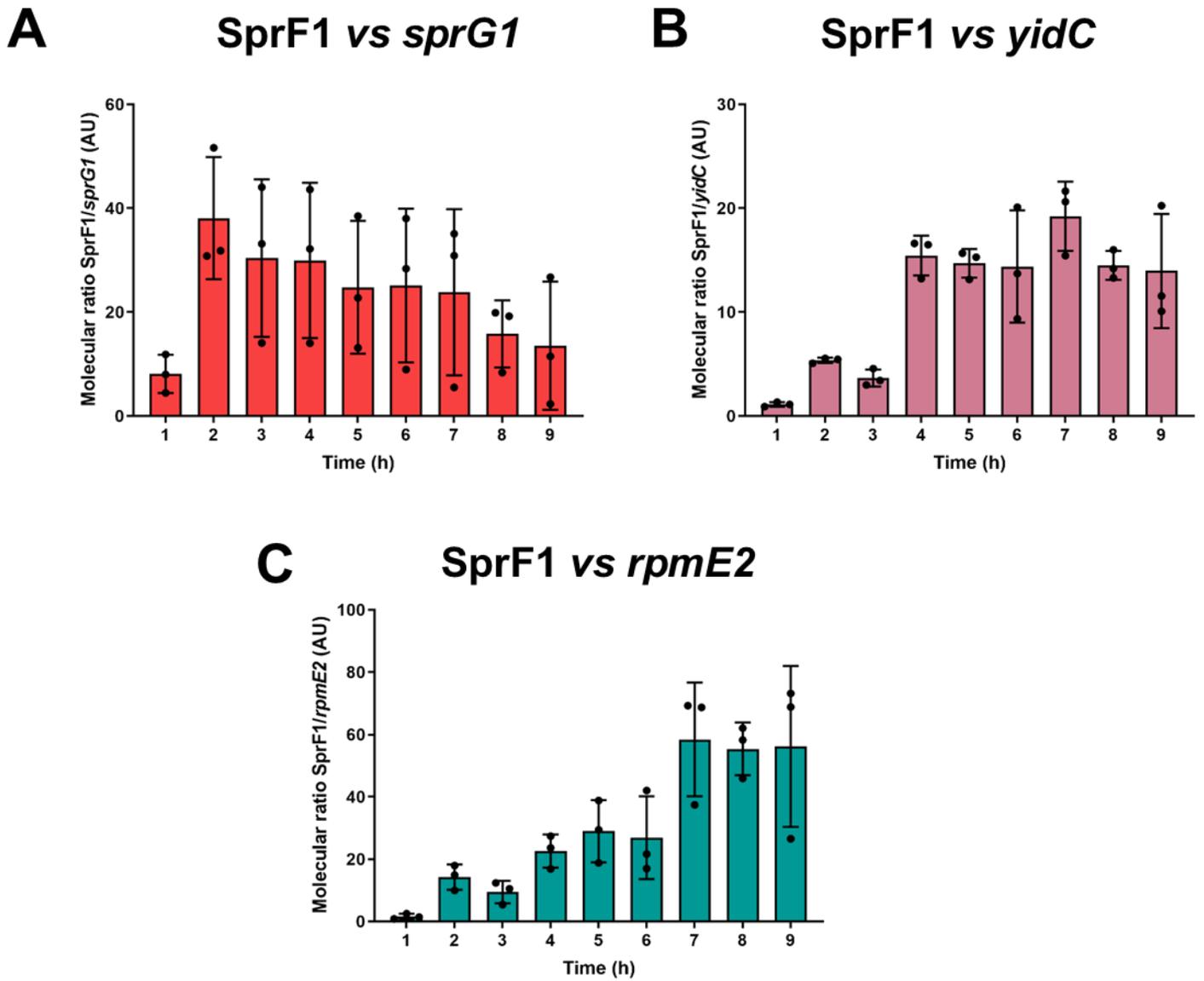
## B *rpmE2* mRNA: 377 nt

+1 (2182919)  
5' **G**AUUGGGUAAAAACUCACAAAUAACUCUGUUCAGAUUGGUUCAGGGCAAAGGAGCUGAA  
AAUA**AUG**AAACAAGGAAUUCAUCCUGAGUAUCACCAAGUAAUCUUUUUJAGAUACUACUACAA  
CUUCAAAUUCUUAAGCGGUUCUACAAAACAUCUUCAGAAAUGAUGGAGUGGGGAAGAUGGAA  
AAGAAUACCCAGUUAUUCGUUUAGAUUUUCAUCUGAUUCACAUCCAUUCUACACUGGACGU  
CAAAAUUCGCUGCUGCGGAUGGACGUGUGGAACGUUUCAACAAAA**AGUUUGGUCUAAAU**  
**C**AAACAAC**UAA**UAUAGUAAUCGUUAAGCUGUCUGCAUCCUAUAAUGGAAUUGUAGACAGCUU  
UUUUUU\_3'  
2182544

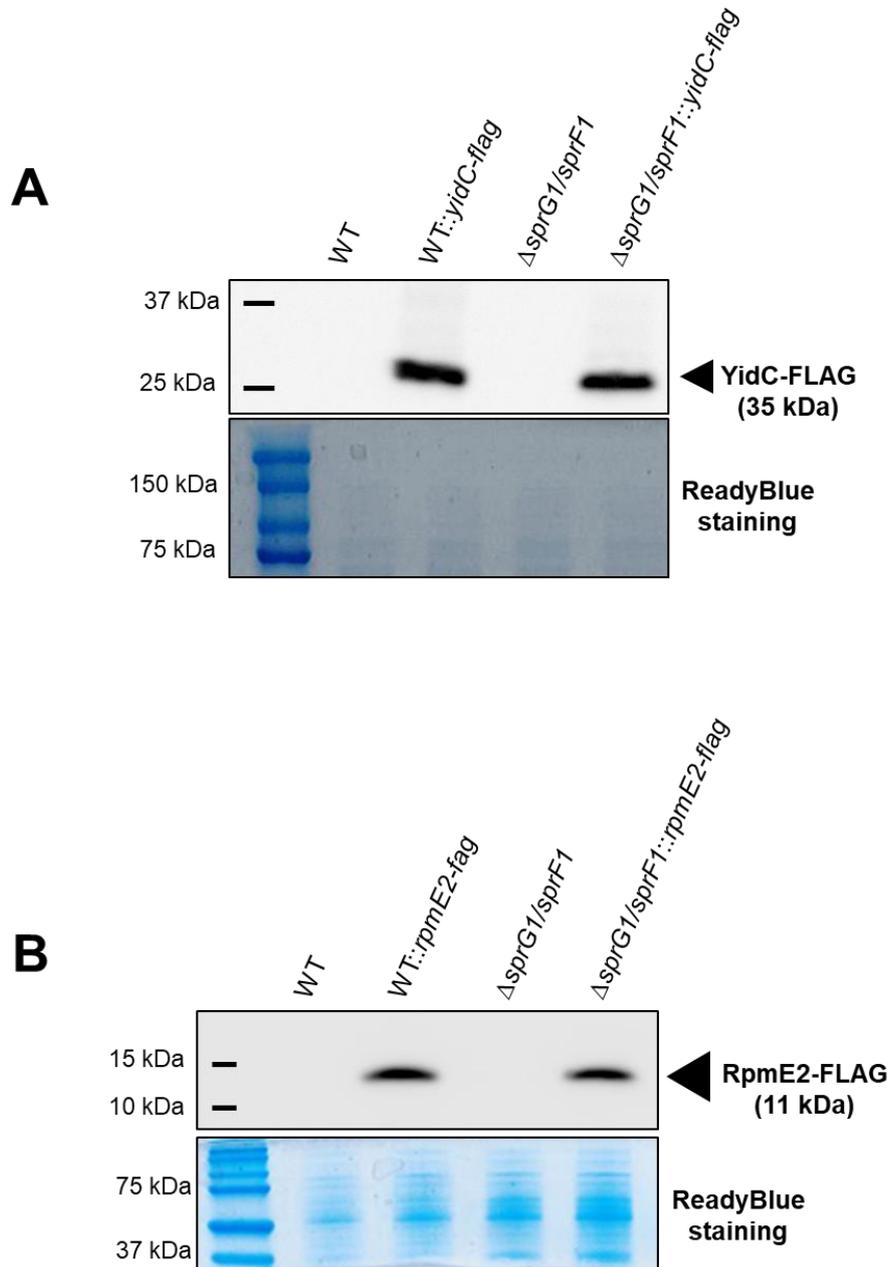
**Figure S3: Nucleotide sequences of *yidC* and *rpmE2* mRNAs.** The 5' and 3' end of *yidC* (A) and *rpmE2* (B) mRNAs were determined using RACE mapping. Coordinates (*S. aureus* NCTC8325 genome, NCBI accession CP000253) of the + 1 nucleotide of transcription (in orange) and of the last nucleotide are indicated. AUG start codons are highlighted in blue and UAA stop codons are highlighted in pink. Predicted regions of interaction with SprF1 are in red. The MEME consensus motif is in yellow.



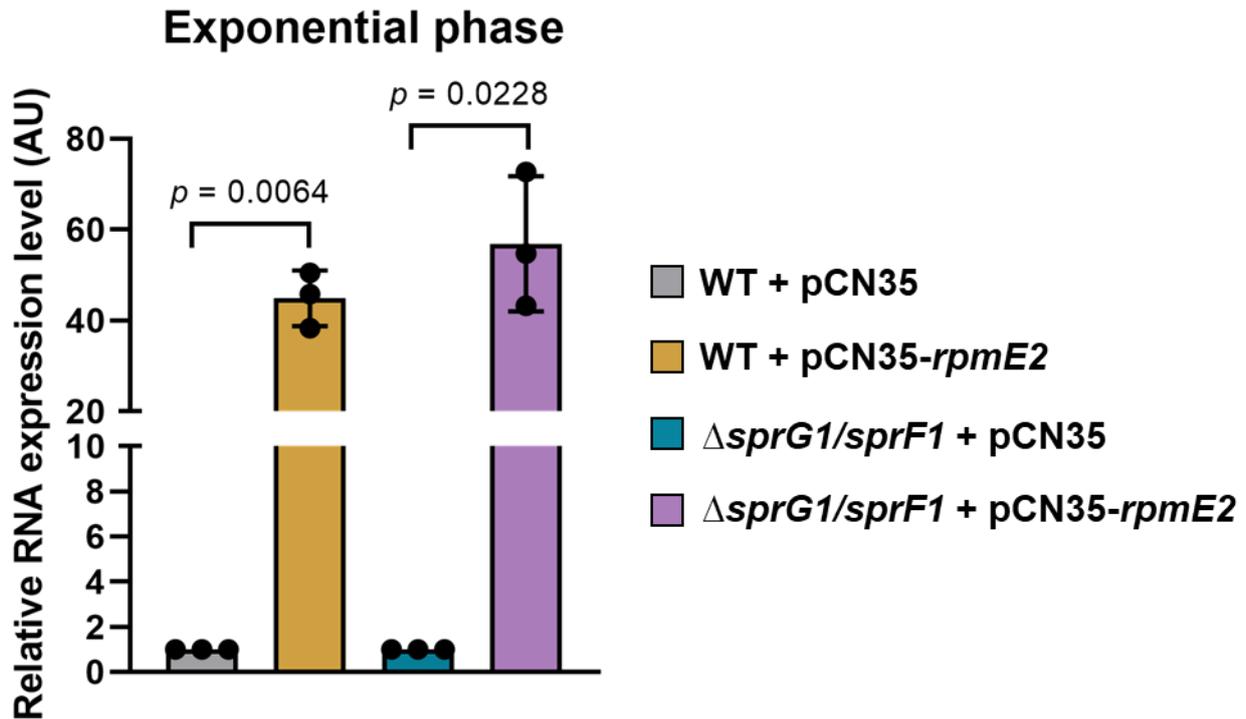
**Figure S4: The interaction MEME motif is involved in SprF1 and *yidC* interaction.** (A) The SprF1 or the SprF1<sub>inv</sub> (SprF1 RNA with 6 nucleotides of the interaction region with *yidC* replaced by the 6 nucleotides of the *yidC* MEME motif) radiolabeled RNAs (0.05 pmol) were incubated with increasing amount (0 to 5 pmol) of a *yidC* mRNA region containing the predicted interaction zone (*yidC*<sub>161</sub>). Original MEME interaction regions of SprF1 and *yidC* are in green. When the MEME interaction region is replaced, it is shown in red. The red cross indicates that interaction between these regions cannot occur. (B) The SprF1 or the SprF1<sub>inv</sub> (SprF1 RNA with 6 nucleotides of the interaction region with *yidC* replaced by the 6 nucleotides of the *yidC* MEME motif) radiolabeled RNAs (0.02 pmol) were incubated with increasing amount (0 to 20 pmol) of a *yidC*<sub>161</sub> RNA or a *yidC*<sub>161\_inv</sub> RNA (*yidC*<sub>161</sub> RNA with 6 nucleotides of the interaction region with SprF1 replaced by the 6 nucleotides of the SprF1 MEME motif). Original MEME interaction regions of SprF1 and *yidC* are in green. When the MEME interaction region is replaced, it is shown in red. The red cross indicates that interaction between these regions cannot occur.



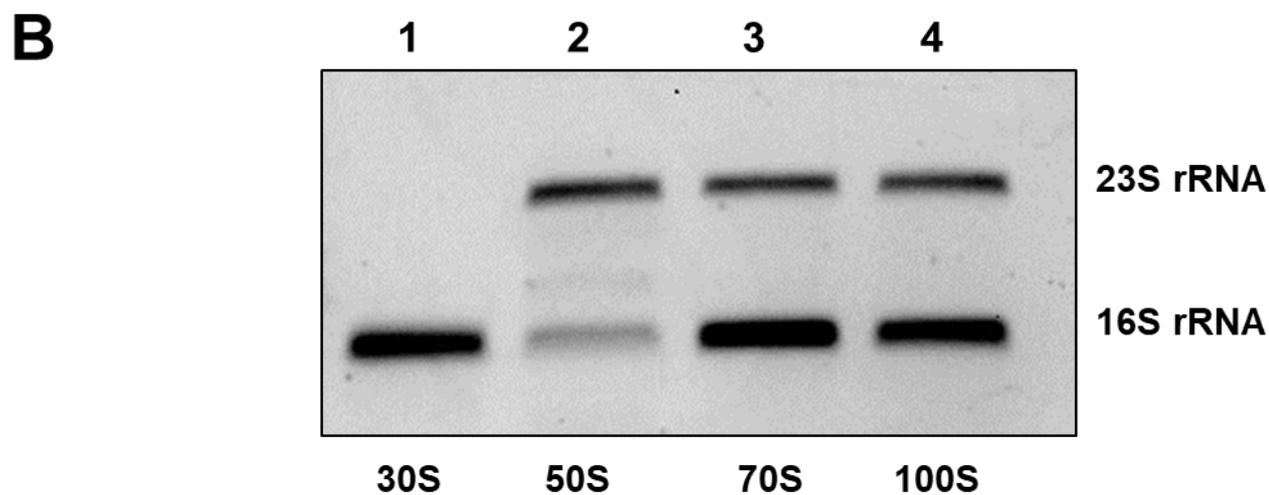
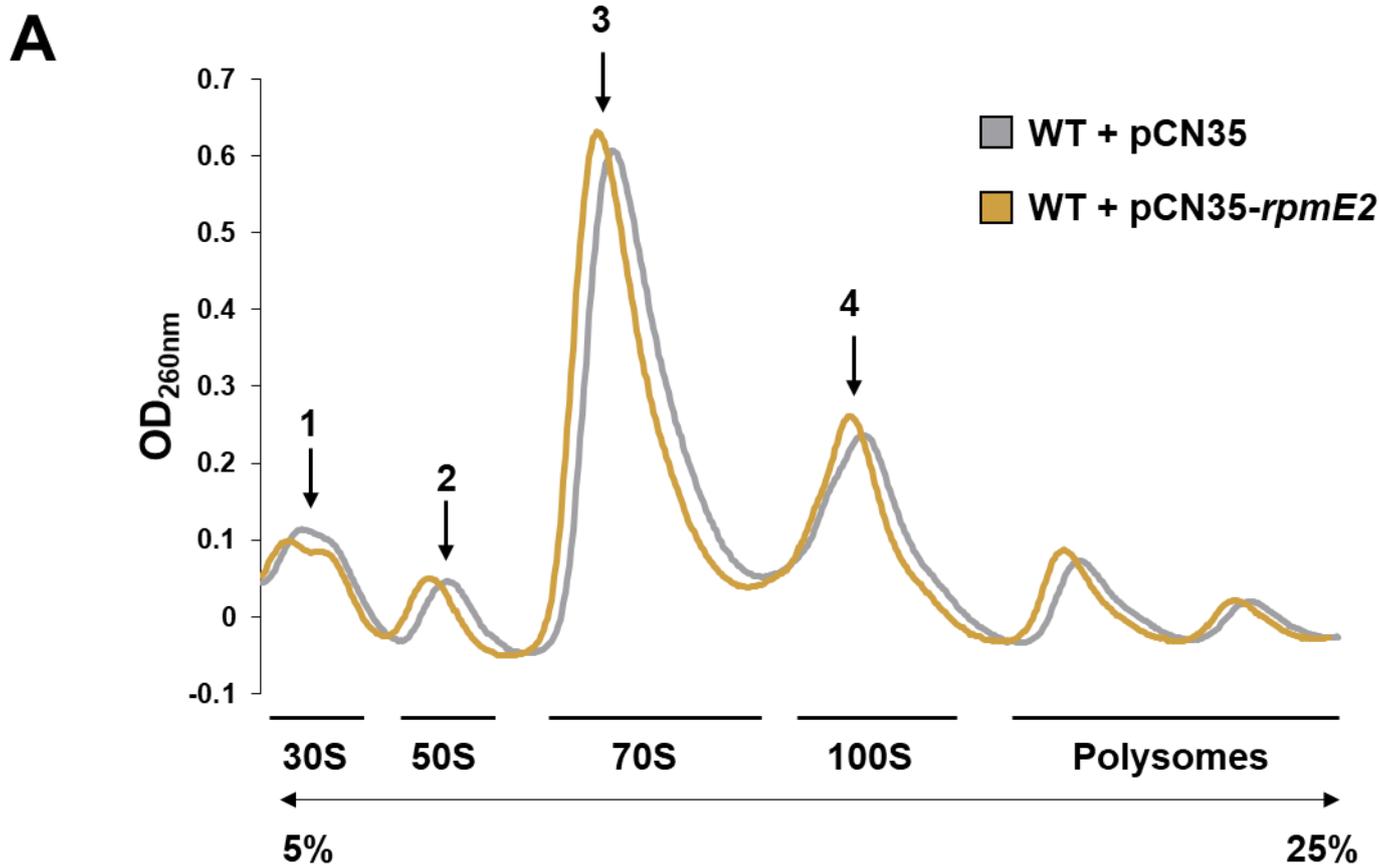
**Figure S5: SprF1 transcript level is sufficient to regulate several targets.** Molecular ratio representing the relative transcript level ( $\Delta\Delta Ct$ ) of SprF1 compared to the relative transcript level of *sprG1* (A), *yidC* (B) and *rpmE2* (C).



**Figure S6: Chromosomal *flag* integration at the C-terminus of *yidC* or *rpmE2* leads to YidC-FLAG and RpmE2-FLAG proteins expression.** (A) Expression validation of YidC-FLAG in the HG003 WT::*yidC-flag* and  $\Delta$ *sprG1/sprF1::yidC-flag* strains compared with the HG003 WT and  $\Delta$ *sprG1/sprF1* strains. (B) Expression validation of RpmE2-FLAG in the HG003 WT::*rpmE2-flag* and  $\Delta$ *sprG1/sprF1::rpmE2-flag* strains compared with the HG003 WT and  $\Delta$ *sprG1/sprF1* strains. After exponential growth phase (2h) protein extraction, FLAG-tagged proteins were detected by immunoblotting with anti-FLAG antibodies. ReadyBlue staining were done as a loading control.



**Figure S7: pCN35-*rpmE2* plasmid leads to *rpmE2* overexpression.** RT-qPCR analysis monitoring *rpmE2* mRNA expression level during exponential phase (3h) for the HG003 WT + pCN35, HG003 WT + pCN35-*rpmE2*,  $\Delta$ *sprG1/sprF1* + pCN35 and  $\Delta$ *sprG1/sprF1* + pCN35-*rpmE2* strains. Data were normalized to the level of *gyrB* mRNA expression. Then, RNAs expression level between the strains were compared to RNA expression either with the HG003 WT + pCN35 strain or with the  $\Delta$ *sprG1/sprF1* + pCN35 strain, which were set to 1. Error bars show the means and standard deviations of three independent biological replicates ( $n = 3$ ). Statistical significance was calculated with a two-tailed unpaired *t*-test with Welch's correction.

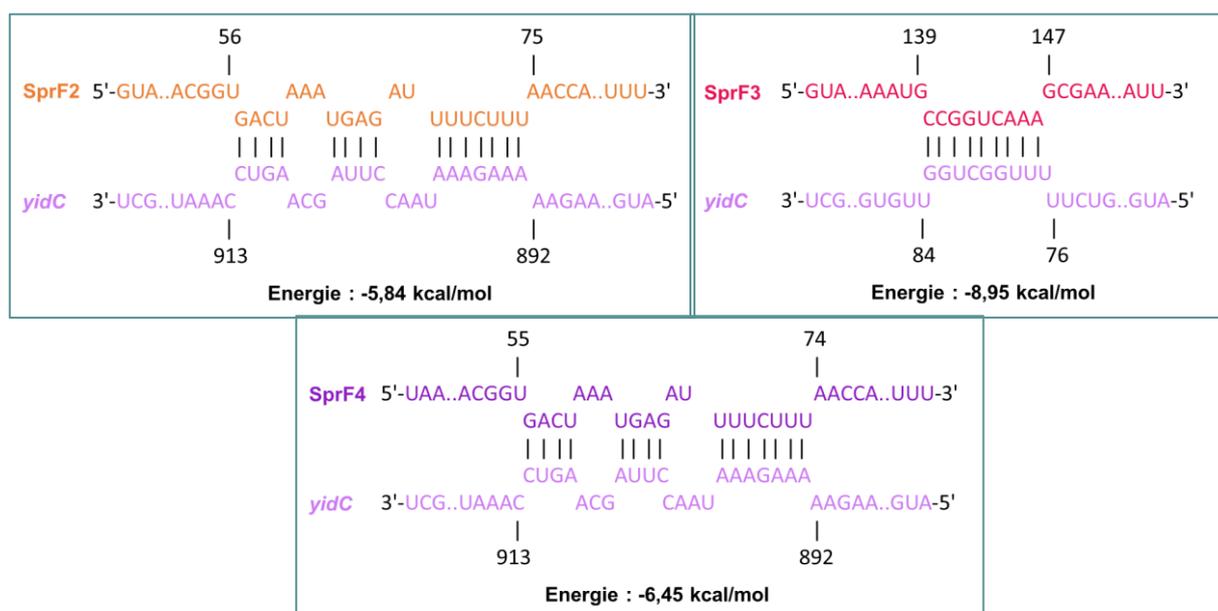


**Figure S8: *rpmE2* overexpression does not induce 100S ribosomes formation.** (A) Ribosome profiles of *S. aureus* HG003 WT + pCN35 and WT + pCN35-*rpmE2* strains. Ribosomes were isolated from TSB cultures at the exponential phase ( $OD_{600nm} = 1.8$ ) and separated in a 5% to 25% sucrose gradient. Ribosome profiles were monitored by  $OD_{260nm}$  measurements. (B) Visualization of RNAs (200 ng) extracted from the four ribosomal fractions indicated by arrows in (A). Samples were separated on a 1% TBE agarose gel and stained with ethidium bromide.

## ii. Résultats complémentaires

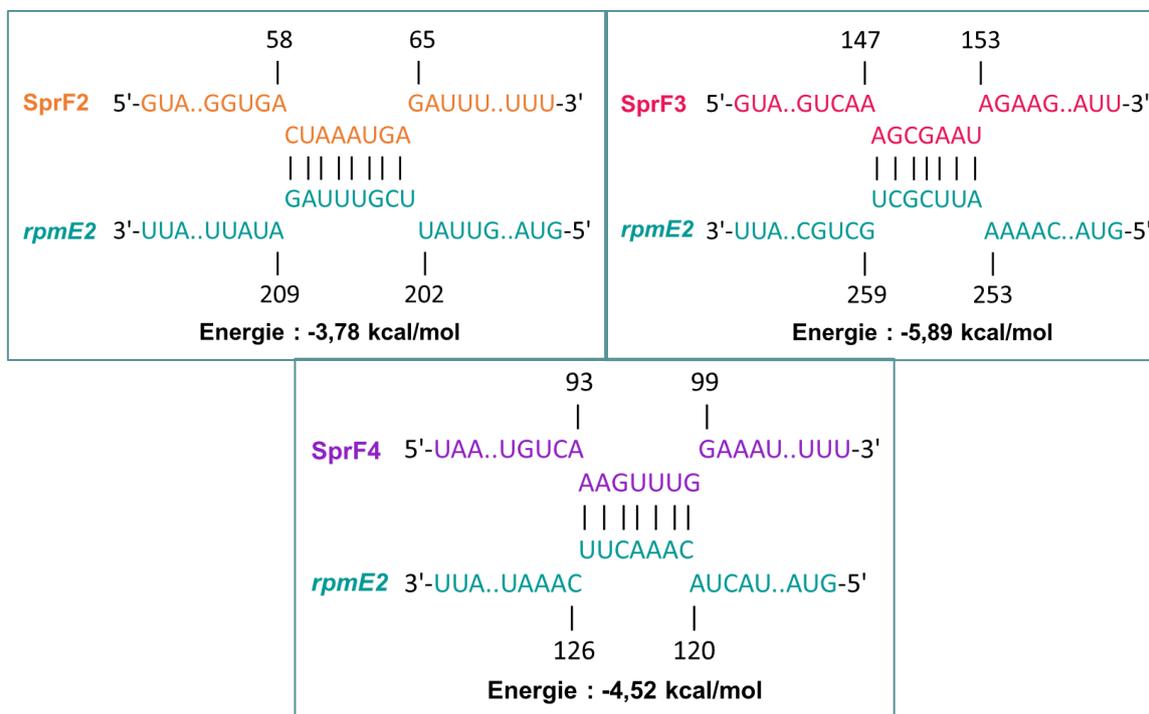
### ii.i. Interaction des antitoxines SprF2, SprF3 et SprF4 avec *yidC* et *rpmE2*

Au sein du génome de *S. aureus*, en plus du système SprG1/SprF1 localisé sur un îlot de pathogénicité, trois autres TA homologues de ce système sont présents dans le core génome (SprG2/SprF2, SprG3/SprF3 et SprG4/SprF4) (Riffaud *et al.*, 2019). Ainsi, l'antitoxine SprF1 partage 64%, 54% et 61% d'identité de séquence avec les antitoxines SprF2, SprF3 et SprF4, respectivement. De plus, des interactions croisées entre les membres de ces systèmes ont été mises en évidence. Par exemple, *in vitro*, l'antitoxine SprF3 peut former un complexe avec l'ARNm codant la toxine SprG1. Au vu de ces résultats, nous nous sommes donc demandés si les antitoxines SprF2, SprF3 et SprF4 pouvaient, comme SprF1, interagir avec les ARNm *yidC* et *rpmE2*. Afin d'identifier des interactions potentielles entre les antitoxines SprF et ces deux ARNm, nous avons utilisé l'outil de prédiction IntaRNA. Pour l'ensemble des antitoxines, des zones d'interactions avec les ARNm *yidC* ou *rpmE2* ont été prédites (Figures 50 et 51). Cependant, les énergies d'interaction prédites pour les complexes SprF2/*yidC* (-5,84 kcal/mol) et SprF4/*yidC* (-6,45 kcal/mol) étant faibles, ces données suggèrent que ces interactions sont moins prépondérantes *in vivo* (Figure 50). En revanche, entre SprF3 et *yidC* le logiciel IntaRNA a prédit une zone d'interaction de neuf nucléotides avec un bilan énergétique de -8,95 kcal/mol. A noter que cette zone d'interaction est, à deux nucléotides près, la même zone d'interaction que celle entre SprF1 et *yidC* (Article 2, Figure 2). Ce résultat est surprenant puisque SprF3 est l'antitoxine SprF qui partage le moins d'identité de séquence avec SprF1. D'un autre côté, il s'agit de l'antitoxine qui est connue pour être capable de se lier à l'ARNm *sprG1* (Riffaud *et al.*, 2019). Ces prédictions suggèrent une possible redondance des antitoxines SprF dans la régulation de l'expression de la protéine YidC.



**Figure 50 : Identification des zones d'interactions potentielles entre les antitoxines SprF2, SprF3 et SprF4 et l'ARNm *yidC*.** Ces interactions ont été prédites par IntaRNA.

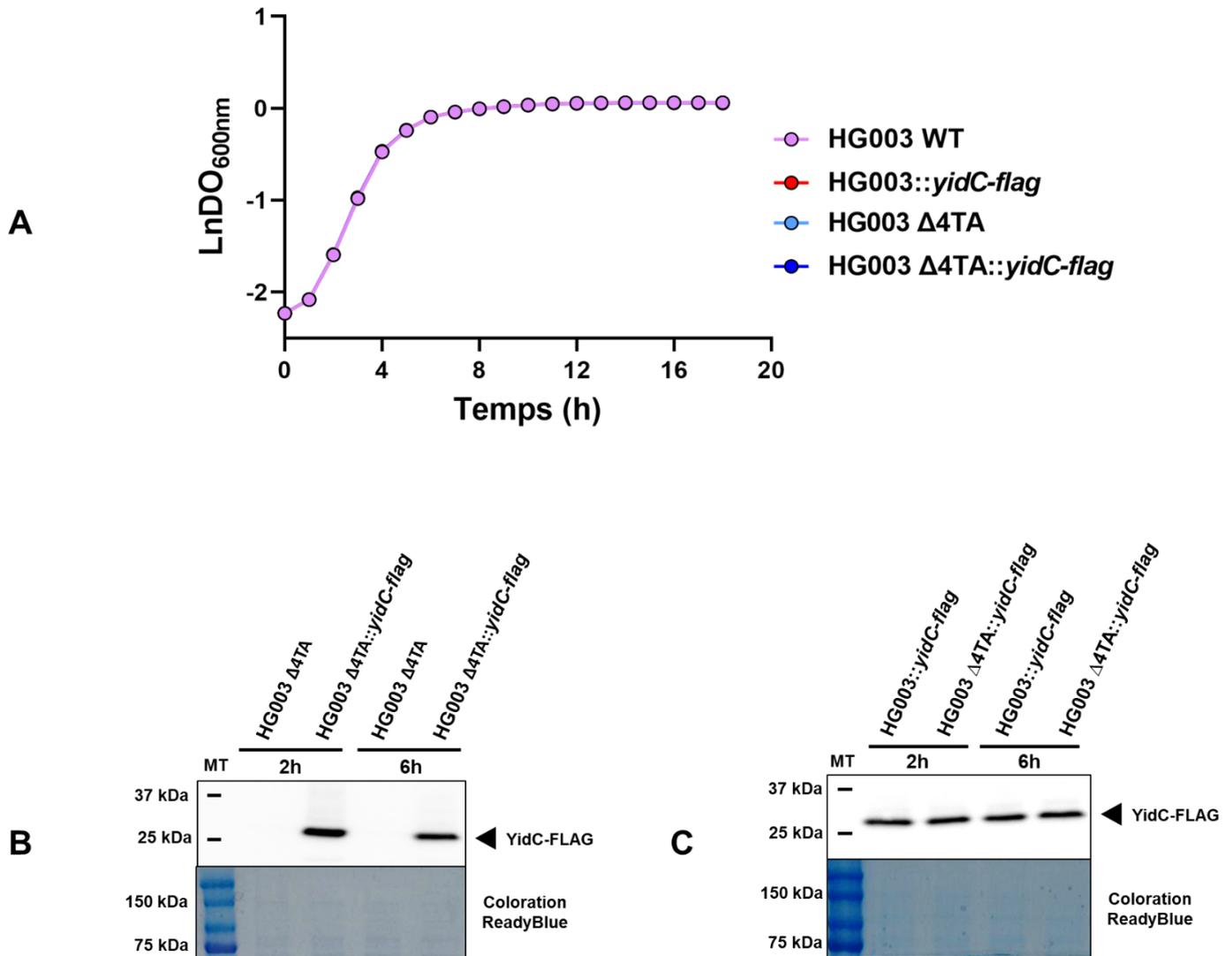
En ce qui concerne l'ARNm *rpmE2* et les antitoxines SprF2, SprF3 et SprF4, des zones de sept/huit nucléotides avec de faibles énergies d'interaction et localisées sur des régions différentes sur l'ARNm *rpmE2* ont été mises en évidence (Figure 51). Du fait de ces faibles interactions, nous ne sommes pas allés plus loin dans ces analyses.



**Figure 51 : Identification des zones d'interactions potentielles entre les antitoxines SprF2, SprF3 et SprF4 et l'ARNm *rpmE2*.** Ces interactions ont été prédites par IntaRNA.

Afin d'évaluer une potentielle redondance de la régulation de l'expression de YidC par les antitoxines SprF, nous avons utilisé le plasmide pBT2-*yidC-flag* pour intégrer, au chromosome, une étiquette FLAG en amont du codon STOP de la protéine YidC dans la souche HG003 délétée des quatre systèmes SprF/SprG (souche notée HG003Δ4TA). A noter que l'ajout d'un FLAG en C-terminal de YidC ne modifie pas la croissance de la souche HG003Δ4TA (Figure 52A). Nous avons validé, par western blot, l'expression de la protéine YidC-FLAG ayant une taille attendue d'environ 30 kDa dans la souche HG003Δ4TA::*yidC-flag* (Figure 52B). L'absence de signal de chimiluminescence pour la souche HG003Δ4TA confirme la spécificité de l'anticorps et la bonne intégration du gène *yidC-flag* au chromosome (Figure 52B). Nous avons ensuite analysé le niveau d'expression de la protéine YidC-FLAG en phase exponentielle (2h) et stationnaire (6h) de croissance pour les souches HG003::*yidC-flag* et HG003Δ4TA::*yidC-flag* (Figure 52C). Visuellement, nous n'avons pas observé de différence du niveau d'expression de la protéine YidC-FLAG entre ces 2 souches. Ces observations suggèrent que la délétion des quatre systèmes SprG/SprF n'a pas d'effet sur le niveau d'expression de YidC et qu'il n'y aurait donc pas de redondance entre les antitoxines SprF pour la régulation de l'expression de YidC. Cependant, étant donné que c'est la surexpression de SprF1 qui entraîne une diminution de l'expression de YidC, il

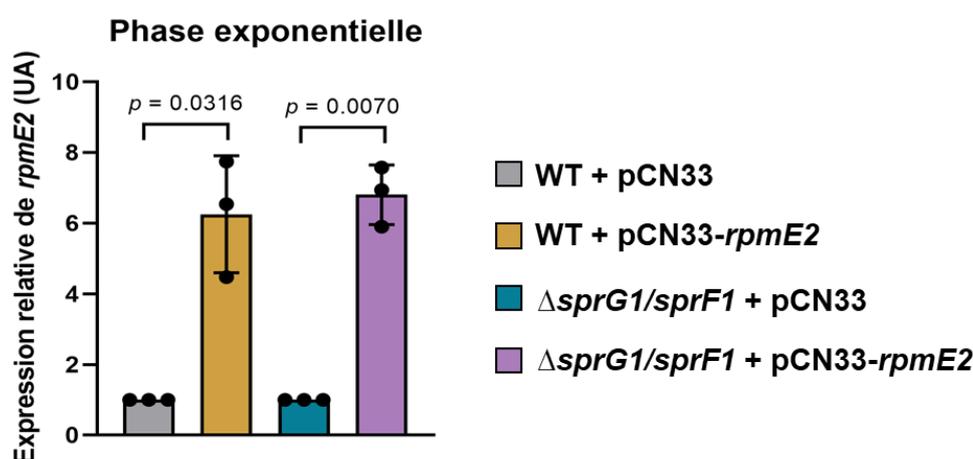
serait intéressant d'analyser l'effet des antitoxines SprF, en particulier SprF3, sur l'expression de YidC en condition de surexpression.



**Figure 52 : La délétion des quatre systèmes SprG/SprF n'a pas d'effet sur l'expression de la protéine YidC.** (A) Cinétiques de croissance des souches HG003 WT, HG003::yidC-flag, HG003Δ4TA et HG003Δ4TA::yidC-flag en milieu TSB (n = 3). (B) Western blot des protéines extraites en phase exponentielle (2h) ou stationnaire de croissance (6h) des souches HG003Δ4TA et HG003Δ4TA::yidC-flag cultivées en milieu TSB. La protéine YidC-FLAG a été révélée par chimiluminescence à l'aide d'un anticorps anti-FLAG. (C) Western blot des protéines extraites en phase exponentielle (2h) ou stationnaire de croissance (6h) des souches HG003::yidC-flag et HG003Δ4TA::yidC-flag cultivées en milieu TSB. La protéine YidC-FLAG a été révélée par chimiluminescence à l'aide d'un anticorps anti-FLAG. Le gel coloré au ReadyBlue est utilisé comme contrôle de dépôt. MT = Marqueur de taille.

## ii.ii. La tolérance induite par la surexpression de *rpmE2* est dose dépendante

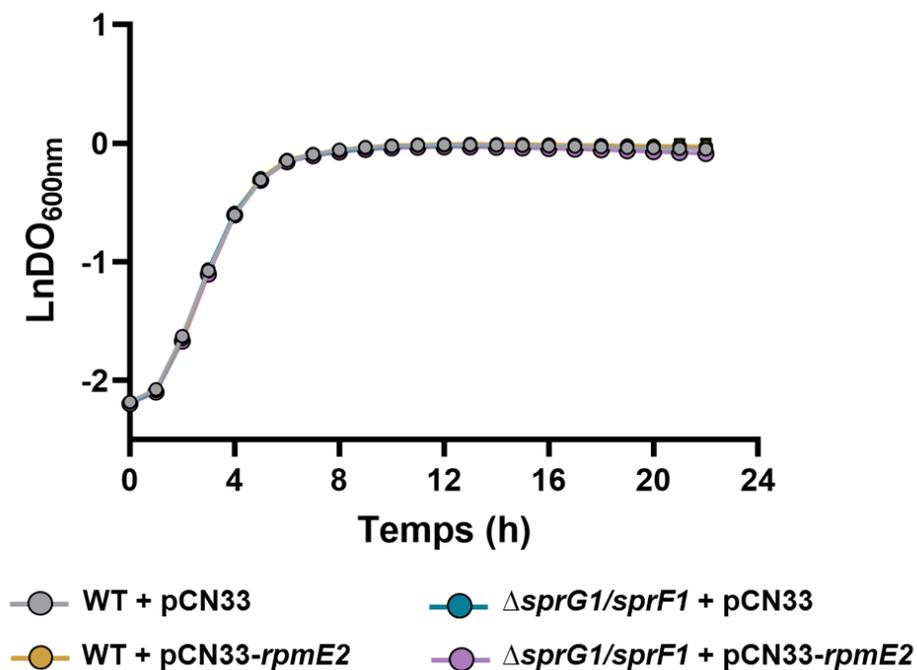
Dans l'article 2 présenté à la page 131 de ce manuscrit, nous avons montré que la surexpression de l'ARNm *rpmE2* via le plasmide pCN35 induit une augmentation de la tolérance à la ciprofloxacine et à la cloxacilline. Aussi, ce phénotype est associé à une augmentation des valeurs de MDK<sub>99</sub> et MDK<sub>99,99</sub>. Le plasmide pCN35 étant un plasmide à fort taux de copies, nous nous sommes demandés si la surexpression de l'ARNm *rpmE2* par un plasmide à plus faible taux de copies (plasmide pCN33 (Charpentier *et al.*, 2004)) pouvait aussi engendrer un phénotype de tolérance. Pour cela, le plasmide pCN33-*rpmE2* a été construit et transformé dans les souches HG003 WT et  $\Delta sprG1/sprF1$ . Dans un premier temps, nous avons validé la surexpression de *rpmE2* par le plasmide pCN33-*rpmE2* (Figure 53). Cette surexpression est environ 10 fois plus faible qu'avec le plasmide pCN35 (Figure 53 et Article 2, Figure S7).



**Figure 53** : Le plasmide pCN33-*rpmE2* entraîne une surexpression de l'ARNm *rpmE2*. Niveau d'expression de l'ARNm *rpmE2* mesuré par RT-qPCR chez les souches HG003 WT et  $\Delta sprG1/sprF1$  portant les plasmides pCN33 ou pCN33-*rpmE2* en phase exponentielle de croissance (2h) en milieu TSB (n = 3). Les données ont été normalisées par rapport au niveau d'expression de l'ARNm *gyrB* et comparées au niveau d'expression de *rpmE2* mesuré pour les souches portant le plasmide pCN33, arbitrairement fixé à 1. Statistiques déterminées par un test *t* de Student avec correction de Welch. UA : Unité arbitraire.

Contrairement à la surexpression de l'ARNm *rpmE2* par le plasmide pCN35 qui cause un ralentissement de la croissance bactérienne au cours de la phase exponentielle (Article 2, Figure 5), la surexpression de l'ARNm *rpmE2* via le plasmide pCN33 n'a aucun effet sur la croissance de *S. aureus* (Figure 54). Par la suite, après avoir vérifié que la CMI de la ciprofloxacine était identique pour les 4 souches étudiées, des expériences de survie à la ciprofloxacine (100X CMI) ont été réalisées (Tableau 6). Le profil des courbes de survie pour les 4 souches est similaire (Figure 55A). Cette observation est en corrélation avec le résultat de la Figure 55B qui montre qu'il n'y a pas de différence significative du taux de survie des 4 souches 24 h après traitement à la ciprofloxacine. De plus, les valeurs de MDK<sub>99</sub> et MDK<sub>99,99</sub> sont identiques entre les souches (Tableau 7). Finalement, ces résultats indiquent que, contrairement au plasmide pCN35, la surexpression de l'ARNm *rpmE2*

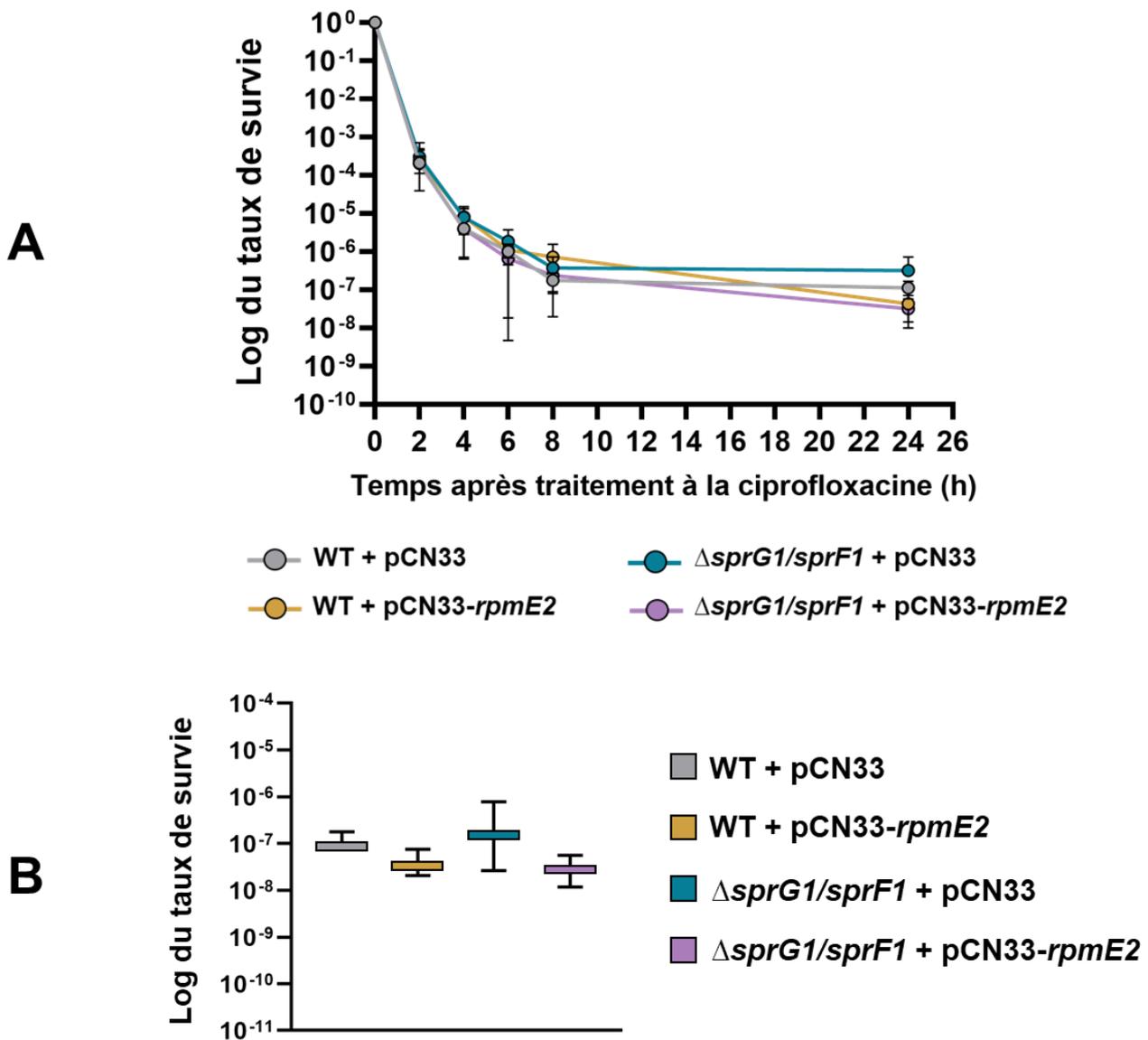
par le plasmide pCN33 n'a pas d'effet sur la tolérance à la ciprofloxacine ce qui suggère que le phénotype de tolérance induit par *rpmE2* est dose dépendant.



**Figure 54 :** La surexpression de l'ARNm *rpmE2* par le plasmide pCN33 ne modifie pas la croissance bactérienne. Cinétiques de croissance des souches HG003 WT et  $\Delta sprG1/sprF1$  portant les plasmides pCN33 ou pCN33-*rpmE2* en milieu TSB (n = 3).

**Tableau 6 :** Valeurs de CMI de la ciprofloxacine.

Souche	CMI Ciprofloxacine
WT + pCN33	0.0625 µg/ml
WT + pCN33- <i>rpmE2</i>	0.0625 µg/ml
$\Delta sprG1/sprF1$ + pCN33	0.0625 µg/ml
$\Delta sprG1/sprF1$ + pCN33- <i>rpmE2</i>	0.0625 µg/ml



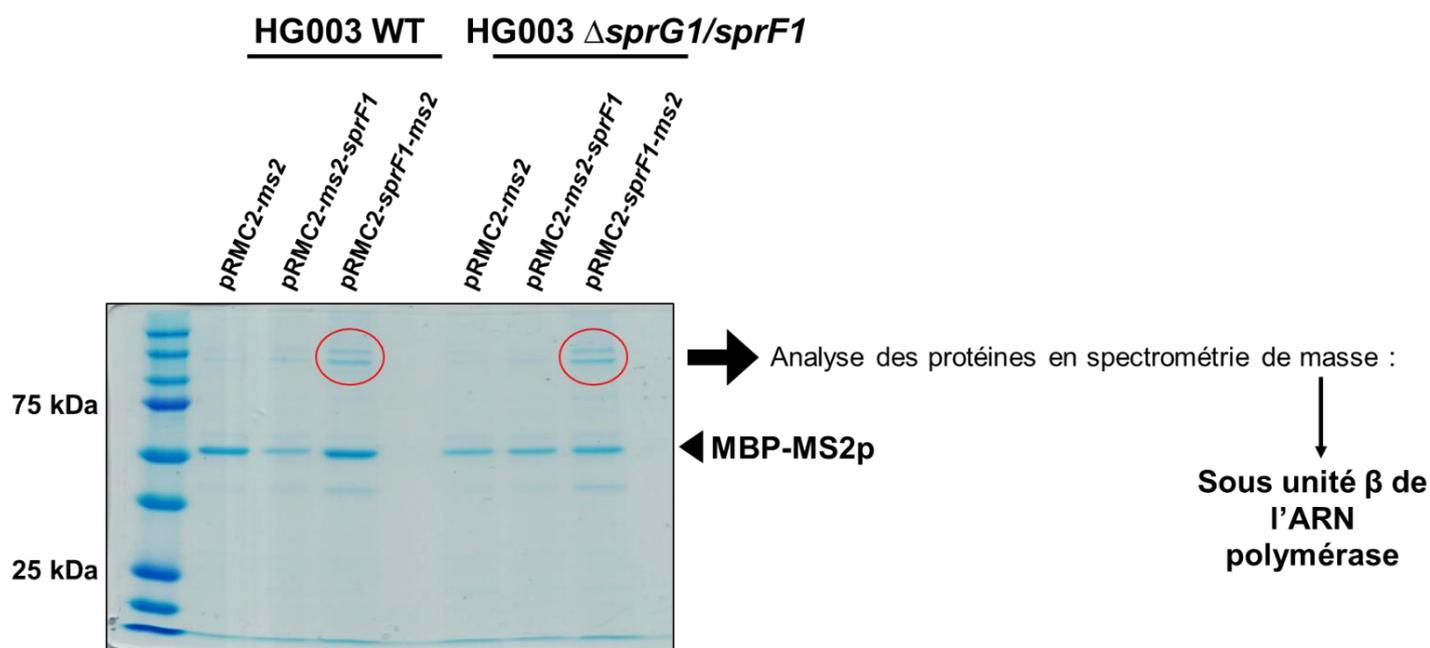
**Figure 55** : La surexpression de l'ARNm *rpmE2* par le plasmide pCN33 n'a pas d'effet sur la tolérance à la ciprofloxacine. (A) Courbes de survie des souches HG003 WT et  $\Delta sprG1/sprF1$  portant les plasmides pCN33 ou pCN33-*rpmE2* après traitement à la ciprofloxacine (100X CMI) (n = 3). (B) Taux de survie des souches HG003 WT et  $\Delta sprG1/sprF1$  portant les plasmides pCN33 ou pCN33-*rpmE2* 24 h après traitement à la ciprofloxacine (n = 3).

**Tableau 7** : Valeurs des MDK<sub>99</sub> et MDK<sub>99,99</sub> de la ciprofloxacine.

Souche	Ciprofloxacine	
	MDK <sub>99</sub> (h)	MDK <sub>99,99</sub> (h)
WT + pCN33	1.2	2.4
WT + pCN33- <i>rpmE2</i>	1.2	2.6
$\Delta sprG1/sprF1$ + pCN33	1.2	2.6
$\Delta sprG1/sprF1$ + pCN33- <i>rpmE2</i>	1.2	2.4

### iii. Recherche des cibles protéiques de SprF1

Comme évoqué précédemment, la technique MAPS peut permettre d'identifier les protéines qui interagissent avec un ARN. Les complexes MS2-SprF1/protéine ou SprF1-MS2/protéine ont donc été décrochés de la colonne d'affinité chargée par la protéine MBP-MS2p par une solution de RNase dégradant les ARN SprF1 fusionnés à l'aptamère MS2. Les protéines décrochées ont ensuite été précipitées au TCA (Acide trichloroacétique) et déposées sur SDS-PAGE. Après migration, les protéines ont été révélées par une coloration au ReadyBlue. Visuellement, nous avons observé un enrichissement de deux bandes protéiques dans la condition SprF1-MS2 par rapport à la condition MS2 seule, que ce soit pour la souche HG003 WT ou  $\Delta sprG1/sprF1$  (Figure 56). Ces bandes ont donc été découpées et envoyées à la plateforme protéomique de l'Institut Cochin pour être identifiées par spectrométrie de masse. L'identification a révélé que ces bandes protéiques correspondaient à la sous-unité  $\beta$  de l'ARN polymérase (RpoB). Cependant, cette protéine ayant déjà été retrouvée dans une autre analyse MAPS réalisée au sein du laboratoire, nous avons choisi de ne pas poursuivre nos investigations sur cette protéine.



**Figure 56 : Visualisation des protéines enrichies dans les conditions MS2-SprF1 et SprF1-MS2 en comparaison de la condition MS2 seule.** Les protéines décrochées de la colonne d'affinité MBP-MS2p ont été déposées sur SDS-PAGE et révélées par une coloration au ReadyBlue. Les quatre bandes entourées en rouge ont été découpées et identifiées par spectrométrie de masse.

### III. Partie 3 : Impact du système SprG1/SprF1 sur le protéome de *Staphylococcus aureus*

Durant ma thèse, j'ai également participé à une étude, initiée avant mon arrivée au laboratoire, visant à analyser l'impact du système SprG1/SprF1 sur le protéome de la souche N315 de *S. aureus*, une souche résistante à la pénicilline. Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Dr Benedykt WLADYKA de l'Université de Cracovie en Pologne suite à la mise en évidence de la capacité de l'antitoxine SprF1 à se fixer aux ribosomes pour atténuer la traduction et favoriser la formation de bactéries persistantes (Pinel-Marie *et al.*, 2021). Nous avons réalisé une étude protéomique par 2D-DIGE couplée à la spectrométrie de masse en comparant les profils d'expression des protéines intracellulaires et extracellulaires des souches N315 parentale (WT + pCN35), délétée ( $\Delta sprG1/sprF1$  + pCN35) et complétée pour l'ARN SprF1 ( $\Delta sprG1/sprF1$  + pCN35-*sprF1*). Pour cela, les bactéries ont été cultivées en milieu TSB et les protéines ont été extraites en phase exponentielle (3,5h) ou stationnaire (15h) de croissance. Ces dernières ont ensuite été déposées et séparées par une électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide. Après coloration au nitrate d'argent, les protéines différentiellement exprimées entre les conditions WT + pCN35 vs  $\Delta sprG1/sprF1$  + pCN35,  $\Delta sprG1/sprF1$  + pCN35-*sprF1* vs WT + pCN35 et  $\Delta sprG1/sprF1$  + pCN35 vs  $\Delta sprG1/sprF1$  + pCN35-*sprF1*, ont été découpées et identifiées par spectrométrie de masse.

Nous avons montré qu'en phase exponentielle de croissance, le protéome intracellulaire est relativement semblable pour les trois types de comparaisons analysées (Article 3, Tableau 2). En revanche, nous avons observé, en phase stationnaire de croissance, une augmentation de l'expression de 5 protéines cytoplasmiques dans la souche  $\Delta sprG1/sprF1$  + pCN35 comparée à la souche WT + pCN35. Ces protéines sont la phosphoglycérate mutase (GpmI), un composant de la 2-oxoglutarate déshydrogénase (OdhB), la catalase (KatA), la protéine FtsA impliquée dans la division cellulaire et la protéase ClpL (Article 3, Tableau 2). Au contraire, nous avons mis en évidence une diminution de l'expression de 5 protéines cytoplasmiques dans la souche  $\Delta sprG1/sprF1$  + pCN35-*sprF1* comparée à la souche  $\Delta sprG1/sprF1$  + pCN35 ainsi qu'une diminution de l'expression de 8 protéines cytoplasmiques dans la souche  $\Delta sprG1/sprF1$  + pCN35-*sprF1* comparée à la souche WT + pCN35 (Article 3, Tableau 2). Parmi ces protéines, 6 sont des enzymes associées à la glycolyse : la pyruvate déshydrogénase, la succinyl-CoA ligase, la phosphofructokinase, la phosphoglycérate mutase, l'aldolase et la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (Article 3, Figure S4). De façon intéressante, le niveau des ARNm *pfkA*, *gpmI* et *gapA1*, codant respectivement pour la phosphofructokinase, la phosphoglycérate mutase et la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, est diminué chez les bactéries persistantes de *S. aureus* internalisées dans des macrophages humains (Peyrusson *et al.*, 2020). Ces résultats suggèrent que SprF1, en diminuant le niveau d'expression d'enzymes impliquées dans la glycolyse

participe à la formation de bactéries persistantes en phase stationnaire de croissance, où le niveau de bactéries persistantes est élevé (Balaban *et al.*, 2019).

Etant donné que SprF1 est capable de s'apparier à l'ARNm *sprG1* pour inhiber sa traduction, nous avons ensuite analysé l'effet de SprF1 sur le niveau d'expression des ARNm *fabZ*, *ribH*, *pdhB* et *ppiB* codant pour des protéines dont l'expression est diminuée en présence de SprF1 en phase stationnaire de croissance (Article 3, Tableau 2). Nous avons observé une diminution significative du niveau relatif d'expression des ARN *fabZ*, *ribH* et *ppiB* dans la souche  $\Delta sprG1/sprF1$  + pCN35-*sprF1* comparée à la souche WT + pCN35 mais aucune différence de niveau relatif d'expression de ces 4 ARNm entre les souches  $\Delta sprG1/sprF1$  + pCN35 et  $\Delta sprG1/sprF1$  + pCN35-*sprF1* n'a été démontrée (Article 3, Figure 3A). Nous avons également observé une diminution significative du niveau relatif d'expression de l'ARNm *ppiB* dans la souche  $\Delta sprG1/sprF1$  + pCN35 comparée à la souche WT + pCN35. Par la suite, une expérience de retard sur gel a été réalisée afin d'étudier une potentielle interaction entre SprF1 et l'ARNm *ppiB* car une zone d'interaction a été prédite *in silico* entre ces deux ARN à l'aide du logiciel TargetRNA2 (Article 3, Figure 3B). Malheureusement, nous n'avons pas observé de complexe entre SprF1 et l'ARNm *ppiB* (Article 3, Figure 3C), indiquant donc que cet ARNm n'est probablement pas une cible directe de SprF1. Contrairement aux données présentées dans l'Article 3, les expériences de MAPS ont été réalisées dans la souche HG003 en phase exponentielle de croissance. Cependant, il est à noter que nous n'avons pas retrouvé les ARNm *fabZ*, *ribH*, *pdhB* et *ppiB* dans nos résultats de MAPS, ce qui suggère que les réseaux de régulation mis en place par ces deux souches diffèrent.

La comparaison du protéome extracellulaire des souches WT + pCN35,  $\Delta sprG1/sprF1$  + pCN35 et  $\Delta sprG1/sprF1$  + pCN35-*sprF1* en phase stationnaire de croissance a aussi permis de montrer des différences d'expression de certaines protéines. De façon intéressante, nous avons observé un niveau plus important d'une quarantaine de protéines, dont la majorité est cytoplasmique, dans le milieu extracellulaire pour la souche WT + pCN35 comparée à la souche  $\Delta sprG1/sprF1$  + pCN35 ou à la souche  $\Delta sprG1/sprF1$  + pCN35-*sprF1* (Article 3, Tableau 3). Nous avons ensuite démontré, dans la souche WT + pCN35, une augmentation du niveau d'expression de l'ARNm *sprG1* et des peptides SprG1<sub>31</sub> et SprG1<sub>44</sub> en phase stationnaire de croissance comparée à la phase exponentielle de croissance (Article 3, Figures 4A et 4C). Il semblerait donc ici que la présence des peptides SprG1<sub>31</sub> et SprG1<sub>44</sub> favorise la libération de protéines cytoplasmiques en phase stationnaire de croissance, phénomène encore mal compris mais contribuant à la pathogénie de *S. aureus* (Ebner *et al.*, 2016). En revanche, SprF1 n'intervient pas dans l'excrétion de protéines cytoplasmiques en phase stationnaire de croissance puisque son niveau est diminué par rapport à la phase exponentielle de croissance (Article 3, Figure 1A).

En conclusion, ce travail suggère qu'au cours de la phase stationnaire de croissance, durant laquelle *S. aureus* est confronté à une carence nutritive, SprF1 serait capable de diminuer le niveau d'expression d'enzymes impliquées dans la glycolyse pour favoriser la formation de bactéries

persistantes tandis que les peptides SprG<sub>131</sub> et SprG<sub>144</sub> favoriseraient l'excrétion de protéines cytoplasmiques pouvant ainsi contribuer à la pathogénie de *S. aureus*.

L'ensemble de ces résultats ont conduit à la publication de l'article « **Impacts of the type I toxin-antitoxin system, SprG1/SprF1, on *Staphylococcus aureus* gene expression** » par Kinga Chlebicka, Emilia Bonar, Piotr Suder, **Emeline Ostyn**, Brice Felden, Benedykt Wladyka et Marie-Laure Pinel-Marie dans le journal *Genes* en mai 2021.

## Article 3

---

Impacts of the type I toxin-antitoxin system, SprG1/SprF1, on  
*Staphylococcus aureus* gene expression



Article

# Impacts of the Type I Toxin–Antitoxin System, SprG1/SprF1, on *Staphylococcus aureus* Gene Expression

Kinga Chlebicka <sup>1,†</sup>, Emilia Bonar <sup>1,†</sup>, Piotr Suder <sup>2</sup> , Emeline Ostyn <sup>3</sup>, Brice Felden <sup>3</sup>, Benedykt Wladyka <sup>1,\*</sup>  and Marie-Laure Pinel-Marie <sup>3,\*</sup> 

<sup>1</sup> Department of Analytical Biochemistry, Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology, Jagiellonian University, 30-387 Krakow, Poland; chlebicka.kinga@gmail.com (K.C.); emilia.bonar@uj.edu.pl (E.B.)

<sup>2</sup> Department of Analytical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Materials Science and Ceramics, AGH University of Science and Technology, 31-007 Krakow, Poland; piotr.suder@agh.edu.pl

<sup>3</sup> Inserm, BRM [Bacterial Regulatory RNAs and Medicine]—UMR\_S 1230, 35000 Rennes, France; emeline.ostyn@univ-rennes1.fr

\* Correspondence: benedykt.wladyka@uj.edu.pl (B.W.); marie-laure.pinel@univ-rennes1.fr (M.-L.P.-M.); Tel.: +48-126646511 (B.W.); +33-223234850 (M.-L.P.-M.)

† These authors contributed equally to this work.

**Abstract:** Type I toxin–antitoxin (TA) systems are widespread genetic modules in bacterial genomes. They express toxic peptides whose overexpression leads to growth arrest or cell death, whereas antitoxins regulate the expression of toxins, acting as labile antisense RNAs. The *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) genome contains and expresses several functional type I TA systems, but their biological functions remain unclear. Here, we addressed and challenged experimentally, by proteomics, if the type I TA system, the SprG1/SprF1 pair, influences the overall gene expression in *S. aureus*. Deleted and complemented *S. aureus* strains were analyzed for their proteomes, both intracellular and extracellular, during growth. Comparison of intracellular proteomes among the strains points to the SprF1 antitoxin as moderately downregulating protein expression. In the strain naturally expressing the SprG1 toxin, cytoplasmic proteins are excreted into the medium, but this is not due to unspecific cell leakages. Such a toxin-driven release of the cytoplasmic proteins may modulate the host inflammatory response that, in turn, could amplify the *S. aureus* infection spread.

**Keywords:** toxin–antitoxin systems (type I); *Staphylococcus aureus*; 2D-DIGE; proteomics; RNA antitoxin; peptide toxins



**Citation:** Chlebicka, K.; Bonar, E.; Suder, P.; Ostyn, E.; Felden, B.; Wladyka, B.; Pinel-Marie, M.-L. Impacts of the Type I Toxin–Antitoxin System, SprG1/SprF1, on *Staphylococcus aureus* Gene Expression. *Genes* **2021**, *12*, 770. <https://doi.org/10.3390/genes12050770>

Academic Editor: Taek Bae

Received: 1 April 2021

Accepted: 16 May 2021

Published: 18 May 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Toxin–antitoxin (TA) loci encode two-component modules that consist of a stable ‘toxin’, whose ectopic overexpression either kills cells or confers growth stasis, and an unstable ‘antitoxin’ that neutralizes the toxin action. A wealth of TA gene loci are present on bacterial plasmids, phages, and chromosomes [1]. These modules thrive in many bacterial pathogens, although the reasons for this profusion remain unknown. Despite studying TA modules for decades, their biological functions and underlying molecular mechanisms are lagging behind. Nevertheless, three functions were attributed to them, post-segregational killing after a plasmid loss, abortive infection, or persister cell formation. Thus, TA gene pairs act as effectors of dormancy and persistence and contribute to the generation of non-growing bacterial cells in response to stress, including during host cell internalization [2–5]. TA module expression regulation at the RNA and/or protein levels, toxin target selection and specificity, and antitoxin modes of negating the toxin effects, are elements that convert their actions into biological functions. Up to now, eight different TA system types were described [6] (type I to VI reviewed in [7]), but translational repression of toxin mRNA by an RNA antisense (type I) and inhibition of toxin activity by

an antitoxin through protein–protein interaction (type II) are the prevailing mechanisms. Type I TA systems have an RNA antitoxin and a protein toxin. In these systems, antisense RNAs pair with the toxin’s mRNA to inhibit translation, and sometimes reduce a toxin’s mRNA steady-state levels [8]. Under standard growth conditions, those type I RNA duplexes cannot load onto the translating ribosomes and are rapidly degraded. Under stress, the pool of antitoxin RNAs is reduced, resulting in the translation of the toxin’s mRNA. The majority of type I toxins are short amphipathic peptides that can penetrate the membrane, disrupting its integrity and leading to growth arrest or cell death. Type I toxins are partitioned into two main classes, according to their locations and mechanisms. The first one comprises membrane-associated toxins acting by pore formation, by nucleoid condensation, or by forming a “carpet”, which destabilizes the phospholipid packing through a detergent-like mechanism. The second class is cytosolic toxins that cleave nucleic acids [9,10]. The *Staphylococcus aureus* N315, a multidrug-resistant pathogen, expresses functional type I TA systems [11–15]. Among them, the SprG/SprF TA systems are found in four homologs in the *S. aureus* genome [12,15]. The overexpression of toxic membrane peptides encoded by SprG RNAs triggers *S. aureus* stasis or death. SprF antitoxins reduce toxin mRNA steady-state levels by interacting in *cis* with their overlapping regions and thus prevent toxin translation [12,15]. The SprG toxicity control is specific to the cognate antitoxin, but cross-regulations between the different SprG/SprF TA systems can occur to modulate the RNA levels of homologs [15]. The biological function of the SprG1/SprF1 TA system begins to elucidate. The *sprG1*-encoded membrane peptides trigger lysis of competing bacteria and human cells [12]. Recently, we demonstrated that the SprF1 is a dual-function RNA antitoxin that, beyond protection from SprG1 toxicity, binds ribosomes to attenuate translation initiation by interfering with initiator transfer RNA binding. This translation attenuation mechanism mediated by SprF1 promotes antibiotic persister cell formation [16]. This may suggest a global regulatory role for the SprG1/SprF1 TA system, similar to already known staphylococcal gene expression regulators (such as *agr*, *sarA*, and *saeRS*) [17], albeit through completely different molecular mechanisms.

In this research, we performed a comparative proteomic study on the SprG1/SprF1 type I TA system to identify proteins, whose expression is modulated by SprF1 and/or SprG1 during *S. aureus* growth. We specifically monitored the differential expression of both intracellular and extracellular proteins in strain N315, a double deletion mutant, and an antitoxin-supplemented mutant. Comparison of intracellular proteomes among the strains points to the SprF1 antitoxin, as moderately downregulating protein expression. In the strain naturally expressing the SprG1 toxin, cytoplasmic proteins are excreted into the medium, but this is not due to unspecific cell protein leakage.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Bacterial Strains and Growth Conditions

*S. aureus* strain N315 [18] and the *sprG1/sprF1* deletion mutant (N315 $\Delta$ *sprG1*/ $\Delta$ *sprF1*) transformed with the control plasmid (pCN35), the N315 $\Delta$ *sprG1*/ $\Delta$ *sprF1* transformed with the plasmid (pCN35 $\Omega$ *sprF1*) expressing SprF1 antitoxin under the control of its native promoter, as well as the N315 $\Delta$ *sprG1*/ $\Delta$ *sprF1* transformed with the plasmid (pCN35 $\Omega$ *sprG1Flag*) expressing the flagged version of SprG1, under the control of its native promoter, [12] were plated or cultivated in Tryptic Soy Broth (TSB) supplemented with chloramphenicol (10  $\mu$ g/mL) at 37 °C with vigorous shaking (200 rpm) (optimal conditions). For stress conditions, bacteria were grown either at elevated temperature (42 °C, TSB) or in minimal medium (NZM, 37 °C). For gene expression and proteomic analysis, cells were grown in optimal conditions with three and four biological replicates, respectively. When necessary, bacterial growth was monitored with a spectrophotometer, as optical density (OD) at 600 nm.

## 2.2. Proteomic Analysis

Sample preparation and 2D DIGE (two-dimensional difference gel electrophoresis) proteomic analysis were performed as described in [19]. Briefly, for cellular protein isolation, bacteria from the logarithmic and the stationary phase of growth (3.5 h and 15 h post-inoculation, respectively) were pelleted by centrifugation (5 min,  $5000\times g$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), washed twice with phosphate buffer saline, and suspended in TRI-Reagent (Sigma, Darmstadt, Germany). The cell suspension was homogenized (Precellys Evolution homogenizer, Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France)  $4\times 30\text{ s}$ ,  $6300\text{ rpm}$  and centrifuged (15 min,  $10,000\times g$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). The supernatant was collected, mixed with chloroform (4:1), and proteins were purified with the TRI-Reagent according to the manufacturer's instructions for protein isolation and finally dissolved in a lysis buffer (7 M Urea, 2 M Thiourea, 30 mM Tris-HCl, 4% CHAPS). For extracellular protein isolation, the culture liquids were collected 16 h after inoculation with bacteria and centrifuged (30 min,  $12\times g$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). The obtained supernatants were filtered through a  $0.22\text{ }\mu\text{m}$  PVDF filter to ensure the complete removal of bacterial cells. Proteins were precipitated with an equal volume of a mixture of methanol and chloroform (3:1), and the precipitate was dissolved in TRI-Reagent and proceeded as above.

For 2D DIGE, protein samples were labeled with fluorescent G-Dyes (Refraction-2D™ Labeling Kits, NH DyeAGNOSTICS, Halle, Germany), paired, mixed respectively, and isoelectrofocussed on 17 cm IPG-strips with a pH range of 4 to 7. SDS-PAGE was used for separation in the second dimension. The gels were then scanned with Chemidoc MP (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and obtained images were analyzed with the DeCyder 7.2 software (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). The differentiating protein spots were cut out from silver-stained gels and subjected to mass spectrometry identification. NanoLC-MS/MS analyses were done as described in [20] with minor changes. Briefly, after proteolytic cleavage with trypsin (Gold MS grade, Promega, Madison, WI, USA), samples were lyophilized and resuspended in 4% acetonitrile in water acidified by 0.1% formic acid (*v/v*). Next, peptides were introduced on the precolumn ( $300\text{ }\mu\text{m ID}\times 10\text{ mm}$ ), purified, and transferred on the capillary  $75\text{ }\mu\text{m ID}\times 150\text{ mm}$  column (both: C18,  $5\text{ }\mu\text{m}$ , PepMap100, Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania). The separation gradient was based on two solvents: water and acetonitrile, both acidified with 0.1% formic acid (*v/v*). The gradient parameters were 4 to 50% acetonitrile for 60 min. All gradients were performed using the Ultimate 3000 system (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) connected online to an Amazon SL mass spectrometer (Bruker-Daltonics, Bremen, Germany). Basic settings of the mass spectrometer were as follows: scan range: 600 to 1800 *m/z*; ICC Target: 200,000 ions/ion trap cycle; spray voltage: 4200 V (source type: ESI nano sprayer); nebulizer pressure: 12 psi; gas flow: 5 L/min, heated capillary temperature:  $140\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Fragmentation settings: precursor ions: 2; fragmentation scan range: 200 to 1800 *m/z*; preferred precursor charge: 2+; active exclusion of precursor mass envelope 4 Da after two fragmentation spectra for 30 s. Data extraction from raw files was done under Compass Data Analysis 4.4 SR1 (Bruker-Daltonics). The received \*.mgf files were processed by Mascot software ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com) London, UK, database used: SwissProt, accessed on-line in the date range: October–December. 2020). The Mascot MS/MS ion search engine was set as follows: database: SwissProt, taxonomy: all entries; enzyme: trypsin (up to 1 missed cleavage); fixed modif.: carbamidomethylation; variable modif.: Met-oxidation; peptide tolerance  $\pm 1.2\text{ Da}$  ( $13\text{C} = 1$ ); MS/MS tolerance:  $\pm 0.6\text{ Da}$ ; peptide charge: 1+, 2+, 3+; instrument: ESI-TRAP. The proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE [21] partner repository with the dataset identifier PXD023449 and 10.6019/PXD023449.

## 2.3. RNA Extraction, Northern Blots, and RT-qPCR Assays

The expression of the SprG1/SprF1 TA system components was monitored by Northern blot. *S. aureus* from logarithmic and stationary growth phases were centrifuged for 5 min at  $4000\times g$  at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  and pellets were stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Cell pellets were resuspended in 500  $\mu\text{L}$  of lysis buffer (0.5% SDS, 20 mM sodium acetate, 1 mM EDTA, pH 5.5) and

mechanically broken through bead beating in phenol (pH 4.0) using a FastPrep-24 5G instrument (MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, France). After 5-min centrifugation at  $12,000\times g$  at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , the aqueous phase was transferred with an equal volume of phenol (pH 4.0) and centrifuged for 5 min at  $12,000\times g$  at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . This was then mixed with an equal volume of a 24:1 solution of chloroform/isoamyl alcohol and centrifuged for 5 min at  $12,000\times g$  at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . RNA was precipitated from the aqueous phase by adding 2.5 volumes of ethanol and 0.1 volumes of 3 M NaOAc (pH 5.2) solution. For the Northern blot assays, 1 to 10  $\mu\text{g}$  of RNA were separated onto an 8% urea-PAGE gel and electrotransferred onto a ZetaProbe GT membrane (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in  $0.5\times$  Tris-borate-EDTA buffer (90 mM Tris, 90 mM boric acid, 2 mM EDTA) for 2 h at 25 V. RNA was cross-linked to the membrane by ultraviolet irradiation. Specific probes (Table 1) were labeled with  $0.5\text{ }\mu\text{L}$  [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]-ATP (5  $\mu\text{Ci}$ ; PerkinElmer, Waltham, MA, USA) and T4 PNK enzyme and hybridized overnight on the membranes with ExpressHyb solution (Ozyme, Saint-Cyr-l'École, France). Membranes were washed twice in  $2\times$  SSC solution with 0.05% SDS for 10 min, in  $0.1\times$  SSC with 0.1% SDS for 10 min, then exposed and scanned with a PhosphorImager (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). The 5S ribosomal RNA was used as the loading control. mRNA levels of the SprG1 toxin and differentially expressed proteins were assessed by RT-qPCR. A total of 4 mL and 2 mL of bacterial cultures from logarithmic and stationary growth phases, respectively, were centrifuged (2 min,  $5000\times g$ , RT). Cells were resuspended in 1 mL of TRI-Reagent, transferred to the Lysis Matrix B Tube, and homogenized (Precellys Evolution homogenizer, Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France, 4500 rpm, 15 min). Then, 100  $\mu\text{L}$  of 1-bromo-3-chloropropan was added, the mixture was manually and vigorously shaken for 15 s and centrifuged (15 min,  $12,000\times g$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). The colorless upper phase was mixed with half a volume of 96% ethanol, transferred onto a microcolumn (Gene Jet RNA Purification Kit, Thermo Scientific, Dublin, Ireland), and spun (1 min,  $12,000\times g$ , RT). Next, 10  $\mu\text{L}$  of DNase I RNase free (Thermo Scientific, Dublin, Ireland) was added to the column and incubated 15 min at RT. The next steps were performed according to Gene Jet RNA Purification Kit instructions. Total RNAs were eluted with water and reverse transcribed to cDNA by Maxima H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, Dublin, Ireland), with random hexamers as primers. qPCR was performed with gene-specific primers (Table 1) and iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), with a  $54\text{ }^{\circ}\text{C}$  annealing temperature.

**Table 1.** A list of DNA oligonucleotides used in the study.

Name	Sequence (5'-3')	Application
SprF1-NB	TAAC TTGCTGGT TTCGATGGTT	Northern blot
SprG1-NB	ATGCCACCATAGGCACCACTCCTT	Northern blot
5S rRNA-NB	CGTAAAGTTCGACTACCATCG	Northern blot
SprG1-F	AGTATACAAGCAGTAAAAAAGTATATGTG	RT-qPCR
SprG1-R	ATTCAGTAATGCCACCATAGGCA	RT-qPCR
gyrB-F	CAACAATGAACCCTGAGCACC	RT-qPCR
gyrB-R	CGGTTTTCTACAACGTCACCC	RT-qPCR
ribH-F	GTCGCGAAAGGTGTTTCTAAAGTA	RT-qPCR
ribH-R	CCAGCTTTCGTACCTGCTCT	RT-qPCR
fabZ-F	AACGTCAAGTAGTACCTGGTGATA	RT-qPCR
fabZ-R	CAAGCAAGTTGACCATCGACAG	RT-qPCR
ppiB-F	CATTGTTCAAATGAAAGAAGTACCTCA	RT-qPCR
ppiB-R	GTGTACCACCTTTTCGCCATA	RT-qPCR
pdhB-F	GCTGAATCAGGTATTGGTGGTTTA	RT-qPCR
pdhB-R	TGTCCAGCAATCGCATCAAATACTT	RT-qPCR
SprF1-T7	TAATACGACTCACTATAGGGATATATAGAAAAAGGGCAAC	In vitro transcription
SprF1-rev	AAAAAATAACCATCGCTAACTTTGGCT	In vitro transcription
ppiB-T7	TAATACGACTCACTATAGGGTTTCTCCCTTAAAGTATGTTAATA	In vitro transcription
ppiB-rev	ATAACCACTTAAATTCACCTTGT	In vitro transcription

#### 2.4. Protein Extraction and Western Blots

The *S. aureus* strains N315-transformed with pCN35 and N315 $\Delta$ sprG1/ $\Delta$ sprF1 carrying either pCN35, pCN3535 $\Omega$ sprF1, or pCN35 $\Omega$ sprG1Flag plasmids were grown to the exponential and stationary growth phase in TSB. Protein samples were prepared from 10 mL of bacterial cultures. For intracellular protein extraction, bacterial pellets were resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-EDTA, pH 7.7, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> of lysostaphin), incubated for 15 min at 37 °C, then protease inhibitors (Roche Diagnostics, Meylan, France) were added and transferred onto ice. After sonication, protein concentration was quantified using the Qubit Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Dublin, Ireland), according to the manufacturer's instructions. For the extraction of extracellular proteins, supernatants were precipitated with 10% trichloroacetic acid overnight at 4 °C. After a 30-min centrifugation at 12,000 $\times$  g at 4 °C, pellets were washed with 80% acetone and resuspended with 20  $\mu$ L of loading buffer (37.5 mM Tris-HCl, pH 7, 0.75% SDS, 7.5% glycerol, 0.01% Coomassie Brilliant Blue, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol). For the Western blots, 50  $\mu$ g of intracellular protein extracts and all extracellular protein extracts were separated onto a 4 to 16% Tricine-SDS-PAGE gel [22]. Zinc staining (#161-0440, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) was done as a loading control, then samples were transferred onto Amersham Hybond P polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). After blocking with 5% bovine serum albumin in Tris-buffered saline, membranes were incubated (1 h at room temperature) with monoclonal mouse anti-Flag antibodies conjugated with horseradish peroxidase (1:2000, #A8592, Sigma, Darmstadt, Germany) then washed, and the signal was developed with an Amersham ECL Plus Western blotting Detection Kit and scanned with an ImageQuant LAS 4000 imager (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). The presence of green fluorescent protein (GFP) inside and outside *S. aureus* cells was also monitored by Western blot. Briefly, N315 and N315 $\Delta$ sprG1/ $\Delta$ sprF1 were transformed with pALCP2G expressing GFP under the control of a constitutive promoter [23]. Total cells from the stationary growth phase (mechanically disrupted with Precellys Evolution homogenizer, Montigny-le-Bretonneux, France) and the medium were separated using SDS-PAGE and transferred onto a PVDF membrane in CAPS buffer (10 mM CAPS pH 11.0, 10% methanol (*v/v*)). The membrane was blocked and incubated with primary anti-GFP antibodies (rabbit, 1:2000, #2555, Cell Signaling, Danvers, MA, USA), and then secondary antibodies (HRP-conjugated goat anti-rabbit, 1:40,000, #A6667, Sigma, Darmstadt, Germany). The signal was developed with chemiluminescence blotting substrate Immobilon Western HRP Substrate (Merck, Darmstadt, Germany).

#### 2.5. In Vitro Transcription, RNA Labeling, and Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) Assays

SprF1 RNA and *ppiB*<sub>117</sub> mRNA were transcribed from PCR-amplified templates using N315 genomic DNA and forward primers containing a T7 promoter sequence (Table 1), using an Invitrogen MEGAscript T7 Transcription Kit (Thermo Scientific, Dublin, Ireland), according to the manufacturer's protocol. RNA was purified on an 8% urea-PAGE gel and eluted overnight at 37 °C under shaking in 500  $\mu$ L of elution buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 250 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% SDS). The RNA was then purified by ethanol precipitation and pellets were resuspended with 20  $\mu$ L of water and stored at -80 °C. For the labeling of the SprF1 RNA 5'-ends, RNA was dephosphorylated by CIP alkaline phosphatase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) and labeled with 0.5  $\mu$ L of [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]-ATP (5  $\mu$ Ci) and T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs Ipswich, MA, USA). Labeled SprF1 RNA was purified on Microspin™ G-50 Columns (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) and stored at -20 °C. Before use in EMSA assays, each transcribed RNA was denatured by incubation at 90 °C for 1 min, then chilled on ice for 1 min and refolded in a buffer (80 mM K-HEPES, pH 7.5, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 330 mM KCl). A total of 0.1 pmol of labeled SprF1 RNA was incubated with 6.25 to 100 pmol of *ppiB*<sub>117</sub> mRNA or 1 pmol of SprG1 RNA for 30 min at 30 °C. To evaluate specificity, 200 pmol of polyU RNA or 1 pmol of unlabeled SprF1 RNA were added. The samples were supplemented with glycerol (10%

final concentration) and loaded on a native 8% polyacrylamide gel containing 5% glycerol. The electrophoresis was performed at 100 V in 0.5× Tris-borate EDTA at 4 °C. The results were analyzed on a PhosphorImager.

## 2.6. Statistics

Proteomic statistical analysis was performed based on a group-to-group comparison of Student's *t*-test, and one-way ANOVA for multiple group comparison with a *p*-value < 0.05. The cutoff value for the average protein ratio was set to 1.5. RT-qPCR statistics were based on Student's *t*-test.

## 3. Results

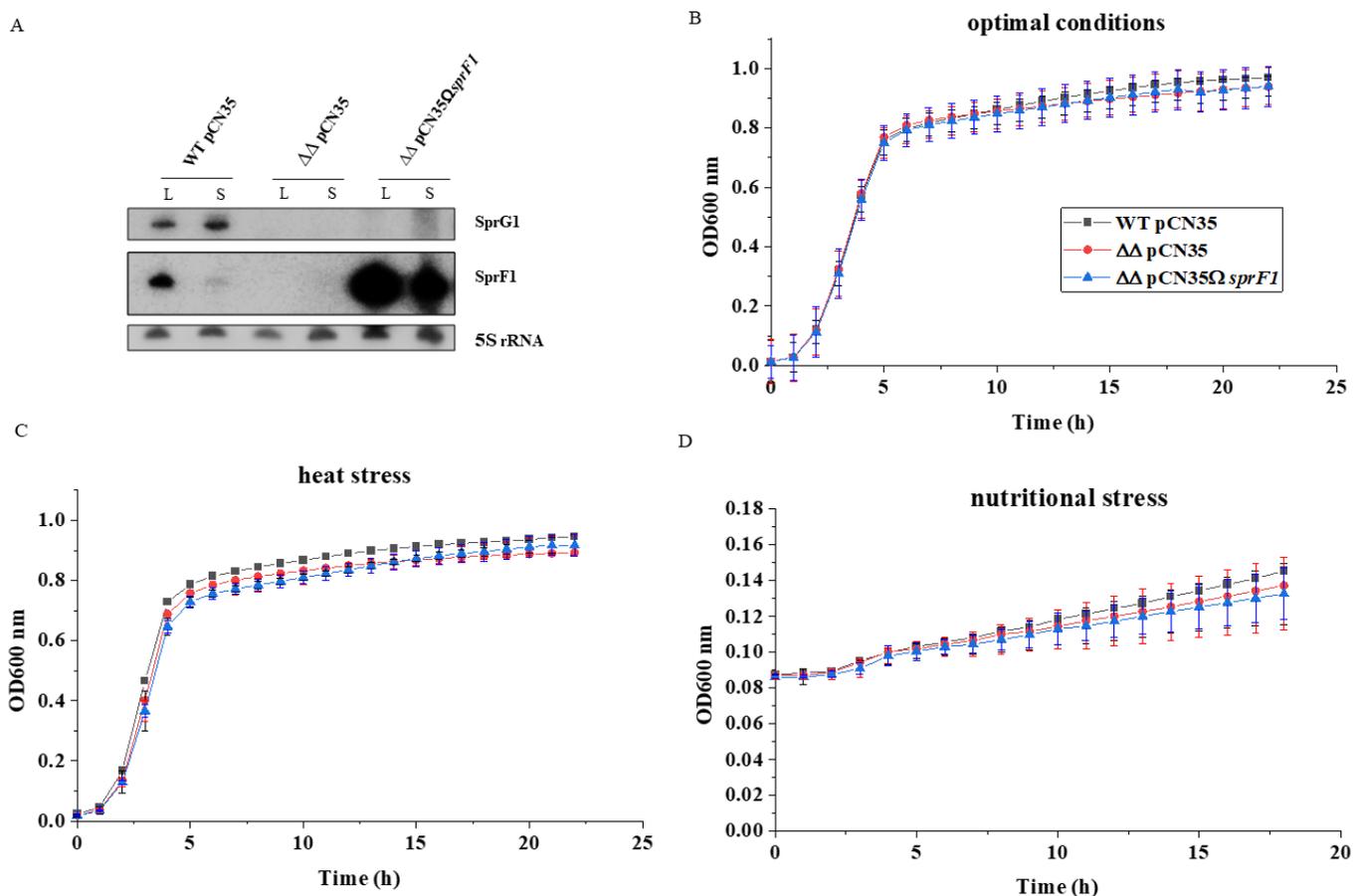
### 3.1. Deletion of the *sprG1/sprF1* TA System Upregulates the Intracellular Proteome Whereas *SprF1* Reverses It

To elucidate the impact of the *SprG1/SprF1* TA system expression on the *S. aureus* proteome, we used the methicillin-resistant (MRSA) strain N315 and the mutant lacking the system. Moreover, the deletion mutant N315Δ*sprG1/ΔsprF1* was supplemented with a plasmid (pCN35Ω*sprF1*) expressing the *SprF1* antitoxin. Northern blot analysis confirmed the presence/absence of transcripts for TA system components in the *S. aureus* respective strains at logarithmic (3.5 h post-inoculation) and stationary (15 h) growth phases. Moreover, the amount and relative proportions of transcripts for *SprG1/SprF1* change over time. The antitoxin *SprF1* decreases in the stationary growth phase, whereas the transcript for the *SprG1* toxin does the opposite (Figure 1A). Deletion of *sprG1/sprF1*, as well as supplementation of the mutant with the antitoxin-encoding plasmid, did not impact bacterial growth in comparison to the isogenic strain. The same profile of growth curves was recorded for wild-type and mutant strains in optimal laboratory conditions (TSB, 37 °C), as well as in stress conditions such as elevated temperature (TSB, 42 °C) or nutritional stress (NZM, 37 °C) (Figure 1B–D).

To compare the intracellular proteomes, we collected cells from logarithmic and stationary growth phases. Cells were mechanically disrupted and proteins separated using 2D DIGE, followed by identification of differentially expressed proteins by mass spectrometry. We observed single differences in the proteomes of cells from logarithmic growth phase between the strains, in all three compared pairs (N315Δ*sprG1/ΔsprF1* vs. N315, N315Δ*sprG1/ΔsprF1* + pCN35Ω*sprF1* vs. N315, and N315Δ*sprG1/ΔsprF1* + pCN35Ω*sprF1* vs. N315Δ*sprG1/ΔsprF1*) (Table 2, Figure 2A, Supplementary Table S1). At the stationary growth phase, the differences in intracellular proteomes were more pronounced. In N315Δ*sprG1/ΔsprF1* vs. N315 pair, six differentiating proteins were identified, five of which were upregulated in the Δ*sprG1/ΔsprF1* mutant, indicating the role of the TA module in gene expression. Interestingly, however, in the strain with the enhanced expression of *SprF1* antitoxin (N315Δ*sprG1/ΔsprF1* + pCN35Ω*sprF1*), eight differentiating proteins were identified, all downregulated, in comparison to the wild-type (N315) (Table 2, Figure 2B, Supplementary Figure S1). In N315Δ*sprG1/ΔsprF1* + pCN35Ω*sprF1* vs. N315Δ*sprG1/ΔsprF1* pair, five out of six differentiating proteins were downregulated in the strain with the enhanced expression of *SprF1*. This points to the antitoxin as the regulatory element of the *SprG1/SprF1* TA system, as recently demonstrated [16].

Since type I antitoxins regulate the expression of the cognate toxin at the mRNA level [8], we were curious whether the same may be applied to the genes coding for proteins downregulated in the strain with the enhanced *SprF1* expression. To this end, total RNAs were extracted from N315, N315Δ*sprG1/ΔsprF1*, and N315Δ*sprG1/ΔsprF1* + pCN35Ω*sprF1*, and RT-qPCR monitoring of the expression of four genes coding for proteins (3-hydroxyacyl-(acyl-carrier-protein) dehydratase (*fabZ*), 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase (*ribH*), pyruvate dehydrogenase E1 component subunit β (*pdhB*), and peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase (*ppiB*)), identified as the most downregulated in *SprF1*-supplemented strain, was performed. The amounts of *fabZ*, *ribH*, and *ppiB* transcripts were significantly decreased in the *SprF1* overexpressing strain (Figure 3A), indicating that the regulation of the genes'

expression could also be detected at the mRNA level. However, the level of *ppiB* transcript was also decreased in the  $N315\Delta sprG1/\Delta sprF1$  mutant, pointing to the involvement of both components of the SprG1/SprF1 TA system in gene expression. Moreover, we searched for SprF1 targets in the *S. aureus* N315 genome, using TargetRNA2 [24]. Interestingly, among 23 predicted targets (Supplementary Table S2), we found the mRNA for PpiB, identified as substantially downregulated in the differential proteomic analysis. The predicted hybridization site of SprF1 with the gene transcript for PpiB covered the region directly downstream of the ribosome binding site and the start codon, which is the region for an effective gene expression silencing by *trans*-acting small RNAs [25] (Figure 3B). We performed electrophoretic mobility shift assays (EMSA) to analyze duplex formation between SprF1 and a 117 nt-long *ppiB* mRNA fragment containing the predicted site of interaction (58 nt downstream and 56 nt upstream of the AUG codon of *ppiB* mRNA). As a positive control, we showed a complex between SprF1 and SprG1 RNAs (Figure 3C, Pinel-Marie et al., 2014). However, no specific complex was observed between SprF1 and *ppiB*<sub>117</sub> mRNA (Figure 3C), indicating that the *ppiB* mRNA is not a direct target of SprF1. Altogether, these results allow us to carefully suggest that the SprF1 RNA antitoxin decreases the expression of eight intracellular proteins during the stationary growth phase, however, not as acting in *trans* with mRNA for downregulated proteins but rather by other indirect mechanisms.

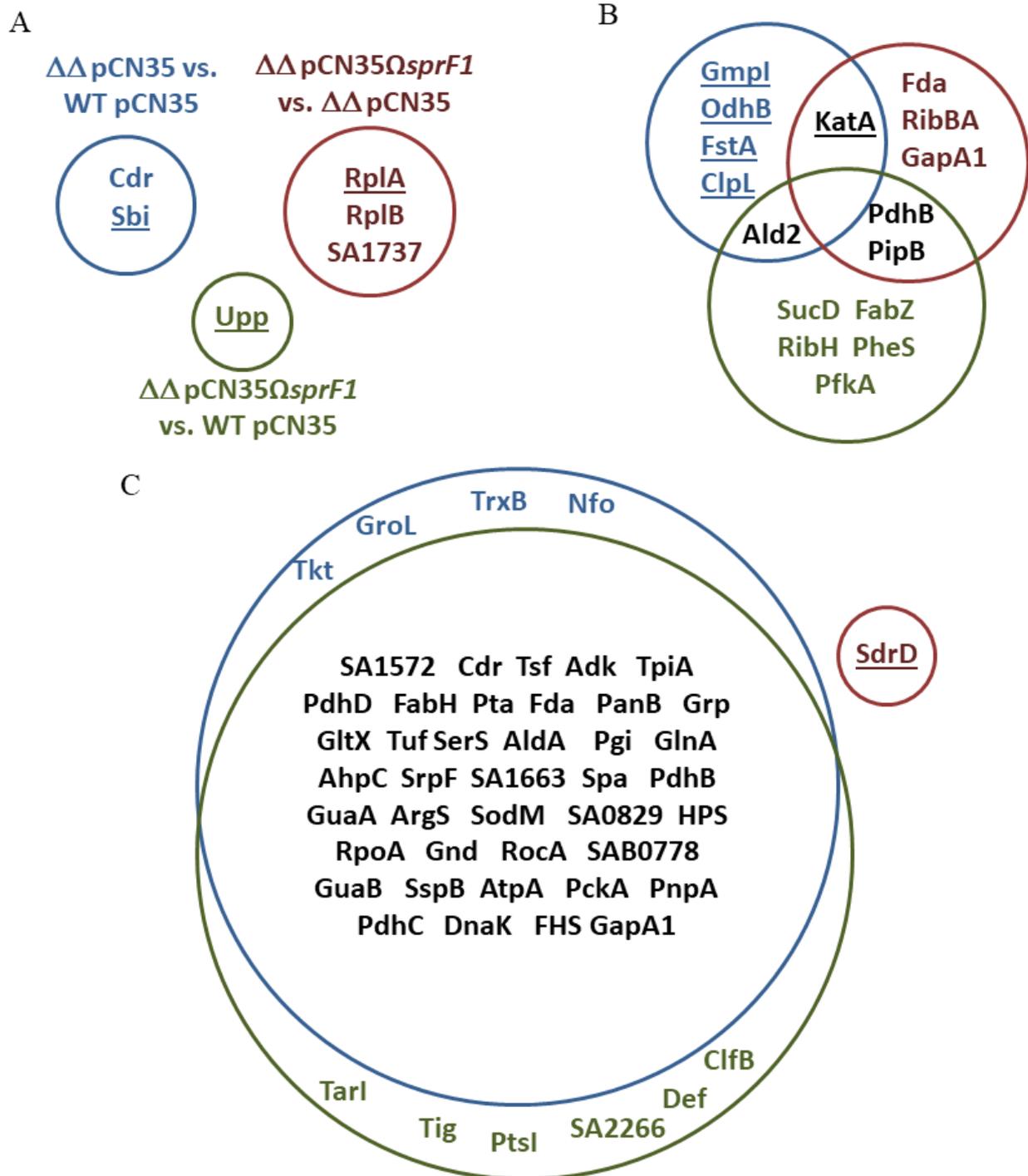


**Figure 1.** The SprG1/SprF1 type 1 TA system does not influence *S. aureus* N315 growth in laboratory conditions. (A) Northern blot analysis of the expression of SprG1/SprF1 system components in *S. aureus* N315 (WT pCN35), the *sprG1/sprF1* deletion mutant ( $\Delta\Delta pCN35$ ), and SprF1 antitoxin (over)expressing ( $\Delta\Delta pCN35\Omega sprF1$ ) strains grown to logarithmic (L) and stationary (S) phases. (B–D) Growth curves in optimal and stress conditions.

**Table 2.** List of differentially expressed proteins in the comparison of the intracellular proteome of *S. aureus* N315 with either the deletion of the SprG1/SprF1 TA system ( $\Delta\Delta$ ) or with the (over)expression of the SprF1 antitoxin ( $\Delta\Delta$ SprF1).

No.	Protein (Acronym)	Accession Number	N315- $\Delta\Delta$ vs. N315	N315- $\Delta\Delta$ SprF1 vs. N315	N315- $\Delta\Delta$ SprF1 vs. N315- $\Delta\Delta$
<b>Logarithmic phase</b>					
1	Coenzyme A disulfide reductase (Cdr)	Q7A6H1	1.68 ↓ *		
2	Immunoglobulin-binding protein (Sbi)	Q99RL2	1.72 ↑		
3	50S ribosomal protein L1 (RplA)	Q99W68			1.82 ↑
4	50S ribosomal protein L2 (RplB)	P60432			1.51 ↓
5	Uncharacterized protein (SA1737)	Q7A4P4			1.50 ↓
6	Uracil phosphoribosyltransferase (Upp)	P67396		2.19 ↑	
<b>Stationary phase</b>					
1	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit $\beta$ (PdhB)	P99063		2.19 ↓	1.82 ↓
2	Succinate-CoA ligase (ADP-forming) subunit $\alpha$ (SucD)	P99070		1.55 ↓	
3	Putative peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PpiB)	Q7A6I1		2.19 ↓	1.82 ↓
4	3-hydroxyacyl-(acyl-carrier-protein) dehydratase FabZ (FabZ)	P64108		2.36 ↓	
5	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase (RibH)	P99141	1.58 ↓	2.36 ↓	
6	Alanine dehydrogenase 2 (Ald2)	Q99TF4		1.86 ↓	
7	Phenylalanine-tRNA ligase $\alpha$ subunit (PheS)	P68848		1.55 ↓	
8	ATP-dependent 6-phosphofructokinase (PfkA)	P99165		1.55 ↓	
9	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase (GpmI)	P64270	1.53 ↑		
10	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex (OdhB)	Q7A5N4	1.53 ↑		
11	Catalase (KatA)	Q7A5T2	1.66 ↑		1.90 ↑
12	Cell division protein FtsA (FtsA)	P63765	1.53 ↑		
13	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpL (ClpL)	Q7A3F4	1.53 ↑		
14	Fructose-bisphosphate aldolase class 1 (Fda)	P99117			1.54 ↓
15	Riboflavin biosynthesis protein RibBA (RibBA)	Q7A511			1.62 ↓
16	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1 (GapA1)	P99136			1.62 ↓

\* the arrow denotes the direction of regulation; ↑ up- and ↓ down-regulation in comparison to the second component from the pair, respectively.



**Figure 2.** Impacts of the SprG1/SprF1 type I TA system on the *S. aureus* N315 proteome. Differentiating proteins in the intracellular proteome at logarithmic (A) and stationary (B) growth phases and in the extracellular proteome at stationary growth phase (C), comparing: wild-type (WT pCN35) and the SprG1/SprF1-deleted module ( $\Delta\Delta$  pCN35) (blue circle); WT pCN35 and SprF1 (over)expressing strain ( $\Delta\Delta$  pCN35 $\Omega$ sprF1) (green circle);  $\Delta\Delta$  pCN35 and  $\Delta\Delta$  pCN35sprF1 (red circle). Proteins upregulated in comparison to the second component from the pair are underlined. For the meaning of the protein acronyms, please refer to Tables 2 and 3.

**Table 3.** List of differentially expressed proteins from the extracellular proteome in comparing *S. aureus* N315 and its mutants with the deletion of SprG1/SprF1 TA system ( $\Delta\Delta$ ) and with the (over)expression of SprF1 antitoxin ( $\Delta\Delta$ SprF1).

No.	Protein (Acronym)	Accession Number	N315- $\Delta\Delta$ vs. N315	N315- $\Delta\Delta$ SprF1 vs. N315	N315- $\Delta\Delta$ SprF1 vs. N315- $\Delta\Delta$
1	Glutamate—tRNA ligase (GltX)	P99170	1.74 ↓	1.72 ↓	
2	1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase (RocA)	P99076	1.96 ↓	2.18 ↓	
3	Glutamine synthetase (GlnA)	P99095	1.77 ↓	2.12 ↓	
4	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing] (GuaA)	P99105	1.87 ↓	1.80 ↓	
5	Arginine—tRNA ligase (ArgS)	Q99W05	1.87 ↓	1.80 ↓	
6	Transketolase (Tkt)	P99161	1.67 ↓		
7	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating (Gnd)	P63334	1.94 ↓	1.85 ↓	
8	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP) (PckA)	P99128	2.57 ↓	2.42 ↓	
9	Glucose-6-phosphate isomerase (Pgi)	P99078	1.77 ↓	1.86 ↓	
10	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex (PdhC)	P65636	2.71 ↓	2.00 ↓	
11	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit $\beta$ (PdhB)	P99063	1.84 ↓	2.23 ↓	
12	Dihydrolipoyl dehydrogenase (PdhD)	P99084	1.66 ↓	1.60 ↓	
13	Fructose-bisphosphate aldolase class 1 (Fda)	P99117	1.68 ↓	1.56 ↓	
14	Triosephosphate isomerase (TpiA)	P99133	1.59 ↓	1.92 ↓	
15	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1 (GapA1)	P99136		1.5 ↓	
16	3-hexulose-6-phosphate synthase (HPS)	Q7A774	1.92 ↓	2.11 ↓	
17	Formate—tetrahydrofolate ligase (FHS)	Q7A535	3.41 ↓	2.75 ↓	
18	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase (PtsI)	Q99V14		1.63 ↓	
19	Elongation factor Ts (Tsf)	P99171	1.59 ↓	1.54 ↓	
20	Elongation factor Tu (Tuf)	P99152	1.74 ↓	1.93 ↓	
21	Serine—tRNA ligase (SerS)	P99178	1.74 ↓	2.12 ↓	
22	Chaperone protein DnaK (DnaK)	P99110	1.82 ↓	1.64 ↓	
23	Protein GrpE (GrpE)	P99086	1.73 ↓	1.50 ↓	
24	Trigger factor (Tig)	P99080		1.54 ↓	
25	60 kDa chaperonin (GroL)	P99083	1.51 ↓		
26	Thioredoxin reductase (TrxB)	Q6GIM7	2.02 ↓		
27	Alkyl hydroperoxide reductase C (AhpC)	P99074	1.82 ↓	1.82 ↓	
28	Superoxide dismutase [Mn/Fe] 2 (SodM)	P66831	1.90 ↓	1.73 ↓	
29	Coenzyme A disulfide reductase (Cdr)	Q7A6H1	1.54 ↓	1.60 ↓	
30	Glutamyl endopeptidase (SspA)	Q7A6A6	1.80 ↓		
31	Immunoglobulin G-binding protein A (SpA)	P99134	1.83 ↓	1.84 ↓	
32	Staphopain B (SspB)	Q7A6A7	2.27 ↓	1.81 ↓	
33	Clumping factor B (ClfB)	Q7A382		1.63 ↓	
34	ATP synthase subunit $\alpha$ (AtpA)	P99111	2.42 ↓	2.41 ↓	
35	Adenylate kinase (Adk)	P99062	1.59 ↓	1.59 ↓	

Table 3. Cont.

No.	Protein (Acronym)	Accession Number	N315- $\Delta\Delta$ vs. N315	N315- $\Delta\Delta$ <i>sprF1</i> vs. N315	N315- $\Delta\Delta$ <i>sprF1</i> vs. N315- $\Delta\Delta$
36	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (GuaB)	P99106	2.06 ↓	1.95 ↓	
37	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase (PnpA)	Q7A5 × 7	2.71 ↓	1.99 ↓	
38	Probable endonuclease 4 (Nfo)	P63538	1.65 ↓		
39	DNA-directed RNA polymerase subunit $\alpha$ (RpoA)	P66706	1.93 ↓	1.81 ↓	
40	Peptide deformylase (Def)	P99077		1.82 ↓	
41	Ribitol-5-phosphate cytidyltransferase 1 (Tarl)	Q7A7V0		2.01 ↓	
42	3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase 3 (FabH)	P99159	1.66 ↓	1.68 ↓	
43	Phosphate acetyltransferase (Pta)	P99092	1.66 ↓	1.96 ↓	
44	UPF0051 protein (SAB0778)	Q7A6L4	1.97 ↓	1.96 ↓	
45	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase (PanB)	P65656	1.71 ↓	1.89 ↓	
46	DUF4242 domain-containing protein (SA0165)	A0A0H3JSJ2		1.58 ↓	
47	Putative aldehyde dehydrogenase (AldA)	Q7A825	1.74 ↓	2.12 ↓	
48	Putative dipeptidase (SA1572)	Q7A522	1.51 ↓	2.32 ↓	
49	Uncharacterized oxidoreductase (SA2266)	Q7A3L9		2.52 ↓	
50	Uncharacterized protein (SA0829)	Q7A6H3	1.90 ↓	1.79 ↓	
51	UPF0342 protein (SA1663)	Q7A4V3	1.82 ↓	2.17 ↓	
52	Serine-aspartate repeat-containing protein D (SdrD)	Q7A780			1.58 ↑

\* the arrow denotes the direction of regulation; ↑ up- and ↓ down-regulation in comparison to the second component from the pair, respectively.

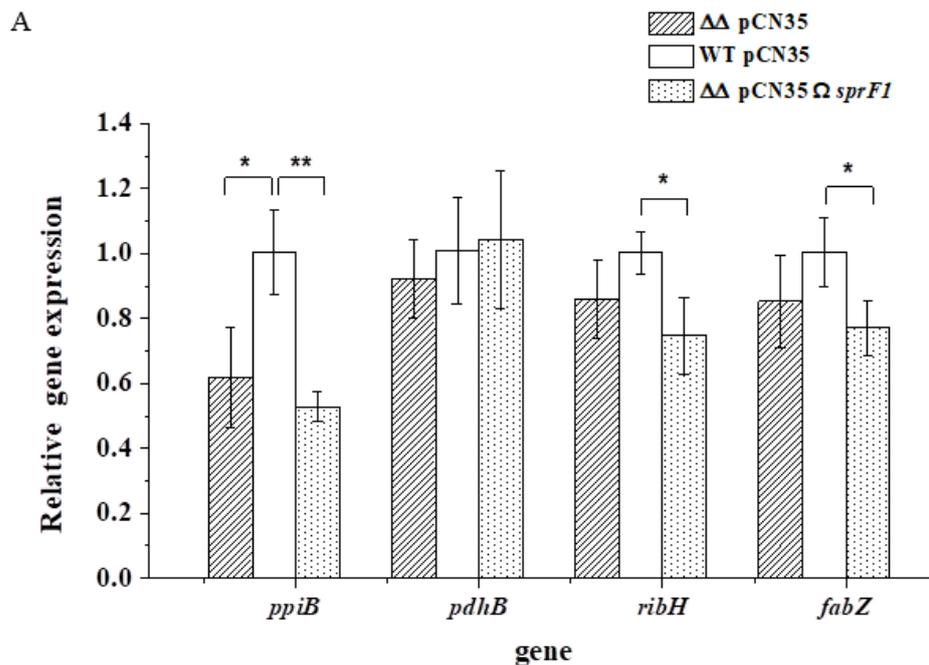
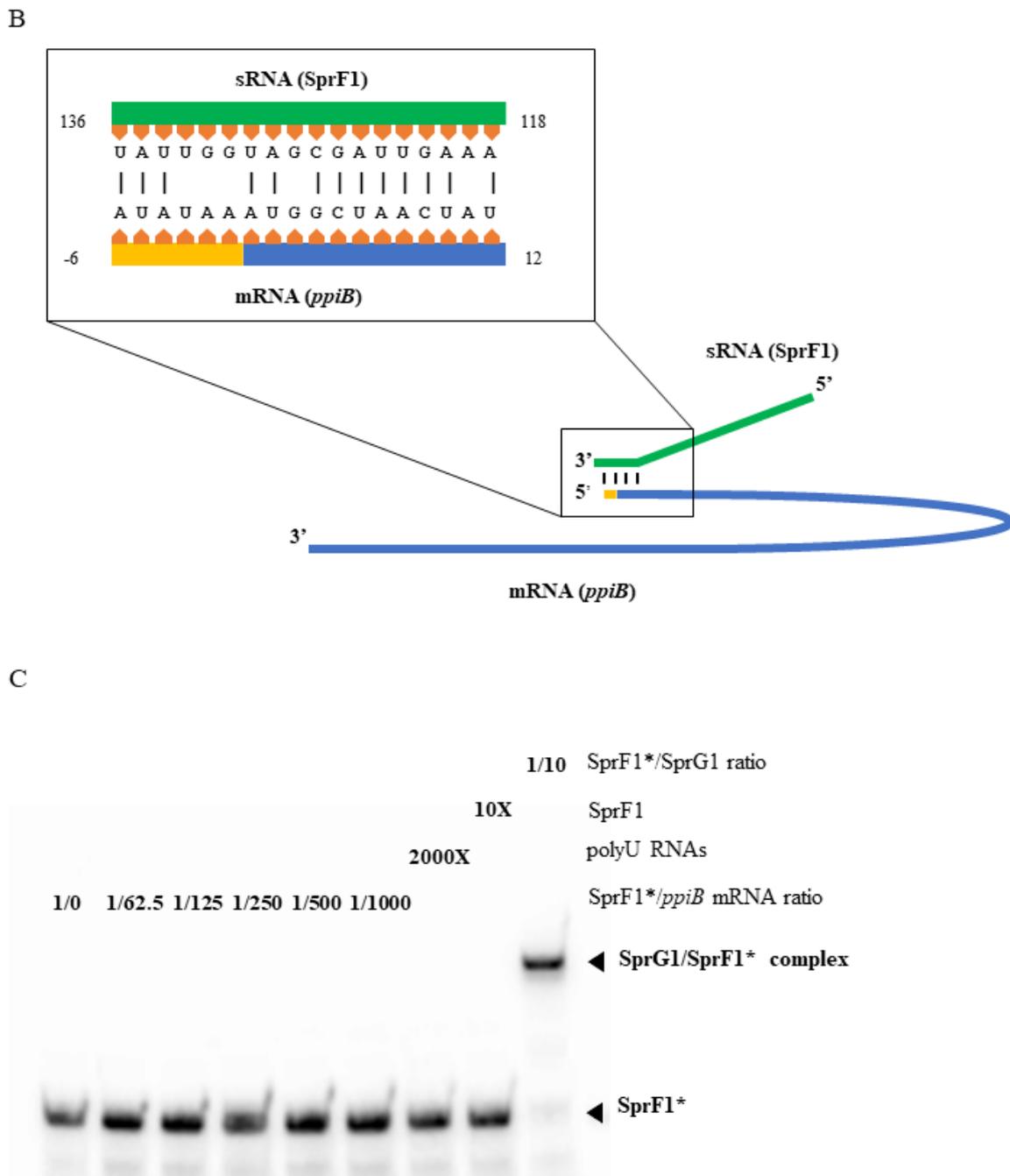


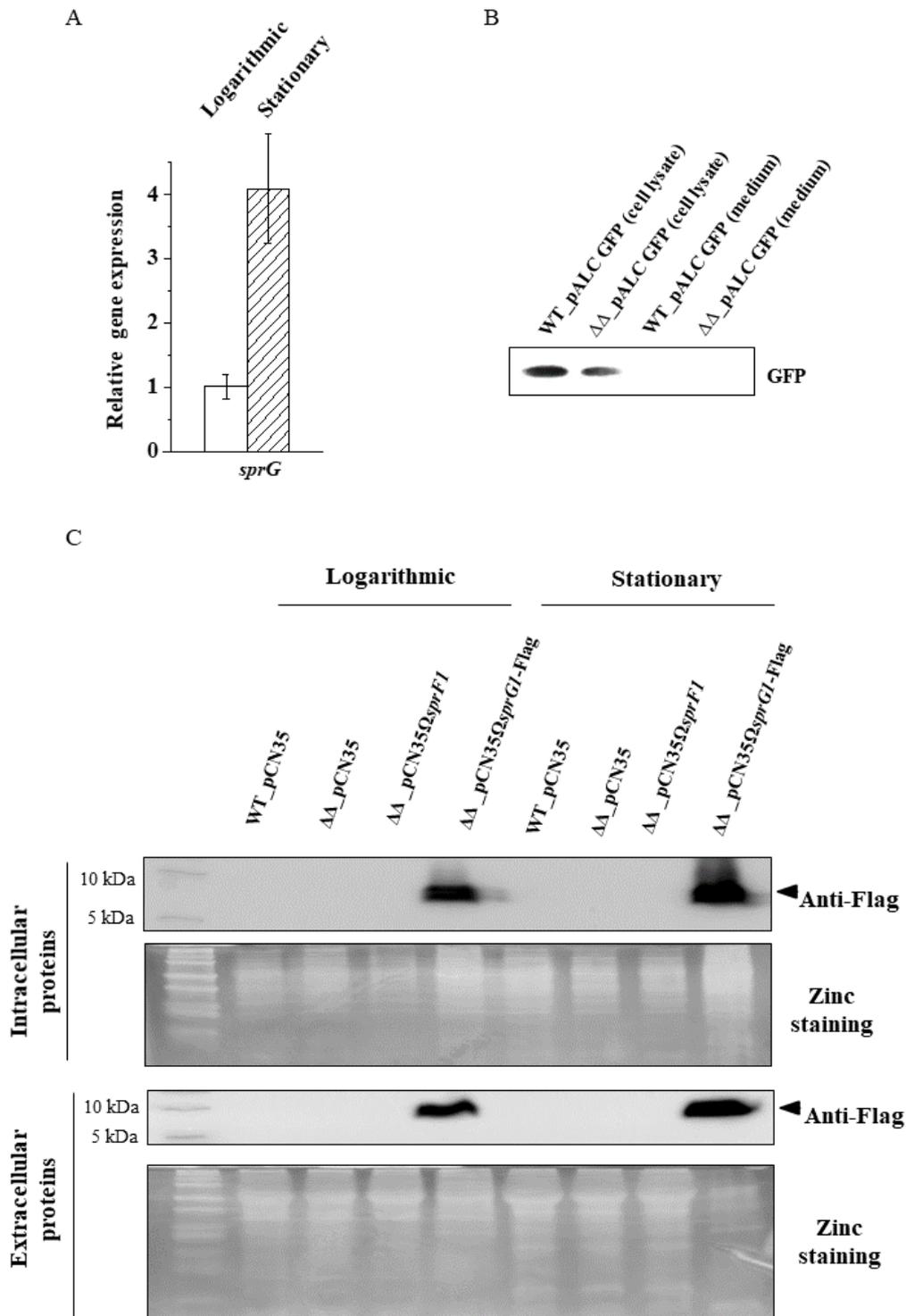
Figure 3. Cont.



**Figure 3.** (Over)expression of SprF1 antitoxin decreases the level of gene transcripts expressing proteins identified as downregulated in the intracellular proteome. (A) RT-qPCR analysis of mRNAs isolated from *S. aureus* N315 (WT pCN35), *sprG1/sprF1* deletion mutant ( $\Delta\Delta$  pCN35), and the *sprG1/sprF1* deletion mutant with the SprF1 antitoxin expressing ( $\Delta\Delta$  pCN35SprF1) plasmid. \* and \*\*, denote statistical significance at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$  level, respectively. (B) A model of in silico predicted interactions between the gene transcript (*ppiB*) for peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and the SprF1 antitoxin (sRNA). (C) EMSA of radioactively labeled SprF1 (SprF1\*) with mRNA for *ppiB*. SprG1/SprF1\* complex serves as a positive control.

### 3.2. The Lack of the SprG1 Toxin Correlates with Decreased Levels of Extracellular Proteins

Comparison of extracellular proteomes between the mutant strain without *sprG1/sprF1* TA system (N315 $\Delta$ *sprG1*/ $\Delta$ *sprF1*) and the wild-type strain (N315), and between the *sprG1/sprF1* deletion mutant with the enhanced expression of SprF1 antitoxin (N315 $\Delta$ *sprG1*/ $\Delta$ *sprF1* + *pCN35 $\Omega$ sprF1*) and N315 resulted in the identification of 44 and 46 differentially expressed proteins, respectively (Table 3, Figure 2C, Supplementary Figure S2, and Supplementary Table S1). Strikingly, the expression of all those proteins was reduced in the *sprG1/sprF1* deletion mutants, compared to the isogenic N315 strain. Moreover, 37 proteins were common to both sets when compared. Interestingly, with the exception of four truly extracellular proteins (clumping factor B (ClfB), IgG-binding protein A (SpA), glutamyl endopeptidase (SspA) and cysteine protease, staphopain B (SspB)), and cell membrane-bounded ATP synthase subunit  $\alpha$  (AtpA), all the other differentiating proteins were cytoplasmic. The presence of cytoplasmic proteins (CPs) in the exoproteomes has already been observed, but the mechanisms of their release are elusive [26]. We hypothesized that the presence of CPs outside the bacteria could reflect the activation of the SprG1/SprF1 type I TA system, resulting in the expression of the SprG1 toxin which, in turn, disrupts bacterial cell membranes and allows CPs to be expelled. One of the roles attributed to TA systems is to respond to environmental stress [6]. Transitions from logarithmic to stationary growth phases are a canonical example of a reaction to stress-induced by increasing cell density and exhaustion of nutrients. To test whether the SprG1/SprF1 TA system is involved in the response to such stress, we compared mRNA levels of the SprG1 toxin at logarithmic and stationary growth phases. RT-qPCR confirmed that the SprG1 mRNA level is over 3.5 higher in cells after a 15-h cultivation in comparison to those after 3.5 h post-inoculation (Figure 4A). The result is consistent with previous semi-quantitative Northern blot analysis (Figure 1A). Using the *S. aureus* strain overexpressing the flagged version of SprG1 (Supplementary Figure S3) [12] and performing Western blot using anti-Flag antibodies, we detected the presence of the *sprG1*-encoded peptide inside and outside the cell at the logarithmic and stationary growth phases (Figure 4C), suggesting that the SprG1 peptides permeabilize the *S. aureus* membrane to release CPs into the medium. To verify if the *sprG1*-encoded peptides can promote cell protein leakage by pore formation, as is the case for the TisB or HokB type I toxins [27–29], we transformed *S. aureus* N315 and the N315 $\Delta$ *sprG1*/ $\Delta$ *sprF1* mutant with a plasmid, pALCP2G, constitutively expressing GFP [23] and performed Western blots of post-culture medium with anti-GFP antibodies. Despite GFP overexpression in bacterial cells, we did not detect the presence of GFP in the medium of either strain (Figure 4B). This indicates that the release of CPs into the medium is not due to SprG1-driven massive cell leakage triggered by pore formation. Altogether, these results support the hypothesis that the SprG1-driven CP release could be related to a membrane disruption via a detergent-like effect or to an interference with membrane-associated functions, however, the elucidation of a specific mechanism requires further studies.



**Figure 4.** Expression of the SprG1-encoded peptides during the *S. aureus* stationary growth phase does not induce massive cell leakages. **(A)** RT-qPCR analysis of the transcript level for SprG1 toxin in *S. aureus* N315 (statistical significance at  $p < 0.01$  level). **(B)** Western blot analysis with anti-GFP antibodies of cell lysates and spent growth medium of *S. aureus* N315 (WT) and the *sprG1/sprF1* deletion mutant ( $\Delta\Delta$ ) transformed with a GFP-expressing plasmid (pALCP2G). **(C)** Western blot with anti-Flag antibodies and SDS-PAGE of total cell lysates (intracellular proteins; upper panels) and culture medium (extracellular proteins; lower panels) of *S. aureus* N315 (WT pCN35), the *sprG1/sprF1* deletion mutant ( $\Delta\Delta$  pCN35), SprF1 antitoxin (over)expressing (N315 $\Delta\Delta$  pCN35 $\Omega$ *sprF1*), and Flagged SprG1 (over)expressing (N315 $\Delta\Delta$  pCN35 $\Omega$ *sprG1-Flag*) strains grown to logarithmic and stationary phases.

#### 4. Discussion

In this study, we addressed and challenged experimentally, by proteomics, if the well-studied SprG1/SprF1 type I TA system influences gene expression in *S. aureus*. We adjusted our experimental approach accordingly by comparing the intracellular and extracellular proteome of *S. aureus* N315, naturally expressing the SprG1/SprF1 TA system, the TA knock-out strain (N315 $\Delta$ sprG1/ $\Delta$ sprF1) and the antitoxin complemented strain (N315 $\Delta$ sprG1/ $\Delta$ sprF1 + pCN35 $\Omega$ sprF1). Due to sprG1-encoded peptides toxicity, we could not obtain the strain that overexpresses only the SprG1 toxin [12]. Moreover, deleterious effects of toxins on the fate of bacterial cells were recently questioned, because the data was obtained from experimental set-ups, where the toxins were largely overexpressed [6,30], which is far from physiological conditions. We observed only single differences in intracellular proteome between wild-type, sprG1/sprF1 deletion mutant and SprF1-complemented mutant, in the logarithmic phase of bacterial growth. This is consistent with the lack of differences in growth rates in optimal laboratory conditions (TSB, 37 °C), as well as in stress conditions (elevated temperature or nutritional stress) (Figure 1B–D). We showed that, at least in laboratory settings, the natural presence of the system does not impair bacterial growth and has a minor influence on the intracellular proteome during the intensive cell growth in comparison to the sprG1/sprF1 deleted strain. However, at the stationary growth phase, the comparison of intracellular proteomes between the strains allows us to carefully suggest the SprF1 antitoxin as downregulating protein expression. We recently demonstrated that SprF1 is a dual function type I RNA antitoxin [16]. At its 3'-end, SprF1 acts as an antitoxin to prevent SprG1 toxicity towards competing bacteria and host cells [12]. Thanks to a purine-rich sequence located at its 5'-end, SprF1 also interacts with a subset of polysomes and ribosomes that could promote translation attenuation and antibiotic persister cell formation [16]. Among the proteins downregulated in the wild-type and the SprF1 antitoxin overexpressing strain or upregulated in the sprG1/sprF1 deleted strain (Table 2), six are glycolysis-related enzymes: pyruvate dehydrogenase E1 component subunit  $\beta$  (PdhB), succinate-CoA ligase (ADP-forming) subunit  $\alpha$  (SucD), ATP-dependent 6-phosphofructokinase (PfkA), 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase (GpmI), fructose-bisphosphate aldolase class 1 (Fda), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1 (GapA1) (Supplementary Figure S4). Interestingly, the pfkA, gpmI, and gapA1 transcript levels are downregulated in *S. aureus* intracellular antibiotic persisters [31]. These results may suggest the role of SprF1 in the *S. aureus* persister cell formation during the stationary growth phase, where the persister cell level is increased [32].

In type I TA systems, RNA antitoxins prevent the expression of cognate toxins at the mRNA level. We previously demonstrated that overexpression of SprF1 decreases mRNA for non-cognate toxins SprG2 and SprG3 [33]. We were curious as to whether SprF1 may have additional functions apart from silencing the expression of the SprG toxins, since we detected eight proteins downregulated in the SprF1 overexpressing strain at the stationary growth phase (Table 2). Interestingly, for the three proteins (6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase, RibH; 3-hydroxyacyl-(acyl-carrier-protein) dehydratase, FabZ; peptidyl-prolyl cis/trans isomerase, PpiB) showing the highest downregulation by SprF1, the amount of the respective transcripts was significantly decreased in the SprF1 overexpressing strain, suggesting a direct interaction between the RNA antitoxin and these mRNAs (Figure 3A). In silico pairing predicted a possible interaction only between the ppiB transcript and SprF1. However, we did not see any complex between ppiB mRNA and SprF1 by EMSA assays (Figure 3C). PpiB (also referred to as PPIase) catalyzes the cis-trans isomerization of proline imidic peptide bonds in oligopeptides, thus accelerating protein folding. PPIases are required for the correct folding and subsequent activity of secreted virulence factors in a number of bacterial pathogens [34,35]. Another protein downregulated in *S. aureus* N315 $\Delta$ sprG1/ $\Delta$ sprF1 + pCN35 $\Omega$ sprF1, in the intra- and extracellular proteomes, is PdhB. The protein is a part of the pyruvate dehydrogenase complex that catalyzes the overall conversion of pyruvate to acetyl-CoA and carbon dioxide. Apart from its involvement in basic metabolism, PdhB is also found in the extracellular proteomes of many bacteria [36].

The moonlighting function for PdhB, as a fibronectin-binding protein facilitating host colonization and disease pathogenesis, was shown for the pathogen *Mycoplasma pneumoniae* [37]. Although such a role in staphylococci was not confirmed experimentally, PdhB was reported as the only cellular protein belonging to the core exoproteome of the bovine *S. aureus* mastitis isolates [38]. Moreover, the intracellular proteins identified as downregulated by SprF1, especially PfkA and GapA1, were suggested in the *S. aureus* persister cell formation [16]. In general, the results suggest that the SprF1 RNA antitoxin influences the expression of some intracellular proteins. However, for transcripts of the proteins identified as downregulated in this proteomic study, SprF1 does not, most probably, serve as a *trans*-acting sRNA [25], which was exemplified for PpiB.

Analysis of extracellular proteomes indicated that the SprG1/SprF1-driven changes are noticeable. Among nearly 320 protein spots encompassing each exoproteome, we identified 44 and 46 differentiating (downregulated) proteins in N315 $\Delta$ sprG1/ $\Delta$ sprF1 and N315 $\Delta$ sprG1/ $\Delta$ sprF1 + pCN35 $\Omega$ sprF1 mutants, respectively. Thirty-seven of those proteins (over 80%) were common to both mutants (Figure 2C, Supplementary Figure S2). In contrast to the intracellular proteomes, only a single protein (serine-aspartate repeat-containing protein D, SdrD) differentiated exoproteomes of N315 $\Delta$ sprG1/ $\Delta$ sprF1 and N315 $\Delta$ sprG1/ $\Delta$ sprF1 + pCN35 $\Omega$ sprF1 mutants. Moreover, the SprF1 RNA level is decreased at the stationary growth phase, contrary to the SprG1 RNA level that is increased (Figures 1A and 4A). This, together with the concise picture of exoproteomes in strains lacking the toxin, strongly suggests the role of SprG1 in the excretion of proteins outside the cell. Interestingly, the only differentially expressed *bona fide* secretory proteins in SprG1-devoid strains were cysteine protease staphopain B (SspB) and serine protease glutamylendopeptidase (SspA). The enzymes are part of the staphylococcal proteolytic system also consisting of metalloprotease (aureolysin) and other serine protease-like (SplA-F) proteases [39,40]. The enzymes are staphylococcal virulence factors that degrade host proteins and are involved in biofilm formation [41–43]. Moreover, two cell wall-anchored proteins, ClfB and SpA, were identified in the exoproteome. Both proteins bind host proteins, plasma fibrinogen, and type G immunoglobulin, respectively, and are important virulence factors (Supplementary Figure S4) [44]. The presence of cytoplasmic proteins (CPs) in the secretome was reported [26]. However, decreased amount of the proteins in  $\Delta$ sprG1/ $\Delta$ sprF1 mutants points to the involvement of the TA system in their excretion. It was reported that overexpressed toxic peptides mimicking the activation of TA systems disrupt the cell membrane, leading to the release of the cell contents, which trigger cell death [12,14]. However, a natural level of SprG1 in *S. aureus* N315 does not induce unspecific protein leakage, as confirmed by Western blots with anti-GFP antibodies. The specific mechanism of excretion of CPs is unknown. However, in *S. aureus*, major autolysin (Atl) and  $\alpha$ -type phenol soluble modulins (PSM $\alpha$ ) both enhance the release of CPs outside the cell [45,46]. Moreover, excreted CPs contribute to the pathogenicity of *S. aureus*, since pathogenic strains excrete more CPs than non-pathogenic strains and species [45]. Interestingly, among proteins upregulated in the mutant strain was the cell division FtsA protein. The protein is involved in the assembly of the cytokinetic Z ring. The structure, among others, consists of polymers of the FtsZ protein, which is tethered to the cytoplasmic membrane at the division site by the C-terminal domain of FtsA [47]. Interestingly, the moment of cell division was suggested to be when cytoplasmic proteins are excreted outside the cell [46]. Moreover, FtsZ, the main component of the divisosome, is the molecular target for YeeU-YeeV, a type IV TA system in *E. coli* [48]. The SprG1/SprF1-driven regulation of FtsA suggests a role of the TA system in the decrease of *S. aureus* cell division during the stationary growth phase, where the availability of nutrients for bacteria is poor. We can speculate that SprG1-encoded peptides promote the release of the cytoplasmic proteins to the medium to favor staphylococcal growth, colonization, and infection when the environmental conditions become unfavorable.

## 5. Conclusions

In conclusion, in laboratory conditions, deletion of the SprG1/SprF1 type I TA system has no effect on *S. aureus* growth, however, it induces noticeable changes in the proteome. Some of the affected proteins are bona fide virulence factors or are involved in metabolic traits and have moonlighting functions that could be linked to staphylococcal pathogenicity [49]. Our proteomic data point to SprF1 RNA as a possible gene expression regulator. However, the number and fold changes of differentially expressed proteins do not allow us to unambiguously support the role of the antitoxin in the *S. aureus* translation attenuation by binding ribosomes, a role that our recent study linked with persister cell formation [16]. Nevertheless, the above findings demonstrate a general function for bacterial RNA antitoxin beyond protection from toxicity. We also speculate about the role of the SprG1 toxin in the release of the cytoplasmic proteins. These observations require further studies to identify the mechanism of action of the *sprG1*-encoded peptides and to elucidate the roles of the SprG1/SprF1 module in staphylococcal pathogenicity, including virulence and persister cell formation.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/genes12050770/s1>, Figures S1 and S2: An exemplary 2D DIGE gel of intracellular and extracellular proteins, respectively, of *S. aureus* N315 and the SprG1/SprF1 TA system deletion mutant transformed with a plasmid (over)expressing the SprF1 antitoxin isolated from stationary growth phase, Figure S3: Growth curve of *S. aureus* N315 *sprG1/sprF1* deletion mutant transformed with the plasmid (pCN35Ω*sprG1*-FLAG) expressing the flagged version of SprG1 toxin, cultivated in optimal conditions, Figure S4: Voronoi diagrams illustrating functions of differentially expressed proteins identified in proteomic studies, Table S1: A list of differentially expressed proteins extracted from proteomic comparisons of *S. aureus* N315 with its deletion mutant of SprG1/SprF1 TA system and with the (over)expression of SprF1 antitoxin, Table S2: SprF1 (sRNA) interactions with *S. aureus* N315 gene transcript predicted by the TargetRNA2 algorithm.

**Author Contributions:** K.C. and E.B. designed and conducted 2D proteomic experiments, and contributed to writing the manuscript. K.C. conducted RT-qPCR and Western blot experiments. P.S. conducted MS analysis. E.O. participated in kinetics and Western blot experiments. B.F. and B.W. supervised the project, contributed to the design of the experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript. M.-L.P.-M. provided recombinant strains, contributed to kinetics, Western blot, and EMSA experiments and their analysis, participated in the design of the experiments, and wrote the manuscript. B.F., B.W., and M.-L.P.-M. share senior authorship. Conceptualization, B.F., B.W., and M.-L.P.-M.; methodology, K.C., E.B., and M.-L.P.-M.; formal analysis, K.C., E.B., P.S., B.F., B.W., and M.-L.P.-M.; investigation, K.C., E.B., P.S., E.O., and M.-L.P.-M.; resources, E.B., P.S., and M.-L.P.-M.; writing—original draft preparation, E.B., K.C., B.F., B.W., and M.-L.P.-M.; visualization, K.C. and M.-L.P.-M.; supervision, B.F. and B.W.; funding acquisition, B.F. and B.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was supported by funds granted by the National Science Centre (NCN, Poland) based on the decision No.DEC-2017/25/B/NZ6/01056 (to B.W.) and by the Agence Nationale pour la Recherche (grant no. ANR-15-CE12-0003-01 ‘sRNA-Fit’ to B.F.), the Fondation pour la Recherche Médicale (grant no. DBF20160635724 ‘Bactéries et champignons face aux antibiotiques et antifongiques’ to B.F.), the Rennes University, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and the School of Pharmacy and Medical Sciences at Rennes University. The software and reagents for mass spectrometry were partially financed from the subsidy no 16.16.160.557 of the Polish Ministry of Science and Education (to P.S.).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD023449 and 10.6019/PXD023449.

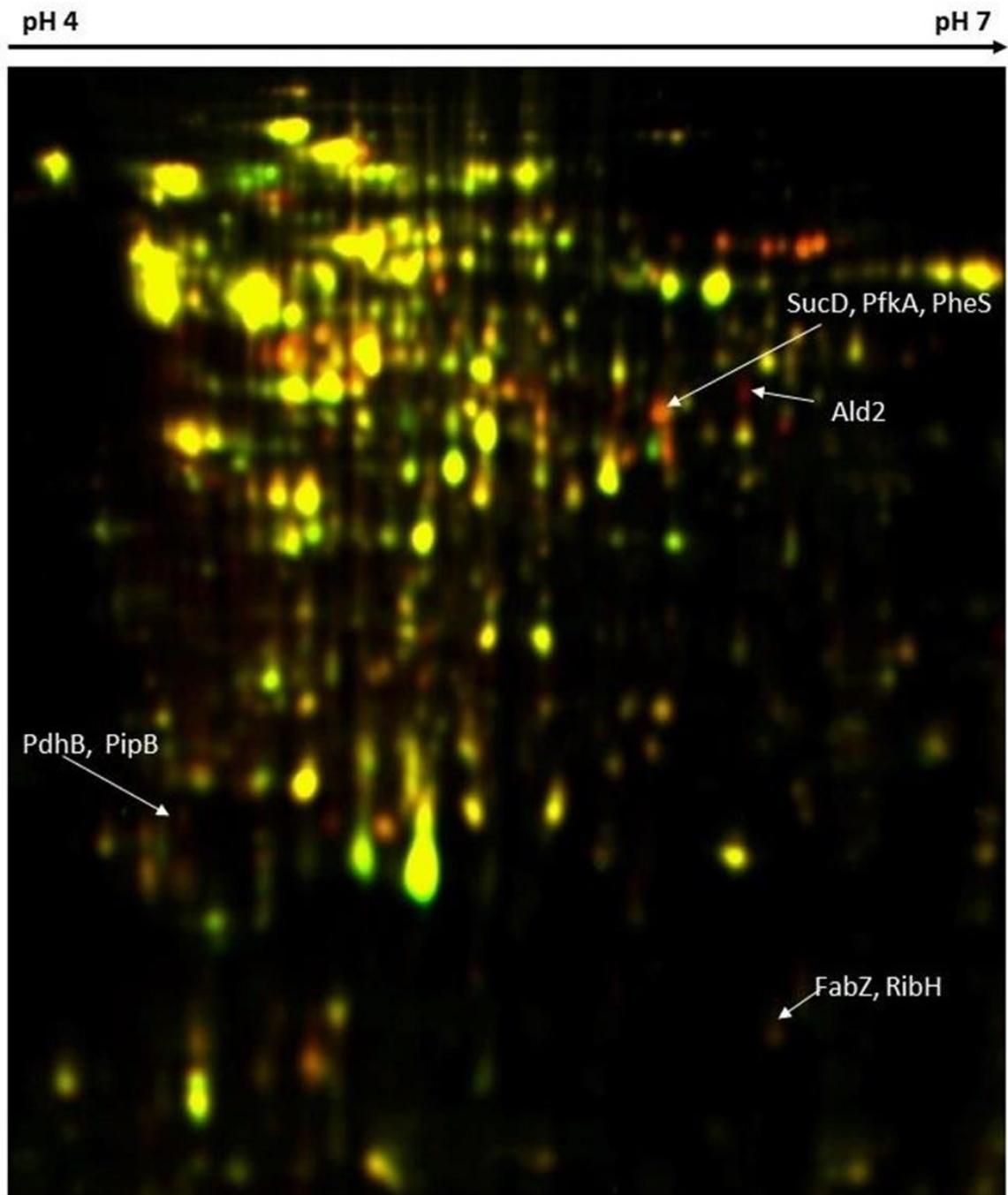
**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

1. Harms, A.; Brodersen, D.E.; Mitarai, N.; Gerdes, K. Toxins, Targets, and Triggers: An Overview of Toxin-Antitoxin Biology. *Mol. Cell* **2018**, *70*, 768–784. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Helaine, S.; Cheverton, A.M.; Watson, K.G.; Faure, L.M.; Matthews, S.A.; Holden, D.W. Internalization of salmonella by macrophages induces formation of nonreplicating persisters. *Science* **2014**, *343*, 204–208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Lobato-Márquez, D.; Moreno-Córdoba, I.; Figueroa, V.; Díaz-Orejas, R.; García-Del Portillo, F. Distinct type I and type II toxin-antitoxin modules control Salmonella lifestyle inside eukaryotic cells. *Sci. Rep.* **2015**, *5*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Ayrapetyan, M.; Williams, T.C.; Oliver, J.D. Bridging the gap between viable but non-culturable and antibiotic persistent bacteria. *Trends Microbiol.* **2015**, *23*, 7–13. [[CrossRef](#)]
5. Zamakhaev, M.V.; Goncharenko, A.V.; Shumkov, M.S. Toxin-Antitoxin Systems and Bacterial Persistence (Review). *Appl. Biochem. Microbiol.* **2019**, *55*, 571–581. [[CrossRef](#)]
6. Song, S.; Wood, T.K. Toxin/Antitoxin System Paradigms: Toxins Bound to Antitoxins Are Not Likely Activated by Preferential Antitoxin Degradation. *Adv. Biosyst.* **2020**, *4*, 1900290. [[CrossRef](#)]
7. Page, R.; Peti, W. Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. *Nat. Chem. Biol.* **2016**. [[CrossRef](#)]
8. Brantl, S.; Jahn, N. sRNAs in bacterial type I and type III toxin-antitoxin systems. *FEMS Microbiol. Rev.* **2015**, *39*, 413–427. [[CrossRef](#)]
9. Brielle, R.; Pinel-Marie, M.-L.; Felden, B. Linking bacterial type I toxins with their actions. *Curr. Opin. Microbiol.* **2016**, *30*, 114–121. [[CrossRef](#)]
10. Maggi, S.; Yabre, K.; Ferrari, A.; Lazzi, C.; Kawano, M.; Rivetti, C.; Folli, C. Functional characterization of the type I toxin Lpt from *Lactobacillus rhamnosus* by fluorescence and atomic force microscopy. *Sci. Rep.* **2019**, *9*. [[CrossRef](#)]
11. Sayed, N.; Nonin-Lecomte, S.; Réty, S.; Felden, B. Functional and structural insights of a staphylococcus aureus apoptotic-like membrane peptide from a toxin-antitoxin module. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 43454–43463. [[CrossRef](#)]
12. 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.* **2014**, *7*, 424–435. [[CrossRef](#)]
13. Habib, G.; Zhu, Q.; Sun, B. Bioinformatics and functional assessment of toxin-antitoxin systems in staphylococcus aureus. *Toxins* **2018**, *10*, 473. [[CrossRef](#)]
14. Germain-Amiot, N.; Augagneur, Y.; Camberlein, E.; Nicolas, I.; Lecureur, V.; Rouillon, A.; Felden, B. A novel Staphylococcus aureus cis-trans type I toxin-antitoxin module with dual effects on bacteria and host cells. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, 1759–1773. [[CrossRef](#)]
15. Riffaud, C.; Pinel-Marie, M.L.; Pascreau, G.; Felden, B. Functionality and cross-regulation of the four SprG/SprF type I toxin-antitoxin systems in Staphylococcus aureus. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, 1740–1758. [[CrossRef](#)]
16. Pinel-Marie, M.L.; Brielle, R.; Riffaud, C.; Germain-Amiot, N.; Polacek, N.; Felden, B. RNA antitoxin SprF1 binds ribosomes to attenuate translation and promote persister cell formation in Staphylococcus aureus. *Nat. Microbiol.* **2021**, *6*, 209–220. [[CrossRef](#)]
17. Jenul, C.; Horswill, A.R. Regulation of Staphylococcus aureus Virulence. *Microbiol. Spectr.* **2019**, *7*. [[CrossRef](#)]
18. Kuroda, M.; Ohta, T.; Uchiyama, I.; Baba, T.; Yuzawa, H.; Kobayashi, I.; Kobayashi, N.; Cui, L.; Oguchi, A.; Aoki, K.I.; et al. Whole genome sequencing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Lancet* **2001**, *357*, 1225–1240. [[CrossRef](#)]
19. Bonar, E.; Chlebicka, K.; Dubin, G.; Wladyka, B. Application of two-dimensional difference gel electrophoresis in identification of factors responsible for virulence of staphylococcus aureus. In *Methods in Molecular Biology*; Humana: New York, NY, USA, 2020.
20. Bodzon-Kulakowska, A.; Suder, P.; Mak, P.; Bierczynska-Krzysik, A.; Lubec, G.; Walczak, B.; Kotlinska, J.; Silberring, J. Proteomic analysis of striatal neuronal cell cultures after morphine administration. *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 1200–1210. [[CrossRef](#)]
21. Perez-Riverol, Y.; Csordas, A.; Bai, J.; Bernal-Llinares, M.; Hewapathirana, S.; Kundu, D.J.; Inuganti, A.; Griss, J.; Mayer, G.; Eisenacher, M.; et al. The PRIDE database and related tools and resources in 2019: Improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D442–D450. [[CrossRef](#)]
22. Schägger, H.; von Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **1987**. [[CrossRef](#)]
23. Bukowski, M.; Lyzen, R.; Helbin, W.M.; Bonar, E.; Szalewska-Palasz, A.; Wegrzyn, G.; Dubin, G.; Dubin, A.; Wladyka, B. A regulatory role for Staphylococcus aureus toxin-antitoxin system PemIK Sa. *Nat. Commun.* **2013**, *4*. [[CrossRef](#)]
24. Kery, M.B.; Feldman, M.; Livny, J.; Tjaden, B. TargetRNA2: Identifying targets of small regulatory RNAs in bacteria. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*. [[CrossRef](#)]
25. Lioliou, E.; Romilly, C.; Romby, P.; Fechter, P. RNA-mediated regulation in bacteria: From natural to artificial systems. *N. Biotechnol.* **2010**, *27*, 222–235. [[CrossRef](#)]
26. Götz, F.; Yu, W.; Dube, L.; Prax, M.; Ebner, P. Excretion of cytosolic proteins (ECP) in bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* **2015**, *305*, 230–237. [[CrossRef](#)]
27. Steinbrecher, T.; Prock, S.; Reichert, J.; Wadhvani, P.; Zimpfer, B.; Bürck, J.; Berditsch, M.; Elstner, M.; Ulrich, A.S. Peptide-lipid interactions of the stress-response peptide tisB that induces bacterial persistence. *Biophys. J.* **2012**, *103*, 1460–1469. [[CrossRef](#)]
28. Wilmaerts, D.; Bayoumi, M.; Dewachter, L.; Knapen, W.; Mika, J.T.; Hofkens, J.; Dedeker, P.; Maglia, G.; Verstraeten, N.; Michiels, J. The persistence-inducing toxin hokB forms dynamic pores that cause ATP leakage. *MBio* **2018**, *9*. [[CrossRef](#)]
29. Gurnev, P.A.; Ortenberg, R.; Dörr, T.; Lewis, K.; Bezrukov, S.M. Persister-promoting bacterial toxin TisB produces anion-selective pores in planar lipid bilayers. *FEBS Lett.* **2012**, *586*, 2529–2534. [[CrossRef](#)]

30. Fraikin, N.; Goormaghtigh, F.; Van Melderen, L. Type II Toxin-Antitoxin Systems: Evolution and Revolutions. *J. Bacteriol.* **2020**, *202*. [[CrossRef](#)]
31. Peyrusson, F.; Varet, H.; Nguyen, T.K.; Legendre, R.; Sismeiro, O.; Coppée, J.Y.; Wolz, C.; Tenson, T.; Van Bambeke, F. Intracellular *Staphylococcus aureus* persists upon antibiotic exposure. *Nat. Commun.* **2020**, *11*. [[CrossRef](#)]
32. Balaban, N.Q.; Helaine, S.; Lewis, K.; Ackermann, M.; Aldridge, B.; Andersson, D.I.; Brynildsen, M.P.; Bumann, D.; Camilli, A.; Collins, J.J.; et al. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nat. Rev. Microbiol.* **2019**, *17*, 441–448. [[CrossRef](#)]
33. Riffaud, C.; Pinel-Marie, M.-L.; Felden, B. Cross-Regulations between Bacterial Toxin–Antitoxin Systems: Evidence of an Interconnected Regulatory Network? *Trends Microbiol.* **2020**, *28*, 851–866. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Alonzo, F.; Xayarith, B.; Whisstock, J.C.; Freitag, N.E. Functional analysis of the *Listeria monocytogenes* secretion chaperone PrsA2 and its multiple contributions to bacterial virulence. *Mol. Microbiol.* **2011**, *80*, 1530–1548. [[CrossRef](#)]
35. Ünal, C.M.; Berges, M.; Smit, N.; Schiene-Fischer, C.; Priebe, C.; Strowig, T.; Jahn, D.; Steinert, M. PrsA2 (CD630\_35000) of *Clostridioides difficile* is an active parvulin-type PPIase and a virulence modulator. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Wang, G.; Xia, Y.; Song, X.; Ai, L. Common Non-classically Secreted Bacterial Proteins with Experimental Evidence. *Curr. Microbiol.* **2016**, *72*, 102–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Dallo, S.F.; Kannan, T.R.; Blaylock, M.W.; Baseman, J.B. Elongation factor Tu and E1  $\beta$  subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **2002**, *46*, 1041–1051. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Wolf, C.; Kusch, H.; Monecke, S.; Albrecht, D.; Holtfreter, S.; von Eiff, C.; Petzl, W.; Rainard, P.; Bröker, B.M.; Engelmann, S. Genomic and proteomic characterization of *Staphylococcus aureus* mastitis isolates of bovine origin. *Proteomics* **2011**, *11*, 2491–2502. [[CrossRef](#)]
39. Stach, N.; Karim, A.; Golik, P.; Kitel, R.; Pustelny, K.; Gruba, N.; Groborz, K.; Jankowska, U.; Kedracka-Krok, S.; Wladyka, B.; et al. Structural Determinants of Substrate Specificity of SplF Protease from *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Stach, N.; Kaszycki, P.; Wladyka, B.; Dubin, G. Extracellular Proteases of *Staphylococcus* spp. In *Pet-to-Man Travelling Staphylococci: A World in Progress*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2018; ISBN 9780128135488.
41. Kolar, S.L.; Antonio Ibarra, J.; Rivera, F.E.; Mootz, J.M.; Davenport, J.E.; Stevens, S.M.; Horswill, A.R.; Shaw, L.N. Extracellular proteases are key mediators of *Staphylococcus aureus* virulence via the global modulation of virulence-determinant stability. *Microbiologyopen* **2013**, *2*, 18–34. [[CrossRef](#)]
42. Mootz, J.M.; Malone, C.L.; Shaw, L.N.; Horswill, A.R. Staphopains modulate *staphylococcus aureus* biofilm integrity. *Infect. Immun.* **2013**. [[CrossRef](#)]
43. Sonesson, A.; Przybyszewska, K.; Eriksson, S.; Mörgelin, M.; Kjellström, S.; Davies, J.; Potempa, J.; Schmidtchen, A. Identification of bacterial biofilm and the *Staphylococcus aureus* derived protease, staphopain, on the skin surface of patients with atopic dermatitis. *Sci. Rep.* **2017**, *7*. [[CrossRef](#)]
44. Lacey, K.A.; Mulcahy, M.E.; Towell, A.M.; Geoghegan, J.A.; McLoughlin, R.M. Clumping factor B is an important virulence factor during *Staphylococcus aureus* skin infection and a promising vaccine target. *PLoS Pathog.* **2019**, *15*, e1007713. [[CrossRef](#)]
45. Ebner, P.; Rinker, J.; Nguyen, M.T.; Popella, P.; Nega, M.; Luqman, A.; Schitteck, B.; Di Marco, M.; Stevanovic, S.; Götz, F. Excreted cytoplasmic proteins contribute to pathogenicity in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **2016**, *84*, 1672–1681. [[CrossRef](#)]
46. Pasztor, L.; Ziebandt, A.K.; Nega, M.; Schlag, M.; Haase, S.; Franz-Wachtel, M.; Madlung, J.; Nordheim, A.; Heinrichs, D.E.; Götz, F. Staphylococcal major autolysin (Atl) is involved in excretion of cytoplasmic proteins. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 36794–36803. [[CrossRef](#)]
47. Pichoff, S.; Lutkenhaus, J. Tethering the Z ring to the membrane through a conserved membrane targeting sequence in FtsA. *Mol. Microbiol.* **2005**, *55*, 1722–1734. [[CrossRef](#)]
48. Masuda, H.; Tan, Q.; Awano, N.; Wu, K.P.; Inouye, M. YeeU enhances the bundling of cytoskeletal polymers of MreB and FtsZ, antagonizing the CbtA (YeeV) toxicity in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **2012**, *84*, 979–989. [[CrossRef](#)]
49. Hemmadi, V.; Biswas, M. An overview of moonlighting proteins in *Staphylococcus aureus* infection. *Arch. Microbiol.* **2021**, *203*, 481–498. [[CrossRef](#)]

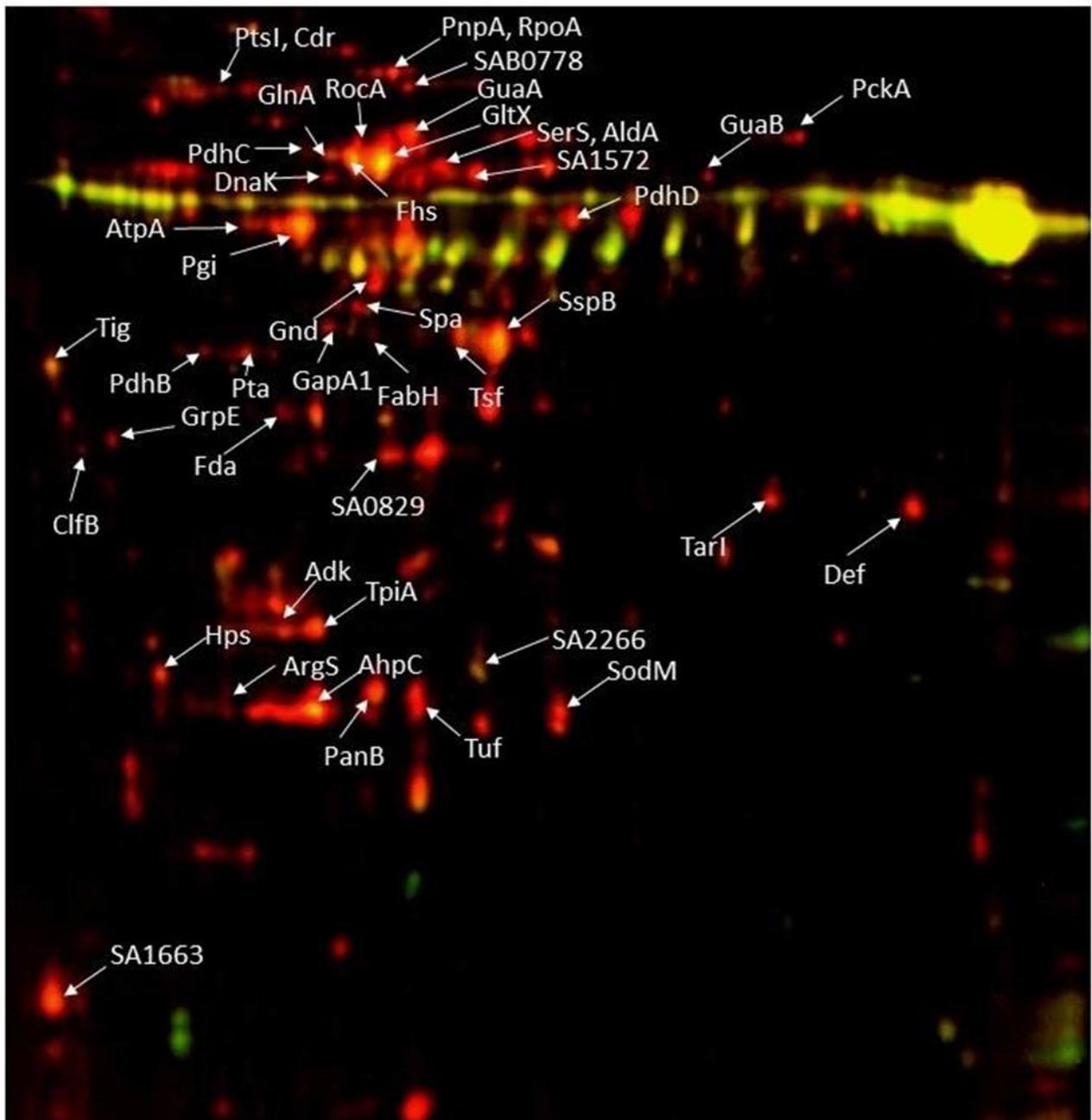
## SUPPLEMENTARY DATA



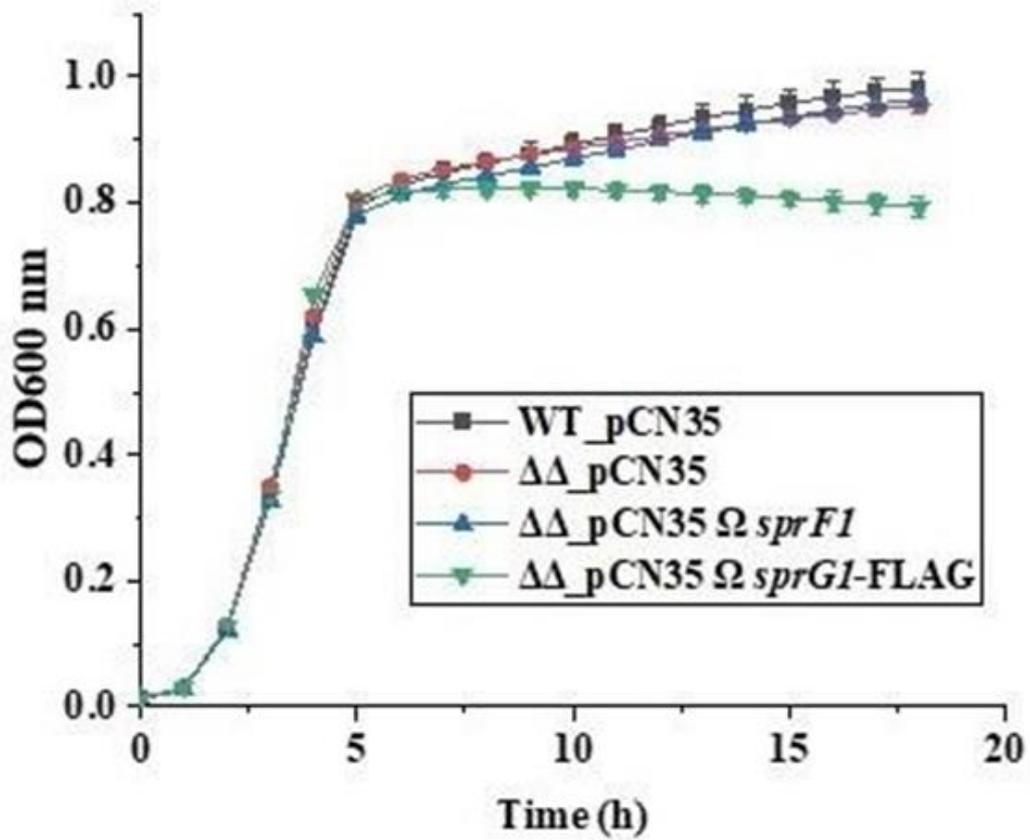
**Supplementary Figure S1.** An exemplary 2D DIGE gel of *S. aureus* N315 and the SprG1/SprF1 TA system deletion mutant, transformed with a plasmid (over)expressing the SprF1 antitoxin, intracellular proteins isolated from stationary growth phase (15 h). Differentiating protein spots are marked with arrows. For the meaning of the protein acronyms, please refer to Table 2.

pH 4

pH 7



**Supplementary Figure S2.** An exemplary 2D DIGE gel of *S. aureus* N315 and the SprG1/SprF1 TA system deletion mutant, transformed with a plasmid (over)expressing the SprF1 antitoxin, extracellular proteins isolated from stationary growth phase (15 h). Differentiating protein spots are marked with arrows. For the meaning of the protein acronyms, please refer to Table 3.



**Supplementary Figure S3.** Growth curves of *S. aureus* N315 (WT) and the *sprG1/sprF1* deletion mutant ( $\Delta\Delta$ ) transformed with the control plasmid (pCN35), the plasmid (pCN35 $\Omega$ *sprF1*) expressing SprF1 antitoxin under the control of its native promoter or the plasmid (pCN35 $\Omega$ *sprG1*-FLAG) expressing the flagged version of SprG1 toxin, cultivated in optimal conditions (Tryptic Soy Broth, 37°C).



**Supplementary Figure S4.** Voronoi diagrams illustrating functions of differentially expressed proteins identified in proteomic studies. **(A)** and **(B)** intracellular proteomes at logarithmic and stationary growth phases, respectively. **(C)** The extracellular proteome at stationary phase. The diagrams were prepared using interactive proteomaps (available at [www.proteomaps.net](http://www.proteomaps.net); Liebermeister W, Noor E, Flamholz A, Davidi D, Bernhardt J, and Milo R, Visual account of protein investment in cellular functions. PNAS June 10, 2014 111 (23) 8488-8493).

**Supplementary Table S1.** A list of differentially expressed proteins extracted from **intracellular** or **extracellular** proteomic comparisons of *S. aureus* N315 with its deletion mutant of SprG1/SprF1 TA system ( $\Delta\Delta$ ) and with the (over)expression of SprF1 antitoxin ( $\Delta\Delta$  SprF). \*fold change, \*\*according to Uniprot database. Lien d'accès : <https://docs.google.com/spreadsheets/d/10KtWL2IY2X31tVeDtQm4jsVIpViP-n3G/edit?usp=sharing&ouid=112794740958927992254&rtpof=true&sd=true>

**Supplementary Table S2.** SprF1 (sRNA) interactions with *S. aureus* N315 gene transcript predicted by the TargetRNA2 algorithm (TargetRNA2: identifying targets of small regulatory RNAs in bacteria. Mary Beth Kery, Monica Feldman, Jonathan Livny, and Brian Tjaden. Nucleic Acids Research, 42(W1): W124-W129, 2014).

Rank	Gene	Synonym	Energy	P values	sRNA_start	sRNA_stop	mRNA_start	mRNA_stop
1	-	SA0971	-18.24	0.000	13	27	-76	-62
2	<i>lytS</i>	SA0250	-13.49	0.003	120	133	2	15
3	-	SA0270	-13.26	0.003	88	105	-17	2
4	-	SA2179	-11.20	0.012	59	78	-3	17
5	-	SA0517	-10.77	0.016	61	75	9	20
6	<i>aldH</i>	SA1736	-10.37	0.019	41	55	-72	-60
7	<i>cfxE</i>	SA1065	-10.00	0.023	21	29	-72	-64
8	<i>set12</i>	SA0388	-9.93	0.024	10	19	-79	-70
9	<i>acpS</i>	SA1875	-9.75	0.026	96	109	-55	-42
10	<i>asnC</i>	SA1287	-9.39	0.031	90	105	-12	3
11	<i>menE</i>	SA1615	-9.36	0.032	122	136	-68	-54
12	<i>splF</i>	SA1627	-9.11	0.035	127	141	6	20
13	-	SA0524	-9.03	0.037	49	64	-64	-49
14	-	SA1764	-9.01	0.037	94	109	-48	-33
15	-	SA2123	-8.98	0.038	128	141	-73	-60
16	-	SA0224	-8.88	0.039	59	74	-69	-54
17	-	SA0815	-8.81	0.040	119	130	-1	11
18	-	SA0116	-8.68	0.043	120	134	-63	-49
19	-	SA0286	-8.43	0.047	29	41	-11	4
20	<i>ddh</i>	SA2312	-8.36	0.049	72	86	7	20
21	-	SA0860	-8.34	0.049	111	119	-21	-13
22	-	SA0268	-8.32	0.049	95	108	-11	4
23	-	SA1778	-8.30	0.050	126	137	-28	-17

SA0971 (conserved hypothetical protein)

```
sRNA    27      3' ACGCGUACAACGGGA 5'   13
          |||:|
SA0971 -76      5' CGCGCAUGUUGUUCA 3'  -62
```

*lytS* (Sensor histidine kinase/phosphatase *LytS*)

```
sRNA    133     3' UUGGUAGCGAUUGA 5'   120
          :|:|
lytS     2      5' UGCUAUCGCUAACA 3'   15
```

SA0270 (similar to secretory antigen precursor *SsaA*)

```
sRNA    105     3' ACC-AAUUUACCAAUAUU 5'   88
          || |||:|
SA0270 -17     5' AGGAUAAAUGGUUAUU 3'    2
```

SA2179 (Oxygen regulatory protein NreC)

```

sRNA 78 3' AUUAGAUUUUAUCGGUGGCA 5' 59
      |||: |||||:|:|:|
SA2179 -3 5' AAAUUGAAAAUAGUCAUUGC 3' 17

```

SA0517 (Cof-type HAD-IIB family hydrolase)

```

sRNA 75 3' AGAUUUUAUCGGUGG 5' 61
      || ||||| |
SA0517 9 5' ACU--AAUAGCCA-C 3' 20

```

aldH (Aldehyde dehydrogenase)

```

sRNA 55 3' AAAUUGCCCGAGUGA 5' 41
      ||||| ||| |||
aldH -72 5' AUUAAC-GGC-CACA 3' -60

```

cfxE (Ribulose-5-phosphate 3-epimerase homolog)

```

sRNA 29 3' AAACGCGUA 5' 21
      |||||
cfxE -72 5' AUUGC GCAA 3' -64

```

set12 (Superantigen-like protein SSL8)

```

sRNA 19 3' AACGGGAAAA 5' 10
      |||||
set12 -79 5' AUGCCCUUUA 3' -70

```

acpS (Holo-[acyl-carrier-protein] synthase)

```

sRNA 109 3' AGCUACCAAUUUAC 5' 96
      |||||
acpS -55 5' ACGAUGGUAAAUA 3' -42

```

asnC (Asparagine--tRNA ligase)

```

sRNA 105 3' ACCAAUUUACCAAUAA 5' 90
      || :|||
asnC -12 5' AGG-AGAAUGGUUAUG 3' 3

```

menE (2-succinylbenzoate--CoA ligase)

```

      11
sRNA 136 3' AUAUUGGUAGCGAUU 5' 122
      ||||| :|||:
menE -68 5' CAUAACCACUGCUAG 3' -54

```

splF (Serine protease SplF)

```

sRNA 141 3' UUUUUAUAUUGGUAG 5' 127
      |||||:|
splF 6 5' AAAAAUAUAUCAU- 3' 20

```

SA0524 (GTP cyclohydrolase)

```

sRNA 64 3' GUGGCAGAAAAAUUGC 5' 49
      ||| | |||||
SA0524 -64 5' CACAG-CUUUUUACA 3' -49

```

SA1764 (Phage minor structural protein)

```

sRNA 109 3' AGCUACCAAUUUACCA 5' 94
      ||| |||||
SA1764 -48 5' ACGACGGUAAAUGGC 3' -33

```

SA2123 (Transcription regulator LysR family)

```

sRNA 141 3' UUUUUUAUAUUGGUA 5' 128
      |||||:|
SA2123 -73 5' UAAAAUAUAGCCAA 3' -60

```

SA0224 (6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating)

```

sRNA 74 3' GAUUUUUAUCGGUGGC-A 5' 59
      ||||| || || |
SA0224 -69 5' AUAAAAUAG-CAACGUU 3' -54

```

SA0815 (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, PPIase)

```

sRNA 130 3' GUAGCGAUUGAA 5' 119
      || |||||
SA0815 -1 5' AAUGGCUAACUA 3' 11

```

SA0116 (Siderophore biosynthesis protein SbnE)

```

sRNA 134 3' AUUGGUAGCGAUUGA 5' 120
      ||||| |||:
SA0116 -63 5' CAACCAUCACUAAUC 3' -49

```

SA0286 (TIGR01741 family protein)

```

sRNA 41 3' AUCC-C-AUUGUACA 5' 29
      :|| | |||||
SA0286 -11 5' GGGGCGAUACAUGA 3' 4

```

ddh (D-lactate dehydrogenase)

```

sRNA 86 3' AAUUAGAAAUUAGAU 5' 72
      |||||:|
ddh 7 5' AUAAUCUUAAUUU- 3' 20

```

SA0860 (ClpXP adapter protein SpxH)

```

sRNA 137 3' UAUAUUGGUAGC 5' 126
      |||||:
SA1778 -28 5' UUAUAACCAUUU 3' -17

```

**Parameters for TargetRNA2 algorithm:** <http://cs.wellesley.edu/~btjaden/TargetRNA2/index.html>

TargetRNA version: 2.01

Replicon: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* N315 chromosome

NTs before start codon: 80

NTs after start codon: 20

Seed length: 7

sRNA conservation and accessibility: true

sRNA window size: 13

mRNA structural accessibility: true

Interaction region: 20

Filter size: 400

Single target: -

File of candidate targets: -

*p*-value: 0.05

sRNA: SprF1 RNA antisense

>SprF1

```
AUAUUAUAGAAAAAGGGCAACAUGCGCAAACAUGUUACCCUAGUGAGCCCGUUAAAAAGACG
GUGGCUAUUUUAGAUUAAAGAUUAAAUUAAUAACCAUUUAACCAUCGAAACCAGCCAAAGU
UAGCGAUGGUUAUUAUUUUU
```





---

# Conclusion

---

Dans ce travail de thèse, nous avons poursuivi la caractérisation fonctionnelle du système TA de type I SprG1/SprF1 de *S. aureus* (Figure 57). En étudiant l'impact de différents stress environnementaux sur l'expression des ARN SprF1 et *sprG1*, nous avons montré que le niveau de transcrite de ces deux ARN est augmenté en condition de stress nutritif. Ce résultat est en adéquation avec une étude ayant montré que le niveau de transcrite de *sprG1* est augmenté dans le biofilm (Karimaei *et al.*, 2021), environnement propice au stress nutritif. Par ailleurs, nos recherches ont suggéré que le régulateur SarA pourrait réprimer l'expression de SprF1 en phase stationnaire de croissance. Des analyses complémentaires sont néanmoins nécessaires pour valider ces résultats. Du fait de la redondance des systèmes TA dans les génomes, la découverte de la fonction biologique associée à un système TA est parfois délicate. Pour le système SprG1/SprF1, de précédentes études menées au laboratoire (données non publiées) ont montré que ce système n'est pas impliqué dans la résistance de *S. aureus* aux antibiotiques. En effet, aucune variation de CMI (ciprofloxacine, cloxacilline, vancomycine, céfazoline) n'a été observée entre la souche HG003 parentale et la souche délétée du système SprG1/SprF1. Une autre fonction à laquelle peuvent participer les systèmes TA est la régulation du cycle de vie du biofilm. Puisque *sprG1* est augmenté en condition de biofilms, nous avons investigué le rôle de SpG1/SprF1 dans la formation du biofilm. Bien que nous ayons montré que ce système ne participe pas à la formation du biofilm, nous avons observé une augmentation du PIA dans la matrice des biofilms surexprimant uniquement SprF1 ou le système entier. Cependant, le lien entre cette augmentation et le système SprG1/SprF1 reste à élucider.

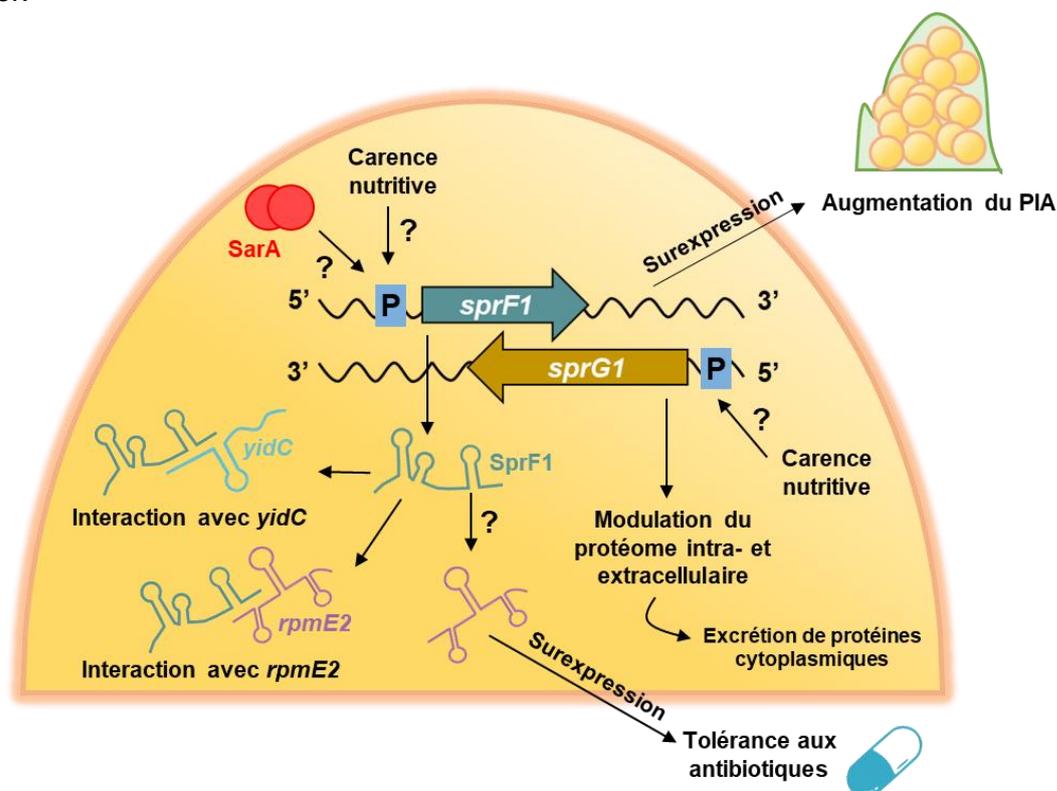


Figure 57 : Résumé des principaux résultats de ce travail de thèse.

Un second objectif de ce travail de thèse était d'étudier l'impact du système SprG1/SprF1 sur les réseaux de régulation mis en place chez *S. aureus*. Pour cela, nous avons réalisé une analyse RNA-Seq pour identifier les cibles moléculaires de SprF1 et une analyse protéomique pour étudier l'impact du système SprG1/SprF1 sur le protéome intra- et extracellulaire. Nous avons ainsi observé, par 2D-DIGE couplée à la spectrométrie de masse, qu'en phase stationnaire de croissance, l'expression de plusieurs enzymes en lien avec la glycolyse (PdhB, SucD, PfkA, Fda, GapA1, GpmI) était modifiée par la surexpression de SprF1 ou la délétion du système (Chlebicka *et al.*, 2021). Le niveau de transcrite de *pfkA*, *gpmI* et *gapA1* étant diminué chez des persisters intracellulaires de *S. aureus* (Peyrusson *et al.*, 2020), ces données suggèrent donc un lien entre la modulation du protéome de *S. aureus* par le système SprG1/SprF1 et la formation des bactéries persistantes. De plus, nous avons montré qu'en phase stationnaire de croissance, la présence de protéines cytoplasmiques dans le milieu extracellulaire est diminuée dans la souche délétée du système SprG1/SprF1 complétée ou non par SprF1 supposant que les peptides SprG1<sub>31</sub> et SprG1<sub>44</sub> favoriseraient l'excrétion de protéines cytoplasmiques pouvant ainsi contribuer à la pathogénie de *S. aureus*.

En ce qui concerne l'identification des cibles moléculaires de l'antitoxine SprF1, nous avons mis en évidence, par la technique MAPS, 12 cibles de cet ARN. Deux de ces cibles, *sprG1* et *yidC*, étaient également retrouvées dans nos analyses *in silico*. Par la suite, nous avons validé *in vitro* l'interaction de SprF1 avec les ARNm *yidC* et *rpmE2*, le premier codant une protéine insertase et le second la protéine ribosomale L31. En interagissant avec ces ARN, SprF1 peut favoriser l'expression de RpmE2 et, au contraire, atténuer l'expression de YidC en phase exponentielle de croissance, moment où le niveau de transcrite des ARNm *yidC* et *rpmE2* est le plus abondant. Le niveau de transcrite de SprF1 étant plus élevé que le niveau de transcrite de ses ARNm cibles (*sprG1*, *yidC* et *rpmE2*), cela suggère que l'antitoxine SprF1 est en quantité suffisante pour réguler plusieurs cibles. Ce dernier point est renforcé du fait que les séquences permettant à l'ARN SprF1 d'interagir avec les ribosomes (Pinel-Marie *et al.*, 2021), *yidC* et *rpmE2* ne sont pas chevauchantes. En s'intéressant de plus près à *rpmE2*, nous avons observé que sa surexpression augmente la fraction des bactéries capables de survivre à la ciprofloxacine et à la cloxacilline, ce qui pourrait contribuer au phénotype de persistance induit par SprF1. L'ensemble de ces résultats tendent donc à bousculer le dogme disant qu'une antitoxine a pour unique rôle la régulation de l'activité de sa toxine. En effet, en interagissant avec plusieurs cibles, l'antitoxine ARN SprF1 se comporte tel un ARN régulateur typique (codé en *trans*) qui participe à l'adaptation de la bactérie à son environnement.

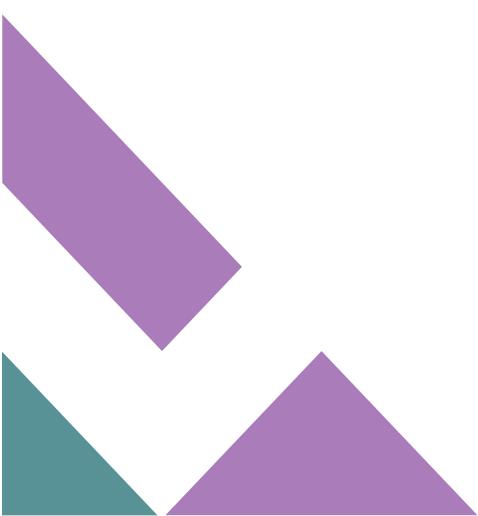




---

# Discussion et perspectives

---



Depuis la découverte en 1983 du premier système TA localisé sur le plasmide F d'*E. coli* (Ogura & Hiraga, 1983), une grande diversité de systèmes TA a été mise en évidence sur des plasmides et au sein des chromosomes des bactéries et des archées. Les systèmes TA sont des éléments génétiques composés de deux gènes : l'un codant une toxine stable à l'origine d'un arrêt de croissance ou de la mort des bactéries et l'autre codant une antitoxine labile neutralisant l'action de la toxine. L'étude approfondie de ces systèmes a permis de les classer en huit types selon la nature et le mode d'action de l'antitoxine. Les systèmes de types I et II sont, à ce jour, les plus étudiés et les mieux décrits. Les systèmes TA de type II sont composés d'une antitoxine protéique qui forme un complexe avec sa toxine pour bloquer son activité. De leur côté, les systèmes TA de type I sont constitués d'une antitoxine ARN qui s'apparie à l'ARNm codant la toxine pour inhiber sa traduction et/ou causer sa dégradation. Chez *S. aureus*, un pathogène responsable de nombreuses infections humaines, plusieurs systèmes TA de types I et II ont été découverts et caractérisés (Schuster & Bertram, 2016). Récemment, en utilisant des outils de prédiction des systèmes TA dans les génomes, une étude menée sur 621 isolats de *S. aureus* (génomés complets issus de la base de données NCBI) a mis en évidence la présence de 3690 systèmes TA de type II putatifs, avec une moyenne de 7 systèmes TA par génome (Xu *et al.*, 2023). Après alignement des séquences codant les toxines putatives, ces 3690 systèmes ont été divisés en 44 groupes : 3 groupes qualifiés de « prévalents » et présents dans 80% des isolats, 6 groupes qualifiés de « communs » identifiés dans 20% des isolats et les 35 autres groupes ont été qualifiés de « rares ». Parmi ces systèmes TA, certains ont été détectés sur des plasmides mais la plupart d'entre eux ont été identifiés au niveau chromosomique et, parfois, dans la cassette *SCCmec*. De plus, en étudiant la co-occurrence de ces systèmes TA avec des gènes de résistance ou de virulence, 16 groupes ont été associés à la présence de gènes de résistance et 19 groupes ont été associés à la présence de gènes de virulence. Ces résultats démontrent donc l'abondance et la grande diversité des systèmes TA chez *S. aureus* et suggèrent qu'ils pourraient participer au maintien des gènes de résistance et de virulence (Xu *et al.*, 2023).

A l'exception du système TA à 3 composants MW1433/MW1434/MW1435 (Habib *et al.*, 2020), les autres systèmes TA de type I décrits chez *S. aureus*, appartenant aux familles SprA/SprA<sub>AS</sub> ou SprG/SprF, ont fait l'objet de plusieurs travaux publiés par le laboratoire INSERM U1230. Les systèmes SprG/SprF sont généralement présents en quatre exemplaires (*sprG1/sprF1*, *sprG2/sprF2*, *sprG3/sprF3* et *sprG4/sprF4*) au sein du génome de *S. aureus* (Pinel-Marie *et al.*, 2014). Plus précisément, *sprG2/sprF2*, *sprG3/sprF3* et *sprG4/sprF4* sont localisés dans le core génome (Figure 34), tandis que le locus *sprG1/sprF1* est situé dans un îlot de pathogénicité. Ce travail de thèse s'est plus particulièrement intéressé au système SprG1/SprF1, composé de l'antitoxine ARN SprF1 et des toxines membranaires SprG1<sub>31</sub> et

SprG1<sub>44</sub> (**Figure 35**) (Pinel-Marie *et al.*, 2014). La surexpression de ces toxines, en raison d'une dépolarisation membranaire couplée à la formation de mésosomes et à l'inhibition de la synthèse d'ATP, induit la mort de *S. aureus* (Fermon *et al.*, 2023). De son côté, l'antitoxine SprF1 s'apparie à l'ARNm codant les toxines SprG1 pour inhiber leur traduction et ainsi bloquer leur activité. De façon intéressante, une étude a montré que SprF1 peut aussi s'associer aux ribosomes, *via* une séquence riche en purines localisée à son extrémité 5', ce qui entraîne une atténuation de la traduction et favorise la formation de bactéries persistantes aux antibiotiques (Pinel-Marie *et al.*, 2021). Suite à cette découverte, mon projet de thèse est né afin de poursuivre la caractérisation fonctionnelle de ce système et d'identifier les cibles moléculaires de SprF1 pour mieux comprendre son implication dans la formation des bactéries persistantes.

### Régulation de l'expression du système SprG1/SprF1 et étude de son implication dans la formation de biofilms

Dans la première partie de ce travail, nous avons tenté d'identifier les mécanismes moléculaires de régulation de l'expression du système SprG1/SprF1 et d'étudier son rôle dans la formation de biofilms. Dans la littérature, les systèmes TA sont considérés comme des modules de réponse aux stress mais cette hypothèse est controversée (Ostyn *et al.*, en préparation). Par exemple, la délétion de 5 systèmes TA de type II chez *E. coli*, dont des systèmes pour lesquels une augmentation de leur expression a été montrée en condition de stress, n'a pas d'effet sur l'adaptation des bactéries à un stress nutritionnel ou à un choc acide (Tsilibaris *et al.*, 2007). Pour le système SprG1/SprF1, dans la souche HG003 de *S. aureus*, nous avons montré que le niveau des transcrits *sprG1* et SprF1 est augmenté lorsque les bactéries sont cultivées en milieu carencé (NZM, SNM3). Afin de mieux comprendre quels sont les facteurs clés qui peuvent induire une modulation de l'expression du système TA en milieu carencé, des expériences de culture en milieux chimiquement définis dans lesquels certains éléments seraient omis (nutriments, minéraux...) pourraient être entreprises. Nous pourrions, par exemple, utiliser un milieu minimum M9 dépourvu des bases azotées ou d'éléments comme le fer ou le zinc (Kim *et al.*, 2023). L'augmentation des transcrits *sprG1* et SprF1 en milieu carencé ne semble pourtant pas être impliquée dans l'adaptation de *S. aureus* à un stress nutritif. En effet, nous avons montré que la croissance des souches N315 parentale et délétée du système SprG1/SprF1 est similaire en milieu NZM (Chlebicka *et al.*, 2021). Les souches utilisées dans ces deux études sont relativement différentes : N315 est une souche MRSA appartenant au complexe clonal 5 tandis que HG003 est une souche MSSA appartenant au complexe clonal 8 (Sassi *et al.*, 2022). De plus, le système Agr est déficient chez la souche N315 ce qui suggère que le réseau de régulation de ces deux souches est différent et qu'elles peuvent donc répondre différemment selon les stress rencontrés. Ainsi, il

apparaît nécessaire de comparer la croissance des souches HG003 parentale et délétée du système SprG1/SprF1 en milieu carencé pour étudier le potentiel rôle du système SprG1/SprF1 dans l'adaptation de la souche HG003 au stress nutritif. En ce qui concerne la recherche d'un facteur de transcription pouvant réguler le système SprG1/SprF1, l'interprétation des données obtenues s'est avérée délicate du fait de certains résultats contradictoires. Par exemple, nous avons observé, par northern blot, une augmentation du niveau de transcrite *sprG1* dans la souche délétée du gène codant le facteur de transcription SarA ( $\Delta sarA$ ) en comparaison avec la souche WT. Or, lorsque nous avons analysé le niveau de transcrite de *sprG1* par RT-qPCR, nous avons montré que ce niveau était identique entre les souches WT et  $\Delta sarA$ . Aussi, en northern blot, le niveau de SprF1 est identique entre les souches WT et  $\Delta sarA$  tandis que par RT-qPCR, le niveau de SprF1 est augmenté dans la souche  $\Delta sarA$  en phase stationnaire de croissance. En poursuivant nos analyses, nous avons montré que l'activité du promoteur de *sprF1* n'est pas augmentée dans la souche  $\Delta sarA$ . Ce résultat suggère que l'augmentation du niveau de transcrite SprF1 dans cette souche pourrait être causée par une plus grande stabilité de l'ARN SprF1. Cette hypothèse doit néanmoins être vérifiée en étudiant la demi-vie de l'ARN SprF1 dans la souche  $\Delta sarA$ .

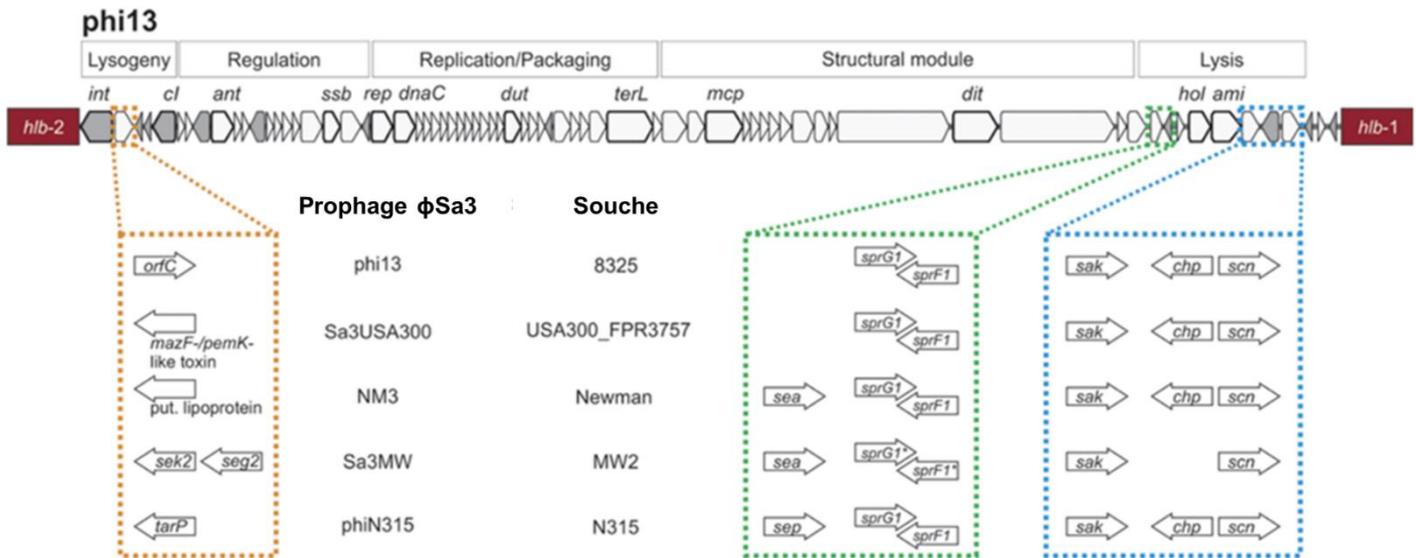
En parallèle des études visant à décrypter les mécanismes moléculaires de régulation de l'expression du système SprG1/SprF1, nous avons analysé son rôle potentiel dans la formation de biofilms, un environnement propice à la formation de persisters (Rowe *et al.*, 2021). En utilisant différentes techniques permettant d'étudier la formation de biofilms (colorations au Crystal violet et au rouge Congo, mesure de l'impédance) nous avons montré que le système SprG1/SprF1 n'est pas impliqué dans la formation de biofilms. Pourtant, nous avons observé une augmentation du PIA dans la matrice des biofilms formés par les souches surexprimant l'antitoxine SprF1 ou le système SprG1/SprF1. La délétion du gène *sprF1* n'étant pas viable pour la bactérie, nous ne pouvons pas savoir si l'augmentation de PIA observée pour la souche surexprimant le système SprG1/SprF1 est uniquement due à la surexpression de *sprF1* ou bien aussi à la surexpression de *sprG1*. Pour vérifier cela, il pourrait être intéressant d'étudier par RT-qPCR l'expression du locus *icaADBC* (locus responsable de la production du PIA) dans des souches exprimant différents niveaux de *sprF1*. Dans l'hypothèse où SprF1 participe à l'expression du locus *icaADBC* et donc à l'augmentation du PIA, des biofilms formés par des souches exprimant différents niveaux de *sprF1* pourraient être traités par des antibiotiques. Ces expériences permettraient ainsi d'étudier l'impact de l'augmentation de l'expression du PIA dans la matrice sur la résistance des biofilms aux antibiotiques. Durant ces travaux de thèse, l'ensemble des expériences de formation de biofilms a été réalisé sur un support abiotique (plaque 96 puits). Il ne peut donc être exclu que dans d'autres conditions,

l'augmentation de PIA induite par le système SprG1/SprF1 puisse, par exemple, participer à la formation de biofilms sur un support biotique ou sur du matériel médical implanté.

Par ailleurs, contrairement aux données de la littérature (Karimaei *et al.*, 2021), nous n'avons pas observé d'augmentation du niveau de transcrit *sprG1* dans le biofilm. A noter, les expériences de ces deux études n'ont pas été réalisées dans les mêmes conditions puisque, nous avons comparé le niveau de transcrit *sprG1* par rapport à celui des bactéries décrochées du biofilm, tandis que Karimaei *et al.* ont comparé le niveau de *sprG1* avec celui de bactéries extraites d'une culture de nuit en milieu TSB. Aussi, le niveau de transcrit *sprG1* a été analysé chez deux souches cliniques de *S. aureus* par Karimaei *et al.* et, dans notre travail, chez la souche HG003, une souche de laboratoire. Ces données suggèrent donc que l'augmentation du niveau de transcrit *sprG1* dans le biofilm serait souche dépendante.

Parmi les fonctions attribuées aux systèmes TA, leur rôle dans le maintien des éléments génétiques mobiles (plasmides, transposons, prophages) est particulièrement bien documenté. Le locus *sprG1/sprF1* est localisé sur un prophage de la famille  $\phi$ Sa3 (prophage  $\Phi$ 13 chez HG003) mais son rôle dans la stabilité de ce prophage n'a pas encore été étudié. Comme les autres phages tempérés retrouvés dans les génomes des Staphylocoques, les phages  $\phi$ Sa3 appartiennent à la famille des *Siphoviridae* (Goerke *et al.*, 2009). Le génome de ces phages est généralement organisé en six modules et contient des gènes codant des facteurs de virulence. Chez *S. aureus*, les phages  $\phi$ Sa3 sont les plus abondants et sont retrouvés dans 96% des souches isolées au niveau nasal chez l'humain (Rohmer & Wolz, 2021). Ces phages s'intègrent dans le gène *hly* qui code la  $\beta$ -hémolysine et cette insertion empêche la production de cette toxine. Les prophages de cette famille contiennent des facteurs de virulence localisés au sein du module de lyse et regroupés dans un cluster génomique d'échappement immunitaire (IEC pour immune evasion cluster) (Van Wamel *et al.*, 2006). L'IEC contient les gènes *scn*, *chp*, *sak* et *sea/sep*, qui codent, respectivement, la protéine SCIN, la protéine CHIPS, la staphylokinase et l'entérotoxine A ou P. Sept types d'IEC ont été décrits en fonction de la combinaison des gènes de virulence présents. A noter, ces gènes de virulence sont notamment associés aux infections humaines ce qui est en adéquation avec les études ayant montrées que les prophages  $\phi$ Sa3 sont davantage présents dans les souches de colonisation/infections humaines qu'animales (Rohmer & Wolz, 2021). En effet, la transmission de *S. aureus* de l'humain à l'animal est corrélée à une perte des phages  $\phi$ Sa3, tandis que, lorsque la souche est transmise de l'animal à l'humain, ces phages sont de nouveau intégrés dans le génome. Similairement, une étude, menée sur 356 isolats de *S. aureus*, a montré que les gènes *sak* et *scn*, localisés dans l'IEC des phages  $\phi$ Sa3 (Figure 58), sont principalement associés à des isolats dont l'hôte est l'humain (Sassi *et al.*, 2022). Certaines souches portant ces gènes ont été isolées d'animaux, mais il s'agit généralement

de souches capables d'infecter à la fois les humains et les animaux. Le système *sprG1/sprF1* étant conservé chez de nombreuses souches de *S. aureus* (Pinel-Marie *et al.*, 2014) et présent dans le module de lyse au sein de l'IEC de plusieurs phages  $\phi$ Sa3 (Figure 58), cette localisation génétique pourrait jouer un rôle dans la stabilité du prophage et donc participer au maintien des gènes de virulence associés à un portage humain.



**Figure 58 : Organisation génétique de cinq prophages de la famille  $\phi$ Sa3 issus de différentes souches de *Staphylococcus aureus*.** (Adapté de Rohmer & Wolz, 2021).

Chez *Clostridioides difficile*, plusieurs expériences ont permis de démontrer l'implication de systèmes TA de type I (localisés dans des prophages) dans le maintien des éléments génétiques mobiles (plasmide, prophage) (Peltier *et al.*, 2020). De façon similaire, en se basant sur les techniques présentées dans ce travail, nous pourrions étudier le rôle du système SprG1/SprF1 dans le maintien des éléments génétiques mobiles. Une première expérience consistant à évaluer la stabilité d'un plasmide portant ou non le système SprG1/SprF1 pourrait être réalisée. Pour cela, les plasmides pCN33 vide (portant une cassette de résistance à l'érythromycine) ou contenant le locus *sprG1/sprF1* (pCN33-*sprG1/sprF1*) seront transformés dans la souche HG003  $\Delta$ *sprG1/sprF1*. Puis, après plusieurs sous-cultures de ces deux souches en absence d'érythromycine, les UFC seront dénombrées sur milieu avec ou sans érythromycine. La comparaison du nombre d'UFC obtenu pour le plasmide vide et le plasmide portant le système SprG1/SprF1, permettra de conclure quant à l'implication de ce système dans la stabilité des plasmides. Dans l'hypothèse où le système SprG1/SprF1 participe au maintien du plasmide, nous pourrions, comme récemment décrit dans la littérature (Fraikin & Van Melder, 2024), visualiser à l'échelle de la cellule si un mécanisme de PSK est bien lié à la perte du plasmide portant le système SprG1/SprF1. Par ailleurs, le rôle du système SprG1/SprF1 dans le maintien du prophage pourrait être étudié en suivant la perte du

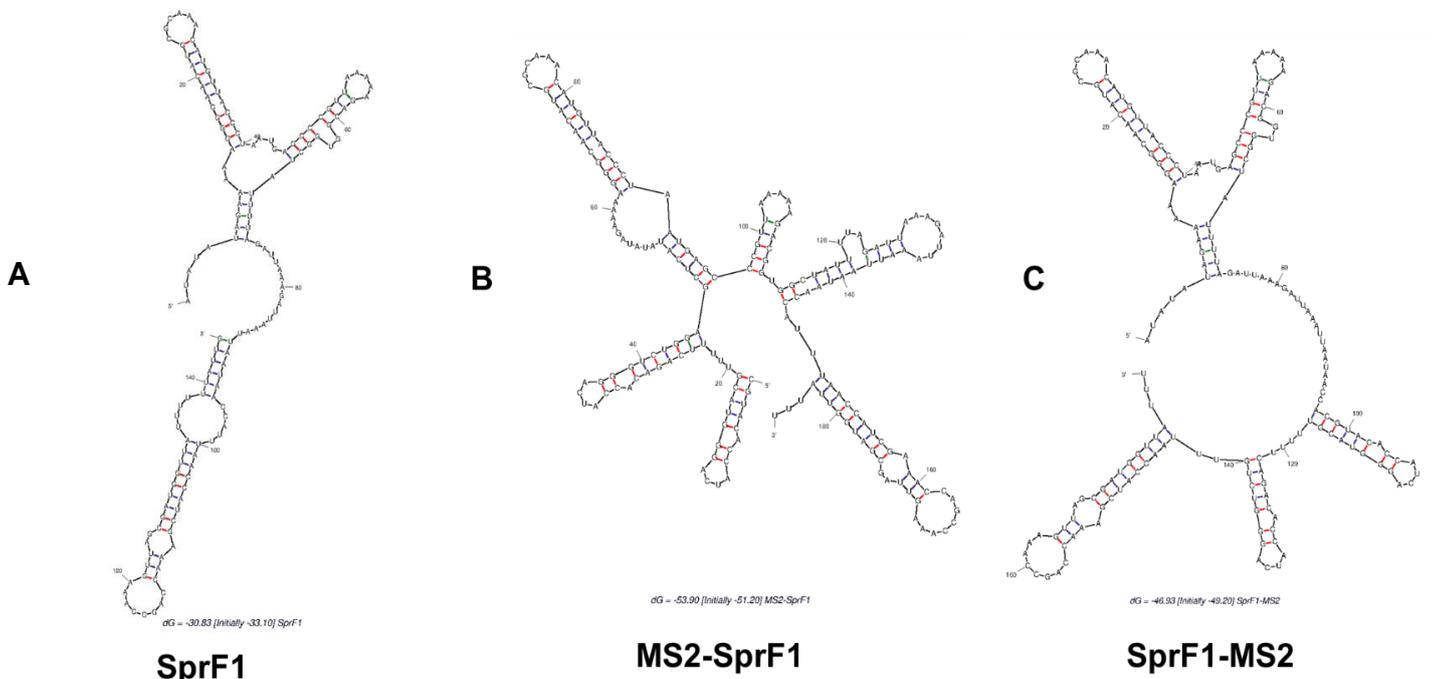
prophage. Dans ce but, un gène de résistance sera intégré dans le prophage  $\Phi 13$  délété ou non du locus *sprG1/sprF1* et la perte du prophage sera comparée, par dénombrement sur gélose, en induisant son excision *via* un plasmide portant le gène codant l'excisionase du prophage  $\Phi 13$ . A noter, le locus *sprG1/sprF1* est localisé dans le module de lyse du prophage (Figure 58), et les toxines SprG1 sont souvent annotées comme des « holin-like toxin », c'est-à-dire des toxines ressemblant aux endolysines produites par les phages et à l'origine de la lyse bactérienne (Cahill & Young, 2019). Ainsi, il serait intéressant d'étudier l'impact du système SprG1/SprF1 sur la lyse bactérienne. Pour cela, un traitement à la mitomycine C activant le cycle lytique du prophage  $\Phi 13$  (Rohmer *et al.*, 2022) permettra de comparer la lyse des souches délétées ou non du système SprG1/SprF1.

### SprF1, une antitoxine aux multiples cibles

Depuis environ trois décennies, les ARNreg, en interagissant avec leurs cibles ARN ou protéines, sont reconnus comme des acteurs clés dans la régulation fine de l'expression des gènes afin de permettre aux bactéries de s'adapter à leur environnement. Ainsi, de nombreuses études se sont intéressées à l'identification des cibles de ces ARNreg pour comprendre les mécanismes de régulation sous-jacents. Différentes stratégies peuvent être utilisées pour découvrir leurs cibles, comme les prédictions bio-informatiques ou les approches expérimentales (Menard *et al.*, 2022). Au niveau bio-informatique, les outils IntaRNA, RNAPredator, CopraRNA et TargetRNA2 peuvent permettre de rechercher *in silico* les cibles ARN d'un ARNreg. Cependant, en raison de la structure parfois complexe des ARNreg et du fait qu'ils peuvent interagir avec leur cible *via* un appariement de base imparfait, certaines cibles peuvent ne pas être identifiées tandis que d'autres résultats se révèlent être des faux positifs (Carrier *et al.*, 2016). Le développement d'approches expérimentales (MAPS, Hybrid-trap-seq) permettant d'identifier les cibles des ARNreg est donc devenu primordial pour surpasser ces limites. La technique MAPS consiste à fusionner un aptamère MS2 sur l'ARNreg d'intérêt puis à purifier par affinité sur colonne les complexes appât/cible *via* la protéine MS2-MBP (Lalaouna *et al.*, 2017). Plusieurs études utilisant le MAPS ont ainsi permis de découvrir les cibles d'ARNreg exprimés par des bactéries à Gram-négatif ou à Gram-positif. Par exemple, chez *E. coli*, sept nouveaux ARNm interagissant avec l'ARNreg GcvB ont été identifiés (Lalaouna, Eyraud, *et al.*, 2019) et, chez *S. aureus*, le MAPS a mis en évidence le targetome de l'ARNreg RsaA (Tomasini *et al.*, 2017) et RsaC (Lalaouna, Baude, *et al.*, 2019). Récemment, au sein du laboratoire, la technique MAPS a également été utilisée pour identifier de nouvelles cibles de l'ARNIII (Hallier *et al.*, 2024). Cette étude a montré que l'ARNIII peut se lier à l'ARNm *rpiRc*, ce qui augmente l'expression de la protéine RpiRc, un régulateur de la voie des pentoses phosphates. Pour identifier les cibles d'un ARNreg en utilisant l'Hybrid-trap-seq, l'ARN d'intérêt est produit par transcription *in vitro* et est ensuite biotinylé en 3' afin de

l'immobiliser sur des billes magnétiques conjuguées à la streptavidine. Puis, ces billes sont mélangées avec des ARN totaux extraits à partir de différentes conditions de culture. Après lavages des billes, les ARN cibles sont élués et séquencés. Cette technique a, par exemple, été utilisée pour identifier le targetome de RsaE chez *S. aureus* (Rochat *et al.*, 2018). Cependant, cette technique étant réalisée *ex vivo*, les interactions découvertes peuvent ne pas être physiologiquement pertinentes.

Etant donné que les antitoxines de type I sont des ARN non codants qui interagissent, par appariement de bases, avec l'ARNm codant leur toxine pour inhiber sa production, ces ARN pourraient être considérés comme des ARNreg. Dans ce travail, nous avons donc utilisé une approche *in silico* et expérimentale pour identifier les cibles moléculaires de l'antitoxine SprF1. Par la technique MAPS, nous avons mis en évidence 12 cibles ARNm (dont *sprG1*) complexées avec SprF1. A noter que, si l'article 2 présenté dans ce manuscrit est prochainement publié, nous aurons la primeur d'avoir identifié par la technique MAPS des cibles ARN d'une antitoxine de type I, autre que l'ARNm codant la toxine. Cependant, il ne faut pas oublier les limites de notre approche. En effet, la recherche des cibles a été réalisée uniquement en phase exponentielle de croissance et, nous avons donc pu passer à côté de cibles régulées par SprF1 en phase stationnaire de croissance ou dans des conditions de stress. Aussi, la présence d'un aptamère MS2, en 5' ou en 3', a pu modifier la structure de l'ARN SprF1 et donc empêcher son interaction avec certaines cibles ou, au contraire, favoriser des interactions non spécifiques (Figure 59).



**Figure 59 : Structures prédictives des ARN SprF1, MS2-SprF1 et SprF1-MS2.** Structures de SprF1(A), SprF1 fusionné à l'aptamère MS2 en 5' (B) et SprF1 fusionné à l'aptamère MS2 en 3' (C) prédites par l'outil Mfold.

Parmi les cibles identifiées en MAPS, nous avons choisi de se focaliser sur les ARNm *yidC* et *rpmE2*. Notre choix s'est porté sur ces deux cibles parce que l'ARNm *yidC* a été retrouvé à la fois dans les analyses *in silico* et dans le MAPS et l'ARNm *rpmE2* code une protéine ribosomale ce qui nous a paru pertinent du fait que SprF1 peut se fixer aux ribosomes. Dans un premier temps, nous avons montré que SprF1 est capable d'interagir avec ces deux ARNm *in vitro* par des expériences de retard sur gel. Nous avons ainsi observé que SprF1 a une meilleure affinité pour *yidC* que pour *rpmE2*. Ce résultat est cohérent avec les interactions prédites par IntaRNA puisque, l'énergie d'interaction prédite pour SprF1/*yidC* (-15,97 kcal/mol) est supérieure à celle prédite pour SprF1/*rpmE2* (-7,91 kcal/mol). Dans le cas de *rpmE2*, la délétion de la zone d'interaction avec SprF1 prédite par IntaRNA ne permet pas d'inhiber efficacement la formation d'un complexe SprF1/*rpmE2*. Ce résultat suggère qu'une autre région pourrait participer à cette interaction. De façon intéressante, en utilisant l'outil GLAM2, nous avons mis en évidence la présence d'un motif MEME permettant l'interaction de SprF1 avec ses cibles (**Article 2, Figure 1B**). Bien que ce motif ne soit pas présent dans la région d'interaction SprF1/*rpmE2* prédite par IntaRNA, nous avons identifié ce motif dans la région 5' de *rpmE2* (**Figure 60**). Des expériences de retard sur gel entre SprF1 et cette région 5' pourrait donc permettre d'étudier l'implication de ce motif MEME dans la formation du complexe SprF1/*rpmE2*.

```

+1 2182919
|
5'_GUAUUGGGUAAAAACUCACAAAUAACUCUGUUCAGAUGGUUCAGGGCAAAGGAGCUGAAAAUAAUGA
AACAAGGAUUUCAUCCUGAGUAUCACCAAGUAAUCUUUUUAGAUACUACUACAAACUUCAAAUUCUUAAGC
GGUUCUACAAAAACAUCUUCAGAAAUGAUGGAGUGGGAAGAUGGAAAAGAAUACCCAGUUUAUUCGUUUAG
AUUUUCAUCUGAUUCACAUCCAUUCUACACUGGACGUCAAAAUUCGUCUGCGGAUGGACGUGUGGA
ACGUUUCAACAAAAAGUUUGGUCUJAAAUCAAACAACJAAUAUAGUAAUCGUUAAGCUGUCUGCAUCCUA
UAAUGGAAUUGUAGACAGCUUUUUUAUU_3'
|
2182544

```

**Figure 60 : Séquence de l'ARNm *rpmE2*.** Le codon d'initiation de la traduction est surligné en bleu et le codon Stop en rose. La région d'interaction avec SprF1 prédite par IntaRNA est en rouge. Le motif MEME est en jaune.

Pour aller plus loin, nous avons aussi souhaité confirmer, *in vivo*, les interactions précédemment observées en utilisant un système rapporteur à double plasmides développé au laboratoire (Ivain *et al.*, 2017). Brièvement, cette technique consiste à transformer deux plasmides dans la bactérie étudiée. Le premier est un plasmide à fort nombre de copies portant la séquence de l'ARNreg d'intérêt (ici SprF1) sous le contrôle de son promoteur endogène. Le second est un plasmide à faible nombre de copies portant la séquence (5'UTR, codon d'initiation de la traduction et zone d'interaction prédite avec SprF1) de l'ARN cible (*yidC* ou

*rpmE2*) en fusion avec la séquence de la GFP (Green Fluorescent Protein) sous le contrôle d'un promoteur constitutif. Ainsi, si l'ARNreg d'intérêt interagit avec sa cible ARNm, une modification positive ou négative du niveau de fluorescence par rapport à un contrôle négatif ne surexprimant pas l'ARNreg étudié peut être observée. Cependant, après plusieurs tentatives, les plasmides portant la séquence de *yidC* ou *rpmE2* en fusion avec la séquence de la GFP n'ont pas pu être transformés dans *E. coli*, ce qui suggère une toxicité de ces constructions. Malgré leur interaction, SprF1 n'a pas d'effet sur le niveau de transcrite des ARNm *yidC* et *rpmE2* ce qui indique que cette interaction ne joue pas au niveau de la stabilité de ces ARNm. Ce résultat n'est néanmoins pas surprenant puisque, chez *S. aureus*, d'autres exemples montrent que l'interaction d'un ARNreg avec un ARNm n'a pas d'effet sur la stabilité mais uniquement sur la traduction de son ARNm cible : SprC/*atl*, SprD/*sbi*, ARNIII/*spa* (Tableau 2) (Bronsky *et al.*, 2016; Chabelskaya *et al.*, 2010; Le Pabic *et al.*, 2015). Nos expériences ont ainsi montré que SprF1 module l'expression des protéines YidC-FLAG et RpmE2-FLAG. La région d'interaction de SprF1 avec les ARNm *yidC* et *rpmE2* est localisée au niveau de la région codante de ces ARNm, région peu commune pour la régulation traductionnelle d'un ARNm. Cependant, ce type de régulation a déjà été décrit chez *E. coli* pour les ARNreg MicL (Guo, M-S. *et al.*, 2014) et DicF (Melson & Kendall, 2019). L'ARNreg MicL se fixe après le codon d'initiation (16 nucléotides en aval) de l'ORF portée par l'ARNm *lpp* et cette interaction cause une inhibition de la synthèse de la lipoprotéine Lpp. La fixation de DicF dans la séquence codante de l'ARNm *pchA* permet de délier une structure anti-RBS ce qui favorise l'expression du régulateur transcriptionnel PchA. A noter, la présence d'une séquence *flag* en fusion avec la séquence codante de *yidC* ou *rpmE2* pourrait causer une modification de la structure de ces ARNm et, par conséquent, perturber l'interaction de SprF1 avec ces deux cibles.

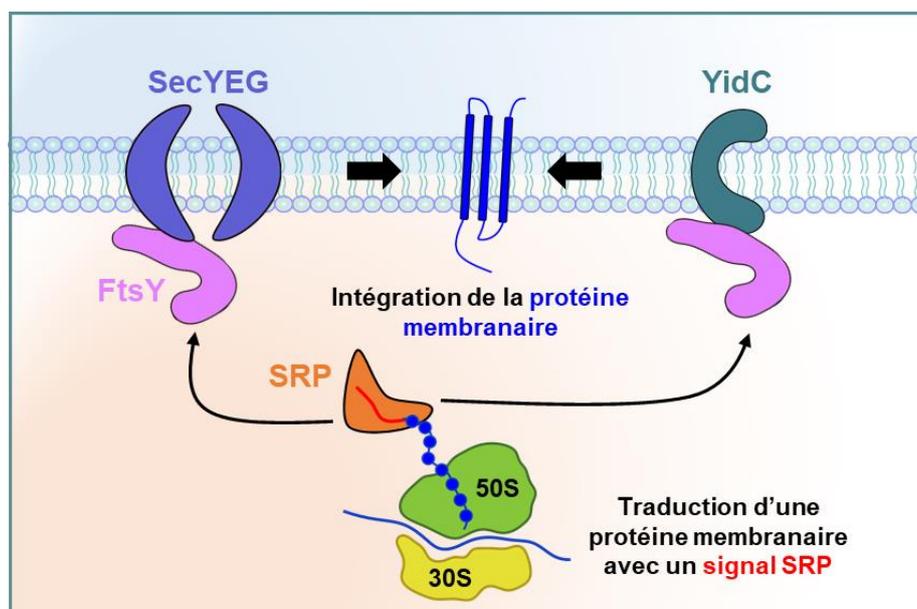
En plus des ARNm *yidC* et *rpmE2*, les analyses MAPS et *in silico* ont mis en évidence plusieurs cibles en lien avec le métabolisme du fer. Par exemple, l'ARN SAOUHSC\_01504, codant une ferredoxine, est une cible identifiée en MAPS. Les analyses *in silico* ont, quant à elles, prédit une interaction de SprF1 avec l'ARNm *fhuG* qui code un transporteur de fer de la famille des transporteurs ABC. Ces données suggèrent donc un lien potentiel entre la disponibilité en fer et SprF1. Il serait intéressant de comparer le niveau de transcrite de l'ARN SprF1 et la croissance de souches présentant différents niveaux de SprF1 en condition de croissance classique et en condition de carence en fer (par exemple en ajoutant un chélateur du fer comme le 2,2'-Bipyridine). Ces analyses nous permettront peut-être de mieux comprendre la régulation de l'expression de SprF1 et d'identifier une nouvelle fonction biologique pour SprF1. Une autre cible mise en évidence par le MAPS est l'ARNm *fusA* qui code le facteur d'élongation EF-G impliqué dans la translocation du ribosome (Tableau 5).

Selon le logiciel IntaRNA, SprF1 interagit avec *fusA* avec une énergie de -10,36 kcal/mol. Etant donné que SprF1 peut causer une atténuation de la traduction, son interaction avec un ARNm codant un facteur d'élongation de la traduction pourrait participer à ce phénotype. A l'avenir, il serait donc intéressant d'étudier la potentielle régulation de *fusA* par SprF1.

En parallèle de l'identification des cibles ARNm, nous avons également utilisé le MAPS pour rechercher les cibles protéiques de SprF1. Deux bandes protéiques enrichies dans la condition SprF1-MS2 par rapport à la condition MS2 contrôle ont ainsi été identifiées, par spectrométrie de masse, comme étant la sous-unité  $\beta$  de l'ARN polymérase (RpoB). Nous ne sommes, cependant, pas allés plus loin dans cette analyse. A noter, en s'intéressant davantage au gel présentant les protéines éluées de la colonne d'affinité du MAPS (**Figure 56**), nous pouvons observer qu'une autre protéine localisée vers 37 kDa est enrichie dans la condition SprF1-MS2 par rapport à la condition MS2 contrôle. Une analyse par spectrométrie de masse permettrait d'identifier cette protéine. Cette dernière pourrait, par exemple, être une protéine chaperonne nécessaire à la stabilisation des complexes de SprF1 avec ses cibles ARNm. En effet, les protéines liant les ARN (RBP), comme la protéine chaperonne Hfq ([Santiago-Frangos & Woodson, 2018](#)), permettent de faciliter l'appariement d'un ARNreg avec sa cible. Chez les bactéries à Gram-positif, les RBP sont peu caractérisées. Néanmoins, une étude a permis l'identification de plusieurs RBP putatives chez *S. aureus* ([Chu et al., 2022](#)). Les auteurs ont ainsi suggéré qu'en interagissant avec des ARNm ou ARNreg, dont SprC, le facteur transcriptionnel CcpA régule leur stabilité. Ainsi, découvrir une protéine liant SprF1 pourrait permettre d'expliquer pourquoi nous n'avons pas été en mesure de déterminer un Kd pour l'interaction de SprF1 avec *rpmE2* *in vitro*.

### **yidC, une cible de SprF1**

*yidC*, cible ARNm de SprF1 identifiée à la fois par la technique MAPS et par les analyses *in silico*, code une protéine insertase. Cette dernière est impliquée dans l'intégration des protéines à la membrane ce qui permet à la bactérie de moduler sa composition protéique membranaire pour s'adapter à son environnement ([Oswald et al., 2021](#)). L'intégration des protéines à la membrane peut également se faire *via* le translocon SecYEG. En effet, lorsqu'elles sont traduites, les protéines membranaires contiennent une séquence signal reconnue par la protéine SRP (Signal recognition particle). Après sa fixation à cette séquence signal, SRP interagit avec la protéine FtsY pour permettre l'intégration de la protéine dans la membrane par le translocon SecYEG ou par l'insertase YidC. Ces deux systèmes peuvent aussi collaborer pour intégrer certaines protéines membranaires (**Figure 61**).



**Figure 61 : Représentation schématique de l'intégration des protéines membranaires via le translocon SecYEG ou l'insertase YidC.** (D'après Oswald *et al.*, 2021).

En plus de *yidC*, l'ARNm *secY*, codant la protéine SecY, a aussi été identifié par l'analyse MAPS (enrichissement de 3.33 dans la condition WT-SprF1-MS2 et énergie d'interaction prédite de -7,49 kcal/mol). Ces résultats suggèrent que SprF1 pourrait donc participer à la régulation des systèmes impliqués dans l'intégration des protéines membranaires. De façon intéressante, à l'exception des toxines SymE et RaiR qui sont cytoplasmiques, les toxines des systèmes TA de type I (dont SprG1) sont des toxines membranaires (Brielle *et al.*, 2016; Nonin-Lecomte *et al.*, 2021). L'intégration de ces toxines à la membrane semble se faire directement sans l'aide d'un système d'intégration comme le translocon SecYEG ou l'insertase YidC. Pourtant, une étude a montré que, chez *Salmonella Typhimurium*, la toxine de type I TimP contient une séquence signal pouvant permettre son intégration membranaire par le translocon SecYEG (Andresen *et al.*, 2020). Ainsi, dans l'hypothèse où SprG1 contient une séquence signal, SprF1, en régulant *secY* et/ou *yidC*, pourrait contrôler l'intégration membranaire de sa toxine.

### ***rpmE2* et la tolérance aux antibiotiques**

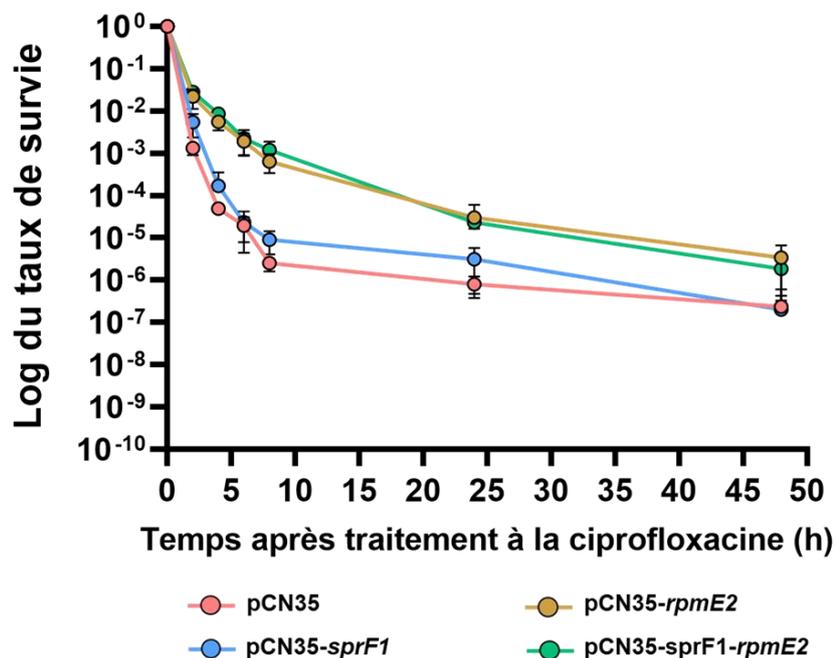
Une autre cible de SprF1 étudiée dans ce travail est l'ARNm *rpmE2* qui code la protéine RpmE2, une protéine ribosomale de la sous unité 50S. Après avoir montré que SprF1 est capable d'interagir avec *rpmE2*, nous avons cherché à identifier le rôle physiologique de cette interaction. Du fait que l'ARNm *rpmE2* code une protéine ribosomale et que SprF1 peut interagir avec les ribosomes pour favoriser la formation de bactéries persistantes, nous avons analysé l'effet de *rpmE2* sur la persistance/tolérance aux antibiotiques (ciprofloxacine et cloxacilline) par des expériences de survie. *rpmE2* étant un gène essentiel, ces expériences ont été réalisées en condition de surexpression de *rpmE2*. Par ces analyses, nous avons

observé une augmentation de la fraction des bactéries capables de survivre aux antibiotiques lorsque *rpmE2* est surexprimé. Pour les souches HG003 WT et  $\Delta sprG1/sprF1$ , les courbes biphasiques de survie à la ciprofloxacine sont caractéristiques de la présence de persisters dans une population. En revanche, pour les souches surexprimant *rpmE2*, les courbes de survie obtenues suggèrent plutôt de la tolérance aux antibiotiques. Un premier paramètre pouvant nous permettre de discriminer entre tolérance et persistance est la valeur de  $MDK_{99}$ . Cette valeur est généralement identique entre les bactéries sensibles et persistantes à un antibiotique tandis qu'elle est plus élevée pour des bactéries tolérantes (**Figure 23**) (Balaban *et al.*, 2019). Dans notre cas, la valeur de  $MDK_{99}$  des souches surexprimant *rpmE2* est plus élevée que celle des bactéries contrôles, ce qui suggère que nous sommes en présence d'un phénotype de tolérance. Cependant, certaines courbes de survie, comme celle obtenue pour le mutant *shpAB1* chez *Salmonella* Typhimurium (Michaux *et al.*, 2022), peuvent être caractéristiques d'un phénomène de tolérance alors que, finalement, une sous-population de persisters est présente dans la population étudiée. Ainsi, nous avons pour projet de réaliser des expériences de dilution de fluorescence pour analyser la présence/absence de persisters chez les souches surexprimant *rpmE2* (**Figure 24**).

Afin de réaliser ces expériences, nous souhaitons utiliser le plasmide pALC2084. Ce dernier porte le gène codant la GFP sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'aTc et a déjà permis de réaliser des expériences de dilution de fluorescence chez *S. aureus* (Peyrusson *et al.*, 2020). Du fait que ce plasmide porte un gène de résistance au chloramphénicol, comme celui porté par le plasmide pCN35-*rpmE2*, il faudra, dans un premier temps, modifier la cassette de résistance de l'un de ces deux plasmides avant de pouvoir les co-transformer dans les souches surexprimant ou non *rpmE2*. Puis, pour l'expérience de dilution de fluorescence, les souches contenant le plasmide pALC2084, en combinaison avec le plasmide pCN35 ou pCN35-*rpmE2*, seront cultivées sur la nuit en présence d'aTc afin d'induire l'expression de la GFP. Les bactéries seront ensuite lavées pour retirer l'inducteur et des échantillons seront prélevés à différents temps de croissance afin d'observer la dilution du signal de fluorescence par cytométrie en flux. Comme montré sur la **Figure 24** (p.54), le nombre de pic visible sur les graphiques de cytométrie en flux permettra de discriminer entre tolérance et persistance pour les bactéries surexprimant *rpmE2*.

Contrairement à ce qui a été observé pour la souche N315 de *S. aureus* (Pinel-Marie *et al.*, 2021), nos analyses réalisées sur la souche HG003 n'ont pas mis en évidence un effet de la délétion de *sprG1/sprF1* sur la persistance à la ciprofloxacine (**Article 2, Figure 6**). En revanche, nous avons observé une tendance à l'augmentation de la survie des bactéries 24h après traitement à la ciprofloxacine en condition de surexpression de SprF1 (**Figure 62**), comme précédemment décrit (Pinel-Marie *et al.*, 2021). Les souches N315 et HG003 ne

possédant pas le même contexte génétique (différences précédemment évoquées dans cette discussion), cela pourrait expliquer les différences observées.



**Figure 62 : Courbes de survie à la ciprofloxacine.** La survie des souches HG003 WT portant le plasmide pCN35, pCN35-*sprF1*, pCN35-*rpmE2* ou pCN35-*sprF1-rpmE2* a été analysée après traitement à la ciprofloxacine (100X CMI) (n = 3).

Par ailleurs, malgré l'interaction de SprF1 avec *rpmE2*, les courbes de survie obtenues en condition de surexpression de *rpmE2* sont similaires pour les souches HG003 WT et  $\Delta sprG1/sprF1$ . Ces résultats suggèrent que SprF1 n'a pas d'effet sur le phénotype de tolérance induit par *rpmE2*. A noter, dans nos conditions expérimentales, *rpmE2* est exprimé à partir d'un plasmide à fort nombre de copies tandis que *sprF1* est exprimé à partir du chromosome. Nous avons donc émis l'hypothèse que SprF1 était en quantité insuffisante pour réguler *rpmE2*. Pour pallier ce biais, nous avons utilisé un plasmide qui surexprime à la fois *sprF1* et *rpmE2* (pCN35-*sprF1-rpmE2*). Cependant, les courbes de survie à la ciprofloxacine, des souches portant le plasmide pCN35-*rpmE2* ou pCN35-*sprF1-rpmE2*, sont superposables ce qui ne permet pas de montrer un lien entre le complexe SprF1/*rpmE2* et la tolérance induite par *rpmE2* (Figure 62).

Suite à ces analyses, nous nous sommes demandé quel était le lien entre la surexpression de *rpmE2* et la tolérance aux antibiotiques. Chez *E. coli*, une étude a montré que RpmE2 favorise la formation de ribosomes 100S, ribosomes pouvant être responsables de l'émergence de persisters. Chez *S. aureus*, les ribosomes 100S sont davantage présents en phase exponentielle de croissance et la dimérisation des ribosomes 70S est médiée par la

protéine HPF. Nous avons donc analysé les profils des ribosomes présents chez les souches HG003 WT portant le plasmide pCN35 ou pCN35-*rpmE2* en phase exponentielle de croissance. Sur nos profils, après avoir identifié les pics correspondant aux ribosomes 30S, 50S et 70S et par comparaison avec un protocole précédemment publié (Basu & Yap, 2016), nous avons déduit la localisation du pic correspondant aux ribosomes 100S. Aucune différence de formation des ribosomes 100S n'a pu être observée entre les deux souches étudiées. Cependant, des expériences de microscopie électronique à transmission après coloration négative seront nécessaires pour s'assurer que nous avons bien identifié le pic correspondant aux ribosomes 100S. Aussi, nous pourrions valider la présence des ribosomes 100S par western blot, à l'aide d'un anticorps anti-HPF, puisque le facteur d'hibernation HPF est responsable de la dimérisation des ribosomes 70S chez *S. aureus* (Figure 26). A noter, nos données ne réfutent pas l'hypothèse que les ribosomes 100S sont impliqués dans le phénotype de tolérance induit par la surexpression de RpmE2. Cette éventualité pourrait être étudiée en réalisant des expériences de fractionnement des ribosomes en condition de tolérance aux antibiotiques. Pour aller plus loin dans l'identification d'un lien potentiel entre RpmE2 et l'hibernation des ribosomes, nous pourrions analyser l'effet de la surexpression de *rpmE2* sur la tolérance aux antibiotiques chez une souche délétée du gène codant le facteur d'hibernation HPF. Par exemple, chez *E. coli*, une étude a montré que le phénotype de persistance induit par la surexpression de *hipA* est diminué lorsque cette surexpression se fait dans une souche délétée du gène *sra* ou *raiA*, gènes codant des protéines impliquées dans l'hibernation des ribosomes (Semanjski et al., 2021).

Bien que SprF1 interagit avec *rpmE2* au niveau ARN, il est possible d'envisager que SprF1 pourrait aussi interagir avec la protéine RpmE2 et que cette interaction permettrait le recrutement de SprF1 au ribosome. Pour étudier cette hypothèse, les ARN présents dans les différents pics ribosomiaux seront extraits et analysés par northern blot. En utilisant une sonde radiomarquée spécifique de SprF1, l'abondance de SprF1 dans les fractions ribosomiales des souches HG003 WT + pCN35 ou WT + pCN35-*rpmE2* sera observée. Une augmentation de la présence de SprF1 dans les ribosomes de la souche surexprimant *rpmE2* conforterait notre hypothèse. Finalement, nous n'avons pas réussi à comprendre le lien entre la surexpression de *rpmE2* et la tolérance aux antibiotiques. Nous envisageons donc de comparer le protéome des souches WT + pCN35 et WT + pCN35-*rpmE2*. Ces expériences, en mettant en évidence des protéines différenciellement exprimées en condition de surexpression de *rpmE2*, pourraient nous permettre d'identifier les voies de signalisation impliquées dans ce phénotype de tolérance.

Dans ce travail, les courbes de survie montrant l'augmentation de la fraction des bactéries capables de survivre aux antibiotiques ont été réalisées en condition de

surexpression de *rpmE2*. Il est important de noter que la surexpression d'une protéine *via* un plasmide peut être critiquable. En effet, des protéines, pourtant non toxiques, peuvent être à l'origine d'une augmentation de la persistance aux antibiotiques lorsqu'elles sont surexprimées (Vázquez-Laslop *et al.*, 2006). Ces données suggèrent donc que, dans certains cas, c'est la surexpression qui est à l'origine de la persistance/tolérance et non pas directement la protéine surexprimée. La surexpression d'une protéine peut, par exemple, interférer avec le métabolisme de la bactérie et entraîner une situation de stress (e.g. carence en acides aminés) (Hoffmann & Rinas, 2004). De plus, des études ont montré que la surexpression de toxines issues de systèmes TA, comme par exemple la surexpression de HipA ou RelE (Falla & Chopra, 1998; Keren *et al.*, 2004), entraîne une augmentation de la persistance aux antibiotiques. Pourtant, la délétion de ces systèmes TA n'a souvent pas d'effet sur la persistance aux antibiotiques ce qui cause des débats concernant l'implication des systèmes TA dans la persistance. Ainsi, nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse que la tolérance induite par *rpmE2* n'est pas spécifiquement causée par *rpmE2* mais par un stress dû à sa surexpression.

### SprG1/SprF1 : rôle dans la pathogénie de *S. aureus* et perspectives thérapeutiques

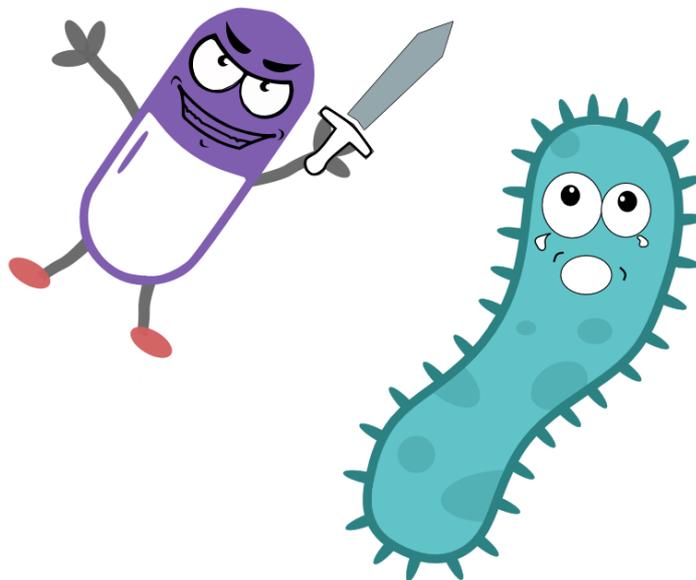
Les systèmes TA sont abondants chez les pathogènes et plusieurs études ont montré qu'ils pouvaient participer à la pathogénie bactérienne, notamment *via* la formation de biofilms, le maintien d'éléments génétiques mobiles portant des gènes de virulence/résistance et la survie dans les cellules de l'hôte (Sonika *et al.*, 2023). Chez *Salmonella* Typhimurium, il a par exemple été montré que des systèmes TA de type II participent à la formation de persisters intracellulaires (Helaine *et al.*, 2014). *S. aureus*, pathogène humain responsable d'un large panel d'infections, est capable de survivre dans les cellules phagocytaires professionnelles et non professionnelles ce qui favorise la rechute des infections. De façon intéressante, le niveau de transcrite de *sprG1* et SprF1 est diminué après internalisation dans les macrophages (Riffaud *et al.*, 2019). L'environnement intracellulaire étant propice à la formation des persisters, nous envisageons donc d'étudier l'impact du système SprG1/SprF1, en particulier celui de SprF1, sur l'internalisation et la survie intracellulaire. Pour cela, des modèles d'infections *in vitro* (macrophages, ostéoblastes) seront mis en place afin de comparer l'internalisation et la survie, en absence ou en présence d'antibiotiques, des souches HG003 parentale, délétée du système SprG1/SprF1 ou surexprimant SprF1. De même, des évidences expérimentales nous orientent vers une implication des peptides SprG1<sub>31</sub> et SprG1<sub>44</sub> dans la virulence de *S. aureus*. En effet, il a été démontré par l'équipe que les peptides SprG1<sub>31</sub> et SprG1<sub>44</sub> sont excrétés et capables de lyser les bactéries compétitrices et les érythrocytes humains (Pinel-Marie *et al.*, 2014). De plus, nous avons mis en évidence un niveau plus important de protéines cytoplasmiques dans le milieu extracellulaire pour la souche N315 WT

comparée à la souche N315 délétée ou complémentée par SprF1 en phase stationnaire de croissance (Chlebicka *et al.*, 2021). Nos résultats semblent indiquer que la présence des peptides SprG1<sub>31</sub> et SprG1<sub>44</sub> favorise la libération de protéines cytoplasmiques, phénomène encore mal compris mais contribuant à la pathogénie de *S. aureus* (Ebner *et al.*, 2016). De par la présence des peptides SprG1<sub>31</sub> et SprG1<sub>44</sub> à la membrane de *S. aureus*, nous pouvons émettre l'hypothèse que les peptides pourraient être véhiculés par des vésicules extracellulaires pour exercer leurs activités cytolitiques. La présence des peptides au sein des vésicules extracellulaires de *S. aureus* vient d'être validée en collaboration avec l'équipe du Dr Eric GUEDON de l'INRAE de Rennes (données non publiées). Il serait intéressant d'analyser l'effet des vésicules extracellulaires purifiées à partir des souches WT, délétée et complémentée du système SprG1/SprF1 sur la viabilité et la réponse des cellules de l'hôte (macrophages, cellules épithéliales bronchiques, ostéoblastes...). Les résultats de ces expériences *in vitro* pourront ensuite être vérifiés *in vivo* sur un ou plusieurs modèles d'infections à *S. aureus* mis au point au laboratoire : modèle invertébré *Galleria mellonella* (Ménard *et al.*, 2021) ou modèles murins (Mascary *et al.*, 2024; Nicolas *et al.*, 2019). Ces modèles permettront d'étudier l'implication du système SprG1/SprF1 dans la virulence de *S. aureus*.

Les infections bactériennes sont considérées comme l'une des principales causes de mortalité humaine à travers le monde. Ces dernières années, les systèmes TA sont apparus comme des cibles thérapeutiques prometteuses du fait de leur abondance dans les génomes bactériens et de leur absence dans les génomes eucaryotes (Lee & Lee, 2016). L'une des stratégies envisagées consiste à activer artificiellement la toxine, par exemple, en empêchant son interaction avec son antitoxine, afin de causer la mort des bactéries. L'utilisation de peptides antimicrobiens synthétiques dérivés de toxines issues de systèmes TA est également possible. Au sein du laboratoire, Pep16 et Pep19, deux peptides dérivés de la toxine de type I SprA1 de *S. aureus*, ont montré leur efficacité contre, par exemple, des souches MRSA (Nicolas *et al.*, 2019; Solecki *et al.*, 2015). Aussi, en se basant sur la structure de la toxine ParE d'*E. coli*, de nouveaux inhibiteurs des topoisomérases bactériennes ont pu être développés (Barbosa *et al.*, 2012). Dans le cas du système SprG1/SprF1, la surexpression des toxines SprG1<sub>31</sub> et SprG1<sub>44</sub> induit une dépolarisation puis une perméabilisation membranaire ce qui entraîne la mort des bactéries (Fermon *et al.*, 2023). Cependant, ces toxines ayant une activité hémolytique contre les érythrocytes humains (Pinel-Marie *et al.*, 2014), des modifications seraient nécessaires avant d'envisager de les utiliser comme peptides antimicrobiens. Par ailleurs, des inhibiteurs (ARN antisens, PNA (Peptide Nucleic Acids)) ciblant l'ARN SprF1 pourraient permettre de bloquer son interaction (1) avec l'ARNm *sprG1* dans le but de favoriser la production des peptides SprG1<sub>31</sub> et SprG1<sub>44</sub> pour tuer *S.*

*aureus*, (2) avec les ribosomes afin d'empêcher la formation de bactéries persistantes aux antibiotiques et (3) avec l'ARNm *rpmE2* puisque l'expression de RpmE2 est favorisée par SprF1 et que RpmE2 est, dans certaines conditions, impliqué dans la tolérance aux antibiotiques. La faisabilité de cette approche a, par exemple, été démontrée chez *E. coli* puisqu'un défaut de croissance est observé lorsque l'expression des antitoxines *mazE* et *hipB* est inhibée par des PNA (Równicki *et al.*, 2018). Aussi, chez *P. aeruginosa* (Al Hussein *et al.*, 2021) et *E. coli* (Nazari *et al.*, 2024), l'utilisation de PNA ciblant l'ARNm codant la toxine de type II MqsR a permis de limiter la formation de persisters causée par la surexpression de *mqsR*.

A terme, ces travaux de recherche visant à décortiquer le fonctionnement du système TA de type I SprG1/SprF1 pourraient donc permettre de développer de nouveaux traitements afin d'enrichir l'arsenal thérapeutique disponible pour lutter contre les infections à *S. aureus*.



**GAME OVER**



---

# Communications

---

## Communications orales

**Octobre 2022**  
Montpellier

**17<sup>e</sup> congrès national de la Société Française de microbiologie**

**MICROBES 2022 « La microbiologie dans tous ses états »**

**Titre :** Deciphering the RNA targetome of SprF1 antitoxin to elucidate its role in *Staphylococcus aureus* antibiotic persistence.

**Décembre 2022**  
Paris

**42<sup>e</sup> Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse**

**Session : Mécanismes moléculaires de l'antibiorésistance**

**Titre :** Deciphering the RNA targetome of SprF1 antitoxin to elucidate its role in *Staphylococcus aureus* antibiotic persistence.

**Janvier 2023**  
Rennes

**12<sup>e</sup> Journée recherche de l'UFR de pharmacie de l'Université de Rennes**

**Titre :** Deciphering the RNA targetome of SprF1 antitoxin to elucidate its role in *Staphylococcus aureus* antibiotic persistence.

**Septembre 2023**  
Guerlédan

**Journées de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé**

**Titre :** *rpmE2* and *yidC*, two novel mRNA targets of the multifaceted *Staphylococcus aureus* SprF1 antitoxin: Do these interactions contribute to SprF1-mediated antibiotic persistence? (en anglais)

**Octobre 2023**  
Rennes

**18<sup>e</sup> congrès national de la Société Française de microbiologie**

**MICROBES 2023 « Un monde à explorer »**

**Session : Antimicrobial resistance and virulence**

**Titre :** *rpmE2* and *yidC*, two novel mRNA targets of the multifaceted *Staphylococcus aureus* SprF1 antitoxin: Do these interactions contribute to SprF1-mediated antibiotic persistence? (en anglais)

## Communications par affiches

Septembre 2021

Nantes

POSTER 1

16<sup>e</sup> congrès national de la Société Française de microbiologie

**MICROBES 2021 « ...mille lieux au cœur de la microbiologie »**

**Titre :** Insights into the structure, the mechanism of action and the biological function of two type I toxins expressed by *Staphylococcus aureus*.

Janvier 2022

Rennes

POSTER 2

11<sup>e</sup> Journée recherche de l'UFR de pharmacie de l'Université de Rennes 1

**Titre :** Implementation of MAPS technology to identify the molecular targets of SprF1 antitoxin RNA and its role in *Staphylococcus aureus* antibiotic persistence.

Octobre 2022

Montpellier

POSTER 3

17<sup>e</sup> congrès national de la Société Française de microbiologie

**MICROBES 2022 « La microbiologie dans tous ses états »**

**Titre :** Deciphering the RNA targetome of SprF1 antitoxin to elucidate its role in *Staphylococcus aureus* antibiotic persistence.- [Prix poster](#)



Juillet 2023

Hambourg

POSTER 4

10<sup>e</sup> congrès de la Société Européenne de microbiologie

**Titre :** Deciphering the *Staphylococcus aureus* SprF1 antitoxin RNA targetome to understand its contribution to antibiotic persistence.

Obtention d'une bourse FEMS pour participer au congrès.



Novembre 2023

Lyon

POSTER 5

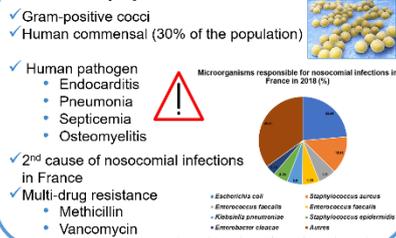
Colloque STAPHOSIUM

**Titre :** *rpmE2* and *yidC*, two novel mRNA targets of the multifaceted *Staphylococcus aureus* SprF1 antitoxin: Do these interactions contribute to SprF1-mediated antibiotic persistence?

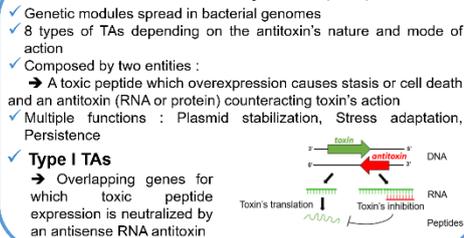
## Insights into the structure, the mechanism of action and the biological function of two type I toxins expressed by *Staphylococcus aureus*

Laurence Fermon<sup>a,b</sup>, Emeline Ostyn<sup>a,b</sup>, Sylvie Nonin-Lecomte<sup>c</sup>, Soizic Chevañe<sup>a</sup>, Arnaud Bondon<sup>a</sup>, Yoann Augagneur<sup>b</sup>, Marie-Laure Pinel-Marie<sup>b</sup>  
<sup>a</sup> CNRS, ISCR-UMR 6226, Université de Rennes 1, Rennes, France, <sup>b</sup> INSERM U1230 BRM, Université de Rennes 1, Rennes, France, <sup>c</sup> CNRS, UMR 8038, Université de Paris Descartes, Paris, France  
 \* The authors contributed equally to the work

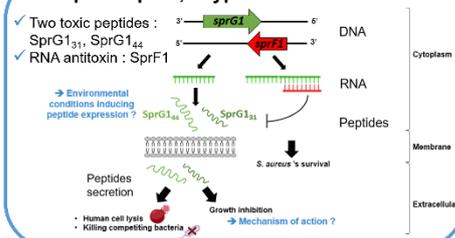
### *Staphylococcus aureus*



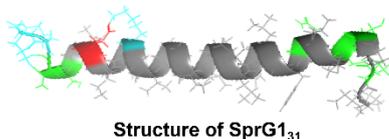
### Toxin-antitoxin systems (TAs)



### SprG1/SprF1, a type I TAs in *S. aureus*



### Two potential transmembrane $\alpha$ -helical peptides...

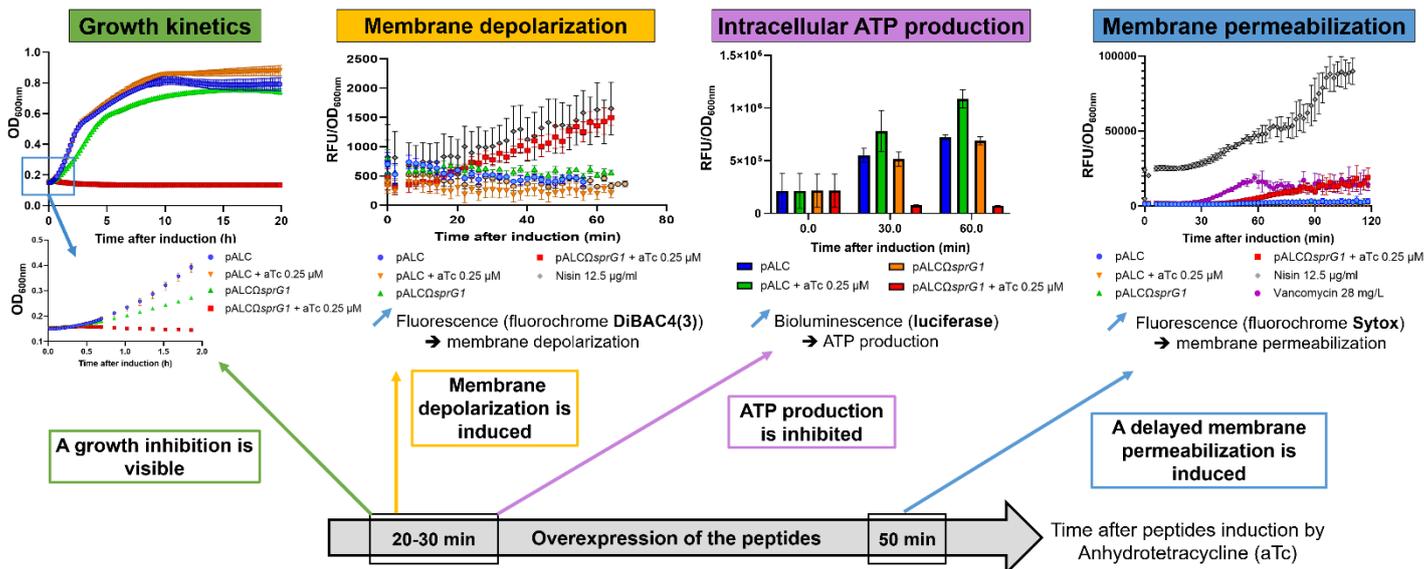


Toxins	Size (aas)	Amino acids sequence with the $\alpha$ -helical transmembrane domain
SprG1 <sub>31</sub>	31	MITISTMLQFGLFLIALIGLVIKLI ELSNKK
SprG1 <sub>44</sub>	44	MVALLKSLERRRLMITISTMLQFGLFLIALIGLVIKLI ELSNKK

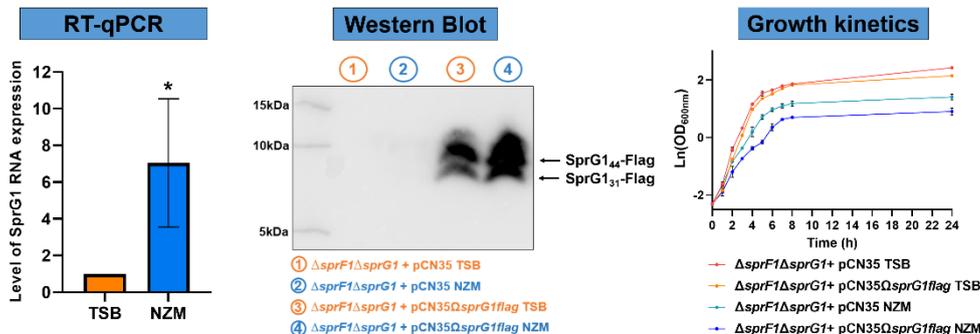
### NMR

SprG1<sub>31</sub> and SprG1<sub>44</sub> are structured in a single  $\alpha$ -helix, predicted to be a transmembrane domain

### ...interacting with the bacterial membrane to inhibit bacteria growth after overexpression...



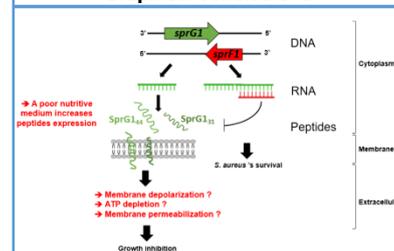
### ... and expressed under nutritive starvation.



SprG1<sub>31</sub> and SprG1<sub>44</sub> are two  $\alpha$ -helical structured peptides localized at the *S. aureus* membrane. When they are overexpressed, they inhibit bacterial growth in association with a membrane depolarization and ATP depletion. About 1h after induction, the simultaneous overexpression of both peptides causes a membrane permeabilization. Moreover, in this study we show that SprG1 mRNA and peptides levels are increased under a nutritive starvation. We could hypothesize that the peptides slow down bacterial metabolism by depolarizing the membrane and depleting ATP to survive under this harsh environmental condition.

Under nutritive starvation (NZM medium), SprG1 mRNA and peptides are overexpressed leading to a growth retardation

### Graphical conclusions



### Staphylococcus aureus

- Gram-positive cocci
- Human commensal (30% of the population)
- Human pathogen:
  - Meningitis
  - Endocarditis
  - Pyolophritis
  - Osteomyelitis
  - Skin infections
  - Pneumonia
  - Toxic shock syndrome
- 2<sup>nd</sup> cause of nosocomial infections in France
- Microorganisms responsible for nosocomial infections in France in 2018 (%)
  - 5.39
  - 1.78
  - 5.6
  - 6.5
  - 23.59
  - 13.83
- Antibiotics resistance → Methicillin, Vancomycin
- Persistent bacteria

### What are persistent bacteria?

- Subpopulation of transiently antibiotic-tolerant slow-growing bacteria that can resume growth after a lethal stress
- Various signals induce persistence:
  - pH variation
  - Starvation
  - Stringent response
  - Stress response
  - Antibiotics
  - Oxidative stress

### What are Toxin-Antitoxin (TA) systems?

- 8 types of TA systems composed by 2 entities → A toxin (RNA or protein) whose overexpression causes stasis or cell death and an antitoxin (RNA or protein) counteracting toxin's action
- Multiple functions → Plasmid maintenance, Stress adaptation, Antibiotic persistence

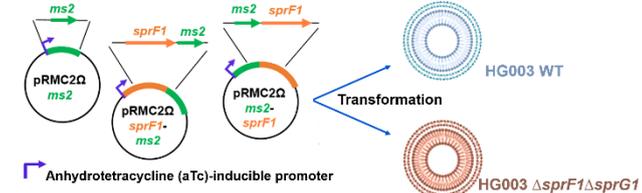
### SprG1/SprF1, a TA system in *S. aureus*

- Type I TA system
- SprF1 → RNA antitoxin
- SprG1 → Peptide toxin
- SprF1, an RNA antitoxin with dual function<sup>1</sup>:
  - SprF1 impairs global translation
  - SprF1 prevents SprG1 encoded toxin translation

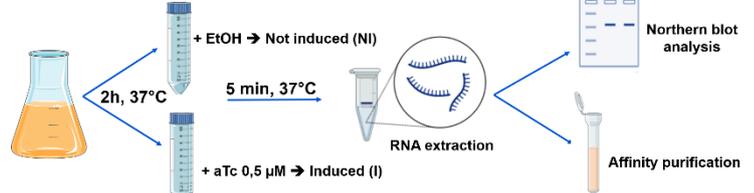
AIM → Identify SprF1 novel molecular targets using MAPS approach to better understand its role in antibiotic persistence

## Experimental procedures

### 1- Bacterial strains construction (*S. aureus* HG003):



### 2- Induction of MS2 RNA constructs by aTc:

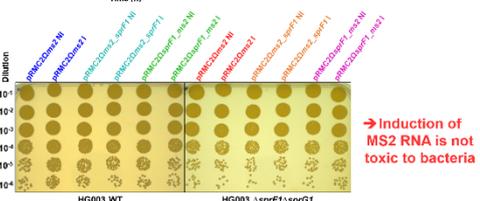
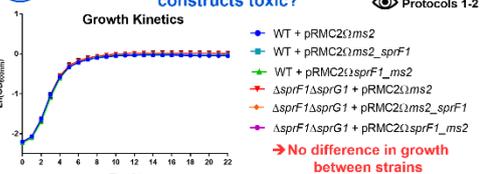


### 3- MS2-affinity purification coupled with RNA sequencing (MAPS) technology<sup>2</sup>:

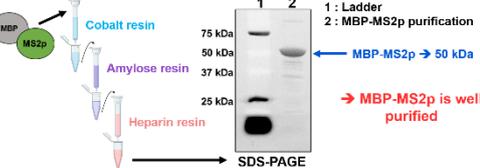


## Results

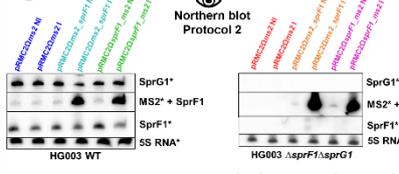
### 1 Are plasmids used and induction of MS2 RNA constructs toxic?



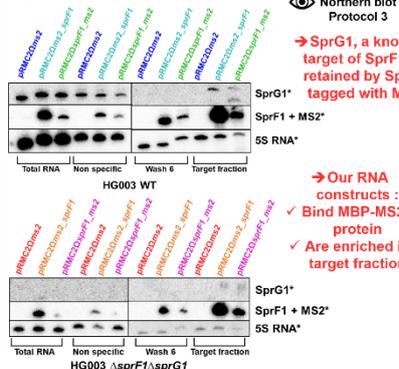
### 2 MBP-MS2p purification to perform MAPS approach



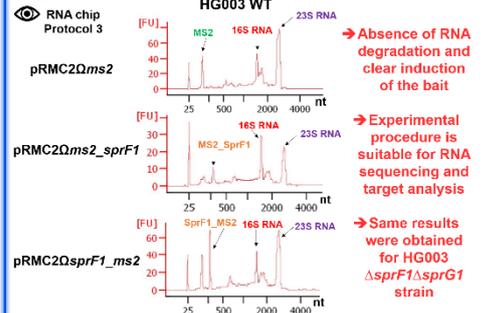
### 3 Are MS2 RNA constructs induced by aTc?



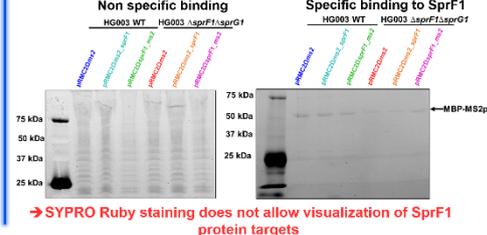
### 4 Does MS2 aptamer bind MBP-MS2p protein?



### 5 RNA quality control profiles after affinity purification



### 6 Does SprF1 bind proteins?



## Conclusions

This work demonstrates that MS2-SprF1 and SprF1-MS2 bind MBP-MS2p protein and are enriched in target fraction. Moreover, the presence of SprG1 bound to SprF1 demonstrates that although tagged with MS2 aptamer, SprF1 is still functional. We have validated the MAPS approach to identify new molecular targets of SprF1 antitoxin.

## Future directions

- Perform RNA sequencing to identify the RNA partners of SprF1
- Identify by mass spectrometry the proteins linked to SprF1
- Use MAPS approach to determine molecular targets of SprG1 RNA

1. Pinel-Marie ML & al. RNA antitoxin SprF1 binds ribosomes to attenuate translation and promote persister cell formation in *Staphylococcus aureus* (2021). Nat Microbiol.  
2. Lalaouna D & al. Identification of unknown RNA partners using MAPS (2017). Methods.

**Staphylococcus aureus**

- Gram-positive cocci
- Human commensal (30% of the population)
- Human pathogen:
  - Meningitis
  - Endocarditis
  - Pyelonephritis
  - Osteomyelitis
  - Skin infections
  - Pneumonia
  - Toxic shock syndrome
- 2<sup>nd</sup> cause of nosocomial infections in France
- Antibiotics resistance (Methicillin, Vancomycin)
- Persistent bacteria

**SprG1/SprF1 toxin-antitoxin system (TA)**

- Type I TA system of *S. aureus*
- SprF1 → RNA antitoxin
- SprG1 → Peptide toxin

**Mechanism of sprG1 inhibition by SprF1 antitoxin**

**SprF1, an RNA antitoxin with dual function!**

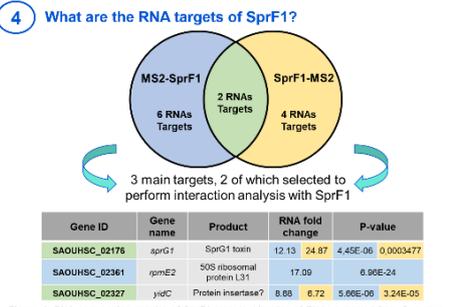
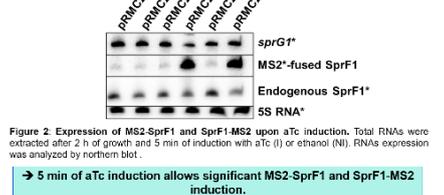
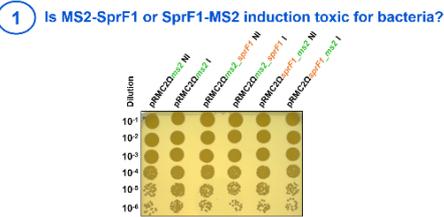
**What are persistent bacteria?**  
→ Subpopulation of transiently antibiotic-tolerant slow-growing bacteria that can resume growth after a lethal stress

**AIM → Identify SprF1 novel molecular targets using MAPS approach to better understand its role in antibiotic persistence**

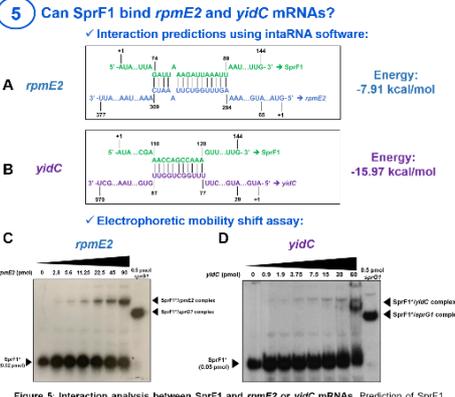
**MS2-affinity purification coupled with RNA sequencing (MAPS)<sup>2</sup>**



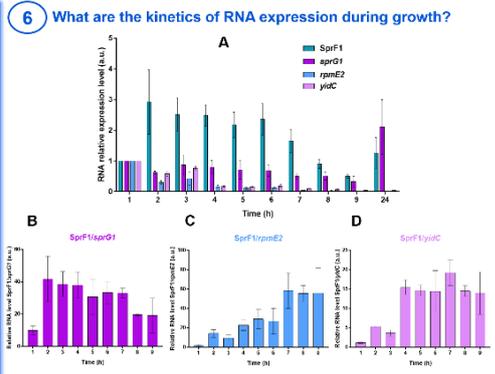
**Results**



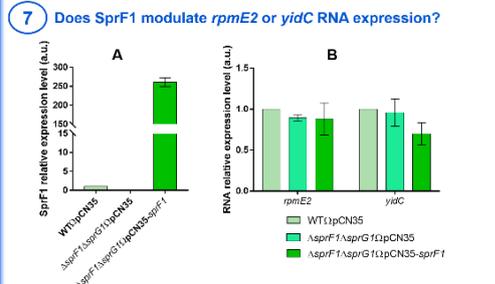
**→ sprG1 is one of the common target of MS2-SprF1 and SprF1-MS2 analysis. Recovery of sprG1 validates the MAPS. rpmE2 and yidC are 2 novel potential targets of SprF1.**



**→ SprF1 binds rpmE2 and yidC with low affinity. Need for a chaperone?**



**→ SprF1 and sprG1 expressions are stable during growth. Expressions of rpmE2 and yidC are maximal at the beginning of growth and then decrease. The level of SprF1 is always higher than the level of its targets suggesting that SprF1 may interact with several targets during growth.**



**→ SprF1 does not alter the expression level of rpmE2 and yidC. SprF1 does not appear to act at the transcriptional or post-transcriptional level on these targets.**

**Conclusions**

This work shows that dual function RNA antitoxin SprF1 has the potential to bind other targets than sprG1 and ribosomes. Using MAPS, we identified 11 novel mRNA targets candidates, two of which showing high enrichment and putative interaction sites. Preliminary electrophoretic mobility shift assay analyses revealed that SprF1 binds rpmE2 and yidC in vitro. Further analysis will be needed to validate the predicting interactions sites between SprF1/rpmE2 and SprF1/yidC.

**Future directions**

- Does SprF1 interaction with rpmE2 and yidC mRNAs influence the translation of these proteins?
- Does yidC encode a functional protein insertase in S. aureus?
- Investigate biological function and relation with persistence and cell wall damage

1. Pinel-Marie ML & al. RNA antitoxin SprF1 binds ribosomes to attenuate translation and promote persist cell formation in Staphylococcus aureus (2021). Nat Microbiol. 2. Lalaouna D & al. Identification of unknown RNA partners using MAPS (2017). Methods.

# Deciphering the *Staphylococcus aureus* SprF1 antitoxin RNA targetome to understand its contribution to antibiotic persistence

Emeline Ostyn<sup>a</sup>, Yoann Augagneur<sup>a</sup>, Marie-Laure Pinel-Marie<sup>a</sup>

<sup>a</sup> INSERM U1230 BRM, Université de Rennes, Rennes, France

## *Staphylococcus aureus*

- ✓ Gram-positive cocci
- ✓ Human commensal (30% of the population)
- ✓ Human pathogen:
  - Endocarditis
  - Osteomyelitis
  - Pneumoniae
  - Meningitis
- ✓ Antibiotic resistance: Methicillin, Vancomycin
- ✓ Antibiotic persistence

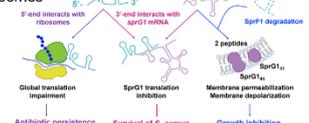
## SprF1, an RNA antitoxin with dual function<sup>1</sup>

SprF1 → RNA antitoxin belonging to the SprG1/SprF1 Type I Toxin-Antitoxin system in *S. aureus*

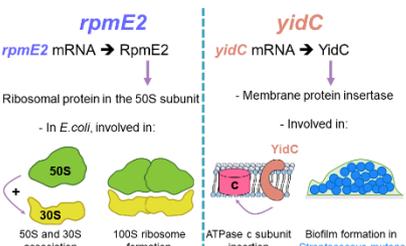
### Dual function of SprF1:

- Inhibition of *sprG1* mRNA
- Interaction with ribosomes

### Persistence



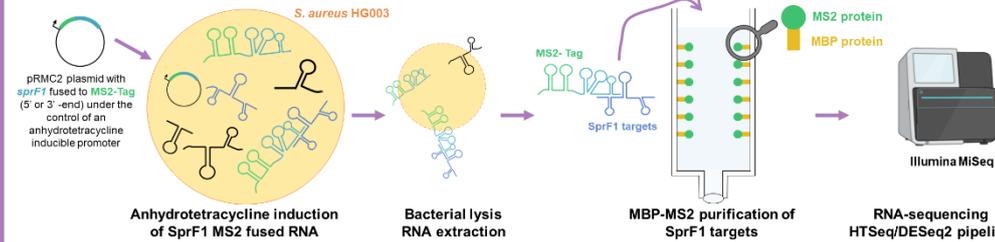
## *rpmE2* and *yidC*, 2 novel SprF1 targets



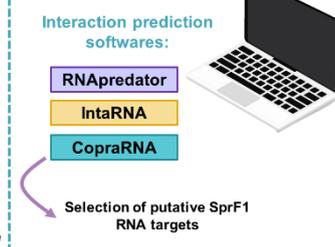
## AIM → Identify SprF1 novel RNAs targets to better understand its role in antibiotic persistence

### Experimental analysis: MS2-affinity purification coupled with RNA sequencing (MAPS)<sup>2</sup>

METHODS



### In silico analysis



### 1 What are the MAPS and in silico SprF1 targets?

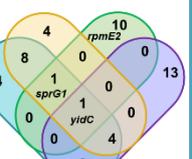
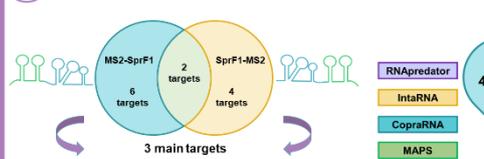


Figure 2: Common RNA targets of SprF1 for MAPS and in silico analysis. Venn diagram of the numbers of common RNA targets of SprF1 between MAPS and in silico analysis. The first 18 targets of each software and the 12 targets of MAPS are used for this diagram.

### 3 Does SprF1 modulate *rpmE2* or *yidC* RNA expression?

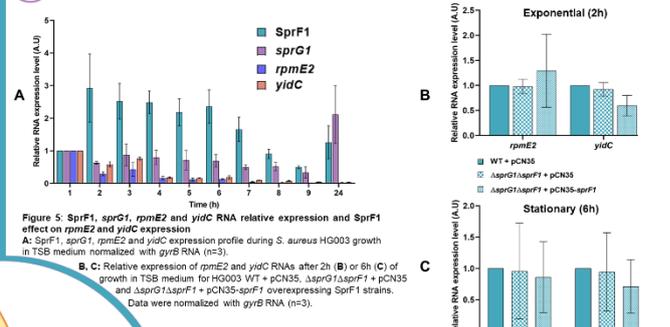


Figure 5: SprF1, *sprG1*, *rpmE2* and *yidC* RNA relative expression and SprF1 effect on *rpmE2* and *yidC* expression. A: SprF1, *sprG1*, *rpmE2* and *yidC* expression profile during *S. aureus* HG003 growth in TSB medium normalized with *gyrB* RNA (n=3). B, C: Relative expression of *rpmE2* and *yidC* RNAs after 2h (B) or 6h (C) of growth in TSB medium for HG003 WT + pCN35, Δ*sprG1* Δ*sprF1* + pCN35 and Δ*sprG1* Δ*sprF1* + pCN35-*sprF1* overexpressing SprF1 strains. Data were normalized with *gyrB* RNA (n=3).

RESULTS

Figure 1: MAPS SprF1 targets. RNA sequencing results of SprF1 RNA targets enrichment comparing the control condition (pRMC2ms2) with pRMC2ms2-*sprF1* (blue circle) or pRMC2Δ*sprF1*-ms2 (yellow circle). Common targets between the two analyses are in green.

- *sprG1* is one of the common target of MS2-SprF1 and SprF1-MS2. Recovery of *sprG1*, an already known target of SprF1, validates the MAPS
- *yidC* is a common target of the four analysis methods
- *rpmE2* is only identified by MAPS

### 2 Can SprF1 bind *rpmE2* and *yidC* mRNAs?

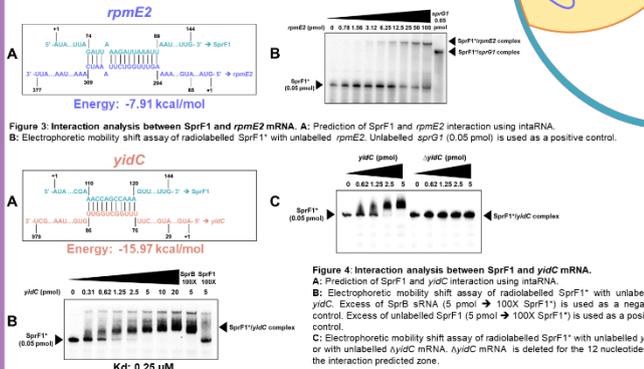


Figure 3: Interaction analysis between SprF1 and *rpmE2* mRNA. A: Prediction of SprF1 and *rpmE2* interaction using IntaRNA. B: Electrophoretic mobility shift assay of radiolabelled SprF1\* with unlabelled *rpmE2*. Unlabelled *sprG1* (0.05 pmol) is used as a positive control.

Figure 4: Interaction analysis between SprF1 and *yidC* mRNA. A: Prediction of SprF1 and *yidC* interaction using IntaRNA. B: Electrophoretic mobility shift assay of radiolabelled SprF1\* with unlabelled *yidC*. Excess of SprB sRNA (5 pmol → 100X SprF1\*) is used as a negative control. Excess of unlabelled SprF1 (5 pmol → 100X SprF1\*) is used as a positive control. C: Electrophoretic mobility shift assay of radiolabelled SprF1\* with unlabelled *yidC* or with unlabelled Δ*yidC* mRNA. Δ*yidC* mRNA is deleted for the 12 nucleotides of the interaction predicted zone.

- SprF1 can interact with *rpmE2* and *yidC*
- For *yidC*, the predicted interaction is confirmed by electrophoretic mobility shift assay

### 4 Does RpmE2 involved in antibiotic persistence?

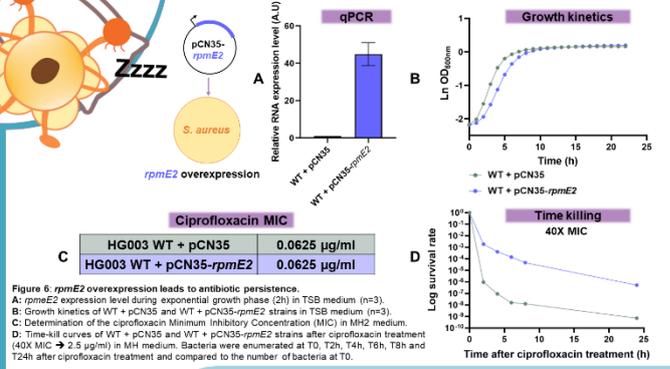


Figure 6: *rpmE2* overexpression leads to antibiotic persistence. A: *rpmE2* expression level during exponential growth phase (2h) in TSB medium (n=3). B: Growth kinetics of WT + pCN35 and WT + pCN35-*rpmE2* strains in TSB medium (n=3). C: Determination of the ciprofloxacin Minimum Inhibitory Concentration (MIC) in MH2 medium. D: Time-killing curves of WT + pCN35 and WT + pCN35-*rpmE2* strains after ciprofloxacin treatment (40X MIC → 2.5 μg/ml) in MH2 medium. Bacteria were enumerated at T0, T2h, T4h, T6h, T8h and T24h after ciprofloxacin treatment and compared to the number of bacteria at T0.

*rpmE2* overexpression leads to an increase in the lag phase of *S. aureus* growth and in the number of ciprofloxacin persistent bacteria

## Conclusions and future directions

The dual function RNA antitoxin SprF1 has the potential to bind other targets than *sprG1* and ribosomes. Using MAPS, we identified 11 novel mRNA targets candidates and putative SprF1 RNA targets are predicted by interaction prediction softwares. In vitro analysis revealed that SprF1 binds *rpmE2* and *yidC* mRNAs. However, this interaction has no effect on the RNA level of both targets. Putative role of SprF1 on translation of these 2 targets will be studied by western blot using *rpmE2-flag* or *yidC-flag* strains. The potential link between SprF1 and the formation of persistent bacteria by *rpmE2* will be analyzed.

## Acknowledgements

I thank the FEMS organization for offering me a grant to participate at this congress



1. Pinel-Marie ML & al. RNA antitoxin SprF1 binds ribosomes to attenuate translation and promote persister cell formation in *Staphylococcus aureus* (2021). Nat Microbiol. 2. Lalaouna D & al. Identification of unknown RNA partners using MAPS (2017). Methods.



# *rpmE2* and *yidC*, two novel mRNA targets of the multifaceted *Staphylococcus aureus* SprF1 antitoxin: Do these interactions contribute to SprF1-mediated antibiotic persistence?

Emeline Ostyn<sup>a</sup>, Yoann Augagneur<sup>a</sup>, Marie-Laure Pinel-Marie<sup>a</sup>  
<sup>a</sup> INSERM U1230 BRM, Université de Rennes, Rennes, France



### *Staphylococcus aureus*

- Gram-positive cocci
- Human commensal (30% of the population)
- Human pathogen:
  - Endocarditis
  - Osteomyelitis
  - Pneumoniae
  - Meningitis
- Antibiotic resistance: Methicillin, Vancomycin
- Antibiotic persistence

### Persisters

Subpopulation of transiently antibiotic-tolerant slow-growing bacteria that are able to resume growth after antibiotic removal

- Involved in chronic and relapsing infections
- Cystic fibrosis
- Urinary tract infections
- Identified by time killing assay:

### SprF1, an RNA antitoxin with dual function<sup>1</sup>

- SprF1 → RNA antitoxin belonging to the SprG1/SprF1Type 1 Toxin-Antitoxin system in *S. aureus*

#### Dual function of SprF1:

- Inhibition of *sprG1* mRNA
- Interaction with ribosomes

**Persistence**

- Global translation impairment
- SprG1 translation inhibition
- Membrane permeabilization
- Membrane depolarization
- Growth inhibition
- Bacterial death

## AIM → Identify SprF1 novel RNAs targets to better understand its role in antibiotic persistence

### Experimental analysis: MS2-affinity purification coupled with RNA sequencing (MAPS)<sup>2</sup>

### In silico analysis

Interaction prediction softwares:

- RNApredator
- IntaRNA
- CopraRNA

Selection of putative SprF1 RNA targets

### 1 What are the MAPS and in silico SprF1 targets?

Gene ID	Gene name	Product	RNA fold change	p-value	
SAOUHSC_02176	sprG1	SprG1 toxin	12.13	4.45E-06	0.000347
SAOUHSC_02361	<i>rpmE2</i>	50S ribosomal protein L31	17.09	5.96E-24	
SAOUHSC_02327	<i>yidC</i>	Protein insertase?	8.68	5.68E-06	3.24E-05

Figure 1: MAPS SprF1 targets. RNA sequencing results of SprF1 RNA targets enrichment comparing the control condition (pRMC2<sub>ms2</sub>) with pRMC2<sub>ms2</sub>-sprF1 (blue circle) or pRMC2<sub>ms2</sub>-sprF1-ms2 (yellow circle). Common targets between the two analyses are in green.

### 2 Can SprF1 bind *rpmE2* and *yidC* mRNAs?

Energy: -7.91 kcal/mol (for rpmE2)

Energy: -15.97 kcal/mol (for yidC)

### 3 Does SprF1 modulate *rpmE2* or *yidC* RNA expression?

Figure 5: SprF1, *sprG1*, *rpmE2* and *yidC* relative expression and SprF1 effect on *rpmE2* and *yidC* expression. A: Bar graph of relative RNA expression level (A.U.) over time (h) for SprF1, sprG1, rpmE2, and yidC. B: Bar graph of relative RNA expression level (A.U.) for rpmE2 and yidC at 2h exponential growth. C: Bar graph of relative RNA expression level (A.U.) for rpmE2 and yidC at 6h stationary growth.

### 4 Can SprF1 bind *rpmE2* and *yidC* mRNAs?

Figure 3: Interaction analysis between SprF1 and *rpmE2* mRNA. A: Prediction of SprF1 and *rpmE2* interaction using IntaRNA. B: Electrophoretic mobility shift assay of radiolabelled SprF1\* with unlabelled *rpmE2*. C: Electrophoretic mobility shift assay of radiolabelled SprF1\* with unlabelled *yidC* or with unlabelled *yidC* mRNA. *yidC* mRNA is deleted for the 12 nucleotides of the interaction predicted zone.

### Conclusion

#### *rpmE2* and *yidC*, 2 novel SprF1 targets

*rpmE2* mRNA → RpmE2

- Ribosomal protein in the 50S subunit
- Involved in: 100S ribosome formation

*yidC* mRNA → YidC

- Membrane protein insertase
- Involved in: ATPase c subunit insertion

Persistence?

### 4 Does RpmE2 involved in antibiotic persistence?

Figure 6: *rpmE2* overexpression leads to antibiotic persistence. A: Bar graph of relative RNA expression level (A.U.) for qPCR. B: Growth kinetics (Ln OD<sub>600nm</sub> vs Time (h)). C: Determination of the ciprofloxacin MIC in MH2 medium. D: Time-killing curves of WT + pCN35 and WT + pCN35-*rpmE2* strains after ciprofloxacin treatment (40X MIC → 2.5 µg/ml) in MH2 medium.

Strain	Ciprofloxacin MIC
HG003 WT + pCN35	0.0625 µg/ml
HG003 WT + pCN35- <i>rpmE2</i>	0.0625 µg/ml

1. Pinel-Marie ML & al. RNA antitoxin SprF1 binds ribosomes to attenuate translation and promote persister cell formation in *Staphylococcus aureus* (2021). Nat Microbiol. 2. Lalaouna D & al. Identification of unknown RNA partners using MAPS (2017). Methods.

## Enseignements et diffusion scientifique

10/21- 03/22

Rennes

Enseignements (TP et TD)

Etudiants en Licence 1 et 2



12/21- 05/22

Rennes

Event manager Pint of Science 2022

Organisation de 3 soirées sur le thème « Notre Corps » dans le cadre du festival de vulgarisation scientifique Pint of Science.



Décembre 2021

Rennes

Création du logo du laboratoire U1230 BRM



Mars 2022

Rennes

Bénévolat événement « La Semaine du Cerveau »

Dans le cadre de l'événement « La semaine du cerveau », durant lequel des présentations vulgarisées sont proposées au grand public, j'ai aidé à l'accueil des participants et des orateurs.



05/22- 05/23

Rennes

Responsable communication de l'association LUCA

LUCA est l'association des doctorants de l'école doctorale Sciences de la Vie et de la Santé de Rennes. Pendant un an j'ai participé à la préparation des affiches puis à la diffusion des événements proposés par l'association.



01/23-03/23

Rennes

Ma thèse en 180 secondes

De janvier à mars 2023, je me suis formée à la vulgarisation scientifique afin de participer au concours « Ma thèse en 180s ». J'ai reçu le 3<sup>e</sup> prix du public lors des qualifications rennaises ce qui m'a permis d'accéder à la finale régionale Bretonne du concours (2<sup>ème</sup> prix ex-æquo du public)

Vidéo → <https://www.youtube.com/watch?v=ESMUZ3qFD7Q>



**Mars 2023**  
Rennes

### Reportage France 3 Bretagne

Reportage au laboratoire et en dehors par des journalistes du journal télévisé de France 3 Bretagne dans le cadre de ma participation à la finale régionale Bretonne du concours « Ma thèse en 180 secondes ».



Vidéo → <https://drive.google.com/file/d/1F0YEzDag1LMa4Uh2eXz-70islMsjEHRU/view?usp=sharing>

**Mai 2023**  
Rennes

### TEDxRennes Youth

Suite à ma participation au concours « Ma thèse en 180 secondes », j'ai été contactée par les organisateurs de la première édition du TEDx Rennes Youth pour présenter en une dizaine de minutes et de manière vulgarisée mes travaux de recherche.



Vidéo → <https://www.youtube.com/watch?v=QJpZiOVv1dQ>



**Mai 2023**

### Concours Contier et rencontrer les Sciences- AUF

En mai 2023, j'ai préparé une vidéo à l'aide du texte que j'ai présenté lors du TEDxRennes Youth afin de participer au concours de vulgarisation scientifique « Contier et rencontrer les Sciences » proposé par l'Agence universitaire de la francophonie (AUF).

Vidéo → [https://drive.google.com/file/d/1G8mkS8YVII727PENTfTq\\_eWFLBnBUQDJ/view?usp=sharing](https://drive.google.com/file/d/1G8mkS8YVII727PENTfTq_eWFLBnBUQDJ/view?usp=sharing)





---

# Références

---

## Références internet

- [1] : Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. Centers for disease control and prevention. 2013. <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>
- [2] : Ban on antibiotics as growth promoters in animal feed enters into effect. European Commission. 2005. [https://ec.europa.eu/commission/presscorner/api/files/document/print/en/ip\\_05\\_1687/IP\\_05\\_1687\\_EN.pdf](https://ec.europa.eu/commission/presscorner/api/files/document/print/en/ip_05_1687/IP_05_1687_EN.pdf)
- [3] : Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. O'Neill J. 2014. [https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations\\_1.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf)
- [4] : L'évolution des consommations d'antibiotiques en France entre 2000 et 2015. ANSM. 2017. [https://www.omedit-grand-est.ars.sante.fr/system/files/2017-08/ANSM-rapport-antibio\\_2016\\_bd2.pdf](https://www.omedit-grand-est.ars.sante.fr/system/files/2017-08/ANSM-rapport-antibio_2016_bd2.pdf)
- [5] : Antimicrobial consumption in the EU/EEA (ESAC-Net): Annual Epidemiological Report for 2021. European centre for disease prevention and control. 2022. [https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/ESAC-Net\\_AER\\_2021\\_final\\_rev.pdf](https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/ESAC-Net_AER_2021_final_rev.pdf)
- [6] : 2021 Antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1425317/retrieve>
- [7] : Site internet de l'AMR Action Fund. <https://www.amractionfund.com/>
- [8] : Liste des agents pathogènes prioritaires. OMS. 2017. <https://www.who.int/fr/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- [9] : Principaux résultats de l'enquête nationale de prévalence 2022 des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissement de santé. Santé publique France. 2023. <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/infections-associees-aux-soins-et-resistance-aux-antibiotiques/infections-associees-aux-soins/documents/enquetes-etudes/principaux-resultats-de-l-enquete-nationale-de-prevalence-2022-des-infections-nosocomiales-et-des-traitements-anti-infectieux-en-etablissement-de-s>
- [10] : Choc toxique menstruel : respecter les conditions de port des protections intimes. ANSES. 2023. <https://www.anses.fr/fr/choc-toxique-menstruel-respecter-conditions-de-port-des-protections-intimes>
- [11] : Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC). Santé publique France. 2023. <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-infectieuses-dorigine-alimentaire/toxi-infections-alimentaires-collectives/documents/bulletin-national-surveillance-des-toxi-infections-alimentaires-collectives.-donnees-de-la-declaration-obligatoire-2021>

## 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  $\beta$  sliding clamp. *Molecular Cell*, 52(5), 617-628. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.10.014>
- Ahmad-Mansour, N., Elhaway, M. I., Huc-Brandt, S., Youssouf, N., Pätzold, L., Martin, M., Abdel-Wadood, N., Aljohmani, A., Morsli, M., Krasteva-Christ, G., Becker, S. L., Yildiz, D., Lavigne, J.-P., Gannoun-Zaki, L., Bischoff, M., & Molle, V. (2022). Characterization of the Secreted Acid Phosphatase SapS reveals a novel virulence factor of *Staphylococcus aureus* that contributes to survival and virulence in mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22), 14031. <https://doi.org/10.3390/ijms232214031>
- Ahmad-Mansour, N., Loubet, P., Pouget, C., Dunyach-Remy, C., Sotto, A., Lavigne, J.-P., & Molle, V. (2021). *Staphylococcus aureus* toxins: an update on their pathogenic properties and potential treatments. *Toxins*, 13(10), 677. <https://doi.org/10.3390/toxins13100677>
- Al Husseini, L. B., Maleki, A., & Al Marjani, M. F. (2021). Antisense mqsR-PNA as a putative target to the eradication of *Pseudomonas aeruginosa* persisters. *New Microbes and New Infections*, 41, 100868. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2021.100868>
- Allison, K. R., Brynildsen, M. P., & Collins, J. J. (2011). Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. *Nature*, 473(7346), 216-220. <https://doi.org/10.1038/nature10069>
- Andresen, L., Martínez-Burgo, Y., Nilsson Zangelin, J., Rizvanovic, A., & Holmqvist, E. (2020). The Small Toxic *Salmonella* protein TimP targets the cytoplasmic membrane and is repressed by the small RNA TimR. *mBio*, 11(6), e01659-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.01659-20>
- Antimicrobial Resistance Collaborators. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *Lancet (London, England)*, 399(10325), 629-655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Armstrong-Esther, C. A. (1976). Carriage patterns of *Staphylococcus aureus* in a healthy non-hospital population of adults and children. *Annals of Human Biology*, 3(3), 221-227. <https://doi.org/10.1080/03014467600001381>
- Ashraf, S., Cheng, J., & Zhao, X. (2017). Clumping factor A of *Staphylococcus aureus* interacts with AnnexinA2 on mammary epithelial cells. *Scientific Reports*, 7, 40608. <https://doi.org/10.1038/srep40608>
- Askarian, F., Ajayi, C., Hanssen, A.-M., van Sorge, N. M., Pettersen, I., Diep, D. B., Sollid, J. U. E., & Johannessen, M. (2016). The interaction between *Staphylococcus aureus* SdrD and desmoglein 1 is important for adhesion to host cells. *Scientific Reports*, 6, 22134. <https://doi.org/10.1038/srep22134>
- Augagneur, Y., King, A. N., Germain-Amiot, N., Sassi, M., Fitzgerald, J. W., Sahukhal, G. S., Elasri, M. O., Felden, B., & Brinsmade, S. R. (2020). Analysis of the CodY RNome reveals RsaD as a stress-responsive riboregulator of overflow metabolism in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 113(2), 309-325. <https://doi.org/10.1111/mmi.14418>
- Bakkeren, E., Diard, M., & Hardt, W.-D. (2020). Evolutionary causes and consequences of bacterial antibiotic persistence. *Nature Reviews. Microbiology*, 18(9), 479-490. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0378-z>
- Bakkeren, E., Huisman, J. S., Fattinger, S. A., Hausmann, A., Furter, M., Egli, A., Slack, E., Sellin, M. E., Bonhoeffer, S., Regoes, R. R., Diard, M., & Hardt, W.-D. (2019). *Salmonella* persisters promote the spread of antibiotic resistance plasmids in the gut. *Nature*, 573(7773), 276-280. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1521-8>

- 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., ... Zinkernagel, A. (2019). Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nature Reviews. Microbiology*, *17*(7), 441-448. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0196-3>
- Balaban, N. Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., & Leibler, S. (2004). Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science (New York, N.Y.)*, *305*(5690), 1622-1625. <https://doi.org/10.1126/science.1099390>
- Baldry, M., Bojer, M. S., Najarzadeh, Z., Vestergaard, M., Meyer, R. L., Otzen, D. E., & Ingmer, H. (2020). Phenol-Soluble Modulins modulate persister cell formation in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 573253. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.573253>
- Barbosa, L. C. B., Garrido, S. S., Garcia, A., Delfino, D. B., Santos, L. do N., & Marchetto, R. (2012). Design and synthesis of peptides from bacterial ParE toxin as inhibitors of topoisomerases. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *54*, 591-596. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.06.008>
- Basu, A., Shields, K. E., & Yap, M.-N. F. (2020). The hibernating 100S complex is a target of ribosome-recycling factor and elongation factor G in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Biological Chemistry*, *295*(18), 6053-6063. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.012307>
- Basu, A., & Yap, M.-N. F. (2016). Ribosome hibernation factor promotes Staphylococcal survival and differentially represses translation. *Nucleic Acids Research*, *44*(10), 4881-4893. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw180>
- Bayles, K. W., Wesson, C. A., Liou, L. E., Fox, L. K., Bohach, G. A., & Trumble, W. R. (1998). Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infection and Immunity*, *66*(1), 336-342. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.1.336-342.1998>
- Beam, J. E., Wagner, N. J., Shook, J. C., Bahnson, E. S. M., Fowler, V. G., Rowe, S. E., & Conlon, B. P. (2021). Macrophage-produced peroxynitrite induces antibiotic tolerance and supersedes intrinsic mechanisms of persister formation. *Infection and Immunity*, *89*(10), e0028621. <https://doi.org/10.1128/IAI.00286-21>
- Beaume, M., Hernandez, D., Farinelli, L., Deluen, C., Linder, P., Gaspin, C., Romby, P., Schrenzel, J., & Francois, P. (2010). Cartography of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transcripts: Detection, orientation and temporal expression during growth phase and stress conditions. *PLoS One*, *5*(5), e10725. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010725>
- Berry, K. A., Verhoef, M. T. A., Leonard, A. C., & Cox, G. (2022). *Staphylococcus aureus* adhesion to the host. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1515*(1), 75-96. <https://doi.org/10.1111/nyas.14807>
- Bigger, Joseph W. (1944). Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. *The Lancet*, *244*(6320), 497-500. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)74210-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)74210-3)
- Boeck, I. D., Broek, M. F. L. van den, Allonsius, C. N., Spacova, I., Wittouck, S., Martens, K., Wuyts, S., Cauwenberghs, E., Jokicevic, K., Vandenheuvel, D., Eilers, T., Lemarcq, M., Rudder, C. D., Thys, S., Timmermans, J.-P., Vroegop, A. V., Verplaetse, A., Wiele, T. V. de, Kiekens, F., ... Lebeer, S. (2020). Lactobacilli have a niche in the human nose. *Cell Reports*, *31*(8). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107674>
- Bogati, B., Wadsworth, N., Barrera, F., & Fozo, E. M. (2021). Improved growth of *Escherichia coli* in aminoglycoside antibiotics by the zor-orz toxin-antitoxin system. *Journal of Bacteriology*, *204*(1), JB0040721. <https://doi.org/10.1128/JB.00407-21>
- Bojer, M. S., Lindemose, S., Vestergaard, M., & Ingmer, H. (2018). Quorum sensing-regulated phenol-soluble modulins limit persister cell populations in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 255. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00255>
- Bourdrelais, P., & Raulot, J.-Y. (1987). Histoire du choléra en France : Une peur bleue, 1832 et 1854. FeniXX.

- Boyle-Vavra, S., Li, X., Alam, M. T., Read, T. D., Sieth, J., Cywes-Bentley, C., Dobbins, G., David, M. Z., Kumar, N., Eells, S. J., Miller, L. G., Boxrud, D. J., Chambers, H. F., Lynfield, R., Lee, J. C., & Daum, R. S. (2015). USA300 and USA500 clonal lineages of *Staphylococcus aureus* do not produce a capsular polysaccharide due to conserved mutations in the *cap5* locus. *mBio*, *6*(2), e02585-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.02585-14>
- Brielle, R., Pinel-Marie, M.-L., & Felden, B. (2016). Linking bacterial type I toxins with their actions. *Current Opinion in Microbiology*, *30*, 114-121. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.01.009>
- 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*. *The EMBO Journal*, *38*(6), e99363. <https://doi.org/10.15252/emj.201899363>
- 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. *Annual Review of Microbiology*, *70*, 299-316. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095708>
- Bronner, S., Monteil, H., & Prévost, G. (2004). Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: Complexity and applications. *FEMS Microbiology Reviews*, *28*(2), 183-200. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.09.003>
- Brunskill, E. W., & Bayles, K. W. (1996). Identification and molecular characterization of a putative regulatory locus that affects autolysis in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, *178*(3), 611-618.
- Buchad, H., & Nair, M. (2021). The small RNA SprX regulates the autolysin regulator WalR in *Staphylococcus aureus*. *Microbiological Research*, *250*, 126785. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126785>
- Bur, S., Preissner, K. T., Herrmann, M., & Bischoff, M. (2013). The *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein promotes bacterial internalization by keratinocytes independent of fibronectin-binding proteins. *The Journal of Investigative Dermatology*, *133*(8), 2004-2012. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.87>
- Butrico, C. E., & Cassat, J. E. (2020). Quorum sensing and toxin production in *Staphylococcus aureus* osteomyelitis: Pathogenesis and paradox. *Toxins*, *12*(8), 516. <https://doi.org/10.3390/toxins12080516>
- Buts, L., Lah, J., Dao-Thi, M.-H., Wyns, L., & Loris, R. (2005). Toxin-antitoxin modules as bacterial metabolic stress managers. *Trends in Biochemical Sciences*, *30*(12), 672-679. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.10.004>
- Cahill, J., & Young, R. (2019). Phage lysis: Multiple genes for multiple barriers. *Advances in Virus Research*, *103*, 33-70. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.09.003>
- Carrier, M.-C., Lalaouna, D., & Massé, E. (2016). A game of tag: MAPS catches up on RNA interactomes. *RNA Biology*, *13*(5), 473-476. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1156830>
- Cassini, A., Högberg, L. D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G. S., Colomb-Cotinat, M., Kretzschmar, M. E., Devleeschauwer, B., Cecchini, M., Ouakrim, D. A., Oliveira, T. C., Struelens, M. J., Suetens, C., Monnet, D. L., & Burden of AMR Collaborative Group. (2019). Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: A population-level modelling analysis. *The Lancet. Infectious Diseases*, *19*(1), 56-66. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30605-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30605-4)
- Cengher, L., Manna, A. C., Cho, J., Theprungsirikul, J., Sessions, K., Rigby, W., & Cheung, A. L. (2022). Regulation of neutrophil myeloperoxidase inhibitor SPIN by the small RNA Teg49 in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, *117*(6), 1447-1463. <https://doi.org/10.1111/mmi.14919>

- 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 Pathogens*, *6*(6), e1000927. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000927>
- Chain, E., Florey, H. W., Gardner, A. D., Heatley, N. G., Jennings, M. A., Orr-Ewing, J., & Sanders, A. G. (1940). Penicillin as a chemotherapeutic agent. *The Lancet*, *236*(6104), 226-228. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)08728-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)08728-1)
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(10), 6076-6085. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.6076-6085.2004>
- Chaudhuri, R. R., Allen, A. G., Owen, P. J., Shalom, G., Stone, K., Harrison, M., Burgis, T. A., Lockyer, M., Garcia-Lara, J., Foster, S. J., Pleasance, S. J., Peters, S. E., Maskell, D. J., & Charles, I. G. (2009). Comprehensive identification of essential *Staphylococcus aureus* genes using Transposon-Mediated Differential Hybridisation (TMDH). *BMC Genomics*, *10*, 291. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-291>
- Cheung, A. L., Bayer, A. S., Zhang, G., Gresham, H., & Xiong, Y.-Q. (2004). Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, *40*(1), 1-9. [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(03\)00309-2](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(03)00309-2)
- Cheung, A. L., Nishina, K. A., Trottonda, M. P., & Tamber, S. (2008). The SarA protein family of *Staphylococcus aureus*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *40*(3), 355-361. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.10.032>
- Cheung, G. Y. C., Bae, J. S., & Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, *12*(1), 547-569. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1878688>
- Chien, Y., Manna, A. C., Projan, S. J., & Cheung, A. L. (1999). SarA, a global regulator of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*, binds to a conserved motif essential for sar-dependent gene regulation. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(52), 37169-37176. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.52.37169>
- Chlebicka, K., Bonar, E., Suder, P., Ostyn, E., Felden, B., Wladyka, B., & Pinel-Marie, M.-L. (2021). Impacts of the Type I toxin-antitoxin system, SprG1/SprF1, on *Staphylococcus aureus* gene expression. *Genes*, *12*(5), 770. <https://doi.org/10.3390/genes12050770>
- Choi, J. S., Kim, W., Suk, S., Park, H., Bak, G., Yoon, J., & Lee, Y. (2018). The small RNA, SdsR, acts as a novel type of toxin in *Escherichia coli*. *RNA Biology*, *15*(10), 1319-1335. <https://doi.org/10.1080/15476286.2018.1532252>
- Christaki, E., Marcou, M., & Tofarides, A. (2020). Antimicrobial resistance in bacteria: mechanisms, evolution, and persistence. *Journal of Molecular Evolution*, *88*(1), 26-40. <https://doi.org/10.1007/s00239-019-09914-3>
- Chu, L.-C., Arede, P., Li, W., Urdaneta, E. C., Ivanova, I., McKellar, S. W., Wills, J. C., Fröhlich, T., von Kriegsheim, A., Beckmann, B. M., & Granneman, S. (2022). The RNA-bound proteome of MRSA reveals post-transcriptional roles for helix-turn-helix DNA-binding and Rossmann-fold proteins. *Nature Communications*, *13*(1), 2883. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30553-8>
- 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: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, *36*(10), 991-996. <https://doi.org/10.1002/bies.201400080>
- 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*(7476), 365-370. <https://doi.org/10.1038/nature12790>
- 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. *Nature Microbiology*, *1*(5), 16051. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.51>

- Corrigan, R. M., Miajlovic, H., & Foster, T. J. (2009). Surface proteins that promote adherence of *Staphylococcus aureus* to human desquamated nasal epithelial cells. *BMC Microbiology*, 9, 22. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-22>
- Costerton, J. W., Geesey, G. G., & Cheng, K. J. (1978). How bacteria stick. *Scientific American*, 238(1), 86-95. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0178-86>
- Cruz, A. R., Bentlage, A. E. H., Blonk, R., de Haas, C. J. C., Aerts, P. C., Scheepmaker, L. M., Bouwmeester, I. G., Lux, A., van Strijp, J. A. G., Nimmerjahn, F., van Kessel, K. P. M., Vidarsson, G., & Rooijackers, S. H. M. (2022). Toward understanding how Staphylococcal protein A inhibits IgG-mediated phagocytosis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 209(6), 1146-1155. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2200080>
- D**arby, E. M., Trampari, E., Siasat, P., Gaya, M. S., Alav, I., Webber, M. A., & Blair, J. M. A. (2023). Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nature Reviews. Microbiology*, 21(5), 280-295. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00820-y>
- Darfeuille, F., Unoson, C., Vogel, J., & Wagner, E. G. H. (2007). An antisense RNA inhibits translation by competing with standby ribosomes. *Molecular Cell*, 26(3), 381-392. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.04.003>
- Debbia, E. A., Roveta, S., Schito, A. M., Gualco, L., & Marchese, A. (2001). Antibiotic persistence: The role of spontaneous DNA repair response. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, 7(4), 335-342. <https://doi.org/10.1089/10766290152773347>
- de Jong, N. W. M., van Kessel, K. P. M., & van Strijp, J. A. G. (2019). Immune evasion by *Staphylococcus aureus*. *Microbiology Spectrum*, 7(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0061-2019>
- Desgranges, E., Barrientos, L., Herrgott, L., Marzi, S., Toledo-Arana, A., Moreau, K., Vandenesch, F., Romby, P., & Caldelari, I. (2022). The 3'UTR-derived sRNA RsaG coordinates redox homeostasis and metabolism adaptation in response to glucose-6-phosphate uptake in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 117(1), 193-214. <https://doi.org/10.1111/mmi.14845>
- de Souza-Neto, R. R., Carvalho, I. G. B., Martins, P. M. M., Picchi, S. C., Tomaz, J. P., Caserta, R., Takita, M. A., & de Souza, A. A. (2022). MqsR toxin as a biotechnological tool for plant pathogen bacterial control. *Scientific Reports*, 12(1), 2794. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06690-x>
- Doebbeling, B. N., Breneman, D. L., Neu, H. C., Aly, R., Yangco, B. G., Holley, H. P., Marsh, R. J., Pfaller, M. A., McGowan, J. E., & Scully, B. E. (1993). Elimination of *Staphylococcus aureus* nasal carriage in health care workers: Analysis of six clinical trials with calcium mupirocin ointment. The Mupirocin Collaborative Study Group. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 17(3), 466-474. <https://doi.org/10.1093/clinids/17.3.466>
- Dombach, J. L., Quintana, J. L. J., & Detweiler, C. S. (2021). Staphylococcal bacterial persister cells, biofilms, and intracellular infection are disrupted by JD1, a membrane-damaging small molecule. *mBio*, 12(5), e0180121. <https://doi.org/10.1128/mBio.01801-21>
- Dörr, T., Lewis, K., & Vulić, M. (2009). SOS response induces persistence to fluoroquinolones in *Escherichia coli*. *PLoS Genetics*, 5(12), e1000760. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000760>
- Dörr, T., Vulić, M., & Lewis, K. (2010). Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biology*, 8(2), e1000317. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000317>
- Dziewanowska, K., Carson, A. R., Patti, J. M., Deobald, C. F., Bayles, K. W., & Bohach, G. A. (2000). Staphylococcal fibronectin binding protein interacts with heat shock protein 60 and integrins: Role in internalization by epithelial cells. *Infection and Immunity*, 68(11), 6321-6328.
- E**bnner, P., Rinker, J., Nguyen, M. T., Popella, P., Nega, M., Luqman, A., Schitteck, B., Di Marco, M., Stevanovic, S., & Götz, F. (2016). Excreted cytoplasmic proteins contribute to pathogenicity in *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, 84(6), 1672-1681. <https://doi.org/10.1128/IAI.00138-16>

- Economou, V., & Gousia, P. (2015). Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infection and Drug Resistance*, 49. <https://doi.org/10.2147/IDR.S55778>
- Eggenhofer, F., Tafer, H., Stadler, P. F., & Hofacker, I. L. (2011). RNAPredator: Fast accessibility-based prediction of sRNA targets. *Nucleic Acids Research*, 39(Web Server issue), W149-154. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr467>
- Egido, J. E., Costa, A. R., Aparicio-Maldonado, C., Haas, P.-J., & Brouns, S. J. J. (2022). Mechanisms and clinical importance of bacteriophage resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 46(1), fuab048. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab048>
- Ellington, J. K., Reilly, S. S., Ramp, W. K., Smeltzer, M. S., Kellam, J. F., & Hudson, M. C. (1999). Mechanisms of *Staphylococcus aureus* invasion of cultured osteoblasts. *Microbial Pathogenesis*, 26(6), 317-323. <https://doi.org/10.1006/mpat.1999.0272>
- 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 Research*, 42(8), 4892-4905. <https://doi.org/10.1093/nar/gku149>
- Falla, T. J., & Chopra, I. (1998). Joint Tolerance to  $\beta$ -Lactam and fluoroquinolone antibiotics in *Escherichia coli* results from overexpression of *hipA*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(12), 3282-3284.
- Fermon, L., Burel, A., Ostyn, E., Dréano, S., Bondon, A., Chevance, S., & Pinel-Marie, M.-L. (2023). Mechanism of action of *sprG1*-encoded type I toxins in *Staphylococcus aureus*: From membrane alterations to mesosome-like structures formation and bacterial lysis. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1275849. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1275849>
- Fisher, R. A., Gollan, B., & Helaine, S. (2017). Persistent bacterial infections and persister cells. *Nature Reviews Microbiology*, 15(8), 453-464. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.42>
- Flannagan, R. S., Kuiack, R. C., McGavin, M. J., & Heinrichs, D. E. (2018). *Staphylococcus aureus* uses the GraXRS regulatory system to sense and adapt to the acidified phagolysosome in macrophages. *mBio*, 9(4), e01143-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01143-18>
- Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a Penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British journal of experimental pathology*, 10(3), 226-236.
- 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*. *Nature Reviews Microbiology*, 12(1), 49-62. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3161>
- Fowler, T., Wann, E. R., Joh, D., Johansson, S., Foster, T. J., & Höök, M. (2000). Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell  $\beta$ 1 integrins. *European Journal of Cell Biology*, 79(10), 672-679. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00104>
- 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 Research*, 38(11), 3743-3759. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq054>
- Fraikin, N., Goormaghtigh, F., & Van Melderen, L. (2020). Type II toxin-antitoxin systems: Evolution and revolutions. *Journal of Bacteriology*, 202(7). <https://doi.org/10.1128/JB.00763-19>
- Fraikin, N., Rousseau, C. J., Goeders, N., & Van Melderen, L. (2019). Reassessing the role of the Type II MqsRA toxin-antitoxin system in stress response and biofilm formation: MqsA is transcriptionally uncoupled from *mqsR*. *mBio*, 10(6), e02678-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.02678-19>
- Fraikin, N., & Van Melderen, L. (2024). Single-cell evidence for plasmid addiction mediated by toxin-antitoxin systems. *Nucleic Acids Research*, gkae018. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae018>

- François, P., Schrenzel, J., & Götz, F. (2023). Biology and regulation of Staphylococcal biofilm. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5218. <https://doi.org/10.3390/ijms24065218>
- Fröhlich, K. S., & Vogel, J. (2009). Activation of gene expression by small RNA. *Current Opinion in Microbiology*, 12(6), 674-682. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.09.009>
- Fung, D. K. C., Chan, E. W. C., Chin, M. L., & Chan, R. C. Y. (2010). Delineation of a bacterial starvation stress response network which can mediate antibiotic tolerance development. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 1082-1093. <https://doi.org/10.1128/AAC.01218-09>
- Gannoun-Zaki, L., Pätzold, L., Huc-Brandt, S., Baronian, G., Elhaway, M. I., Gaupp, R., Martin, M., Blanc-Potard, A.-B., Letourneur, F., Bischoff, M., & Molle, V. (2018). PtpA, a secreted tyrosine phosphatase from *Staphylococcus aureus*, contributes to virulence and interacts with coronin-1A during infection. *The Journal of Biological Chemistry*, 293(40), 15569-15580. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003555>
- Gefen, O., Chekol, B., Strahilevitz, J., & Balaban, N. Q. (2017). TDtest: Easy detection of bacterial tolerance and persistence in clinical isolates by a modified disk-diffusion assay. *Scientific Reports*, 7, 41284. <https://doi.org/10.1038/srep41284>
- Geiger, T., Kästle, B., Gratani, F. L., Goerke, C., & Wolz, C. (2014). Two small (p)ppGpp synthases in *Staphylococcus aureus* mediate tolerance against cell envelope stress conditions. *Journal of Bacteriology*, 196(4), 894-902. <https://doi.org/10.1128/JB.01201-13>
- 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 Research*, 37(21), 7239-7257. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp668>
- Gerdes, K., Rasmussen, P. B., & Molin, S. (1986). Unique type of plasmid maintenance function: Postsegregational killing of plasmid-free cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(10), 3116-3120. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.10.3116>
- 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 Research*, 47(4), 1759-1773. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1257>
- Glatter, K. A., & Finkelman, P. (2021). History of the plague: An ancient pandemic for the age of COVID-19. *The American Journal of Medicine*, 134(2), 176-181. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2020.08.019>
- 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. *Journal of Bacteriology*, 191(11), 3462-3468. <https://doi.org/10.1128/JB.01804-08>
- Goerke, C., & Wolz, C. (2010). Adaptation of *Staphylococcus aureus* to the cystic fibrosis lung. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 300(8), 520-525. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.08.003>
- Gollan, B., Grabe, G., Michaux, C., & Helaine, S. (2019). Bacterial persists and infection : past, present, and progressing. *Annual Review of Microbiology*, 73(1), 359-385. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115650>
- González Barrios, A. F., Zuo, R., Hashimoto, Y., Yang, L., Bentley, W. E., & Wood, T. K. (2006). Autoinducer 2 controls biofilm formation in *Escherichia coli* through a novel motility quorum-sensing regulator (MqsR, B3022). *Journal of Bacteriology*, 188(1), 305-316. <https://doi.org/10.1128/JB.188.1.305-316.2006>
- Goormaghtigh, F., Fraikin, N., Putrinš, M., Hallaert, T., Hauryliuk, V., Garcia-Pino, A., Sjödin, A., Kasvandik, S., Udekwu, K., Tenson, T., Kaldalu, N., & Van Melderen, L. (2018). Reassessing the role of Type II toxin-antitoxin systems in formation of *Escherichia coli* Type II persister cells. *mBio*, 9(3). <https://doi.org/10.1128/mBio.00640-18>

- Gounani, Z., Şen Karaman, D., Venu, A. P., Cheng, F., & Rosenholm, J. M. (2020). Coculture of *P. aeruginosa* and *S. aureus* on cell derived matrix—An in vitro model of biofilms in infected wounds. *Journal of Microbiological Methods*, 175, 105994. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105994>
- Gresham, H. D., Lowrance, J. H., Caver, T. E., Wilson, B. S., Cheung, A. L., & Lindberg, F. P. (2000). Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection1. *The Journal of Immunology*, 164(7), 3713-3722. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.7.3713>
- 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. *Journal of Bacteriology*, 182(7), 1794-1801.
- Guegler, C. K., & Laub, M. T. (2021). Shutoff of host transcription triggers a toxin-antitoxin system to cleave phage RNA and abort infection. *Molecular Cell*, 81(11), 2361-2373.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.03.027>
- Guo, H., Tong, Y., Cheng, J., Abbas, Z., Li, Z., Wang, J., Zhou, Y., Si, D., & Zhang, R. (2022). Biofilm and small colony variants-An update on *Staphylococcus aureus* strategies toward drug resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1241. <https://doi.org/10.3390/ijms23031241>
- Guo, M. S., Updegrove, T. B., Gogol, E. B., Shabalina, S. A., Gross, C. A., & Storz, G. (2014). MicL, a new  $\sigma$ E-dependent sRNA, combats envelope stress by repressing synthesis of Lpp, the major outer membrane lipoprotein. *Genes & Development*, 28(14), 1620-1634. <https://doi.org/10.1101/gad.243485.114>
- 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 Research*, 42(10), 6448-6462. <https://doi.org/10.1093/nar/gku279>
- Gutiérrez, D., Hidalgo-Cantabrana, C., Rodríguez, A., García, P., & Ruas-Madiedo, P. (2016). Monitoring in real time the formation and removal of biofilms from clinical related pathogens using an impedance-based technology. *PloS One*, 11(10), e0163966. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163966>
- Gutiérrez, D., Ruas-Madiedo, P., Martínez, B., Rodríguez, A., & García, P. (2014). Effective removal of staphylococcal biofilms by the endolysin LysH5. *PloS One*, 9(9), e107307. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107307>
- Habib, G., Zhu, J., & Sun, B. (2020). A novel type I toxin-antitoxin system modulates persister cell formation in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 310(2), 151400. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2020.151400>
- Habib, G., Zhu, Q., & Sun, B. (2018). Bioinformatics and functional assessment of toxin-antitoxin systems in *Staphylococcus aureus*. *Toxins*, 10(11), 473. <https://doi.org/10.3390/toxins10110473>
- Haggar, A., Hussain, M., Lönnies, H., Herrmann, M., Norrby-Teglund, A., & Flock, J.-I. (2003). Extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* enhances internalization into eukaryotic cells. *Infection and Immunity*, 71(5), 2310-2317. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.5.2310-2317.2003>
- Hallier, M., Bronsard, J., Dréano, S., Sassi, M., Cattoir, V., Felden, B., & Augagneur, Y. (2024). RNAlII is linked with the pentose phosphate pathway through the activation of RpiRc in *Staphylococcus aureus*. *mSphere*, e0034823. <https://doi.org/10.1128/msphere.00348-23>
- Hansen, S., Lewis, K., & Vulić, M. (2008). Role of global regulators and nucleotide metabolism in antibiotic tolerance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(8), 2718-2726. <https://doi.org/10.1128/AAC.00144-08>
- Hayes, S. M., Biggs, T. C., Goldie, S. P., Harries, P. G., Walls, A. F., Allan, R. N., Pender, S. L. F., & Salib, R. J. (2020). *Staphylococcus aureus* internalization in mast cells in nasal polyps: Characterization of interactions and potential mechanisms. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 145(1), 147-159. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.06.013>
- Heilmann, C. (2011). Adhesion mechanisms of staphylococci. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 715, 105-123. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-0940-9\\_7](https://doi.org/10.1007/978-94-007-0940-9_7)

- 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*(6167), 204-208. <https://doi.org/10.1126/science.1244705>
- Helaine, S., Thompson, J. A., Watson, K. G., Liu, M., Boyle, C., & Holden, D. W. (2010). Dynamics of intracellular bacterial replication at the single cell level. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(8), 3746-3751. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000041107>
- Heller, D. M., Tavag, M., & Hochschild, A. (2017). CbtA toxin of *Escherichia coli* inhibits cell division and cell elongation via direct and independent interactions with FtsZ and MreB. *PLoS Genetics*, *13*(9), e1007007. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007007>
- 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. *Infection and Immunity*, *78*(6), 2877-2889. <https://doi.org/10.1128/IAI.00088-10>
- Herren, S. C., Huemer, M., Acevedo, C. T., Gómez-Mejia, A., Andreoni, F., Mairpady Shambat, S., Hasse, B., Zbinden, R., Brugger, S. D., & Zinkernagel, A. S. (2022). Assessing antibiotic tolerance of *Staphylococcus aureus* derived directly from patients by the replica plating tolerance isolation system (REPTIS). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *66*(1), e0096721. <https://doi.org/10.1128/AAC.00967-21>
- Hirschhausen, N., Schlesier, T., Schmidt, M. A., Götz, F., Peters, G., & Heilmann, C. (2010). A novel staphylococcal internalization mechanism involves the major autolysin Atl and heat shock cognate protein Hsc70 as host cell receptor. *Cellular Microbiology*, *12*(12), 1746-1764. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01506.x>
- Hobby, G. L., Meyer, K., & Chaffee, E. (1942). Observations on the mechanism of action of penicillin. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, *50*(2), 281-285. <https://doi.org/10.3181/00379727-50-13773>
- Hoffmann, F., & Rinas, U. (2004). Stress induced by recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, *89*, 73-92. <https://doi.org/10.1007/b93994>
- Hommel, J. W., & Surewaard, B. G. J. (2022). Intracellular habitation of *Staphylococcus aureus*: Molecular mechanisms and prospects for antimicrobial therapy. *Biomedicines*, *10*(8), 1804. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10081804>
- Howden, B. P., Giulieri, S. G., Wong Fok Lung, T., Baines, S. L., Sharkey, L. K., Lee, J. Y. H., Hachani, A., Monk, I. R., & Stinear, T. P. (2023). *Staphylococcus aureus* host interactions and adaptation. *Nature Reviews. Microbiology*, *21*(6), 380-395. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00852-y>
- Huemer, M., Mairpady Shambat, S., Brugger, S. D., & Zinkernagel, A. S. (2020). Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO Reports*, *21*(12), e51034. <https://doi.org/10.15252/embr.202051034>
- Huemer, M., Mairpady Shambat, S., Hertegonne, S., Bergada-Pijuan, J., Chang, C.-C., Pereira, S., Gómez-Mejia, A., Van Gestel, L., Bär, J., Vulin, C., Pfammatter, S., Stinear, T. P., Monk, I. R., Dworkin, J., & Zinkernagel, A. S. (2023). Serine-threonine phosphoregulation by PknB and Stp contributes to quiescence and antibiotic tolerance in *Staphylococcus aureus*. *Science Signaling*, *16*(766), eabj8194. <https://doi.org/10.1126/scisignal.abj8194>
- Huitema, L., Phillips, T., Alexeev, V., Tomic-Canic, M., Pastar, I., & Igoucheva, O. (2021). Intracellular escape strategies of *Staphylococcus aureus* in persistent cutaneous infections. *Experimental Dermatology*, *30*(10), 1428-1439. <https://doi.org/10.1111/exd.14235>
- Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: Past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, *51*, 72-80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
- Irving, S. E., Choudhury, N. R., & Corrigan, R. M. (2021). The stringent response and physiological roles of (pp)pGpp in bacteria. *Nature Reviews. Microbiology*, *19*(4), 256-271. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00470-y>

- Ivain, L., Bordeau, V., Eyraud, A., Hallier, M., Dreano, S., Tattevin, P., Felden, B., & Chabelskaya, S. (2017). An *in vivo* reporter assay for sRNA-directed gene control in Gram-positive bacteria: Identifying a novel sRNA target in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Research*, *45*(8), 4994-5007. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx190>
- Iwase, T., Uehara, Y., Shinji, H., Tajima, A., Seo, H., Takada, K., Agata, T., & Mizunoe, Y. (2010). *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature*, *465*(7296), 346-349. <https://doi.org/10.1038/nature09074>
- Jahn, N., Preis, H., Wiedemann, C., & Brantl, S. (2012). BsrG/SR4 from *Bacillus subtilis*— the first temperature-dependent type I toxin–antitoxin system. *Molecular Microbiology*, *83*(3), 579-598. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07952.x>
- Jankevicius, G., Ariza, A., Ahel, M., & Ahel, I. (2016). The toxin-antitoxin system DarTG catalyzes reversible ADP-ribosylation of DNA. *Molecular Cell*, *64*(6), 1109-1116. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.11.014>
- Jenul, C., & Horswill, A. R. (2019). Regulation of *Staphylococcus aureus* virulence. *Microbiology Spectrum*, *7*(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0031-2018>
- Josse, J., Laurent, F., & Diot, A. (2017). Staphylococcal adhesion and host cell invasion : fibronectin-binding and other mechanisms. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 2433. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02433>
- Jurénas, D., Fraikin, N., Goormaghtigh, F., & Van Melderen, L. (2022). Biology and evolution of bacterial toxin-antitoxin systems. *Nature Reviews. Microbiology*, *20*(6), 335-350. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00661-1>
- Kahl, B. C., Becker, K., & Löffler, B. (2016). Clinical significance and pathogenesis of Staphylococcal small colony variants in persistent infections. *Clinical Microbiology Reviews*, *29*(2), 401-427. <https://doi.org/10.1128/CMR.00069-15>
- Karimaei, S., Kazem Aghamir, S. M., Foroushani, A. R., & Pourmand, M. R. (2021). Antibiotic tolerance in biofilm persister cells of *Staphylococcus aureus* and expression of toxin-antitoxin system genes. *Microbial Pathogenesis*, *159*, 105126. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105126>
- Kavanagh, N., Ryan, E. J., Widaa, A., Sexton, G., Fennell, J., O'Rourke, S., Cahill, K. C., Kearney, C. J., O'Brien, F. J., & Kerrigan, S. W. (2018). Staphylococcal osteomyelitis: Disease progression, treatment challenges, and future directions. *Clinical Microbiology Reviews*, *31*(2), e00084-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00084-17>
- Kawano, M., Aravind, L., & Storz, G. (2007). An antisense RNA controls synthesis of an SOS-induced toxin evolved from an antitoxin. *Molecular Microbiology*, *64*(3), 738-754. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05688.x>
- Kayama, S., Murakami, K., Ono, T., Ushimaru, M., Yamamoto, A., Hirota, K., & Miyake, Y. (2009). The role of *rpoS* gene and quorum-sensing system in ofloxacin tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, *298*(2), 184-192. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01717.x>
- Keren, I., Shah, D., Spoering, A., Kaldalu, N., & Lewis, K. (2004). Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *186*(24), 8172-8180. <https://doi.org/10.1128/JB.186.24.8172-8180.2004>
- Kerro-Dego, O., Prysljak, T., Perez-Casal, J., & Potter, A. A. (2012). Role of GapC in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. *Veterinary Microbiology*, *156*(3-4), 443-447. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.11.018>
- Kim, J., Kim, G.-L., Norambuena, J., Boyd, J. M., & Parker, D. (2023). Impact of the pentose phosphate pathway on metabolism and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathogens*, *19*(7), e1011531. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011531>
- Kim, J.-S., Heo, P., Yang, T.-J., Lee, K.-S., Cho, D.-H., Kim, B. T., Suh, J.-H., Lim, H.-J., Shin, D., Kim, S.-K., & Kweon, D.-H. (2011). Selective killing of bacterial persisters by a single chemical compound without affecting normal antibiotic-sensitive cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *55*(11), 5380-5383. <https://doi.org/10.1128/AAC.00708-11>

- Kim, J.-S., Schantz, A. B., Song, S., Kumar, M., & Wood, T. K. (2018). GhoT of the GhoT/GhoS toxin/antitoxin system damages lipid membranes by forming transient pores. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *497*(2), 467-472. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.01.067>
- Kim, W., Zhu, W., Hendricks, G. L., Van Tyne, D., Steele, A. D., Keohane, C. E., Fricke, N., Conery, A. L., Shen, S., Pan, W., Lee, K., Rajamuthiah, R., Fuchs, B. B., Vlahovska, P. M., Wuest, W. M., Gilmore, M. S., Gao, H., Ausubel, F. M., & Mylonakis, E. (2018). A new class of synthetic retinoid antibiotics effective against bacterial persisters. *Nature*, *556*(7699), 103-107. <https://doi.org/10.1038/nature26157>
- Kinkel, T. L., Roux, C. M., Dunman, P. M., & Fang, F. C. (2013). The *Staphylococcus aureus* SrrAB two-component system promotes resistance to nitrosative stress and hypoxia. *mBio*, *4*(6), e00696-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00696-13>
- Kintarak, S., Whawell, S. A., Speight, P. M., Packer, S., & Nair, S. P. (2004). Internalization of *Staphylococcus aureus* by human keratinocytes. *Infection and Immunity*, *72*(10), 5668-5675. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.10.5668-5675.2004>
- Kline, B. C., McKay, S. L., Tang, W. W., & Portnoy, D. A. (2015). The *Listeria monocytogenes* hibernation-promoting factor is required for the formation of 100s ribosomes, optimal fitness, and pathogenesis. *Journal of Bacteriology*, *197*(3), 581-591. <https://doi.org/10.1128/JB.02223-14>
- Kluytmans, J., van Belkum, A., & Verbrugh, H. (1997). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clinical Microbiology Reviews*, *10*(3), 505-520. <https://doi.org/10.1128/CMR.10.3.505>
- Kotpal, R., S, K. P., Bhalla, P., Dewan, R., & Kaur, R. (2016). Incidence and risk factors of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in HIV-infected individuals in comparison to HIV-uninfected individuals: A case-control study. *Journal of the International Association of Providers of AIDS Care*, *15*(2), 141-147. <https://doi.org/10.1177/2325957414554005>
- Koziel, J., Maciag-Gudowska, A., Mikolajczyk, T., Bzowska, M., Sturdevant, D. E., Whitney, A. R., Shaw, L. N., DeLeo, F. R., & Potempa, J. (2009). Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by macrophages exerts cytoprotective effects manifested by the upregulation of antiapoptotic factors. *PLoS One*, *4*(4), e5210. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005210>
- 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 Pathogens*, *10*(1), e1003862. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003862>
- Kurbatfinski, N., Kramer, C. N., Goodman, S. D., & Bakaletz, L. O. (2023). ESKAPEE pathogens newly released from biofilm residence by a targeted monoclonal are sensitized to killing by traditional antibiotics. *Frontiers in Microbiology*, *14*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2023.1202215>
- Laarman, A. J., Mijnheer, G., Mootz, J. M., van Rooijen, W. J. M., Ruyken, M., Malone, C. L., Heezius, E. C., Ward, R., Milligan, G., van Strijp, J. A. G., de Haas, C. J. C., Horswill, A. R., van Kessel, K. P. M., & Rooijackers, S. H. M. (2012). *Staphylococcus aureus* Staphopain A inhibits CXCR2-dependent neutrophil activation and chemotaxis. *The EMBO Journal*, *31*(17), 3607-3619. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.212>
- Labandeira-Rey, M., Couzon, F., Boisset, S., Brown, E. L., Bes, M., Benito, Y., Barbu, E. M., Vazquez, V., Höök, M., Etienne, J., Vandenesch, F., & Bowden, M. G. (2007). *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science (New York, N.Y.)*, *315*(5815), 1130-1133. <https://doi.org/10.1126/science.1137165>
- Lakhundi, S., & Zhang, K. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews*, *31*(4), e00020-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00020-18>
- Lalanne, S., Cattoir, V., Guerin, F., Verdier, M.-C., & Revest, M. (2023). Differential response to antibiotic therapy in staphylococcal infective endocarditis: Contribution of an ex vivo model. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *78*(7), 1689-1693. <https://doi.org/10.1093/jac/dkad155>

- Lalaouna, D., Baude, J., Wu, Z., Tomasini, A., Chicher, J., Marzi, S., Vandenesch, F., Romby, P., Caldelari, I., & Moreau, K. (2019). RsaC sRNA modulates the oxidative stress response of *Staphylococcus aureus* during manganese starvation. *Nucleic Acids Research*, *47*(18), 9871-9887. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz728>
- Lalaouna, D., Eyraud, A., Devinck, A., Prévost, K., & Massé, E. (2019). GcvB small RNA uses two distinct seed regions to regulate an extensive targetome. *Molecular Microbiology*, *111*(2), 473-486. <https://doi.org/10.1111/mmi.14168>
- Lalaouna, D., Prévost, K., Eyraud, A., & Massé, E. (2017). Identification of unknown RNA partners using MAPS. *Methods*, *117*, 28-34. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.11.011>
- Langouët-Astrié, C., Oshima, K., McMurtry, S. A., Yang, Y., Kwiecinski, J. M., LaRivière, W. B., Kavanaugh, J. S., Zakharevich, I., Hansen, K. C., Shi, D., Zhang, F., Boguslawski, K. M., Perelman, S. S., Su, G., Torres, V. J., Liu, J., Horswill, A. R., & Schmidt, E. P. (2022). The influenza-injured lung microenvironment promotes MRSA virulence, contributing to severe secondary bacterial pneumonia. *Cell Reports*, *41*(9), 111721. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111721>
- Laux, C., Peschel, A., & Krismer, B. (2019). *Staphylococcus aureus* colonization of the human nose and interaction with other microbiome members. *Microbiology Spectrum*, *7*(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0029-2018>
- Le Huyen, K. B., Gonzalez, C. D., Pascreau, G., Bordeau, V., Cattoir, V., Liu, W., Bouloc, P., Felden, B., & Chabelskaya, S. (2021). A small regulatory RNA alters *Staphylococcus aureus* virulence by titrating RNase III activity. *Nucleic Acids Research*, *49*(18), 10644-10656. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab782>
- Le, K. Y., & Otto, M. (2015). Quorum-sensing regulation in staphylococci—an overview. *Frontiers in Microbiology*, *6*, 1174. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01174>
- Le Loir, Y., Gautier, M., & Pellerin, J.-L. (2010). *Staphylococcus aureus*. Editions Tec & Doc Lavoisier. <https://hal.science/hal-01454441>
- 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 Research*, *43*(19), 9232-9248. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv783>
- Lechardeur, D., Cesselin, B., Liebl, U., Vos, M. H., Fernandez, A., Brun, C., Gruss, A., & Gaudu, P. (2012). Discovery of intracellular heme-binding protein HrtR, which controls heme efflux by the conserved HrtB-HrtA transporter in *Lactococcus lactis*. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(7), 4752-4758. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.297531>
- Lee, A. S., de Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-Kumar, S., Peschel, A., & Harbarth, S. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Disease Primers*, *4*(1), 18033. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.33>
- Lee, H. G., Kang, S., & Lee, J. S. (2021). Binding characteristics of staphylococcal protein A and streptococcal protein G for fragment crystallizable portion of human immunoglobulin G. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *19*, 3372-3383. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.05.048>
- Lee, K.-Y., & Lee, B.-J. (2016). Structure, biology, and therapeutic application of toxin-antitoxin systems in pathogenic bacteria. *Toxins*, *8*(10), 305. <https://doi.org/10.3390/toxins8100305>
- Lee, S. O., Lee, S., Lee, J. E., Song, K.-H., Kang, C. K., Wi, Y. M., San-Juan, R., López-Cortés, L. E., Lacoma, A., Prat, C., Jang, H.-C., Kim, E. S., Kim, H. B., & Lee, S. H. (2020). Dysfunctional accessory gene regulator (agr) as a prognostic factor in invasive *Staphylococcus aureus* infection: A systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, *10*, 20697. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77729-0>
- Lehar, S. M., Pillow, T., Xu, M., Staben, L., Kajihara, K. K., Vandlen, R., DePalatis, L., Raab, H., Hazenbos, W. L., Morisaki, J. H., Kim, J., Park, S., Darwish, M., Lee, B.-C., Hernandez, H., Loyet, K. M., Lupardus, P., Fong, R., Yan, D., ... Mariathasan, S. (2015). Novel antibody-antibiotic conjugate eliminates intracellular *S. aureus*. *Nature*, *527*(7578), 323-328. <https://doi.org/10.1038/nature16057>

- Leidecker, M., Bertling, A., Hussain, M., Bischoff, M., Eble, J. A., Fender, A. C., Jurk, K., Rumpf, C., Herrmann, M., Kehrel, B. E., & Niemann, S. (2023). Protein disulfide isomerase and extracellular adherence protein cooperatively potentiate Staphylococcal invasion into endothelial cells. *Microbiology Spectrum*, 11(3), e03886-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03886-22>
- Leung, V., & Lévesque, C. M. (2012). A stress-inducible quorum-sensing peptide mediates the formation of persister cells with noninherited multidrug tolerance. *Journal of Bacteriology*, 194(9), 2265-2274. <https://doi.org/10.1128/JB.06707-11>
- Levin-Reisman, I., Ronin, I., Gefen, O., Braniss, I., Shores, N., & Balaban, N. Q. (2017). Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. *Science (New York, N.Y.)*, 355(6327), 826-830. <https://doi.org/10.1126/science.aaj2191>
- Li, C., Wu, Y., Riehle, A., Ma, J., Kamler, M., Gulbins, E., & Grassmé, H. (2017). *Staphylococcus aureus* survives in cystic fibrosis macrophages, forming a reservoir for chronic pneumonia. *Infection and Immunity*, 85(5), e00883-16. <https://doi.org/10.1128/IAI.00883-16>
- Li, M., Gong, L., Cheng, F., Yu, H., Zhao, D., Wang, R., Wang, T., Zhang, S., Zhou, J., Shmakov, S. A., Koonin, E. V., & Xiang, H. (2021). Toxin-antitoxin RNA pairs safeguard CRISPR-Cas systems. *Science (New York, N.Y.)*, 372(6541), eabe5601. <https://doi.org/10.1126/science.abe5601>
- Li, Y., Sharma, M. R., Koripella, R. K., Banavali, N. K., Agrawal, R. K., & Ojha, A. K. (2021). Ribosome hibernation : A new molecular framework for targeting nonreplicating persisters of mycobacteria. *Microbiology*, 167(2), 001035. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001035>
- Linz, M. S., Mattappallil, A., Finkel, D., & Parker, D. (2023). Clinical impact of *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 12(3), 557. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030557>
- Lipsky, B. A., Pecoraro, R. E., Chen, M. S., & Koepsell, T. D. (1987). Factors affecting staphylococcal colonization among NIDDM outpatients. *Diabetes Care*, 10(4), 483-486. <https://doi.org/10.2337/diacare.10.4.483>
- Liu, C. M., Price, L. B., Hungate, B. A., Abraham, A. G., Larsen, L. A., Christensen, K., Stegger, M., Skov, R., & Andersen, P. S. (2015). *Staphylococcus aureus* and the ecology of the nasal microbiome. *Science Advances*, 1(5), e1400216. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1400216>
- Liu, J., Gefen, O., Ronin, I., Bar-Meir, M., & Balaban, N. Q. (2020). Effect of tolerance on the evolution of antibiotic resistance under drug combinations. *Science (New York, N.Y.)*, 367(6474), 200-204. <https://doi.org/10.1126/science.aay3041>
- Liu, Q., Yeo, W.-S., & Bae, T. (2016). The SaeRS two-component system of *Staphylococcus aureus*. *Genes*, 7(10), 81. <https://doi.org/10.3390/genes7100081>
- Liu, S., Wu, N., Zhang, S., Yuan, Y., Zhang, W., & Zhang, Y. (2017). Variable persister gene interactions with (p)ppGpp for persister formation in *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1795. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01795>
- Liu, Y., Mu, C., Ying, X., Li, W., Wu, N., Dong, J., Gao, Y., Shao, N., Fan, M., & Yang, G. (2011). RNAIII activates *map* expression by forming an RNA-RNA complex in *Staphylococcus aureus*. *FEBS Letters*, 585(6), 899-905. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.02.021>
- Liu, Y., Zhang, J., & Ji, Y. (2020). Environmental factors modulate biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Science Progress*, 103(1), 36850419898659. <https://doi.org/10.1177/0036850419898659>
- Long, D. R., Penewit, K., Lo, H.-Y., Almazan, J., Holmes, E. A., Bryan, A. B., Wolter, D. J., Lewis, J. D., Waalkes, A., & Salipante, S. J. (2023). *In Vitro* selection identifies *Staphylococcus aureus* genes influencing biofilm formation. *Infection and Immunity*, 91(3), e0053822. <https://doi.org/10.1128/iai.00538-22>
- López-Igual, R., Bernal-Bayard, J., Rodríguez-Patón, A., Ghigo, J.-M., & Mazel, D. (2019). Engineered toxin-intein antimicrobials can selectively target and kill antibiotic-resistant bacteria in mixed populations. *Nature Biotechnology*, 37(7), 755-760. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0105-3>

- Lu, T. K., & Collins, J. J. (2009). Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(12), 4629-4634. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800442106>
- Ma, D., Mandell, J. B., Donegan, N. P., Cheung, A. L., Ma, W., Rothenberger, S., Shanks, R. M. Q., Richardson, A. R., & Urish, K. L. (2019). The toxin-antitoxin MazEF drives *Staphylococcus aureus* biofilm formation, antibiotic tolerance, and chronic infection. *mBio*, *10*(6), e01658-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.01658-19>
- Maffei, E., Woischnig, A.-K., Burkolter, M. R., Heyer, Y., Humolli, D., Thürkauf, N., Bock, T., Schmidt, A., Manfredi, P., Egli, A., Khanna, N., Jenal, U., & Harms, A. (2024). Phage Paride can kill dormant, antibiotic-tolerant cells of *Pseudomonas aeruginosa* by direct lytic replication. *Nature Communications*, *15*(1), 175. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-44157-3>
- Mah, T. F., & O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, *9*(1), 34-39. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(00\)01913-2](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(00)01913-2)
- Majerczyk, C. D., Dunman, P. M., Luong, T. T., Lee, C. Y., Sadykov, M. R., Somerville, G. A., Bodi, K., & Sonenshein, A. L. (2010). Direct targets of CodY in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, *192*(11), 2861-2877. <https://doi.org/10.1128/JB.00220-10>
- Marchais, A., Naville, M., Bohn, C., Bouloc, P., & Gautheret, D. (2009). Single-pass classification of all noncoding sequences in a bacterial genome using phylogenetic profiles. *Genome Research*, *19*(6), 1084-1092. <https://doi.org/10.1101/gr.089714.108>
- Maree, M., Thi Nguyen, L. T., Ohniwa, R. L., Higashide, M., Msadek, T., & Morikawa, K. (2022). Natural transformation allows transfer of SCCmec-mediated methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Nature Communications*, *13*(1), 2477. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29877-2>
- Marques, C. N. H., Morozov, A., Planzos, P., & Zelaya, H. M. (2014). The fatty acid signaling molecule cis-2-decenoic acid increases metabolic activity and reverts persister cells to an antimicrobial-susceptible state. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(22), 6976-6991. <https://doi.org/10.1128/AEM.01576-14>
- Mascary, J.-B., Bordeau, V., Nicolas, I., Verdier, M.-C., Rocheteau, P., & Cattoir, V. (2024). Intracellular activity and *in vivo* efficacy in a mouse model of septic arthritis of the novel pseudopeptide Pep16 against *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *JAC-Antimicrobial Resistance*, *6*(1), dlac025. <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlae025>
- Mashruwala, A. A., & Boyd, J. M. (2017). The *Staphylococcus aureus* SrrAB regulatory system modulates hydrogen peroxide resistance factors, which imparts protection to aconitase during aerobic growth. *PLoS ONE*, *12*(1), e0170283. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170283>
- Masłowska, K. H., Makiela-Dzubska, K., & Fijałkowska, I. J. (2019). The SOS system: A complex and tightly regulated response to DNA damage. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, *60*(4), 368-384. <https://doi.org/10.1002/em.22267>
- Matsuo, M., Hiramatsu, M., Singh, M., Sasaki, T., Hishinuma, T., Yamamoto, N., Morimoto, Y., Kirikae, T., & Hiramatsu, K. (2019). Genetic and transcriptomic analyses of ciprofloxacin-tolerant *Staphylococcus aureus* isolated by the replica plating tolerance isolation system (REPTIS). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *63*(2), e02019-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.02019-18>
- 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 Research*, *44*(21), 10186-10200. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw777>
- McDonnell, C. J., Garciarena, C. D., Watkin, R. L., McHale, T. M., McLoughlin, A., Claes, J., Verhamme, P., Cummins, P. M., & Kerrigan, S. W. (2016). Inhibition of major integrin  $\alpha$ V  $\beta$ 3 reduces *Staphylococcus aureus* attachment to sheared human endothelial cells. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, *14*(12), 2536-2547. <https://doi.org/10.1111/jth.13501>
- McGuinness, W. A., Kobayashi, S. D., & DeLeo, F. R. (2016). Evasion of neutrophil killing by *Staphylococcus aureus*. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, *5*(1), 32. <https://doi.org/10.3390/pathogens5010032>

- McKellar, S. W., Ivanova, I., Arede, P., Zapf, R. L., Mercier, N., Chu, L.-C., Mediati, D. G., Pickering, A. C., Briaud, P., Foster, R. G., Kudla, G., Fitzgerald, J. R., Caldelari, I., Carroll, R. K., Tree, J. J., & Granneman, S. (2022). RNase III CLASH in MRSA uncovers sRNA regulatory networks coupling metabolism to toxin expression. *Nature Communications*, *13*, 3560. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31173-y>
- Melson, E. M., & Kendall, M. M. (2019). The sRNA DicF integrates oxygen sensing to enhance enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence via distinctive RNA control mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(28), 14210-14215. <https://doi.org/10.1073/pnas.1902725116>
- Ménard, G., Rouillon, A., Ghukasyan, G., Emily, M., Felden, B., & Donnio, P.-Y. (2021). *Galleria mellonella* Larvae as an infection model to investigate sRNA-Mediated pathogenesis in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*, 631710. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.631710>
- Menard, G., Silard, C., Suriray, M., Rouillon, A., & Augagneur, Y. (2022). Thirty Years of sRNA-mediated regulation in *Staphylococcus aureus*: From initial discoveries to *in vivo* biological implications. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(13), 7346. <https://doi.org/10.3390/ijms23137346>
- Michaux, C., Ronneau, S., Giorgio, R. T., & Helaine, S. (2022). Antibiotic tolerance and persistence have distinct fitness trade-offs. *PLoS Pathogens*, *18*(11), e1010963. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010963>
- Millette, G., Séguin, D. L., Isabelle, C., Chamberland, S., Lucier, J.-F., Rodrigue, S., Cantin, A. M., & Malouin, F. (2023). *Staphylococcus aureus* small-colony variants from airways of adult cystic fibrosis patients as precursors of adaptive antibiotic-resistant mutations. *Antibiotics*, *12*(6), 6. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12061069>
- Missiakas, D. M., & Schneewind, O. (2013). Growth and laboratory maintenance of *Staphylococcus aureus*. *Current Protocols in Microbiology*, *28*(1). <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc09c01s28>
- Mlynarczyk-Bonikowska, B., Kowalewski, C., Krolak-Ulinska, A., & Marusza, W. (2022). Molecular mechanisms of drug resistance in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(15), 8088. <https://doi.org/10.3390/ijms23158088>
- Möker, N., Dean, C. R., & Tao, J. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* increases formation of multidrug-tolerant persister cells in response to quorum-sensing signaling molecules. *Journal of Bacteriology*, *192*(7), 1946-1955. <https://doi.org/10.1128/JB.01231-09>
- Moldoveanu, A. L., Rycroft, J. A., & Helaine, S. (2021). Impact of bacterial persisters on their host. *Current Opinion in Microbiology*, *59*, 65-71. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.07.006>
- Moyed, H. S., & Bertrand, K. P. (1983). HipA, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *Journal of Bacteriology*, *155*(2), 768-775. <https://doi.org/10.1128/jb.155.2.768-775.1983>
- Mulcahy, L. R., Burns, J. L., Lory, S., & Lewis, K. (2010). Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis. *Journal of Bacteriology*, *192*(23), 6191-6199. <https://doi.org/10.1128/JB.01651-09>
- Munro, P., Benchetrit, M., Nahori, M.-A., Stefani, C., Clément, R., Michiels, J.-F., Landraud, L., Dussurget, O., & Lemichez, E. (2010). The *Staphylococcus aureus* epidermal cell differentiation inhibitor toxin promotes formation of infection foci in a mouse model of bacteremia. *Infection and Immunity*, *78*(8), 3404-3411. <https://doi.org/10.1128/IAI.00319-10>
- Naitali, M., Guillier, L., & Dubois-Brissonnet, F. (2017). Risques microbiologiques alimentaires. Tec et Doc Lavoisier. <https://hal.science/hal-01988649>
- Nazari, M. R., Mahmoodi, M. M., Kouhsari, E., Shariati, M., & Maleki, A. (2024). Investigating the effectiveness of *mqsR*-peptide nucleic acid as a novel solution for the eradication of persister cells in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Clinical Laboratory*, *70*(2). <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2023.230406>

- Nguyen, H. T. T., Nguyen, T. H., & Otto, M. (2020). The staphylococcal exopolysaccharide PIA - Biosynthesis and role in biofilm formation, colonization, and infection. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 3324-3334. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.10.027>
- Nicolas, I., Bordeau, V., Bondon, A., Baudy-Floc'h, M., & Felden, B. (2019). Novel antibiotics effective against gram-positive and -negative multi-resistant bacteria with limited resistance. *PLoS Biology*, 17(7), e3000337. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000337>
- Nikolic, P., & Mudgil, P. (2023). The cell wall, cell membrane and virulence factors of *Staphylococcus aureus* and their role in antibiotic resistance. *Microorganisms*, 11(2), 259. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020259>
- Nishino, K., Yamasaki, S., Nakashima, R., Zwama, M., & Hayashi-Nishino, M. (2021). Function and inhibitory mechanisms of multidrug efflux pumps. *Frontiers in Microbiology*, 12, 737288. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.737288>
- Nonin-Lecomte, S., Fermon, L., Felden, B., & Pinel-Marie, M.-L. (2021). Bacterial type I toxins: Folding and membrane interactions. *Toxins*, 13(7), 490. <https://doi.org/10.3390/toxins13070490>
- Nouwen, J. L., van Belkum, A., & Verbrugh, H. A. (2001). Determinants of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *The Netherlands Journal of Medicine*, 59(3), 126-133. [https://doi.org/10.1016/s0300-2977\(01\)00150-4](https://doi.org/10.1016/s0300-2977(01)00150-4)
- Ogston, A. (1882). Micrococcus poisoning. *Journal of Anatomy and Physiology*, 17(Pt 1), 24-58.
- Ogura, T., & Hiraga, S. (1983). Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(15), 4784-4788. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.15.4784>
- Oriol, C., Cengher, L., Manna, A. C., Mauro, T., Pinel-Marie, M.-L., Felden, B., Cheung, A., & Rouillon, A. (2021). Expanding the *Staphylococcus aureus* SarA regulon to small RNAs. *mSystems*, 6(5), e0071321. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00713-21>
- O'Riordan, K., & Lee, J. C. (2004). *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1), 218-234. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.1.218-234.2004>
- Oswald, J., Njenga, R., Natriashvili, A., Sarmah, P., & Koch, H.-G. (2021). The dynamic SecYEG translocon. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 664241. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.664241>
- O'Toole, R. F. (2021). The interface between COVID-19 and bacterial healthcare-associated infections. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 27(12), 1772-1776. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.06.001>
- Otten, H. (1986). Domagk and the development of the sulphonamides. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 17(6), 689-696. <https://doi.org/10.1093/jac/17.6.689>
- Pandey, S., Sahukhal, G. S., & Elasri, M. O. (2021). The *msaABCR* operon regulates persister formation by modulating energy metabolism in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 657753. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.657753>
- Papenfert, K., & Vogel, J. (2009). Multiple target regulation by small noncoding RNAs rewires gene expression at the post-transcriptional level. *Research in Microbiology*, 160(4), 278-287. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.03.004>
- Patel, N., & Nair, M. (2021). The small RNA RsaF regulates the expression of secreted virulence factors in *Staphylococcus aureus* Newman. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 59(10), 920-930. <https://doi.org/10.1007/s12275-021-1205-6>
- Pathania, A., Anba-Mondoloni, J., Gominet, M., Halpern, D., Dairou, J., Dupont, L., Lamberet, G., Trieu-Cuot, P., Gloux, K., & Gruss, A. (2021). (P)ppGpp/GTP and malonyl-CoA modulate *Staphylococcus aureus* adaptation to FASII antibiotics and provide a basis for synergistic bi-therapy. *mBio*, 12(1), e03193-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.03193-20>
- Pecota, D. C., & Wood, T. K. (1996). Exclusion of T4 phage by the hok/sok killer locus from plasmid R1. *Journal of Bacteriology*, 178(7), 2044-2050.

- Peltier, J., Hamiot, A., Garneau, J. R., Boudry, P., Maikova, A., Hajnsdorf, E., Fortier, L.-C., Dupuy, B., & Soutourina, O. (2020). Type I toxin-antitoxin systems contribute to the maintenance of mobile genetic elements in *Clostridioides difficile*. *Communications Biology*, 3(1), 718. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01448-5>
- Peng, Q., Tang, X., Dong, W., Sun, N., & Yuan, W. (2022). A review of biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and its regulation mechanism. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 12(1), 12. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12010012>
- Personnic, N., Striednig, B., Lezan, E., Manske, C., Welin, A., Schmidt, A., & Hilbi, H. (2019). Quorum sensing modulates the formation of virulent *Legionella* persisters within infected cells. *Nature Communications*, 10, 5216. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13021-8>
- Petit, R. A., & Read, T. D. (2018). *Staphylococcus aureus* viewed from the perspective of 40,000+ genomes. *PeerJ*, 6, e5261. <https://doi.org/10.7717/peerj.5261>
- Peyrusson, F., Nguyen, T. K., Najdovski, T., & Van Bambeke, F. (2022). Host cell oxidative stress induces dormant *Staphylococcus aureus* persisters. *Microbiology Spectrum*, 10(1), e0231321. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02313-21>
- Peyrusson, F., Varet, H., Nguyen, T. K., Legendre, R., Sismeiro, O., Coppée, J.-Y., Wolz, C., Tenson, T., & Van Bambeke, F. (2020). Intracellular *Staphylococcus aureus* persisters upon antibiotic exposure. *Nature Communications*, 11(1), 2200. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15966-7>
- Pichon, C., & Felden, B. (2005). Small RNA genes expressed from *Staphylococcus aureus* genomic and pathogenicity islands with specific expression among pathogenic strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(40), 14249-14254. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503838102>
- Pidwill, G. R., Gibson, J. F., Cole, J., Renshaw, S. A., & Foster, S. J. (2020). The role of macrophages in *Staphylococcus aureus* infection. *Frontiers in Immunology*, 11, 620339. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.620339>
- 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 Reports*, 7(2), 424-435. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.012>
- Pinel-Marie, M.-L., Brielle, R., Riffaud, C., Germain-Amiot, N., Polacek, N., & Felden, B. (2021). RNA antitoxin SprF1 binds ribosomes to attenuate translation and promote persister cell formation in *Staphylococcus aureus*. *Nature Microbiology*, 6(2), 209-220. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00819-2>
- Postma, B., Poppelier, M. J., van Galen, J. C., Prossnitz, E. R., van Strijp, J. A. G., de Haas, C. J. C., & van Kessel, K. P. M. (2004). Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* binds specifically to the C5a and formylated peptide receptor. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 172(11), 6994-7001. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.11.6994>
- Poyart, C., & Trieu-Cuot, P. (1997). A broad-host-range mobilizable shuttle vector for the construction of transcriptional fusions to beta-galactosidase in gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 156(2), 193-198. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12726.x>
- Pragman, A. A., Yarwood, J. M., Tripp, T. J., & Schlievert, P. M. (2004). Characterization of virulence factor regulation by SrrAB, a two-component system in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 186(8), 2430-2438. <https://doi.org/10.1128/JB.186.8.2430-2438.2004>
- Prat, C., Bestebroer, J., de Haas, C. J. C., van Strijp, J. A. G., & van Kessel, K. P. M. (2006). A new staphylococcal anti-inflammatory protein that antagonizes the formyl peptide receptor-like 1. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 177(11), 8017-8026. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.11.8017>
- Preston, M. A., Pimentel, B., Bermejo-Rodríguez, C., Dionne, I., Turnbull, A., & de la Cueva-Méndez, G. (2016). Repurposing a prokaryotic toxin-antitoxin system for the selective killing of oncogenically stressed human cells. *ACS Synthetic Biology*, 5(7), 540-546. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.5b00096>

- Proctor, R. A., van Langevelde, P., Kristjansson, M., Maslow, J. N., & Arbeit, R. D. (1995). Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 20(1), 95-102. <https://doi.org/10.1093/clinids/20.1.95>
- Proctor, R. A., von Eiff, C., Kahl, B. C., Becker, K., McNamara, P., Herrmann, M., & Peters, G. (2006). Small colony variants : A pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nature Reviews. Microbiology*, 4(4), 295-305. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1384>
- Prossliner, T., Skovbo Winther, K., Sørensen, M. A., & Gerdes, K. (2018). Ribosome hibernation. *Annual Review of Genetics*, 52, 321-348. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035130>
- Pu, Y., Zhao, Z., Li, Y., Zou, J., Ma, Q., Zhao, Y., Ke, Y., Zhu, Y., Chen, H., Baker, M. A. B., Ge, H., Sun, Y., Xie, X. S., & Bai, F. (2016). Enhanced efflux activity facilitates drug tolerance in dormant bacterial Cells. *Molecular Cell*, 62(2), 284-294. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.03.035>
- Qiu, J., Zhai, Y., Wei, M., Zheng, C., & Jiao, X. (2022). Toxin-antitoxin systems : Classification, biological roles, and applications. *Microbiological Research*, 264, 127159. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127159>
- Quereda, J. J., & Cossart, P. (2017). Regulating bacterial virulence with RNA. *Annual Review of Microbiology*, 71, 263-280. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-030117-020335>
- Räz, A. K., Andreoni, F., Boumasmoud, M., Bergada-Pijuan, J., Schweizer, T. A., Mairpady Shambat, S., Hasse, B., Zinkernagel, A. S., & Brugger, S. D. (2023). Limited adaptation of *Staphylococcus aureus* during transition from colonization to invasive infection. *Microbiology Spectrum*, 11(4), e0259021. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02590-21>
- Razvi, S., Quittell, L., Sewall, A., Quinton, H., Marshall, B., & Saiman, L. (2009). Respiratory microbiology of patients with cystic fibrosis in the United States, 1995 to 2005. *Chest*, 136(6), 1554-1560. <https://doi.org/10.1378/chest.09-0132>
- Reffuveille, F., Josse, J., Vallé, Q., Gangloff, C. M. and S. C., Reffuveille, F., Josse, J., Vallé, Q., & Gangloff, C. M. and S. C. (2017). *Staphylococcus aureus* biofilms and their impact on the medical field. In *The Rise of Virulence and Antibiotic Resistance in Staphylococcus aureus*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/66380>
- Ren, D., Bedzyk, L. A., Thomas, S. M., Ye, R. W., & Wood, T. K. (2004). Gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(4), 515-524. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1517-y>
- Repoila, F., & Darfeuille, F. (2009). Small regulatory non-coding RNAs in bacteria : Physiology and mechanistic aspects. *Biology of the Cell*, 101(2), 117-131. <https://doi.org/10.1042/BC20070137>
- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3), 482-501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
- 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 Research*, 47(4), 1740-1758. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1256>
- Robertin, S., Brokatzky, D., Lobato-Márquez, D., & Mostowy, S. (2023). Regulation of integrin  $\alpha\beta 1$ -mediated *Staphylococcus aureus* cellular invasion by the septin cytoskeleton. *European Journal of Cell Biology*, 102(4), 151359. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2023.151359>
- 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., & Boulloc, P. (2018). The conserved regulatory RNA RsaE down-regulates the arginine degradation pathway in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Research*, 46(17), 8803-8816. <https://doi.org/10.1093/nar/gky584>

- Rodrigues Lopes, I., Alcantara, L. M., Silva, R. J., Josse, J., Vega, E. P., Cabrerizo, A. M., Bonhomme, M., Lopez, D., Laurent, F., Vandenesch, F., Mano, M., & Eulalio, A. (2022). Microscopy-based phenotypic profiling of infection by *Staphylococcus aureus* clinical isolates reveals intracellular lifestyle as a prevalent feature. *Nature Communications*, 13(1), 7174. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34790-9>
- Rohmer, C., Dobritz, R., Tuncbilek-Dere, D., Lehmann, E., Gerlach, D., George, S. E., Bae, T., Nieselt, K., & Wolz, C. (2022). Influence of *Staphylococcus aureus* strain background on Sa3int phage life cycle switches. *Viruses*, 14(11), 2471. <https://doi.org/10.3390/v14112471>
- Rohmer, C., & Wolz, C. (2021). The Role of *hIb*-converting bacteriophages in *Staphylococcus aureus* host adaptation. *Microbial Physiology*, 31(2), 109-122. <https://doi.org/10.1159/000516645>
- Röhrig, C., Huemer, M., Lorgé, D., Luterbacher, S., Phothaworn, P., Schefer, C., Sobieraj, A. M., Zinsli, L. V., Mairpady Shambat, S., Leimer, N., Keller, A. P., Eichenseher, F., Shen, Y., Korbsrisate, S., Zinkernagel, A. S., Loessner, M. J., & Schmelcher, M. (2020). Targeting hidden pathogens: Cell-penetrating enzybiotics eradicate intracellular drug-resistant *Staphylococcus aureus*. *mBio*, 11(2), e00209-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.00209-20>
- Ronneau, S., & Helaine, S. (2019). Clarifying the Link between toxin–antitoxin modules and bacterial persistence. *Journal of Molecular Biology*, 431(18), 3462-3471. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.03.019>
- Ronneau, S., Michaux, C., Giorgio, R. T., & Helaine, S. (2024). Intoxication of antibiotic persisters by host RNS inactivates their efflux machinery during infection. *PLoS Pathogens*, 20(2), e1012033. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1012033>
- Ronneau, S., Michaux, C., & Helaine, S. (2023). Decline in nitrosative stress drives antibiotic persister regrowth during infection. *Cell Host & Microbe*, 31(6), 993-1006.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2023.05.002>
- Rooijackers, S. H. M., Ruyken, M., Roos, A., Daha, M. R., Presanis, J. S., Sim, R. B., van Wamel, W. J. B., van Kessel, K. P. M., & van Strijp, J. A. G. (2005). Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Nature Immunology*, 6(9), 920-927. <https://doi.org/10.1038/ni1235>
- Rowe, S. E., Beam, J. E., & Conlon, B. P. (2021). Recalcitrant *Staphylococcus aureus* infections: Obstacles and solutions. *Infection and Immunity*, 89(4), e00694-20. <https://doi.org/10.1128/IAI.00694-20>
- Rowe, S. E., Wagner, N. J., Li, L., Beam, J. E., Wilkinson, A. D., Radlinski, L. C., Zhang, Q., Miao, E. A., & Conlon, B. P. (2020). Reactive oxygen species induce antibiotic tolerance during systemic *Staphylococcus aureus* infection. *Nature Microbiology*, 5(2), 282. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0627-y>
- Równicki, M., Pieńko, T., Czarnecki, J., Kolanowska, M., Bartosik, D., Trylska, J. (2018). Artificial activation of *Escherichia coli mazEF* and *hipBA* toxin-antitoxin systems by antisense peptide nucleic acids as an antibacterial strategy. *Frontiers in microbiology*, 9:2870. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02870>
- Sakr, A., Brégeon, F., Rolain, J.-M., & Blin, O. (2019). *Staphylococcus aureus* nasal decolonization strategies: A review. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 17(5), 327-340. <https://doi.org/10.1080/14787210.2019.1604220>
- Santiago-Frangos, A., & Woodson, S. A. (2018). Hfq chaperone brings speed dating to bacterial sRNA. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 9(4), e1475. <https://doi.org/10.1002/wrna.1475>
- Sarpong, D. D., & Murphy, E. R. (2021). RNA regulated toxin-antitoxin systems in pathogenic bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 661026. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.661026>
- Sassi, M., Augagneur, Y., Mauro, T., Ivain, L., Chabelskaya, S., Hallier, M., Sallou, O., & Felden, B. (2015). SRD : A *Staphylococcus* regulatory RNA database. *RNA (New York, N.Y.)*, 21(5), 1005-1017. <https://doi.org/10.1261/rna.049346.114>

- Sassi, M., Bronsard, J., Pascreau, G., Emily, M., Donnio, P.-Y., Revest, M., Felden, B., Wirth, T., & Augagneur, Y. (2022). Forecasting *Staphylococcus aureus* infections using genome-wide association studies, machine learning, and transcriptomic approaches. *MSystems*, 7(4), e0037822. <https://doi.org/10.1128/msystems.00378-22>
- 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. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(1), 105-112. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2193>
- 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(52), 43454-43463. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.402693>
- Schilcher, K., & Horswill, A. R. (2020). Staphylococcal biofilm development: Structure, regulation, and treatment strategies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 84(3), e00026-19. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00026-19>
- Schlievert, P. M., & Davis, C. C. (2020). Device-associated menstrual toxic shock syndrome. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(3), e00032-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00032-19>
- Schumacher, M. A., Balani, P., Min, J., Chinnam, N. B., Hansen, S., Vulić, M., Lewis, K., & Brennan, R. G. (2015). HipBA-promoter structures reveal the basis of heritable multidrug tolerance. *Nature*, 524(7563), 59-64. <https://doi.org/10.1038/nature14662>
- Schuster, C., & Bertram, R. (2016). Toxin-antitoxin systems of *Staphylococcus aureus*. *Toxins*, 8(5), 140. <https://doi.org/10.3390/toxins8050140>
- Selva, L., Viana, D., Regev-Yochay, G., Trzcinski, K., Corpa, J. M., Lasa, Iñigo, Novick, R. P., & Penadés, J. R. (2009). Killing niche competitors by remote-control bacteriophage induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(4), 1234-1238. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809600106>
- Semanjski, M., Gratani, F. L., Englert, T., Nashier, P., Beke, V., Nalpas, N., Germain, E., George, S., Wolz, C., Gerdes, K., & Macek, B. (2021). Proteome dynamics during antibiotic persistence and resuscitation. *MSystems*, 6(4), e0054921. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00549-21>
- Shan, Y., Brown Gandt, A., Rowe, S. E., Deisinger, J. P., Conlon, B. P., & Lewis, K. (2017). ATP-dependent persister formation in *Escherichia coli*. *mBio*, 8(1), e02267-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.02267-16>
- Shang, Y., Wang, X., Chen, Z., Lyu, Z., Lin, Z., Zheng, J., Wu, Y., Deng, Q., Yu, Z., Zhang, Y., & Qu, D. (2020). *Staphylococcus aureus* PhoU homologs regulate persister formation and virulence. *Frontiers in Microbiology*, 11, 865. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00865>
- Shao, Y., Harrison, E. M., Bi, D., Tai, C., He, X., Ou, H.-Y., Rajakumar, K., & Deng, Z. (2011). TADB: A web-based resource for Type 2 toxin-antitoxin loci in bacteria and archaea. *Nucleic Acids Research*, 39(Database issue), D606-611. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq908>
- Shi, H., Tang, J., An, C., Yang, L., & Zhou, X. (2021). Protein A of *Staphylococcus aureus* strain NCTC8325 interacted with heparin. *Archives of Microbiology*, 203(5), 2563-2573. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02255-0>
- Siboo, I. R., Chambers, H. F., & Sullam, P. M. (2005). Role of SraP, a serine-rich surface protein of *Staphylococcus aureus*, in binding to human platelets. *Infection and Immunity*, 73(4), 2273-2280. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.4.2273-2280.2005>
- Singh, G., Yadav, M., Ghosh, C., & Rathore, J. S. (2021). Bacterial toxin-antitoxin modules: Classification, functions, and association with persistence. *Current Research in Microbial Sciences*, 2, 100047. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100047>
- Sinha, B., François, P. P., Nüsse, O., Foti, M., Hartford, O. M., Vaudaux, P., Foster, T. J., Lew, D. P., Herrmann, M., & Krause, K. H. (1999). Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasins via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1. *Cellular Microbiology*, 1(2), 101-117. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.1999.00011.x>
- Slattery, A., Victorsen, A. H., Brown, A., Hillman, K., & Phillips, G. J. (2013). Isolation of highly persistent mutants of *Salmonella enterica* serovar typhimurium reveals a new toxin-antitoxin module. *Journal of Bacteriology*, 195(4), 647-657. <https://doi.org/10.1128/JB.01397-12>

- Smith, E. J., Visai, L., Kerrigan, S. W., Speziale, P., & Foster, T. J. (2011). The Sbi protein is a multifunctional immune evasion factor of *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, 79(9), 3801-3809. <https://doi.org/10.1128/IAI.05075-11>
- Solecki, O., Mosbah, A., Baudy Floc'h, M., & Felden, B. (2015). Converting a *Staphylococcus aureus* toxin into effective cyclic pseudopeptide antibiotics. *Chemistry & Biology*, 22(3), 329-335. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.12.016>
- Song, S., & Wood, T. K. (2020). PpGpp ribosome dimerization model for bacterial persister formation and resuscitation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 523(2), 281-286. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.01.102>
- Song, Y., Zhang, S., Luo, G., Shen, Y., Li, C., Zhu, Y., Huang, Q., Mou, X., Tang, X., Liu, T., Wu, S., Tong, A., He, Y., & Bao, R. (2021). Type II antitoxin HigA Is a key virulence regulator in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Infectious Diseases*, 7(10), 2930-2940. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.1c00401>
- Sonika, S., Singh, S., Mishra, S., & Verma, S. (2023). Toxin-antitoxin systems in bacterial pathogenesis. *Heliyon*, 9(4), e14220. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14220>
- Speziale, P., & Pietrocola, G. (2020). The multivalent role of fibronectin-binding proteins A and B (FnBPA and FnBPB) of *Staphylococcus aureus* in host infections. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2054. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02054>
- Stapels, D. A. C., Hill, P. W. S., Westermann, A. J., Fisher, R. A., Thurston, T. L., Saliba, A.-E., Blommestein, I., Vogel, J., & Helaine, S. (2018). *Salmonella* persists undermine host immune defenses during antibiotic treatment. *Science (New York, N.Y.)*, 362(6419), 1156-1160. <https://doi.org/10.1126/science.aat7148>
- Stewart, P. S. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 292(2), 107-113. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00196>
- Storz, G., Vogel, J., & Wassarman, K. M. (2011). Regulation by small RNAs in bacteria: Expanding frontiers. *Molecular Cell*, 43(6), 880-891. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.022>
- Sugimoto, S., Iwamoto, T., Takada, K., Okuda, K.-I., Tajima, A., Iwase, T., & Mizunoe, Y. (2013). *Staphylococcus epidermidis* Esp degrades specific proteins associated with *Staphylococcus aureus* biofilm formation and host-pathogen interaction. *Journal of Bacteriology*, 195(8), 1645-1655. <https://doi.org/10.1128/JB.01672-12>
- Sulaiman, J. E., Hao, C., & Lam, H. (2018). Specific enrichment and proteomics analysis of *Escherichia coli* persists from rifampin pretreatment. *Journal of Proteome Research*, 17(11), 3984-3996. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00625>
- Svensson, S. L., & Sharma, C. M. (2016). Small RNAs in bacterial virulence and communication. *Microbiology Spectrum*, 4(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0028-2015>
- Szafranska, A. K., Oxley, A. P. A., Chaves-Moreno, D., Horst, S. A., Roßlenbroich, S., Peters, G., Goldmann, O., Rohde, M., Sinha, B., Pieper, D. H., Löffler, B., Jauregui, R., Wos-Oxley, M. L., & Medina, E. (2014). High-resolution transcriptomic analysis of the adaptive response of *Staphylococcus aureus* during acute and chronic phases of osteomyelitis. *mBio*, 5(6), e01775-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01775-14>
- Tam, K., & Torres, V. J. (2019). *Staphylococcus aureus* secreted toxins and extracellular enzymes. *Microbiology Spectrum*, 7(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0039-2018>
- Theodore, A., Lewis, K., & Vulic, M. (2013). Tolerance of *Escherichia coli* to fluoroquinolone antibiotics depends on specific components of the SOS response pathway. *Genetics*, 195(4), 1265-1276. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.152306>
- Thwaites, G. E., & Gant, V. (2011). Are bloodstream leukocytes Trojan Horses for the metastasis of *Staphylococcus aureus*? *Nature Reviews. Microbiology*, 9(3), 215-222. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2508>

- Tiwari, N., López-Redondo, M., Miguel-Romero, L., Kulhankova, K., Cahill, M. P., Tran, P. M., Kinney, K. J., Kilgore, S. H., Al-Tameemi, H., Herfst, C. A., Tuffs, S. W., Kirby, J. R., Boyd, J. M., McCormick, J. K., Salgado-Pabón, W., Marina, A., Schlievert, P. M., & Fuentes, E. J. (2020). The SrrAB two-component system regulates *Staphylococcus aureus* pathogenicity through redox sensitive cysteines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(20), 10989-10999. <https://doi.org/10.1073/pnas.1921307117>
- 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 Research*, *45*(11), 6746-6760. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx219>
- 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. *Clinical Microbiology Reviews*, *28*(3), 603-661. <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>
- Tourasse, N. J., & Darfeuille, F. (2021). T1Tadb: The database of type I toxin-antitoxin systems. *RNA (New York, N.Y.)*, *27*(12), 1471-1481. <https://doi.org/10.1261/rna.078802.121>
- Truong-Bolduc, Q. C., Khan, N. S., Vyas, J. M., & Hooper, D. C. (2017). Tet38 efflux pump affects *Staphylococcus aureus* internalization by epithelial cells through interaction with CD36 and contributes to bacterial escape from acidic and nonacidic phagolysosomes. *Infection and Immunity*, *85*(2), e00862-16. <https://doi.org/10.1128/IAI.00862-16>
- Tsilibaris, V., Maenhaut-Michel, G., Mine, N., & Van Melderen, L. (2007). What is the benefit to *Escherichia coli* of having multiple toxin-antitoxin systems in its genome? *Journal of Bacteriology*, *189*(17), 6101-6108. <https://doi.org/10.1128/JB.00527-07>
- Tuchscher, 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. *The Journal of Infectious Diseases*, *202*(7), 1031-1040. <https://doi.org/10.1086/656047>
- Tuchscher, L., Medina, E., Hussain, M., Völker, W., Heitmann, V., Niemann, S., Holzinger, D., Roth, J., Proctor, R. A., Becker, K., Peters, G., & Löffler, B. (2011). *Staphylococcus aureus* phenotype switching: An effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. *EMBO Molecular Medicine*, *3*(3), 129-141. <https://doi.org/10.1002/emmm.201000115>
- Ueta, M., Wada, C., Bessho, Y., Maeda, M., & Wada, A. (2017). Ribosomal protein L31 in *Escherichia coli* contributes to ribosome subunit association and translation, whereas short L31 cleaved by protease 7 reduces both activities. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, *22*(5), 452-471. <https://doi.org/10.1111/gtc.12488>
- Unoson, C., & Wagner, E. G. H. (2008). A small SOS-induced toxin is targeted against the inner membrane in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, *70*(1), 258-270. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06416.x>
- Urish, K. L., & Cassat, J. E. (2020). *Staphylococcus aureus* osteomyelitis: Bone, bugs, and surgery. *Infection and Immunity*, *88*(7), e00932-19. <https://doi.org/10.1128/IAI.00932-19>
- 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*(1-2), 186-194. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.023>
- Van den Bergh, B., Fauvart, M., & Michiels, J. (2017). Formation, physiology, ecology, evolution and clinical importance of bacterial persisters. *FEMS Microbiology Reviews*, *41*(3), 219-251. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux001>
- Van den Berg, S., de Vogel, C. P., van Belkum, A., & Bakker-Woudenberg, I. A. J. M. (2015). Mild *Staphylococcus aureus* skin infection improves the course of subsequent endogenous *S. aureus* bacteremia in mice. *PloS One*, *10*(6), e0129150. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129150>

- Van Hal, S. J., Jensen, S. O., Vaska, V. L., Espedido, B. A., Paterson, D. L., & Gosbell, I. B. (2012). Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(2), 362-386. <https://doi.org/10.1128/CMR.05022-11>
- Van Wamel, W. J. B., Rooijackers, 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. *Journal of Bacteriology*, 188(4), 1310-1315. <https://doi.org/10.1128/JB.188.4.1310-1315.2006>
- Vázquez-Laslop, N., Lee, H., & Neyfakh, A. A. (2006). Increased persistence in *Escherichia coli* caused by controlled expression of toxins or other unrelated proteins. *Journal of Bacteriology*, 188(10), 3494-3497. <https://doi.org/10.1128/JB.188.10.3494-3497.2006>
- Vega, N. M., Allison, K. R., Khalil, A. S., & Collins, J. J. (2012). Signaling-mediated bacterial persister formation. *Nature Chemical Biology*, 8(5), 431-433. <https://doi.org/10.1038/nchembio.915>
- Verstraeten, N., Gkekas, S., Kint, C. I., Deckers, B., Van den Bergh, B., Herpels, P., Louwagie, E., Knapen, W., Wilmaerts, D., Dewachter, L., Fauvart, M., Singh, R. K., Michiels, J., & Versées, W. (2019). Biochemical determinants of ObgE-mediated persistence. *Molecular Microbiology*, 112(5), 1593-1608. <https://doi.org/10.1111/mmi.14382>
- 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. *Molecular Cell*, 59(1), 9-21. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.011>
- Vestergaard, M., Frees, D., & Ingmer, H. (2019). Antibiotic resistance and the MRSA problem. *Microbiology Spectrum*, 7(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0057-2018>
- Viducic, D., Ono, T., Murakami, K., Susilowati, H., Kayama, S., Hirota, K., & Miyake, Y. (2006). Functional analysis of *spoT*, *relA* and *dkxA* genes on quinolone tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* under nongrowing condition. *Microbiology and Immunology*, 50(4), 349-357. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2006.tb03793.x>
- Visansirikul, S., Kolodziej, S. A., & Demchenko, A. V. (2020). *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides: A structural and synthetic perspective. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 18(5), 783-798. <https://doi.org/10.1039/c9ob02546d>
- Vogel, J., Argaman, L., Wagner, E. G. H., & Altuvia, S. (2004). The small RNA IstR inhibits synthesis of an SOS-induced toxic peptide. *Current Biology: CB*, 14(24), 2271-2276. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.12.003>
- Von Eiff, C., Becker, K., Machka, K., Stammer, H., & Peters, G. (2001). Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. *The New England Journal of Medicine*, 344(1), 11-16. <https://doi.org/10.1056/NEJM200101043440102>
- Wang, R., Shu, X., Zhao, H., Xue, Q., Liu, C., Wu, A., Cheng, F., Wang, L., Zhang, Y., Feng, J., Wu, N., & Li, M. (2023). Associate toxin-antitoxin with CRISPR-Cas to kill multidrug-resistant pathogens. *Nature Communications*, 14(1), 2078. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37789-y>
- Wang, X., Kan, Y., Bai, K., Xu, X., Chen, X., Yu, C., Shi, J., Jiang, N., Li, J., & Luo, L. (2023). A novel double-ribonuclease toxin-antitoxin system linked to the stress response and survival of *Acidovorax citrulli*. *Microbiology Spectrum*, 11(6), e0216923. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02169-23>
- 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. *Nature Chemical Biology*, 8(10), 855-861. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1062>
- Wang, X., Yao, J., Sun, Y.-C., & Wood, T. K. (2021). Type VII toxin/antitoxin classification system for antitoxins that enzymatically neutralize toxins. *Trends in Microbiology*, 29(5), 388-393. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.12.001>

- Waters, L. S., & Storz, G. (2009). Regulatory RNAs in bacteria. *Cell*, 136(4), 615-628. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.043>
- Weidenmaier, C., Kokai-Kun, J. F., Kristian, S. A., Chanturiya, T., Kalbacher, H., Gross, M., Nicholson, G., Neumeister, B., Mond, J. J., & Peschel, A. (2004). Role of teichoic acids in *Staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. *Nature Medicine*, 10(3), 243-245. <https://doi.org/10.1038/nm991>
- 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*. *Infection and Immunity*, 86(5), e00032-18. <https://doi.org/10.1128/IAI.00032-18>
- 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. *The Lancet. Infectious Diseases*, 5(12), 751-762. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)70295-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70295-4)
- Wertheim, H. F. L., Vos, M. C., Ott, A., van Belkum, A., Voss, A., Kluytmans, J. A. J. W., van Keulen, P. H. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., Meester, M. H. M., & Verbrugh, H. A. (2004). Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. *Lancet (London, England)*, 364(9435), 703-705. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16897-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16897-9)
- Wexselblatt, E., Oppenheimer-Shaanan, Y., Kaspary, I., London, N., Schueler-Furman, O., Yavin, E., Glaser, G., Katzhendler, J., & Ben-Yehuda, S. (2012). Relacin, a novel antibacterial agent targeting the stringent response. *PLoS Pathogens*, 8(9), e1002925. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002925>
- Wilde, A. D., Snyder, D. J., Putnam, N. E., Valentino, M. D., Hammer, N. D., Lonergan, Z. R., Hinger, S. A., Aysanoa, E. E., Blanchard, C., Dunman, P. M., Wasserman, G. A., Chen, J., Shopsin, B., Gilmore, M. S., Skaar, E. P., & Cassat, J. E. (2015). Bacterial hypoxic responses revealed as critical determinants of the host-pathogen outcome by TnSeq analysis of *Staphylococcus aureus* invasive infection. *PLoS Pathogens*, 11(12), e1005341. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005341>
- 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(4), e00744-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.00744-18>
- Wilmaerts, D., Dewachter, L., De Loose, P.-J., Bollen, C., Verstraeten, N., & Michiels, J. (2019). HokB monomerization and membrane repolarization control persister awakening. *Molecular Cell*, 75(5), 1031-1042.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.06.015>
- Windels, E. M., Michiels, J. E., Fauvart, M., Wenseleers, T., Bergh, B. V. den, & Michiels, J. (2019). Bacterial persistence promotes the evolution of antibiotic resistance by increasing survival and mutation rates. *The ISME Journal*, 13(5), 1239. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0344-9>
- Winstel, V., Kühner, P., Salomon, F., Larsen, J., Skov, R., Hoffmann, W., Peschel, A., & Weidenmaier, C. (2015). Wall teichoic acid glycosylation governs *Staphylococcus aureus* nasal colonization. *mBio*, 6(4), e00632. <https://doi.org/10.1128/mBio.00632-15>
- Wollenberg, M. S., Claesen, J., Escapa, I. F., Aldridge, K. L., Fischbach, M. A., & Lemon, K. P. (2014). Propionibacterium-produced coproporphyrin III induces *Staphylococcus aureus* aggregation and biofilm formation. *mBio*, 5(4), e01286-01214. <https://doi.org/10.1128/mBio.01286-14>
- Wright, P. R., Georg, J., Mann, M., Sorescu, D. A., Richter, A. S., Lott, S., Kleinkauf, R., Hess, W. R., & Backofen, R. (2014). CopraRNA and IntaRNA: Predicting small RNA targets, networks and interaction domains. *Nucleic Acids Research*, 42(Web Server issue), W119-123. <https://doi.org/10.1093/nar/gku359>
- Wu, N., He, L., Cui, P., Wang, W., Yuan, Y., Liu, S., Xu, T., Zhang, S., Wu, J., Zhang, W., & Zhang, Y. (2015). Ranking of persister genes in the same *Escherichia coli* genetic background demonstrates varying importance of individual persister genes in tolerance to different antibiotics. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1003. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01003>

- Xu, J., Wang, Y., Liu, F., Duan, G., & Yang, H. (2023). Genome mining reveals the prevalence and extensive diversity of toxin–antitoxin systems in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1165981>
- Yang, J., Bowring, J. Z., Krusche, J., Lehmann, E., Bejder, B. S., Silva, S. F., Bojer, M. S., Grunert, T., Peschel, A., & Ingmer, H. (2023). Cross-species communication via *agr* controls phage susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *Cell Reports*, *42*(9), 113154. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.113154>
- Yang, Y.-H., Jiang, Y.-L., Zhang, J., Wang, L., Bai, X.-H., Zhang, S.-J., Ren, Y.-M., Li, N., Zhang, Y.-H., Zhang, Z., Gong, Q., Mei, Y., Xue, T., Zhang, J.-R., Chen, Y., & Zhou, C.-Z. (2014). Structural insights into SraP-mediated *Staphylococcus aureus* adhesion to host cells. *PLoS Pathogens*, *10*(6), e1004169. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004169>
- Young, B. C., Golubchik, T., Batty, E. M., Fung, R., Lerner-Svensson, H., Votintseva, A. A., Miller, R. R., Godwin, H., Knox, K., Everitt, R. G., Iqbal, Z., Rimmer, A. J., Cule, M., Ip, C. L. C., Didelot, X., Harding, R. M., Donnelly, P., Peto, T. E., Crook, D. W., ... Wilson, D. J. (2012). Evolutionary dynamics of *Staphylococcus aureus* during progression from carriage to disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(12), 4550-4555. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113219109>
- Zanger, P., Nurjadi, D., Gaile, M., Gabrysch, S., & Kremsner, P. G. (2012). Hormonal contraceptive use and persistent *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *55*(12), 1625-1632. <https://doi.org/10.1093/cid/cis778>
- Zapf, R. L., Wiemels, R. E., Keogh, R. A., Holzschu, D. L., Howell, K. M., Trzeciak, E., Caillet, A. R., King, K. A., Selhorst, S. A., Naldrett, M. J., Bose, J. L., & Carroll, R. K. (2019). The small RNA Teg41 regulates expression of the alpha phenol-soluble modulins and is required for virulence in *Staphylococcus aureus*. *mBio*, *10*(1), e02484-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.02484-18>
- Zapotoczna, M., Jevnikar, Z., Miajlovic, H., Kos, J., & Foster, T. J. (2013). Iron-regulated surface determinant B (IsdB) promotes *Staphylococcus aureus* adherence to and internalization by non-phagocytic human cells. *Cellular Microbiology*, *15*(6), 1026-1041. <https://doi.org/10.1111/cmi.12097>
- Zapotoczna, M., O'Neill, E., & O'Gara, J. P. (2016). Untangling the diverse and redundant mechanisms of *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *PLoS Pathogens*, *12*(7), e1005671. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005671>
- Zhang, L., Jacobsson, K., Vasi, J., Lindberg, M., & Frykberg, L. (1998). A second IgG-binding protein in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology (Reading, England)*, *144* ( Pt 4), 985-991. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-4-985>
- Zhang, T., Tamman, H., Coppieters 't Wallant, K., Kurata, T., LeRoux, M., Srikant, S., Brodiazhenko, T., Cepauskas, A., Talavera, A., Martens, C., Atkinson, G. C., Haurlyuk, V., Garcia-Pino, A., & Laub, M. T. (2022). Direct activation of a bacterial innate immune system by a viral capsid protein. *Nature*, *612*(7938), 132-140. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05444-z>
- Zhou, S., Rao, Y., Li, J., Huang, Q., & Rao, X. (2022). *Staphylococcus aureus* small-colony variants: Formation, infection, and treatment. *Microbiological Research*, *260*, 127040. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127040>
- Zipperer, A., Konnerth, M. C., Laux, C., Berscheid, A., Janek, D., Weidenmaier, C., Burian, M., Schilling, N. A., Slavetinsky, C., Marschal, M., Willmann, M., Kalbacher, H., Schitteck, B., Brötz-Oesterhelt, H., Grond, S., Peschel, A., & Krismer, B. (2016). Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. *Nature*, *535*(7613), 511-516. <https://doi.org/10.1038/nature18634>
- Zou, J., Peng, B., Qu, J., & Zheng, J. (2021). Are bacterial persisters dormant cells only? *Frontiers in Microbiology*, *12*, 708580. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.708580>
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, *31*(13), 3406-3415. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg595>

**Titre : SprG1/SprF1, un système toxine-antitoxine de *Staphylococcus aureus* : caractérisation, analyse du targetome de l'antitoxine SprF1 et lien avec la tolérance aux antibiotiques**

**Mots clés :** *Staphylococcus aureus*, systèmes toxine-antitoxine, antitoxine SprF1, RpmE2, tolérance aux antibiotiques

**Résumé :** Les bactéries au métabolisme ralenti (tolérantes et persistantes) sont capables de survivre aux antibiotiques ce qui contribue à l'échec des traitements et à la rechute des infections. Les systèmes toxine-antitoxine (TA) font partie des mécanismes participant à la formation des bactéries tolérantes/persistantes. Chez *Staphylococcus aureus*, un pathogène humain majeur, l'antitoxine ARN SprF1 appartenant au système TA de type I SprG1/SprF1, peut se fixer sur les ribosomes ce qui entraîne une atténuation de la traduction et favorise la formation des bactéries persistantes. Afin de mieux comprendre le rôle de SprF1 dans l'adaptation de *S. aureus* aux antibiotiques, nous nous sommes intéressés à l'étude de la régulation du système SprG1/SprF1 et à l'identification du targetome de SprF1. Par des approches *in silico* et par la technique MAPS (MS2 Affinity Purification coupled with RNA

Sequencing), nous avons mis en évidence 12 cibles ARNm de SprF1, dont l'ARNm *sprG1*. Nous avons ensuite démontré que SprF1 interagit, *in vitro*, avec les ARNm *yidC* et *rpmE2*, le premier codant une protéine insertase et le second la protéine ribosomale L31, et que cette interaction entraîne une modulation de l'expression des protéines YidC et RpmE2. Par la suite, nous avons observé que la surexpression de *rpmE2* favorise la tolérance aux antibiotiques ce qui pourrait contribuer au phénotype de persistance induit par SprF1. Les résultats présentés dans ce travail de thèse montrent donc que certaines antitoxines de type I agissent comme des ARN régulateurs typiques qui, en interagissant avec plusieurs cibles, ont un rôle dans l'adaptation des bactéries à leur environnement.

**Title: SprG1/SprF1, a *Staphylococcus aureus* toxin-antitoxin system: characterization, deciphering of the SprF1 antitoxin targetome and link to antibiotic tolerance**

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, toxin-antitoxin systems, SprF1 antitoxin, RpmE2, antibiotic tolerance

**Abstract:** Slow-growing bacteria, referred as tolerant and persistent, are able to survive antibiotics, which contributes to treatment failures and relapsing infections. Among others, type I toxin-antitoxin (TA) systems have been linked to slow-growing bacteria formation. In *Staphylococcus aureus*, a major human pathogen, the SprF1 RNA antitoxin belonging to the type I SprG1/SprF1 TA system, can bind ribosomes to inhibit global translation and promote persister cells formation. To better understand the role of SprF1 in *S. aureus* antibiotic adaptation, we studied the regulation of the SprG1/SprF1 system and deciphered the SprF1 targetome. Using *in silico* analyses and MAPS (MS2 Affinity Purification coupled with RNA

Sequencing), we uncovered 12 SprF1 mRNA targets, including *sprG1* mRNA. Then, we demonstrated that SprF1 interacts, *in vitro*, with the *yidC* and *rpmE2* mRNAs, the former encoding a protein insertase and the latter the ribosomal protein L31, and that this interaction can modulate YidC and RpmE2 protein expression. Subsequently, we observed that *rpmE2* overexpression promotes antibiotic tolerance, which could contribute to the persistence phenotype induced by SprF1. Altogether, these findings highlight that some type I RNA antitoxins behave like typical regulatory RNAs, by interacting with several targets to participate in bacteria adaptation to their environment.