THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

pour le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Biologie et sciences de la santé

Ecole doctorale Vie Agro Santé

présentée par

Régine Brielle

Préparée à l'unité de recherche Inserm U835
Biochimie pharmaceutique
Faculté de pharmacie

Etude fonctionnelle d'un système toxine-antitoxine de type I exprimé par *Staphylococcus aureus* et d'ARN régulateurs associés aux ribosomes bactériens.

Thèse soutenue à Rennes

Le vendredi 09 décembre 2016

devant le jury composé de :

Pascale Romby
DR1 CNRS-IBMC/ *rapporteur*

Fabien Darfeuille
CR1 Inserm U1212 / *rapporteur*

Ciaràn Condon
DR1 UMR8261/ *examinateur*

Marie-Dominique Galibert
PU-PH IGDR/ *examinateur*

Marie-Laure Pinel-Marie
MCU Inserm U835/ *co-directrice de thèse*

Brice Felden
PU Inserm U835 / *directeur de thèse*

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie tout particulièrement Marie-Laure Pinel-Marie, ma co-directrice de thèse pour avoir dirigé mes travaux, pour sa grande disponibilité et ses nombreux conseils.

Je remercie également Brice Felden, mon directeur de thèse, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Je veux aussi remercier l'ensemble des membres du laboratoire qui m'ont été d'une grande aide et d'un grand soutient autant au niveau scientifique que moral. Pour tout ça un grand merci à tous, sans aucune exception.

Un merci spécial à Tony Mauro et Lorraine Ivain, membres de la fine équipe d'animation du laboratoire et à l'ensemble de l'équipe des thésards : Tony Mauro, Lorraine Ivain, Camille Riffaud et Julie Bronssard à qui je souhaite bon courage pour la poursuite de leur thèse.

Un merci particulier à Noëlla Amiot avec qui j'ai partagé un bureau pendant ces quatre années de thèse et qui a su m'écouter quand j'en avais besoin, se taire aussi quand j'en avais besoin et surtout qui ne s'est jamais plaint de mes mauvaises humeurs. Merci aussi à Valérie Bordeau, ma psychologue du boulot, pour m'avoir souvent écouté pleurer. Merci à Nathalie Ramage et Nadège Thuia pour leur bonne humeur. Merci à Yoann Augagneur, Gaëtan Pascreau et Mohamed Sassi pour les corrections en anglais et pour m'avoir obligée à me perfectionner dans la réalisation de cheese-cakes. Merci à Svetlana Chabelskaya, Astrid Rouillon et Hélène Le Pabic pour les précieux conseils. Merci à Marc Hallier d'avoir été à mes côtés dans un moment difficile. Merci à Annick Le fèvre et Nadège Thuia à qui mes neufs contrats de travail ont donné beaucoup de travail.

Un grand merci à mon conjoint pour m'avoir supportée et soutenue en ces temps difficiles et à Louis pour être un petit garçon aussi adorable et aussi facile à élever. Merci à l'ensemble des membres de ma famille et de mes amis pour m'avoir épaulée, ainsi qu'à mon assistante maternelle d'avoir accepté de s'adapter à mes horaires pour que je puisse mener à bien cette thèse.

A vous tous ainsi qu'aux autres, un grand merci !

Table des matières

Remerciements 2

Liste des figures 6

Liste des tableaux 9

Liste des Annexes 9

Liste des abréviations 10

Staphylococcus aureus 14

1. Caractéristiques générales 14
2. Commensalisme de *S. aureus* 15
3. Pathogénie de *S. aureus* 16
   a. La diversité génomique 17
   b. Les facteurs de virulence 19
   c. L'adaptation rapide aux stress environnementaux 25
   d. La résistance aux antibiotiques 30
   e. La formation de biofilms 32
   f. L'entrée en état de persistance 33
   g. Les principaux régulateurs de la pathogénie de *S. aureus* 37

Systèmes toxine-antitoxine de type I 49

1. Les systèmes toxine-antitoxine 49
   a. Caractéristiques communes 49
   b. Six types de systèmes toxine-antitoxine 51
2. Les systèmes toxine-antitoxine de type I 57
   a. Les différents mécanismes de régulation mis en jeu par l'antitoxine pour réguler l'expression de la toxine 57
   b. Les mécanismes d'action et fonctions biologiques des toxines 67

Article I 69

Les régulateurs de la traduction bactérienne 78

1. La traduction bactérienne 78

a. L'initiation 79
b. L'élongation 80
c. La terminaison et le recyclage 81
2. Les régulateurs de la traduction 83
a. Les protéines régulatrices 83
b. Les ARN régulateurs 90
Contexte de la thèse 100
- Partie I - 103
Etude fonctionnelle d'un système toxine-antitoxine de type I exprimé par *Staphylococcus aureus* 103
Introduction et objectifs 104
Résultats 104
1. Article 2: « Dual Toxic-Peptide-Coding *Staphylococcus aureus* RNA under Antisense Regulation Targets Host Cells and Bacterial Rivals Unequally » 105
Article II 108
2. Identification *in vivo* de l'expression des peptides natifs 121
3. Identification de la fonction biologique du STA *sprG1*/SprF1 122
a. Etude de l'implication de *sprG1*/SprF1 dans la résistance aux antibiotiques de *S. aureus* 122
b. Etude de l'implication de *sprG1*/SprF1 dans la formation de biofilms chez *S. aureus* 124
c. Etude de l'implication de *sprG1*/SprF1 dans l'adaptation de *S. aureus* à différents stress environnementaux 125
d. Mise en évidence du ou des nutriments carencés responsable(s) de l'activation du STA *sprG1*/SprF1 chez *S. aureus* 129
Conclusion 137
- Partie II - 138
Etude fonctionnelle d'ARN régulateurs associés aux ribosomes bactériens 138
Introduction et objectifs 139
1. Mise en évidence de fragments d'ARN associés aux ribosomes de *S. aureus* 140

2. Etude fonctionnelle du fragment « 2566 » 143

3. Article 3: « Purification, identification, and functional analysis of polysomes from the human pathogen *Staphylococcus aureus* » 146

Article III 147

4. Article 4: « Ribosome grab by a small RNA decelerates translation and triggers bacterial persistence » 156

Conclusion 160

Article IV 161

Discussion 203

Conclusion 216

Annexes 218

Références 224

Liste des figures

Figure 1: Taux de portage de *S. aureus* en fonction du site anatomique dans la population globale adulte 15
Figure 2: Grande diversité des infections à *S. aureus* 17
Figure 3: Séquençage du génome complet de la souche *S. aureus* résistant à la méthicilline N315 18
Figure 4 : Fonctions des protéines fixées aux parois bactériennes de *S. aureus* (CWA pour Cell Wall-Anchored) exprimées par *S. aureus*. 21
Figure 5 : L'agglutination de *S. aureus* avec la fibrine fournit une protection contre les phagocytes.. 23
Figure 6 : Exemples de cytotoxines exprimées par *S. aureus* nécessitant la présence de récepteurs protéiques pour former des pores. 24
Figure 7 : Schéma de l'intersection entre la réponse stringente et le répresseur CodY. 28
Figure 8: Historique de l'acquisition des résistances aux antibiotiques successives par les Staphylocoques dorés. 31
Figure 9 : Modèle du cycle de croissance du biofilm chez *S. aureus*. 32
Figure 10 : Modèle décrivant la régulation de l'expression du superantigène TSST-1 par SarA chez *S. aureus*. 38
Figure 11 : Le système quorum sensing *agr*. 39
Figure 12 : Mécanismes d'action de l'ARNIII sur ces ARNm cibles. 43
Figure 13 : Répression de la traduction de l'ARNm *sbi* par SprD. 44
Figure 14 : ARN et facteurs transcriptionnels liant le métabolisme et la virulence chez *S. aureus*. 48
Figure 15 : Mécanisme de « mort post-ségrégationnelle » ou PSK. 50
Figure 16 : Principales caractéristiques des STA de type I. 51
Figure 17 : Principales caractéristiques des STA de type II. 52
Figure 18 : Mode d'action de la toxine ToxN exprimée par la bactérie à Gram négatif *Pectobacterium atrosepticum*. 54
Figure 19 : Principales caractéristiques du STA de type IV. 55
Figure 20 : Principales caractéristiques du STA de type V. 56
Figure 21 : Principales caractéristiques du STA de type VI. 57

Figure 22 : Mécanisme d'inhibition de l'expression de la toxine *txpA* par l'antitoxine RatA......60
Figure 23 : Mécanisme d'inhibition de la traduction de *hok* par l'antitoxine Sok......61
Figure 24 : Mécanisme d'inhibition de la traduction de la toxine SymE par l'antitoxine SymR......62
Figure 25 : Mécanisme d'inhibition de la traduction de RNAI par l'antitoxine RNAII. ...63
Figure 26 : Modèle proposé d'inhibition de la traduction de l'ARNm *sprA1* en *trans* par l'antitoxine $SprA1_{AS}$ codée en *cis*......64
Figure 27 : Mécanisme d'inhibition de la traduction de la toxine *tisB* par l'antitoxine IstR-1.. 65
Figure 28 : Mécanisme d'activation de la dégradation de l'ARNm bsrG et d'inhibition de la traduction de bsrG par l'antitoxine SR4. 66
Figure 29 : Schéma d'un ribosome en cours de traduction 78
Figure 30 : Représentation schématique de l'ensemble des étapes de la traduction bactérienne......82
Figure 31 : Modèle du mode d'action de RelA en condition optimale et en condition de carence nutritive......87
Figure 32 : Schéma du mécansime de résistance à l'acide fusidique (FA) médiée par les protéines de type FusB......89
Figure 33 : Exemple d'un riboswitch où la fixation du ligand sur l'aptamère séquestre le RBS et inhibe la traduction de l'ARNm 90
Figure 34 : Schéma d'un ARNrég ciblant le RBS de son ARNm cible. 92
Figure 35 : Schéma d'un ARNrég ciblant une séqence située en amont du RBS de son ARNm cible......93
Figure 36 : Schéma d'un ARNrég ciblant un cadre ouvert de lecture (ORF) leader. 94
Figure 37 : Schéma d'un ARNrég activateur de la traduction. 95
Figure 38 : Vue d'ensemble du complexe ribosomique bloqué.....97
Figure 39 : Clivages de Val-tRF......98
Figure 40 : Analyse du profil de résistance aux antibiotiques de *S. aureus* N315 en fonction du niveau d'expression du STA *sprG1*/SprF1. 124
Figure 41 : Etude de la délétion du STA *sprG1*/SprF1 sur la formation de biofilms par *S. aureus*......125
Figure 42 : Influence des stress environnementaux sur l'expression de SprF1 et sprG1 et sur l'expression de PepG144 et PepG131. 127
Figure 43 : Influence de la carence nutritive sur l'activation du STA *sprG1*/SprF1. 128

Figure 44 : Mise en évidence de l'effet de la délétion du STA *sprG1*/SprF1 dans la croissance de *S. aureus* en milieu carencé en acides aminés ramifiés (BCAA)......130
Figure 45 : Mise en évidence de l'effet de la délétion du STA *sprG1*/SprF1 dans la croissance de *S. aureus* en milieu carencé en leucine......131
Figure 46 : Etude de l'expression des ARN *sprG1* et SprF1 et des peptides $PepG1_{44}$ et $PepG1_{31}$ après culture de *S. aureus* en condition de carence en leucine......132
Figure 47 : Analyse de l'effet de la délétion du STA *sprG1*/SprF1 sur l'expression des deux répresseurs transcriptionnels CodY et Gcp et de l'activateur transcriptionnel CcpA en condition de carence en leucine......134
Figure 48 : Analyse de l'effet de la délétion du STA *sprG1*/SprF1 sur l'expression des gènes de l'opéron *ilv-leu* en condition de carence en leucine......135
Figure 49 : Modèle de la dérépression de *sprG1* en condition de carence nutritive globale......137
Figure 50 : Exemple d'un profil de fractions ribosomales de *S. aureus*......141
Figure 51 : Etude de l'expression par Northern blot d'un fragment d'ARNt et des fragments d'ARN 5S dans la fraction ribosomale de *S. aureus*......143
Figure 52 : Mise en évidence du rôle de la RNaseY et de la RNaseIII dans le clivage de SprF1 en fragment 3'-SprF1. 144
Figure 53 : SprF1 est capable de s'associer aux ribosomes *in vitro*......145
Figure 54 : Modèle hypothétique résumant les connaissances actuelles sur les mécanismes d'action et les fonctions de SprF1. 160
Figure 55 : Structure primaire des peptides $PepG1_{31}$ et $PepG1_{44}$ 206
Figure 56 : Structure tridimensionnelle de $PepG1_{31}$ obtenue par résonance magnétique nucléaire 207
Figure 57 : Alignement de séquences des ARN SprF exprimés par *S. aureus*......215

Liste des tableaux

Tableau 1: Taxonomie de *Staphylococcus aureus* 14
Tableau 2 : Eléments génétiques mobiles (EGM) retrouvés chez *S. aureus*. 19
Tableau 3 : Adaptations majeurs de *S. aureus* aux signaux environnementaux (Dastgheyb & Otto, 2015) 26
Tableau 4 : Mutations décrites chez les SCV de *S. aureus*. 35
Tableau 5 : Caractérisiques des SCV décrites de *S. aureus*, comparé aux souches parentales. 36
Tableau 6 : Caractéristiques de certains loci de STA de type I décrits.. 59

Liste des Annexes

Annexe 1 : Résultats de spectrométrie de masse. 219
Annexe 2 : Séquences des amorces d'ADN utilisés en NB et qPCR 220
Annexe 3 : Répartition de $PepG1_{31}$ et $PepG1_{44}$ dans les différents compartiments cellulaires en fonction des conditions de croissance. 221
Annexe 4 : Mise en évidence du groupe de nutriments impliqué dans l'activation du STA *sprG1*/SprF1 en carence nutritive. 222
Annexe 5 : Influence de la carence nutritive sur l'activation du STA *sprG1*/SprF1 après culture de *S. aureus* en milieu TSB dilué au 1/10. 223

Liste des abréviations

A	Adénine
aa-ARNt	ARNt aminoacylé
aaRS	aminoacyl-ARNt synthétases
ADN	Acide DésoxyiboNucléique
ADP	Adénosine DiPhosphate
AIP	Auto-Inducing Peptide
AMP	Adésonise MonoPhosphate
APART	Automated Pipeline for Analysis of RNA Transcripts
ARN	Acide RiboNucléique
ARNlas	ARN antisens long
ARNm	ARN messager
ARNnc	ARN non codant
ARNr	ARN ribosomal
ARNrég	ARN régulateur
ARNsno	small nucleolar RNA
ARNt	ARN de transfert
ARNtm	ARN transfer-messager
Atl	Autolysine
ATP	Adénosine TriPhosphate
BCAA	Branched Chain Amino Acids
C	Cytosine
CHIPS	CHemotaxis Inhibitory Protein of *S. aureus*
Clf	Clumping factor
Coa	Staphylocoagulase
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CWA	Cell Wall-Anchored
DC	Dendritic Cells
DC	Decoding Center
DR	Direct Repeat
Eap	Extracellular adherence protein
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EF	Elongation Factor
EGM	Elémént Génétique Mobile
Emp	Extracellular matrix binding protein
ERO	Espèce Réactive de l'Oxygène
EttA	Energy-dependent Translational Throttle
Fg	Fibrinogène
fMet	formylMéthionine
Fn	Fibronectine
FnBP	Fibronectin-Binding Protein
G	Guanine
GDP	Guanosine Diphosphate
GTP	Guanosine TriPhosphate

HPF	Hibernation Promoting Factor
IC	Initiation Factor
IF	Initiation Factor
Ig	Immunoglobuline
Il	Interleukine
LB	Luria-Bertani
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
MHC	Major Histocompatibility Complex
MSCRAMM	Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules
NO	Oxyde nitrique
ORF	Open Reading Frame
PBP	Penicillin-Binding Protein
pH	potentiel Hydrogène
PMN	Cellules PolyMorphoNucléaires
ppGpp	guanosine 5',3'-(bis) diphosphate
PPi	PyroPhosphate inorganique
pppGpp	guanosine 5'-triphosphate,3'-diphosphate
PSK	Post-Segregational Killing
PSM	Phnol-Soluble Moduline
pt-ARNt	Peptidyl-ARNt
PTC	Peptidyl Transfer Center
PTS	PhosphoTransferase System
PVL	Panton-Valentine Leukocidine
pY	Protéine Y
RBC	Red Blood Cell
RBS	Ribosome Binding Site
RBS	Ribosome Binding Site
RF	Release Factor
RIT	Région d'initiation de la Traduction
RMF	Ribosome Modulation Factor
Rnase	Ribonucléase
RPP	Ribosomal Protection Protein
RRF	Ribosome Recycling Factor
RsfS	Ribosomal silencing factor
S	Unité Svedberg
SAK	Staphylokinase
SARM	Staphylococcus aureus résistants à la méthicilline
Sar	Staphylococcal accessory regulator
SCC	Staphylococcal Cassette Chromosome
SCV	Small Colony Variants
SD	Séquence Shine-Dalgarno
Sdr	Shine-Dalgarno repeat-containing
SelX	Staphylococcal enterotoxin-like toxin X
SERAM	Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules

SI	Système Immunitaire
SmpB	Small protein B
SoVG	Stage V Sporulation protein G
Spr	Small pathogenicity island rNA
SSL10	S. aureus Superantigen-Like 10
SSR	Small Stable RNA
SSTI	Skin and soft tissue infections
STA	Système Toxine-Antitoxine
T	Thymine
TCA	TriCarboxyl Acid
TCS	Two-Component System
Tn	Eléments transposables
tRF	tRNA Fragment
TSST	Toxic Shock Syndrome Toxin
U	Uracile
UTR	UnTranslated Region
Vn	Vitronectine
vWF	Facteur de von Willebrand
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
PVC	Poly(Vinyl Chloride)
TPR	Tampon Profil Ribosome
TPP	Tampon Profil Polysomes
FFR	Formylated Peptide Receptor
EM	Electron Microscopy

Introduction

Staphylococcus aureus

1. Caractéristiques générales

Le chirurgien écossais Alexander Ogston isolat pour la première fois la bactérie en 1880 à partir d'un abcès chirurgical (Ogston, 1881). Il lui donna le nom de genre Staphylococcus de la racine grecque « staphyle » qui signifie « grappe » et kokkos qui signifie « baie » (Ogston, 1882). En 1884, le physicien Allemand Friedrich Julius Rosenbach a ensuite différencié les staphylococcies isolées chez l'Homme en fonction de la pigmentation de leurs colonies. L'espèce synthétisant la staphyloxanthine, un caroténoïde membranaire, pris alors de nom de *aureus* du Latin *aurum* pour la couleur dorée de ses colonies (Thomer *et al.*, 2016) (**Tableau 1**).

Règne	***Bacteria***
Division	*Firmicutes*
Classe	*Bacilli*
Ordre	*Bacillales*
Famille	*Staphylococcaceae*
Genre	*Staphylococcus*
Espèce	*aureus*

Tableau 1: Taxonomie de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) se présente sous forme de coques à Gram positif immobiles et regroupés en grappes de raisin mesurant 1 μm de diamètre. Biochimiquement, cette bactérie se caractérise par l'absence d'oxydase et la présence de catalase et de coagulase. *S. aureus* est la seule espèce de Staphylocoques capable de coloniser l'Homme à posséder le caractère coagulase positif (Thomer *et al.*, 2016). La bactérie présente une forte capacité d'adaptation à son environnement puisqu'il s'agit d'une bactérie anaérobie facultative, halophile et mésophile avec une croissance optimale à 37°C mais elle est capable de tolérer des températures allant de 15 à 45°C. Elle est également capable de synthétiser une capsule dont la production dépend des conditions environnementales et d'un réseau de régulation très complexe (Lei & Lee, 2015). Ces capacités d'adaptation font de *S. aureus* une bactérie versatile capable de coloniser la majorité des organes et des tissus de l'Homme et de l'animal (Botelho *et al.*, 2016, Bosch *et al.*, 2016).

2. Commensalisme de *S. aureus*

S. aureus est une bactérie commensale, c'est-à-dire qu'elle vit aux dépens de son hôte la majorité du temps sans lui être nuisible. C'est un commensal de l'Homme mais également de certains animaux avec des transmissions zoo-anthroponotiques. Chez l'Homme, *S. aureus* est capable de coloniser la peau et les muqueuses en différents sites anatomiques comme le pharynx, le périnée, le tractus gastro-intestinal, le vagin et les aisselles (Claassen-Weitz *et al.*, 2016, Thomer *et al.*, 2016, Wertheim *et al.*, 2005, Holtfreter *et al.*, 2009). Il est également fortement retrouvé dans les fosses nasales (**Figure 1**) (Holtfreter *et al.*, 2009, Williams, 1963).

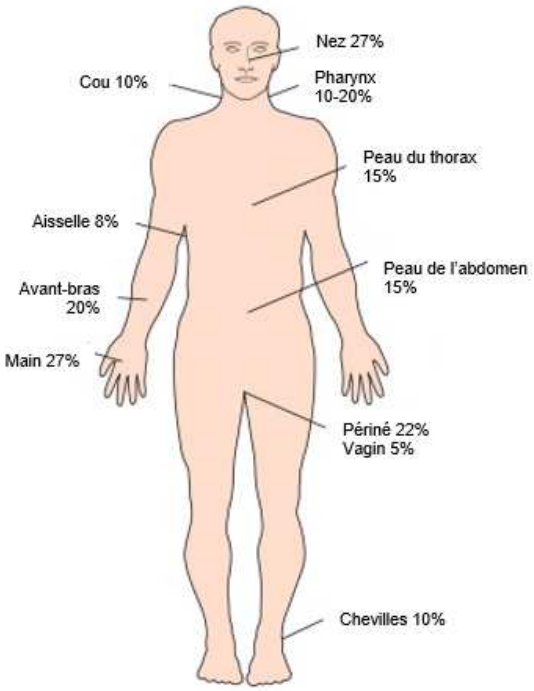


Figure 1: Taux de portage de *S. aureus* en fonction du site anatomique dans la population globale adulte (adaptée de (Wertheim *et al.*, 2005)).

La population générale adulte a été divisée en trois groupes en fonction du portage sain de *S. aureus* au niveau des fosses nasales : les non porteurs, les porteurs intermittents, dont les souches diffèrent généralement au cours du temps, et les porteurs permanents qui, à l'inverse, ne portent souvent qu'une seule souche (Noble *et al.*, 1964, Wertheim *et al.*, 2005). La colonisation nasale permanente est l'un des facteurs de risque important pour des infections à *S. aureus* (Verhoeven *et al.*, 2014). Le lien entre colonisation et infection est supporté par le fait que les souches de *S. aureus* de portage nasale et d'infection sont généralement identiques (Wertheim *et al.*, 2005).

3. Pathogénie de *S. aureus*

La plupart des bactéries sont connues pour être bénéfiques à l'Homme. Si l'on tient compte de leur capacité à causer une infection, seulement une minorité d'entre elles apparaissent comme néfastes (Alibayov *et al.*, 2014) : ce sont les bactéries pathogènes. C'est le cas de *S. aureus*, un pathogène humain majeur impliqué dans de nombreuses infections communautaires et nosocomiales. En effet, il s'agit de la deuxième cause d'infections acquises en milieu hospitalier après *Escherichia coli* (*E. coli*), dont 38% sont des souches de *S. aureus* résistants à la méthicilline (SARM) (Cadena *et al.*, 2016). La colonisation nasale à SARM constitue d'ailleurs le plus grand facteur de risque d'infections invasives à SARM, en particulier sous forme de bactériémies (Cadena *et al.*, 2016). En 2008, le centre européen pour la prévention et le contrôle des infections (ECDC pour European Centre for Disease Prevention and Control) estimait à 171 000 le nombre d'infections nosocomiales à SARM chaque année dans l'ensemble des états membres de l'Union Européenne, la Norvège et l'Islande. Ces infections sont responsables de 5 400 cas de décès, de plus d'un million d'hospitalisation et de 380 millions de frais d'hospitalisation par an en Europe (ECDC, 2009). Le fléau que constitue les infections staphylococciques est en partie lié à la grande diversité génomique du pathogène. Cette diversité est majoritairement apportée par le transfert horizontal d'éléments génétiques mobiles (EGM). Ces éléments peuvent porter des gènes de résistance aux antibiotiques à l'origine de l'émergence de souches multi-résistantes, généralement rencontrées en établissements de santé. Le transfert des EGM favorise également le transfert de gènes codant les facteurs de virulence, tels que les toxines et les facteurs d'adhésion. Certains de ces facteurs d'adhésions interviennent notamment dans la formation de biofilms qui, associés au phénomène de persistance jouent un rôle important dans la chronicité et la récidive des infections à *S. aureus* (Bhattacharya *et al.*, 2015, Kahl *et al.*, 2016).

La grande diversité génomique fait également de *S. aureus* une bactérie capable de développer des pathologies très diverses en termes de gravité et de sites infectieux, allant des infections de la peau et des tissus mous (SSTI pour Skin and Soft Tissue Infections) à la bactériémie (Alibayov *et al.*, 2014, Lindsay & Holden, 2004), en passant par l'endocardite, la pneumonie, les infections osseuses, articulaires et urinaires ainsi que les toxi-infections alimentaires (**Figure 2**) (VanEperen & Segreti, 2016, Rahimi *et al.*, 2016, Wu *et al.*, 2016). Cette capacité à s'implanter dans ces différents sites anatomiques est possible grâce à la forte aptitude du pathogène à s'adapter rapidement aux stress qu'il rencontre au cours de l'infection.

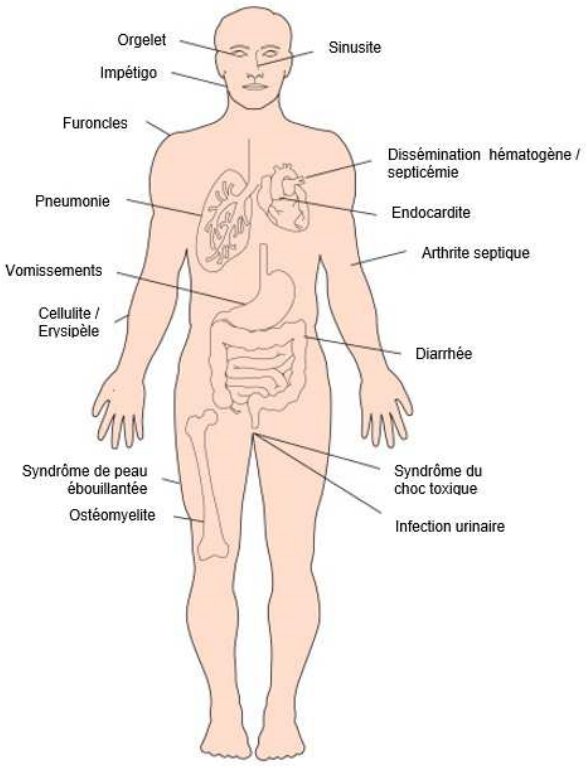


Figure 2: Grande diversité des infections à *S. aureus* (Adaptée de (Wertheim *et al.*, 2005))

a. La diversité génomique

L'augmentation alarmante des transferts de gènes accessoires codant des gènes de virulence et de résistance contribue actuellement à l'émergence de nouvelles souches de *S. aureus* hautement pathogènes (Lindsay & Holden, 2004). L'étude génomique des différentes souches de *S. aureus* accroît nos connaissances concernant la pathogénie de la bactérie et constitue un outil dans la prévision de son évolution (Lindsay & Holden, 2004). Pour cette raison, un grand nombre de génomes de différents isolats de *S. aureus* ont d'ores et déjà été séquencés et annotés depuis le séquençage des souches N315 et Mu50 (**Figure 3**) (Kuroda *et al.*, 2001).

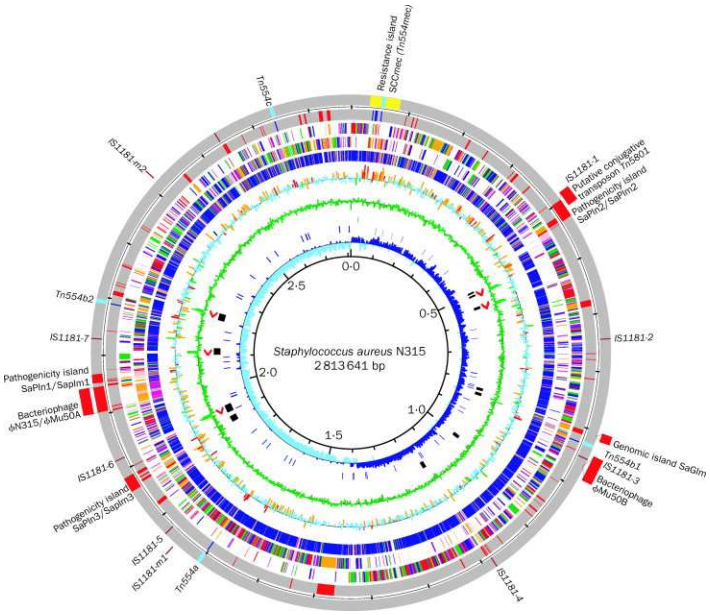


Figure 3: Séquençage du génome complet de la souche *S. aureus* résistant à la méthicilline N315 (Kuroda *et al.*, 2001).

Le génome de *S. aureus* compte environ 2.8 millions de paires de base, avec un pourcentage de guanine et cytosine (%GC) proche de 33%. Il possède approximativement 2 800 séquences codantes (Sassi *et al.*, 2014, Bosi *et al.*, 2016), dont 1441 appartiennent au « core » génome, qui représente à lui seul en moyenne 56% de la taille du génome (Bosi *et al.*, 2016). Le « core » génome regroupe les gènes conservés par héritage vertical et retrouvés chez toutes les souches d'une même espèce (Lindsay & Holden, 2004). Ces gènes sont généralement indispensables à la survie de la bactérie et sont impliqués dans le métabolisme, la synthèse d'acides nucléiques, la formation des structures bactériennes ou la réplication (Alibayov *et al.*, 2014, Moon *et al.*, 2016).

Les variations génétiques qui existent entre les différentes souches sont apportées par l'apparition de mutations, de réarrangements, de recombinaison et par le transfert horizontal d'EGM. La majorité de ces gènes accessoires codent pour des facteurs de virulence impliqués dans l'adaptation et la survie du pathogène en condition de stress environnementaux et des facteurs de résistance aux antibiotiques (Moon *et al.*, 2016). Ainsi, le transfert horizontal de ces EGM a un énorme impact sur l'émergence des souches super virulentes et multi-résistantes aux antibiotiques (Fitzgerald, 2014). Ces EGM regroupent des segments d'ADN très hétérogènes, répertoriés dans le **Tableau 2**.

EGM	Taille	Exemples	Références
Plasmides	1 à 60 K	**pSK1** : confère la résistance aux aminoglycosides **pRW001** : porte le gène de la toxine exfoliative B, responsable du syndrome de la peau ébouillantée	(Berg *et al.*, 1998) (Malachowa & DeLeo, 2010) (Jackson & Iandolo, 1986)
Eléments transposables	< 8 Kb	**Tn552** : porte le gène de la pénicillinase	(Rowland & Dyke, 1989)
Prophages	16 à 140 Kb	**ϕB166** et **ϕB236** : portent le gène de la toxine exfoliative A responsable d'impétigo	(Botka *et al.*, 2015)
Ilots de pathogénie	12 à 27 kb	**vΣαβ** : porte le système toxine-antitoxine *sprA1*/SprA1AS	(Sayed *et al.*, 2012a)
Staphylococcal Cassette Chromosome (SCC)	20 à 60 kb	**SCCmec** : porte le gène de résistance à la méthicilline	(Ito *et al.*, 1999)

Tableau 2 : Eléments génétiques mobiles (EGM) retrouvés chez *S. aureus*.

b. Les facteurs de virulence

La virulence d'une bactérie pathogène fait référence à son aptitude à se multiplier au sein d'un organisme et à y provoquer un état pathologique. Elle est notamment liée à tout un arsenal de molécules, le plus souvent protéiques, appelées « facteurs de virulence ». Ces facteurs ont un rôle déterminant dans la colonisation et la dissémination du pathogène au sein de l'hôte. Par sa capacité à exprimer une grande variété de facteurs de virulence, *S. aureus* est responsable de pathologies plus fréquentes et plus aiguës que les Staphylocoques à coagulase-négative (Heilmann, 2011).

L'ensemble de ces facteurs de virulence se complètent pour permettre à la bactérie de s'adapter aux variations environnementales rencontrées au cours de l'infection (Dastgheyb & Otto, 2015), d'échapper au système immunitaire (Heilmann, 2011) et de lyser les cellules de l'hôte (Otto, 2014). Le processus infectieux de *S. aureus* est très complexe et implique un large répertoire de facteurs d'adhésion ou de toxines sécrétées exprimées de manière coordonnée aux cours des différents stades de l'infection. En effet, les facteurs d'adhésion sont exprimés aux étapes précoces de l'infection, c'est-à-dire au cours de la colonisation alors que les toxines sont produites pendant la phase de dissémination du pathogène dans l'organisme.

i. Les facteurs d'adhésion

Au cours de l'infection, *S. aureus* doit accéder à l'hôte en adhérant soit aux surfaces biotiques, comme les composants de la matrice extracellulaire ou les tissus, soit sur les dispositifs médicaux implantés. Pendant la phase d'adhérence, la bactérie prolifère et colonise la surface grâce à la formation de biofilm. Celle-ci se déroule en deux phases, la phase d'adhérence, suivie de la phase d'accumulation. A l'intérieur du biofilm, le staphylocoque, enchâssé dans une matrice, est protégé du système immunitaire de l'hôte et des traitements antibiotiques (Heilmann, 2011). Certaines adhésines staphylococciques ne sont pas seulement impliquées dans l'adhérence et la colonisation, mais aussi dans l'internalisation de la bactérie par les cellules de l'hôte qui constitueraient ainsi un réservoir potentiel pour les infections chroniques (Heilmann, 2011). Grâce à ses facteurs d'adhésion, *S. aureus* est capable d'adhérer directement à l'épithélium ou l'endothélium de l'hôte en se liant à un nombre varié de composants de la matrice extracellulaire, comme la fibronectine (Fn), le fibrinogène (Fg), la vitronectine (Vn), la thrombospondine, la sialoprotéine osseuse, l'élastine, le collagène et le facteur de von Willebrand (vWF). Il est également capable d'adhérer aux dispositifs médicaux qui sont rapidement recouverts de matrice extracellulaire et de plasma. Ainsi, tous ces composants de l'hôte sont des récepteurs spécifiques pour les bactéries colonisatrices. Les facteurs protéiques d'adhésion exprimés par *S. aureus* peuvent être ancrés de manière covalente au peptidoglycane des parois bactériennes ou liés à la surface par d'autres mécanismes. Il existe également des adhésines qui ne sont pas de type protéique (Heilmann, 2011).

- Les protéines de surface liées à la bactérie de manière covalente

La majorité des adhésines sont ancrées de manière covalente au peptidoglycane bactérien et appartiennent à la famille des MSCRAMM (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) (Clarke & Foster, 2006). Le génome de *S. aureus* contient plus de vingt gènes codant des adhésines ancrées (Heilmann, 2011), dont des fibronectin-binding proteins (FnBPA et B), des protéines de la sous-famille Sdr (SD repeat-containing), comme les clumping factors (ClfA et B), la protéine A, des déterminants régulés par le fer ou d'autres protéines associées à la formation de biofilm. Ce sont des molécules multifonctionnelles capables d'adhérer à un large panel de molécules exprimées par l'hôte, en particulier la Fn (Greene *et al.*, 1995), le Fg (Wann *et al.*, 2000, McDevitt *et al.*, 1997), l'élastine (Roche *et al.*, 2004) et les immunoglobulines G (IgG) pour la protéine A (Inganas *et al.*, 1980). Elles jouent un rôle essentiel dans l'agrégation plaquettaire (Chavakis *et al.*, 2005), l'échappement au système immunitaire, l'activation de la réponse inflammatoire

(Clarke & Foster, 2006), l'adhésion et la formation de biofilm (O'Neill *et al.*, 2008) et la virulence de *S. aureus* sur modèle murin (Edwards *et al.*, 2010) (**Figure 4**).

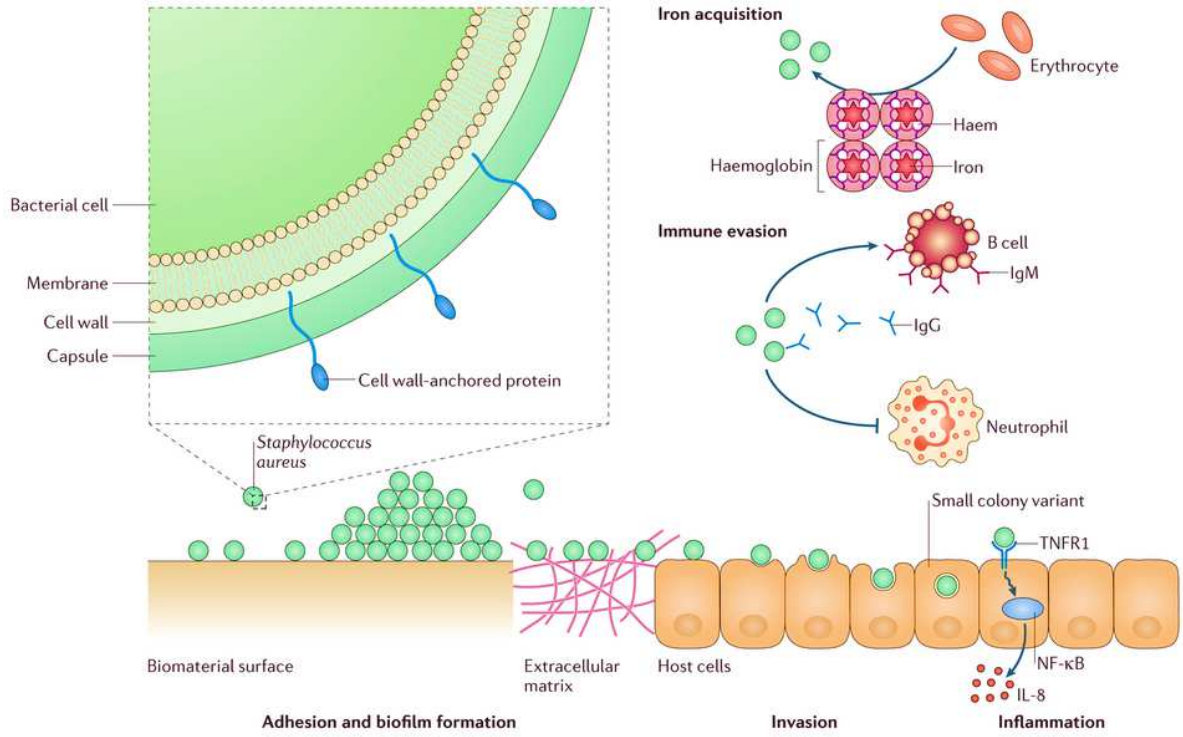


Figure 4 : Fonctions des protéines fixées aux parois bactériennes de *S. aureus* (CWA pour Cell Wall-Anchored) exprimées par *S. aureus*. (A) La protéine CWA Isd (Ion-regulated surface determinant) fixe l'hémoglobine, extrait et transporte l'hème à travers la paroi cellulaire et la membrane jusqu'au cytoplasme, où le fer est libéré. (B) La protéine A agit comme un superantigène pour les lymphocytes B et perturbe la réponse immunitaire adaptative et la mémoire immunitaire. (C) La phagocytose par les neutrophiles est inhibée par la fixation des protéines CWA aux IgG et autres protéines du plasmiques, par inhibition de la quantité ou de l'accès des récepteurs des neutrophiles pour le complément d'opsonisation C3b et, lorsqu'il est englouti, en inhibant la libération des oxydants. (D-E) Les protéines CWA favorisent l'adhésion de *S. aureus* (D) aux biomatériaux, conditionnés par le dépôt de protéines plasmiques, et (E) à la matrice extracellulaire présente à la surface des cellules de l'hôte. (F) Les interactions entre les protéines CWA sur les cellules adjacentes contribuent à la phase d'accumulation de la formation de biofilm. (G) Les protéines CWA interagissent directement ou indirectement avec les intégrines et favorisent l'invasion des cellules de l'hôte non-phagocytaires. (H) Les bactéries intracellulaires peuvent causer l'apoptose ou la nécrose des cellules de l'hôte, ou encore entrer dans un stade semi-dormant appelé Small Colony Variants (SCV). (I) Par fixation et activation des récepteurs de facteurs de nécrose tumorale 1 (TNFR-1) sur les cellules épithéliales de l'hôte, la protéine A déclenche la synthèse de cytokines (ex : l'interleukine 6 (Il-6)) et cause une inflammation, qui contribue à la pathogénèse (Foster *et al.*, 2014).

- Les protéines de surface liées à la bactérie de manière non-covalente

Il existe deux grandes catégories de protéines de surface fixées aux cellules de manière non covalente : il s'agit des autolysines/adhésines et des SERAM (Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules).

Les protéines autolysines/adhésines sont associées à la surface bactérienne par des interactions ioniques ou hydrophobes. Elles sont bi-fonctionnelles avec une fonction enzymatique qui leur permet d'hydrolyser le peptidoglycane et une fonction adhésive. L'autolysine, Atl, exprimée par *S. aureus* peut se fixer aux Fg, Fn et Vn et aux cellules endothéliales de l'Homme. Elle a un rôle dans l'internalisation de *S. aureus* dans les cellules epithéliales de l'hôte (Hirschhausen *et al.*, 2010) et favorise la formation de biofilm (Biswas *et al.*, 2006).

Les SERAM sont des protéines sécrétées fixées à la surface bactérienne par un mécanisme encore inconnu (Chavakis *et al.*, 2005). Parmi les SERAM, les protéines Eap (Extracellular adherence protein) et Emp (Extracellular matrix binding protein) peuvent se fixer à la matrice extracellulaire, au plasma et à une grande variété de composants de la matrice extracellulaire comme Fg, Fn et Vn (Chavakis *et al.*, 2005). Les SERAM jouent un rôle dans les infections endovasculaires, comme les endocardites infectieuses (Chavakis *et al.*, 2005). La protéine Eap possède une activité anti-inflammatoire et immuno-supressive, favorisant la tolérance du système immunitaire vis-à-vis de *S. aureus* (Chavakis *et al.*, 2005).

- Les adhésines non protéiques

Les adhésines intercellulaires non protéiques regroupent les polysaccharides, les acides teichoïques et les acides lipoteichoïques. Ces dernières sont impliquées dans l'adhésion de *S. aureus* aux surfaces biotiques et abiotiques, la formation de biofilm et la stimulation de l'immunité (Chan *et al.*, 2007). Des études suggèrent également que les acides teichoïques favoriseraient l'adhérence du pathogène aux cellules épithéliales nasales de l'Homme (Weidenmaier *et al.*, 2004, Winstel *et al.*, 2015) et qu'ils seraient impliqués dans les endocardites à *S. aureus* (Weidenmaier *et al.*, 2005).

ii. Les protéines sécrétées

Suite à la colonisation de l'hôte, le pathogène entre dans une phase infectieuse. Au cours de cette phase, l'expression des facteurs d'adhésion est réprimée au profit de l'expression des toxines sécrétées. Ces toxines interfèrent directement avec l'hôte dans le but d'affaiblir son système immunitaire et de mobiliser les métabolites nécessaires à sa survie. La grande diversité de protéines toxiques sécrétées participe au pouvoir pathogène et à la versatilité de *S. aureus*.

- Les enzymes sécrétées

Le rôle de la majorité des enzymes sécrétées est d'interférer avec le métabolisme et les cascades de signalisation de l'hôte ainsi que de dégrader les molécules de l'hôte. Les molécules dégradées constituent une source de nutriments favorisant la croissance de la bactérie au sein de l'organisme infecté. Parmi ces enzymes, nous retrouvons les nucléases, protéases, lipases, hyaluronidases et collagénases. Les protéases sont capables d'inhiber le système du complément humain (Jusko *et al.*, 2014) ou d'intervenir dans la maturation d'exoprotéases de *S. aureus* (Cassat *et al.*, 2013). Les toxines exfoliatives clivent spécifiquement les cadhérines desmosomales des couches supérieures de la peau et sont ainsi responsables du syndrome staphylococcique de la peau ébouillantée (Bukowski *et al.*, 2010). *S. aureus* exprime également deux facteurs de coagulation, la staphylocoagulase (Coa) et le facteur de von Willebrand (vWF) qui contribuent à la formation de caillots de fibrine à la surface de la bactérie (**Figure 5**). Ils inhibent également la phagocytose, favorisent la formation d'abcès (Cheng *et al.*, 2010) et l'adhésion de *S. aureus* aux cathéters au cours d'infections associées à la formation de biofilms (Vanassche *et al.*, 2013). D'autres protéases dégradent les protéines de l'hôte à large échelle altérant ainsi les tissus (Otto, 2014).

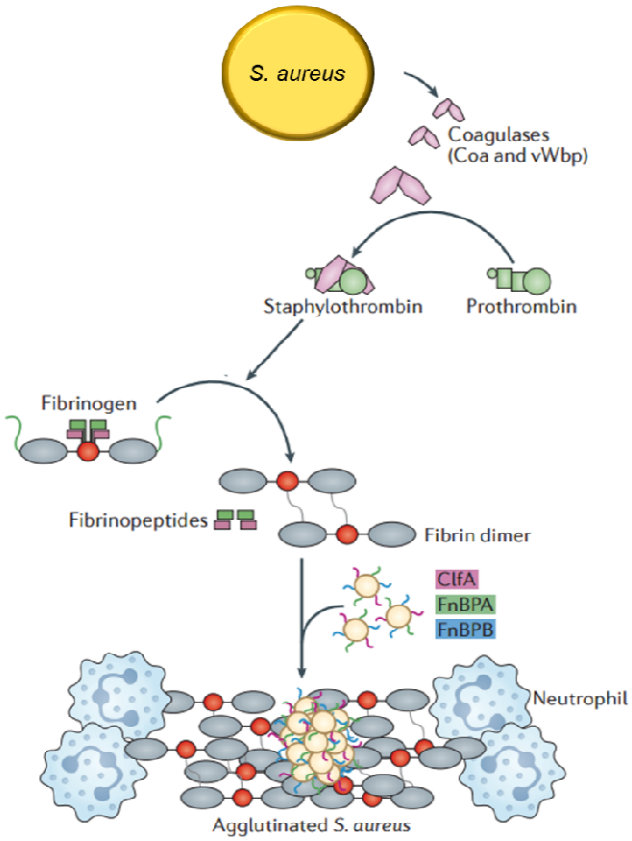


Figure 5 : L'agglutination de *S. aureus* avec la fibrine fournit une protection contre les phagocytes. Les coagulases staphylococciques, coagulase (Coa) et protéine de fixation au facteur de von Willebrand (vWbp) convertissent la prothrombine en staphylothrombine qui clive les fibrinopeptides A et B du fibrinogène pour générer de la fibrine, sans l'activation des autres facteurs d'hémostase et favorise l'assemblage des polymères de fibrine à la surface des staphylocoques, où il protège la bactérie de l'élimination par les neutrophiles et les phagocytes. L'agglutination de fibrines à la surface des staphylocoques implique aussi les facteurs d'agglutination A (ClfA pour Clumping factor A) et les protéines de fixation aux fibronectines (FnBP Fibronectin binding protein) A et B qui fixent les chaînes-γ de fibrinogène, exprimés par *S. aureus* (Adapté de (Thammavongsa *et al.*, 2015)).

- Les cytotoxines

Les cytotoxines sécrétées par *S. aureus* lysent un grand nombre de cellules du sang et les cellules épithéliales par formation de pores membranaires (Otto, 2014) (**Figure 6**). Parmi ces cytotoxines, les toxines à deux-composants ont besoin d'un récepteur pour former des pores. Cette catégorie inclue l'α-hémolysine capable de lyser les hématies et la plupart des leucocytes et la Leucocidine de Panton-Valentine (PVL) responsable des pneumonies nécrosantes et fortement associée aux SARM communautaires (Otto, 2010).

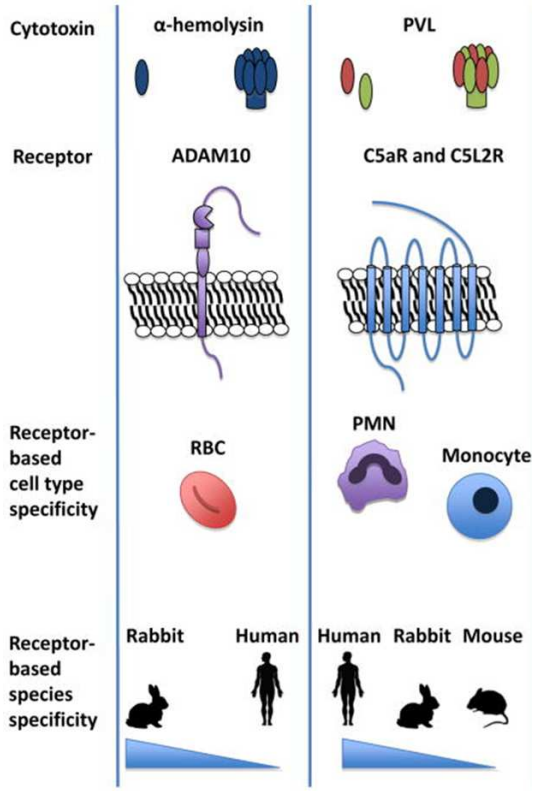


Figure 6 : Exemples de cytotoxines exprimées par *S. aureus* nécessitant la présence de récepteurs protéiques pour former des pores. Les cytotoxines sont listées en haut du tableau. Les récepteurs des cellules cibles hématopoïétiques et les récepteurs espèce spécifiques sont indiqués. Abréviations : RBC, hématies ; PMN, Cellules PolyMorphoNucléaires ou neutrophiles (Adapté de (DuMont *et al.*, 2014)).

A l'inverse, les phénol-soluble modulins (PSM) ne font pas intervenir de récepteur pour leur activité cytotoxique, bien qu'elles se fixent à des récepteurs pour activer la réponse inflammatoire (Kretschmer *et al.*, 2010). Ce sont des petits peptides amphipatiques et α-hélicoïdaux, solubles dans le phénol et ayant des propriétés détergentes. Il en existe deux sortes, les PSMα et les PSMβ. Les PSMα, dont la δ-hémolysine, d'une taille de 20 acides aminés, contribuent à la lyse des neutrophiles après la phagocytose de la bactérie et des érythrocytes humains (Chatterjee & Otto, 2013, Surewaard *et al.*, 2013, Geiger *et al.*, 2012). Les PSMβ sont plus long, 40 acides aminés, et possèdent une activité cytolytique encore débattue (Geiger *et al.*, 2012). En plus de leur rôle cytolytique, les PSM contribuent à la formation du biofilm (Peschel & Otto, 2013).

- Les toxines super-antigéniques

Les super-antigènes sont des molécules qui déclenchent l'activation et la prolifération des lymphocytes T sans nécessiter l'intervention des antigènes. Elles agissent en permettant l'interaction non spécifique des complexes majeurs d'histocompatibilité de classe II (MHC II) avec les récepteurs des cellules T. Il s'agit d'entérotoxines et d'entérotoxines-like qui interfèrent avec les fonctions intestinales et sont à l'origine de diarrhées et de vomissements (Hennekinne *et al.*, 2012), *S. aureus* en produit environ une vingtaine. Leur mécanisme d'action n'est pas bien connu, mais inclut la libération massive de cytokines responsables de l'apoptose des cellules de l'hôte (Lin *et al.*, 2010). L'exemple le plus connu chez *S. aureus* est la toxine responsable du syndrome de choc toxique (TSST pour Toxic Shock Syndrome Toxin), une pathologie sévère, voire fatale. A l'exception de l'entérotoxine SelX (Staphylococcal enterotoxin-like toxin X) synthétisée par 95% des isolats de *S. aureus*, les entérotoxines sont uniquement présentes dans un petit nombre de souches (Wilson *et al.*, 2011).

- Les protéines d'échappement au système immunitaire

S. aureus exprime une série de protéines sécrétées lui permettant d'échapper au système immunitaire (SI) de l'hôte. La protéine CHIPS (CHemotaxis Inhibitory Protein of *S. aureus*) et la staphylokinase (SAK), toutes deux codés par des prophages (Sako & Tsuchida, 1983), permettent d'échapper au SI de manières très différentes. La petite protéine CHIPS interfère avec les récepteurs C5aR et FRR (Formylated Peptide Receptor) de leucocytes pour empêcher la reconnaissance de *S. aureus* et prévenir l'activation du système immunitaire (Postma *et al.*, 2004). La protéine SAK active le plasminogène en plasmine capable de dégrader les caillots de fibrine favorisant l'entrée de *S. aureus* dans les tissus de l'hôte (van Wamel *et al.*, 2006).

c. L'adaptation rapide aux stress environnementaux

En fonction des niches physiologiques qu'elles colonisent, les bactéries peuvent être confrontés à différents stress, notamment à une faible disponibilité en nutriments et en oxygène, à des variations de pH ou de température ou encore à la présence de cellules sanguines (**Tableau 3**) (Dastgheyb & Otto, 2015).

Niche	*Indices environnementaux potentiels*	*Phénotypes d'adaptation reportés et gènes de virulence inhibés ou activés*
Peau et tissus mous	Variation du taux d'humidité, de pH, de température et du microbiote	Activation de *hlg*, *spa*, *hla*, *lukS-PV*, *lukE* Inhibition de *agr*, *psmβ*
Tractus urinaire	Variation du pH	Croissance inhibée Formation de biofilm
Narines	pH faible, faible disponibilité en nutriments, peptides antimicrobiens, interactions mucociliaires, compétition avec microflore	Phénotype de dispersion plutôt que biofilm (?) Inhibition de *agr*
Tractus reproducteur	Variation de la tension en oxygène et du pH	Formation de biofilm Faible production des facteurs de virulence
Poumons	Antécédents d'infections virales, variation du pH	Formation de biofilm, inhibition de *agr*, Activation de *hld* et *psm*
Sang / système vasculaire	Présence de protéines sériques, de globules blancs et rouges et de plaquettes. Contrainte de cisaillement, stress lié au flux.	Agrégation, dispersion/dissémination. Expression différentielle de *agr*, *psm* (résultats conflictuels) Augmentation de l'expression des protéines de surface
Os / Articulations	Haute teneur en minéraux (os), tissus fibreux, haute viscosité, variation de la tension en oxygène et de la cellularité, composition en protéines (liquide synovial)	Agrégation/ formation de biofilm, persistance intracellulaire (ostéoblastes/chondrocytes) récalcitrance aux antibiotiques. Inhibition de *agr*, *psm*, activation de l'expression des gènes de protéines de surface (FnbpA, ClfA)
Liquide Céphalo-Rachidien (LCR)	Sérum ultra-filtré avec protéines spécifiques du LCR (ex : cystatine), faible cellularité	_

Tableau 3 : Adaptations majeurs de *S. aureus* aux signaux environnementaux (Dastgheyb & Otto, 2015)

Ces variations des conditions environnementales peuvent amener le pathogène *S. aureus* à exprimer différents phénotypes et à modifier l'expression de certains gènes aux niveaux transcriptionnel et/ou traductionnel (Resch *et al.*, 2005, Bore *et al.*, 2007). Certains de ces gènes, régulés en fonction de paramètres extérieurs, sont également impliqués dans la virulence du pathogène, suggérant que les stress rencontrés par la bactérie au cours de l'infection pourraient réguler sa virulence.

iii. Les stress nutritifs

Au cours de la colonisation des cavités nasales, les bactéries sont confrontées à une carence nutritive (Krismer *et al.*, 2014, DuMont *et al.*, 2014, Dastgheyb & Otto, 2015). En effet, l'analyse métabolomique des sécrétions nasales montre une forte diversité mais une faible concentration en métabolites, notamment en ions métalliques (Krismer *et al.*, 2014). L'étude montre également que les isolats de *S. aureus* peuvent pousser dans un milieu mimant les sécrétions nasales, à l'inverse des Staphylocoques à coagulase négative,

montrant une meilleure adaptation de *S. aureus* à cet habitat. D'autres études ont montré que la carence en sucrose (Chan & Foster, 1998, Regassa *et al.*, 1992) ou en ions métalliques (Chan & Foster, 1998, Reeves, 1989, Allard *et al.*, 2006) entraînait des variations d'expression de certains gènes impliqués dans la virulence du pathogène.

La réponse stringente permet de réguler l'expression des gènes à tous les niveaux en réponse à une carence nutritive, et spécialement à la pénurie en acides aminés. Elle favorise généralement la survie bactérienne sous des conditions défavorables et affecte les comportements sociaux tels que la communication inter-cellulaire, la virulence, les relations hôte-pathogène et la persistance (Hauryliuk *et al.*, 2015).

Chez *S. aureus*, ce procédé est principalement initié par l'enzyme RSH, capable de synthétiser les alarmones ppGpp (guanosine 5',3'-(bis) diphosphate) et pppGpp (guanosine 5'-triphosphate,3'-diphosphate), collectivement appelés (p)ppGpp, à partir d'ATP ou de GTP. RSH est une enzyme bifonctionnelle, également capable d'hydrolyser le (p)ppGpp dans le but de prévenir son accumulation toxique pour la bactérie (Geiger *et al.*, 2012, Geiger *et al.*, 2014). A elle seule, elle constitue l'homologue du système RelA/SpoT retrouvé chez *E. coli* (Starosta *et al.*, 2014, Atkinson *et al.*, 2011). RSH est la seule enzyme responsable de la synthèse de (p)ppGpp en réponse à une carence en acides aminés branchés (Geiger *et al.*, 2012).

En condition de carence nutritive, (p)ppGpp induit une sévère inhibition de la synthèse protéique ainsi qu'une dérépression du régulon CodY, un régulateur majeur de l'expression de gènes de virulence (Geiger *et al.*, 2012). En effet, CodY régule l'expression de certains gènes, comme les gènes de la capsule (*cap*), de la protéine A (*spa*), de la protéine de fixation aux fibronectines A (*fnbA*) et de la coagulase (*coa*), en assistant ou en substituant la fonction du système *agr* (décrit plus loin). La majorité des gènes activés par CodY sont impliqués dans le métabolisme des nucléotides ou dans la virulence en assistant ou en substituant la fonction régulatrice du système *agr*. En revanche, les gènes réprimés par CodY sont impliqués dans le métabolisme des acides aminés (Pohl *et al.*, 2009), notamment l'opéron *ilvDBHC-leuABCD-ilvA* (*ilv-leu*) contenant neuf gènes impliqués dans la voie de la biosynthèse des acides aminés branchés (BCAA pour Branched Chain Amino Acids) : isoleucine, leucine et valine (Majerczyk *et al.*, 2010, Lei *et al.*, 2012) (**Figure 7**).

Bien que *S. aureus* possède l'ensemble des gènes nécessaires à la biosynthèse de ces BCAA, la bactérie présente une auxotrophie pour la leucine et la valine (Onoue & Mori, 1997, Lincoln *et al.*, 1995). En effet, la bactérie réprime la synthèse des BCAA dans les premières étapes de la croissance, préférant maintenir le niveau intracellulaire en captant les

BCAA synthétisés par l'hôte, avec l'aide de deux transporteurs, BrnQ1 et BcaP (Lincoln *et al.*, 1995). Ces BCAA sont des précurseurs de la synthèse protéique et des acides gras branchés, qui sont les acides gras majoritairement impliqués dans la biogénèse des membranes cellulaires (Lincoln *et al.*, 1995, Beck *et al.*, 2004). Ils interviennent également dans la croissance et la virulence de *S. aureus* (Lincoln *et al.*, 1995).

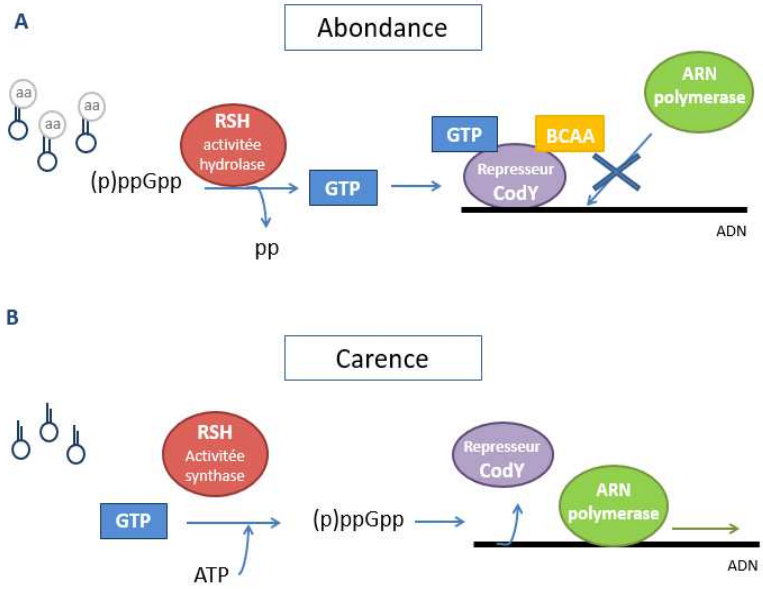


Figure 7 : Schéma de l'intersection entre la réponse stringente et le répresseur CodY. (A) En milieu riche en nutriments, les niveaux de GTP et de BCAA restent élevés. Le répresseur CodY, par fixation à ces cofacteurs, présente une forte affinité pour l'ADN et ainsi inhibe l'activité de l'ARN polymérase. (B) L'enzyme RSH est activée quand la bactérie se retrouve dans un milieu pauvre en nutriments, et notamment en acides aminés. La synthèse de (p)ppGpp et son accumulation entraînent une diminution de la quantité de GTP et donc le détachement de CodY de l'ADN. Les gènes et leurs produits, nécessaires à l'adaptation à une carence nutritive, peuvent alors être exprimés (adapté de (Beck *et al.*, 2004)).

La réponse stringente est également induite par la bactérie suite à sa phagocytose par les neutrophiles humains, où RSH est nécessaire à la synthèse de PSM, qui à leur tour favorisent la survie de la bactérie après la phagocytose (Geiger *et al.*, 2012). RelP et RelQ sont deux autres (p)ppGpp synthases actives chez *S. aureus* qui sont induites suite à un stress ciblant la paroi, comme les traitements par la vancomycine ou l'ampicilline, pour favoriser la tolérance de la bactérie vis-à-vis de ces antibiotiques (Geiger *et al.*, 2014). La réponse stringente joue également un rôle clé dans la détermination du niveau de résistance aux β-lactames des souches de SARM (Kim *et al.*, 2013, Aedo & Tomasz, 2016).

iv. *Les stress physiques*

La bactérie est également capable de s'adapter à une concentration limitée en oxygène, rencontrée dans les abcès, le tractus urogénital, les articulations synoviales et la colonne vertébrale, par la mise en place d'une respiration anaérobique (Dastgheyb & Otto, 2015).

Les variations de pH, rencontrées par exemple pendant le passage de la colonisation de la peau (légèrement acide) à la septicémie (sang légèrement basique), modifie l'expression de plus de 400 transcrits. De nombreux gènes associés à la virulence sont notamment augmentés à pH faible, comme au niveau de la peau, du tractus urogénital, des poumons, de la bouche et dans les abcès (Weinrick *et al.*, 2004). L'expression de certains gènes impliqués dans la virulence est également induite par des variations rapides de température (Dastgheyb & Otto, 2015).

v. *Les stress liés aux mécanismes de défense de l'hôte*

La capacité de *S. aureus* à résister à l'immunité innée de l'hôte augmente la sévérité du pathogène. Certains composés produits de manière endogène, comme les peptides antimicrobiens, les espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou l'oxyde nitrique ($NO^{\cdot}$), mais également les antibiotiques apportés de manière exogène, ont pour but d'altérer l'environnement du pathogène.

Les peptides antimicrobiens ciblent et dégradent les membranes bactériennes et font partie intégrante des défenses innées de l'hôte (Harder & Schroder, 2005). Ils sont responsables de l'augmentation de l'expression de certains transcrits (*mprF*, *dlt* et *vraFG*), tous impliqués dans la résistance à ces peptides antimicrobiens (Li *et al.*, 2007, Peschel *et al.*, 1999, Peschel *et al.*, 2001). La production d'ERO, comme le peroxyde d'hydrogène ou les superoxydes, par les macrophages et autres lymphocytes, inhibe la capacité de *S. aureus* à produire des biofilms (Chang *et al.*, 2006). La capacité particulière de *S. aureus* à résister aux radicaux $NO^{\cdot}$ fait intervenir cinq régulateurs : SrrAB, Fur et les régulateurs centraux de la virulence de *S. aureus*, SarA, CodY et Rot. Ainsi, la réponse transcriptionnelle du pathogène au $NO^{\cdot}$ détermine plusieurs caractères phénotypiques associés à la régulation du métabolisme et de la virulence (Grosser *et al.*, 2016). Enfin, la présence d'une concentration sub-inhibitrice d'antibiotiques influence l'expression de facteurs de virulence comme l'α-hémolysine, les PSM et TSST-1 (Stevens *et al.*, 2007, Joo *et al.*, 2010, Ohlsen *et al.*, 1998).

vi. Le stress osmotique

S. aureus est la plus grande cause d'intoxications alimentaires à travers le monde. Réprimé par les bactéries compétitrices dans la plupart des matrices, le pathogène présente un avantage compétitif crucial dans un milieu concentré en sel, condition fortement rencontrée dans les denrées alimentaires (Sihto *et al.*, 2014). L'osmo-tolérance de *S. aureus* lui permet également de survivre et de se diviser sur la peau et les muqueuses, en accord avec le fait que les patients atteints de mucoviscidose sont sensibles aux infections à *S. aureus* (Kahl *et al.*, 2003a, Price-Whelan *et al.*, 2013). En réalité, *S. aureus* peut également croître dans un milieu à faible osmolarité car il possède une capacité d'osmo-régulation pour une large gamme de concentration (Price-Whelan *et al.*, 2013, Graham & Wilkinson, 1992). Parmi les gènes qui voient leur expression modifiée en condition de stress osmotique, nous retrouvons notamment les gènes impliqués dans l'assimilation du potassium, d'acide sialique et de sucre, mais également des gènes impliqués dans la biosynthèse de la capsule et dans le métabolisme central des acides aminés (Price-Whelan *et al.*, 2013). Les transporteurs de potassium (Ktr) sont particulièrement impliqués dans le contrôle de l'osmolarité en maintenant une forte concentration cytoplasmique de l'ion potassium (Price-Whelan *et al.*, 2013). La croissance du pathogène dans un milieu à forte concentration en NaCl semble néanmoins inhiber l'expression des gènes des entérotoxines C et D (*sec* et *sed*) au niveau ARNm (Regassa & Betley, 1993, Sihto *et al.*, 2015). La choline, la bétaine, le diméthylglycine, la proline et la taurine, accumulés au cours de la croissance de *S. aureus* en milieu à forte osmolarité, agissent comme des osmo-protecteurs capables de rétablir le défaut de croissance de *S. aureus* et d'augmenter l'expression du gène de l'entérotoxine C (Graham & Wilkinson, 1992, Regassa & Betley, 1993).

d. La résistance aux antibiotiques

L'émergence et la propagation de souches résistantes ou multi-résistantes aux antibiotiques est directement lié au transfert de ces EGM, porteurs de gènes de résistance, mais c'est également la conséquence de l'utilisation massive d'antibiotiques, notamment dans les milieux hospitaliers et agricoles.

Les antibiotiques sont des molécules bactériostatiques ou bactéricides, c'est-à-dire qu'elles sont capables, respectivement, d'inhiber la croissance des bactéries ou d'entraîner leur mort. La plupart d'entre eux sont naturellement produits par des bactéries ou des champignons, dans le but d'éliminer les autres microorganismes présents dans l'environnement. Ils ciblent généralement les fonctions vitales de la bactérie et sont

regroupés en familles en fonction de leurs modes d'actions. Les β-lactamines et les glycopeptides inhibent la synthèse de la paroi (Ogawara, 1981, Howden *et al.*, 2010), les polymixines désorganisent la bicouche lipidique de la membrane (Newton, 1956), les quinolones empêchent la réplication de l'ADN (Hooper, 2001), les rifamycines empêchent la synthèse de l'ARN (Floss & Yu, 2005) et les aminoglycosides ainsi que les macrolides inhibent la synthèse protéique (Davis, 1987, Periti *et al.*, 1993).

L'acquisition rapide de gènes de résistance à ces antibiotiques fait de *S. aureus* un problème majeur de santé publique. En effet, pour chaque antibiotique, l'apparition de souches résistantes est survenue rapidement après sa mise sur le marché (**Figure 8**).

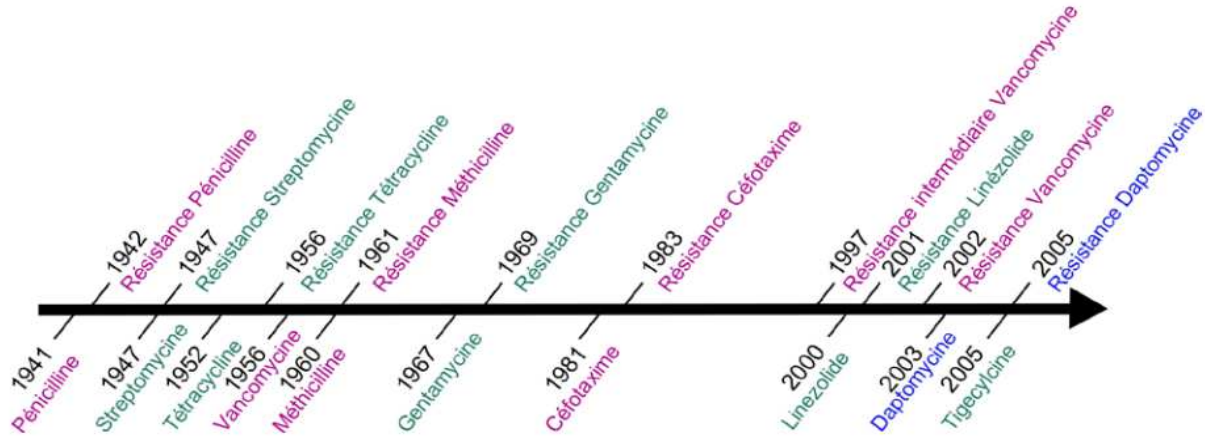


Figure 8: Historique de l'acquisition des résistances aux antibiotiques successives par les Staphylocoques dorés. En bas, l'année de l'approbation de l'usage des antibiotiques par la Federal Drug Agency. En haut, l'année d'apparition des premières souches résistantes. En violet, les antibiotiques qui agissent en bloquant la synthèse protéique, en bleu, un antibiotique qui agit en s'insérant dans la membrane bactérienne (Manuscrit de thèse d'Alex Eyraud, 2014).

Par exemple, l'apparition de souches de *S. aureus* résistantes à la pénicilline n'est apparue que quelques années après sa première utilisation, en 1941 (Pantosti & Venditti, 2009, Lyon & Skurray, 1987). Les pénicillines, de la famille des β-lactamines, inhibent la synthèse de la paroi cellulaire en se fixant à des protéines dites de liaison aux pénicillines (PBP pour penicillin-binding protein). Les PBP catalysent la liaison entre les chaînes peptidiques qui constituent la paroi. L'enzyme de la pénicillinase, aussi appelée β-lactamase, est portée par des EGM. Elle est responsable de la résistance aux β-lactamines puisqu'elle est capable de détruire l'antibiotique (Lyon & Skurray, 1987). La méthicilline est une pénicilline modifiée, capable de résister aux β- lactamases, qui a été synthétisée pour pallier aux problèmes de résistance à la pénicilline. Cependant, le premier cas de SARM a été rapporté après seulement deux ans d'utilisation de l'antibiotique (Pantosti & Venditti, 2009).

Cette résistance est liée à l'acquisition de la protéine PBP2a, codée par le gène *mecA* présent sur la cassette SCCmec, résistante aux β-lactamines (Katayama *et al.*, 2000).

e. La formation de biofilms

Les problèmes de chronicité rencontrés aux cours des infections à *S. aureus* sont en partie liés à sa capacité à adhérer aux surfaces et à développer des structures communautaires récalcitrantes, appelées biofilms. Les biofilms sont définis comme une communauté microbienne structurée dont le développement requière un changement significatif de la physiologie bactérienne. A l'intérieur du biofilm, les bactéries sont enchâssées dans une matrice exo-polymérique et attachée à une surface (Paharik & Horswill, 2016).

Dans cette structure, les bactéries peuvent échapper au système immunitaire de l'hôte et tolérer des concentrations aux antibiotiques capables d'éliminer les bactéries planctoniques (Kiedrowski & Horswill, 2011). A l'heure actuelle, il n'existe pas de critère précis pour déterminer si nous sommes en présence de biofilms staphylococciques, mais seulement des observations subjectives (Paharik & Horswill, 2016), comme la quantité de cellules adhérant à une surface. Cependant, la phevaline (ou aureusimine B), un dipeptide cyclique probablement impliqué dans l'expression des facteurs de virulence, l'inhibition des protéases chez les cellules eucaryotes et la communication bactérienne interespèce semble prometteur en tant que biomarqueur de biofilms pour le pathogène *S. aureus* puisqu'il est fortement plus exprimé dans les biofilms que (Secor *et al.*, 2012).

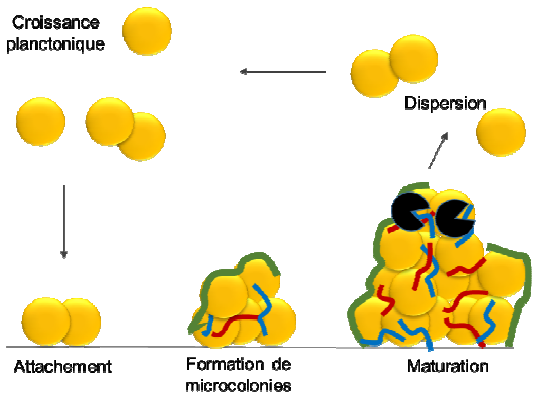


Figure 9 : Modèle du cycle de croissance du biofilm chez *S. aureus*. En contact avec une surface, les cellules planctoniques s'attachent grâce aux protéines de surface. Après l'attachement, les cellules se divisent et produisent la matrice extracellulaire, qui entraîne la formation de microcolonies. Comme la division cellulaire continue, la biomasse s'accumule et un biofilm mature est formé. Les signaux environnementaux à l'intérieur du biofilm entraînent l'activation des mécanismes de dissémination (noirs). Pendant la dispersion, les cellules réentrent dans une phase de croissance planctonique et peuvent ensemencer de nouveaux sites de formation de biofilm (Adaptée de (Lister & Horswill, 2014)).

Le cycle de vie des biofilms se décompose en quatre grandes étapes (**Figure 9**) : l'attachement initial à une surface biotique ou abiotique, le développement de microcolonies, la maturation et la dispersion. L'attachement correspond à l'adhésion des cellules à une surface, alors que le développement de microcolonies et la maturation sont médiées par la formation de matrice et l'adhésion intercellulaire. De nombreuses adhésines interviennent dans ces deux étapes (Paharik & Horswill, 2016). En revanche, la dispersion fait intervenir dix protéases sécrétées, incluant sept protéases (SspA et SplA-F), deux cystéines protéases (SspB et ScpA) et une métalloprotéase (Aur) qui dégradent la matrice du biofilm (Lister & Horswill, 2014). Chez *S. aureus*, cette matrice est composée d'ADN extracellulaire provenant de la lyse cellulaire (Mann *et al.*, 2009, Dengler *et al.*, 2015), d'adhésines protéiques (Dengler *et al.*, 2015), de protéines cytoplasmiques (Foulston *et al.*, 2014), d'adhésines polysaccharidiques et plus particulièrement le PIA (Polysaccharide Intercellular Antigen) constitué d'unités N-acétylglucosamine (Dengler *et al.*, 2015) et d'acide teichoïque (Latteyer *et al.*, 2010).

Parmi les pathologies à *S. aureus* concernées par la formation de biofilm, nous retrouvons les ostéomyélites, les endocardites, les infections de la peau, du tractus urinaire et oculaires et la mucoviscidose (Paharik & Horswill, 2016). Les biofilms sont également particulièrement retrouvés sur les dispositifs médicaux, incluant les prothèses orthopédiques et les implants cardiaques et vasculaires (Bhattacharya *et al.*, 2015). La formation de biofilm intervient dans la stratégie de persistance (Abdallah *et al.*, 2014) puisqu'il confère aux bactéries persistantes une protection vis-à-vis des antibiotiques et du système immunitaire est la formation de biofilm (Kahl *et al.*, 2003b, Conlon *et al.*, 2015).

f. L'entrée en état de persistance

Les bactéries persistantes correspondent à une sous-population à l'intérieur d'une culture bactérienne isogénique qui entre en état de dormance et qui présente une tolérance vis-à-vis des antibiotiques. Elles partagent des caractéristiques communes et constituent une partie du cycle de vie des colonies naines (SCV pour Small Colony Variant) (Proctor *et al.*, 2014). Ces bactéries semblent incapables d'initier une infection et présentent une inhibition de la virulence comparée à la population totale sur le modèle *Caenorhabditis elegans*. En revanche, après leur phase de dormance, les bactéries persistantes retrouvent leur capacité à infecter l'hôte (Mina & Marques, 2016).

La formation de SCV est fortement régulée par les signaux environnementaux et fait intervenir le facteur général de réponse aux stress, sigmaB (van Schaik & Abee, 2005). SigmaB joue un rôle important dans la formation de SCV induite par les antibiotiques appartenant à la famille des aminoglycosides (Mitchell *et al.*, 2010a), par le 4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide, synthétisé par la bactérie des voies respiratoires *Pseudomonas aeruginosa* (Mitchell *et al.*, 2010b), ou par une exposition prolongée aux stress acide, alcalin, osmotique et de température. (Onyango *et al.*, 2013, van Schaik & Abee, 2005, Sendi & Proctor, 2009).

Des mutations aux niveaux des gènes impliquées dans la biosynthèse de l'hémine (*hemB*), de la médianone (*menD*) (Proctor *et al.*, 2006) et de la protéine d'assemblage du cytochrome c (*ctaA*) (Glue & Clement, 1999) sont impliqués dans l'altération du transport d'électron à l'origine de la formation des SCV de type transport d'électron déficients (Proctor *et al.*, 2014). Il existe également des SCV thymidine-dépendantes, qui présentent une auxotrophie vis-à-vis de la thymidine à cause d'une mutation au niveau du gène *thyA,* qui code la thymidylate synthase impliqués dans la voie de la biosynthèse de la thymidine (Proctor *et al.*, 2006). Les SCV thymidine-dépendantes se comportent de la même manière que les SCV de type transport d'électron déficient puisque l'absence du gène *thyA* fonctionnel inhibe le cycle de Krebs impliqué dans le transport d'électrons (Chatterjee *et al.*, 2008, Chatterjee *et al.*, 2007). Une autre étude a récemment mis en évidence le rôle de la carence en ATP dans l'entrée de *S. aureus* en état de persistance (Conlon *et al.*, 2016): cette observation est en cohérence avec le défaut de respiration chez les SCV.

La mutation du gène *relA*, empêche la fonction (p)ppGpp hydrolase de l'enzyme RelA, menant à une accumulation du niveau de (p)ppGpp intracellulaire responsable de la persistence de *S. aureus* stringente dépendante (Gao *et al.*, 2010). De nombreuses autres mutations sont observées chez les SCV, elles ont un rôle important dans l'expression des différents phénotypes observés dans cette fraction de la population, les mutations associées aux SCV de *S. aureus* les mieux caractérisées sont répertoriées dans le **Tableau 4**.

Gène muté	Produit d'expression	Rôle	Phénotype spécifique	Références
thyA	Thymidylate synthase	Biosynthèse de la thimidine	- Auxotrophie à la thymidine et à la médianone - Altération du transport d'électrons	(Proctor *et al.*, 2006)
menD	2-succinyl-6-hydroxy-2,4-cyclohexadiene-1-carboxylate synthase	Biosynthèse de la ménadione	- Auxotrophie à la médianone - Altération du transport d'électrons	(Proctor *et al.*, 2006)
hemB	Porphobilinogen synthase	Biosynthèse de l'hème	- Auxotrophie à l'hémine et à la médianone - Altération du transport d'électrons - Inhibition de la pigmentation et de l'activité hémolytique	(Proctor *et al.*, 2006)
ctaA	CtaA	Assemblage du citochrome c	- Auxotrophie à l'hémine - Altération du transport d'électrons	(Glue & Clement, 1999)
rsh	(p)ppGpp	Activateur de la réponse stringente	- Activation permanente de la réponse stringente responsable de l'inhibition de la synthèse protéique - Inhibition de la virulence - Résistance au SI de l'hôte	(Gao *et al.*, 2010) (Gao *et al.*, 2013)
rpoB	ARN polymérase	Transcription	- Résistance à la rifampicine - Inhibition de la virulence - Résistance au SI de l'hôte	(Gao *et al.*, 2010) (Gao *et al.*, 2013)
parC	Sous-unité A de l'ADN topoisomérase IV	Structuration de l'ADN	- Tolérance aux quinolones	(Gao *et al.*, 2010)
rplF	Protéine ribosomale L16	Synthèse protéique	- Dépigmentation - Inhibition de la traduction	(Norstrom *et al.*, 2007) (Lannergard *et al.*, 2011)
mprF	MprF (Multiple peptide resistance Factor)	Résistance à la daptomycine	- Résistance aux peptides antimicrobiens cationiques synthétisés par les cellules immunitaires de l'hôte	(Richards *et al.*, 2015)

Tableau 4 : Mutations décrites chez les SCV de *S. aureus*. Les gènes mutés, sont indiqués avec leur produit d'expression et leur fonction biologique. Les phénotypes spécifiques font références aux caractéristiques des SCV imputables à la mutation du gène en question. Abréviation : SI Système Immunitaire.

Les mutations présentes chez les SCV de *S. aureus* induisent de nombreux changements de métabolismes comme l'inhibition du cycle du TCA (TriCarboxyl Acid) et du catabolisme de l'acétate ou encore l'activation de la voie de l'arginine déiminase (Sendi & Proctor, 2009). L'expression des facteurs de virulence est également modifiée dans cette fraction de la population bactérienne. Alors que la production de toxines est inhibée, le niveau d'expression des facteurs d'adhésion impliqués dans la formation de biofilms (O'Neill *et al.*, 2008), l'agrégation plaquettaire (Chavakis *et al.*, 2005), l'échappement au système immunitaire et l'activation de la réponse inflammatoire (Clarke & Foster, 2006) est activée (**Tableau 5**). On observe également une inhibition de l'expression du système quorum sensing *agr* et donc de l'ARNIII et de la δ-hémolysine (*hld*) ainsi que du gène codant l'α-toxine (*hla*), alors que l'expression du gène codant le facteur SigmaB est activé (Sendi & Proctor, 2009).

	Activation	**Inhibition**
Métabolisme	- Voie de l'arginine déiminase	- Cycle du TCA - Catabolisme de l'acétate
Facteurs de virulence	- FnBP - Clf - Polysaccharides d'adhésions intercellulaires	- Hémolysines α - Hémolysines δ
Régulateurs	- SigmaB	- Système *agr* - ARN III

Tableau 5 : Caractérisiques des SCV décrites de *S. aureus*, comparé aux souches parentales.

L'ensemble de ces mutations et caractéristiques permettent aux SCV d'entrer et de persister à l'intérieur des cellules phagocytaires non professionnelles, comme les cellules épithéliales et endothéliales (Schroder *et al.*, 2006). En effet, le milieu intracellulaire présente certains avantages pour le pathogène, comme la protection contre les anticorps, le complément et les antibiotiques. Une fois phagocytées, les bactéries doivent survivre dans le milieu intracellulaire. Pour cela, elles ne doivent en aucun cas induire la mort des cellules de l'hôte ou activer le système immunitaire. Cependant, elles doivent être capables de résister aux défenses intracellulaires de l'hôte et d'être en mesure de proliférer dans le cytoplasme des cellules de l'hôte (Sendi & Proctor, 2009). Ainsi, l'inhibition de l'expression des facteurs de virulence chez les SCV a un rôle dans la survie à long-terme du pathogène dans le milieu intracellulaire (Kahl *et al.*, 2016).

g. Les principaux régulateurs de la pathogénie de *S. aureus*

L'expression de l'ensemble des gènes impliqués dans la pathogénie de *S. aureus* sont contrôlés par un réseau de régulation complexe incluant des régulateurs protéiques et des ARN régulateurs.

i. Les régulateurs protéiques

- Les facteurs sigma

L'initiation de la transcription de l'ensemble des gènes par l'ARN polymérase nécessite la présence de facteurs sigma qui reconnaissent spécifiquement des séquences au niveau des promoteurs de gènes. *S. aureus* exprime le facteur général de transcription sigmaA mais également sigmaB, H et S (Zhang *et al.*, 2016). Ces facteurs permettent l'adaptation rapide du pathogène aux différents stress rencontrés par la bactérie et l'expression de facteurs de virulence spécifiques au cours de l'infection.

Le facteur sigmaB se fixe généralement sur une séquence consensus 'GTTTAA-12-15-GGGTAT' située dans la région promotrice de ces gènes cibles (Homerova *et al.*, 2004) impliqués dans différents processus cellulaires comme le syndrome du choc septique (Andrey *et al.*, 2015), le transfert du gène de résistance à la méthicilline (Zhang *et al.*, 2016) et la formation de biofilm (Valle *et al.*, 2007). La régulation de l'expression de certains gènes cibles de sigmaB peut faire intervenir des intermédiaires puisque les promoteurs de ces gènes ne possèdent pas la séquence consensus (Andrey *et al.*, 2015, Pane-Farre *et al.*, 2006). L'activité de sigmaB est légèrement accrue en réponse à une augmentation de la température, des concentrations en NaCl et KOH et pendant la croissance en milieu LB (Pane-Farre *et al.*, 2006, Kusch *et al.*, 2011), soulignant son implication dans la réponse aux différents stress rencontrés par la bactérie.

- Les facteurs généraux de transcription

La régulation de l'expression des gènes impliqués dans la pathogénie de *S. aureus* fait également intervenir des facteurs de transcription.

Les régulateurs accessoires staphylococciques (Sar pour Staphylococcal accessory regulator) sont des membres de la famille des facteurs de transcription possédant un motif hélice-tour-hélice. Le facteur SarA est une protéine de 15 kDa capable de fixer, sous forme

de dimère, les régions promotrices riches en A/T de l'ADN (Rechtin *et al.*, 1999) au niveau de l'une des séquences consensus ATTTgTATtTAATATTTataTAAtTg (Chien *et al.*, 1999) ou ATTTTAT (Sterba *et al.*, 2003).

Le locus *sarA* est transcrit à partir de trois promoteurs possédant la même extrémité 3', actifs à différents moments de la croissance et contribuant à la traduction de SarA (Novick & Jiang, 2003).

La protéine active l'expression de gènes de virulence comme le gène de la protéine de fixation à la fibronectine (*fnbA*), du superantigène TSST-1 (*tst*), des hémolysines-α (*hla*), β (*hlb*) et δ (*hld*) et inhibe l'expression des gènes codant la staphylokinase (*sak*) et la protéine A (*spa*) (Novick & Jiang, 2003, Chan & Foster, 1998, Cheung *et al.*, 2008, Ziebandt *et al.*, 2001). Cependant, la fonction activatrice de SarA ne fait pas l'unanimité car il semblerait qu'il active l'expression de certains gènes en inhibant l'expression de leur répresseur. En effet, *S. aureus* exprime également d'autres facteurs de transcription comme MgrA, Rot, SarR-V, SarX-Y et TcaR. L'activation de *hla* par SarA passerait par l'inhibition du répresseur SarT (Schmidt *et al.*, 2001). De la même manière, SarA contribue à l'activation du promoteur du gène *tst* en inhibant la transcription de SarS via SarT (Andrey *et al.*, 2015). Il semble également que SigmaB régule le gène *tst* par l'intermidiaire du système *agr*/ARNIII et de SarA (**Figure 10**) (Andrey *et al.*, 2015)).

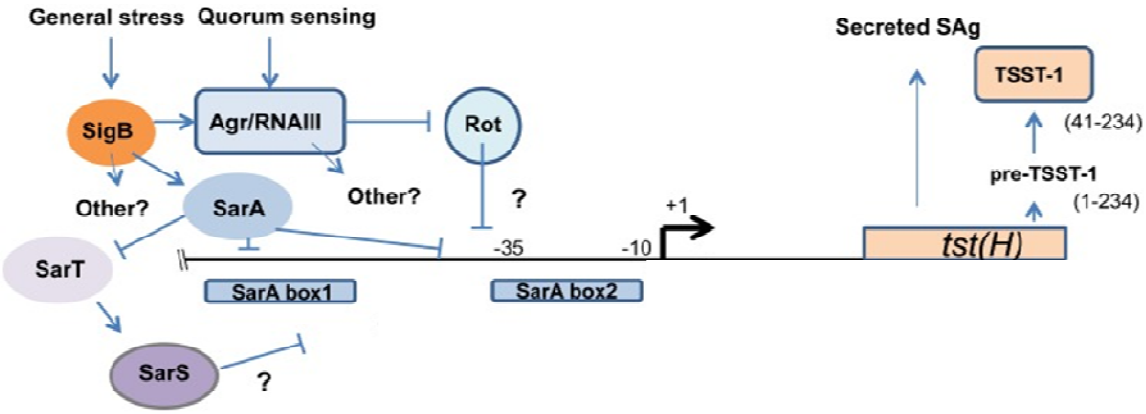


Figure 10 : Modèle décrivant la régulation de l'expression du superantigène TSST-1 par SarA chez *S. aureus*. La position des boîtes SarA 1 et 2 ont été déterminées par les séquences consensus de SarA et les tests de fixation à l'ADN (Adapté de (Andrey *et al.*, 2015))

L'expression de deux petits ARN « srn_3610_sprC », impliqué dans la virulence et la phagocytose de *S. aureus* et « srn_9340 » est également régulée par SarA (Mauro *et al.*, 2016). Une nouvelle étude réalisée avec des mutants de délétion de *sarA* met également en

évidence le rôle du régulateur dans la résistance à l'oxacilline, un antibiotique de la famille des β-lactamines chez les souches de SARM mecA-positives (Li *et al.*, 2016).

Les systèmes à deux composants

Les récepteurs de signaux extracellulaires sont une source majeure d'informations sur l'environnement extérieur pour la bactérie. Pour *S. aureus,* ils constituent la première voie de régulation de l'expression des facteurs de virulence. Les systèmes à deux composants (TCS pour Two-Component Systems), sont composés d'un « senseur » de l'environnement et d'un « effecteur ». Une fois activé, l'effecteur régule l'expression de gènes spécifiques en réponse aux stress environnementaux rencontrés par la bactérie. Quatre groupes distincts de TCS sont connus pour être impliqués dans la virulence de *S. aureus*, le système *agr*, les TCS *sae*, *srr* et *arl* (Novick & Jiang, 2003).

Le locus *agr* est composé de deux opérons divergeants transcrits par deux promoteurs voisins mais non chevauchants, P2 et P3. La séquence de l'opéron P2, transcrit l'ARN II qui contient 4 cadres ouverts de lecture, *agrA*, *C*, *D* et *B*. *agrD* code un pro-peptide, AgrD, qui est clivé au cours de la phase exponentielle de croissance en un peptide de 7 acides aminés (Ji *et al.*, 1997). *agrB* apporte à ce peptide des modifications post-traductionnelles pour générer l'Auto-Inducing Peptide (AIP) et permet ensuite sa sécrétion dans le milieu extracellulaire. Quand l'AIP atteint une concentration seuil, directement corrélée à la densité bactérienne, le senseur *agrC* est activé et, via l'effecteur *agrA*, déclenche l'auto-induction de l'opéron *agrBDCA* et l'induction de l'opéron *P3* (Ji *et al.*, 1995). P3, quant à lui, transcrit l'effecteur de la réponse agr, l'ARN III, qui code la δ-hémolysine (Janzon *et al.*, 1989) et qui est également un ARN régulateur (Novick *et al.*, 1993, Morfeldt *et al.*, 1995). Les ARN II et III sont exprimés durant la phase post-exponentielle de croissance, lorsque la densité bactérienne est la plus forte (**Figure 11**).

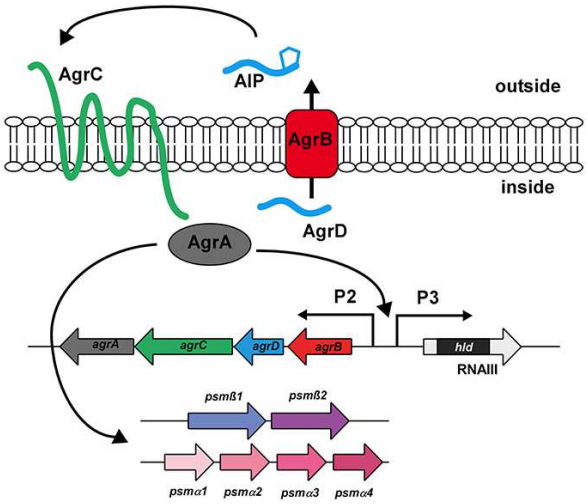


Figure 11 : Le système quorum sensing *agr*. Le système *agr* est un système auto-régulé qui contrôle l'expression des gènes. La fixation de AgrA active les promoteurs de *agrP2*, *argP3*, *psmα* et *psmβ*.

Le système quorum sensing *agr* est composé de deux circuits de régulation indépendants avec deux effecteurs principaux : AgrA et l'ARNIII (Queck *et al.*, 2008) qui régulent l'expression des gènes de virulence en fonction de la densité bactérienne et donc de la phase de croissance. En effet, pendant la phase post-exponentielle de croissance, AgrA active l'expression des PSM (**Figure 11**), alors que l'ARNIII, en plus d'activer l'expression de toxines sécrétées, inhibe l'expression des protéines de surface (Queck *et al.*, 2008, Novick *et al.*, 1993).

Le locus *agr* semble avoir un rôle majeur dans la virulence de *S. aureus* puisque les souches *agr* négative sont moins virulentes que les souches sauvages sur des modèles *in vivo* (Novick & Jiang, 2003, Cheung *et al.*, 1994, Wright *et al.*, 2005, Cheung *et al.*, 2011). En revanche, de nombreuses souches possédant une résistance intermédiaire ou une hétéro-résistance aux antibiotiques de la famille des glycopeptides et responsables d'infections nosocomiales possèdent un système *agr* non fonctionnel (Sakoulas *et al.*, 2002, Traber *et al.*, 2008). Il semble que dans un environnement avec une forte pression d'antibiotiques, la perte de fonction du système *agr* favoriserait l'acquisition de gènes de résistance aux antibiotiques.

La transcription du TCS *SaeRS* est sous influence de signaux environnementaux comme le pH, la concentration en sel et en glucose, le peroxyde d'hydrogène, la vancomycine et les défensines humaines (Kuroda *et al.*, 2003, Geiger *et al.*, 2008, Kuroda *et al.*, 2007, Novick & Jiang, 2003). Elle est également régulée par d'autres régulateurs des facteurs de virulence, comme le système *agr* (Rogasch *et al.*, 2006, Kusch *et al.*, 2011). *SaeRS* active l'expression de plusieurs facteurs de virulence, comme la sérine protéase SspA, la thermonucléase Nuc, la coagulase Coa, les hémolysines α et β, la protéine d'adhésion Eap, la protéine A, les protéines de fixation à la fibronectine ou encore l'entérotoxine B (Rogasch *et al.*, 2006). Une étude a récemment montré qu'il régule également la transcription du gène codant la toxine TSTT-1 (Baroja *et al.*, 2016). A l'inverse, il réprime l'expression de l'opéron *cap* qui porte les gènes responsables de la synthèse de la capsule de polysaccharides (Steinhuber *et al.*, 2003).

Le TCS SrrAB est un senseur de l'oxygène impliqué dans la régulation de plusieurs gènes de virulence lorsque *S. aureus* est exposé à une faible concentration en oxygène (Pragman *et al.*, 2004, Pragman *et al.*, 2007, Ulrich *et al.*, 2007). Il régule notamment l'expression de la flavohémoglobuline, qui a un rôle critique dans l'efficacité des décontaminations au NO (Richardson *et al.*, 2006, Kinkel *et al.*, 2013), et du gène *katA* de la catalase qui confère à la bactérie la résistance au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Oogai *et al.*, 2016).

i. Les ARN régulateurs

Les ARN régulateurs (ARNrég) sont de petites molécules d'ARN, de 50 à 500 nt, stables et ubiquitairement retrouvés dans tous les domaines de la vie. Chez les procaryotes, l'ARN 6S fut parmi les premiers ARN régulateurs identifiés, en 1967 (Hindley, 1967). Depuis l'arrivée des techniques de prédictions bio-informatiques et des techniques à haut débit, de très nombreux nouveaux ARNrég ont été identifiés (Altuvia, 2004, Kawano *et al.*, 2005, Huttenhofer & Vogel, 2006, Sassi *et al.*, 2015, Gebetsberger *et al.*, 2015).

Initialement considérés comme non codants (ARNnc), un grand nombre d'entre eux possèdent un cadre ouvert de lecture. Ils peuvent alors se comporter comme des ARNm en plus d'avoir leur fonction régulatrice. Rarement essentiels, les ARNrég ont un rôle important dans la modulation des différentes voies de signalisation et sont globalement impliqués dans les réseaux de régulation d'un grand nombre de réponses physiologiques et dans l'expression des facteurs de virulence (Wagner & Romby, 2015, Svensson & Sharma, 2016). Peu sont exprimés de manière constitutive, ils sont généralement transcrits lorsque la bactérie est confrontée à des conditions bien spécifiques comme la phase stationnaire de croissance ou la présence d'un stress, c'est-à-dire lorsque leur activité de régulation est nécessaire à la suivie de la bactérie.

Les ARNrég ciblent généralement des protéines ou des acides nucléiques, de type ADN ou ARN, à l'exception des riboswitchs. Les ARNrég les mieux décrits sont classés en fonction de leur mécanisme d'action (Waters & Storz, 2009). Ils peuvent réguler la réplication et l'expression des gènes aux différents niveaux : transcription de l'ADN et stabilité et traduction de l'ARNm. Parmi les mécanismes les plus répandus, nous retrouvons les riboswitchs, les ARNrég interagissant avec les protéines, les ARNrég interagissant avec les ARNm et les CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats).

L'ARN III est le premier ARN régulateur (ARNrég) reporté chez *S. aureus* (Novick *et al.*, 1993). Le régulateur de réplication appelé ARN I a ensuite été mis en évidence sur le plasmide de multi résistance pSK41 (Kwong *et al.*, 2004). Depuis, de nombreux ARNrég exprimés par *S. aureus* ont été découverts par des approches bio-informatiques, puis validés expérimentalement (revu dans (Guillet *et al.*, 2013, Tomasini *et al.*, 2014, Fechter *et al.*, 2014). C'est le cas des 6 ARN Spr : SprA, B, C, D, F et G, appelés ainsi puisqu'ils sont localisés sur des îlots de pathogénie de *S. aureus* (Small pathogenicity island RNA) (Pichon & Felden, 2005). Actuellement, plus de 160 gènes codant des petits ARN transcrits dans les différentes souches de *S. aureus* ont été identifiés. La majorité est uniquement exprimée chez le pathogène, cependant quelques exemples, dont RsaE, sont également retrouvés

dans la famille des *Bacillacea,* et les ARNrég de ménage (ARNtm, l'ARN RNase P et l'ARN 6S) sont retrouvés chez toutes les eubactéries(Guillet *et al.*, 2013).

Pour la grande majorité d'entre eux, la structure, la fonction et les mécanismes d'action sont encore inconnus. Les ARNrég les mieux décrits sont souvent impliqués dans des circuits de régulation complexes associant le métabolisme, la réponse à différents stress et la virulence bactérienne. En effet, au cours de l'infection, *S. aureus* est exposé à un grand nombre de stress environnementaux et nutritifs, ces différents stress influencent la transcription et la synthèse des facteurs de virulence exprimés par le pathogène (Somerville & Proctor, 2009). L'expression d'ARNrég codés en *trans* peut être induite par certains de ces stress ou être régulée en fonction de la phase de croissance (Anderson *et al.*, 2006, Beaume *et al.*, 2010, Bohn *et al.*, 2010).

La construction d'une librairie (Abu-Qatouseh *et al.*, 2010) réalisée à partir de souches normales ou de variants issus de SCV a mis en évidence des ARNrég exprimés exclusivement dans la souche sauvage, c'est le cas de l'ARN III, ou exclusivement dans les SCV, comme le petit ARN Sau-66. D'autres ARNrég, comme RsaA, un inhibiteur de la virulence (Lays *et al.*, 2014), et le riboswitch *yybP-ykoY* sensible au pH et au manganèse (Dambach *et al.*, 2015) sont plus exprimés dans les SCV que dans les souches sauvages. Enfin, tous les ARN Spr semblent être exprimés de manière constitutive chez les souches ayant un phénotype normal alors que leur expression est inhibée en fin de croissance chez les SCV (Abu-Qatouseh *et al.*, 2010).

Chez *S. aureus*, une étude à large échelle a montré que des ARNrég répondaient à une exposition à quatre antibiotiques représentant les classes d'antibiotiques principalement utilisées pour traiter les infections à SARM : la vancomycine, le linezolide, le ceftobiprole et la tigecycline. La majorité de ces ARN sont les antisens de gènes codant des protéines impliquées dans la synthèse protéique et les fonctions ribosomales (Howden *et al.*, 2013, Lalaouna *et al.*, 2014).

- L'ARNIII

L'ARN III est un ARN de 517 nucléotides dont l'expression est régulée en fonction de la densité bactérienne, il s'accumule au cours de la croissance pour atteindre sa concentration maximale en phase post-exponentielle de croissance (Dunman *et al.*, 2001, Singh & Ray, 2014). Il s'agit de l'effecteur du système quorum sensing *agr* qui permet de réguler l'expression des protéines de surface et des toxines sécrétées au cours du temps, permettant ainsi de faire basculer *S. aureus* de la phase de colonisation vers la phase

infectieuse (Novick & Jiang, 2003). Son expression est moins importante dans les souches de choc septique que dans les souches de portages (Bordeau *et al.*, 2016).

En plus de coder pour la δ-hémolysine, l'ARNIII régule un certain nombre de facteurs de virulence directement au niveau post-transcriptionnel ou indirectement au niveau transcriptionnel. Avec son extrémité 5'UTR, l'ARNIII facilite le recrutement des ribosomes sur l'ARNm *hla*, codant l'hémolyse-α (Morfeldt *et al.*, 1995), il est également capable d'activer l'expression de MAP, un médiateur de la réponse immunitaire des infections à *S. aureus*, par appariement de base au niveau de sa quatrième tige-boucle (Liu *et al.*, 2011) alors que l'extrémité 3'UTR est un domaine répresseur. Cette région 3' se fixe sur le site de fixation au ribosome de certains ARNm impliqués dans la virulence de *S. aureus*, comme les ARNm codant pour l'autolysine LytM, la protéine de surface A, la coagulase, la protéine d'échapement du SI Sbi, et le répresseur Rot (Chabelskaya *et al.*, 2014, Boisset *et al.*, 2007, Chunhua *et al.*, 2012, Chevalier *et al.*, 2010) (**Figure 12**).

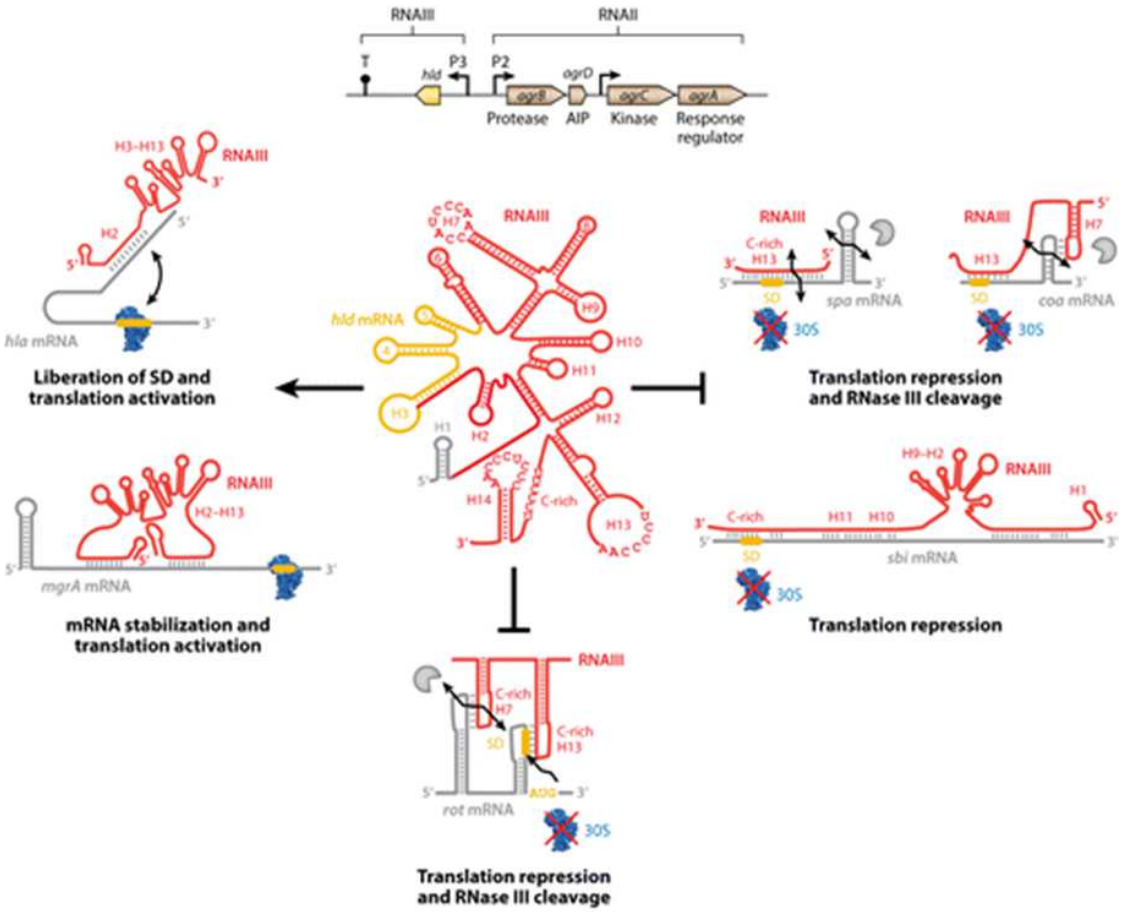


Figure 12 : Mécanismes d'action de l'ARNIII sur ces ARNm cibles. Organisation génomique du système quorum sensing agr en haut. Structures secondaires schématiques de l'ARNIII en rouge, du gène de la δ-hémolysine en jaune, des ARNm en gris (Bronesky *et al.*, 2016).

Les complexes ainsi formés empêchent la fixation des ribosomes et sont rapidement dégradés par la RNase III, une endoribonucléase spécifique des segments double brins et agissant dans ce cas comme un cofacteur de l'ARNIII. De manière indirecte, l'ARNIII active la synthèse de la capsule de polysaccharides ainsi que de plusieurs exotoxines et réprime la transcription d'adhésines, comme la protéine A, en réprimant la traduction du régulateur de transcription Rot (Geisinger *et al.*, 2006, Boisset *et al.*, 2007, George *et al.*, 2015). Ces deux voies assurent une régulation fine de l'expression des facteurs de virulence. L'ARNIII est aussi impliqué dans la régulation de plusieurs hydrolases et amidases intervenant dans le métabolisme du peptidoglycane (Tomasini *et al.*, 2014).

- Les ARNrég issus d'îlots de pathogénie (Spr)

- L'ARN SprD est le deuxième ARNrég connu pour réguler les facteurs de virulence chez *S. aureus*. Il est localisé dans un îlot de pathogénie au niveau du phage ϕ13 (Pichon & Felden, 2005). SprD interagit par appariement de base avec le site de fixation au ribosome de l'ARNm *sbi*, exprimant une protéine d'évasion du SI. La formation du complexe prévient l'initiation de la traduction de l'ARNm *sbi* sans affecter sa stabilité (**Figure 13**) (Chabelskaya *et al.*, 2010).

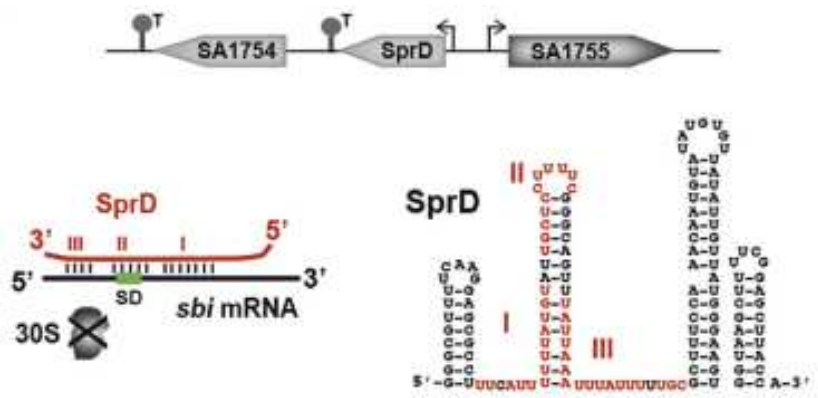


Figure 13 : Répression de la traduction de l'ARNm *sbi* par SprD. Trois différentes régions de SprD forment des interactions par appariement de bases avec la région 5'-UTR (UnTRanslated) et le début de la séquence codante de l'ARNm *sbi*. Le duplexe prévient la formation du complexe d'initiation ribosomique (Chabelskaya *et al.*, 2010).

L'expression de la protéine Sbi est en fait régulée conjointement et de manière temporelle par les deux ARNrég, ARNIII et SprD (Chabelskaya *et al.*, 2014). En effet, en fonction de leur profil d'expression, les deux ARNrég inhibent successivement l'expression de Sbi, ainsi la protéine n'est exprimée qu'en début de croissance bactérienne,

correspondant à la phase de colonisation où la bactérie doit échapper au SI (Chabelskaya *et al.*, 2014). Une étude sur modèle murin avec le mutant de délétion de *sprD*, montre le rôle primordial de SprD dans la virulence de *S. aureus*. Cette observation est en contradiction avec son rôle dans l'inhibition de la protéine Sbi, suggérant que SprD aurait au moins une autre cible impliquée dans la virulence de la bactérie (Chabelskaya *et al.*, 2010).

Une étude récente à montré que le rapport d'expression ARNIII/SprD est plus important dans les souches de colonisation que dans les souches d'infections, incluant les septicémies et les chocs septiques. Ce résultat suggère une différence d'expression génique entre ces différentes catégories de souches. Le suivi d'expression des deux ARN pourrait faciliter la détermination de la sévérité des infections à *S. aureus* (Bordeau *et al.*, 2016).

- L'ARN SprC, localisé dans l'îlot de pathogénie SaPIn3 (Pichon & Felden, 2005) est un autre Spr impliqué dans la virulence de *S. aureus*. (Le Pabic *et al.*, 2015). Il intervient dans l'inhibition de la traduction de l'autolysine (ATL), une protéine impliquée dans l'internalisation de la bactérie dans les phagocytes, par appariement directe avec les signaux d'initiation de la traduction. Les tests réalisés avec le mutant de délétion *sprC* montrent que de cette manière SprC inhibe la phagocytose par les monocytes et les macrophages humains. De plus, SprC, dont l'expression est réprimée après la phagocytose, semble inhiber la croissance bactérienne en condition de stress oxydant, suggérant que SprC serait exprimé en réponse au stress oxydant rencontré au cours de la phagocytose. Finalement, SprC atténue la virulence de *S. aureus* sur modèle murin de septicémie et la sollicitation des cellules phagocytaires de l'hôte, probablement dans le but de maintenir la bactérie à l'état de commensal (Le Pabic *et al.*, 2015).

- L'ARN SprX est impliqué dans la régulation de la résistance à la vancomycine et à la téicoplanine, appartement à la famille des glycopeptides. Ces antibiotiques séquestrent les substrats nécessaires à la formation du peptidoglycane, inhibant ainsi la synthèse de la paroi cellulaire. SprX agit en inhibant spécifiquement SpoVG (stage V Sporulation protein G), un acteur important de la résistance aux glycopeptides, par appariement directe avec les signaux d'initiation de la traduction (Eyraud *et al.*, 2014). Une étude récente réalisée avec un mutant de délétion et de surexpression de SprX1, l'une des copies de SprX, a montré un rôle de cet ARNrég dans l'activation des gènes codant le facteur d'aggrégation B (*clfB*) et de l'hémolysine-δ (*hld*). De cette manière, il interviendrait dans l'activité hémolytique, l'agglutination, la formation de biofilms et la virulence de *S. aureus*. L'ensemble de ces résultats mettent en évidence le rôle de SprX dans la pathogénie de *S. aureus* (Kathirvel *et al.*, 2016).

- L'ARN SprA1$_{AS}$ régule directement l'expression de son ARNm chevauchant, *sprA1*. Il constitue l'antitoxine appartenant à un système toxine-antitoxine (STA) de type I exprimé par *S. aureus* (Sayed *et al.*, 2012a). Ces systèmes sont décrits plus en détail dans la partie STA de type I du manuscrit.

- L'ARN SSR42

Les SSR (Small Stable RNA) sont des ARN spécifiquement exprimés et/ou stabilisés en fonction des phases de croissance et en réponse à différents stimuli environnementaux. Parmi ces ARN, Ssr42, est fortement enrichi en phase stationnaire de croissance (Morrison *et al.*, 2012). Ce long ARN non codant est impliqué dans la lyse des érythrocytes, la résistance à la lyse par opsonisation et la pathogénèse sur modèle murin d'infection de la peau et des tissus mous (Morrison *et al.*, 2012, Tomasini *et al.*, 2014). Une étude a récemment montré que la protéine Rsp (Repressor of surface protein) et l'ARNrég SSR42 représentent un système de régulation exprimé par *S. aureus* où *rsp* contrôle l'expression de SSR42 en réponse au peroxyde d'hydrogène. La protéine Rsp est également impliquée dans la cytotoxicité et l'activité hémolytique de *S. aureus*, inhibe d'autres protéines de subversion de l'immunité et augmente la létalité de *S. aureus* au cours de l'infection (Das *et al.*, 2016).

- L'ARN ArtR

L'ARNrég ArtR est le second ARNrég régulé par la protéine AgrA après l'ARNIII. En effet, AgrA se fixe sur le promoteur du gène *artR* pour inhiber sa transcription. L'ARN ArtR est impliqué dans la régulation de la virulence de *S. aureus* en activant l'expression de l'α-toxine. L'ArtR favorise également la dégradation de l'ARNm *sarT* par l'ARN III et inhibe sa traduction par fixation directe sur sa région 5'UTR, suggérant que l'activation de l'α-toxine par ArtR passe par l'inhibition de SarT (Xue *et al.*, 2014).

- L'ARN RsaE

L'ARNrég RsaE intervient dans la régulation d'enzymes impliquées dans le transport d'acides aminés et de peptides, la synthèse de cofacteurs, le métabolisme des lipides, des purines et des glucides ainsi que le cycle du TCA (Bohn *et al.*, 2010) (Geissmann et *al.*, 2009). De plus, une surproduction de l'ARNrég RsaE inhibe la croissance de *S. aureus*, réversée par l'ajout d'acétate (Bohn *et al.*, 2010).

- L'ARNrég RsaA

Comme mentionné précédemment, le facteur sigmaB, activé lorsque le pathogène est confronté à un stress, est impliqué dans le réseau de régulation de l'expression de gènes de virulence. Lorsqu'il ne se fixe pas directement à une séquence consensus localisée sur le promoteur de ses gènes cibles, il fait intervenir d'autres régulateurs, comme l'ARNrég RsaA. RsaA réprime la synthèse du régulateur global de transcription MgrA, activant ainsi la production de biofilm et inhibant la synthèse de capsules chez différentes souches de *S. aureus*. Ces phénotypes diminuent la protection de *S. aureus* contre l'opsonisation. Des études sur modèle animal montrent également que RsaA atténue la sévérité des infections systémiques aigües au profit des infections chroniques. C'est le premier exemple d'ARNrég suppresseur de virulence conservé chez *S. aureus.* Son rôle pourrait être de favoriser une relation de commensalisme entre la bactérie et son hôte (Romilly *et al.*, 2014). Trois autres transcrits dépendant du facteur sigmaB, appelés *sbrA*, *sbrB* et SbrC, sont très conservés chez *S. aureus*. *sbrA* et *B* codent pour un petit peptide alors que SbrC est un ARN non codant puisqu'il ne contient pas de cadre ouvert de lecture. La fonction de ces gènes est encore inconnue mais semble importante pour la réponse de *S. aureus* aux conditions de stress médiée par sigmaB (Nielsen *et al.*, 2011).

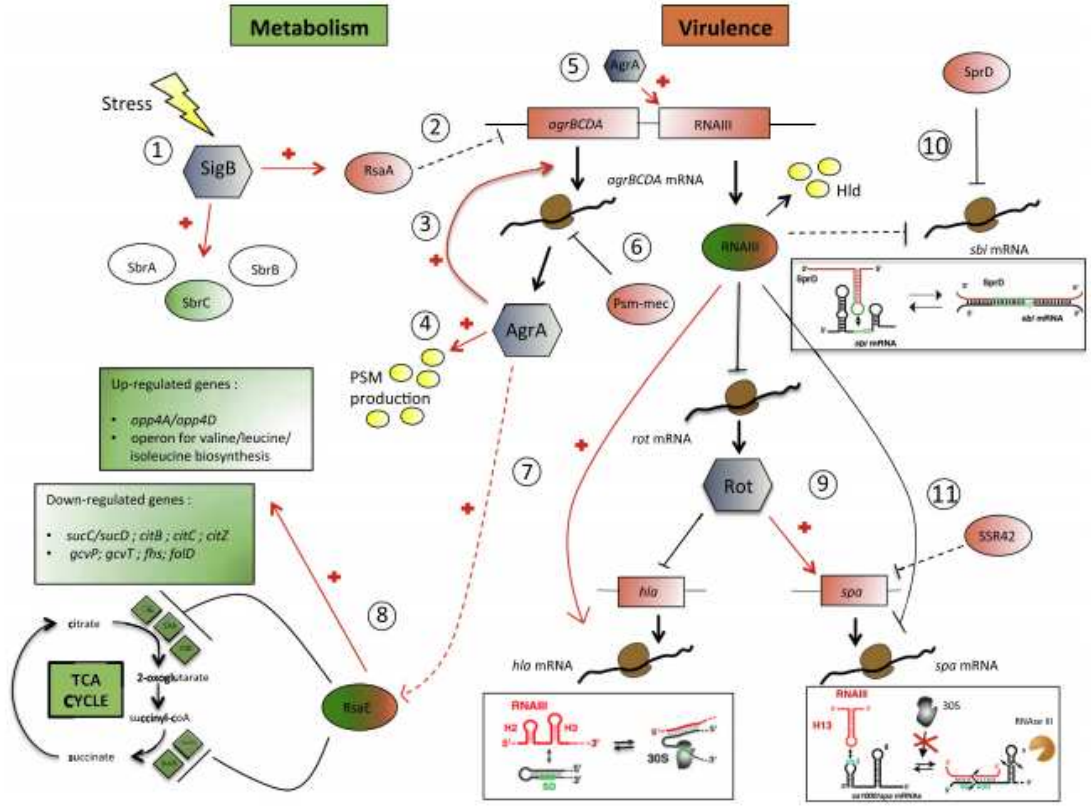


Figure 14 : ARN et facteurs transcriptionnels liant le métabolisme et la virulence chez *S. aureus*. Le panel à gauche de la figure montre les effecteurs moléculaires impliqués principalement dans le métabolisme général de *S. aureus* (boîtes vertes) et le panel de droite montre les effecteurs impliqués dans la virulence (boîtes rouges). Les facteurs transcriptionnels sont représentés par des hexagones gris et tous les ARN régulateurs par des ovales rouges (excepté l'ARNIII et RsaE qui sont colorés en vert et rouge pour souligner leur double rôle dans le métabolisme central et dans la virulence alors que SbrA/B ne sont pas colorés puisque aucune fonction ne leur a encore été assignée). Des flèches rouges et des croix rouges montrent une activation de l'expression, au contraire, les tirets noirs avec une barre montrent un effet inhibiteur, les tirets en pointillé représentent des interactions putatives (Tomasini *et al.*, 2014).

Systèmes toxine-antitoxine de type I

1. Les systèmes toxine-antitoxine

a. Caractéristiques communes

Les systèmes toxine-antitoxine (STA) sont des systèmes de mort autoprogrammée exprimés par les bactéries et les archées constitués de deux composants : une toxine stable de type protéique dont la surexpression ectopique tue les bactéries ou induit une stase bactérienne et d'une antitoxine instable qui neutralise l'action de la toxine. Dans certaines conditions, l'antitoxine labile est dégradée favorisant l'action de la toxine en inhibant des processus cellulaires essentiels comme la traduction, la réplication et la synthèse de la paroi cellulaire. Afin de neutraliser cette toxicité, l'antitoxine doit donc être continuellement synthétisée par la bactérie. Ces STA sont classés en six types en fonction de la nature et du mécanisme d'action des antitoxines. Les STA de type I et III regroupent les antitoxines de type ARN, alors que les types II, IV, V et VI regroupent les antitoxines de type protéique.

Les STA ont été identifiés pour la première fois comme des modules intervenant dans le maintien de plasmides. Les trois premiers systèmes décrits appartenant tous au type I sont : *ccdAB* localisé sur le plasmide F chez *E. coli* (Ogura & Hiraga, 1983, Jaffe *et al.*, 1985), *hok-sok* appartenant au locus *parB* et *kis-kid* appartenant au locus *parD* localisés sur le plasmide R1 de *E. coli* (Gerdes *et al.*, 1986b, Bravo *et al.*, 1987). Après la division cellulaire, les cellules filles dépourvues de ces plasmides ne peuvent plus se réapprovisionner en antitoxine, laissant la toxine libre d'entraver un processus cellulaire essentiel comme la réplication de l'ADN, la traduction ou encore la synthèse de peptidoglycane avec pour conséquence un arrêt de la croissance bactérienne. Ainsi, l'élimination spécifique des cellules dépourvues de plasmides, appelée « mort post-ségrégationnelle » ou PSK (Post-Segregational Kiling) (Gerdes *et al.*, 1986a) favorise le maintien des plasmides dans la population bactérienne (**Figure 15**).

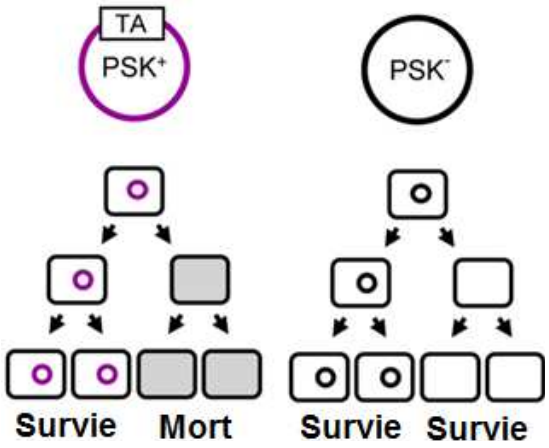


Figure 15 : Mécanisme de « mort post-ségrégationnelle » ou PSK. Contrairement aux plasmides PSK-, au cours de la division cellulaires les cellules filles qui ne reçoivent pas le plasmide PSK+, porteur du STA, n'expriment plus l'antitoxine labile et sont alors éliminées par la toxine qui est stable. Seules les cellules filles possédant le plasmide survivent, favorisant ainsi le maintien du plasmide PSK+ dans la population bactérienne. Ainsi la présence du STA sur le plasmide lui confère un avantage sélectif par rapport à un plasmide PSK-. (Adapté de (Van Melderen & Saavedra De Bast, 2009))

Plus tard, de nombreux STA ont également été découverts sur le chromosome bactérien (Van Melderen & Saavedra De Bast, 2009, Gerdes *et al.*, 2005, Pandey & Gerdes, 2005). Les STA chromosomiques n'interviennent pas dans le maintien de plasmides, cependant, les analyses bio-informatiques montrent qu'un certain nombre d'entre eux sont intégrés sur les EGM, comme les îlots de pathogénie ou les intégrons (Makarova *et al.*, 2009, Cambray *et al.*, 2010). Comme les STA plasmidiques, ces STA peuvent contribuer au maintien de ces éléments génétiques à l'intérieur du chromosome bactérien, contribuant ainsi à la dispersion des gènes de résistance ou des facteurs de virulence localisés sur ces EGM (Hernandez-Arriaga *et al.*, 2014). Des études suggèrent également un rôle altruiste des STA chromosomiques, qui induiraient une mort autoprogrammée d'une fraction de la population bactérienne pour permettre à la population générale de survivre dans des conditions de croissance difficiles (Yarmolinsky, 1995, Aizenman *et al.*, 1996). La stabilité différentielle de la toxine et de l'antitoxine est une stratégie simple mais efficace exploitée par les bactéries pour de nombreuses fonctions dans la physiologie bactérienne. En effet, des STA ont d'ores et déjà été associés à la réponse aux stress, la protection contre les phages ou au contraire le maintien des phages, la formation de biofilm ou encore la persistance. Ils constituent également une arme potentielle dans la pathogénie bactérienne (Otsuka, 2016, Lobato-Marquez *et al.*, 2016).

b. Six types de systèmes toxine-antitoxine

Les STA de type I

Pour les STA de type I, l'antitoxine de type ARN possède une complémentarité de séquence avec l'ARNm codant la toxine. Après la formation d'un complexe par appariement de base, l'antitoxine est capable d'activer la dégradation de l'ARNm de la toxine et/ou d'inhiber la traduction de l'ARNm de la toxine (**Figure 16**).

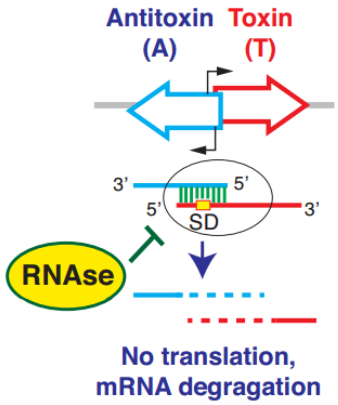


Figure 16 : Principales caractéristiques des STA de type I. Toxine (T) et antitoxine (A) sont indiqués en rouge et bleu, respectivement. L'antitoxine est un ARN antisens qui s'apparie avec l'ARNm codant la toxine. Le duplex est ciblé par des RNAses inhibant la traduction de la toxine. Abréviation : SD, séquence Shine-Dalgarno. Adapté de (Lobato-Marquez *et al.*, 2016).

Mon travail de thèse porte sur l'étude fonctionnelle d'un STA de type I. Pour cette raison, ils seront décrits plus en détail ultérieurement.

Les STA de type II

Les STA de type II regroupent le plus de loci et sont de loin les plus étudiés. Comme l'ensemble des STA, ils sont généralement composés de deux gènes qui sont ici organisés en opéron. Le gène de l'antitoxine précède celui de la toxine et les deux sont transcrits à partir d'un seul et même promoteur localisé en amont du gène de l'antitoxine (Leplae *et al.*, 2011). La plupart du temps, les deux gènes sont légèrement chevauchants indiquant une traduction couplée des deux gènes. L'organisation de l'opéron ne doit rien au hasard : elle permet de faire en sorte que l'antitoxine soit toujours transcrite et traduite avant l'initiation de la synthèse de la toxine (Chan *et al.*, 2016).

En condition normale de croissance, la protéine antitoxine se fixe à la protéine toxine pour préserver la cellule de sa nuisance. Cependant, l'antitoxine, peu structurée (Cherny *et al.*, 2005), est particulièrement sensible à la dégradation par les protéases de l'hôte. Ainsi, le clivage de l'antitoxine libère la toxine lui permettant d'agir sur ses cibles cellulaires.

L'antitoxine de type II empêche la toxicité de la toxine grâce à un domaine de fixation qui ne se structure que suite à la formation du complexe toxine-antitoxine. Souvent, l'antitoxine s'enroule autour de la toxine pour l'inactiver en bloquant ou masquant les sites

actifs de la toxine (Boggild *et al.*, 2012, Schureck *et al.*, 2014) : c'est le cas de MazF, décrit pour la première fois chez *E. coli* et découvert chez *S. aureus* (Kamada *et al.*, 2003, Schuster *et al.*, 2015, Schuster & Bertram, 2016). La structure cristallographique du complexe MazE/MazF chez *E. coli* révèle une structure en hétérohexamère étendue composée d'une alternance d'homodimères de toxine et d'antitoxine ($MazF_2$-$MazE_2$-$MazF_2$)(Kamada *et al.*, 2003).

D'autres antitoxines inhibent l'activité de la toxine en perturbant leur structure, comme l'antitoxine RelB (Li *et al.*, 2009), ou en se fixant loin du site actif pour verrouiller la toxine dans une conformation ouverte inactive, comme l'antitoxine HipB (Schumacher *et al.*, 2009).

Les antitoxines de type II répriment également la transcription de leur propre opéron par fixation directe sur le site opérateur, en plus de cibler leur toxine. Seules, elles n'ont qu'une action limitée sur leur propre régulation, en revanche, une répression totale est généralement observée en présence du complexe toxine-antitoxine. En effet, la fixation de la toxine sur l'antitoxine favorise sa capacité à fixer l'ADN. La toxine, qui n'est pas capable de fixer l'ADN en amont de l'opéron, a ici un rôle de corépresseur en modifiant la conformation du complexe antitoxine-ADN (Hayes & Kedzierska, 2014, Chan *et al.*, 2016) (**Figure 17**).

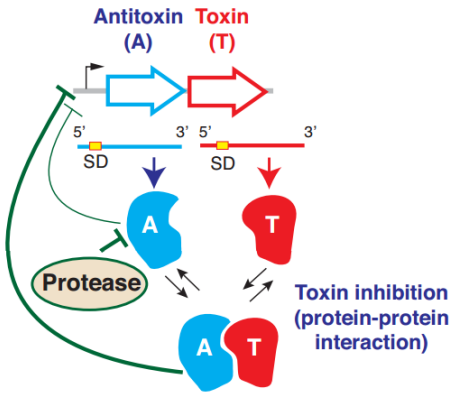


Figure 17 : Principales caractéristiques des STA de type II. Toxine (T) et antitoxine (A) sont indiquées en rouge et bleu, respectivement. L'antitoxine est une protéine qui bloque l'activité de la toxine par une interaction protéine-protéine directe. Dans la plupart des cas, le complexe T-A se fixe au promoteur pour réprimer efficacement la transcription des deux éléments. L'antitoxine seule peut aussi fixer et réprimer son propre promoteur, mais moins efficacement qu'en combinaison avec la toxine. Les niveaux d'antitoxine sont minutieusement contrôlés par les protéases. Abréviation : SD, séquence Shine-Dalgarno. Adapté de (Lobato-Marquez *et al.*, 2016).

Les toxines de type II peuvent être divisées en six groupes en fonction de leur homologie de structure (Blower *et al.*, 2011). Elles peuvent cibler différentes structures cellulaires et des procédés moléculaires essentiels entravant ainsi les activités cellulaires (Hayes & Van Melderen, 2011, Kedzierska & Hayes, 2016). La grande majorité des toxines de type II agissent comme des endoribonucléases qui inhibent la traduction (Yamaguchi *et al.*, 2011) : c'est le cas de la toxine MazF qui clive les ARNm libres de manière séquence spécifique (Zhang *et al.*, 2003). D'autres toxines de type II inhibent la traduction bactérienne

par d'autres mécanismes décris dans le chapitre consacré à la régulation de la traduction. Enfin, les toxines de type II CcdB et ParE agissent par inhibition de la réplication de l'ADN (Bernard & Couturier, 1992, Yuan *et al.*, 2011) et les toxines ζ et PezT empêchent la synthèse de la paroi bactérienne (Mutschler *et al.*, 2011).

Des STA de type II ont déjà été impliqués dans le maintien d'EGM (Van Melderen & Saavedra De Bast, 2009), la mort cellulaire autoprogrammée (Engelberg-Kulka *et al.*, 2006), l'inhibition globale de la traduction (Christensen *et al.*, 2001), la persistance (Correia *et al.*, 2006), la formation de biofilm (Kim *et al.*, 2009, Mutschler *et al.*, 2011, Wood & Wood, 2016) ; Bloom-Ackermann, 2016) ou encore la virulence (Wood & Wood, 2016, Chan & Espinosa, 2016). La délétion du STA pezAT exprimé par *Streptococcus pneumoniae* présente une résistance accrue aux antibiotiques de la famille des β-lactamines. PezAT pourrait participer à l'équilibre subtile entre la perte de fonctions, comme la résistance aux β-lactamines et l'acquisition d'autres fonctions, comme la virulence (Chan & Espinosa, 2016).

Quatre STA de type II sont exprimés par *S. aureus.* Le STA plasmidique $PemIK_{Sa}$ où la toxine $PemK_{Sa}$ est une ribonucléase spécifique de la séquence nucléotidique UAUU et $PemI_{Sa,}$ l'antitoxine qui inhibe la toxine par interaction dans le but de maintenir le plasmide au sein de *S. aureus* (Bukowski *et al.*, 2013). Le STA MazEF est exprimé à partir de l'opéron *mazEF-rsbUVW-sigmaB* (Donegan & Cheung, 2009). La toxine MazF est une ribonucléase spécifique des séquences UACAU présentent sur les ARNm codant par exemple pour la δ-hémolysine, la protéine A et sigmaB (Fu *et al.*, 2009). Une étude récente a permis de montrer une implication du STA MazEF dans la tolérance de *S. aureus* aux antibiotiques de la famille des β-lactamines (Schuster *et al.*, 2015). Le STA YefM/YoeB est exprimé en deux copies par *S. aureus* où YoeB est une RNase dépendante du ribosome qui inhibe la traduction et la croissance de *S. aureus* (Larson & Hergenrother, 2014). La délétion des trois STA MazEF et les deux STA de YefM/YoeB n'a pas permis de mettre en évidence de phénotype particulier (Conlon *et al.*, 2016). Enfin, *S. aureus* exprime le STA Omega/Epsilon/Zeta où la toxine Zeta est inhibée par l'antitoxine Epsilon et où Omega est une protéine impliquée dans la régulation de l'expression de l'opéron (Locke *et al.*, 2012). La fonction biologique associée à ce STA n'a pas encore été élucidé chez *S. aureus* mais il est probable que la toxine Zeta inhibe la synthèse du peptidoglycane en phosphorylant le précurseur uridine diphosphate-N-acétylglucosamine conduisant à l'autolyse de la bactérie (Mutschler *et al.*, 2011).

Les STA de type III

Le premier STA de type III, *toxN*/ToxI, a été découvert sur le plasmide pECA1039 chez *Pectobacterium atrosepticum* (Fineran *et al.*, 2009). Le second STA de type III à avoir été bien décrit est *abiQ*/AntiQ découvert récemment chez *Lactococcus lactis* (Samson *et al.*, 2013).

Au niveau génétique, les STA de type III sont organisés en opérons bicistroniques où la toxine et l'antitoxine sont transcrits à partir d'un même promoteur situé en amont du gène de l'antitoxine. Un terminateur transcriptionnel Rho-indépendant, localisé entre les deux gènes, garantit l'expression en excès de l'antitoxine par rapport à la toxine (Goeders *et al.*, 2016, Belanger & Moineau, 2015). L'antitoxine dans sa forme complète est une succession de séquences répétées, cependant, une seule séquence est nécessaire pour réprimer la toxicité de la toxine (Blower *et al.*, 2011, Fineran *et al.*, 2009, Samson *et al.*, 2013). C'est la toxine elle-même, par son activité endoribonucléase spécifique de la séquence nucléotidique, qui clive l'antitoxine en monomères. Dans l'exemple de *toxN*/ToxI, le locus contient le gène *toxI* composé de 5,5 répétitions en tandem de 36 nucléotides de l'antitoxine ToxI suivi du gène *toxN* codant pour la toxine ToxN de 19,7 kDa avec un terminateur transcriptionnel Rho-independant entre les deux gènes. La structure cristalline du complexe ToxI-toxN a révelé un complexe hétérohexamérique triangulaire composé de trois monomères de ToxI et de trois protéines ToxN. La formation de ce complexe est donc responsable de l'inhibition de la fonction de la toxine ToxN par ToxI (Short *et al.*, 2013, Blower *et al.*, 2011) (**Figure 18**).

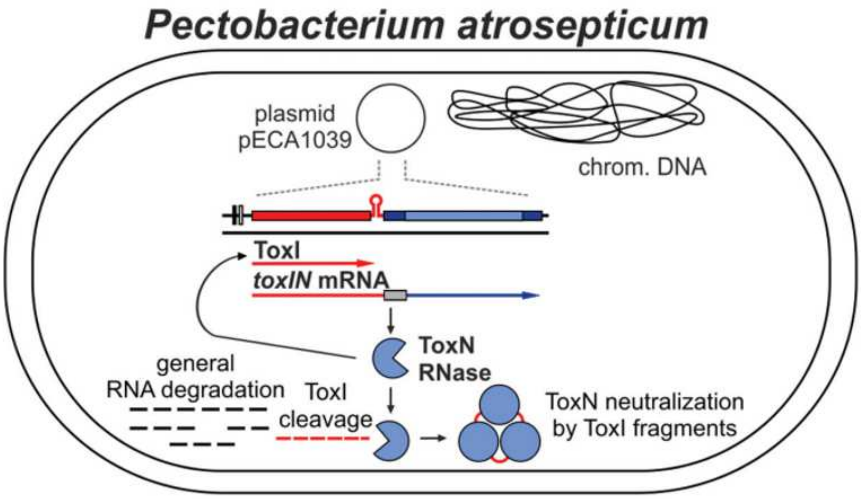


Figure 18 : Mode d'action de la toxine ToxN exprimée par la bactérie à Gram négatif *Pectobacterium atrosepticum.* L'opéron biscitronique est représenté avec les barres noires et blanches indiquant les boîtes -35 et -10 du promoteur et avec l'antitoxine ToxI en rouge et la toxine ToxN en bleu. La transcription de l'opéron permet la synthèse de l'ARNm *toxIN* et, par conséquent, l'expression de la toxine ToxN. ToxN agit comme une ribonucléase dirigée contre des cibles cellulaires générales et sa propre antitoxine ToxI dont les fragments sont capables de neutraliser directement ToxN (Adapté de (Brantl & Jahn, 2015)).

Bien que tous les STA de type III présentent le même arrangement génétique, ils peuvent être classés en trois familles en fonction des similitudes entre les séquences d'acides aminés : *toxIN*, *cptIN*, et *tenpLN*, où les « L » et « N » représentent l'antitoxine et la toxine, respectivement. Des loci de la famille des *tenpLN* ont été identifiés dans trois différentes souches de *S. aureus* aux niveaux chromosomiques ou plasmidiques (Blower *et al.*, 2011). Jusqu'à présent, deux fonctions biologiques ont été associées aux STA de type III : la protection contre les infections par les bactériophages (Samson *et al.*, 2013) et le maintien de plasmides (Short *et al.*, 2013). Ces fonctions semblent faire intervenir l'activité endoribonucléase des toxines de type III (Goeders *et al.*, 2016).

Le STA de type IV

Le STA de type IV se caractérise par l'action de l'antitoxine de type protéique qui neutralise la toxine par blocage plutôt que par une interaction directe protéine-protéine (**Figure 19**). L'unique exemple de STA de type IV actuellement mis en évidence, *yeeUV*, est retrouvé chez *E. coli.* L'antitoxine YeeU, renommée CbeA (pour Cytoskeleton bundling-enhancing factor A), permet le regroupement des protéines du cytosquelette MerB et FtsZ, protégeant leur polymérisation contre l'action inhibitrice de la toxine YeeV (ou CbtA) (Masuda *et al.*, 2012a, Masuda *et al.*, 2012b).

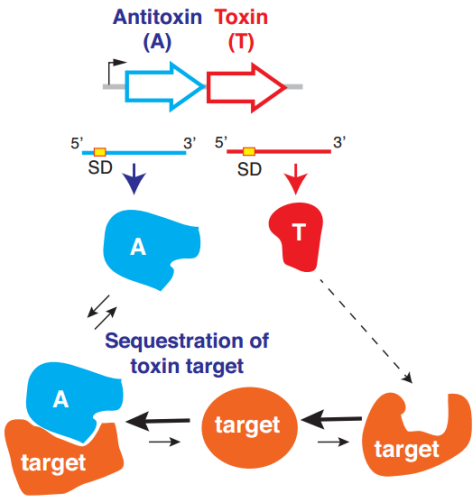


Figure 19 : Principales caractéristiques du STA de type IV. Toxine (T) et antitoxine (A) sont indiqués en rouge et bleu, respectivement. La toxine et l'antitoxine se fixent sur la même cible. L'antitoxine inhibe l'activité de la toxine par compétition pour la fixation sur un substrat commun. Abréviation : SD, séquence Shine-Dalgarno. Adapté de (Lobato-Marquez *et al.*, 2016).

Le STA de type V

Chez l'unique STA de type V actuellement reporté chez *E. coli*, *ghoST*, la toxine GhoT est un petit peptide hydrophobe qui perturbe le potentiel membranaire et, par conséquent, la synthèse d'ATP, facilitant ainsi l'entrée en persistence (Wang *et al.*, 2012). L'antitoxine du système, GhoS, est quant à elle une RNase qui clive l'ARNm *ghoT* prévenant ainsi la synthèse de la toxine. C'est le seul cas décrit d'antitoxine ayant une activité enzymatique (**Figure 20**).

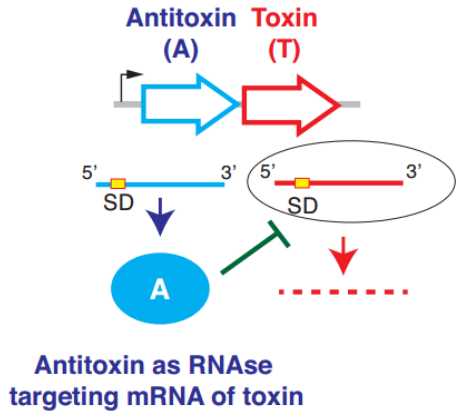


Figure 20 : Principales caractéristiques du STA de type V. Toxine (T) et antitoxine (A) sont indiqués en rouge et bleu, respectivement. L'antitoxine a une activité RNase et dégrade le transcrit de la toxine. Abréviation : SD, séquence Shine-Dalgarno. Adapté de (Lobato-Marquez *et al.*, 2016).

La régulation du système *ghoST* ne passe pas uniquement par l'antitoxine. En effet, un second locus TA, *mqsRA*, contrôle le niveau du transcrit *ghoS* grâce à l'activité RNase spécifique de la toxine MqsR (Wang *et al.*, 2012). Ainsi, les systèmes *msqAR* et *gohST* agissent de manière coordonnée pour réguler l'activité de la toxine transmembranaire, GhoT (Lobato-Marquez *et al.*, 2016).

Le STA de type VI

Récemment un nouveau type de STA a été découvert : il constitue alors le STA de type VI. A l'heure actuelle, le seul exemple à avoir été identifié est le locus *socAB*, où l'antitoxine SocA se fixe à la toxine SocB et agit comme une protéine adaptatrice pour les protéases ClpXP qui vont donc pouvoir dégrader la toxine. A l'inverse des STA de type II, SocA ne neutralise donc pas directement SocB, mais assure la promotion de sa dégradation par des protéases spécifiques grâce à la formation d'un complexe toxine-antitoxine (Aakre *et al.*, 2013, Lobato-Marquez *et al.*, 2016) (**Figure 21**).

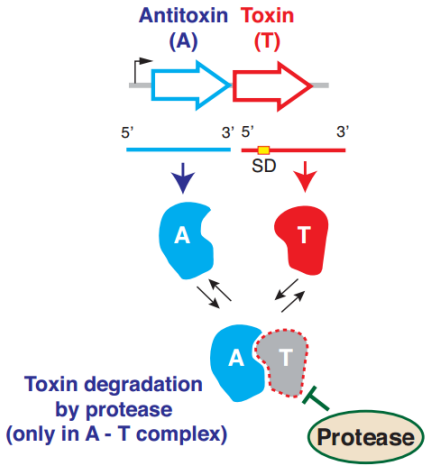


Figure 21 : Principales caractéristiques du STA de type VI. Toxine (T) et antitoxine (A) sont indiqués en rouge et bleu, respectivement. L'antitoxine favorise la dégradation de la toxine par la formation d'un complexe T-A ; dans cette conformation, la toxine est sélectivement ciblée par les protéases. Abréviation : SD, séquence Shine-Dalgarno. Adapté de (Lobato-Marquez *et al.*, 2016).

2. Les systèmes toxine-antitoxine de type I

Les STA de type I sont composés d'un petit peptide ou d'une protéine toxique et stable dont l'expression est inhibée par une antitoxine instable de type ARN lorsque les conditions de croissance sont optimales. L'antitoxine, qui possède une complémentarité de séquence avec l'ARNm de la toxine, inhibe sa traduction et/ou active sa dégradation par appariement de base. A l'inverse, lorsque la bactérie est confrontée à une condition de croissance particulière ou lorsqu'elle perd l'EGM qui porte le locus du STA, l'antitoxine labile n'est plus synthétisée et rapidement dégradée, à l'inverse de la toxine qui est beaucoup plus stable. Dans cette condition, la toxine peut cibler des fonctions essentielles de la physiologie bactérienne pour induire une inhibition de la croissance bactérienne ou la mort bactérienne.

a. Les différents mécanismes de régulation mis en jeu par l'antitoxine pour réguler l'expression de la toxine

Les antitoxines de type I ont une complémentarité de séquence avec l'ARNm de leur toxine associée, même si toute cette complémentarité n'est pas nécessaire à la répression de l'expression de la toxine (Wen & Fozo, 2014). En effet, les appariements de base entre l'antitoxine et l'ARNm de la toxine peuvent varier de 18 à 75 nucléotides. Les gènes composants les STA de type I sont généralement localisés sur les brins opposés, de manière convergente et chevauchante. Ils ont alors une complémentarité parfaite (ex : *ibs*/Sib) (Fozo *et al.*, 2010). Ils peuvent également être localisés à part l'un de l'autre de manière divergente et n'auront alors qu'une complémentarité de séquence limitée (ex : *tisB*/IstR1) (Darfeuille *et al.*, 2007). Dans le premier cas, l'antitoxine est codée en *cis* alors

que dans le deuxième cas, elle est codée en *trans* (revue (Brantl, 2012)(Brantl, 2009)). Grâce à cette complémentarité de séquence entre l'antitoxine et l'ARNm de la toxine, les antitoxines de type I n'ont pas besoin de protéine intermédiaire pour stabiliser leur interaction avec l'ARNm de la toxine en opposition avec d'autres ARNrég identifiés chez *E. coli* présentant une complémentarité de séquence de 6 à 12 nucléotides, à l'exception du système *ralR*/RalA (Guo *et al*., 2014), qui nécessite la présence de la protéine Hfq (Wagner, 2013).

L'organisation génétique d'un certain nombre d'exemples de STA de type I ont été reportés dans le **Tableau 6** présenté à la page suivante.

Locus	Localisation (plasmide ou bactérie) [a]	Organisation génétique [b]	Mode d'action de l'antitoxine [c]
Hok/Sok	Plasmid R1		Inhibe la synthèse protéique
RNAI/RNAII	pAD1		Inhibe la synthèse protéique
Ldr/Rdl	*Escherichia coli*		Inhibe la synthèse protéique
TisB/IstR1	*Escherichia coli*		Inhibe la synthèse protéique
TxpA/RatA	*Bacilus subtilis*		Stimule la dégradation de l'ARNm
SymE/SymR	*Escherichia coli*		Inhibe la synthèse protéique
Ibs/Sib	*Escherichia coli*		Inhibe la synthèse protéique
ShoB/OhsC	*Escherichia coli*		Inhibe la synthèse protéique
BsrG/SR4	*Bacilus subtilis*		Stimule la dégradation de l'ARNm et inhibe la traduction
Zor/Orz	*Escherichia coli*		Inhibe la synthèse protéique
RdlR/RalA	*Escherichia coli*		Inhibe la synthèse protéique
DinQ/AgrB	*Escherichia coli*		Inhibe la synthèse protéique

Tableau 6 : Caractéristiques de certains loci de STA de type I décrits. [a]La localisation (première décrite) de chaque locus toxine-antitoxine est indiquée. Noter que plusieurs homologues de ces systèmes ont été identifiés et caractérisés. [b]Les flèches bleues représentent l'ARNm de la toxine ; les boîtes bleues, les régions codantes de la toxine. Les flèches rouges indiquent l'antitoxine. [c]Le mode d'action de l'antitoxine n'a pas été validé pour tous les exemples (Adapté de (Wen & Fozo, 2014).

Les antitoxines de type I contrôlant la stabilité de l'ARNm

Le locus *txpA*/*ratA* est exprimé par *Bacillus subtillis* (*B. subtillis*) au niveau de l'élément *skin*, un élément génétique excisé du chromosome au cours de la sporulation de la bactérie (Silvaggi *et al.*, 2005). La surexpression du gène *txpA* codant pour un peptide de 59 acides aminés, par un promoteur inductible, est fortement toxique pour la bactérie, mais la co-expression de l'ARN RatA peut prévenir cette toxicité. Des études *in vitro* montrent que l'interaction *via* les extrémités 3' de RatA et *txpA* induit la formation d'un complexe d'ARN *txpA*-RatA entraînant de sévères changements structuraux sur l'ARNm de la toxine *txpA*.

Ces modifications mènent à la formation de nouveaux sites de coupure pour la RNase III, une endoribonucléase bactérienne spécifique des séquences double brin d'ARN (Durand *et al.*, 2012). De plus, la délétion de *ratA* (Silvaggi *et al.*, 2005) tout comme la délétion du gène codant la RNase III, *rnc* (Durand *et al.*, 2012) entraînent un niveau élevé d'ARNm *txpA* par rapport à la souche sauvage. Ces résultats suggèrent que le locus *txpA*/RatA constitue un STA de type I où l'antitoxine RatA agit principalement en contrôlant la stabilité l'ARNm de la toxine *txpA* en faisant intervenir l'activité d'une endoribonucléase (Silvaggi *et al.*, 2005, Durand *et al.*, 2012) (**Figure 22**).

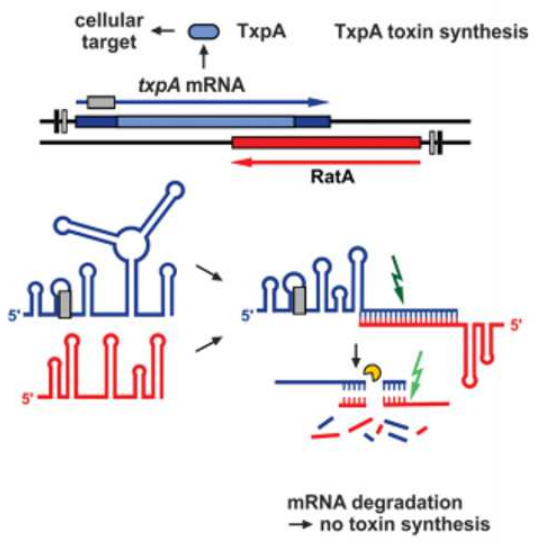


Figure 22 : Mécanisme d'inhibition de l'expression de la toxine *txpA* par l'antitoxine RatA. L'antitoxine RatA (rouge) interagit avec l'ARNm de la toxine *txpA* (bleu) par appariement de bases à leur extrémité 3'. La RNase III clive le duplexe *tpxA*/RatA inhibant ainsi la traduction de la toxine. Les barres noires et blanches mettent en évidence les boîtes -35 et -10 des promoteurs, respectivement et les boîtes grises correspondent aux séquences SD. Les flèches vertes symbolisent les endoribonucléases (Adapté de (Brantl & Jahn, 2015).

Les antitoxines de type I contrôlant la synthèse protéique

La grande majorité des antitoxines de type I agissent par inhibition de la traduction de l'ARNm de la toxine. Cependant, cette inhibition peut faire intervenir différents mécanismes moléculaires.

- L'inhibition de la traduction d'un peptide leader

Le locus *hok*/*sok* (locus *par*) est le premier STA de type I à avoir été identifié sur le plasmide R1 chez *E. coli* (Gerdes et al., 1986b)*..* Il est maintenant associé à un grand nombre de bactéries à Gram négatif. L'ARNm de la toxine *hok* (host killing) possède une région 5' non traduite (5' UTR) exceptionnellement longue où se trouve la région de complémentarité avec l'antitoxine Sok. Cette longue région 5'UTR a un repliement tel que ni l'antitoxine, ni les ribosomes ne peuvent y accéder (Franch & Gerdes, 1996, Franch *et al.*, 1997, Moller-Jensen *et al.*, 2001). Le clivage de l'extrémité 3' de l'ARNm *hok* modifie son

repliement et permet à l'antitoxine Sok (Suppression of host killing) d'accéder à la région complémentaire (Gerdes *et al.*, 1990).

Dans la région 5' UTR de *hok* se trouve un autre cadre ouvert de lecture, *mok* (mediation of killing), dont la traduction est nécessaire à la traduction de *hok*. En effet, le ribosome ayant accès au RBS de l'ARNm *mok* peut ainsi initier sa traduction puis une fois accroché au brin d'ARN, il peut également traduire l'ARNm *hok* sans avoir besoin de se fixer au préalable sur son RBS (Thisted & Gerdes, 1992). La région de complémentarité de Sok chevauche l'ARNm *mok*, ainsi la fixation de Sok sur *mok* empêche la traduction des deux ARNm *mok* et *sok* (**Figure 23**). L'inhibition de la traduction de *mok* et de *hok* est le mécanisme d'action principal de l'antitoxine Sok mais le complexe d'ARN formé est également sujet aux dégradations par la RNase III (Gerdes *et al.*, 1992).

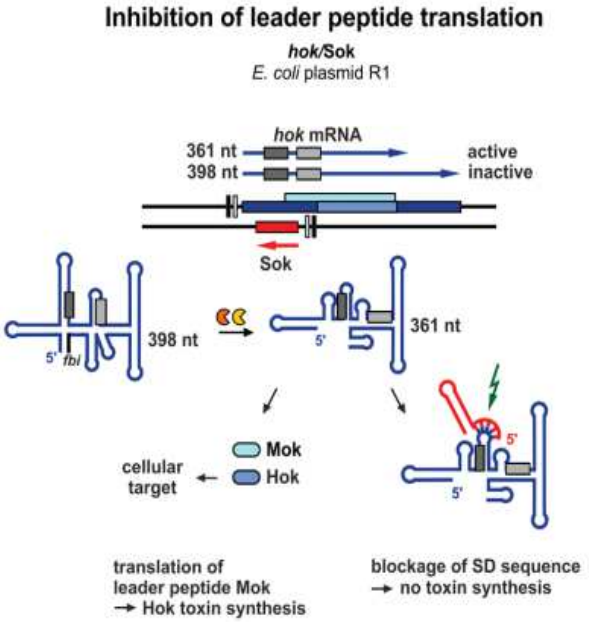


Figure 23 : Mécanisme d'inhibition de la traduction de *hok* par l'antitoxine Sok. Le locus *hok/sok* du plasmide R1 trouvé chez *E. coli* comprend trois gènes : *hok* (host killing) qui code le peptide toxique, *mok* (mediation of killing) qui chevauche *hok* et qui est nécessaire pour la traduction de *hok*, et *sok* (suppression of host killing) l'antitoxine qui bloque la traduction de l'ARNm *mok*. Puisque la traduction de *hok* dépend de la traduction de *mok*, Sok indirectement inhibe la traduction de *hok* en inhibant la traduction de *mok*. Les barres noires et blanches mettent en évidence les boîtes -35 et -10 des promoteurs, respectivement et les boîtes grises correspondent aux séquences SD. Les flèches vertes symbolisent les endoribonucléases. (Adapté de (Brantl & Jahn, 2015).

De nombreux homologues du locus *hok*/*sok* ont été mis en évidence sur différents plasmides, dont les loci *flm* (f leading maintenance) et *srnB-srnC* (stable RNA negative) retrouvés sur le plasmide F et le locus *pndA-pndB* (promotion of nucleic acid degradation) sur le plasmide R483 ou directement sur des chromosomes bactériens (Wen & Fozo, 2014).

La régulation de la traduction de la toxine Ldr (Long direct repeat) par l'antitoxine Rdl semble comparable à ce qui est décrit pour le locus *hok*/*sok*. La séquence répétée Ldr est retrouvée en quatre copies sur le chromosome de *E. coli* (Kawano *et al.*, 2002b, Kawano *et al.*, 2002a, Rudd, 1999). Chacune de ces séquences répétées sont composées d'un gène codant un petit peptide de 35 acides aminés toxique, LdrD, et d'un gène antisens codant son

antitoxine Rdl (Kawano *et al.*, 2002b, Kawano *et al.*, 2002a). L'ARNm *ldrD* possède également une longue région 5' UTR comprenant la zone de chevauchement avec l'antitoxine Rdl. Cependant, Rdl ne chevauche ni le RBS, ni le codon d'initiation de la traduction. Il semblerait que la traduction de *ldrD* dépende de la traduction d'un autre ARNm, *ldrX*, localisé dans la région 5' UTR de *ldrD* (Gerdes & Wagner, 2007) et que l'appariement de base de l'antitoxine Rdl bloque la traduction des deux ARNm, hypothèse qui reste cependant à vérifier (Wen & Fozo, 2014).

- La séquestration de la séquence Shine-Dalgarno ou du codon d'initiation de la traduction

Le locus *symE*/*symR* exprimé chez *E. coli* code pour un STA de type I atypique, où la toxine SymE (SOS-induced *yjiW* gene with similarity to *mazE*) est une protéine de 113 acides aminés pas particulièrement hydrophobe et qui agit comme une endoribonucléase (Kawano *et al.*, 2007, Kawano, 2012). L'expression de l'ARNm *symE* est induite par la réponse aux dommages à l'ADN (réponse SOS), via la fixation du répresseur transcriptionnel LexA sur le promoteur du gène *symE* (Kawano *et al.*, 2007). De plus, la surexpression de la toxine mène à une augmentation de la quantité d'ARNm dégradés (Kawano *et al.*, 2007). En général, son expression est réprimée par l'antitoxine SymR (symbiotique RNA), un ARN antisens sur la partie 5'-UTR de la toxine *symE*, de manière à chevaucher le codon d'initiation de la traduction et le RBS de l'ARNm *symE*. Ici, l'antitoxine inhibe la traduction de l'ARNm de la toxine en inhibant la fixation du ribosome, sans affecter sa stabilité (Kawano *et al.*, 2007). En effet, la mutation dans le promoteur du gène *symR* induit une augmentation de 7 fois de l'expression de la protéine SymE associée à une faible augmentation de l'expression de l'ARNm *symE*. De plus, l'expression de la protéine SymE n'est pas affectée dans une souche délétée de la RNase III (Kawano *et al.*, 2007) (**Figure 24**).

Pour le STA de type I *ibs*/Sib, exprimés en 5 copies chez *E. coli*, l'antitoxine Sib (Short intergenic abundant) chevauche entièrement la région codante et le RBS de l'ARNm de la toxine *ibs* (induction brings stasis) (Han *et al.*, 2010). Cependant, l'interaction de Sib sur l'ARNm ibs implique le domaine TRD1 chevauchant la séquence codante de *ibs* et TRD2 chevauchant le site d'initiation de la traduction de *ibs*. Cette interaction induit ainsi l'inhibition de la fixation du ribosome et donc la traduction de la toxine. Le complexe d'ARN serait également sujet à la dégradation par la RNase III puisque que l'expression de l'ARN ibs est augmentée dans une souche délétée de la RNase III (Fozo *et al.*, 2008).

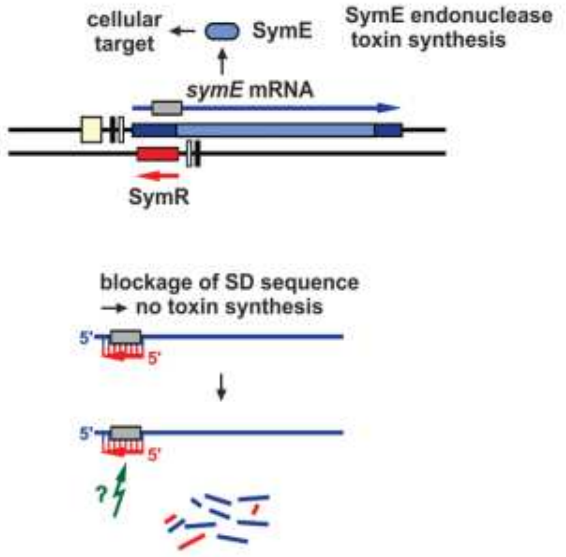


Figure 24 : Mécanisme d'inhibition de la traduction de la toxine SymE par l'antitoxine SymR. L'ARN antisens SymR inhibe la traduction de l'ARNm *symE* par fixation directe sur la séquence SD. La boîte LexA indique que le promoteur de *symE* est sous le contrôle de la réponse SOS. Les barres noires et blanches mettent en évidence les boîtes -35 et -10 des promoteurs, respectivement et les boîtes grises correspondent aux séquences SD. Les flèches vertes symbolisent les endoribonucléases. La boîte jaune indique le site de fixation de LexA (Adapté de (Brantl & Jahn, 2015)).

Les ARN RNAI et RNAII, exprimés à partir du plasmide pAD1 d'Enterococcus faecalis et chevauchants en 3' sur 35 nucléotides, sont composés de deux séquences répétées, DRa et DRb, complémentaires aux deux extrémités 3' et 5', le complexe ainsi formé bloque la séquence SD et le codon d'initiation empêchant ainsi la fixation du ribosome et donc l'inhibition de la traduction de l'ARNm de la toxine RNA I codant pour le peptide toxique Fst (Faecalis plasmid stabilisation toxin) (Greenfield & Weaver, 2000, Greenfield *et al.*, 2001). Le complexe RNA I-RNA II ainsi formé est très stable *in vitro* (Weaver *et al.*, 2004). Il semble qu'un facteur supplémentaire encore inconnu serait impliqué dans la dissociation du complexe et la dégradation de l'antitoxine RNA II *in vivo* puisque la demi-vie de RNA II est plus faible que la demi-vie de la toxine RNA I (Wen & Fozo, 2014) (**Figure 25**).

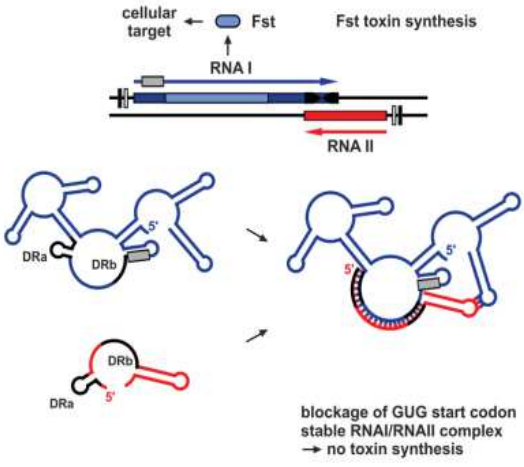


Figure 25 : Mécanisme d'inhibition de la traduction de RNAI par l'antitoxine RNAII. RNAI et RNAII possèdent trois segments complémentaires dispersés (DRa, DRb (pour direct repeat) et le terminateur de transcription). Le complexe RNAI/RNAII prévient la traduction de la toxine, puisque la région entourant le codon d'initiation de la toxine est séquestrée par l'antitoxine. La formation du complexe entraîne la stabilisation des deux ARN. Les barres noires et blanches mettent en évidence les boîtes -35 et -10 des promoteurs, respectivement et les boîtes grises correspondent aux séquences SD. Les flèches vertes symbolisent les endoribonucléases. DRa et DRb sont en noire. (Adapté de (Brantl & Jahn, 2015, Dorr *et al.*, 2010).

- Cas particulier d'un ARN antisens codé en *cis*, mais qui régule la traduction en *trans*

Le STA de type I *sprA1*/SprA1$_{AS}$, localisé dans un îlot de pathogénie du pathogène *S. aureus,* présente une caractéristique particulière. En effet, les deux gènes du locus sont localisés sur les brins opposés de l'ADN avec une région chevauchante au niveau de leurs extrémités 3' respectives. Cependant, dans ce STA, ce ne sont pas les régions chevauchantes qui s'apparient entre elles, mais les extrémités 5', non chevauchantes. Les résultats montrent également que c'est bien cet appariement en « *trans* » qui est responsable de l'inhibition de la traduction du peptide toxique codé par *sprA1*, PepA1 de 31 acides aminés (**Figure 26**) (Sayed *et al.*, 2012a).

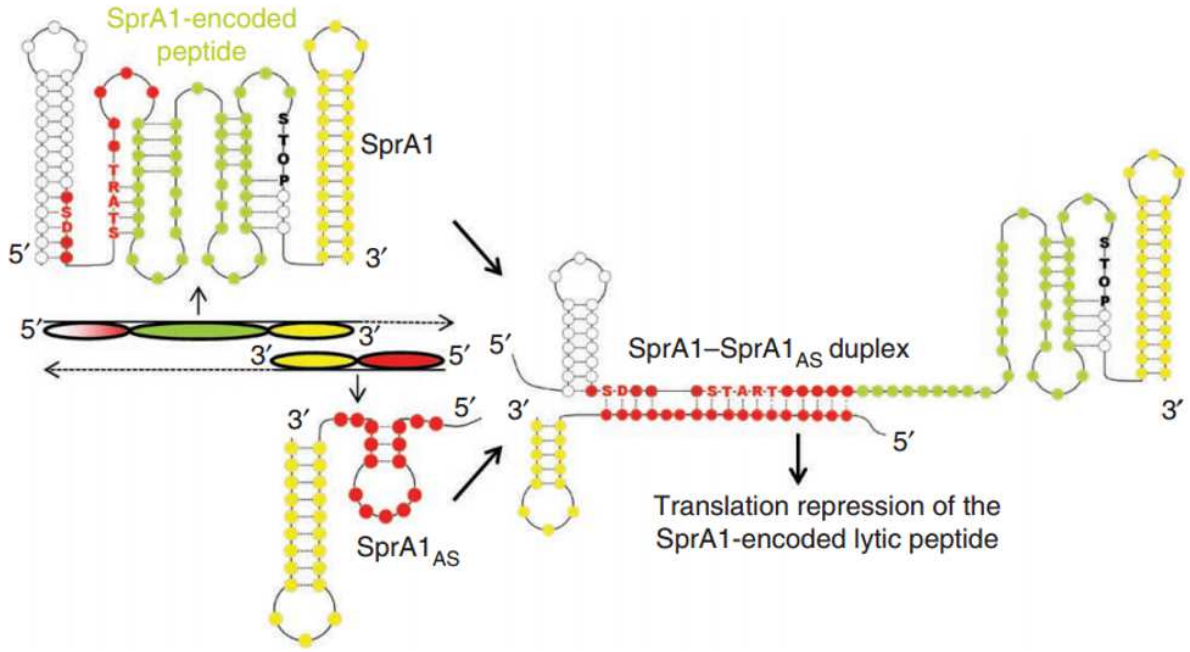


Figure 26 : Modèle proposé d'inhibition de la traduction de l'ARNm *sprA1* en *trans* par l'antitoxine SprA1$_{AS}$ codée en *cis*. Le cadre ouvert de lecture de *sprA1* est montré en vert, les séquences chevauchantes sont en jaunes et les séquences non chevauchantes mais capables d'interagir sont en rouge. La formation du complexe séquestre le codon d'initiation et la séquence SD (indiqués en rouge) (Sayed *et al.*, 2012a).

- La séquestration d'une séquence stand-by

Le STA de type I *tisB*-IstR1 a été identifié sur le chromosome d'*E. coli*. Les gènes de ce système sont divergents l'un de l'autre et ne possèdent qu'une complémentarité de séquence limitée. Il serait régulé par le répresseur transcriptionnel LexA de la réponse SOS (Wagner & Unoson, 2012). Il interviendrait dans l'entrée de la bactérie en état de persistance en réponse à ce stress (Vogel *et al.*, 2004, Gurnev *et al.*, 2012).

Dans ce système, l'ARNm de la toxine *tisB* (toxicity-induced by SOS) entier (+1), traductionnellement inactif, est clivé à son extrémité 5' par une endonucléase pour donner l'ARNm *tisB* actif (+42). La forme active présente des réarrangements structuraux et possède des séquences nucléotidiques simple-brin complémentaire de la séquence de l'antitoxine IstR-1 (Inhibitor SOS-induced toxicity by RNA) qui vient s'y fixer pour inhiber sa traduction et favoriser son clivage, par la RNAse III, en un ARNm tronqué et inactif (+106). L'ARNm *tisB* actif (+42), contrairement aux transcrits inactifs (+1 et +106), contient un site de chargement ou de « stand-by » en amont du RBS qui lui est séquestré dans une structure secondaire stable. La fixation de la sous-unité 30S sur cette séquence stand-by lui permet d'avancer vers le RBS de l'ARNm *tisB*, alors transitoirement ouvert et accessible, afin de traduire le peptide toxique TisB de 29 acides aminés. L'antitoxine IstR-1 inhibe la traduction de *tisB* par compétition avec le ribosome par appariement de base au niveau de ce site stand-by, localisé approximativement à 100 nucléotides en amont du RBS, bloquant ainsi la toxicité de TisB (Darfeuille *et al.*, 2007, Wagner & Unoson, 2012) (**Figure 27**). Les études montrent que la délétion du gène *rnc* codant pour la RNAse III et la délétion du gène *istR-1* induit une augmentation du niveau d'ARNm *tisB* (Vogel et al., 2004), suggérant que la formation du duplexe *tisB*/IstR-1 provoque la dégradation de *tisB* par la RNase III.

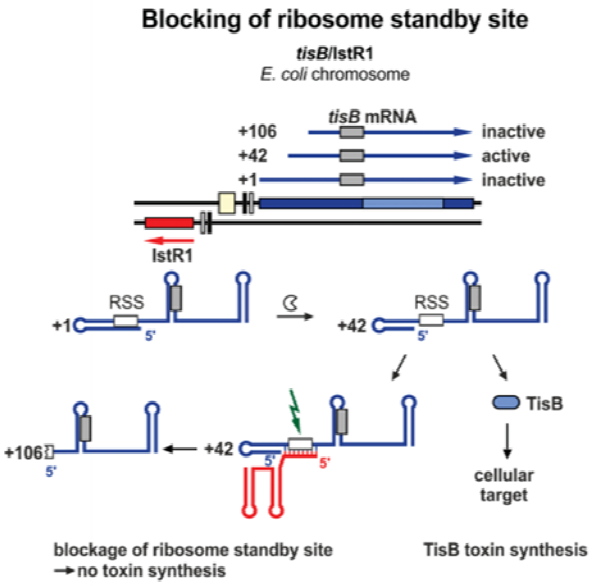


Figure 27 : Mécanisme d'inhibition de la traduction de la toxine *tisB* par l'antitoxine IstR-1. Chez *E. coli*, IstR-1 fixe le site stand-by (RSS) du ribosome de l'ARNm *tisB*. Par conséquent, les ribosomes ne peuvent pas accéder à cette région de l'ARNm et la traduction de l'ARNm *tisB* dépendante du site stand-by est inhibée. Les barres noires et blanches mettent en évidence les boîtes -35 et -10 des promoteurs, respectivement et les boîtes grises correspondent aux séquences SD. Les flèches vertes symbolisent les endoribonucléases. (Adapté de (Brantl & Jahn, 2015)).

Il existe d'autres STA de type I pour lesquels les gènes de l'antitoxine et de la toxine sont divergents, *shoB-ohsC*, *zor-orz* et *dinQ-agrB* (Fozo *et al.*, 2010, Fozo *et al.*, 2008, Weel-Sneve *et al.*, 2013, Wen & Fozo, 2014). Des recherches sur leur mécanisme d'action sont nécessaires pour déterminer s'il existe des similitudes entre ces différentes antitoxines codées en *trans*.

Les antitoxines de type I contrôlant la dégradation et la traduction de la toxine

Dans le locus *bsrG/SR4*, mis en évidence sur le phage SPβ chez *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), l'antitoxine semble inhiber l'expression de la toxine autant en affectant la stabilité de l'ARNm de la toxine que sa traduction. Les gènes de l'antitoxine *SR4* et de la toxine *bsrG* se chevauchent sur environ 120 nucléotides au niveau de leurs extrémités 3' comme pour tous les STA actuellement décrits chez les bactéries à Gram positive (Jahn *et al.*, 2012). Les résultats montrent que la délétion du gène *rnc* augmente le niveau d'ARNm *bsrG*, mais la RNase III ne semble pas nécessaire à la répression de l'expression de la toxine BsrG (Jahn *et al.*, 2012, Durand *et al.*, 2012). D'un autre côté, l'appariement entre la toxine *bsrG* et l'antitoxine SR4 entraîne des changements structuraux loin de la zone de chevauchement en 3'. Ces modifications augmentent la séquestration du RBS, inhibant ainsi la traduction de la toxine(Jahn & Brantl, 2013). De cette manière, l'antitoxine peut inhiber la traduction de la toxine bien qu'elle soit fixée loin de son codon d'initiation de la traduction. Ainsi, l'antitoxine SR4 utilise deux fonctions distinctes pour empêcher la toxicité de *bsrG* (**Figure 28**).

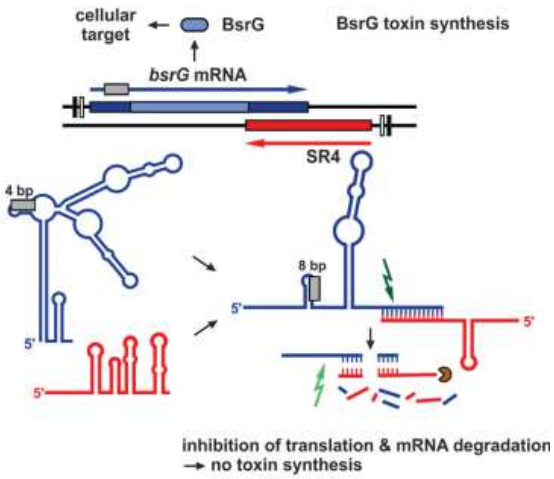


Figure 28 : Mécanisme d'activation de la dégradation de l'ARNm bsrG et d'inhibition de la traduction de bsrG par l'antitoxine SR4. L'antitoxine SR4 et l'ARNm de la toxine *bsrG* interagissent à leur extrémité 3'. La fixation de SR4 sur l'ARNm *bsrG* induit l'extension d'une région double-brin de 4 à 8 pb, séquestrant la séquence SD qui inhibe la traduction de l'ARNm *bsrG* à un certain degré. De plus, l'interaction entre les ARN SR4 et *bsrG* favorise la dégradation de la toxine par un clivage initial par la Rnase III, suivi par d'autres dégradations par les RNases R et Y. Les barres noires et blanches mettent en évidence les boîtes -35 et -10 des promoteurs, respectivement et les boîtes grises correspondent aux séquences SD. Les flèches vertes symbolisent les endoribonucléases. (Adapté de (Brantl & Jahn, 2015)).

b. Les mécanismes d'action et fonctions biologiques des toxines

Les toxines de types I possèdent des caractéristiques structurales communes : ce sont généralement des petits peptides hydrophobes de moins de 60 acides aminés et qui possèdent un domaine transmembranaire en hélice-α putatif, à l'exception des toxines SymE et RalR (Kawano *et al.*, 2007, Guo *et al.*, 2014). Compte tenu de ces similitudes, les toxines de type I ont longtemps été associées à un seul mécanisme d'action : la formation de pores membranaires. Cependant, les études récentes sur leur localisation et leur mécanisme d'action a permis de mettre en évidence deux grandes classes de toxines de type I : les toxines associées à la membrane et les toxines cytoplasmiques. Parmi les toxines membranaires, deux mécanismes d'action bien distincts ont été mis en évidence : la formation de pores et la condensation du nucléoïde. Les toxines cytoplasmiques, quant à elles, agissent comme des nucléases.

De même que les toxines de type I peuvent agir de différentes manières, elles peuvent également intervenir à différents niveaux de la physiologie ou de la pathogénie de leur bactérie hôte. Parmi les fonctions biologiques déjà associées aux STA de type I, nous retrouvons le maintien de plasmide par effet PSK, la réponse à différents stress environnementaux, la résistance aux antibiotiques, la recombinaison, la régulation du métabolisme, le recyclage d'ARN endommagés et la persistance.

Le STA de type I *hokB*/SokB est impliqué dans la persistence de *E. coli* dépendant de la GTPase Obg et du (p)ppGpp. L'expression de la toxine HokB est inhibibée par l'antitoxine SokB au niveau traductionnel et activée par Obg et le (p)ppGpp au niveau transcriptionnel. Une régulation fine de l'expression du peptide HokB est nécessaire pour l'entrée de la bactérie en persistance puisqu'une légère surexpression entraîne la dépolarisation membranaire repsonsable de la persistance alors qu'une surexpression importante dégrade le potentiel membranaire qui entraîne la mort cellulaire (Verstraeten *et al.*, 2015). Une nouvelle étude propose un mécanisme de contrôle homéostatique qui couple l'expression du peptide HokB à la fixation de la RNase E à la membrane bactérienne dans le but de dégrader et inactiver l'ARN antisens SokB (Gerdes, 2016).

Récemment, un article a également mis en évidence le rôle du STA de type I *txpA*/RatA dans la formation de biofilms chez *B. subtilis*. En effet, le système est activé au cours de la formation de biofilms, en particulier à l'intérieur du biofilm. La délétion de la toxine *txpA* montre qu'elle favoriserait l'élimination ou l'arrêt de la croissance des cellules défectueuses, probablement dans le but de libérer des enzymes intracellulaires capables de

dégrader la matrice extracellulaire, dissolvant ainsi un biofilm pré-établi (Bloom-Ackermann *et al.*, 2016).

Un nouveau STA de type I localisé dans l'élément prophage-like P6 du chromosome de *B. subtilis* a été caractérisé. La surexpression de la toxine *bsrE* code un peptide toxique qui entraine la lyse cellulaire. Cette toxicité peut être neutralisée par la surexpression de l'antitoxine SR5 qui interagit avec la région 3'-UTR de l'ARNm *bsrE*, favorisant ainsi sa dégradation en recrutant la RNase III. La protéine Hfq stabilise SR5 mais n'est pas nécessaire à sa fonction inhibitrice. La RNase J1 est la principale RNase responsable de la dégradation des ARN SR5 et *bsrE*, et la RNase PnpA clive le précurseur SR5 pour obtenir la forme mature de l'ARN. Le niveau d'ARNm *bsrE* est affecté par le choc de température et le stress alcalin, tandis que le niveau d'ARN SR5 est influencé par différents stress dont le stress pH, l'anoxie et de manière sigmaB dépendante par la carence en fer. Les deux ARN sont également extrêmement instables en présence d'éthanol à cause de la dégradation rapide par la RNase Y (Muller *et al.*, 2016, Meissner *et al.*, 2016). L'ensemble de ces résultats suggèrent qu'ils auraient un rôle dans la réponse de la bactérie à ces différents stress.

La classification des toxines de type I en fonction de leur localisation et de leur mode d'action ainsi que les fonctions biologiques associées ont fait l'objet d'une revue récemment publiée dans le journal Current Opinion in Microbiology (**Brielle**, 2016).

Article I

Linking bacterial type I toxins with their actions.

, Régine Brielle, Marie-Laure Pinel-Marie and Brice Felden

Curr Opin Microbiol. 2016 Apr;30:114-21

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Current Opinion in Microbiology

Linking bacterial type I toxins with their actions

Régine Brielle, Marie-Laure Pinel-Marie and Brice Felden

Bacterial type I toxin–antitoxin systems consist of stable toxin-encoding mRNAs whose expression is counteracted by unstable RNA antitoxins. Accumulating evidence suggests that these players belong to broad regulatory networks influencing overall bacterial physiology. The majority of known transmembrane type I toxic peptides have conserved structural characteristics. However, recent studies demonstrated that their mechanisms of toxicity are diverse and complex. To better assess the current state of the art, type I toxins can be grouped into two classes according to their location and mechanisms of action: membrane-associated toxins acting by pore formation and/or by nucleoid condensation; and cytosolic toxins inducing nucleic acid cleavage. This classification will evolve as a result of future investigations.

Address
Inserm U835-Upres EA2311, Pharmaceutical Biochemistry Lab, University of Rennes 1, 2 av. du Prof. Léon Bernard, 35000 Rennes, France

Corresponding authors: Pinel-Marie, Marie-Laure (marie-laure.pinel@univ-rennes1.fr) and Felden, Brice (bfelden@univ-rennes1.fr)

Current Opinion in Microbiology 2016, **30**:114–121

This review comes from a themed issue on **Cell regulation**

Edited by **Brice Felden** and **Ute Römling**

For a complete overview see the Issue and the Editorial

Available online 12th February 2016

http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2016.01.009

1369-5274/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Toxin–antitoxin (TA) systems are widespread in bacterial and archaeal genomes. In these systems, the expression of a stable toxin-encoding messenger RNA (mRNA) leads to stasis or cell death unless an unstable antitoxin counteracts its effects. TA systems were first identified on plasmids, where they ensure plasmid maintenance through post-segregational killing (PSK) mechanisms [1]. TA systems were later identified on chromosomes, sometimes in multiple copies, and on phage-like elements. Although in many cases their functions are unknown, they are involved in programmed cell death, bacterial growth control, defense against the intrusion of foreign genetic material, and persistence [2]. TAs are classified into five types according to the antitoxin's nature and mechanisms of action. Here, we focus exclusively on type I TA systems, characterized by RNA antitoxins that inhibit toxic peptide synthesis [1]. For the four other types, please refer to the review by Goeders and Van Melderen [3].

Type I TA loci can be transmitted by vertical gene transfer or in specific lineages by gene duplications [4]. RNA antitoxins can act in *cis* or in *trans*. The majority of the type I antitoxins identified so far are *cis*-acting antitoxins (e.g., Sib and SprF1 antitoxins [5,6•]), meaning that they overlap and perfectly match the toxin-encoding mRNA. The *trans*-acting antitoxins (e.g., IstR1 and OhsC [5]) are located away from the toxin locus and share often limited sequence complementarities. An exception to this in which a RNA antitoxin controls toxin translation *via* its non-overlapping sequence was recently described in *Staphylococcus aureus* [7]. TA RNA duplex formation can either result in toxin mRNA degradation (e.g., RatA [8]) or, more commonly, result in toxin translation inhibition (e.g., IstR1 [9]), or in the combination of the two regulatory mechanisms (e.g., SR4 [10] and SprF1 [6•]) [11].

Most type I toxins identified to date have conserved structural features: they generally contain less than 60 amino acids are hydrophobic and have a putative α-helical transmembrane domain, except for SymE and RalR [12,13•]. Despite these similarities, the biological functions and mechanisms of action of type I toxins can be very diverse. Therefore, inspired by Jahn and collaborators [14••], type I TA systems were cataloged in this review based on the toxins' currently known mechanisms of action, and are summarized here in Table 1. Many studies reporting type I toxin functions were based upon episomal overproduction, and deletion of the modules was not often associated with a phenotype. For this reason, it remains difficult to distinguish between the primary and secondary molecular targets of type I toxins.

Membrane-associated type I toxins

Some membrane-associated type I toxins have been reported to disrupt membrane integrity through pore formation or *via* nucleoid condensation. However, for many type I toxins, either no, or only one of these mechanisms has been investigated experimentally.

Peptides inducing membrane permeation through pore-formation

Some type I toxins, similar to the phage holin proteins, are membrane-associated peptides that form pores, resulting in a drop in potential and ATP synthesis. Thus, their overexpression leads to cell death, evidenced by the appearance of 'ghost' cells with translucent centers and

Table 1

Overview of the type I TA classes based on the mechanisms of action of toxins

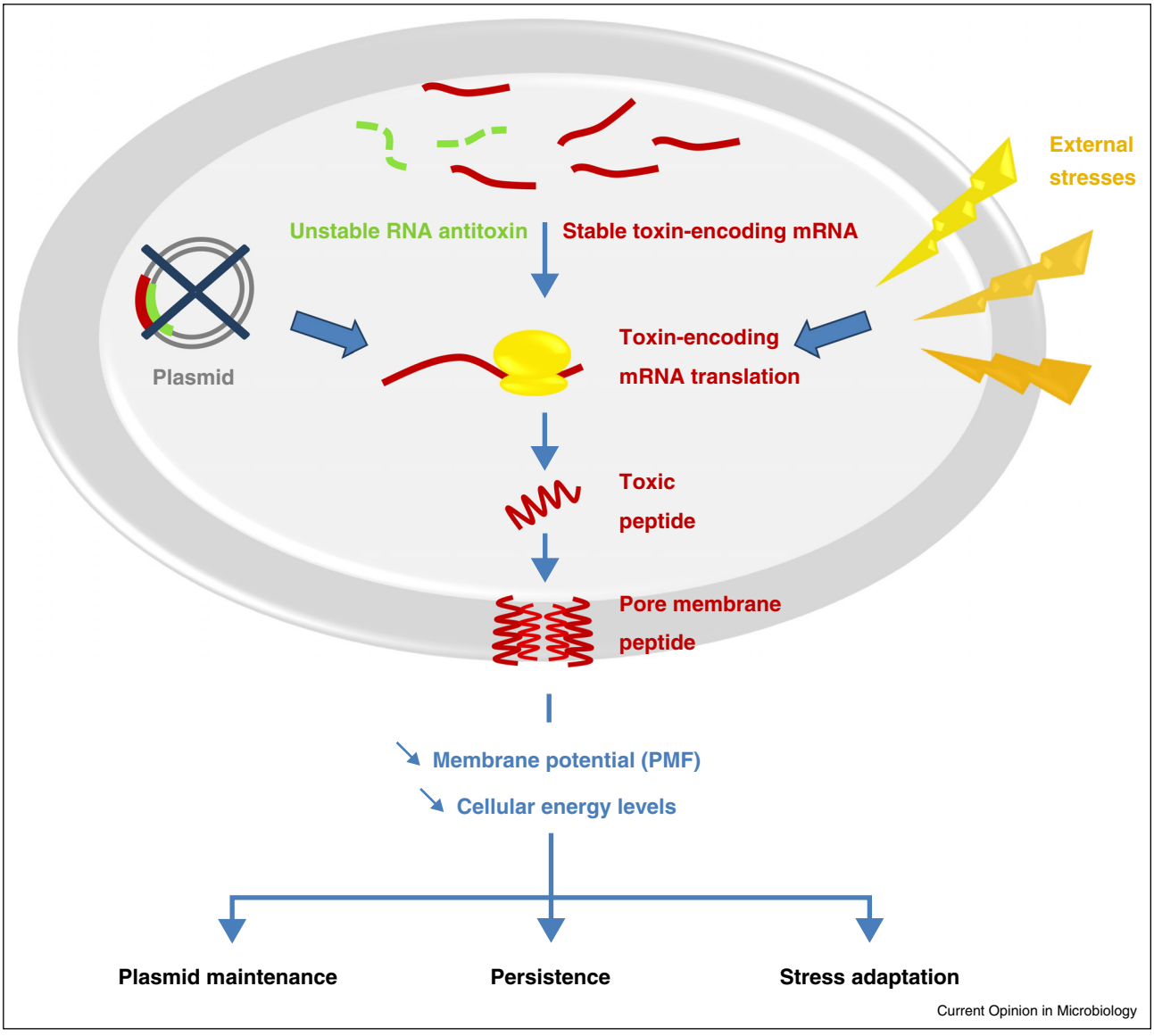
Classes	Type I toxin mechanisms of action	Mechanisms of action discovered through:	TA systems	Locations	Biological functions (discovered through:)	Refs.
Membrane-associated toxins	Pore formation	Overexpression[c]	*hok*/Sok[a]	- *E. coli* R1 plasmid - Numerous Gram-genomes	- Plasmid maintenance (ectopic expression[b]) - Obg-mediated persistence (deletion) - Stress response to temperatures, antibiotics, SOS, *etc.* (ectopic expression[b])	[15] [16••] [17•]
		Chemically synthesized[d]	*tisB*/IstR1[a]	- *E. coli* chromosome	- SOS-mediated persistence by inducing DNA repair and dormancy (deletion)	[18–20]
	Nucleoid condensation	Overexpression[c]	*dinQ*/AgrB	- *E. coli* chromosome	- SOS response (overexpression[c]) - Conjugal recombination (deletion)	[21]
		Overexpression[c]	*RNAI*/RNAII[a]	- *E. faecalis* pAD1 plasmid	- Plasmid maintenance (ectopic expression[b])	[22,23]
		Overexpression[c]	*ldrD*/RdlD[a]	- *E. coli* chromosome	- Involved in purin metabolism and cAMP levels (overexpression[c])	[24] [25]
		Overexpression[c]	*bsrG*/SR4[a]	- *B. subtilis* SPβ prophage	- Unknown	[14••] [26]
		Chemically synthesized[d]	*sprA1*/SprA1$_{AS}$[a]	- *S. aureus* νΣαβ pathogenicity island	- Acidic and oxidative stress responses (overexpression[c]) - Competing bacterial and human erythrocyte lysis (chemical synthesis[d])	[7] [27]
		Chemically synthesized[d]	*sprG1*/SprF1[a]	- *S. aureus* SaPIn3 pathogenicity island	- Competing bacterial and human erythrocyte lysis (chemical synthesis[d] and membrane extraction)	[6•]
	To be confirmed		*pnd*	- *E. coli* R483 plasmid	- Plasmid maintenance (ectopic expression[b])	[28] [29,30]
			srnB	- *E. coli F* plasmid	- Plasmid maintenance (ectopic expression[b])	[31] [30]
			ibsC/SibC[a]	- *E. coli* chromosome	- Unknown	[32]
			shoB/OhsC	- *E. coli* chromosome	- Heat and oxidative stress response (overexpression[c]) - Induction of carbohydrate transport expression (overexpression[c])	[33] [32]
			zorO/OrzO[a]	- *E. coli* chromosome	- Unknown	[4] [32]
			fst-Sm/SrSm[a]	- *S. mutans* chromosome	- Inhibits persistence (mild-over expression[b])	[34]
			txpA/RatA[a]	- *B. subtilis* skin phage-like element	- Cell metabolic state? (endogenous[e])	[8] [35] [36]
Cytoplasmic toxins	RNA cleavage	Overexpression[c]	*symE*/SymR[a]	- *E. coli* chromosome	- SOS response (endogenous[e]) - Recycling damaged RNAs (overexpression[c])	[12]
	DNA cleavage	Chemically synthesized[d]	*ralR*/RalA	- *E. coli* rac prophage	- Fosfomycin resistance (deletion)	[13•]

[a] TA systems expressed in other bacteria and/or in other copies located in the bacterial genome.
[b] Plasmid maintenance identified using plasmid other than the plasmid of origin expressing the TA locus.
[c] Biological functions identified when the TA systems are highly expressed using overexpression plasmids with endogenous or inducible promoters.
[d] *In vitro* analysis with chemically synthesized peptides.
[e] The environmental conditions induce a modulation of the toxin mRNA expression in the wild-type strain.

cell material located at the poles. However, in physiological conditions, these pore-forming peptides are involved in diverse biological functions (see the summary in Figure 1).

The Hok toxic peptide in *Escherichia coli*, expressed from the *hok/sok* (or *parB*) locus of the R1 plasmid [1], is an example of pore-forming peptide. It was the first type I TA system discovered on plasmids that confers their maintenance by PSK [15]. *hok/sok* homologs were identified in the chromosomes of Gram-negative bacteria, suggesting their involvement in other functions [37,38]. In response to nutrient starvation, the stringent response alarmone (p)ppGpp interacts with Obg GTPase, resulting

Figure 1



Reported functions for type I pore-forming toxins.
Some type I toxins expressed in response to stresses (yellow lightning) or after plasmid loss (dark grey) are located within membranes (grey), where they form pores. These pores decrease the membrane potential, cell energy levels and proton motive force (PMF), eventually leading to cell growth arrest or cell lysis of a population fraction. Plasmid maintenance, persistence, and stress adaptation were among the biological functions identified for type I pore-forming toxins located in the membrane.

in the induction of the *hokB* toxin-encoding mRNA through an unknown mechanism [16••]. This moderate overexpression leads to membrane depolarization responsible for a switch to a persistent state. Persister cells are a bacterial subpopulation that enters into a dormant state and thus becomes tolerant to antibiotics. While the deletion of *hokB* locus has no effect on persistence, possibly due to system redundancies, the overexpression of *hokB* mRNA is essential for Obg-mediated persistence. Another recent study [17•] has demonstrated the involvement of the *hok/sok* locus in bacterial lag phase expansion. This allows cells to adapt to unfavorable conditions such as elevated temperatures or the presence of antibiotics. In low cell density cultures, the system favors bacterial survival regardless of growth-limiting conditions and could complement existing or defective SOS response mechanism, an inducible DNA repair system [17•]. However, in *E. coli*, some of the *hok/sok* copies can be inactivated by insertion sequences [38].

TisB translated from the '*tisB-istR1*' locus is another pore-forming peptide. The TisB toxic peptide is small,

hydrophobic, and spontaneously binds membranes [39]. Chemically synthesized TisB peptides are assembled as stable transmembrane dimers. The charges on the amphiphilic TisB helix suggest that antiparallel dimers could be assembled by salt bridges, and these narrow channels could enable protons to pass across the hydrophobic membranes. Another study [20] revealed that the positively charged TisB pores induce selective membrane permeation for hydroxyl anions. In turn, protons and anions passages dissipate the proton motive force (PMF). The TisB pore is so narrow that it is impermeable to intracellular water-soluble components, allowing cell survival. As a consequence, *tisB* mRNA overexpression causes a drop in ATP levels and an increase of cell death even though in physiological conditions it induces a drop in the PMF and the formation of persister cells [20]. By triggering a dormant state, TisB leads to the shutdown of the major antibiotic targets and induces multidrug tolerance (e.g., in β-lactams targeting peptidoglycan synthesis, in aminoglycosides inhibiting translation, and in ciprofloxacin reducing DNA replication by inhibiting topoisomerase activity). This phenotype has only been observed in exponentially growing *E. coli* cells, corresponding to a higher expression of the genes involved in the SOS response [19]. Persister formation by the SOS-induced TisB toxin involves two strategies for survival: DNA repair activation; and entrance into a dormant state [19].

Peptides inducing nucleoid condensation

The *par* locus, or the RNAI-RNAII TA system (see Figure 2), is expressed from the pAD1 plasmid of *Enterococcus faecalis* and encodes the Fst toxin. The *par* homologs have been detected in low GC Gram-positive bacteria [22]. The Fst toxic peptide possesses a hydrophobic transmembrane domain that is essential for toxicity and conserved within the Fst/Ldr superfamily. This is followed by an unstructured C-terminal tail, probably located in the cytoplasm [22]. Studies focusing on *fst* mRNA overexpression have shown short-term and long-term effects of the toxin. Firstly, *fst* mRNA overexpression causes an abnormal nucleoid condensation in *E. faecalis*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, and *E. coli*. Alteration of peptidoglycan synthesis, cell division and septum placements were also described in *E. faecalis* and *B. subtilis*, resulting in unequal DNA distribution among daughter cells [23,40]. While the early effects of *fst* toxin-encoding mRNA overexpression are at the chromosomal level, its major impact is the membrane stress that induces the transcription of numerous target genes [23]. The majority of these targeted transcripts encode membrane-associated proteins. These proteins include ABC transporters such as glucan, manganese, and glycine-betaine family transporters which are associated with resistance to numerous antibiotics [41]. Transporter overexpression is harmful to the bacteria, probably through depletion of the cellular ATP pool and/or perturbed membrane integrity, as the Fst-induced responses are diverse and nonspecific. This late expression of the transporters may be a response to the Fst-induced chromosomal structure impairment. *fst* toxin-encoding mRNA overexpression also induces cell membrane permeation, without 'ghost' cell formation, and the arrest of macromolecular synthesis [42]. RNAI-RNAII is the only type I PSK system described so far in Gram-positive bacteria [23], although numerous *par* homologs have been detected in many bacterial chromosomes [22].

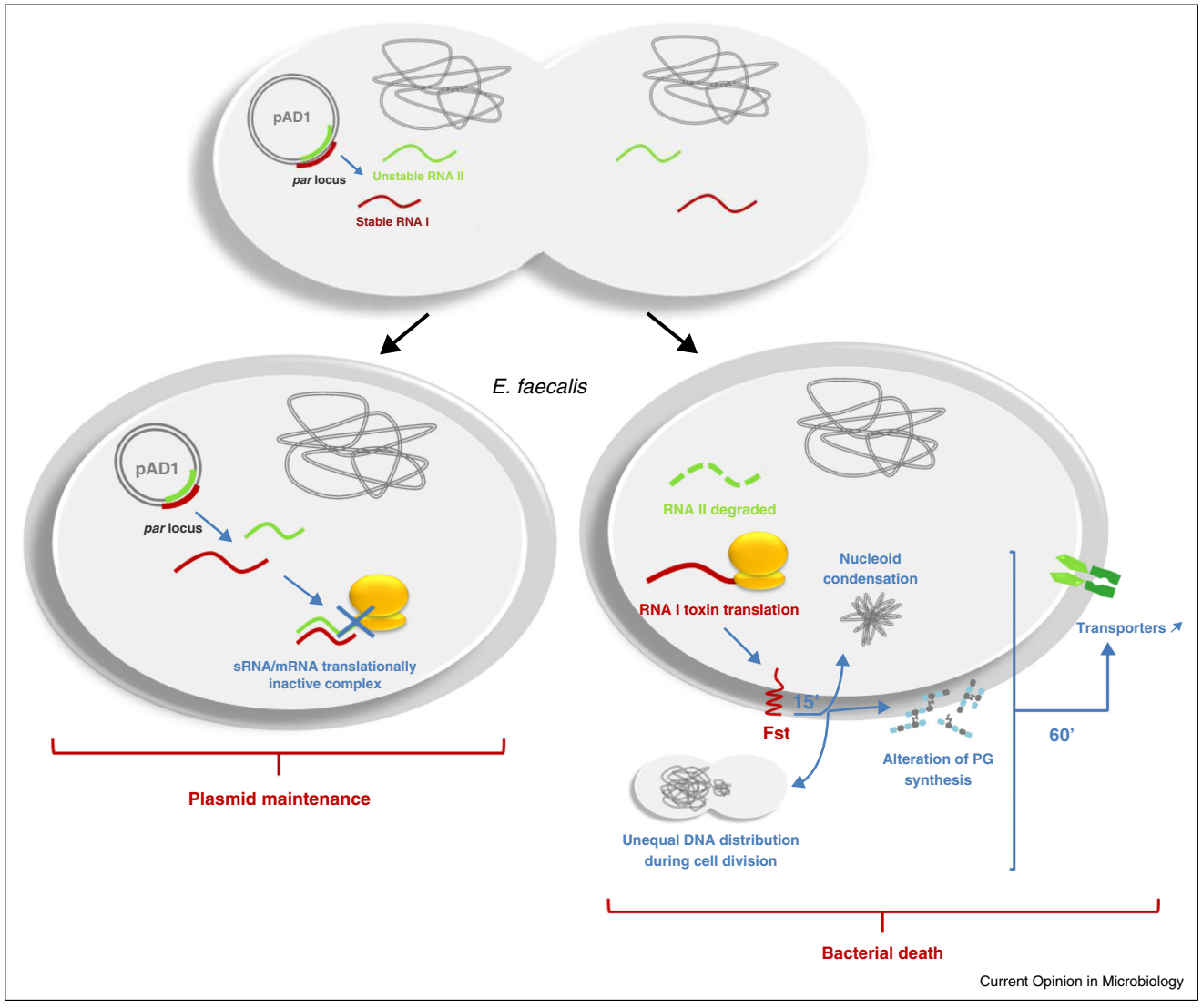
Interestingly, overexpression of the *fst-Sm*/srSm TA system in *Streptococcus mutans* causes a significant decrease in the number of persister cells [34]. Moreover, in the opportunistic pathogen *E. faecalis*, a link was recently identified between the expression of a *par* homolog and virulence [43••]. The mutant lacking the *par* homolog is more virulent in insect and mouse models, more efficiently colonizes mouse organs, and survives better inside macrophages and upon oxidative stress. The authors suggest that these effects could be involved in the transition from commensalism to virulence [34,43••].

In *E. coli*, overproduction of the LdrD protein, which belongs to the Fst/Ldr superfamily [4], leads to nucleoid condensation [25], suggesting a conserved mechanism of action. Additionally, microarray analysis suggests that overexpression of *ldrD* mRNA upregulates genes involved in the purine metabolism pathway, and reduces cAMP levels [25]. Interestingly, overexpression of the *ldrD* mRNA homolog *ldrA* inhibits ATP synthesis and consequently DNA replication, transcription, and translation, eventually inducing cell growth arrest [44].

The *E. coli* DinQ toxic peptide is a small transmembrane peptide located in the inner membrane. Its expression is controlled by AgrB antisense RNA and the repressor LexA which downregulates numerous genes involved in the SOS response [45]. Ectopic overexpression of *dinQ* mRNA induces membrane depolarization [21]. In an *agrB* mutant strain, two-fold constitutive overexpression of *dinQ* mRNA leads to an increase in UV sensitivity associated with a decrease in intracellular ATP and a delay in nucleoid decompaction and extension after UV irradiation. Moreover, elevated levels of *dinQ* mRNA in this mutant have a role in the repair of UV-induced DNA damage through inhibition of conjugal recombination [21]. Thus, the DinQ toxin uses several mechanisms to modulate the *E. coli* UV response.

Temperature-sensitive *bsrG*/SR4 system located within the SPβ prophage in *B. subtilis* is probably involved in prophage maintenance within the bacterial chromosome. Indeed, overexpressed *bsrG* mRNA leads to the accumulation of toxic peptides that inhibit cell growth by targeting the cytoplasmic membrane [26]. Nevertheless,

Figure 2



Fst toxin: an example of a 'domino effect' post-segregational killing (PSK).
Within *E. faecalis*, PSK bacterial maintenance of the pAD1 plasmid (dark grey) involves the *par* locus. After bacterial division, RNAI toxin mRNA and RNAII antitoxin are both expressed within the daughter cells carrying the plasmid (at left). They can form a stable RNA duplex that prevents toxin mRNA translation without effecting bacterial growth. Within the daughter cells lacking plasmids (at right), the unstable RNAII antitoxin is degraded and does not downregulate RNAI toxin translation. The toxic peptide is expressed, migrates, and accumulates at the membrane. After 15 minutes, this induces an aberrant nucleoid condensation, altered synthesis of peptidoglycan, abnormal cell division and septum placement, resulting in unequal DNA distribution among the daughter cells. After 60 minutes, probably in response to these initial triggers, Fst toxin induces transcription of numerous target genes including transporters, and results finally in cell death [23,42].

bsrG mRNA overexpression interferes neither with membrane permeability nor with energy supply [14••]. *bsrG* mRNA overexpression stimulates fatty acid biosynthesis, which induces invaginations of the cytoplasmic membrane, leading to abnormal membrane topology, distorted cell division planes, and a reduced cell size. This also results in a delocalization of the cell wall synthesis machinery, including the cytoskeletal component MreB normally associated to the membrane and oriented perpendicularly to the longer cell axis. With the assistance of autolytic enzymes, this disturbance of cell wall synthesis machinery leads to cell lysis. Moreover, BsrG toxin induces nucleoid condensation but chromosome segregation and replication are not affected. The nucleoid condensation, in turn, induces a significant global inhibition of transcription and translation [14••].

Membrane-associated peptides with a mechanism to determined

There are many other membrane-associated type I toxins with the mechanism of action still to be determined (see Table 1). For many systems, the mechanism was

not addressed. For the others, information to classify toxins according to their mechanisms of action is insufficient.

Among them, in the human pathogen *S. aureus*, two type I TA systems are located within a pathogenicity island (PI) and express membrane toxic peptides whose overexpression causes bacterial cell death. PepA1, translated from the '*sprA1*/*sprA1*$_{AS}$' locus, is induced upon acidic and oxidative stresses [46]. PepG1$_{31}$ and PepG1$_{44}$ are both translated from the '*sprG1*/*sprF1*' locus. Extracellular addition of either the three chemically synthesized peptides or of membrane extracts prepared from *S. aureus* cells overexpressing PepG1$_{44}$ and PepG1$_{31}$ will trigger the lysis of both competing bacteria and human erythrocytes [6•,7]. NMR structures and dynamic simulations indicate that synthetic PepA1 possesses an α-helical structure and can insert into the membrane. These toxic peptides probably damage bacterial membranes and erythrocytes through pore-formation, membrane disruption due to a detergent-like effect, or by interference with membrane-associated functions, nevertheless we cannot exclude a role of these toxins in nucleoid condensation [46].

Cytoplasmic type I toxins that cleave nucleic acids

While a large number of membrane-associated type I toxins have been described, the only reported to be located in the cytoplasm have been SymE and RalR. Contrary to the other type I toxins, SymE and RalR lack putative transmembrane segments and cleave nucleic acids.

RNA cleavage

SymE is a 113-amino acid peptide that, like the MazE type II antitoxin, contains an AbrB [47]. SymE and its homologs constitute a distinct family within the AbrB superfamily. Indeed, all of the other AbrB family members are transcription factors acting as antitoxins, while the SymE homologs have become toxic proteins. SymE toxin synthesis is downregulated additively at multiple levels: at the transcriptional level by LexA; at the mRNA stability level by the *cis*-encoded SymR antitoxin RNA and at the translational level by SymR and Lon proteases [12]. In *E. coli*, the SymE protein co-purifies with ribosomal proteins, and its overexpression drastically affects colony-forming ability and protein synthesis [12]. Overexpression of *symE* mRNA decreases levels of all tested mRNAs and regulatory RNAs except its antitoxin SymR. Moreover, after *symE* mRNA induction, distinct shorter mRNA fragments were observed. These results suggest that SymE acts as an endoribonuclease and cleaves mRNAs that should not be translated [12,48]. The DNA damaging agent mitomycin C induces overexpression of *symE* mRNA at both the mRNA and protein levels, suggesting a role for SymE toxin in simultaneously recycling damaged RNAs and DNAs during the SOS response.

DNA cleavage

The '*ralR*/*ralA*' locus is located on the *E. coli rac* prophage. *ralR* mRNA encodes a 64-amino acid type I toxin, and its overexpression leads to cell growth inhibition, while the RalA antitoxin requires the Hfq chaperone to stabilize it [13•]. *In vitro* DNA cleavage assays have shown that purified RalR toxin is a non-specific endonuclease that cleaves methylated or non-methylated DNAs. Furthermore, *in vitro* RNA cleavage assays do not reveal any RNA-targeting cleavage activity. Finally, overproduction of *ralR* mRNA causes a filamentous growth resulting from the SOS response following DNA degradation. The positive effects of the *ralR*/RalA TA system on cell physiology and fosfomycin resistance were confirmed through monitoring the growth and metabolic activity of wild-type and *ralR*/*ralA* knockout strains in the presence of fosfomycin, an inhibitor of bacterial cell wall biogenesis [13•].

Concluding remarks and perspectives

When examined together, the effects of some type I toxins on bacterial physiology challenge the concept that membrane-associated type I toxins act solely by pore formation. This is why we propose an updated nomenclature with two classes of type I toxins. These classes are based on peptide location and their mechanisms of action: (i) membrane-associated toxins act either by pore formation and/or nucleoid condensation and (ii) cytoplasmic toxins that catalyze nucleic acid cleavages. Table 1 summarizes the type I toxins according to the current understanding of their mechanisms of actions, and underlines the two different classes. Our nomenclature only includes the modes of action that are currently well-described, and will thus evolve based on future discoveries, but it provides a solid basis for better understanding of the TA systems. In particular, it would be appropriate to investigate whether, like many other antibacterial peptides, certain type I toxic peptides could induce a membrane disruption *via* the 'carpet' mechanism (where peptides bind to the surface of the membrane and provoke a detergent-like effect) [49]. Moreover, the effect of the pore-forming peptides on the nucleoid condensation is usually left unexplored, so it is tempting to speculate that some may act through both mechanisms. Another important challenge would be to determine whether there is heterogeneity in toxin expression within a cell population, along with an exploration of the various triggers and signaling pathways that induce toxin expression. New hypotheses about the biological functions of toxic peptides will arise from a better understanding of their mechanisms and the identification of their molecular targets. Finally, TA systems should be considered as tiny modules embedded in larger regulatory networks where all of the different players interact. Indeed, recent discoveries implying crosstalk between type I and II TAs

[50] suggest that numerous interactions involving different TA systems are yet to be discovered.

The unique characteristics of TA loci make them of particular interest for biotechnological applications. TAs can be considered lead compounds for the design of new antimicrobials, plasmid maintenance tools, vaccines, and selective reporter genes [51,52]. Moreover, toxins on their own can also have various applications. Indeed, selective cloning vectors containing variants of IbsC, a type I *E. coli* toxic peptide, have been engineered [53]. In addition, chemical modifications of PepA1 toxin dramatically increased its antibacterial potential and its stability in human serum while considerably reducing its human cell toxicity, implying that toxins can be transformed into potent antibiotics [27]. The DinQ toxin is another promising candidate for the development of anti-cell-envelope antibiotics, notably against *E. coli* infection [54]. These strategies could be applied to other toxic peptides, notably for the design of new antibiotics, thus providing alternatives to the burgeoning issue of bacterial resistance to the drugs presently in use.

Acknowledgements

The authors acknowledge financial support from Universities of Rennes 1 (France), Bern (Switzerland), and Sherbrooke (Canada, grant 'Fonds de recherche Nature et Technologie de Québec'), as well as from the French institutes, the 'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale' (INSERM) the School of Pharmacy and Medical Sciences of Rennes 1 University , and the French Medical Research Foundation (FRM). We also thank P. Bouloc, Y. Augagneur, G. Pascreau, and M. Sassi from our lab and J. Berland for proof reading the review.

References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the period of review, have been highlighted as:

- • of special interest
- •• of outstanding interest

1. Gerdes K, Rasmussen PB, Molin S: **Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986, **83**:3116-3120.

2. Brantl S, Jahn N: **sRNAs in bacterial type I and type III toxin–antitoxin systems**. *FEMS Microbiol Rev* 2015, **39**:413-427.

3. Goeders N, Van Melderen L: **Toxin–antitoxin systems as multilevel interaction systems**. *Toxins* 2014, **6**:304-324.

4. Fozo EM, Makarova KS, Shabalina SA, Yutin N, Koonin EV, Storz G: **Abundance of type I toxin–antitoxin systems in bacteria: searches for new candidates and discovery of novel families**. *Nucleic Acids Res* 2010, **38**:3743-3759.

5. Fozo EM, Kawano M, Fontaine F, Kaya Y, Mendieta KS, Jones KL, Ocampo A, Rudd KE, Storz G: **Repression of small toxic protein synthesis by the Sib and OhsC small RNAs**. *Mol Microbiol* 2008, **70**:1076-1093.

6. • Pinel-Marie ML, 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.
This study have identified an unconventional type I toxin–antitoxin system expressed from a human pathogen. In this TAs, toxin expresses two hemolytic and antibacterial peptides from a dual-coding RNA, unless its dual-acting antisense RNA inhibits it.

7. Sayed N, Jousselin A, Felden B: **A cis-antisense RNA acts in trans in *Staphylococcus aureus* to control translation of a human cytolytic peptide**. *Nat Struct Mol Biol* 2012, **19**:105-112.

8. Silvaggi JM, Perkins JB, Losick R: **Small untranslated RNA antitoxin in *Bacillus subtilis***. *J Bacteriol* 2005, **187**:6641-6650.

9. Darfeuille F, Unoson C, Vogel J, Wagner EG: **An antisense RNA inhibits translation by competing with standby ribosomes**. *Mol Cell* 2007, **26**:381-392.

10. Jahn N, Brantl S: **One antitoxin-two functions: SR4 controls toxin mRNA decay and translation**. *Nucleic Acids Res* 2013, **41**:9870-9880.

11. Wen J, Fozo EM: **sRNA antitoxins: more than one way to repress a toxin**. *Toxins* 2014, **6**:2310-2335.

12. Kawano M, Aravind L, Storz G: **An antisense RNA controls synthesis of an SOS-induced toxin evolved from an antitoxin**. *Mol Microbiol* 2007, **64**:738-754.

13. • Guo Y, Quiroga C, Chen Q, McAnulty MJ, Benedik MJ, Wood TK, Wang X: **RalR (a DNase) and RalA (a small RNA) form a type I toxin–antitoxin system in *Escherichia coli***. *Nucleic Acids Res* 2014, **42**:6448-6462.
This report describes a toxin–antitoxin system in which the toxin acts as a non-specific endodesoxiribonuclease.

14. •• Jahn N, Brantl S, Strahl H: **Against the mainstream: the membrane-associated type I toxin BsrG from *Bacillus subtilis* interferes with cell envelope biosynthesis without increasing membrane permeability**. *Mol Microbiol* 2015.
Most type I toxins are small hydrophobic membrane peptides and are assumed to target cytoplasmic membrane and, as a result, to induce cell death. The srG/SR4 toxin–antitoxin module does not dissipate membrane potential nor affects cellular ATP-levels but strongly interferes with the envelope biosynthesis, causing membrane invaginations and triggering autolysis.

15. Gerdes K, Bech FW, Jorgensen ST, Lobner-Olesen A, Rasmussen PB, Atlung T, Boe L, Karlstrom O, Molin S, von Meyenburg K: **Mechanism of postsegregational killing by the *hok* gene product of the parB system of plasmid R1 and its homology with the *relF* gene product of the *E. coli* relB operon**. *EMBO J* 1986, **5**:2023-2029.

16. •• Verstraeten N, Knapen WJ, Kint CI, Liebens V, Van den Bergh B, Dewachter L, Michiels JE, Fu Q, David CC, Fierro AC *et al.*: **Obg and membrane depolarization are part of a microbial bet-hedging strategy that leads to antibiotic tolerance**. *Mol Cell* 2015, **59**:9-21.
A universally conserved GTPase induces bacterial multidrug tolerance at single-cell level by transcriptional activation of a type I toxin. The peptide, encoded by a type I toxin–antitoxin module, provokes a collapse in the membrane potential, which ultimately results in bacterial persistence state. These findings are an important step toward unraveling shared genetic mechanisms underlying persistence.

17. • Chukwudi CU, Good L: **The role of the *hok/sok* locus in bacterial response to stressful growth conditions**. *Microb Pathogen* 2015, **79**:70-79.
This study showed that the *hok/sok* locus prolonges the bacterial lag phase in unfavorable conditions to enabling the cells to adapt to the stress such as high temperature and antibiotic.

18. Vogel J, Argaman L, Wagner EG, Altuvia S: **The small RNA IstR inhibits synthesis of an SOS-induced toxic peptide**. *Curr Biol* 2004, **14**:2271-2276.

19. Dorr T, Vulic M, Lewis K: **Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli***. *PLoS Biol* 2010, **8**:e1000317.

20. Gurnev PA, Ortenberg R, Dorr T, Lewis K, Bezrukov SM: **Persister-promoting bacterial toxin TisB produces anion-selective pores in planar lipid bilayers**. *FEBS Lett* 2012, **586**:2529-2534.

21. Weel-Sneve R, Kristiansen KI, Odsbu I, Dalhus B, Booth J, Rognes T, Skarstad K, Bjoras M: **Single transmembrane peptide DinQ modulates membrane-dependent activities**. *PLoS Genet* 2013, **9**:e1003260.

22. Weaver KE, Reddy SG, Brinkman CL, Patel S, Bayles KW, Endres JL: **Identification and characterization of a family of**

toxin–antitoxin systems related to the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1 *par* addiction module. *Microbiology* 2009, **155**:2930-2940.

23. Brinkman CL, Bumgarner R, Kittichotirat W, Dunman PM, Kuechenmeister LJ, Weaver KE: **Characterization of the effects of an *rpoC* mutation that confers resistance to the Fst peptide toxin–antitoxin system toxin**. *J Bacteriol* 2013, **195**:156-166.

24. Rudd KE: **Novel intergenic repeats of *Escherichia coli* K-12**. *Res Microbiol* 1999, **150**:653-664.

25. Kawano M, Oshima T, Kasai H, Mori H: **Molecular characterization of long direct repeat (LDR) sequences expressing a stable mRNA encoding for a 35-amino-acid cell-killing peptide and a *cis*-encoded small antisense RNA in *Escherichia coli***. *Mol Microbiol* 2002, **45**:333-349.

26. Jahn N, Preis H, Wiedemann C, Brantl S: ***bsrG*/SR4 from *Bacillus subtilis* — the first temperature-dependent type I toxin–antitoxin system**. *Mol Microbiol* 2012, **83**:579-598.

27. Solecki O, Mosbah A, Baudy Floc'h M, Felden B: **Converting a *Staphylococcus aureus* toxin into effective cyclic pseudopeptide antibiotics**. *Chem Biol* 2015, **22**:329-335.

28. Akimoto S, Ohnishi Y: **R483 and F plasmid genes promoting RNA degradation: comparative restriction mapping**. *Microbiol Immunol* 1982, **26**:779-793.

29. Ono K, Akimoto S, Ohnishi Y: **Nucleotide sequence of the *pnd* gene in plasmid R483 and role of the *pnd* gene product in plasmolysis**. *Microbiol Immunol* 1987, **31**:1071-1083.

30. Nielsen AK, Thorsted P, Thisted T, Wagner EG, Gerdes K: **The rifampicin-inducible genes *srnB* from F and *pnd* from R483 are regulated by antisense RNAs and mediate plasmid maintenance by killing of plasmid-free segregants**. *Mol Microbiol* 1991, **5**:1961-1973.

31. Thisted T, Nielsen AK, Gerdes K: **Mechanism of post-segregational killing: translation of Hok, SrnB and Pnd mRNAs of plasmids R1, F and R483 is activated by 3′-end processing**. *EMBO J* 1994, **13**:1950-1959.

32. Fozo EM: **New type I toxin–antitoxin families from ''wild'' and laboratory strains of *E. coli*: Ibs-Sib, ShoB-OhsC and Zor-Orz**. *RNA Biol* 2012, **9**:1504-1512.

33. Kawano M, Reynolds AA, Miranda-Rios J, Storz G: **Detection of 5′- and 3′-UTR-derived small RNAs and *cis*-encoded antisense RNAs in *Escherichia coli***. *Nucleic Acids Res* 2005, **33**:1040-1050.

34. Koyanagi S, Levesque CM: **Characterization of a Streptococcus mutans intergenic region containing a small toxic peptide and its cis-encoded antisense small RNA antitoxin**. *PLOS ONE* 2013, **8**:e54291.

35. Durand S, Jahn N, Condon C, Brantl S: **Type I toxin–antitoxin systems in *Bacillus subtilis***. *RNA Biol* 2012, **9**:1491-1497.

36. Nicolas P, Mader U, Dervyn E, Rochat T, Leduc A, Pigeonneau N, Bidnenko E, Marchadier E, Hoebeke M, Aymerich S *et al.*: **Condition-dependent transcriptome reveals high-level regulatory architecture in *Bacillus subtilis***. *Science* 2012, **335**:1103-1106.

37. Poulsen LK, Larsen NW, Molin S, Andersson P: **A family of genes encoding a cell-killing function may be conserved in all gram-negative bacteria**. *Mol Microbiol* 1989, **3**:1463-1472.

38. Pedersen K, Gerdes K: **Multiple hok genes on the chromosome of *Escherichia coli***. *Mol Microbiol* 1999, **32**:1090-1102.

39. Steinbrecher T, Prock S, Reichert J, Wadhwani P, Zimpfer B, Burck J, Berditsch M, Elstner M, Ulrich AS: **Peptide–lipid interactions of the stress-response peptide TisB that induces bacterial persistence**. *Biophys J* 2012, **103**:1460-1469.

40. Patel S, Weaver KE: **Addiction toxin Fst has unique effects on chromosome segregation and cell division in *Enterococcus faecalis* and *Bacillus subtilis***. *J Bacteriol* 2006, **188**:5374-5384.

41. Dintner S, Staron A, Berchtold E, Petri T, Mascher T, Gebhard S: **Coevolution of ABC transporters and two-component regulatory systems as resistance modules against antimicrobial peptides in Firmicutes Bacteria**. *J Bacteriol* 2011, **193**:3851-3862.

42. Weaver KE: **The *par* toxin–antitoxin system from *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1 and its chromosomal homologs**. *RNA Biol* 2012, **9**:1498-1503.

43. •• Michaux C, Hartke A, Martini C, Reiss S, Albrecht D, Budin-Verneuil A, Sanguinetti M, Engelmann S, Hain T, Verneuil N *et al.*: **Involvement of *Enterococcus faecalis* small RNAs in stress response and virulence**. *Infect Immun* 2014, **82**:3599-3611.
This report that highlight the functions of certain candidate sRNAs in the adaptation of *E. faecalis* to environmental changes has shown that a mutant lacking an homolog of a toxin–antitoxin locus is hypervirulent and has increased abilities to colonize mice.

44. Yamaguchi Y, Tokunaga N, Inouye M, Phadtare S: **Characterization of LdrA (long direct repeat A) protein of *Escherichia coli***. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2014, **24**:91-97.

45. Fernandez De Henestrosa AR, Ogi T, Aoyagi S, Chafin D, Hayes JJ, Ohmori H, Woodgate R: **Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli***. *Mol Microbiol* 2000, **35**:1560-1572.

46. Sayed N, Nonin-Lecomte S, Rety 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.

47. Coles M1, Djuranovic S, Söding J, Frickey T, Koretke K, Truffault V, Martin J, Lupas AN: **AbrB-like transcriptionfactors assume a swapped hairpin fold that is evolutionarily related to double-psi beta barrels**. *Structure* 2005, **13**:919-928.

48. Kawano M: **Divergently overlapping cis-encoded antisense RNA regulating toxin–antitoxin systems from *E. coli*: *hok/sok*, *ldr/rdl*, *symE/symR***. *RNA Biol* 2012, **9**:1520-1527.

49. Dufourc EJ, Buchoux S, Toupe J, Sani MA, Jean-Francois F, Khemtemourian L, Grelard A, Loudet-Courreges C, Laguerre M, Elezgaray J *et al.*: **Membrane interacting peptides: from killers to helpers**. *Curr Protein Pept Sci* 2012, **13**:620-631.

50. Wessner F, Lacoux C, Goeders N, d'Herouel AF, Matos R, Serror P, Van Melderen L, Repoila F: **Regulatory crosstalk between type I and type II toxin–antitoxin systems in the human pathogen *Enterococcus faecalis***. *RNA Biol* 2015:0.

51. Ghafourian S, Raftari M, Sadeghifard N, Sekawi Z: **Toxin–antitoxin systems: classification, biological function and application in biotechnology**. *Curr Issues Mol Biol* 2014, **16**:9-14.

52. Demidenok OI, Goncharenko AV: **Bacterial toxin–antitoxin systems and perspectives for their application in medicine: a review**. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia* 2013, **49**:539-546.

53. Mok WW, Li Y: **A highly efficient molecular cloning platform that utilises a small bacterial toxin gene**. *Chembiochem* 2013, **14**:733-738.

54. Booth JA, Suganthan R, Gaustad P, Bjoras M: **Development of DinQ from *Escherichia coli* as an anti-cell-envelope antibiotic**. *Int J Antimicrob Agents* 2015, **45**:196-197.

Les régulateurs de la traduction bactérienne

1. La traduction bactérienne

Le ribosome est un complexe ribonucléoprotéique composé de deux sous-unités qui assurent la synthèse protéique aussi appelée traduction (Warner *et al.*, 1963). La petite sous-unité (30S) est constituée de l'ARN ribosomique (ARNr) 16S et 21 protéines. La grande sous-unité (50S) est composée des ARNr 23S et 5S et 34 protéines. La sous-unité 30S se fixe à l'ARNm et facilite le décodage au niveau du centre de décodage (DC pour Decoding Denter), alors que la sous-unité 50S catalyse la formation des liaisons peptidiques au niveau du centre de transfert peptidique (PTC pour Peptidyl Transfer Center).

Ensemble, les deux sous-unités forment le ribosome 70S qui possède trois sites de fixation aux ARNt, le site A lie les aa-ARNt, le site P contient le peptidyl-ARNt (pt-ARNt) et le site E pour « Exit site » par lequel les ARNt déacylés sont expulsés hors du ribosome (**Figure 29**). L'essentiel du core du ribosome, qui permet la formation de ces trois sites fonctionnels majeurs, est fortement conservé dans tous les domaines de la vie (Anger *et al.*, 2013, Ben-Shem *et al.*, 2011, Wilson & Doudna Cate, 2012). Les principaux sites fonctionnels du ribosome dont le PTC, le DC et les sites de fixation des ARNt, sont formés majoritairement ou intégralement par des ARN (Noller *et al.*, 1971, Noller & Chaires, 1972, Moazed *et al.*, 1986, Moazed & Noller, 1989). La plupart des protéines ribosomiques sont localisées sur l'extérieur du ribosome avec une extension polypeptidique basique insérée dans la structure tridimensionnelle des ARNr, stabilisant le repliement de ces ARNr par des interactions électrostatiques (Liu & Fredrick, 2016).

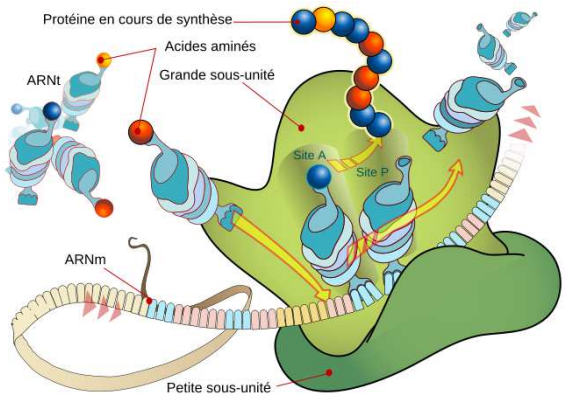


Figure 29 : Schéma d'un ribosome en cours de traduction

Au cours de la traduction, le ribosome prend en charge l'ARNm, assure sa traduction par l'intermédiaire des ARNt et catalyse la formation des liaisons peptidiques de la protéine en cours d'élongation. Le ribosome est intrinsèquement compétent pour la synthèse protéique, seulement des facteurs de traduction sont essentiels pour une traduction rapide et précise. La structure du ribosome est mobile : sa flexibilité est essentielle pour différents aspects de la traduction et peut avoir un rôle clé dans les mécanismes de régulation (Liu & Fredrick, 2016). La traduction est un processus dynamique et continu que l'on peut diviser en quatre grandes étapes : l'initiation, l'élongation, la terminaison et enfin le recyclage des ribosomes (**Figure 30**).

a. L'initiation

Sur un ARNm les séquences codantes commencent systématiquement par un codon d'initiation de la traduction et se terminent par un codon de terminaison. Généralement le codon d'initiation est un AUG, reconnu par l'anticodon de l'ARNt de la formyl-méthionine ($ARNt^{fMet}$) (Mayer *et al.*, 2003). Il peut également s'agir des codons GUG ou UUG qui auront un appariement plus faible que le codon AUG (Sussman *et al.*, 1996). Ce codon d'initiation est précédé d'une séquence de 4 à 5 nucléotides riche en purines et capable de s'apparier à l'extrémité 3' de l'ARNr 16S appelée Shine-Dalgarno (SD) (Jacob *et al.*, 1987, Steitz & Jakes, 1975). Le site de fixation au ribosome (RBS pour Ribosome Binding Site), correspondant au segment d'ARNm protégé de la digestion des RNases par le ribosome au moment de l'initiation de la traduction, recouvre environ 15 nucléotides en amont et 15 nucléotides en aval du codon d'initiation de la traduction (Steitz & Jakes, 1975).

L'ARN de transfert (ARNt), qui a une structure secondaire en forme de trèfle, possède cinq régions, dont l'hélice acceptrice et une tige-boucle anticodon. L'hélice acceptrice contient une séquence universelle conservée, CCA, qui porte à son extrémité 3' l'acide aminé fixé par une liaison ester et un nucléotide variable qui permet la spécificité des aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS). La tige-boucle anticodon possède la séquence discriminante anticodon qui s'apparie avec les codons de l'ARNm.

Les aaRS jouent un rôle crucial dans la fidélité de la traduction en appariant chaque acide aminé avec l'ARNt iso accepteur correspondant, formant ainsi les aminoacyl-ARNt (aa-ARNt). Au cours de la traduction, ces aa-ARNt, convertissent l'information génétique stockée dans la séquence d'ARNm en une information matérialisée en protéines.

La phase d'initiation de la traduction commence par la formation du complexe d'initiation 30S (30SIC). Dans ce complexe, le codon d'initiation de la traduction est décodé par l'anticodon de l'ARNt^{fMet} initiateur, au sein du site P de la petite sous-unité du ribosome. Ce premier appariement établit le cadre ouvert qui sera utilisé pour la synthèse protéique. Le 30SIC se fixe ensuite à la grande sous-unité du ribosome pour donner le complexe d'initiation 70S (70SIC). L'aa-ARNt correspondant au second codon de l'ARNm est transmis au site A par le facteur d'élongation EF-Tu pour synthétiser le « dipeptide d'initiation ». Trois facteurs protéiques d'initiation IF1, IF2 et IF3 déterminent la cinétique et contrôlent la sélection de l'ARNt initiateur fMet-ARNt^{fMet} et du codon d'initiation de l'ARNm au cours de l'assemblage du complexe d'initiation. La première translocation dépendant d'EF-G marque le début de la phase d'élongation de la synthèse protéique (Gualerzi & Pon, 2015).

b. L'élongation

La phase d'élongation est une succession de cycles répétitifs durant lesquels le ribosome utilise les ARNt élongateurs pour décoder les codons de l'ARNm, catalyser l'incorporation des acides aminés au sein d'une chaîne polypeptidique naissante et avancer le long de l'ARNm jusqu'au codon suivant.

Au début de chaque cycle, le ribosome est associé à l'ARNt porteur du polypeptide en cours de synthèse dans le site P et à un codon localisé dans le site A. A chaque itération, l'acide aminé suivant est amené au site A par un complexe ternaire formé par un aaARNt associé au facteur d'élongation EF-Tu et à une molécule de GTP. Chacun des cycles de l'élongation est divisé en quatre étapes :

- Le décodage assure la sélection des ARNt dans le site A, par reconnaissance spécifique avec le codon présent de l'ARNm.

- L'accomodation : s'il y a reconnaissance entre le codon et l'anticodon, la fixation du complexe ternaire provoque le départ de EF-Tu, l'hydrolyse du GTP sous forme de GDP et le mouvement de relaxation du bras anticodon de l'ARNt. Ce mouvement appelé accomodation mène le bras accepteur dans le site de transfert peptidique (PTC).

- La réaction de transfert peptidique au cours de laquelle le groupement amine de l'aa-ARNt, localisé dans le site A, provoque une attaque nucléophile sur le carbone du groupement carboxyl de la liaison ester du peptidyl-ARNt, localisé dans le site P, pour former une nouvelle liaison peptidique. Le ribosome catalyse cette réaction au niveau du PTC.

- La translocation durant laquelle le peptide en cours de synthèse est transféré sur l'ARNt du site A, tandis que l'ARNt du site P est déacylé. Durant la translocation, l'ARNm se décale exactement d'un codon tandis que les ARNt des sites A et P vont respectivement transloquer vers le site P et E.

Les facteurs d'élongation, EF-Tu et EF-G utilisent l'énergie libre de l'hydrolyse du GTP pour accélérer le processus de décodage pour EF-Tu et de translocation pour EF-G. Le facteur EF-Tu présente l'aa-ARNt entrant, sous forme de complexe ternaire EF-Tu-GTP-tRNA, au ribosome et EF-G promeut la translocation des pt-ARNt et de leur ARNm associé du site A vers le site P (Moazed *et al.,* 1988). Les facteurs d'élongation, EF-Tu et EF-G utilisent l'énergie libre de l'hydrolyse du GTP pour accélérer le processus de décodage pour EF-Tu et de translocation pour EF-G (Moazed *et al.*, 1988).

La formation de la majorité des liaisons peptidiques catalysées par le ribosome est thermodynamiquement favorable, excepté pour la synthèse de liaisons proline-proline qui nécessitent l'intervention du facteur d'élongation P (EF-P) (Liu & Fredrick, 2016).

c. La terminaison et le recyclage

La rencontre du complexe d'élongation avec un codon stop sur l'ARNm marque la terminaison de la traduction. Les codons stop ne sont pas reconnus par les ARNt mais par deux facteurs de terminaison homologues RF1 et RF2 (Release Factors) localisés dans le site A. L'arrivée du facteur de terminaison catalyse l'hydrolyse de la liaison ester via une attaque nucléophile, comme lors du transfert peptidique, permettant la libération de la protéine néo-synthétisée qui prend alors la conformation d'une protéine fonctionnelle. La liaison du facteur de terminaison RF3 sur le ribosome catalyse le départ des facteurs RF1 et RF2.Après la terminaison, les facteurs de recyclage du ribosome (RRF) et EF-G se fixent dans le site A du ribosome pour dissocier les deux sous-unités du ribosome. Le complexe 30S-ARNm-ARNt nécessite la fixation de IF3 pour se dissocier à son tour et la sous-unité 30S peut alors former un nouveau complexe d'initiation avec un nouvel ARNm (Gao *et al.*, 2005, Peske *et al.*, 2005).L'ensemble des trois étapes, initiation, élongation et terminaison permettent la traduction de l'information génétique portée par l'ARNm en une protéine fonctionnelle (**Figure 30**).

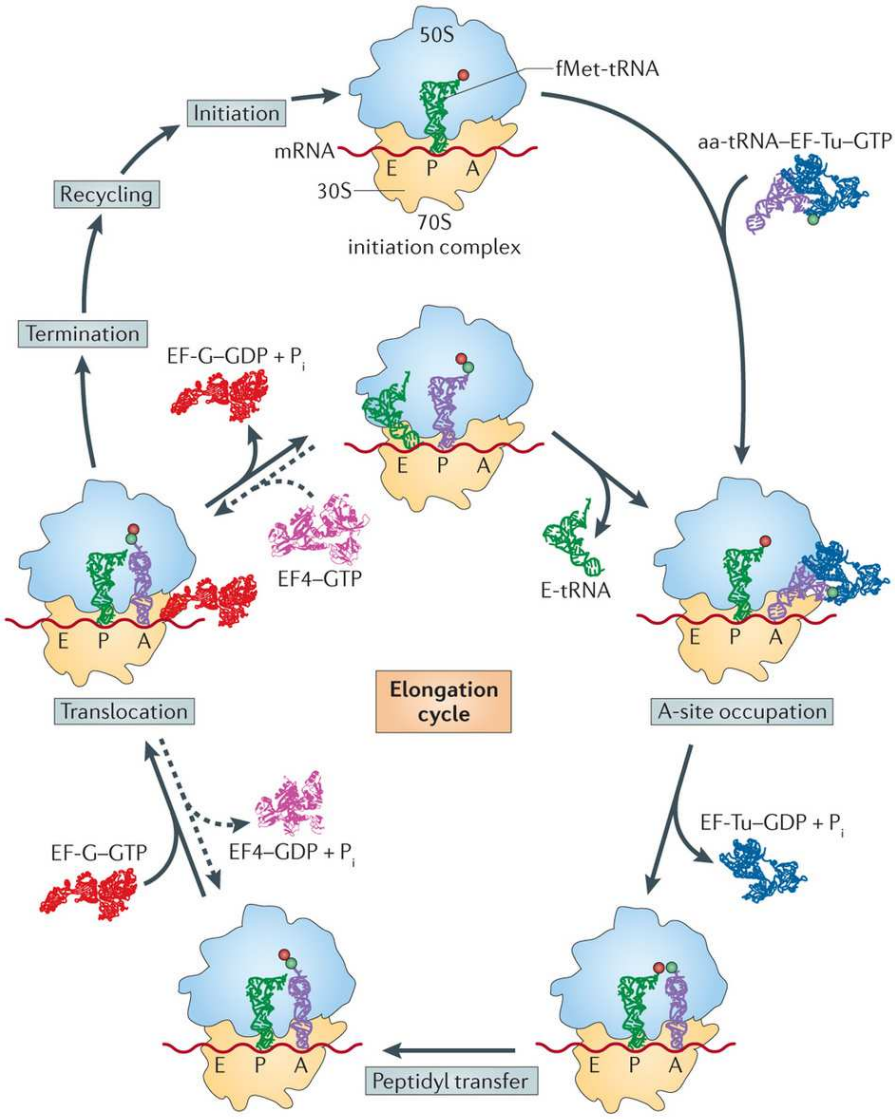


Figure 30 : Représentation schématique de l'ensemble des étapes de la traduction bactérienne.

2. Les régulateurs de la traduction

Les différentes étapes du processus d'expression des gènes, c'est-à-dire la transcription, la traduction et les modifications post-traductionnelles des protéines, peuvent être régulées au cours de la croissance bactérienne et en fonction des conditions environnementales. Ces régulations permettent aux cellules de contrôler l'ensemble des fonctions qui leur permettent de vivre, de se diviser et d'évoluer, elles constituent une étape clé déterminant les phénotypes observés à partir d'une séquence génétique donnée.

Les études de transcriptomes réalisées en parallèle des études de protéomes montrent, pour la majorité des gènes, une faible corrélation entre le niveau de transcrits et le niveau de protéines. Ces différences s'expliquent en partie par les mécanismes de régulation de la traduction qui font intervenir un grand nombre d'acteurs de type protéiques ou ARN. Certains d'entre eux vont réguler la traduction d'ARNm spécifiques alors que d'autres vont directement cibler les effecteurs de la régulation, notamment les ribosomes, dans le but de réguler de manière globale la traduction bactérienne.

a. Les protéines régulatrices

i. Les systèmes toxine-antitoxine de type II

Les bactéries possèdent plusieurs systèmes toxine-antitoxine de type II. Pour la majorité d'entre eux, les toxines inhibent la traduction de leur cible par leur activité RNase (ex : MazF ; RelE) (Condon, 2006, Vesper *et al.*, 2011, Pedersen *et al.*, 2003) ou sont des kinases qui vont phosphoryler des acteurs de la traduction (ex : HipA or Doc) (Germain *et al.*, 2013, Castro-Roa *et al.*, 2013). Nous retrouvons également des protéines capables d'inhiber la croissance par liaison directe avec des enzymes impliquées dans la réplication, comme l'ADN gyrase (ex : CcdB) (Bahassi *et al.*, 1999).

La toxine MazF est une ARNm interférase : elle clive les ARNm libres et simple brin, préférentiellement au niveau d'une séquence ACA localisée sur ou juste en amont du codon d'initiation AUG, et ce en l'absence de ribosome (Cook *et al.*, 2013). Les produits de clivage de MazF sont alors des ARNm dépourvus de séquence SD (Vesper *et al.*, 2011). Ces ARNm sont spécifiquement reconnus par les « ribosome de stress » qui sont également des produits de MazF. Ces ribosomes ne possèdent plus la séquence anti-SD de l'ARN16S, nécessaire à l'initiation de la traduction de nombreux ARNm canoniques. Les ribosomes de stress peuvent ainsi traduire sélectivement les ARNm sans séquence leader. L'hétérogénéité des ribosomes permet ainsi aux cellules de moduler la production de protéines en favorisant

certaines catégories d'ARNm (Moll & Engelberg-Kulka, 2012). Le clivage des ARNm par MazF peut entraîner une inhibition de synthèse protéique allant jusqu'à 90%. Cependant, la synthèse de certaines protéines, généralement d'une taille inférieure à 20 kDa est maintenue, voire augmentée (Amitai *et al.*, 2009).

D'autres toxines de type II dégradent sélectivement les ARNm associés aux ribosomes afin de réguler la traduction et la croissance bactérienne et de faciliter la survie en condition de stress. Ces toxines ribosome dépendantes, comme RelE, YoeB et HigB, reconnaissent une variété de codons localisés dans le site A, où les ARNt fixent et décodent l'ARNm (Pedersen *et al.*, 2003, Feng *et al.*, 2013, Schureck *et al.*, 2015). Comme les RNases bactériennes Sa et T1, elles utilisent des mécanismes de catalyse acide-base pour cliver les liaisons phospho-diester de la chaîne d'ARNm (Feng *et al.*, 2013, Neubauer *et al.*, 2009).

Il existe également des toxines de type II qui inhibent la traduction en clivant des ARN ribosomaux au niveau de sites fonctionnels importants : c'est le cas des toxines VapC et MazF, exprimées par *Mycobacterium tuberculosis*, qui clivent spécifiquement les ARN 16S et 23S (Winther *et al.*, 2013, Schifano *et al.*, 2013, Schifano & Woychik, 2014). La toxine VapC module également la traduction et la croissance bactérienne en clivant les anticodons d'ARNt spécifiques (Winther & Gerdes, 2011, Cruz *et al.*, 2015). HipA est une phosphorylase spécifique des glutamyl-ARNt synthase (GltX) fixés à un ARNtGlu, de cette manière HipA est un inhibiteur de l'aminoacylation qui intervient dans la persistance bactérienne dépendante du (p)ppGpp (Germain *et al.*, 2013). La protéine Doc, quant à elle, inhibe la phase d'élongation par phosphorylation de EF-Tu (Castro-Roa *et al.*, 2013, Cruz *et al.*, 2014). Ainsi, il semble que l'activation des toxines entraîne des variations d'expression spécifiques nécessaires à la survie bactérienne et que chaque toxine activée corresponde à un stress particulier.

ii. Les protéines intervenant dans la réponse à la phase stationnaire

Lorsque la quantité de nutriments devient limitante et/ou que l'accumulation des déchets est importante, la bactérie passe de la phase exponentielle de croissance à la phase stationnaire. Au cours de cette phase, l'expression de plus de 200 gènes et protéines est modifiée (Schellhorn *et al.*, 1998, Starosta *et al.*, 2014). Parmi ces protéines, certaines sont associées aux ribosomes et interviennent dans la régulation de la traduction.

- **La protéine Y (pY)**, aussi appelée RaiA (Ribosome associated inhibitor A) se fixe à la sous-unité 30S dans une position chevauchant les sites de fixation des ARNt et ARNm dans les sites A et P (Agafonov *et al.*, 2001, Vila-Sanjurjo *et al.*, 2004, Polikanov *et al.*,

2012). C'est également un compétiteur du facteur d'initiation IF3, bloquant ainsi l'initiation de la traduction au cours de la phase stationnaire.

- Les facteurs de modulation du ribosome (RMF) et de promotion de l'hibernation (HPF) interviennent dans la formation de dimères de ribosomes, appelés 100S, qui représentent un état de protection et/ou de stockage appelé « hibernation des ribosomes » (Polikanov *et al.*, 2012, Wada *et al.*, 1995, Yoshida *et al.*, 2002, Ueta *et al.*, 2005, Ueta *et al.*, 2008).

- **L'accélérateur de traduction énergie-dépendent A (EttA pour Energy-dependent Translational Throttle, Yiik)** est une cassette de fixation à l'ATP de la famille des protéines ABC-F (Boel *et al.*, 2014). L'expression de EttA est activée pendant la phase stationnaire et confère un avantage pour restaurer la croissance bactérienne après l'apport de milieu frais. Lorsque le rapport ADP/ATP est élevé, la protéine inhibe l'entrée du 70SIC dans le cycle d'élongation par fixation au sire E du ribosome, jusqu'à ce que le niveau d'ATP soit suffisant pour restaurer la traduction (Boel *et al.*, 2014, Chen *et al.*, 2014).

- **La protéine hypothétique YqjD**, exprimée en phase stationnaire par *E. coli* est une protéine membranaire possédant un motif transmembranaire en position C-terminale. Elle est capable de fixer les ribosomes 70S et 100S par sa région N-terminale, entraînant une inhibition de la croissance cellulaire. Son expression est sous le contrôle du facteur sigma de réponse au stress, RpoS. Il est suggéré que YqjD déplacerait les ribosomes vers la membrane cellulaire au cours de la phase stationnaire (Yoshida *et al.*, 2012).

- **Le facteur ribosome-silencing S (RsfS)**, inhibe la traduction et la croissance cellulaire en condition de carence nutritive. Il est présent en solution sous forme de dimère et se dissocie pour se fixer sous forme de monomère à la sous-unité 50S, bloquant ainsi l'association des deux sous-unités, 50S et 30S. Les interactions mises en place sont principalement de type électrostatique ou hydrogènes (Li *et al.*, 2015).

- **Les endoribonucléases.** Une nouvelle étude a mis en évidence la présence d'ARNr 16S tronqués au niveau des sous-unités 30S des ribosomes extraits en phase stationnaire chez *E. coli.* Les résultats de l'étude montrent que ce clivage, phase stationnaire spécifique, est nécessaire et suffisant pour inhiber l'activité traductionnelle. Il semble également que des endoribonucléases, potentiellement activée dans l'entrée en phase stationnaire, pourraient alors avoir accès à cette région de la sous-unité 30S (Luidalepp *et al.*, 2016).

- Réponse à un stress induit par une pause de la traduction médiée par le peptide

L'incorporation de proline successives dans une chaîne polypeptidique naissante, responsable du ralentissement voire d'une pause de la traduction (Hayes *et al.*, 2002, Doerfel *et al.*, 2013, Ude *et al.*, 2013, Woolstenhulme *et al.*, 2013), est prise en charge par le facteur d'élongation EF-P. Chez *E. coli*, la capacité de EF-P à relancer la traduction dépend de sa lysinylation par les enzymes YjeK et YjeA (Doerfel *et al.*, 2013, Ude *et al.*, 2013). YjeK est une lysine 2,3-amynomutase qui convertie la (S)-α-lysine en (R)-β-lysine (Behshad *et al.*, 2006, Peil *et al.*, 2012) et YjeA, un homologue de la lysine ARNt synthétase aussi appelé PoxA, EpmA, ou GenX, permet le transfert de la (R)-β-lysine sur le facteur EF-P (Peil *et al.*, 2012, Navarre *et al.*, 2010, Yanagisawa *et al.*, 2010, Marman *et al.*, 2014).

- Réponse à une carence nutritive

Chez *E. coli*, le processus de formation du (p)ppGpp est induit en réponse à un niveau élevé d'ARNt non chargés dans la cellule. Lorsque les conditions de croissance sont favorables, RelA est libre et adopte une conformation où son domaine C-terminal (CTD) bloque son domaine N-terminal (NTD) porteur des activités hydrolase et synthase du (p)ppGpp (Arenz *et al.*, 2016).

En condition de carence en acide aminés, lorsque les aa-ARNt ne sont pas disponibles, les ARNt non chargés se fixent sur le site-A du ribosome, induisant l'arrêt de la traduction. RelA reconnaît les ribosomes arrêtés et va alors s'y fixer (Wendrich *et al.*, 2002). Récemment, la structure de RelA en complexe avec des ribosomes 70S *d'E. coli* par cryo-microscopie électronique (cry-EM pour Electron Microscopy) a montré que RelA adopte une conformation ouverte dans laquelle le CTD est entrelacé autour d'un ARNt non chargé entre les sous-unités du ribosome et le NTD se prolonge à l'extérieur du ribosome. Cette observation suggère que lorsque RelA est associé aux ribosomes, la conformation ouverte qu'il adopte relève l'effet d'auto-inhibition du CTD sur le NTD, permettant la stimulation de la synthèse de (p)ppGpp par RelA (**Figure 31**) (Arenz *et al.*, 2016). Le (p)ppGpp ainsi synthétisé réduit l'affinité de RelA pour le ribosome, lui permettant ainsi de répéter le cycle sur un autre ribosome bloqué (Wendrich *et al.*, 2002). Il s'agit là d'un rare exemple de régulation positive allostérique d'une enzyme par son produit (Shyp *et al.*, 2012).

Les deux alarmones, ppGpp et pppGpp synthétisée, se fixent à l'ARN polymérase (Chatterji *et al.*, 1998, Syal & Chatterji, 2015) inhibant ainsi la transcription de molécules intervenant dans les processus de transcription et de traduction (Dennis & Nomura, 1974,

Dennis & Nomura, 1975). A l'inverse, des enzymes métaboliques, particulièrement celles impliquées dans la biosynthèse des acides aminés, sont activées (Gentry *et al.*, 1993) (Brown *et al.,* 2002).

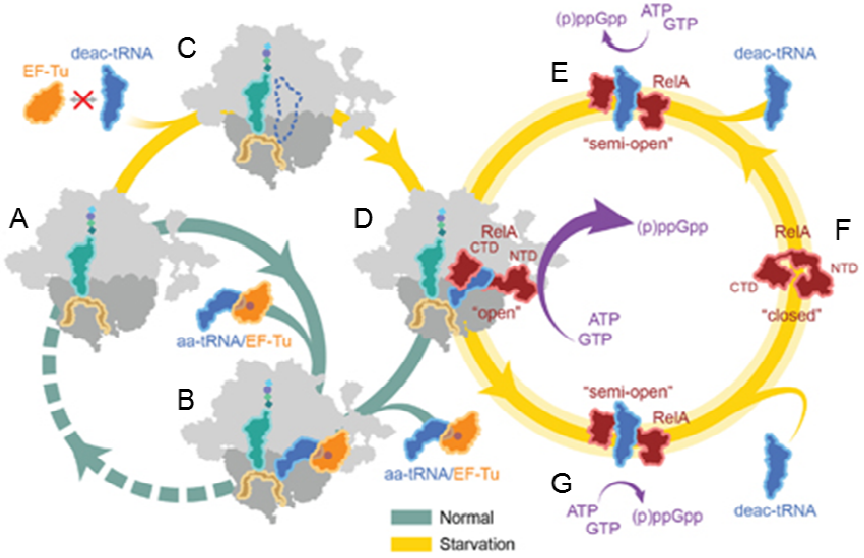


Figure 31 : Modèle du mode d'action de RelA en condition optimale et en condition de carence nutritive. (A-B) En condition optimale (cycle vert), les aaARNt sont délivrés par EF-Tu (orange) au site A du ribosome. (C-G) En condition de carence (cycle jaune), l'interaction de RelA (rouge) avec un ARNt déacylé au niveau du site A du ribosome entraine un changement de conformation de RelA d'une forme « fermée » à une forme « ouverte » stimulant ainsi la synthèse de (p)ppGpp (Arenz *et al.*, 2016).

Obg, intervient dans les dernières étapes de la biogénèse de la sous-unité 50S du ribosome en conditions normales de croissance. Elle stimule également l'activité hydrolase de SpoT, qui cible l'alarmone (p)ppGpp, prévenant ainsi l'activation inappropriée de la réponse stringente (Raskin *et al.*, 2007, Jiang *et al.*, 2007, Kint *et al.*, 2014). Lorsque la quantité de nutriments est faible et que le niveau de GTP chute, Obg, liée au GDP et influencée par la présence de (p)ppGpp, dissocie les ribosomes et perd son interaction avec SpoT, inhibant ainsi la traduction en ciblant directement les ribosomes d'une part et en favorisant l'accumulation de (p)ppGpp d'autre part (Jiang *et al.*, 2006, Feng *et al.*, 2014, Jiang *et al.*, 2007, Kint *et al.*, 2014). La protéine Obg agit en partenariat avec les acteurs de différentes voies de contrôle de la croissance et cela à partir d'un statut énergétique donné. (Kint *et al.*, 2014, Feng *et al.*, 2014).

- Réponse à un stress antibiotique

Le ribosome est l'une des principales cibles cellulaires des antibiotiques, les bactéries ont alors développé un grand nombre de mécanismes pour échapper aux stress associés aux antibiotiques et développer des résistances (Wilson, 2014, Wilson, 2016). La synthèse de protéines associées aux ribosomes comme les protéines de protection du ribosome (RPP) (Nguyen *et al.*, 2014, Connell *et al.*, 2003a, Connell *et al.*, 2003b) et les homologues de la protéine FusB (O'Neill *et al.*, 2004, Farrell *et al.*, 2011) fait partie de ces mécanismes.

- Les protéines spécialisées dans la protection du ribosome (RPP) représentent l'un des moyens développés par les bactéries de résister à la tétracycline (revue par (Chopra & Roberts, 2001, Nguyen *et al.*, 2014). La tétracycline est un antibiotique qui se fixe à la sous-unité 30S du ribosome pour empêcher les aa-ARNt d'aller au site-A (Brodersen *et al.*, 2000). Les RPP sont des GTPases présentant une forte homologie avec EF-G (revue par (Connell *et al.*, 2003a)). Les RPP les mieux caractérisés, TetM et TetO, se fixent aux ribosomes inhibés par l'antibiotique, libérant la tétracycline de son site de fixation par un mécanisme directe (Donhofer *et al.*, 2012, Li *et al.*, 2013). Ils permettent ainsi la fixation du complexe ternaire « EF-Tu-aa-ARNt-GTP » pour entamer un nouveau cycle d'élongation (Connell *et al.*, 2003a).

- Les homologues de FusB : L'acide fusidique est un antibiotique qui verrouille le facteur d'élongation EF-G sur le ribosome et diminue la quantité de ribosomes actifs (Wilson, 2009). Parmi les mécanismes de résistance à l'acide fusidique, il y a le transfert horizontal de déterminants fusB-like (Farrell *et al.*, 2011), retrouvés chez certains Gram positifs dont les *Staphylococcus* (O'Neill *et al.*, 2004, O'Neill & Chopra, 2006). L'expression du gène *fusB* est régulée par une diminution du niveau de traduction (O'Neill & Chopra, 2006), notamment induite par la présence d'acide fusidique. Dans cette condition, la protéine FusB se fixe au complexe « EF-G•GDP•Acide fusidique » associé au site A du ribosome en pause, déstabilise le complexe et augmente son taux de dissociation du ribosome, permettant ainsi au ribosome de poursuivre la traduction (**Figure 32**) (Cox *et al.*, 2012).

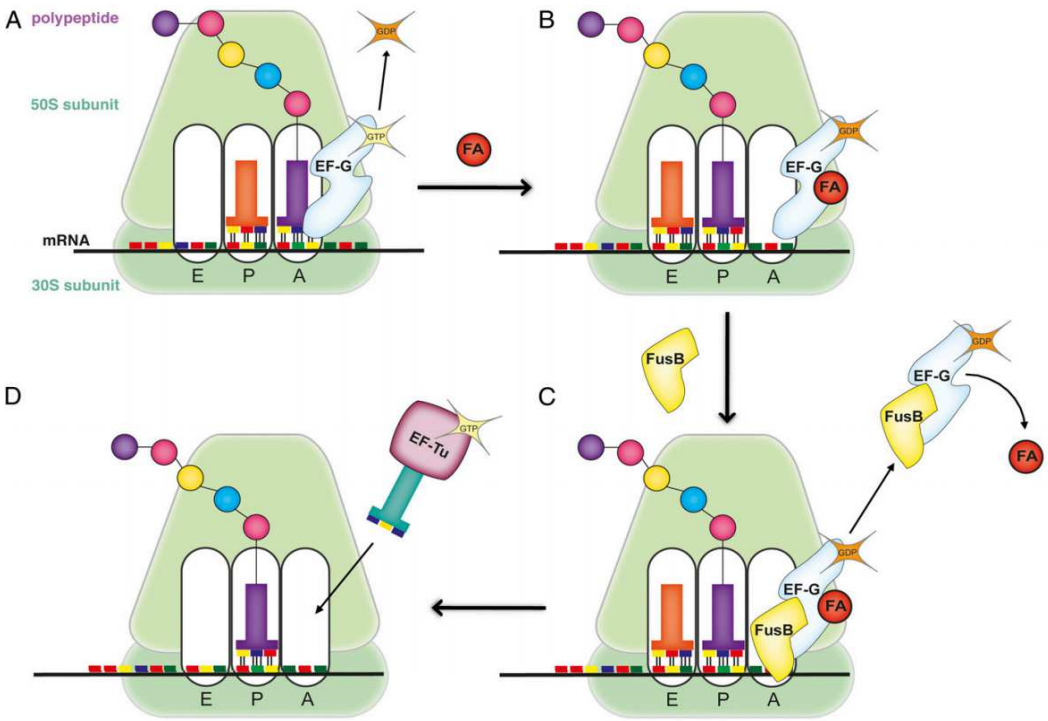


Figure 32 : Schéma du mécansime de résistance à l'acide fusidique (FA) médiée par les protéines de type FusB. (A) EF-G catalyse la translocation dans une réaction conduite par l'hydrolyse de GTP. (B) En présence de FA, la molécule immobilise le complexe EF-G•GDP sur le ribosome, bloquant stériquement la prochaine étape de la traduction et la synthèse protéique. (C) Les protéines de type FusB entrent en compétition avec le ribosome pour fixer EF-G, déstabilisant ainsi le complexe ribosome•EF-G•GDP•FA et favorisant sa dissociation ; FA ne peut pas fixer le facteur EF-G lorsqu'il n'est plus fixé au ribosome, et sera spontanément dissocié une fois le complexe délogé du ribosome. (D) La dissociation du complexe EF-G•GDP•FA dégage le site A du ribosome, permettant l'entré de la prochaine molécule d'aa-ARNt, et la reprise de la traduction (Cox *et al.*, 2012).

- Réponse à une forte concentration en magnésium

Une forte concentration en magnésium inhibe la traduction en induisant une translocation non-productive des ARNt au cours de la phase d'élongation. Dans cette condition, EF-4, qui est un paralogue du facteur d'élongation EF-G, libère le ribosome en catalysant le retour de la translocation, fournissant ainsi à EF-G l'opportunité de catalyser une translocation productive afin de poursuivre la traduction (Yamamoto *et al.*, 2014).

b. Les ARN régulateurs

Les ARNrég impliqués dans la régulation de la traduction bactérienne présentent un avantage cinétique et énergétique par rapport à des régulateurs de type protéique. En effet, ils sont disponibles et fonctionnels rapidement après l'intervention d'un changement environnemental, sans nécessiter la synthèse d'un polypeptide régulateur au préalable.

- Les ARN régulateurs ciblant les ARNm

La plupart des ARNrég intervenant dans la régulation de la traduction sont des ARN antisens qui peuvent être regroupés en deux grandes catégories, les ARNrég agissant en *cis* et en *trans*. Les ARNrég agissant en *cis* sont codés par le brin d'ADN opposé et chevauchant de leur ARNm cible. Ils ne régulent alors la traduction que de cet ARNm spécifique grâce à un appariement parfait. Au contraire, Les ARNrég agissant en *trans* ciblent et régulent de multiples ARNm par des appariements imparfaits. Ainsi, la traduction des ARNm cibles peut être finement régulée en fonction des conditions environnementales rencontrées par la bactérie et indépendamment du taux de traduction globale. Plusieurs mécanismes d'action sont impliqués dans la régulation négative ou positive de la traduction de ces ARNm cibles par des ARNrég.

Les riboswitchs

Les riboswitchs, correspondent à un fragment d'ARNm qui autorégule l'ARNm. Ainsi, les riboswitchs captent et répondent à la disponibilité de certaines molécules présentes dans la cellule grâce à l'intervention de deux parties fonctionnelles : le senseur, ou aptamère, et la plateforme d'expression. Lorsque le niveau de métabolite excède un certain seuil, sa fixation au niveau du senseur induit un changement de conformation au niveau de la plateforme d'expression, menant à la modulation des évènements en aval comme la terminaison de la transcription ou la traduction (Serganov & Nudler, 2013, Breaker, 2012, Mandal & Breaker, 2004) (**Figure 33**).

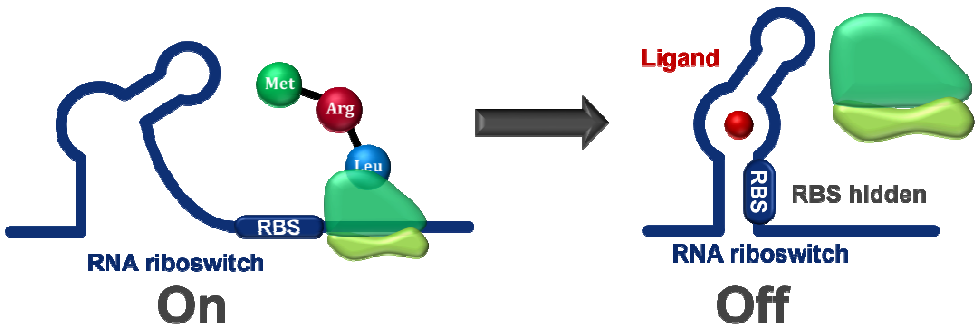


Figure 33 : Exemple d'un riboswitch où la fixation du ligand sur l'aptamère séquestre le RBS et inhibe la traduction de l'ARNm (igem.org).

Chez les *Lactobacillales*, l'expression de *metK*, qui code pour la S-adenyl méthionine (SAM) synthétase produisant SAM est régulée par un mécanisme senseur de la concentration intracellulaire de SAM. En effet, la SAM intracellulaire se fixe au motif « SMK box » présent en 5' de l'ARNm *metk*, induisant ainsi un changement de structure secondaire de l'ARNm et la séquestration de la séquence SD dans une tige, la rendant inaccessible au ribosome. La régulation de *metK* par ce mécanisme permet un contrôle de la production de SAM synthase (Fuchs *et al.*, 2006).

Un autre exemple de riboswitch est l'ARNm *env8HyCbl*, membre de la famille des variants AdoCbl (5'-deoxyadenosylcobalamine) exprimé par *E. coli*. La fixation de cobalamine au sein du domaine de régulation, entraîne la séquestration du RBS. (Polaski *et al.*, 2016).

Les thermosenseurs

La structure secondaire des ARN est influencée par les changements de température : l'utilisation de riboswitchs thermosenseurs par la bactérie pour réguler la traduction de certains gènes est donc énergétiquement peu coûteuse (Altuvia *et al.*, 1989, Morita *et al.*, 1999). A basse température, la structure secondaire des thermosenseurs séquestrent les sites de fixation du ribosome empêchant ainsi la traduction. L'augmentation de la température réverse le phénomène, libérant ainsi les sites de fixation du ribosome pour restaurer la traduction de l'ARNm (Johansson *et al.*, 2002). Ces ARN thermosenseurs sont généralement impliqués dans la régulation de l'expression de gènes de virulence et des gènes intervenant au cours de chocs de température (Righetti & Narberhaus, 2014). C'est le cas pour l'ARNm *prfA* retrouvé chez *Listeria monocytogenes*, qui permet l'activation de gènes associés à la virulence lors de l'entrée de la bactérie dans l'hôte, où elle est confrontée à une température plus élevée (Johansson *et al.*, 2002).

Les ARNrég associés au site de fixation du ribosome (RBS)

La majorité des ARNrég ciblent la région 5'-UTR des ARNm, à proximité ou sur le RBS, entrant ainsi en compétition avec la sous-unité 30S du ribosome (**Figure 34**). Généralement, l'appariement chevauche la séquence Shine-Dalgarno (SD) et/ou le codon d'initiation.

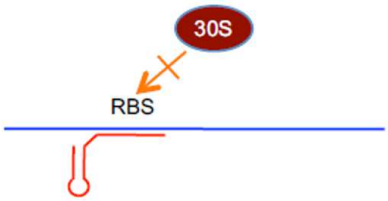


Figure 34 : Schéma d'un ARNrég ciblant le RBS de son ARNm cible. L'ARNm est en bleu, l'ARNrég en rouge, la sous-unité 30S est représentée par un ovale rouge, la flèche orange barrée représente l'inhibition de la traduction. RBS : Ribosome Binding Site (issu de (Wagner & Romby, 2015)).

C'est le cas de l'ARNrég SgrS qui se fixe à proximité de la séquence SD de l'ARNm *ptsG*, qui code pour des composants membranaires, pour inhiber sa traduction (Kawamoto *et al.*, 2005).

Chez *E. coli*, l'ARNrég MicA, accumulé au cours de l'entrée de la bactérie en phase stationnaire, se fixe sur la séquence leader de l'ARNm *ompA*. Il interfère ainsi avec la formation du complexe ternaire, composé de l'ARNm, la sous-unité 30S et l'ARNt-fMet, et inhibe ainsi l'initiation de la traduction de la protéine membranaire OmpA (Outer membrane protein A) (Udekwu *et al.*, 2005).

Les ARNrég associés à la région codante

A l'inverse, certains ARNrég ne présentent de complémentarité ni avec la séquence SD ni avec le codon d'initiation de la traduction, suggérant que le contrôle de la traduction par des ARNrég pourraient intervenir à un autre site sur l'ARNm. Chez *Salmonella* l'ARNrég RybB réprime la traduction de l'ARNm *ompN* par appariement avec l'extrémité 5' de sa région codante (Bouvier *et al.*, 2008). Dans la même étude, les résultats d'interférence systématique entre la fixation d'ARNrég et la fixation de la sous-unité 30S sur différents ARNm, suggèrent que les ARNrég qui inhibent la traduction par séquestration de la région 5' de la phase codante, ne peuvent s'apparier que jusqu'au cinquième codon après le codon AUG. Cette « fenêtre de cinq codons » pour le contrôle de la traduction s'applique également aux systèmes de régulation en *cis*, comme les thermosenseurs et les riboswitchs (Bouvier *et al.*, 2008). Cette observation suggère la manière dont les ARNm sans séquence leader peuvent être régulés par des ARNrég.

Dans certains cas, l'appariement de base avec la séquence SD est accompagnée d'un complexe supplémentaire, en aval de la séquence codante, permettant de stabiliser la fixation de l'ARNrég sur son ARNm cible. Chez *S. aureus*, l'effecteur du quorum sensing, ARNIII interagit avec l'ARNm *coa*, impliqué dans la virulence, en deux régions distantes. Le complexe entre les deux ARN est composé d'un appariement imparfait qui cache la séquence SD de l'ARNm *coa* et d'une interaction boucle-boucle en aval de la région codante. L'appariement imparfait est suffisant pour prévenir la formation du complexe d'initiation de la traduction. De plus, l'endonucléase III, spécifique des séquences d'ARN

double-brin clive les deux régions de l'ARNm liées à l'ARNIII, contribuant ainsi à sa dégradation. Ce résultat illustre la diversité de topologies des appariements entre l'ARNIII et ses ARNm cibles (Chevalier *et al.*, 2010).

Chez *E. coli*, l'ARNrég OxyS, induit en réponse au stress oxydatif, est un ARNrég général qui régule l'expression d'une quarantaine de gènes dont *fhlA*, qui code un activateur transcriptionnel du métabolisme du formiate (Altuvia, 1998). Deux petits appariements entre OxyS et l'ARNm *fhlA*, l'un au niveau du site de fixation du ribosome, l'autre dans la région codante, sont responsables de l'inhibition de la traduction de l'ARNm (Argaman & Altuvia, 2000). La protéine Hfq stimule la cinétique d'association entre l'ARNrég et l'ARNm et reste lié à l'ARNm *fhlA* pour former un complexe ternaire (Salim & Feig, 2010).

Les ARNrég associés à l'ARNm en amont du RBS

Des études ont montrées, par des techniques de mutation et de probing, que pour certains ARNm le site de fixation de l'ARNrég responsable de l'inhibition de la traduction est localisé loin en amont du RBS (**Figure 35**).

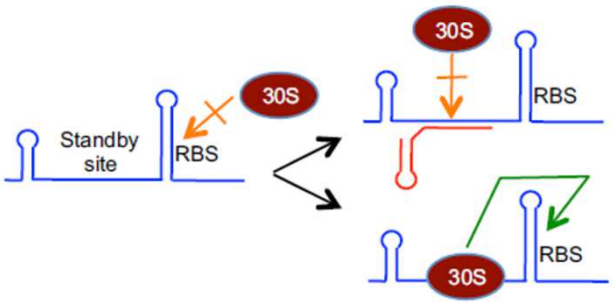


Figure 35 : Schéma d'un ARNrég ciblant une séqence située en amont du RBS de son ARNm cible. L'ARNm est en bleu, l'ARNrég en rouge, la sous-unité 30S est représentée par un ovale rouge. La flèche verte et les flèches orange barrées représentent l'activation et l'inhibition de la traduction, respectivement. RBS : Ribosome Binding Site (issu de (Wagner & Romby, 2015)).

Dans le cas du STA de type I *tisB*/IstR1 (décrit dans la partie STA de type I), l'antitoxine IstR1 se fixe sur un site stand-by localisé environ 100 nucléotides en amont du RBS de la forme active de l'ARNm de la toxine *tisB*. Il entre ainsi en compétition avec le ribosome et favorise la dégradation de l'ARNm par la RNase III (Darfeuille *et al.*, 2007, Wagner & Unoson, 2012).

Chez *Salmonelle*, l'ARNrég GcvB réprime l'expression de sept ARNm. Ce régulateur possède une séquence riche en uracile et guanine très conservée, capable de se fixer à des éléments activateurs riches en cytosine et adénine. Dans certains cas (*oppA*, *dppA*), la répression par GcvB est directement liée au blocage du RBS, cependant, GcvB peut

également réprimer la traduction par fixation sur l'ARNm cible en amont du RBS, c'est le cas pour l'ARNm *gltI* (Sharma *et al.*, 2007).

Pour certains ARNm, comme *csgD*, le site de fixation des ARNrég OmrA et OmrB est localisé à environ 50 nucléotides en amont de la séquence SD (Holmqvist *et al.*, 2010, Holmqvist *et al.*, 2013), mais les mécanismes d'action restent encore à élucider.

Les ARNrég ciblant des cadres ouverts de lecture leader

La régulation par des appariements entre ARN sens et ARN antisens peut être indirecte. Parfois, la traduction d'un ARNm est entravée par la structure secondaire du RBS, et le couplage traductionnel d'une ORF leader en amont est nécessaire pour l'expression.

Par exemple, la protéine d'initiation de la réplication RepA, qui régule la fréquence de réplication du plasmide R1, est contrôlée par l'ARNrég CopA par l'intermédiaire d'un peptide leader, Tap (Translational activator peptide). La fixation de l'antitoxine CopA sur la séquence CopT de l'ARNm *repA*, inhibe la traduction de l'ARNm *tap.* L'expression de *repA*, nécessitant la traduction de l'ARNm *tap* est alors inhibée. En revanche, lorsque l'antitoxine est absente, l'ARNm *tap* est traduit. Le codon stop de l'ARNm *tap* étant localisé juste en aval du codon d'initiation de l'ARNm *repA*, la traduction de *tap* favorise l'accès du ribosome sur le RBS de l'ARNm *repA*, auparavant séquestré par une tige-boucle (Blomberg *et al.*, 1992, Malmgren *et al.*, 1996) (**Figure 36**).

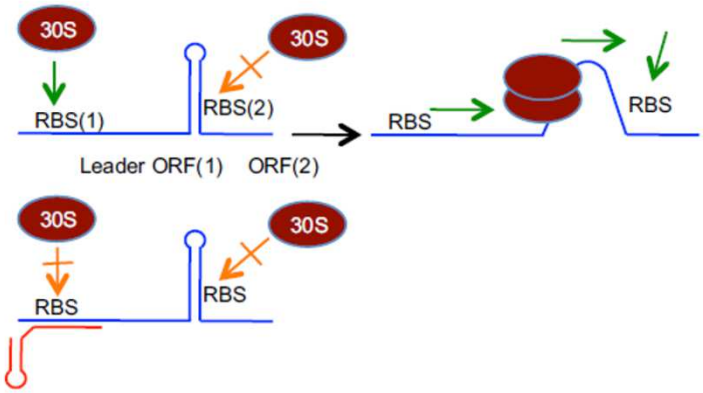


Figure 36 : Schéma d'un ARNrég ciblant un cadre ouvert de lecture (ORF) leader. L'ARNm est en bleu, l'ARNrég en rouge, la sous-unité 30S est représentée par un ovale rouge et le ribosome 70S est par la superposition de deux ovales rouges. Les flèches vertes et les flèches orange barrées représentent l'activation et l'inhibition de la traduction, respectivement. RBS : Ribosome Binding Site (issu de (Wagner & Romby, 2015)).

RyhB est un exemple d'ARNrég chromosomique qui inhibe la traduction de sa cible via l'inhibition d'un peptide leader. Chez *E. coli*, l'absence de fer dans le milieu favorise la synthèse de l'ARNrég RyhB. Celui-ci se fixe sur l'ORF leader, *uof*, localisée en amont de *fur* qui a un rôle central dans le métabolisme du fer. Il en résulte l'inhibition de la traduction et la dégradation des deux ARNm *uof* et *fur* (Vecerek *et al.*, 2007).

L'activation de la traduction par un ARNrég peut également impliquer des ORF de peptide leader. Chez *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), l'ARNrég PhrS active la traduction de l'ORF localisée en amont de l'ARNm *pqsR*, un régulateur clé du quorum-sensing chez *P. aeruginosa*, dont il va alors activer la traduction par couplage traductionnel (Sonnleitner *et al.*, 2011).

Activation de la traduction

D'autres ARNrég peuvent être impliqués dans l'activation de la traduction de leur ARNm cible : ils agissent généralement comme des anti-antisens (**Figure 37**). Ces ARNrég activent la traduction d'ARNm possédant une longue séquence leader qui séquestre structurellement le RBS dans une tige-boucle stable. La fixation de l'ARNrég dans la région 5' flanquante de la tige-boucle libère le RBS. C'est le cas de l'ARN III qui active la traduction de l'ARNm de l'α-toxine, *hla* (Morfeldt *et al.*, 1995) et des ARNrég DsrA, RprA et ArcZ qui régulent tous les trois le facteur sigma alternatif *rpoS* (Majdalani *et al.*, 1998, Majdalani *et al.*, 2002, Mandin & Gottesman, 2010). Une étude récente a mis en évidence l'implication de la protéine Hfq dans les mécanismes d'activation. Hfq fixe trois sites dans la région leader de *rpoS*, permettant un repliement compact qui positionne la séquence cible de l'ARNrég proche de la séquence antisens de l'ARNrég (Peng *et al.*, 2014).

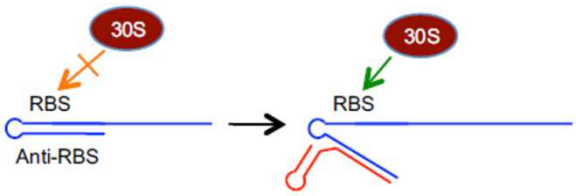


Figure 37 : Schéma d'un ARNrég activateur de la traduction. L'ARNm est en bleu, l'ARNrég en rouge, la sous-unité 30S est représentée par un ovale rouge. La flèche verte et la flèche orange barrée représentent l'activation et l'inhibition de la traduction, respectivement. RBS : Ribosome Binding Site (issu de (Wagner & Romby, 2015)).

- Les ARN régulateurs ciblant le ribosome

Les ARNrég intervenant dans la régulation de la synthèse protéique des procaryotes ont longtemps été uniquement connus pour cibler les ARNm, à l'exception de l'ARNtm (ARN transfer-messager). Cependant, des centaines d'ARN non codants (ARNnc) directement associés aux ribosomes ont récemment été mis en évidence chez différents organismes retrouvés dans les trois grands domaines de la vie. Les premières expériences sur les ARNnc associés aux ribosomes (ARNncar) ont mis en évidence la relation entre leur interaction avec les ribosomes et l'ajustement du taux de biosynthèse protéique de manière stress-dépendante. En ciblant le ribosome, les ARNnc permettent une régulation de la synthèse protéique rapide et directe, nécessaire lors de variations soudaines des conditions environnementales, et permet la reprogrammation massive de l'expression génique.

Un nouvel outil informatique appelé APART (Automated Pipeline for Analysis of RNA Transcripts) a permis la mise en évidence de nouveaux ARNnc associés aux ribosomes chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). Deux sortes d'ARNnc sont détectés et différenciés : les ARNnc ayant leur propre unité de transcription et les molécules d'ARNnc stables différentiellement transformées de manière stress-dépendante à partir d'ARN précurseurs plus longs, comme les ARNr, les ARNt, les ARNsno (petits ARN nucléolaires) ou les ARNm (Zywicki *et al.*, 2012).

L'ARNtm

Dans différentes situations, les ribosomes peuvent être bloqués en cours de traduction, de manière programmée ou non. Même si certains ribosomes restent bloqués dans un but de régulation de l'expression des gènes, beaucoup sont pris en charge par des systèmes de secours cellulaires. Un ribosome stoppé à l'extrémité 3' d'un ARNm tronqué, dépourvu de codon stop, est pris en charge par le système de contrôle qualité, appelé *trans*-traduction, médié par l'ARNtm et son partenaire protéique SmpB (Small protein B). L'ARNtm, qui possède à la fois des caractéristiques d'ARNt et des caractéristiques d'ARNm a pour fonction d'étiqueter les ARNm dépourvus de codon stop et de permettre la reprise de la traduction avec un échange de matrice entre l'ARNm tronqué et la région codant l'étiquette de l'ARNtm (Keiler *et al.*, 1996). Ce processus permet ainsi le recyclage du ribosome et la prévention de la pénurie de ribosomes fonctionnels, principale fonction de la *trans*-traduction. La séquence de l'étiquette est la cible de protéases (Keiler *et al.*, 1996, Gottesman *et al.*, 1998, Flynn *et al.*, 2001, Herman *et al.*, 1998, Choy *et al.*, 2007), ainsi, les polypeptides tronqués et étiquetés sont préférentiellement dégradés dans la cellule. De cette manière, le système de *trans*-traduction prévient également l'accumulation dans la cellule de polypeptides non fonctionnels produits à partir d'ARNm tronqués (Yamamoto *et al.*, 2003). Cette dégradation semble plus significative en condition de carence en acides aminés, fournissant ainsi les acides aminés nécessaires à la synthèse protéique (Li *et al.*, 2008). Toutes les bactéries sont équipées du système de *trans*-traduction médiée par l'ARNtm (Himeno *et al.*, 2015). Cependant, il n'est pas essentiel pour un certain nombre d'entre elles, bien que sa déplétion diminue généralement leur résistance aux différents stress rencontrés (Himeno *et al.*, 2015).

Le partenaire le plus important de l'ARNtm pour la *trans*-traduction est la protéine SmpB, très conservée parmi les bactéries. SmpB est une petite protéine basique qui se fixe au TLD (tRNA Like Domain) de l'ARNtm (Barends *et al.*, 2001, Hanawa-Suetsugu *et al.*, 2002, Nameki *et al.*, 2005, Hallier *et al.*, 2006, Weis *et al.*, 2010a) et au ribosome avec une forte affinité (Hallier, 2006 ; Weis, 2010) pour prévenir sa dégradation et favoriser son

aminoacylation et sa fixation au ribosome (Hanawa-Suetsugu *et al.*, 2002, Nameki *et al.*, 2005, Shimizu & Ueda, 2002, Gillet & Felden, 2007, Weis *et al.*, 2010b). Cette protéine à un rôle essentiel dans le processus de *trans*-traduction (Hanawa-Suetsugu *et al.*, 2002, Nameki *et al.*, 2005) (**Figure 38**).

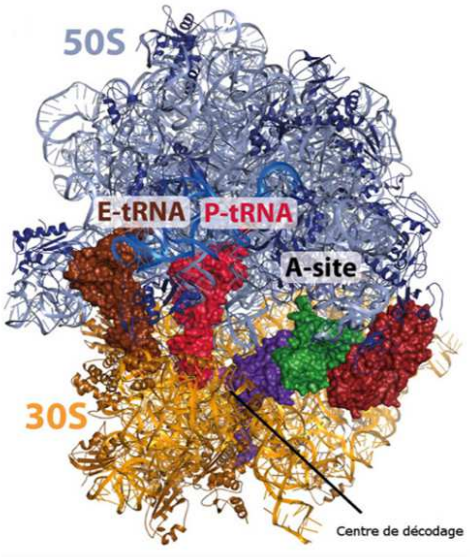


Figure 38 : Vue d'ensemble du complexe ribosomique bloqué en présence de SmpB (en violet) et du fragment d'ARNtm (en vert) lié à EF-Tu•GDP (en rouge). (IGDR, Reynald Gillet)

Il existe deux autres systèmes de secours pour les ribosomes bloqués, ArfA (YhdL) et ArfB (YaeJ) (Arf pour Alternative Ribosome rescue Factor) (Kurita *et al.*, 2014, Himeno *et al.*, 2015).

Les fragments d'ARNm

La recherche de nouveaux ARNnc associés aux ribosomes chez *S. cerevisiae* par le logiciel APART a mis en évidence 20 fragments d'ARNm co-purifiés avec les ribosomes (Zywicki *et al.*, 2012). Le plus abondant d'entre eux est un fragment de 18 nucléotides du locus TRM10, qui code une ARNt méthyl-transférase (Jackman *et al.*, 2003), ce fragment est appelé 18-mer.

Plus de 50% de l'ARN 18-mer est associé aux ribosomes 80S dans des conditions de croissance cellulaire optimales, alors qu'en condition de stress osmotique le fragment est principalement relocalisé dans la fraction polysomale. Dans cette condition de croissance, l'absence d'ARN 18-mer, et non de l'ARNm entier, entraîne un défaut de croissance de la levure. Il semblerait en effet que lorsque la concentration en sel est élevée, l'ARN 18-mer cible la sous-unité 60S du ribosome pour favoriser l'accumulation de ribosomes 80S, entraînant ainsi la réduction de la fraction polysomale. De cette manière, il interfère avec la phase d'initiation de la traduction, inhibant ainsi, de manière dose-dépendante, la synthèse

protéique. L'ARN 18-mer aurait alors un rôle primordial dans l'ajustement du taux de traduction en interagissant directement avec les polysomes en conditions de croissance hyper osmotique chez la levure *S. cerevisiae* (Pircher *et al.*, 2014).

Les fragments d'ARNt

Des fragments dérivés d'ARNt (tRF pour tRNA-derived Fragments) ont été identifiés dans tous les domaines de la vie et représentent une nouvelle classe grandissante d'ARNnc putatifs. Grâce au logiciel APART, les tRF issus de 14 ARNt différents et directement associés aux ribosomes ont été mis en évidence chez l'archaebactérie halophile *Haloferax volcanii* (*H. volcanii*) (Gebetsberger *et al.*, 2012). Ces tRF sont répertoriés en quatre classes différentes en fonction de leur taille et de leur site de coupure, les plus abondants sont les tRF de classe I qui comptent entre 20 et 26 nucléotides et dont l'extrémité 3', correspondant au site de coupure, est localisée au niveau de la tige-boucle D de t'ARNt initial (**Figure 39**).

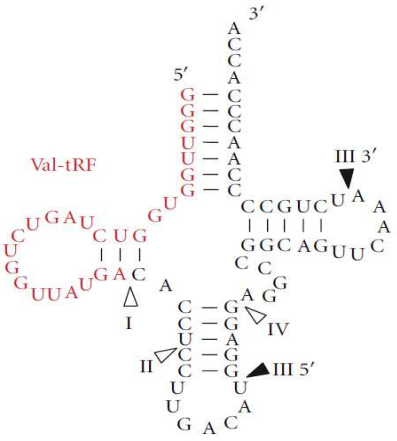


Figure 39 : Clivages de Val-tRF. Structure secondaire de l'ARNt-Val de *H. volcanii* avec le fragment Val-tRF représenté en rouge. Les flèches indiquent la position des sites de coupure pour les quatres différentes classes d'ARNt (I-IV) observées. Les flèches blanches sur la structure de l'ARNt-Val indiquent les extrémités 3' des tRF pour les classes I, II et IV. Les tRF des classes I, II et IV sont toutes clivés à partir de l'extrémité 5' d'ARNt mature. Les flèches noires marquent les extrémités 5' et 3' des tRF appartenant à la classe III (Gebetsberger *et al.*, 2012).

Les résultats obtenus suggèrent que seuls les tRF correspondant aux extrémités 5' des ARNt sont capables d'interagir avec les ribosomes. Le fragment dérivé de l'extrémité 5' de l'ARNt de la valine et d'une longueur de 26 nucléotides, est de loin le plus abondant : il représente 85% de tous les tRF détectés chez la bactérie. Ce fragment, appelé Val-tRF de classe I, est fortement enrichi dans la fraction des ARN associés aux ribosomes et principalement exprimé lorsque la bactérie est cultivée dans un milieu à pH élevé.

Les études montrent que Val-tRF est capable de se fixer à la sous-unité 30S du ribosome *in vivo* et *in vitro*. Cependant, *in vivo*, c'est seulement suite à l'exposition à un pH élevé que le fragment Val-tRF est également retrouvé associé aux polysomes, suggérant un rôle putatif de Val-tRF sur la traduction en réponse à un stress alcalin. Des tests de traduction *in vitro* ont confirmé que la présence de 50 pmol de Val-tRF inhibe l'efficacité de la

traduction globale d'environ 45%. Il semble que Val-tRF agirait en inhibant la formation des liaisons peptidiques sur la protéine en cours de synthèse. Ainsi, Val-tRF serait probablement responsable du défaut de croissance observé lorsque *H. volcanii* est cultivé dans un milieu alcalin.

Contexte de la thèse

Le coque à Gram positif, S. aureus, est un commensal de l'Homme et de l'animal mais également un pathogène humain majeur responsable d'infections nosocomiales et communautaires. Avec l'utilisation excessive des antibactériens, l'incidence et l'émergence de souches de S. aureus multi-résistantes aux antibiotiques ont augmenté rapidement depuis plusieurs années et constituent un véritable problème de santé publique (Pantosti & Venditti, 2009). Le succès de S. aureus en tant que pathogène est lié à sa capacité à s'adapter rapidement à un nouvel environnement et à produire un arsenal de facteurs de virulence dont l'expression fait intervenir des protéines mais également des ARNrég.

Jusqu'à récemment, le seul ARNrég connu pour être impliqué dans la virulence de *S. aureus* était l'ARNIII (Boisset *et al.*, 2007). Des études antérieures réalisées au laboratoire ont permis la découverte de sept nouveaux ARNrég exprimés par *S. aureus* (Bohn *et al.*, 2010, Pichon & Felden, 2005). Ces ARN, nommés Spr (Small pathogenicity island RNAs) (SprA-G et X), sont situés dans les îlots de pathogénie, zones variables du génome contenant notamment les gènes de virulence, suggérant qu'ils auraient un rôle dans la virulence bactérienne. Les études ont d'ores et déjà montré l'implication de deux d'entre eux, SprC et SprD, dans la virulence de *S. aureus* sur modèle murin de septicémie. L'inactivation de SprD a permis de mettre en évidence son rôle primordial dans la mise en place de l'infection (Chabelskaya *et al.*, 2010). Lors de cette étude, une cible de SprD a été identifiée, la protéine Sbi impliquée dans l'échappement de *S. aureus* au système immunitaire, et le mécanisme moléculaire de régulation mis en jeu a été élucidé (Chabelskaya *et al.*, 2010). Il s'agit du deuxième ARNrég, après l'ARN III (Novick & Jiang, 2003), dont le rôle dans la virulence a été établi chez le pathogène *S. aureus*. SprC est capable de réguler la traduction de l'autolysine, une adhésine qui facilite l'assimilation de *S. aureus* par les phagocytes humains, ce qui conduit à une augmentation de la phagocytose de *S. aureus* par les monocytes et les macrophages humains et à une inhibition de la virulence de *S. aureus*, probablement dans le but de maintenir la bactérie à l'état de commensal (Le Pabic *et al.*, 2015). Au laboratoire, une étude a démontré que l'ARN SprX est impliqué dans la résistance de *S. aureus* aux antibiotiques de la famille des glycopeptides en régulant notamment la traduction de l'ARNm *spoVG* (Eyraud *et al.*, 2014). C'est le premier exemple d'ARNrég a avoir été impliqué dans la résistance aux antibiotiques chez *S. aureus*. Enfin, les études réalisées au laboratoire ont également permis de mettre en évidence que deux autres ARN Spr, *sprA1* et $SprA1_{AS}$, constituent un STA de type I fonctionnel où la surexpression de l'ARN *sprA1* codant pour un peptide membranaire toxique, PepA1, induit la mort de *S. aureus.*

Cette toxicité réversée en présence de l'ARNrég antitoxine $SprA1_{AS}$. PepA1 est également capable de lyser *in vitro* des érythrocytes humains. De plus, l'expression de PepA1 est induite lors de stress acide et oxydant (Sayed *et al.*, 2011, Sayed *et al.*, 2012b), deux stress rencontrés par la bactérie lors de l'infection de l'hôte, suggérant une implication du STA dans la virulence de *S. aureus*. L'implication des ARN $SprA1_{AS}$, SprD et SprX dans la virulence et la résistance aux antibiotiques de *S. aureus* est notamment liée au fait qu'ils soient capables d'inhiber la traduction de leur ARNm cible en bloquant le RBS par appariement de bases avec l'ARNm.

D'une manière générale, les ARNrég jouent un rôle important dans le contrôle de l'expression des gènes depuis l'étape de la transcription jusqu'à la traduction (Waters and Storz, 2009 ; Repoila et *al.*, 2009 ; Johansson et *al.*, 2003). Pendant longtemps, les ARNrég intervenant dans la régulation de la traduction étaient uniquement connus pour cibler les ARNm, à l'exception de l'ARNtm chez les procaryotes (Keiler *et al.*, 1996, Felden & Gillet, 2011). Cependant, des études récentes ont montré, chez l'eucaryote (Zywicki *et al.*, 2012, Pircher *et al.*, 2014), mais également chez le procaryote (Gebetsberger *et al.*, 2012), que des ARNrég non codants pouvaient réguler la traduction globale en ciblant directement le ribosome. Deux sortes d'ARNrég associés aux ribosomes ont été mises en évidence : les ARNrég ayant leur propre unité de transcription et les ARNrég qui correspondent à des produits de clivage d'ARN précurseurs, comme les ARNr, les ARNt, les ARNsno (petits ARN nucléolaires) ou les ARNm (Zywicki *et al.*, 2012).

Dans ce contexte, mon sujet de thèse se décline en deux grandes parties qui sont l'étude fonctionnelle d'un STA de type I exprimé par *S. aureus* impliquant deux nouveaux ARNs Spr, *sprG1*(srn_3840) et SprF1(srn_3830) (Sassi *et al.*, 2015), d'une part, et l'étude fonctionnelle, au sens large, d'ARNrég associés aux ribosomes bactériens d'autre part.

- Partie I -

Etude fonctionnelle d'un système toxine-antitoxine de type I exprimé par *Staphylococcus aureus*

Introduction et objectifs

Les ARN SprF et SprG ont été initialement identifiés au laboratoire par une approche *in silico* (Pichon & Felden, 2005). Ces ARN sont partiellement chevauchants et présents en multiples copies dans le génome de toutes les souches séquencées de *S. aureus.* Deux études ont suggéré, sur la base d'analogie de séquence, que les ARN SprF1 et *sprG1* coderaient respectivement pour une antitoxine et une toxine de type I chez *S.aureus* (Fozo *et al.*, 2010, Beaume *et al.*, 2010). Dans ce contexte, l'objectif de mon travail de thèse est de démontrer que *sprG1* et SprF1 codent pour un STA de type I fonctionnel, de décrypter le mécanisme d'action de l'antitoxine et de la toxine au niveau moléculaire et de comprendre le rôle de ce système dans la physiologie et la virulence de *S. aureus*.

Résultats

L'ensemble des résultats présentés ici ont été réalisés sur la souche N315 de *S. aureus*. Cette souche présente l'intérêt d'être une souche clinique de *S. aureus* résistante à la méticilline (SARM), d'être entièrement séquencée (Kuroda *et al.*, 2001), et d'exprimer les 4 copies de *sprF* et *sprG* qui ont été découvertes en premier lieu dans cette souche (Pichon & Felden, 2005). De plus, la construction d'outils génétiques a été réalisée avec succès dans cette souche clinique au laboratoire (Chabelskaya *et al.*, 2010).

1. Article 2: « Dual Toxic-Peptide-Coding *Staphylococcus aureus* RNA under Antisense Regulation Targets Host Cells and Bacterial Rivals Unequally »

Nous avons initié ce projet par l'analyse de l'expression des ARNs *sprG1* et SprF1, localisé sur l'îlot de pathogénie ϕSa3 (Pichon & Felden, 2005), au cours de la croissance de la souche N315 de *S. aureus*. Nous avons mis en évidence, par Northern blot, une expression constitutive et concomitante de SprF1 et de *sprG1,* qui, contrairement à SprF1, est exprimé en deux transcrits au cours de la croissance (**Figure 1, article 2**). Nous avons également montré que SprF1 est un ARN instable alors que *sprG1* est un ARNm stable qui possède un cadre ouvert de lecture putatif qui coderait pour un peptide de 44 acides aminés présentant une homologie de séquence avec la toxine de type I TxpA (Toxic peptide A) exprimé par *Bacillus subtilis* (Fozo *et al.*, 2010, Silvaggi *et al.*, 2005) (**Figures 1 et 2, article 2**).

Afin d'analyser le profil d'expression de ce peptide, nous avons construit une souche surexprimant le peptide en ajoutant un flag en amont du codon stop à l'aide du vecteur navette pCN35 à fort taux de copies (Charpentier *et al.*, 2004). En effet, nous n'avons malheureusement pas été en mesure de produire des anticorps spécifiques dirigés contre les peptides encodés par *sprG1* ni de construire une souche de surexpression de *sprG1* sous le contrôle de son promoteur endogène. Nous avons ainsi mis en évidence, par Western blot à l'aide d'un anticorps anti-Flag, l'expression de deux peptides membranaires et sécrétés, appelés $PepG1_{31}$ et $PepG1_{44}$ (pour 31 et 44 acides aminés, respectivement) (**Figures 2 et 6, article 2**). Nous avons confirmé la présence des deux cadres ouverts de lecture sur l'ARN *sprG1 in vitro* par la technique de toeprint et de traduction *in vitro* et *in vivo* en mutant les deux codons d'initiation de la traduction (**Figures 2 et 3, article 2**). Nous avons également montré que la surexpression de SprF1, à l'aide du plasmide pCN35 sous le contrôle de son promoteur endogène, provoque une inhibition de l'expression de *sprG1* de même qu'une inhibition de la traduction de *sprG1* (**Figures 3 et 4 article 2**). Nous avons ensuite montré que cette régulation orchestrée par SprF1 est liée à une interaction directe en *cis* entre les deux ARN au niveau de leur zone de chevauchement en 3' mise en évidence par des expériences de gel retard (**Figure 4, article 2**).

Afin de démontrer que les ARN *sprG1* et SprF1 code pour un STA de type I fonctionnel, nous avons construit des souches de *S. aureus* surexprimant ou non l'ARNm *sprG1* sous le contrôle d'un promoteur inductible, en présence ou non de SprF1. Le suivi de

croissance de ses différentes souches par mesure de la DO à 600nm, ainsi que des tests de viabilité montrent que la surexpression des deux peptides codés par *sprG1* induit la mort de *S. aureus*. Cette toxicité est contrebalancée par la surexpression de SprF1 (**Figure 5, article 2**). Ensemble, ces résultats démontrent que le couple *sprG1*/SprF1 constitue un *S*TA de type I fonctionnel.

Enfin, nous avons analysé le rôle des peptides codés par l'ARNm *sprG1*, $PepG1_{31}$ et $PepG1_{44}$. Ces peptides sont de petits peptides hydrophobes et polycationiques localisés dans la membrane bactérienne et sécrétés dans le milieu extracellulaire. Les prédictions de leurs structures tridimensionnelles suggèrent un repliement en hélice α pour ces deux peptides. Toutes ces caractéristiques sont communes avec les peptides antimicrobiens et hémolytiques (Alvarez-Bravo *et al.*, 1994, Giacometti *et al.*, 2000, Fozo *et al.*, 2008, Hancock & Lehrer, 1998, Gerdes *et al.*, 2005). Nous avons donc étudié l'effet cytotoxique de ces peptides synthétiques sur les bactéries compétitrices et les érythrocytes humains. Les résultats obtenus nous ont permis de mettre en évidence un effet antibactérien sur la bactérie à $Gram^+$ *S. aureus,* avec une meilleure activité pour le peptide court, $PepG1_{31}$, et sur les bactéries à $Gram^-$ *E. coli* et *P. aeruginosa* par la technique de microdilution en milieu liquide (**Figure 6, article 2**). Pour étudier l'effet antibactérien des peptides natifs, nous avons préparé des extraits membranaires à partir de la souche *S. aureus* N315 sauvage, de la souche délétée du STA par recombinaison homologue à l'aide du plasmide pBT2 (Nakanishi *et al.*, 1986) comme contrôle négatif, de la souche surexprimant $PepG1_{44}$ et $PepG1_{31}$ et de la souche surexprimant *sprG1* mais où les codons d'initiation de la traduction des peptides sont mutés. Nous avons suivi la croissance de *S. aureus* en présence de ces extraits membranaires et montré une inhibition de la croissance en présence des extraits membranaires surexprimant $PepG1_{44}$ et $PepG1_{31}$, comparable à l'inhibition retrouvée pour la nisine, un peptide antimicrobien utilisé comme contrôle positif. En revanche, nous n'avons pas montré d'inhibition de croissance en présence des extraits membranaires provenant des autres souches, soulignant que l'inhibition de croissance observée est bien liée aux peptides codés par *sprG1*. Nous avons également observé, par la lecture de l'absorbance à 414 nm de l'hémoglobine libérée dans le milieu, un effet hémolytique de nos peptides synthétiques avec pour cette fois une meilleure activité pour le peptide long, $PepG1_{44}$, probablement liée à la présence de plusieurs acides aminés cationiques connus pour augmenter le pouvoir hémolytique des peptides (Solecki *et al.*, 2015) (**Figure 6, article 2**).

En conclusion, nous avons montré dans cette étude que les ARNs *sprG1* et SprF1 constituent un STA de type I fonctionnel où l'antitoxine SprF1 inhibe l'expression et la traduction de la toxine *sprG1* qui code pour deux peptides membranaires et sécrétés,

PepG1$_{44}$ et PepG1$_{31}$, capables de lyser les érythrocytes humains et d'inhiber la croissance de bactéries compétitrices et de *S. aureus* lui-même. L'ensemble de ces résultats ont permis la publication de l'article « Dual Toxic-Peptide-Coding *Staphylococcus aureus* RNA under Antisense Regulation Targets Host Cells and Bacterial Rivals Unequally » Marie-Laure Pinel-Marie, **Régine Brielle** et Brice Felden, publié dans Cell Reports en avril 2014.

Article II

Dual toxic-peptide-coding *Staphylococcus aureus* RNA under antisense regulation targets host cells and bacterial rivals unequally.

Marie-Laure Pinel-Marie, Régine Brielle, Brice Felden

Cell Rep. 2014 Apr 24;7(2):424-35.

OPEN ACCESS
CellPress

Cell Reports
Article

Dual Toxic-Peptide-Coding *Staphylococcus aureus* RNA under Antisense Regulation Targets Host Cells and Bacterial Rivals Unequally

Marie-Laure Pinel-Marie,[1] Régine Brielle,[1] and Brice Felden[1,*]
[1]Rennes University, Inserm U835 Biochimie Pharmaceutique, 2 Avenue du Professeur Léon Bernard, 35043 Rennes, France
*Correspondence: brice.felden@univ-rennes1.fr
http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.012
This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/).

SUMMARY

Produced from the pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus* clinical isolates, stable SprG1 RNA encodes two peptides from a single internal reading frame. These two peptides accumulate at the membrane, and inducing their expression triggers *S. aureus* death. Replacement of the two initiation codons by termination signals reverses this toxicity. During growth, *cis*-antisense RNA SprF1 is expressed, preventing mortality by reducing SprG1 RNA and peptide levels. The peptides are secreted extracellularly, where they lyse human host erythrocytes, a process performed more efficiently by the longer peptide. The two peptides also inactivate Gram-negative and -positive bacteria, with the shorter peptide more effective against *S. aureus* rivals. Two peptides are secreted from an individual RNA containing two functional initiation codons. Thus, we present an unconventional type I toxin-antitoxin system expressed from a human pathogen producing two hemolytic and antibacterial peptides from a dual-coding RNA, negatively regulated by a dual-acting antisense RNA.

INTRODUCTION

The *Staphylococcus aureus* bacterium is a serious human pathogen that causes life-threatening nosocomial and community-associated infections (Anstead et al., 2014). *S. aureus* generates virulence factors (Zecconi and Scali, 2013) whose timing and expression levels are tuned by regulatory proteins and small RNAs (sRNAs). Bacterial sRNAs control the expression of targets such as virulence and stress response genes directly or indirectly through regulatory cascades (Caldelari et al., 2013). Direct regulations are achieved through pairing with mRNA targets by sharing limited or extended complementarity or by modulating protein activity (Storz et al., 2011). As for *Listeria monocytogenes* (Mellin and Cossart, 2012) or *Streptococcus pneumoniae* (Mann et al., 2012), *S. aureus* expresses hundreds of sRNAs, making it a model organism for sRNA studies in Gram-positive bacteria (Guillet et al., 2013; Tomasini et al., 2014). In *S. aureus*, several sRNAs are expressed from small pathogenicity islands (SaPIs) containing virulence and antibiotic resistance genes; thus, these sRNAs have been named "Spr" (small pathogenicity island RNAs). Interestingly, one of these, SprD, contributes to disease induction in a mouse model of infection and reduces the expression of a host immune evasion molecule (Chabelskaya et al., 2010). Recent reports suggest that some sRNAs, originally termed "noncoding regulatory RNAs," encode peptides or small proteins from internal reading frames (Vanderpool et al., 2011; Sayed et al., 2012a).

This study investigated the functions of SprF and SprG, RNA present in multiple copies in the staphylococcal genome and initially detected by computer searches and transcriptomic analysis (Pichon and Felden, 2005). Sequence comparisons suggested that the SprF1/SprG1 pair might be a type I toxin-antitoxin (TA) system (Fozo et al., 2010). TA systems are classified into five types depending on the nature and mode of action of the antitoxin. In types I and III, the antitoxins are RNA that either inhibit toxin synthesis or that sequester the toxins. In types II, IV, and V, the antitoxins are proteins that sequester toxins, counterbalance toxin activity, or inhibit toxin synthesis. Type I TA systems are abundant in the eubacterial and archaeal genomes and are made of overlapping gene pairs that allow toxic peptide expression, which is then neutralized by an antisense RNA antitoxin (Brantl, 2012). They permit plasmid maintenance or act as stability modules for their genomes (Holcík and Iyer, 1997; Van Melderen, 2010). When overexpressed, some of these pairs trigger cell death, whereas others contribute to formation of persister cells, thus inducing a dormant stage tolerant to certain antibiotics (Dörr et al., 2010). However, the precise roles of these TA systems remain obscure. We report here that the SprG1/SprF1 pair is an unconventional type I TA system expressed in *S. aureus*. SprG1 uses two in-frame initiation codons to produce two toxic peptides. Peptide expression is negatively regulated by SprF1, a dual-acting *cis*-antisense RNA. The two secreted peptides are able to lyse host cells and competing bacteria with dissimilar strengths.

RESULTS

SprF1 and SprG1 End Mapping, Expression, Relative Amounts, and Stabilities

SprF and *sprG* read in opposite directions, with sequence overlaps predicted at their 3′ ends. Using probes specific for

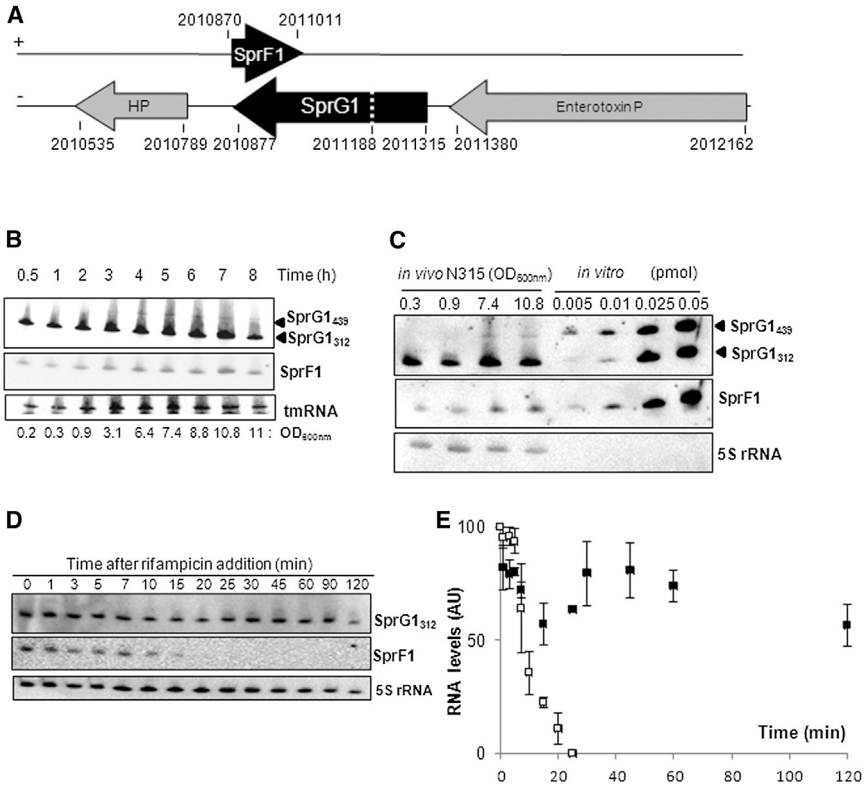


Figure 1. SprF1 and SprG1 Genomic Location, Expression Survey, Quantities, and Stabilities in *S. aureus* Strain N315

(A) RACE mappings of SprF1 and SprG1 in the ΦSa3 pathogenicity island of the *S. aureus* N315 genome, showing genomic location, length determination, and nucleotide overlap.

(B) Northern blots detecting SprF1, $SprG1_{439}$, and $SprG1_{312}$ at various times during growth. tmRNA is an internal control.

(C) SprF1, $SprG1_{439}$, and $SprG1_{312}$ quantifications relative to increasing amounts of synthetic SprF1 and SprG1.

(D) SprF1 and SprG1 RNA expression levels during growth after addition of rifampicin, relative to the 5S rRNA, used as an internal control.

(E) Quantification of $SprG1_{312}$ (black squares) and SprF1 (white squares) RNA levels after rifampicin addition (Arbitrary Units, AU). The error bars indicate variations between three replicates.

each identified gene copy, we found three strains that did not express SprF1 and SprG1, whereas the copies were expressed in all other strains tested. There was some ambiguity in certain strains as to the presence of SprG2 and SprG4, probably due to their sequence similarities (Figure S1). We chose to work with strain N315 because it is a clinical, Methicillin-resistant *S. aureus* strain (MRSA) that expresses all the gene copies. RACE mapping was done to determine the 5′ and 3′ ends of the four SprF/G RNA pairs present in this strain (Table S1). This report focuses the SprF1/SprG1 pair located within ΦSa3 PI, which is the genome of a virulence factor-containing converting phage (Pichon and Felden, 2005), compared to the other copies located in the core genome. The SprF1 and SprG1 3′ ends overlapped, excluding only seven nucleotides (nt) at the SprF1 5′ end (Figure 1A). Northern blot and RACE mapping of SprG1 indicated that it is expressed as two transcripts differing at their 5′ ends: a $SprG1_{312}$ major form, and a $SprG1_{439}$ minor form (Figure S2). Long and short SprG1 have conserved $_{-10}$TATTA$_{-6}$ and $_{-9}$TATAAT$_{-4}$ boxes, respectively, as predicted promoters (Figure S3, red). The SprF1 5′ end was assigned at position $A_{2010870}$ downstream of a predicted conserved $_{-21}$TATATTA$_{-15}$ promoter sequence (Figure S4, red). SprG1 and SprF1 expression were monitored during *S. aureus* growth (Figure 1B). During growth, the RNAs are constitutively and concomitantly expressed. Quantitative estimations of SprF1, $SprG1_{439}$, and $SprG1_{312}$ were done by comparing their in vivo expression to a concentration range of purified synthetic RNA (Figure 1C). At all times, there was about twice the amount of $SprG1_{312}$ as of SprF1, whereas the expression of $SprG1_{439}$ was about 20-fold less than that of $SprG1_{312}$. Half-life determinations of the RNAs (Figures 1D and 1E) showed about a 12-fold shorter half-life for SprF1 (~10 min) than for $SprG1_{312}$ (>120 min). In summary, unstable SprF1 and stable SprG1 are constitutively expressed, and their RNA sequences overlap.

SprG1 Ribosome Loading at Two Internal Initiation Codons Generates Two Peptides

SprF1 and *sprG1* phylogenetic distribution is restricted to the Bacillales (*staphylococcaceae*, genus *staphylococcus*), with an increased sequence identity between the strains (Figures S3 and S4). In all identified *sprG1* sequences, an internal open reading frame (ORF) was identified with two predicted Shine-Dalgarno (SD) sequences ~8 nt upstream from two potential initiation codons (Figure S3, underlined). SprG1 may therefore express two polypeptides: one containing 44 amino acids with a predicted molecular weight (MW) of ~5 kDa; and a shorter peptide of ~3.5 kDa theoretical MW that lacks 13 residues at the N terminus (Figure 2A). A probable ORF was also detected in SprF1 (Figure S4). To determine whether SprF1 and/or SprG1 express peptides, in vitro translation assays were performed (Figure 2B). No translation was detected with SprF1. Synthetic $SprG1_{312}$ and $SprG1_{439}$ RNA, however, produce peptides of ~3–5 kDa apparent MW, which is in agreement with the peptide lengths inferred from the internal coding sequence. To investigate whether translation initiates at one or both predicted methionine codons, they were replaced by two termination codons (mutant $SprG1_{439}$-$STOP_{1,14}$), but this interrupted translation. Next, to test whether the short peptide encoded by SprG1 arises from initiation at the second in-frame methionine codon (M_{14}), it was mutated into Alanine (mutant $SprG1_{439}$-Ala_{14}). Mutating M_{14} into Ala_{14} caused a strong inhibition of the short peptide

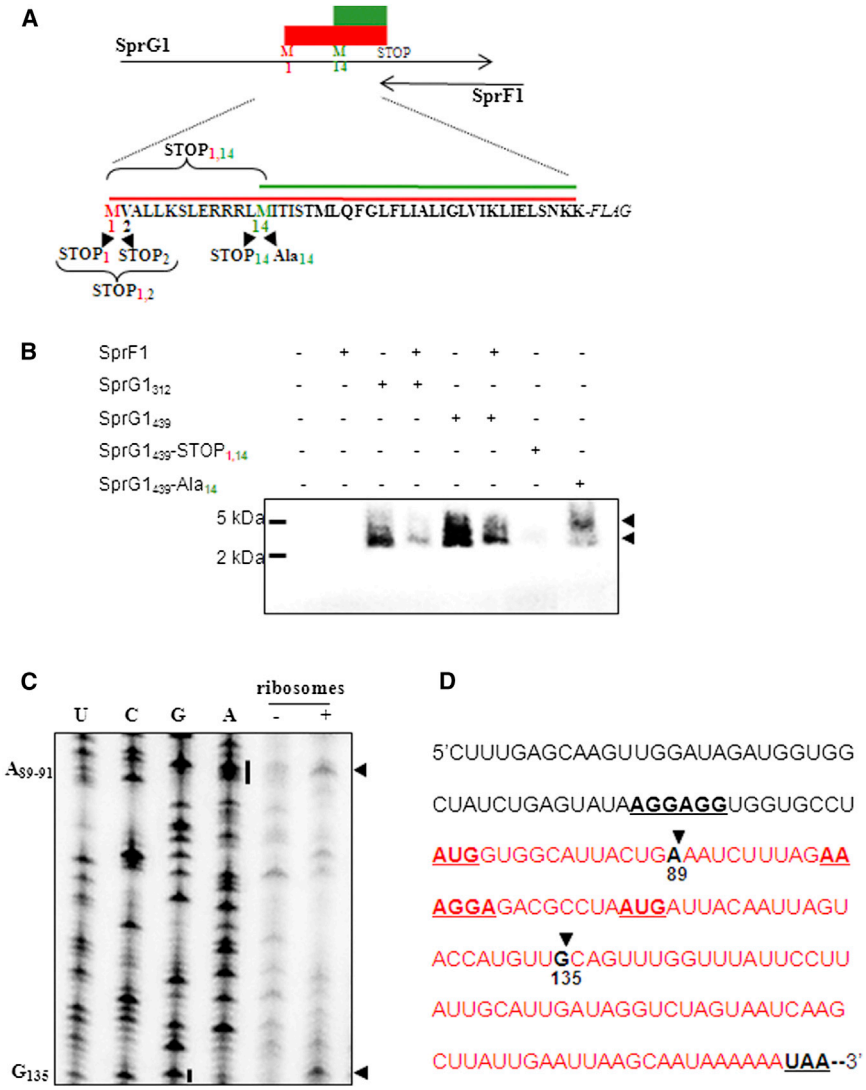


Figure 2. SprG1 Expresses Two Peptides from Two In-Frame Methionine Codons Whose Expression Is Inhibited by SprF1

(A) Top: location of the internal ORFs (red and green) within the SprG1 sequence, with SprF1 bordering the predicted stop codon of the ORFs. Bottom: amino acid sequences and mutations performed on the two peptides. The two methionine initiation codons M_1 (red) and M_{14} (green) and the valine initiation codon V_2 (blue) were mutated into termination codons ($STOP_1$, $STOP_2$, $STOP_{1,2}$, $STOP_{14}$, and $STOP_{1,14}$) or into an alanine codon (Ala_{14}).

(B) In vitro translation assays detected ~3.5 and ~5 kDa peptides (arrowheads) expressed by $SprG1_{312}$, $SprG1_{439}$, $SprG1_{439}$-$STOP_{1,14}$, and $SprG1_{439}$-Ala_{14} RNAs in the absence or presence of SprF1. SprF1 is in 2.5 molar excess as compared to SprG1.

(C and D) Two experimentally determined ribosome toeprints on $SprG1_{312}$ (arrows). (C) U, C, G, and A refer to the $SprG1_{312}$ sequencing ladder. (D) The AUG codons and the SD sequences are bold and underlined. The internal coding sequence of SprG1 is red.

translation, although translation of the long peptide was maintained. This suggests that the shorter peptide was produced from ribosome initiation at M_{14}. When SprF1 is added to the reaction at a 2.5-fold molar excess as compared to SprG1, $SprG1_{312}$, and $SprG1_{439}$ translations were reduced about 3- and 2-fold, respectively. The direct interaction of the ribosomes with the predicted translation initiation signals was evaluated using toeprint assays on ternary initiation complexes that included purified ribosomes, initiator $tRNA^{fMet}$, and $SprG1_{312}$ (Figure 2C). Two ribosome toeprints were detected at positions A_{89} and G_{135} on SprG1, 15 and 23 nt downstream, respectively, from A_{+1} of the first and second predicted initiation codons in the SprG1 ORF (Figure 2D).

The SprG1-Encoded Peptides Originate from Two Internal In-Frame Methionine Codons

To investigate whether SprG1 produced the two peptide(s) in vivo during bacterial growth, a reporter construct was designed by adding an ~2.75 kDa theoretical MW 3 × FLAG (FLAG) sequence in-frame ahead of the ORF's predicted termination codon (Figure S3). In addition to endogenous $SprG1_{312}$, northern blots validated the expression of $SprG1_{312}$-FLAG during growth (Figure 3A). Using anti-FLAG, immunoblotting revealed that SprG1 fusion peptides are expressed in vivo during *S. aureus* growth (Figure 3B). Two peptides were detected: a major abundant form and a minor shorter product, both of ~5–7.5 kDa apparent MWs, in agreement with the predicted 31+22- and 44+22-amino-acid-long fusion peptides inferred from the SprG1 sequence (Figure S3). The peptides were expressed early, accumulated during the early phase, and decreased later on. This drop in peptide expression was not caused by a toxicity-induced cell plasmid number reduction (see below) because the $SprG1_{312}$-FLAG RNA levels were stable throughout growth (Figure 3A). Compared to *S. aureus* cells with an empty vector, isogenic bacteria expressing $SprG1_{312}$-FLAG had reproducible minor growth defects (Figure 3C). To determine whether SprF1 effects SprG1-encoded peptide expression in vivo, an additional construct was built to produce the flagged peptides in the presence of excess SprF1. Northern blots showed that inducing about a 3-fold increase in SprF1 expression reduced the amount of $SprG1_{312}$-FLAG and $SprG1_{312}$ endogenous RNA (Figure 3A), as well as reducing the number of flagged peptides (Figure 3B), thus complementing the growth defect (Figure 3C). To test whether the peptides encoded by SprG1 resulted from translation initiation at two

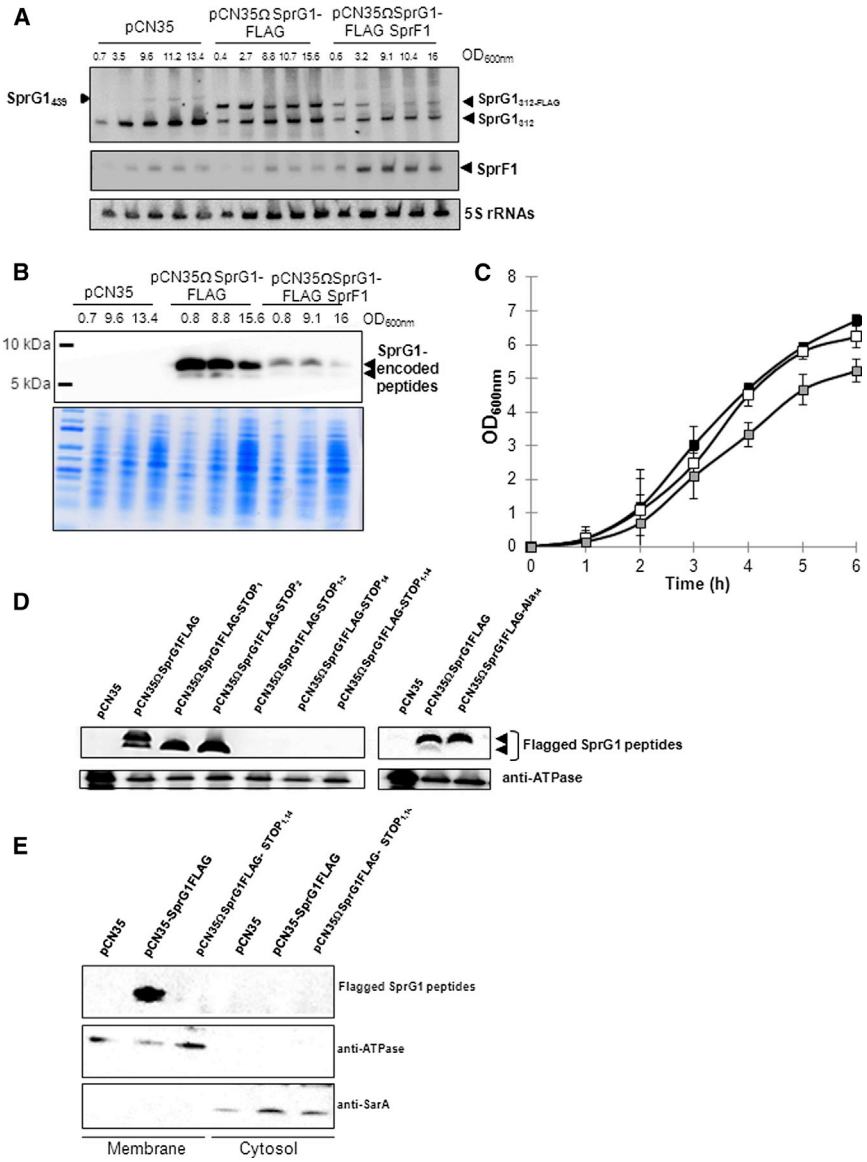


Figure 3. SprG1 Expresses Two Membrane Peptides from Two Internal Methionine Codons Whose Expression Is Inhibited by SprF1 during *S. aureus* Growth

Northern blot analysis of SprF1, $SprG1_{312}$, and $SprG1_{312}$-FLAG (arrowheads) RNA expression (A), western blot analysis of SprG1-encoded flagged peptide expression (B), and growth kinetics (C) of *S. aureus* strain N315 carrying an empty pCN35 vector (black), pCN35ΩSprG1FLAG (gray), or pCN35ΩSprG1FLAG SprF1 (white).

(A) 5S rRNAs are internal loading controls.

(B) Coomassie staining of the total proteins from each sample is loading controls.

(C) The error bars indicate variations between three replicates.

(D) *S. aureus* strain N315 pCN35, pCN35Ω SprG1FLAG, pCN35ΩSprG1FLAG-$STOP_1$, pCN 35ΩSprG1FLAG-$STOP_2$, pCN35ΩSprG1FLAG-$STOP_{1,2}$, pCN35ΩSprG1FLAG-$STOP_{14}$, pCN35Ω SprG1FLAG-$STOP_{1,14}$, and pCN35ΩSprG1FLAG-Ala_{14} were grown to OD_{600nm}:4, and cell lysates were prepared. The expression of SprG1-encoded flagged peptides was analyzed by western blotting. ATPase expression was used as a loading control.

(E) *S. aureus* strain N315 pCN35, pCN35ΩSprG1 FLAG, and pCN35ΩSprG1FLAG-$STOP_{1,14}$ were grown to OD_{600nm}:4. After membrane and cytosolic preparation, expression of the SprG1-encoded flagged peptides was analyzed by western blotting. ATPase and SarA expression were used as a membrane and cytosolic controls, respectively.

internal AUG codon (M_1 and M_{14}) or at a second in-frame valine codon (V_2), they were mutated into a UAA termination codon (Figure 2A). When compared with the fusion peptides expressed by SprG1, immunoblots revealed the lack of expression of the longer peptide in the $STOP_1$ and $STOP_2$ mutants, together with a significant increase of expression of the short peptide predicted to start at M_{14} (Figure 3D). In the $STOP_{14}$ mutant used as a control, no peptides were produced, because the truncated 13 residue form of the long peptide is not flagged and thus not detected. More surprising was the absence of peptides produced by the $STOP_{1,2}$ mutant, suggesting that the sequence at and around M_1 influences production of the shorter peptide, possibly requiring an initial ribosome loading further upstream. Mutating M_{14} into Ala_{14} caused the disappearance of the shorter peptide while maintaining the expression of the longer one (Figure 3D). Altogether, the mutational analysis of the initiation codons of the SprG1 coding sequence indicated that the long and short peptides were produced from ribosome initiation at M_1 and M_{14}, respectively. In addition, it was determined that specific mutations could lead to the exclusive synthesis of the long (Ala_{14}) or the short ($STOP_1$) peptides. Therefore, SprG1 stable RNA contains a dual-coding ORF.

Both SprG1-Expressed Peptides Are Detected at the *S. aureus* Membrane

The amino acid sequences of the peptides encoded by SprG1 and produced by strain N315 are conserved in all sequenced *S. aureus* genomes, with minor sequence variations leading to one to two amino acid changes in the 44 residues (Figure S5). The second methionine codon was lacking in three species containing *sprG1* and *sprF1*. Sequence alignments and the amino acid composition of the SprG1-encoded peptides suggested the existence of a transmembrane hydrophobic domain and two cationic ones. Subcellular localization of the two peptides was performed within the *S. aureus* N315 cells. Membrane and cytosolic fractions were prepared, and the cell fractionation

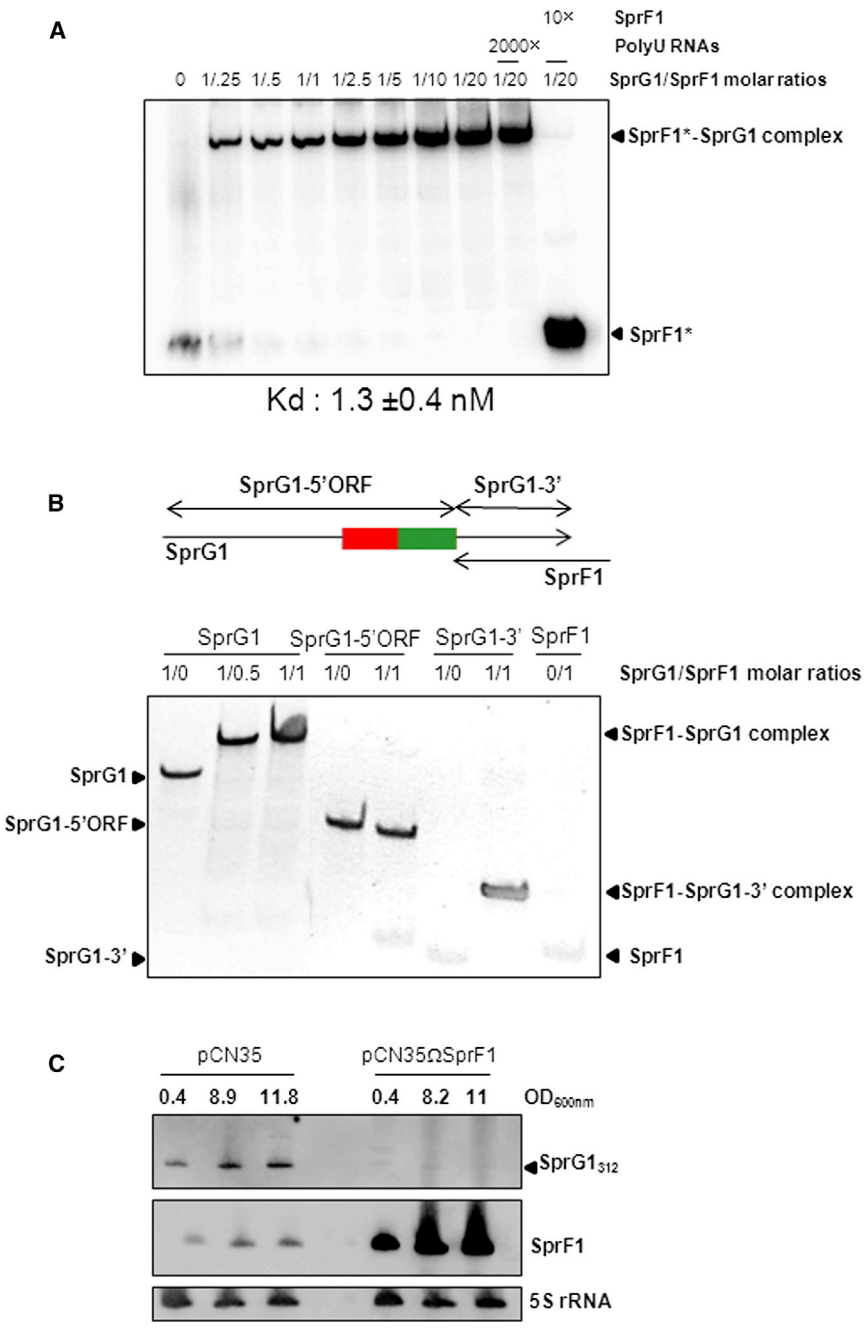


Figure 4. SprF1 Reduces SprG1 Expression by a Direct *cis* Interaction that Involves the Sequence Overlap between the RNAs

(A) Native gel retardation assays of purified labeled SprF1 (A) with unlabeled $SprG1_{312}$. The complexes were revealed with a Phosphoimager for the radioactive assay. The competition assays were performed with a 2,000-fold molar excess of polyU RNAs or with a 10-fold molar excess of unlabeled SprF1. The apparent binding constant (K_d) between SprG1 and SprF1 was inferred from three independent experiments: $K_d = 1.3 \pm 0.4$ nM.

(B) Native gel retardation assays of SprF1 with $SprG1_{312}$, the 5′ and ORF sequences of $SprG1_{312}$ (SprG1-5′-ORF), and the 3′ sequence of $SprG1_{312}$ (SprG1-3′). The complexes were revealed by ethidium bromide staining.

(C) Northern blot analysis of SprF1 and SprG1 expression levels during growth in a *S. aureus* N315 strain carrying an empty pCN35 vector and in an isogenic strain containing pCN35ΩSprF1. The 5S rRNAs are the internal controls.

purity was verified by immunoblotting using anti-ATPase and anti-SarA (staphylococcal accessory regulator) antibodies, respectively (Figure 3E). Immunoblots with anti-FLAG indicated that the SprG1-encoded peptides were only detected in the membrane fractions. As negative controls, no peptides were detected for the *S. aureus* strains having either an empty vector or a $STOP_{1,14}$ mutant lacking the two internal initiation codons. This indicates that once the peptides were translated, they migrated to the *S. aureus* membranes. Despite several attempts to monitor the expression of the native untagged peptides, polyclonal antibodies against each of the two chemically synthesized peptides inferred from the SprG1 sequence could not be obtained.

SprF1 Reduces SprG1 RNA and Peptide Levels by a Direct *cis* Interaction Involving Its Sequence Overlap

SprF1 prevented $SprG1_{312}$ and $SprG1_{439}$ translation in vitro (Figure 2B) and in vivo (Figure 3B) and the RNAs possess nucleotide complementarities involving 134 nt at their 3′ ends (Figure 1A). Native gel retardation assays performed between SprF1 and $SprG1_{312}$ detected an RNA complex (Figure 4A) with an apparent binding constant of about 1.3 ± 0.4 nM. Binding is specific, because a 2,000-fold molar excess of unrelated RNA does not remove SprF1 from its preformed SprF1-$SprG1_{312}$ complex, whereas a 10-fold excess of SprF1 does. Antisense RNA pairs do not necessarily depend on their overlapping sequences for interaction and regulation (Sayed et al., 2012a). $SprG1_{312}$ was divided into two halves: a SprG1-5′ ORF containing its 5′ domain and its ORF but without its SprF1 overlap sequence; and SprG1-3′ which includes its 3′ domain that overlaps with SprF1 (Figure 4B). Gel retardation assays indicated that SprF1 interacts with SprG1 using its 3′ domain. In the Figure 3A, we have shown that SprF1 may lower SprG1 translation by affecting SprG1 RNA levels. To confirm this result, a strain overexpressing SprF1 was constructed by cloning the gene with its endogenous promoter into pCN35. Northern blots indicated that, when SprF1 is overexpressed (~20-fold excess), SprG1 was undetectable during bacterial growth (Figure 4C),

indicating that SprF1 induction reduced SprG1 RNA levels in vivo.

Both SprG1-Encoded Peptides Inhibit *S. aureus* Growth and Trigger Death

Sequence comparisons suggested that the SprG1/SprF1 pair belongs to a type I TxpA (*T*oxic *p*eptide *A*) TA family (Fozo et al., 2010). To test this hypothesis, native untagged peptides in vivo were produced from the $SprG1_{439}$ sequences starting at the upstream transcription initiation site (Figure S3), from the $STOP_1$, Ala_{14}, and $STOP_{1,14}$ SprG1 mutants. These were all cloned into inducible low copy pALC vectors. After an anhydrotetracycline (aTc) induction, northern blots were used to verify the in vivo production of SprG1, SprG1-$STOP_1$, SprG1-Ala_{14}, and SprG1-$STOP_{1,14}$ (Figure 5A). Without aTc, *S. aureus* cells containing each of the four constructs grew in the same manner as the empty vector cells (data not shown). But in the presence of aTc, SprG1 expression inhibited *S. aureus* growth in liquid cultures (Figure 5B), a process also shown by adding aTc onto a solid media and performing serial dilutions (Figure 5C). The SprG1-$STOP_1$ mutant that only expressed the shorter peptide inhibited *S. aureus* growth, whereas SprG1 and the SprG1-Ala_{14} mutant only expressed the long peptide (Figures 3D, 5B, and 5C). Mutant SprG1 $STOP_{1,14}$, however, which does not express either of the two peptides, grows near to wild-type (WT) levels in both liquid and solid cultures. This demonstrates that SprG1 inhibits *S. aureus* growth because it encodes two peptides, and that the production of either of these peptides stops growth. SprG1 also slightly impaired growth independently of its translation products (Figure 5B). To determine whether the SprG1-encoded peptides induce *S. aureus* cell death, bacteria containing an empty pALC, pALCΩSprG1, or the SprG1-$STOP_{1,14}$ mutant were stained with fluorescent dyes to discriminate between living and dead cells and then viewed by microscopy. For the pALC negative control, bacteria were alive, whereas increasing SprG1 expression levels killed about half the cells (Figure 5D). Up to ~80% of the bacteria carrying SprG1-$STOP_{1,14}$, a mutant incapable of producing the two peptides, were viable. This shows that it is the peptides, not SprG1 alone, that are required for toxicity.

The SprG1/SprF1 Pair Is a Type I TA System that Produces Two Toxic Peptides

Direct detoxification of the SprG1 transcript by SprF1 expression of was assayed in vivo. Two sets of plasmids were used: an aTc-inducible pALC with or without SprG1; and a constitutive pCN35 with or without SprF1 expression. Northern blots validated SprF1 induction in Newman strains containing pCN35ΩSprF1 and SprG1 expression after aTc induction in strains transformed with pALCΩSprG1 (Figure 5E). In the presence of aTc, the strains containing pALC and pCN35ΩSprF1 (and therefore expressing SprF1) grew in the same way as those containing the two empty vectors (Figure 5F). The cells expressing SprG1 after aTc induction, however, inhibited *S. aureus* growth, and this was rescued by inducing SprF1 expression (Figure 5F). Altogether, these experiments demonstrate that the SprG1/SprF1 pair is a type I toxin/antitoxin system in which toxicity relies upon the internal expression of two peptides, with both being enough on their own to trigger toxicity.

The SprG1 Peptides Are Secreted, and They Lyse Host Cells and Competing Bacteria with Dissimilar Strengths

The two peptides were detected at the *S. aureus* membrane (Figure 3E), possibly ready for subsequent release outside the bacteria. To investigate this, total and extracellular proteins were extracted at various times during *S. aureus* growth. The two SprG1-encoded fusion peptides accumulated over time in the extracellular environment in smaller amounts than in the total cell lysates (Figure 6A). The longer peptide was predominantly expressed and secreted, compared to the short peptide. Although cytoplasmic SarA transcription factor was detected in the total protein extracts, its absence within the extracellular fractions rules out the idea that the exterior peptides are due to cell lysis. Immunoblots against Protein A and extracellular adherence protein (Eap) allowed their detection, mostly within the extracellular fractions. This is a result consistent with that for excreted proteins, thus it further supports our protein fractionations. Peptide sequence alignments suggest that they are hydrophobic and contain cationic residues (Figure S5), both attributes of pore-forming peptides (Hancock and Rozek, 2002). The lytic activity of the SprG1-expressed peptides was seen when adding increasing concentrations of each of the two synthesized formylated peptides to human erythrocytes. The longer peptide has significantly higher (~5-fold) activity toward human erythrocytes than that of the shorter peptide, and is more active (~3-fold) than δ-hemolysin, the positive control (Figure 6B). As the peptides encoded by SprG1 are secreted, they might also inhibit the growth of competing bacteria during colonization and infection. Their antibacterial activity against representative Gram-positive and -negative bacteria was measured by a growth inhibition assay in liquid cultures, using serial peptide dilution and recording the minimal inhibitory concentration (MIC) values (Figure 6C). Compared to nisin (a Gram-positive antibacterial peptide) and cecropin (a Gram-negative antibacterial peptide), these peptides possess moderate antibacterial activities against *S. aureus* as well as against *E. coli* and (to a lesser extent) *Pseudomonas aeruginosa*, two bacteria frequently associated with staphylococcal infections. Interestingly, the short peptide has a lower MIC value against *S. aureus* than the longer peptide. Both peptides, however, have similar MICs against *E. coli* and *P. aeruginosa*, and both are more active against the former. To evaluate the antibacterial activity of the SprG1-encoded peptides directly produced by *S. aureus* during growth, *S. aureus* membrane extracts were prepared from bacteria deleted in the *sprG1/sprF1* locus (negative control). These either expressed SprG1 and therefore the two peptides, or a $STOP_{1,14}$ mutant unable to produce the two peptides, and were then incubated with intact *S. aureus* cells. Like nisin, the membrane extracts containing the two peptides encoded by SprG1 prevent *S. aureus* growth (Figure 6D). Interestingly, similar amounts of membrane extracts from strain *ΔsprG1/sprF1* and from isogenic strain pALC SprG1-$STOP_{1,14}$ (both strains not expressing the SprG1 peptides) allow bacterial growth in the same manner as an isogenic WT strain. Therefore, peptides produced by growing bacteria can prevent the growth of competing *S. aureus* cells.

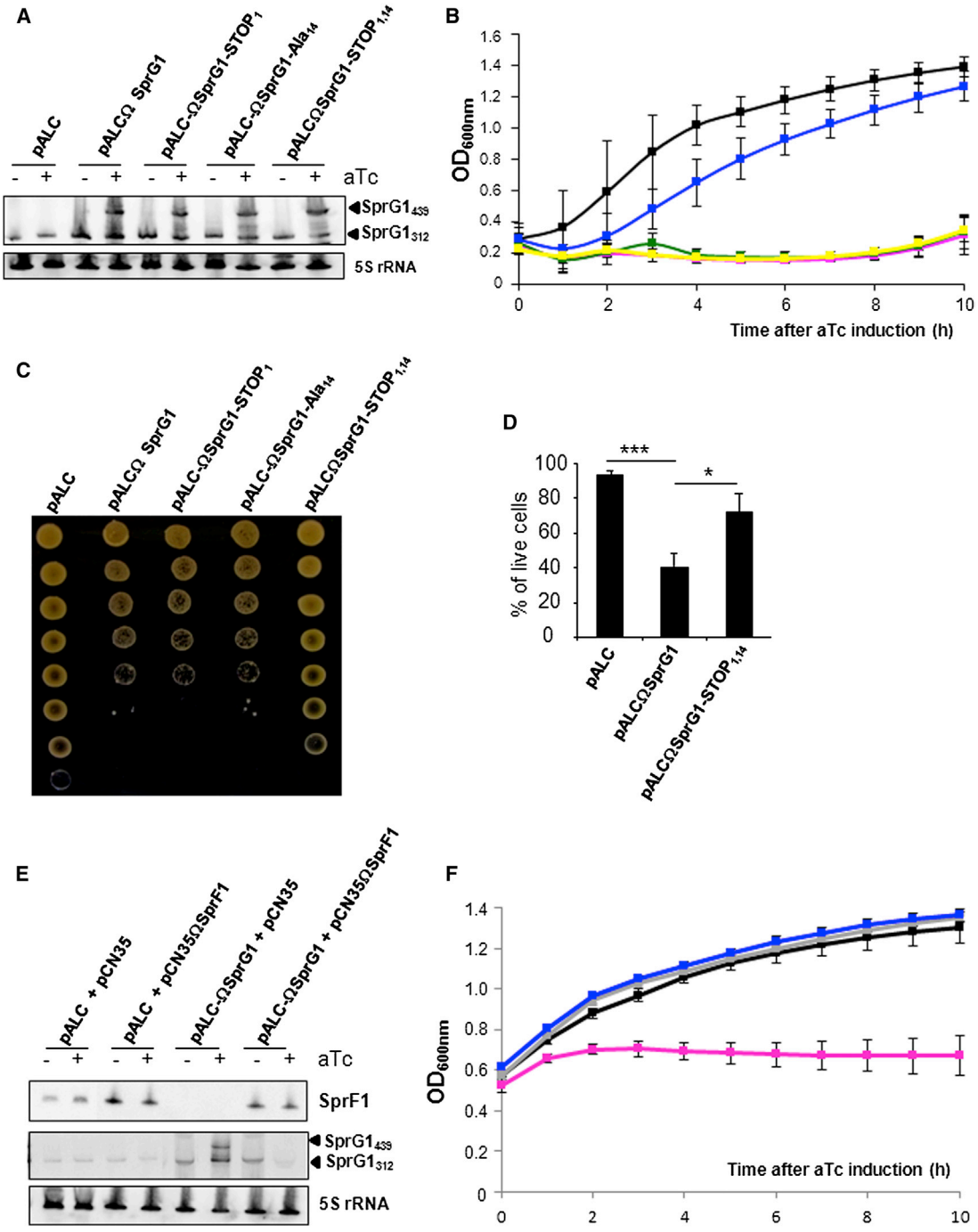


Figure 5. SprG1 Overexpression Triggers *S. aureus* Death Caused by Either Encoded Peptide and Reversed by SprF1

(A) Northern blot analysis of the expression levels of SprG1 and three SprG1 mutants ($STOP_1$, Ala_{14}, $STOP_{1,14}$) after induction by anhydrotetracyline (aTc).

(B and C) (B) Growths in liquid cultures and (C) serial dilutions of exponentially grown N315 bacteria containing pALC (black), pALCΩSprG1 (pink), pALCΩSprG1-$STOP_1$ (green), pALCΩSprG1-Ala_{14} (yellow), and pALCΩSprG1-$STOP_{1,14}$ (blue) RNA after aTc induction. The error bars in (B) indicate variations between three replicates.

(D) Cells counts of fluorescent viable *S. aureus* cells after LIVE/DEAD experiments. Data were expressed as the mean ± SD of four independent experiments. *$p < 0.05$; ***$p < 0.001$.

(E) Northern blot analysis of SprG1 and SprF1 expression levels in isogenic *S. aureus* Newman strains containing pALC and pCN35, pALC and pCN35-SprF1, pALC-SprG1 and pCN35, and pALC-SprG1 and pCN35-SprF1 plasmids. The internal loading control is 5S rRNA.

(F) Growths of Newman strains containing pALC and pCN35 (black), pALC and pCN35-SprF1 (gray), pALC-SprG1 and pCN35 (pink), and pALC-SprG1 and pCN35-SprF1 (blue) plasmids after aTc induction. The error bars indicate variations between three replicates.

DISCUSSION

We report on an unconventional type I TA system expressed by *S. aureus*: the SprG1/SprF1 pair. Type I TA systems consist of a stable toxin whose expression kills the cells or confers growth stasis, regulated by unstable RNA antitoxins. SprG1 is a dual-coding RNA sequence that produces two membranes and secretes toxic peptides by utilizing two internal in-frame initiation codons. The expression of the toxic peptides is negatively regulated by SprF1, a dual-acting *cis*-antisense RNA. Compared to the short (~5 min) half-lives of the majority of the *S. aureus* mRNAs, SprG1 is a stable RNA (Roberts et al., 2006). It is expressed as two transcripts differing at their 5′ ends, which can both produce the two peptides. $SprG1_{312}$ prevails at all times during growth, whereas $SprG1_{439}$ is mainly detected at later stages, suggesting that environmental or metabolic signals modulate promoter usage. In *S. aureus*, the major transcriptional regulator SarA is also transcribed from distinct widely spaced promoters that yield three overlapping transcripts that vary at their 5′ ends (Bayer et al., 1996) for optimal expression regulation.

Figure 6E shows SprG1 regulation by SprF1, SprG1's expression products, and the outcomes of this for the bacterial physiology. SprG1 expression is toxic when stimulated and is tightly protected by the unstable SprF1 antitoxin. SprF1 counteracts SprG1 toxicity at both the RNA and peptide levels by direct interaction in *cis*, which includes the SprG1-overlapping 3′ domain. In type I TA systems, antitoxins either inhibit toxic mRNA translation or promote mRNA degradation (Brantl, 2012). SprF1 performs at both of these regulatory levels, perhaps interfering with SprG1 transcription, triggering its degradation by dedicated RNases (Romilly et al., 2012), or by remodeling SprG1 conformation to prevent toxic peptide translation. Surprisingly, during *S. aureus* growth there is twice as much SprG1 as SprF1. The dual-acting control of SprG1 by SprF1, and perhaps the involvement of other SprF copies, is enough to counteract SprG1 toxicity during growth. The molecular mechanisms of these regulations remain to be elucidated. Dual-acting antitoxin has been detected in *Bacillus subtilis*, with the SR4 antitoxin that controls *bsrG* toxin mRNA decay and translation (Jahn and Brantl, 2013). Moreover, the *lysC* riboswitch also controls translation initiation and mRNA decay in *E. coli* (Caron et al., 2012).

SprG1 is an unconventional type I toxin that produces two toxic peptides from two in-frame initiation codons. Such usage of multiple initiation codons contributes to diversity through expression of several peptide isoforms from a single transcript. In bacteria, dual-coding mRNAs have already been reported. For instance, in *E. coli ClpA* encodes the ATPase subunit of a protease and uses dual translational initiation sites to produce two proteins from a single reading frame (Seol et al., 1994). *E. coli dnaX* expresses two peptides from a single mRNA through ribosomal frameshifting that produces distinct DNA polymerase subunits (Tsuchihashi and Kornberg, 1990). In *S. enterica*, a leader region controls the expression of an ion transporter by responding to proline levels via translation of a proline codon-rich ORF located in that region (Park et al., 2010). Some RNAs also possess dual functions, expressing a protein from an internal ORF as well as regulating mRNA targets (Vanderpool et al., 2011). In *S. aureus*, at least two sRNAs encode a peptide: RNAIII encodes δ-hemolysin (Novick and Geisinger, 2008), and SprA1 encodes a 31 amino acid-long type I toxin whose expression is prevented by an antitoxin (Sayed et al., 2012a). If it controls target gene expression, SprG1 may also belong to this group. Preventing the expression of the longer peptide by mutations increases the translation of the shorter peptide. This suggests a possible conflict between the elongating and initiating ribosomes at the second, downstream AUG codon, because they are only separated by 12 codons. In monocistronic RNAs with two adjacent SD sequences, ribosome binding interferences have been reported (Nishizawa et al., 2010), and this may also occur with SprG1. SD modules located within coding sequences cause pervasive translational pausing (Li et al., 2012), providing opportunities for heterologous peptide expression in bacteria.

Inducing the expression of the two membrane peptides triggers *S. aureus* death, possibly by generating pores. Except for SymE, all known type I toxins are small hydrophobic peptides acting as phage holins, forming pores in cell membranes and impairing ATP synthesis (Brantl, 2012). The TisB toxin produces clusters of anion-selective pores in lipid bilayers (Gurnev et al., 2012). The SprA1 type I toxin, expressed by *S. aureus*, gets inserted into the membranes (Sayed et al., 2012b). In enterobacteria, hydrophobic peptides have other roles, acting as modulators, transporter stabilizers, or sensor kinase regulators (Alix and Blanc-Potard, 2009). The peptides expressed by SprG1 could possess other regulatory functions at the membrane level. Between 5% and 20% of the two membrane peptides, varying according to the time selected during growth, are excreted in the extracellular medium, where they can lyse host cells and competing bacteria with dissimilar strengths. The longer SprG1-encoded peptide is the one primarily expressed and secreted. When compared to its shorter version, it is about three times more active against human erythrocytes and about half as active against competing *S. aureus* cells. The smaller size of a peptide could facilitate its passage through the thick cell wall of Gram-positive bacteria, which could account efficacy toward *S. aureus* but not against Gram-negative bacteria. As opposed to the short peptide, the longer version has a second N-ter cationic domain containing four additional positive charges, and this is probably responsible for its higher cytolytic effect against erythrocytes. In *L. lactis*, *E. coli*, and *B. brevis*, increasing the positive charges of signal peptide sequences improves secretion efficiency (Ravn et al., 2003; Izard et al., 1995; Takimura et al., 1997). Depending on environmental conditions, *S. aureus* may prefer to use the second initiation codon, increasing shorter peptide synthesis when a subset of cells is lysed. This is either an altruistic community behavior or is a way to eradicate bacterial rivals. Growth conditions that mimic the effect of the artificial induction are currently unknown. If produced in sufficient amounts, the membrane peptides investigate a programmed cell death, which could promote the secretion of the peptides able to lyse host cells and competing bacteria and the release of virulence factors to facilitate spread of infections. Their toxicity accounts for their obligatory repression by SprF1 during growth. In *S. aureus*, the phenol-soluble modulins (PSMs) are

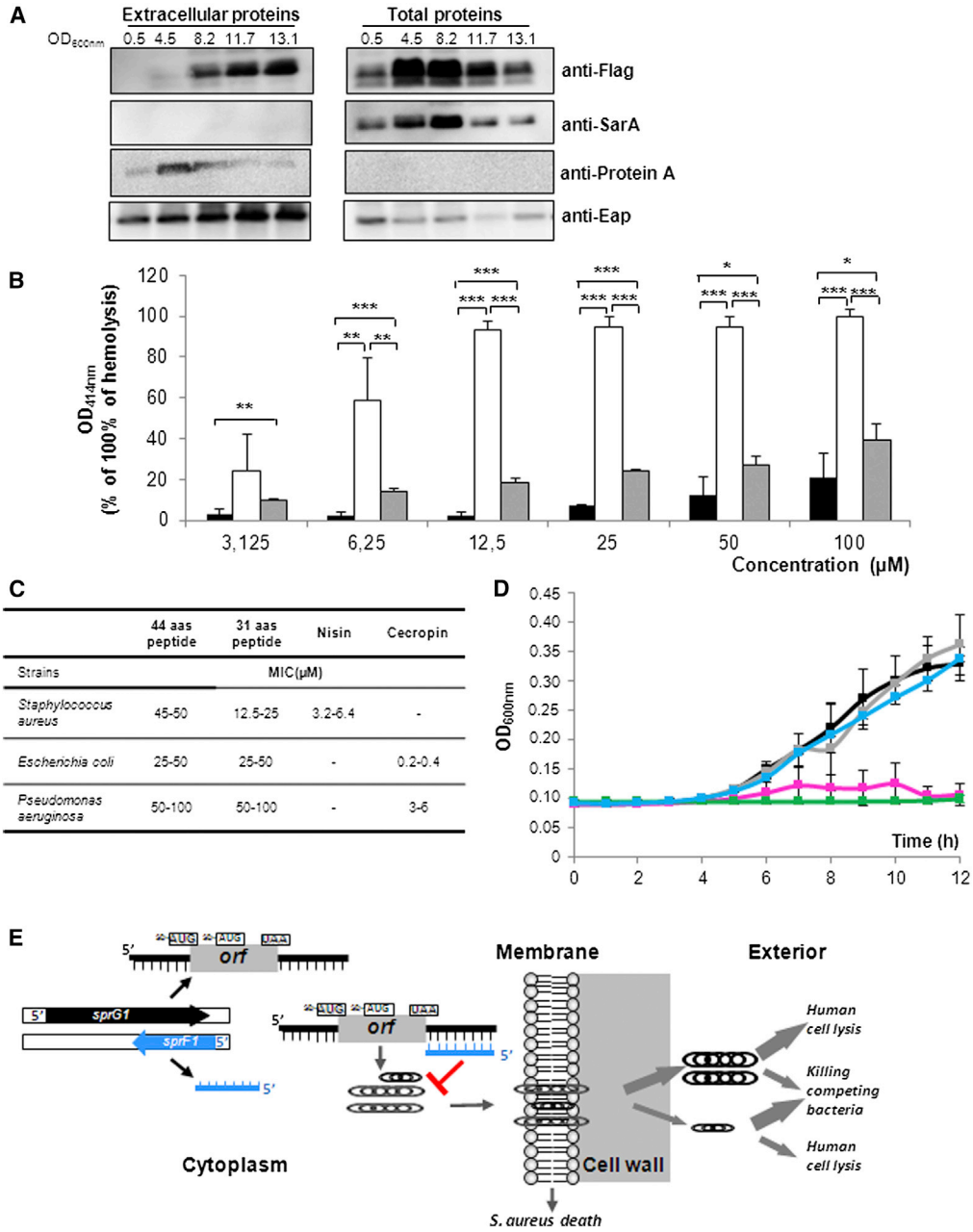


Figure 6. Secreted SprG1 Peptides Inactivate Host Cells and Competing Bacteria Differently: Schematic Diagram of SprG1 Regulation by SprF1 and Roles

(A) Immunoblotting with anti-FLAG to detect the SprG1-encoded flagged peptides during growth of strain N315 pCN35ΩSprG1FLAG in the culture supernatants. The anti-SarA is the control for the total fraction, with anti-Protein A and anti-Eap as controls for the extracellular fractions.

(B) Hemolytic activity of increasing concentrations of the long (white) and short (black) synthetic peptides. The delta-hemolysin produced by RNAIII (gray) is a hemolytic peptide used as a positive control. The results are expressed as a percentage of lysis compared with the 100% lysis of the positive control (1% Triton) and are the mean ± SD of three independent experiments. *$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$.

(C) The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of the two peptides encoded by SprG1 onto Gram-positive and Gram-negative bacteria. Nisin and cecropin were used as positive controls for the Gram-positive and -negative bacteria, respectively.

(D) Membrane extract antibacterial activity in liquid cultures after being purified from strains *ΔsprG1/sprF1* (gray), isogenic pALC-ΩSprG1 (pink), and pALC-ΩSprG1-STOP$_{1,14}$ (blue). The growth of the *S. aureus* N315 strain is measured at 600 nm in the absence (5% isopropanol control, black) or presence of 230 μg/ml of membrane extracts. Nisin (100 μg/ml, green) is used as a positive control. The error bars indicate variations between three replicates.

(E) Working model summarizing the locations, outcomes, and functions of the two SprG1-expressed peptides and their negative regulation (red bar) by *cis*-acting SprF1 (blue). The black arrows represent the gene pair; the short and long peptides expressed by SprG1 (black) are the small and large ovals, respectively. The size of the gray arrows is proportional to the amount of peptides produced, as well as to their functional implications in host cells and bacterial lyses.

proinflammatory peptides also hemolytic and secreted, as is δ-hemolysin (PSM gamma), another peptide that interacts with membranes (Otto, 2010; Cheung et al., 2012). PSMs contribute to *S. aureus* virulence (Wang et al., 2007) and biofilm maturation (Periasamy et al., 2012). The peptides encoded by SprG1 may also influence these biological events.

Type I TA systems are commonly found in multiple copies, consistent with the expression of three to four *sprF* and *sprG* copies in numerous *S. aureus* strains. Because there is significant sequence conservation between these copies (Figure S6), there might be interference and crosstalk between them. This will be addressed in future studies by deleting each copy and addressing its role in toxicity. Interestingly, a comparison of "wild" and laboratory strains of *E. coli* suggested that the number of copies would correspond to the ecological niche occupied by the bacterial host (Fozo, 2012). The biological roles of type I TA systems are unclear, but the systems aid in adaptive stress responses, recovery from starvation, and immunity against predators (Blower et al., 2011), and they can be temperature sensitive (Jahn et al., 2012). Upon oxidative and acidic stress in *S. aureus*, PepA1 type I toxin expression is induced, maybe to ease bacterial escape from phagolysosomes (Sayed et al., 2012b). Persister cells are dormant bacteria tolerant to antibiotics that show increased levels of TA transcripts (Dörr et al., 2010). The SprG1/SprF1 pair might be involved in metabolic dormancy and persister formation. There are differences between other type I TA modules and the SprG1/SprF1 pair, including the fact that two toxic peptides are produced by the pair. Based on their sequences, the additional copies of *sprG* expressed in strain N315 may encode shorter peptides that are 25, 26, or 18 amino acids long for *sprG2*, *sprG3*, and *sprG4*, respectively (Figure S6). These additional copies may have acquired divergent regulatory functions. Global regulation of virulence factor expression by type I TA systems in pathogenic bacteria is an exciting concept, but it remains to be experimentally proved.

In conclusion, the SprG1/SprF1 pair expressed by numerous *S. aureus* clinical isolates is an unconventional type I TA system producing two membrane toxins with different cytolytic activities and that are controlled by a dual-acting RNA antitoxin. In bacterial pathogens, the programmed induction of toxin expression from TA pairs could lead to promising antibacterial strategies (Williams and Hergenrother, 2012) although in this case chemical optimization will be needed to remove human cell toxicity. Detecting the native peptides will provide direct evidence of their expression. The next challenges are to identify under what conditions they are expressed, and what are their functions might be during staphylococcal growth, colonization, and infection.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Strains, Plasmids, and Genetic Manipulations

Strains, plasmids, and primers are listed in Tables S2–S4. Strains were grown at 37°C in BHI buffer (Oxoid). When necessary, chloramphenicol and erythromycin were added at 10 μg/ml. In pCN35ΩSprF1, the SprF1 sequence of 187 nt upstream and 63 nt downstream was amplified from N315 genomic DNA as a 385 bp fragment, with flanking BamHI/EcoRI sites, and inserted into pCN35 (Charpentier et al., 2004). For the flagged SprG1 constructs, amplification from N315 DNA was done of an $SprG1_{439}$ sequence consisting of 149 nt upstream and 4 nt downstream. A 3XFLAG in-frame sequence of the SprG1-encoded peptides followed by a termination codon (Zeghouf et al., 2004) was added, resulting in a 658 bp fragment with flanking BamHI/EcoRI sites. This was then inserted into pCN35. For the flagged SprG1 constructs expressing SprF1, the SprG1 sequence corresponds to a 715 bp fragment of 149 nt upstream and 61 nt downstream. In these constructs, the RNAs were expressed from their endogenous promoters. To generate an anhydrotetracycline (aTc)-inducible construct for SprG1, a fragment containing the $SprG1_{439}$ sequence with +1 and 4 nt downstream was amplified from N315 DNA as a 500 bp fragment with flanking KpnI/EcoRI sites then inserted into pALC (Bateman et al., 2001). To inactivate the *sprF1/SprG1* gene pair, DNA fragments of 1,050 bp upstream and 915 bp downstream of the *sprF1/SprG1* gene were amplified by PCR from N315 DNA and cloned into BamHI/PstI sites of temperature-sensitive plasmid pBT2 (Brückner, 1997). The resulting plasmid pBT2Δ*sprF1/sprG1*was transformed into *S. aureus* strain RN4220 and then into *S. aureus* N315. Mutants were enriched by growth at 42°C. Cells from stationary-phase cultures were plated onto Trypticase Soy Agar (TSA) plates and incubated at 37°C. Colonies were imprinted onto plates supplemented with 10 μg/ml chloramphenicol. Chloramphenicol-sensitive colonies were tested by PCR for the deletion of *sprF1/sprG1* and then confirmed by northern blot (Figure S7).

RNA Extractions, Northern Blots, and Half-Life Determinations

RNA extractions were performed as previously described (Chabelskaya et al., 2010). The DNA probes for RNA detection are listed in Table S4. Total RNAs (10 μg) were separated on denaturing PAGE and transferred onto Zeta-Probe GT membranes (Bio-Rad). Specific 3′-end digoxigenin-labeled probes were hybridized with DIG Easy Hyb solution overnight at 37°C, washed, revealed by an antidigoxigenin antibody-AP (Roche), exposed, and then viewed with the ImageQuant LAS4000 imager (GE Healthcare). Quantifications were performed with the ImageQuant and normalized to 5S rRNA or tmRNA. For the RNA half-life measurements, *S. aureus* was cultured overnight, diluted 1:100, then grown for an additional 5 hr at 37°C to the E phase, and then incubated with 200 μg × ml^{-1} of rifampicin for 1–120 min.

RACE End Mapping

Primers used are shown in Table S4. Total RNAs (5 μg) from *S. aureus* N315 were circularized using T4 RNA Ligase (Promega). After precipitation, the reaction was reverse transcribed by the M-MLV RT (Promega) using primer R1. Two PCR reactions were performed with Taq polymerase (Invitrogen) using R2-F1 and R2-F2 primers, respectively. The PCR products were cloned in pGEM vector (Promega), transformed into *E. coli* DH5α, and sequenced with M13 reverse vector primer using MegaBACE DNA sequencers (Amersham Pharmacia Biotech).

In Vitro Transcription, RNA Labeling, and Translation Assays

All the RNAs used in this study were transcribed from PCR-amplified templates using N315 genomic DNA and forward primers containing a T7 promoter sequence (Table S4). PCR-generated DNA was used as a template for transcription using a MEGAscript T7 kit (Ambion). RNA was gel-purified, eluted, and ethanol precipitated. 5′ end labeling of RNA was performed as previously described (Antal et al., 2005). In vitro translation of [^{35}S]-methionine was performed (Sayed et al., 2012b) using an *E. coli* S30 Extract System for Linear Templates (Promega), following the manufacturer's instructions.

Gel-Shift Assays and Toeprints

Gel retardation assays were performed as previously described (Antal et al., 2005). For the labeled gel shift, 0.4 pmol of labeled SprF1 was incubated with various concentrations (0.1–8 pmol) of unlabeled SprG1. For the unlabeled gel shift, 1 pmol of SprG1 WT, SprG1-5′ORF, or SprG1-3′ was incubated with 0.5 or 1 pmol of SprF1. RNA mixes were incubated in binding buffer (80 mM K-HEPES [pH 7.5], 4 mM $MgCl_2$, 330 mM KCl) for 20 min at 30°C before native gel separation. Toeprint assays were performed (Chabelskaya et al., 2010) using 0.25 pmol of SprG1 and 1 pmol of labeled "SprG1-Toe" primer.

Protein Extractions, Cell Fractionations, and Western Blots

Protein extracts and cell fractionations were performed as previously described (Sayed et al., 2012a, 2012b). Bradford assays were performed on the samples and equal amounts of intracellular, extracellular, cytosolic, and membrane proteins were used for the western blots and antibacterial assays. For the western blots, the samples were separated on 16% Tricine SDS-PAGE and transferred onto Hybond-P PVDF membrane (Amersham). After blocking, membranes were incubated with one of the following primary antibodies: monoclonal mouse anti-FLAG horseradish peroxidase (HRP) (Sigma); polyclonal rabbit anti-*M. luteus* ATPase (Downer et al., 2002); rabbit anti-*S. aureus* SarA (performed in the laboratory); mouse monoclonal anti-*S. aureus* Protein A (Sigma); or sheep polyclonal anti-*S. aureus* Eap (Haggar et al., 2005). After incubation with HRP-conjugated secondary antibodies, the membranes were revealed using the ECL Plus Western Blotting Detection kit (Amersham) and scanned with the LAS4000 imager. For the antibacterial assays, the membrane extracts were dissolved in lysis buffer with 0.05% Triton X-100, EDTA-free cocktail protease inhibitor, and 25% isopropanol, and concentrated between 3 to 10 kDa with Centricon and Amicon Centrifugal Filters (Millipore), following the manufacturer's instructions.

SprG1 Induction, Growth, and Cell Death Experiments

Strains containing the relevant plasmids were grown in BHI for 2 hr 15 min at 37°C to mid-E phase (OD_{600nm}:1.5) and then incubated with 1 μM of aTc inducer. For the kinetics, OD_{600nm} was measured at each time point. To determine the effects of SprG1 WT and mutant inductions, cultures were prepared by 2-fold serial dilutions of E phase cultures on BHI plates containing 1 μM aTc and then incubated for 24 hr at 37°C. For the cell death experiments, cultures were incubated for 1 hr, washed with PBS, and then stained with a LIVE/DEAD kit (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Pictures of fluorescence-labeled cells were captured with a DM RXA2 microscope (Leica) and a CoolSNAP HQ charge-coupled device camera (Photometrics) using MetaVue software (Molecular Devices).

Hemolytic and Antibacterial Assays

The two peptides were synthesized (UMR 6226) at >99% purity as verified by HPLC and MALDI-TOF and dissolved into 50% isopropanol. For the hemolytic assays, human red blood cells (Etablissement Français du Sang) were washed three times and diluted to 5% in PBS. Peptide dilutions (75 μl) resulting from serial halving in PBS were added into a V-bottomed 96-well plate with 75 μl of 5% red blood cells. After 2 hr incubation at 37°C, the plate was centrifuged 15 min at 1,400 rpm, and the supernatant was transferred onto a new plate. The absorbance of the released hemoglobin was measured at 414 nm. Positive and negative controls were performed with 1% Triton X-100 and the same amount of the vehicle (2.5% isopropanol), respectively. The results were expressed as a percentage of lysis as compared to the positive control (100%). Antimicrobial activity was measured as previously described (Jorgensen and Ferraro, 2009) against *S. aureus* (N315) and against two other Gram-negative bacteria often associated with *S. aureus* infections, *Escherichia coli* (K12), and *Pseudomonas aeruginosa*. The strains were grown in Mueller-Hinton broth until 10^8 CFU/ml (OD_{600nm}:0.5). They were then diluted to obtain between 10^4 and 10^5 CFU per well of a flat-bottomed 96-well plate and incubated with peptide dilutions resulting from serial halving in PBS buffer. Cultures were grown for 20 hr with vigorous shaking at 37°C, and the bacterial growth was evaluated by measuring the absorbance of the bacterial culture at 600 nm using a microplate reader (BioTek). Negative controls were performed with 0.3% isopropanol. Positive controls were performed with either pure nisin or cecropin for Gram-positive and -negative bacteria, respectively. To evaluate the biological activity of membrane extracts purified from strains *ΔsprG1/sprF1*, isogenic pALC-ΩSprG1, and pALC-ΩSprG1-$STOP_{1,14}$, *S. aureus* strain N315 was cultivated in the absence (5% isopropanol as a control) or presence of 230 μg/ml membrane extracts. Nisin (100 μg/ml) was used as a positive control.

Statistical Analysis

Data are expressed as mean ± SD of at least three to four independent experiments. Significant differences were evaluated using the t test. Standard deviations: $^*p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$; and $^{***}p < 0.001$ were considered to be statistically significant.

ACCESSION NUMBERS

The SprF1, $SprG1_{312}$, and $SprG1_{439}$ RNAs have been deposited to the GenBank under accession numbers KJ625226, KJ625227, and KJ625228, respectively. The two peptides encoded and expressed by the $SprG1_{312}$ and $SprG1_{439}$ RNAs were deposited to the Antimicrobial Peptide Database and registered under accession numbers AP2360 and AP2361.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes seven figures and four tables and can be found with this article online at http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.012.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.L.P.-M. and R.B. prepared samples. M.L.P.-M. and B.F. designed the experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We are thankful to Drs. M. Baudy-Floc'h and A. Mosbah for peptide synthesis and to Drs. S. Chabelskaya and M. Hallier for manuscript help. We thank Prof. J.I. Flock (Carolinska Institute, Sweden) for the sheep anti-*S. aureus* Eap antibodies and Prof. T.J. Foster (Dublin, Ireland) for the rabbit anti-*M. luteus* ATPase antibodies. This study was supported by the Agence Nationale pour la Recherche (grant ANR-09-MIEN-030-01 to B.F.) and the Institut national de la santé et de la recherche médicale.

Received: January 11, 2013
Revised: February 5, 2014
Accepted: March 5, 2014
Published: April 3, 2014

REFERENCES

Alix, E., and Blanc-Potard, A.B. (2009). Hydrophobic peptides: novel regulators within bacterial membrane. Mol. Microbiol. *72*, 5–11.

Anstead, G.M., Cadena, J., and Javeri, H. (2014). Treatment of infections due to resistant Staphylococcus aureus. Methods Mol. Biol. *1085*, 259–309.

Antal, M., Bordeau, V., Douchin, V., and Felden, B. (2005). A small bacterial RNA regulates a putative ABC transporter. J. Biol. Chem. *280*, 7901–7908.

Bateman, B.T., Donegan, N.P., Jarry, T.M., Palma, M., and Cheung, A.L. (2001). Evaluation of a tetracycline-inducible promoter in Staphylococcus aureus in vitro and in vivo and its application in demonstrating the role of sigB in microcolony formation. Infect. Immun. *69*, 7851–7857.

Bayer, M.G., Heinrichs, J.H., and Cheung, A.L. (1996). The molecular architecture of the sar locus in Staphylococcus aureus. J. Bacteriol. *178*, 4563–4570.

Blower, T.R., Salmond, G.P., and Luisi, B.F. (2011). Balancing at survival's edge: the structure and adaptive benefits of prokaryotic toxin-antitoxin partners. Curr. Opin. Struct. Biol. *21*, 109–118.

Brantl, S. (2012). Bacterial type I toxin-antitoxin systems. RNA Biol. *9*, 1488–1490.

Brückner, R. (1997). Gene replacement in Staphylococcus carnosus and Staphylococcus xylosus. FEMS Microbiol. Lett. *151*, 1–8.

Caldelari, I., Chao, Y., Romby, P., and Vogel, J. (2013). RNA-mediated regulation in pathogenic bacteria. Cold Spring Harb. Perspect. Med. *3*, a010298.

Caron, M.P., Bastet, L., Lussier, A., Simoneau-Roy, M., Massé, E., and Lafontaine, D.A. (2012). Dual-acting riboswitch control of translation initiation and mRNA decay. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *109*, E3444–E3453.

Chabelskaya, S., Gaillot, O., and Felden, B. (2010). A Staphylococcus aureus small RNA is required for bacterial virulence and regulates the expression of an immune-evasion molecule. PLoS Pathog. *6*, e1000927.

Charpentier, E., Anton, A.I., Barry, P., Alfonso, B., Fang, Y., and Novick, R.P. (2004). Novel cassette-based shuttle vector system for gram-positive bacteria. Appl. Environ. Microbiol. *70*, 6076–6085.

Cheung, G.Y., Duong, A.C., and Otto, M. (2012). Direct and synergistic hemolysis caused by Staphylococcus phenol-soluble modulins: implications for diagnosis and pathogenesis. Microbes Infect. *14*, 380–386.

Dörr, T., Vulić, M., and Lewis, K. (2010). Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in Escherichia coli. PLoS Biol. *8*, e1000317.

Downer, R., Roche, F., Park, P.W., Mecham, R.P., and Foster, T.J. (2002). The elastin-binding protein of Staphylococcus aureus (EbpS) is expressed at the cell surface as an integral membrane protein and not as a cell wall-associated protein. J. Biol. Chem. *277*, 243–250.

Fozo, E.M. (2012). New type I toxin-antitoxin families from "wild" and laboratory strains of E. coli: Ibs-Sib, ShoB-OhsC and Zor-Orz. RNA Biol. *9*, 1504–1512.

Fozo, E.M., Makarova, K.S., Shabalina, S.A., Yutin, N., Koonin, E.V., and Storz, G. (2010). Abundance of type I toxin-antitoxin systems in bacteria: searches for new candidates and discovery of novel families. Nucleic Acids Res. *38*, 3743–3759.

Guillet, J., Hallier, M., and Felden, B. (2013). Emerging functions for the Staphylococcus aureus RNome. PLoS Pathog. *9*, e1003767.

Gurnev, P.A., Ortenberg, R., Dörr, T., Lewis, K., and Bezrukov, S.M. (2012). Persister-promoting bacterial toxin TisB produces anion-selective pores in planar lipid bilayers. FEBS Lett. *586*, 2529–2534.

Haggar, A., Shannon, O., Norrby-Teglund, A., and Flock, J.I. (2005). Dual effects of extracellular adherence protein from Staphylococcus aureus on peripheral blood mononuclear cells. J. Infect. Dis. *15*, 210–217.

Hancock, R.E., and Rozek, A. (2002). Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. FEMS Microbiol. Lett. *206*, 143–149.

Holcík, M., and Iyer, V.N. (1997). Conditionally lethal genes associated with bacterial plasmids. Microbiology *143*, 3403–3416.

Izard, J.W., Doughty, M.B., and Kendall, D.A. (1995). Physical and conformational properties of synthetic idealized signal sequences parallel their biological function. Biochemistry *34*, 9904–9912.

Jahn, N., and Brantl, S. (2013). One antitoxin—two functions: SR4 controls toxin mRNA decay and translation. Nucleic Acids Res. *41*, 9870–9880.

Jahn, N., Preis, H., Wiedemann, C., and Brantl, S. (2012). BsrG/SR4 from Bacillus subtilis—the first temperature-dependent type I toxin-antitoxin system. Mol. Microbiol. *83*, 579–598.

Jorgensen, J.H., and Ferraro, M.J. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. Clin. Infect. Dis. *49*, 1749–1755.

Li, G.W., Oh, E., and Weissman, J.S. (2012). The anti-Shine-Dalgarno sequence drives translational pausing and codon choice in bacteria. Nature *484*, 538–541.

Mann, B., van Opijnen, T., Wang, J., Obert, C., Wang, Y.D., Carter, R., McGoldrick, D.J., Ridout, G., Camilli, A., Tuomanen, E.I., and Rosch, J.W. (2012). Control of virulence by small RNAs in Streptococcus pneumoniae. PLoS Pathog. *8*, e1002788.

Mellin, J.R., and Cossart, P. (2012). The non-coding RNA world of the bacterial pathogen Listeria monocytogenes. RNA Biol. *9*, 372–378.

Nishizawa, A., Nakayama, M., Uemura, T., Fukuda, Y., and Kimura, S. (2010). Ribosome-binding site interference caused by Shine-Dalgarno-like nucleotide sequences in Escherichia coli cells. J. Biochem. *147*, 433–443.

Novick, R.P., and Geisinger, E. (2008). Quorum sensing in staphylococci. Annu. Rev. Genet. *42*, 541–564.

Otto, M. (2010). Basis of virulence in community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Annu. Rev. Microbiol. *64*, 143–162.

Park, S.Y., Cromie, M.J., Lee, E.J., and Groisman, E.A. (2010). A bacterial mRNA leader that employs different mechanisms to sense disparate intracellular signals. Cell *142*, 737–748.

Periasamy, S., Joo, H.S., Duong, A.C., Bach, T.H., Tan, V.Y., Chatterjee, S.S., Cheung, G.Y., and Otto, M. (2012). How Staphylococcus aureus biofilms develop their characteristic structure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *109*, 1281–1286.

Pichon, C., and Felden, B. (2005). Small RNA genes expressed from Staphylococcus aureus genomic and pathogenicity islands with specific expression among pathogenic strains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *102*, 14249–14254.

Ravn, P., Arnau, J., Madsen, S.M., Vrang, A., and Israelsen, H. (2003). Optimization of signal peptide SP310 for heterologous protein production in Lactococcus lactis. Microbiology *149*, 2193–2201.

Roberts, C., Anderson, K.L., Murphy, E., Projan, S.J., Mounts, W., Hurlburt, B., Smeltzer, M., Overbeek, R., Disz, T., and Dunman, P.M. (2006). Characterizing the effect of the Staphylococcus aureus virulence factor regulator, SarA, on log-phase mRNA half-lives. J. Bacteriol. *188*, 2593–2603.

Romilly, C., Chevalier, C., Marzi, S., Masquida, B., Geissmann, T., Vandenesch, F., Westhof, E., and Romby, P. (2012). Loop-loop interactions involved in antisense regulation are processed by the endoribonuclease III in Staphylococcus aureus. RNA Biol. *9*, 1461–1472.

Sayed, N., Jousselin, A., and Felden, B. (2012a). A cis-antisense RNA acts in trans in Staphylococcus aureus to control translation of a human cytolytic peptide. Nat. Struct. Mol. Biol. *19*, 105–112.

Sayed, N., Nonin-Lecomte, S., Réty, S., and Felden, B. (2012b). Functional and structural insights of a Staphylococcus aureus apoptotic-like membrane peptide from a toxin-antitoxin module. J. Biol. Chem. *287*, 43454–43463.

Seol, J.H., Yoo, S.J., Kim, K.I., Kang, M.S., Ha, D.B., and Chung, C.H. (1994). The 65-kDa protein derived from the internal translational initiation site of the clpA gene inhibits the ATP-dependent protease Ti in Escherichia coli. J. Biol. Chem. *269*, 29468–29473.

Storz, G., Vogel, J., and Wassarman, K.M. (2011). Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. Mol. Cell *43*, 880–891.

Takimura, Y., Kato, M., Ohta, T., Yamagata, H., and Udaka, S. (1997). Secretion of human interleukin-2 in biologically active form by Bacillus brevis directly into culture medium. Biosci. Biotechnol. Biochem. *61*, 1858–1861.

Tomasini, A., François, P., Howden, B.P., Fechter, P., Romby, P., and Caldelari, I. (2014). The importance of regulatory RNAs in Staphylococcus aureus. Infect. Genet. Evol. *21C*, 616–626.

Tsuchihashi, Z., and Kornberg, A. (1990). Translational frameshifting generates the gamma subunit of DNA polymerase III holoenzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *87*, 2516–2520.

Van Melderen, L. (2010). Toxin-antitoxin systems: why so many, what for? Curr. Opin. Microbiol. *13*, 781–785.

Vanderpool, C.K., Balasubramanian, D., and Lloyd, C.R. (2011). Dual-function RNA regulators in bacteria. Biochimie *93*, 1943–1949.

Wang, R., Braughton, K.R., Kretschmer, D., Bach, T.H., Queck, S.Y., Li, M., Kennedy, A.D., Dorward, D.W., Klebanoff, S.J., Peschel, A., et al. (2007). Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. Nat. Med. *13*, 1510–1514.

Williams, J.J., and Hergenrother, P.J. (2012). Artificial activation of toxin-antitoxin systems as an antibacterial strategy. Trends Microbiol. *20*, 291–298.

Zecconi, A., and Scali, F. (2013). Staphylococcus aureus virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. Immunol. Lett. *150*, 12–22.

Zeghouf, M., Li, J., Butland, G., Borkowska, A., Canadien, V., Richards, D., Beattie, B., Emili, A., and Greenblatt, J.F. (2004). Sequential Peptide Affinity (SPA) system for the identification of mammalian and bacterial protein complexes. J. Proteome Res. *3*, 463–468.

2. Identification *in vivo* de l'expression des peptides natifs

Afin d'analyser le profil d'expression des peptides $PepG1_{31}$ et $PepG1_{44}$ au cours de la croissance, nous avons utilisé une souche de *S. aureus* surexprimant les peptides flaggés en C-terminal. Cependant, l'utilisation de ce Flag peut entraîner un biais quant à l'expression, la stabilité, la localisation et la fonction biologique des peptides. Nous avons donc souhaité démontrer *in vivo* l'expression des peptides natifs, non flaggés en espérant également pouvoir mettre en évidence d'éventuelles modifications post-traductionnelles. Pour cela, nous avons cultivé en milieu riche et jusqu'en phase exponentielle de croissance la souche de *S. aureus* N315 sauvage surexprimant *sprG1* et donc les deux peptides natifs à l'aide du plasmide inductible à l'anhydrotétracycline, pALC (Tashiro *et al.*, 1999) et la souche délétée du STA *sprG1*/SprF1 comme contrôle négatif. Nous avons ensuite extrait les membranes bactériennes puis lyophilisé avant de les faire analyser par spectrométrie de masse par l'équipe du CRMPO (Centre Régional de Mesures Physiques de l'Ouest) de Rennes.

Différentes approches ont été utilisées : l'analyse directe des échantillons par MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time-Of-Flight mass spectrometry), technique basée sur une ionisation douce et adaptée aux biomolécules ; ainsi que l'analyse par chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse (LC-MS), ou encore par LC-MS/MS (combinaison de deux spectromètres de masse). La LC-MS/MS est particulièrement adaptée à l'identification de peptides/protéines présents dans un mélange complexe Dans le cas de la LC-MS et LC-MS/MS, différentes sources d'ionisation ont été appliquées : l'ESI (Ionisation Electrospray) et le nanoESI. Plusieurs injections réalisées en LC-MS et LC-MS/MS montrent une reproductibilité du profil chromatographique. De plus, le peptide $PepG1_{44}$ synthétique pur, utilisé comme contrôle, a pu être mis en évidence en ESI et en nanoESI, validant la technique (**Annexe 1A**). Nous avons ensuite réussi à limiter suffisamment la contamination en polyéthylène glycol, très fortement ionisé et apporté par les matériaux plastiques utilisés au cours de la préparation des extraits. En revanche, nous n'avons pas pu interpréter les spectres obtenus à partir de ces extraits (**Annexe 1B**). En effet, la présence presque exclusive d'espèces monochargées n'a pas permis le traitement des données par le logiciel adéquat, qui se base essentiellement sur l'exploitation de peptides di ou trichargés issus d'une digestion. Aussi, la concentration des peptides, $PepG1_{31}$ et $PepG1_{44}$, semble très faible par rapport à la matrice totale. Finalement, même après avoir optimisé notre rendement tout en limitant l'apport de contaminants dans les

échantillons, nous n'avons pas pu mettre en évidence la présence de nos peptides natifs *in vivo* dans les extraits membranaires de *S. aureus*.

3. Identification de la fonction biologique du STA *sprG1*/SprF1

Afin de déterminer la fonction biologique du STA de type I, *sprG1*/SprF1, nous avons construit des souches présentant des niveaux d'expression différents de *sprG1* et SprF1. Nous avons utilisé une souche de délétion de *sprG1*/SprF1 (ΔΔ) obtenue par recombinaison homologue à partir de la souche N315 de *S. aureus* (WT). Cette souche de délétion a été complémentée ou non avec les plasmides pCN38 à faible taux de copies ou pCN35 à fort taux de copies (Charpentier *et al.*, 2004) surexprimant SprF1 seul (pCN38Ω*sprF1 ;* pCN35Ω*sprF1*) ou le STA complet *sprG1*/SprF1 (pCN38Ω*sprG1*/*sprF1 ;* pCN35Ω*sprG1*/*sprF1*) sous le contrôle de leur promoteur endogène. Nous avons étudié l'effet de la délétion sur la résistance aux antibiotiques et la formation de biofilms.

Ensuite, nous avons cherché à mettre en évidence l'impact de différentes conditions de stress rencontrés par *S. aureus* au cours de l'infection de l'hôte sur la croissance de *S. aureus* et sur l'expression des ARN *sprG1* et SprF1 ainsi que des peptides codés par *sprG1*. Pour ces expériences, nous avons utilisé la souche N315 sauvage et la souche délétée du STA complémentée par les plasmides à fort taux de copies pCN35 surexprimant les peptides flaggés en présence ou en absence de SprF1 (pCN35Ω*sprG1-Flag* ; pCN35Ω*sprG1-Flag*/*sprF1)* et sous le contrôle de leur promoteur endogène. L'ensemble des amorces utilisées figures dans le tableau en **Annexe 2**.

a. Etude de l'implication de *sprG1*/SprF1 dans la résistance aux antibiotiques de *S. aureus*

Plusieurs STA ont récemment été directement impliqués dans la résistance aux antibiotiques. Chez *E. coli*, la délétion du STA de type I *ralA*/RalR présente une sensibilité accrue à la fosfomycine, un antibiotique qui inhibe la synthèse du peptidoglycane (Guo *et al.*, 2014). La délétion du STA de type II *mazE*/*mazF* altère la sensibilité de *S. aureus* aux antibiotiques de la famille des β-lactamines, ciblant également la paroi bactérienne (Schureck *et al.*, 2015). A l'inverse, la délétion du STA de type II *pezAT* favorise la résistance de *Streptococcus pneumoniae* aux β-lactamines puisque la biosynthèse de la paroi est la

cible de la toxine PezT (Chan & Espinosa, 2016). De plus, certains STA sont impliqués dans le maintien de plasmides à l'intérieur de la bactérie par PSK ou d'EGM à l'intérieur du chromosome bactérien (Gerdes *et al.*, 1986b, Hernandez-Arriaga *et al.*, 2014) suggérant qu'ils contribuent à la dispersion des gènes de résistance localisés sur ces EGM (Hernandez-Arriaga *et al.*, 2014). Ainsi, le fait que le STA *sprG1*/SprF1 soit présent sur un EGM suggère son implication dans la résistance aux antibiotiques de *S. aureus*.

Pour mettre en évidence le rôle putatif de notre système dans la résistance aux antibiotiques, nous avons réalisé un antibiogramme par diffusion sur milieu gélosé Muëller-Hinton sur 10 antibiotiques différents, ainsi qu'une galerie API ATB Staph (Biomérieux). Pour ces deux approches, nous avons travaillé sur un inoculum correspondant au standard de turbidité McFarland 2 dilué au 1/5. Après une nuit à 37°C, les résultats ont été analysés par la mesure des diamètres d'inhibition de croissance, qui témoignent de la sensibilité des souches à chacun des antibiotiques, pour l'antibiogramme par diffusion et par la lecture de la turbidité pour la galerie API ATB Staph. Chaque résultat obtenu est ensuite comparé entre les différentes souches. Quelque soit la technique utilisée, les résultats ne montrent pas de différence de résistance significative entre les souches étudiées (**Figure 40**). Le STA *sprG1*/SprF1 ne semble donc pas être impliqué dans la résistance de *S. aureus* aux antibiotiques.

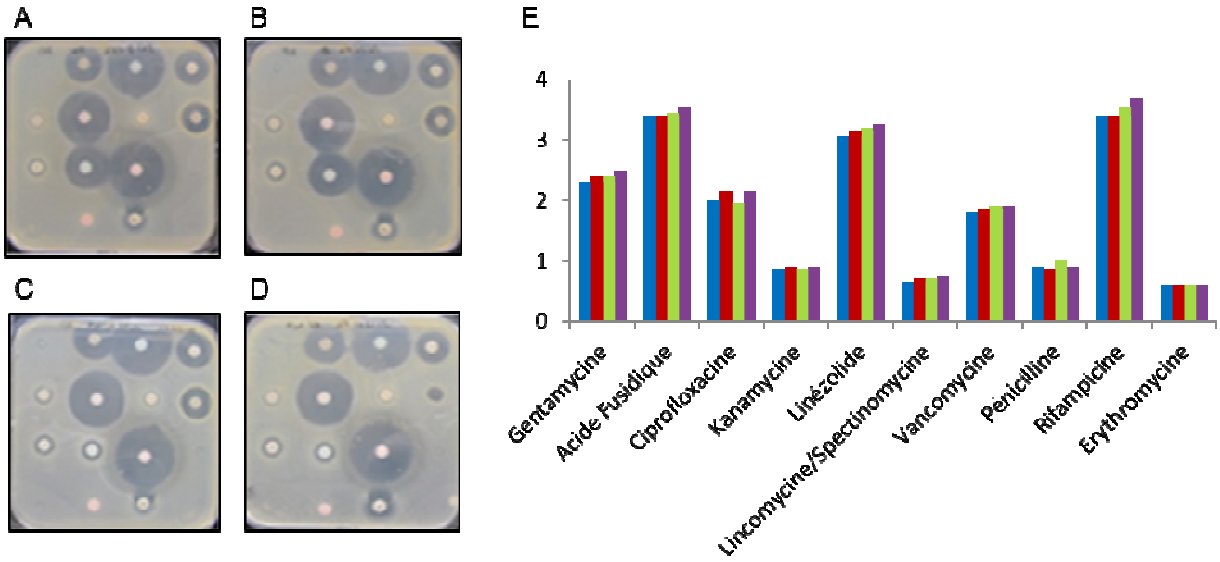


Figure 40 : Analyse du profil de résistance aux antibiotiques de *S. aureus* N315 en fonction du niveau d'expression du STA *sprG1*/SprF1. (A-D) Photos des antibiogrammes des souches (A) WT (B) ΔΔ (C) ΔΔ+pCN38 (D) ΔΔ+pCN38Ω*sprG1*/SprF1. (E) Diamètres moyens correspondant aux zones d'inhibition de croissance bactérienne par les antibiotiques entre les différentes souches WT (bleu), ΔΔ (rouge), ΔΔ+pCN38 (vert), ΔΔ+pCN38Ω*sprG1*/SprF1 (violet). Représentation des moyennes de trois expériences indépendantes.

b. Etude de l'implication de *sprG1*/SprF1 dans la formation de biofilms chez *S. aureus*

Le rôle des STA dans la formation de biofilm a été mis en évidence pour la première fois chez *E. coli* avec le STA de type II MqsR/MqsA (Ren, *et al.* 2004) (Soo & Wood, 2013). Plus tard, cinq autres STA ont été impliqués dans le développement de biofilm bactérien : MazF/MazE, RelE/RelB, ChpB, YoeB/YefM, et YafQ/DinJ. Ensemble, ils favoriseraient initialement (à 8h), puis inhiberaient (à 24h) la formation de biofilm en favorisant sa dispersion (Kim *et al.*, 2009). De plus, récemment, une étude a également mis en évidence le rôle du STA de type I *txpA*/RatA dans la formation de biofilms chez *B. subtilis* (Bloom-Ackermann *et al.*, 2016).

Pour déterminer l'impact putatif de *sprG1*/SprF1 sur la formation de biofilm chez *S. aureus*, nous avons réalisé une quantification du biofilm statique en microplaque de poly(chlorure de vinyle) (PVC pour Poly(Vinyl Chloride)) par coloration des cellules au crystal violet (O'Toole & Kolter, 1998). Les bactéries sont cultivées dans du TSB supplémenté par 0,5% de glucose, pendant 24h sans agitation à 37°C afin de favoriser la formation de biofilm. Les expériences sont réalisées en présence ou non de sérum humain. L'utilisation du sérum permet d'induire la formation de biofilms notamment via l'intermédiaire des protéines Eap (Thompson *et al.*, 2010). Chaque condition a été réalisée en triplicat avec un contrôle négatif contenant 200 µl de milieu seul et un contrôle positif, la souche *S. aureus* RN4220.

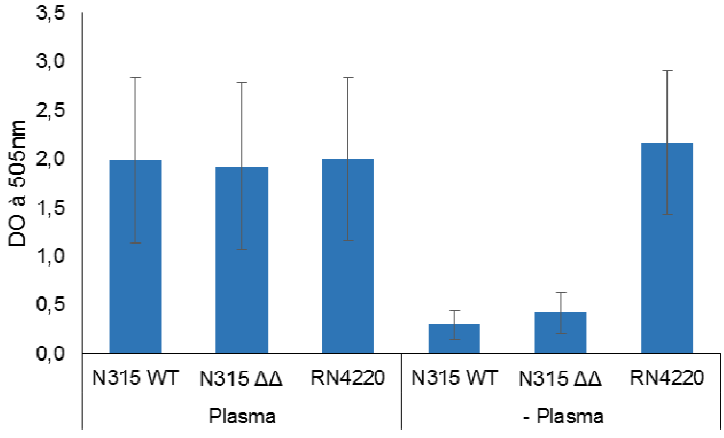


Figure 41 : Etude de la délétion du STA *sprG1*/SprF1 sur la formation de biofilms par *S. aureus*. Les bactéries fixées au support de poly(chlorure de vinyle) appartenant aux souches *S. aureus* N315 WT, N315 ΔΔ et RN4220, cultivées 24h sans agitation dans le milieu TSB supplémenté par 0,5% de glucose et en présence ou non de plasma humain, ont été colorées au cristal violet. La quantité de cristal violet élué, proportionnelle à la quantité de cellules fixées et donc de biofilm produit, est quantifiée à DO_{505} par un lecteur de plaque Bioteck. Les résultats sont exprimés en moyennes ± écart-type de trois expériences indépendantes.

Nous avons mis en évidence une différence significative de quantité de cellules agrégées, assimilée à la production de biofilm (O'Toole & Kolter, 1998), entre les souches N315 et RN4220 en absence de plasma, résultat attendu et validant notre méthode (**Figure 41**). En revanche, nous n'observons pas de différence significative dans la quantité de cellules fixées au support de PVC entre les souches N315 WT et N315Δ*sprG1*/*sprF1* en présence ou en absence de plasma humain. Ces résultats ne nous permettent pas de conclure quant à l'implication du STA *sprG1*/SprF1 dans la formation de biofilm par *S. aureus*.

c. Etude de l'implication de *sprG1*/SprF1 dans l'adaptation de *S. aureus* à différents stress environnementaux

Les STA de type I peuvent également être impliqués dans la réponse de leur bactérie hôte à différents stress environnementaux, notamment ceux rencontrés au cours de l'infection. La présence ectopique du locus *hok*/*sok*, c'est-à-dire au niveau d'un plasmide exogène, favorise l'adaptation de *E. coli* au stress de température (42°C) et à la présence de différents antibiotiques. L'étude montre également que *hok*/*sok* est capable de compléter ou de se substituer à un mécanisme SOS fonctionnel ou défectueux, respectivement (Chukwudi & Good, 2015). Chez *S. aureus,* la croissance d'une souche de surexpression de *sprA1*/$SprA1_{AS}$ en présence de différents stress montrent que les stress acide et oxydant inhibent l'expression de l'antitoxine favorisant ainsi l'expression de la toxine au niveau peptidique (Sayed *et al.*, 2012b).

Nous avons testé l'impact des stress rencontrés par le pathogène au cours de l'infection, c'est-à-dire les stress oxydant, osmotique, acide et nutritif, sur l'expression des deux ARN *sprG1* et SprF1. Les conditions de stress appliquées sont inspirées de protocoles issus de la littérature (Anderson *et al.*, 2006, Chang & Petrash, 2008, Geissmann *et al.*, 2009). Pour l'étude des stress oxydant, osmotique et acide, les bactéries sont cultivées en

milieu TSB jusqu'à atteindre une DO_{600} de 1 correspondant au début de la phase exponentielle de croissance où les stress oxydant (10 mM final d'H_2O_2), osmotique (0,5 M final de NaCl) et acide (pH 4,5) sont appliqués pendant 15 min à 37°C. Pour l'étude de la carence nutritive, les souches, issues d'une même pré-culture en milieu TSB, sont cultivées jusqu'à la DO_{600} de 1 en parallèle dans le milieu riche (-) et le milieu RPMI carencé en nutriments (Carence). Les ARN sont ensuite collectés par extraction phénolique pour suivre l'expression de *sprG1* et SprF1 par Northern blot. Les protéines sont également extraites pour suivre l'expression des peptides $PepG1_{31}$ et $PepG1_{44}$ flaggés par Western Blot.

Nous avons montré une augmentation de l'expression de *sprG1* et SprF1 lors du stress hyperosmotique (NaCl). En revanche, nous n'observons pas d'augmentation significative de l'expression de $PepG1_{44}$ et $PepG1_{31}$ (**Figures 42A et 42C**). Par contre, de façon intéressante, nous avons observé une augmentation significative de l'expression de *sprG1* et des peptides $PepG1_{31}$ et $PepG1_{44}$ de l'ordre de deux fois lors d'une carence nutritive (**Figures 42B et 42D**).

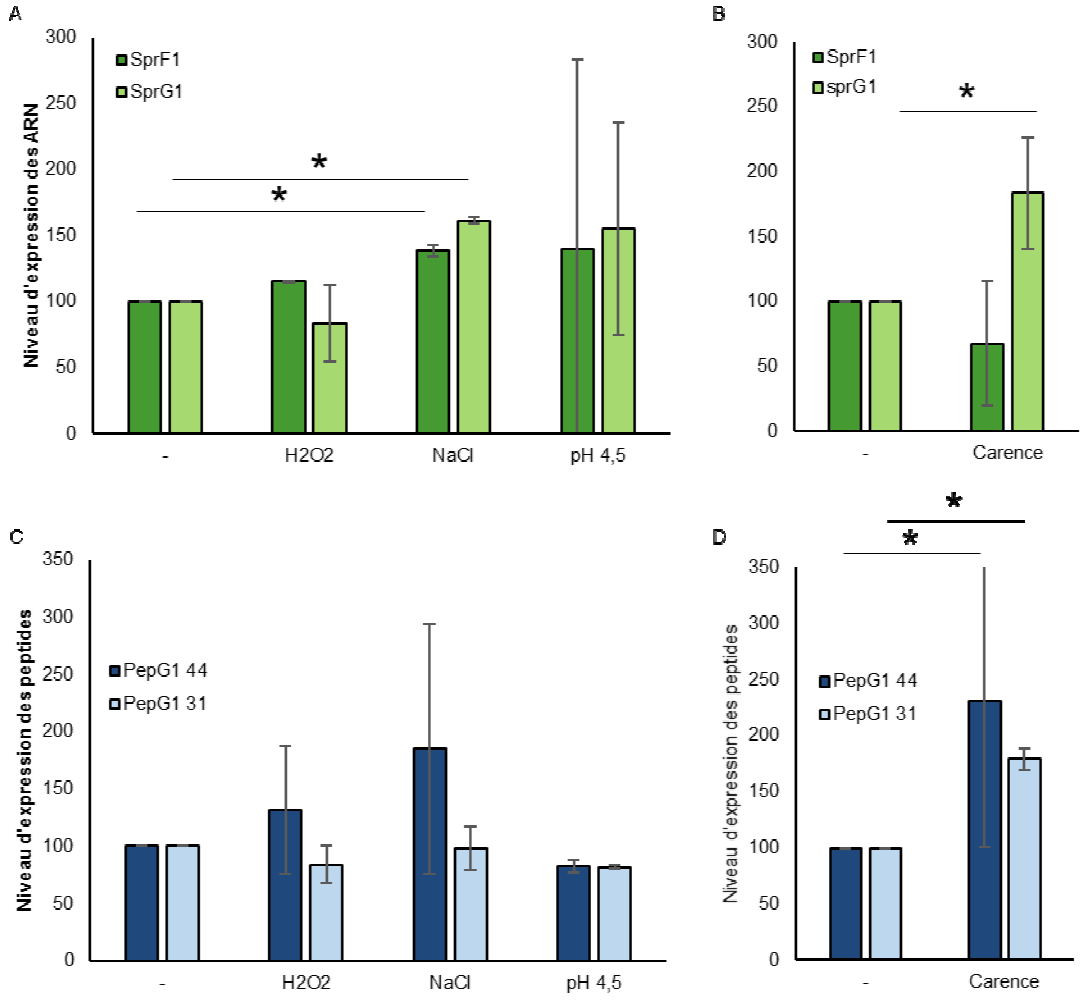


Figure 42 : Influence des stress environnementaux sur l'expression de SprF1 et sprG1 et sur l'expression de PepG144 et PepG131. (A, C) Les souches N315 WT (A) et ΔΔ+pCN35ΩsprG1-Flag (C) sont cultivées en milieu TSB jusqu'à atteindre une DO600 de 1 en présence ou non de 10 mM final d'H2O2, 0,5 M final de NaCl et à pH acide de 4,5 pendant 15 minutes à 37°C. (B, D) Les souches N315 WT (B) et Δ+pCN35ΩsprG1-Flag (D) sont cultivées en milieu TSB ou en milieu RPMI (Carence) jusqu'à atteindre une DO600 de 1. Les ARN et les protéines sont ensuite extraits pour analyser le niveau d'expression de sprG1 et de SprF1 et des peptides PepG144 et PepG131 par Northern blot et Western blot, respectivement. Les résultats sont exprimés en moyennes ± écart-type de trois expériences indépendantes avec le contrôle sans stress arbitrairement mis à 100%. Valeur-p par t test de student : *$p < 0.05$.

Nous avons ensuite suivi la croissance de la souche WT et de la souche de délétion surexprimant ou non *sprG1* flaggé, en présence ou non de l'antitoxine SprF1, en milieu TSB et en milieu RPMI pauvre en nutriments. Nous n'avons pas observé pas de différence de croissance entre les souches WT et ΔΔ dans le milieu RPMI. En revanche, nous avons montré un retard de croissance significatif pour les souches surexprimant *sprG1*-flaggé en présence ou non de SprF1 dans le milieu carencé (**Figure 43A-B**).

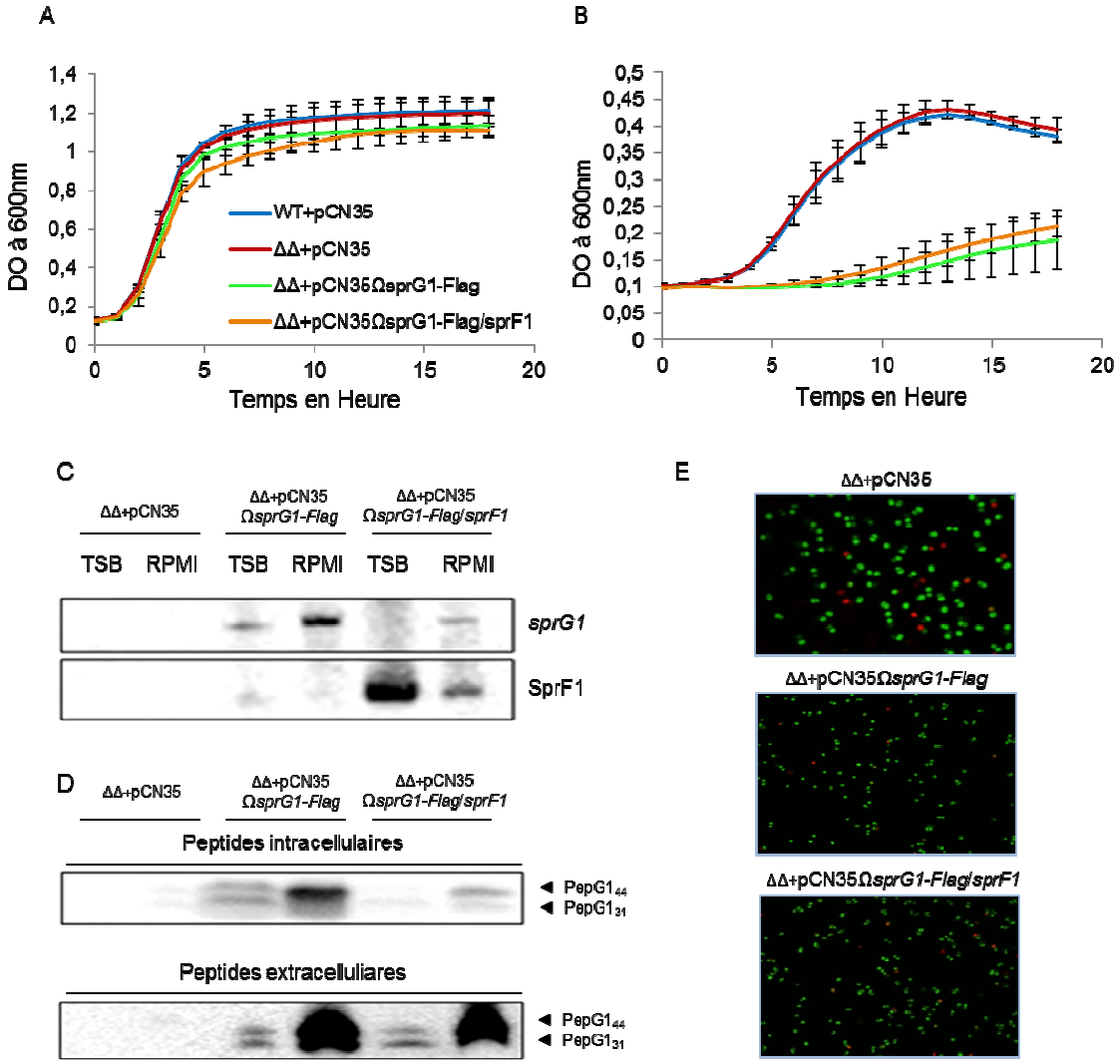


Figure 43 : Influence de la carence nutritive sur l'activation du STA *sprG1*/SprF1. La souche sauvage (WT) et le mutant de délétion (ΔΔ) complémenté avec le plasmide pCN35 vide, pCN35Ω*sprG1*-Flag, pCN35Ω*sprG1*-Flag/*sprF1* ont été cultivés en milieu en milieu TSB (A) et en milieu RPMI (B). A DO_{600} 1, les ARN et les protéines des souches de délétion complémentées avec les plasmides ont été extraits. Les niveaux d'expression des ARN *sprG1* et SprF1 ont été analysés par Northern blot (C) et celui des peptides $PepG1_{31}$ et $PepG1_{44}$ par Western blot (D). Des tests de viabilité cellulaire (E) ont été réalisés avec la sonde Sytox green qui marque les cellules vivantes en vert et l'iodure de propidium qui marque les cellules mortes en rouge. Les expériences ont été réalisées en triplicat.

Aussi, au cours de la croissance en milieu RPMI, nous avons montré par Northern blot que l'expression de l'antitoxine SprF1 semble réprimée tandis que l'expression de l'ARNm *sprG1* est augmentée en phase exponentielle de croissance (**Figure 43C**). Par Western blot, nous avons également montré que l'expression des peptides toxiques codés par *sprG1*, $PepG1_{31}$ et $PepG1_{44}$, est induite dans cette condition de carence nutritive (**Figure**

43D). De plus, nous avons observé une augmentation de la présence des peptides dans le milieu extracellulaire en condition de carence nutritive. Cependant, les peptides sont majoritairement localisés au niveau de la membrane bactérienne (**Annexe 3**). Ces résultats sont en corrélation avec le retard de croissance observé pour les souches surexprimant *sprG1* flaggé avec ou sans SprF1 (**Figure 43B**).

Afin de déterminer si le retard de croissance observé est lié à une stase bactérienne ou à de la mort, nous avons réalisé un test de viabilité avec les deux sondes fluorescentes, Syto 9 et iodure de propidium, précédemment utilisée (Article 2) sur les différentes souches cultivées en milieu TSB (données non présentées) et en milieu RPMI. Nous avons observé par microscopie à fluorescence une majorité de bactéries vivantes (**Figure 43E**) suggérant que la surexpression de *sprG1* et de ces peptides lors d'une carence nutritive provoque une inhibition de la croissance de *S. aureus* liée à une stase bactérienne et non à une mort de la bactérie.

d. Mise en évidence du ou des nutriments carencés responsable(s) de l'activation du STA *sprG1*/SprF1 chez *S. aureus*

Nous avons ensuite souhaité mettre en évidence le ou les nutriments carencés responsables du retard de croissance observé pour les souches surexprimant les peptides codés pas *sprG1* en milieu RPMI (**Figure 43B**).

Nous avons donc préparé un milieu chimiquement défini (MCD) auquel nous avons retiré, un à un, onze groupes de nutriments, parmi lesquels cinq correspondent à différents groupes d'acides aminés (aa), les autres groupes rassemblent les différentes vitamines, les ions, les bases azotés ou encore le glucose. La composition exacte du milieu et de chaque groupe de nutriment peut être retrouvé dans l'article de (Pohl *et al.*, 2009).

Dans un premier temps, nous avons comparé la croissance des souches N315 sauvage et de délétion de *sprG1*/*sprF1* dans ces douze milieux par lecture de DO_{600} par un lecteur de microplaque Biotek. Nous avons validé que, dans notre condition de contrôle MCD complet, les deux souches présentent le même profil de croissance (**Figure 44A**). La plus grande différence de croissance entre la souche sauvage et de délétion de *sprG1*/SprF1 est observée dans le MCD dépourvu de thréonine et des trois BCAA : isoleucine, leucine et valine (**Figure 44B**). Nous observons également un différentiel de croissance entre les

souches en condition de carence en en acides aminés : cystéine, histidine et méthionine et également en condition de carence en vitamines (**Annexe 4**).

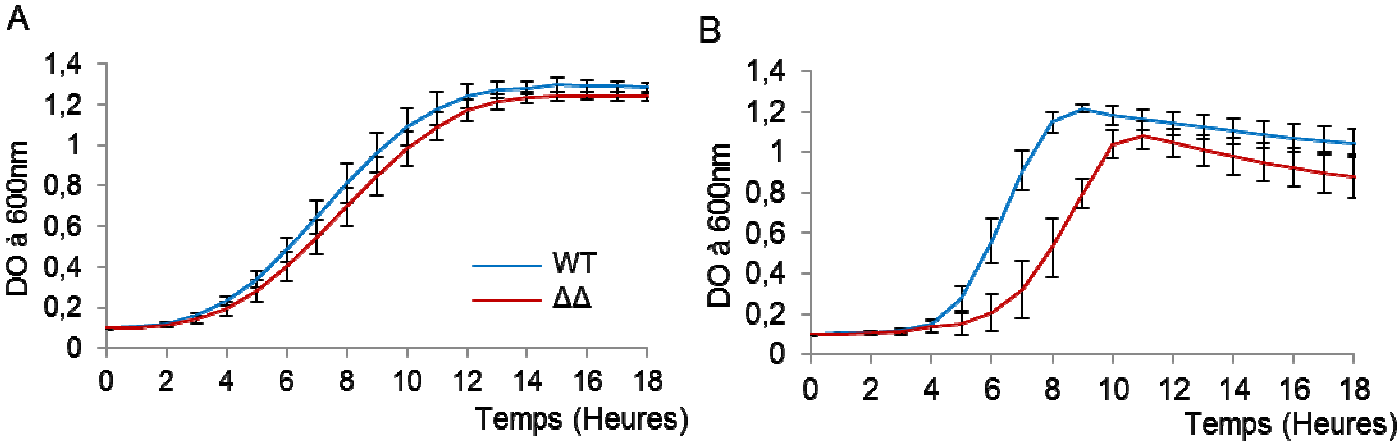


Figure 44 : Mise en évidence de l'effet de la délétion du STA *sprG1*/SprF1 dans la croissance de *S. aureus* en milieu carencé en acides aminés ramifiés (BCAA). Cinétiques de croissance des souches *S. aureus* N315 WT (bleu) et de délétion (ΔΔ) (rouge) en milieu chimiquement défini (MCD) (A) ; MCD sans thréonine et les BCAA (isoleucine, leucine, valine) (B). Représentation des moyennes ± écart-type de trois expériences indépendantes.

Ce résultat suggère que l'inhibition de la croissance et la régulation de l'expression des ARN SprF1 et *sprG1* et de ses peptides dans le milieu RPMI seraient liés à une carence en un ou plusieurs BCAA ou en thréonine. Les BCAA ont un rôle de précurseurs de la synthèse protéique et des acides gras branchés, impliqués dans la biogénèse des membranes cellulaires (Beck *et al.*, 2004, Kaiser *et al.*, 2016) et également dans la croissance et la virulence de *S. aureus* (Kaiser *et al.*, 2016).

Afin de déterminer la carence du ou des acide(s) aminé(s) impliquée dans ce retard de croissance, nous avons alors comparé la croissance des deux souches, sauvage et de délétion, dans le MCD auquel nous avons retiré chacun des trois BCAA séparément. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence un retard de croissance de la souche de délétion dans les conditions de carence en valine (**Figure 45B**) et surtout en leucine (**Figure 45C**). En revanche, les deux souches présentent le même profil de croissance en condition de carence en isoleucine (**Figure 45D**).

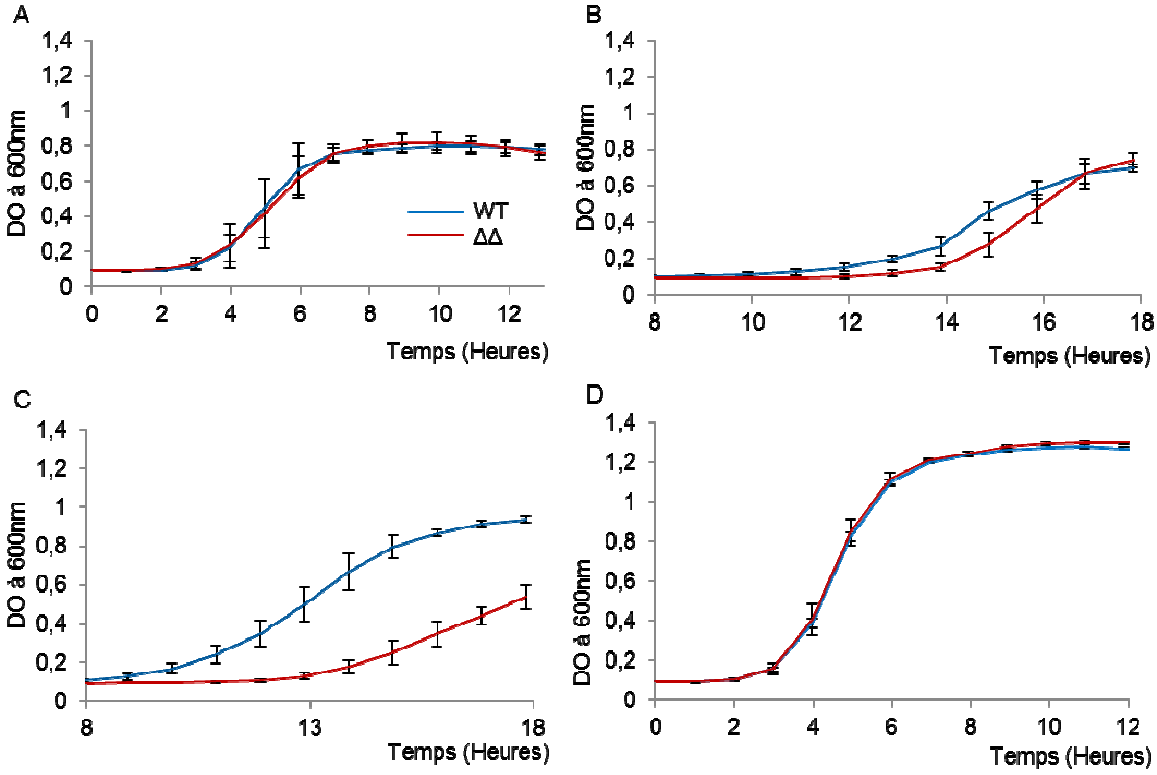


Figure 45 : Mise en évidence de l'effet de la délétion du STA *sprG1*/SprF1 dans la croissance de *S. aureus* en milieu carencé en leucine. Cinétiques de croissance des souches *S. aureus* N315 WT et Δ*sprG1*/*sprF1* en milieu chimiquement défini (MCD) (A) ; MCD dépourvu de valine (B) ; MCD dépourvu de leucine (C) ; MCD dépourvu d'isoleucine (D). Représentation des moyennes ± écart-type de trois expériences indépendantes.

Puisque la délétion du système semble surtout avoir un impact dans la réponse de *S. aureus* à la carence en leucine, nous avons souhaité étudier l'expression des ARN *sprG1* et SprF1 et des peptides $PepG1_{44}$ et $PepG1_{31}$ dans les deux MCD, complet et carencé en leucine, dans la souche N315 sauvage cultivée jusqu'en phase exponentielle de croissance par RT-qPCR et Western blot. Dans la souche sauvage, l'expression des deux ARN, *sprG1* et SprF1, est significativement inhibée en condition de carence en leucine (**Figure 46A**). Ce résultat semble assez surprenant compte tenu du fait que la souche exprimant le système a une meilleure croissance que la souche de délétion. Nous nous attendions à avoir plutôt une induction du niveau d'expression du STA. Ensuite, nous avons suivi l'expression des deux ARNs et des peptides dans les souches de surexpression de l'ARNm *sprG1* flaggé avec et sans la présence de l'antitoxine SprF1 (**Figure 46B-E**). Ici aussi, le résultat est surprenant car, dans la souche exprimant la toxine seule, l'expression de *sprG1* en milieu carencé en leucine est significativement inhibée alors que l'expression des peptides qu'il code ne semble pas varier. En revanche, lorsque l'antitoxine est également exprimée, l'expression

des deux ARNs et des deux peptides est significativement augmentée (**Figure 46C-E**). Il semble donc que ce soit la surexpression de l'antitoxine qui favoriserait l'expression de la toxine en condition de carence en leucine, ce qui est en totale contradiction avec le résultat observé en carence nutritive globale.

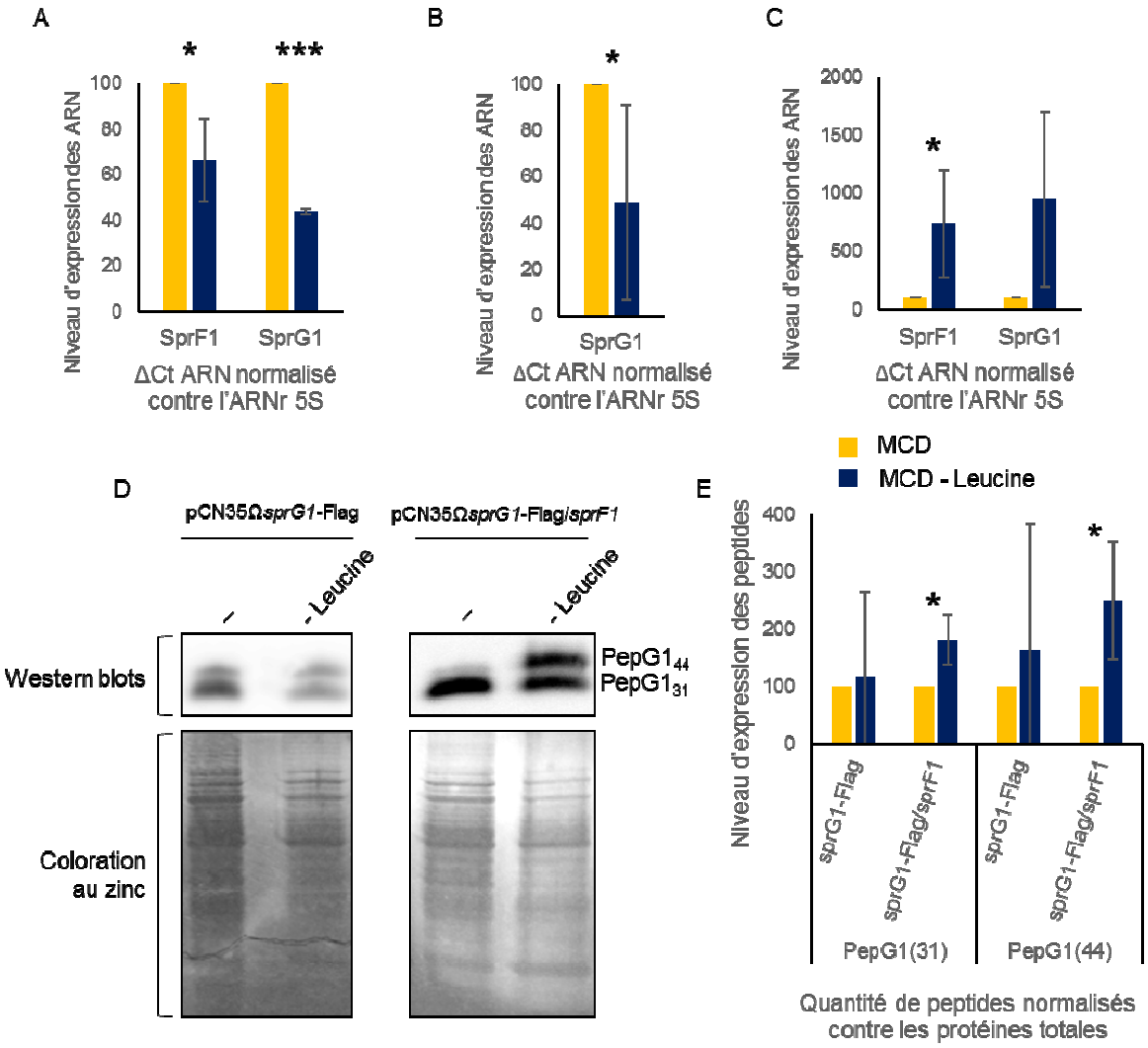


Figure 46 : Etude de l'expression des ARN *sprG1* et SprF1 et des peptides PepG1$_{44}$ et PepG1$_{31}$ après culture de *S. aureus* en condition de carence en leucine. Les souches N315 WT et délétée du STA *sprG1*/SprF1 surexprimant les peptides flaggés en présence ou en absence de SprF1 ont été cultivées jusqu'en phase exponentielle de croissance en milieu carencé ou non en leucine. Les ARN et les protéines ont été extraits pour analyser l'expression des ARN *sprG1* et SprF1 par RT-qPCR (A-C) et des peptides par Western blot (D-E). (A-C) Niveaux d'expression des ARN *sprG1* et SprF1 dans les souches N315 WT (A) ; ΔΔ+pCN35Ω*sprG1*-Flag (B) ; ΔΔ+pCN35Ω*sprG1*-Flag/*sprF1* (C) La coloration au zinc-imidazole sert de contrôle de dépôt des protéines totales. Les résultats sont exprimés en moyennes ± écart-type de trois expériences indépendantes avec le contrôle sans stress arbitrairement mis à 100%. Valeur-p par *t* test de student : *p < 0.05; ***p < 0.001.

Chez *S. aureus*, l'opéron *ilvDBHC-leuABCD-ilvA* (*ilv-leu*) contient neuf gènes impliqués dans la voie de la biosynthèse des acides aminés ramifiés (Majerczyk *et al.*, 2010, Lei *et al.*, 2012). L'expression de cet opéron est régulée par deux répresseurs transcriptionnels, CodY sous le contrôle de la réponse stringente (Majerczyk *et al.*, 2010), 2010), et Gcp, mais également par un activateur de la transcription, CcpA. La délétion du répresseur Gcp n'a pas d'influence sur le niveau de transcription de CodY, en revanche, elle active la transcription de CcpA (Lei *et al.*, 2012). Ainsi, deux voies distinctes de régulation de l'opéron *ilv-leu* ont été caractérisées chez *S. aureus*. Nous avons voulu mettre en évidence la voie de signalisation dans laquelle le STA *sprG1*/SprF1 interviendrait pour favoriser la croissance de *S. aureus* dans un milieu dépourvu de leucine. Pour cela, nous avons suivi par RT-qPCR l'expression des ARNm codant pour CodY,Gcp et CcpA dans les souches de *S. aureus* sauvage et délétée de *sprG1*/*sprF1* cultivée en phase exponentielle de croissance dans le milieu carencé ou non en leucine (**Figure 47A**). En milieu carencé, nos résutats montrent une augmentation significative de l'expression de l'ARNm *codY* dans la souche délétée du STA. En revanche, nos résultats ne montrent pas de différence d'expression significative concernant les ARNm des régulateurs Gcp et CcpA, privilégiant l'hypothèse du rôle de *sprG1*/SprF1 dans la voie de la réponse stringente.Nous avons ensuite suivi l'expression de l'ARNm *codY* dans les souches surexprimant l'ARNm *sprG1* flaggé avec et sans la présence de l'antitoxine SprF1. Encore une fois, le résultat obtenu est déconcertant : en effet, la souche ne surexprimant que la toxine présente le même profil d'expression de *codY* que la souche sauvage, alors que la souche surexprimant le STA complet présente un profil comparable à la celui de la souche de délétion (**Figure 47B**). Nous nous serions attendus ici à ce que la surexpression du système inhibe l'expression du répresseur CodY. Enfin, nous avons montré par Western blot que, dans cette condition de croissance, la protéine CodY était à l'inverse significativement moins exprimée dans la souche de délétion que dans la souche sauvage (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.C-D**). Ainsi, nous ne pouvons pas conclure que l'inhibition de la croissance de la souche de délétion de *sprG1*/SprF1 en condition de carence en leucine pourrait être liée à une inhibition de la traduction de l'ARNm codant pour CodY.

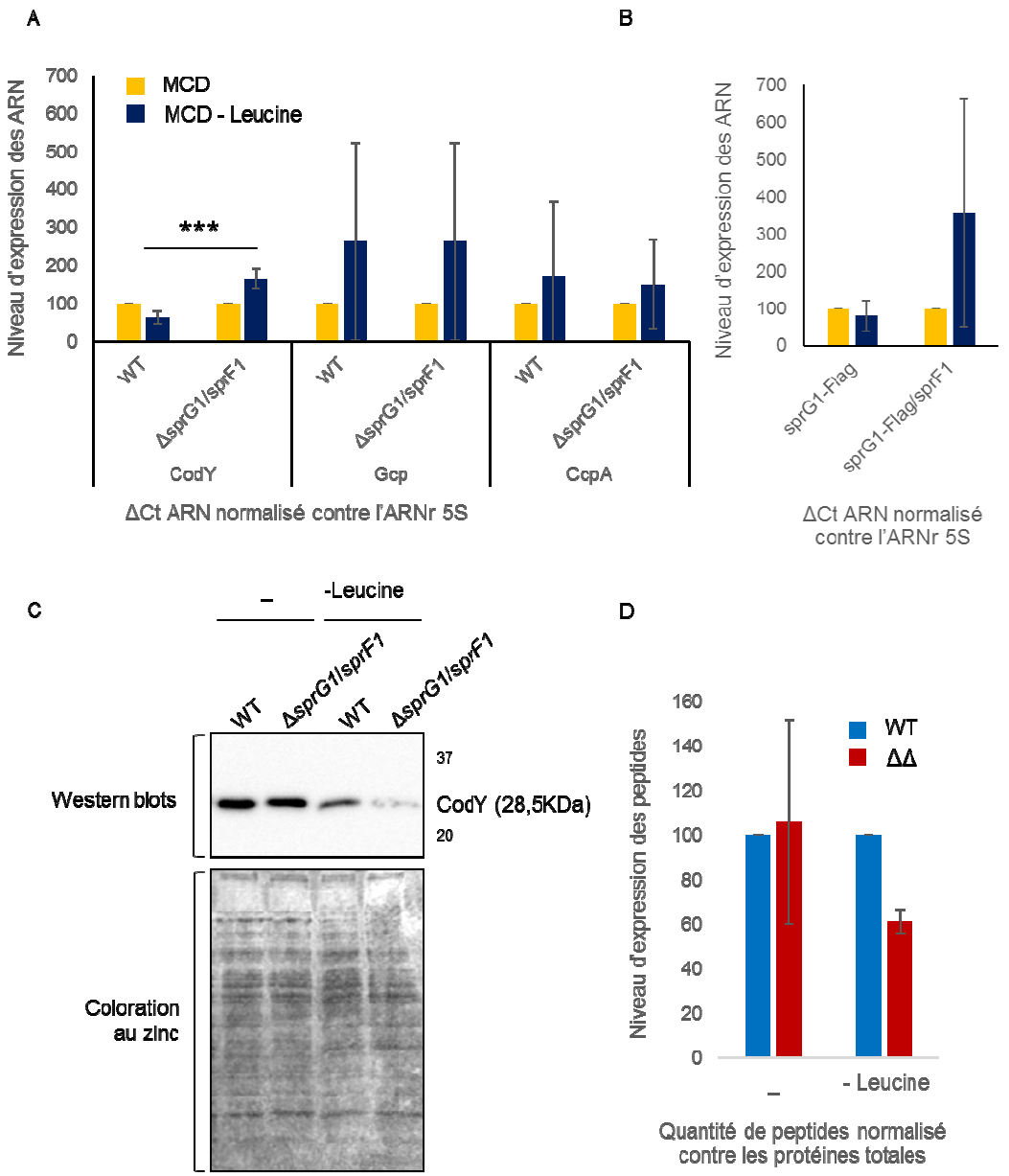


Figure 47 : Analyse de l'effet de la délétion du STA *sprG1*/SprF1 sur l'expression des deux répresseurs transcriptionnels CodY et Gcp et de l'activateur transcriptionnel CcpA en condition de carence en leucine. Les souches N315 WT, délétée du STA Δ*sprG1/sprF1* et surexprimant les peptides flaggés en présence ou en absence de SprF1 ont été cultivées en phase exponentielle de croissance en milieu MDC carencé ou non en leucine. Après extraction des ARN, les niveaux d'expression de trois régulateurs transcriptionnels de l'opéron *ilv-leu*, CodY, Gcp et CcpA, ont été analysés par RT-qPCR et comparés au contrôle interne (ARNr 5S) (A) dans les souches N315 WT et Δ*sprG1*/*sprF1* (B) et de CodY uniquement dans les souches ΔΔ+pCN35Ω*sprG1*-Flag et ΔΔ+pCN35Ω*sprG1*-Flag/*sprF1* (C-D) Après extraction des protéines, les niveaux d'expression de la protéine CodY dans les souches WT et Δ*sprG1*/*sprF1* ont été analysés par Western blot avec le contrôle de dépôt par coloration des protéines totales au zinc-imidazole. Les résultats sont exprimés en moyennes ± écart-type de trois expériences indépendantes avec le contrôle sans stress arbitrairement mis à 100%. Valeur-p par *t* test de student : ***p < 0.001.

Enfin, nous avons souhaité mettre en évidence le rôle putatif du système STA *sprG1*/SprF1 sur l'expression des gènes de l'opéron *ilv-leu*. Ainsi, nous avons suivi par RT-qPCR l'expression des ARNm *ilvA*, *ilvC*, *ilvD*, *ilvE* et *leuA* dans les deux conditions de croissance, avec et sans leucine, et dans les souches exprimant ou non le système. En condition de carence en leucine, nous avons observé une induction de l'expression des ARNm *IlvC*, *IlvD* et *LeuA.* Par contre, nous n'avons pas montré de différence d'expression significative entre nos deux souches (**Figure 48**). Ainsi, nous pouvons conclure que l'inhibition de la croissance de la souche de délétion de *sprG1*/SprF1 en condition de carence en leucine n'est pas liée à une régulation de l'expression de l'opéron *ilv-leu* au niveau transcriptionnel.

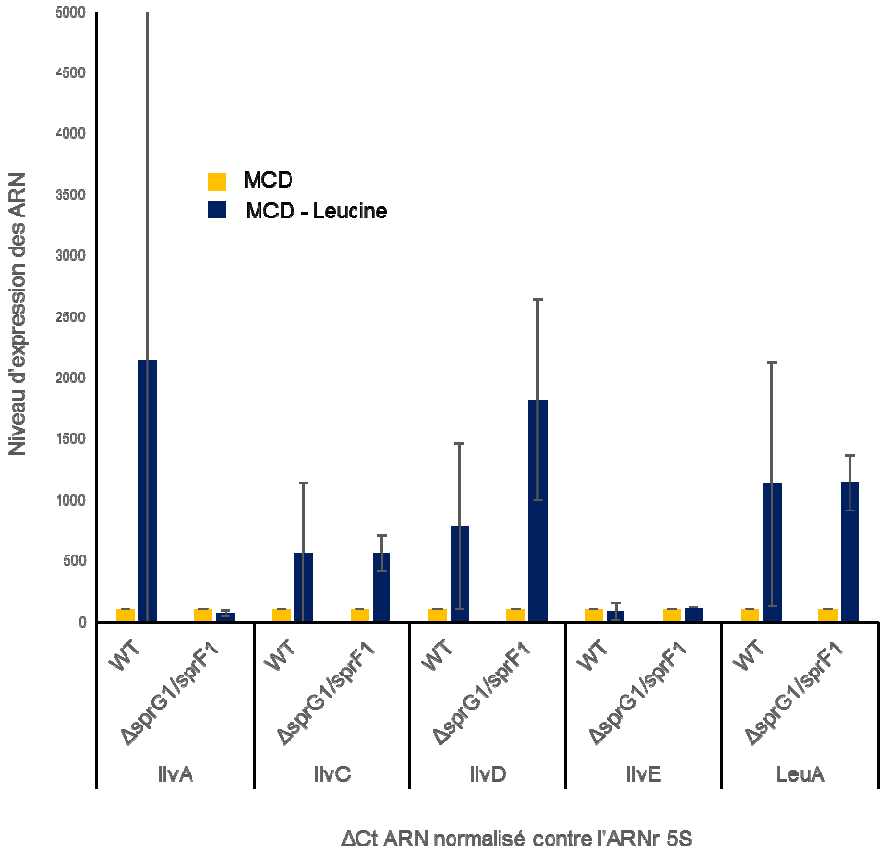


Figure 48 : Analyse de l'effet de la délétion du STA *sprG1*/SprF1 sur l'expression des gènes de l'opéron *ilv-leu* en condition de carence en leucine. Les souches N315 WT et délétée du STA Δ*sprG1/sprF1* ont été cultivées en phase exponentielle de croissance en milieu MDC carencé ou non en leucine. Après extraction des ARN, les niveaux d'expression de quatre gènes exprimés par l'opéron *ilv-leu* : *ilvA*, *ilvC*, *ilvD*, *ilvE* et *leuA*, ont été analysés par RT-qPCR et comparés au contrôle interne (ARNr 5S). Les résultats sont exprimés en moyennes ± écart-type de trois expériences indépendantes avec le contrôle sans stress arbitrairement mis à 100%.

Au vu de ces résultats, le STA *sprG1*/SprF1 ne semble pas directement impliqué dans l'adaptation de *S. aureus* à une carence en leucine. En effet, nous avons montré une inhibition significative de l'expression des ARN *sprG1* et SprF1 dans la souche N315 sauvage en condition de carence en leucine. Cette inhibition ne permet pas d'expliquer le retard de croissance de la souche de délétion du STA *sprG1*/SprF1 en condition de carence en leucine. De plus, les niveaux d'expression des ARN *sprG1* et SprF1 et des peptides $PepG1_{44}$ et $PepG1_{31}$ sont inversement régulés en fonction des souches de surexpression de *sprG1* et des peptides $PepG1_{44}$ et $PepG1_{31}$ en présence ou non de SprF1 lors de la carence en leucine. Nous avons cependant observé que l'inhibition de la croissance de la souche de délétion du STA *sprG1*/SprF1 en condition de carence en leucine pourrait être attribuée à une augmentation de l'expression de l'ARNm *codY* consécutive à une inhibition significative de la traduction de CodY, inhibition dont les mécanismes moléculaires de régulation impliquant probablement de façon indirecte le STA *sprG1*/SprF1 seront à décrypter.

Lors de ce projet, nous n'avons pas été en mesure d'identifier un nutriment responsable de l'inhibition de croissance de *S. aureus* observée lors d'une carence nutritive en condition de surexpression de *sprG1* et de ces peptides. Il semble donc que le simple fait d'avoir une carence nutritive globale suffise pour induire l'expression de la toxine et de ces peptides toxiques dans le but d'induire une stase bactérienne. Effectivement, en diluant simplement le milieu TSB au 1/10, nous avons été en mesure de reproduire les résultats obtenus pour le milieu RPMI sauf pour l'expression de SprF1 qui reste stable dans cette condition de culture (**Annexe 5**).

Conclusion

En conclusion de cette partie, nous avons mis en évidence qu'en condition normale de croissance, l'expression de la toxine *sprG1* et de ces peptides, $PepG1_{44}$ et $PepG1_{31}$, est inhibée par l'antitoxine SprF1. En revanche, en condition de carence nutritive globale, l'expression de l'ARNm *sprG1* et des peptides $PepG1_{44}$ et $PepG1_{31}$ est induite *via* une diminution de l'expression de l'antitoxine SprF1 conduisant à une stase bactérienne (**Figure 49**).

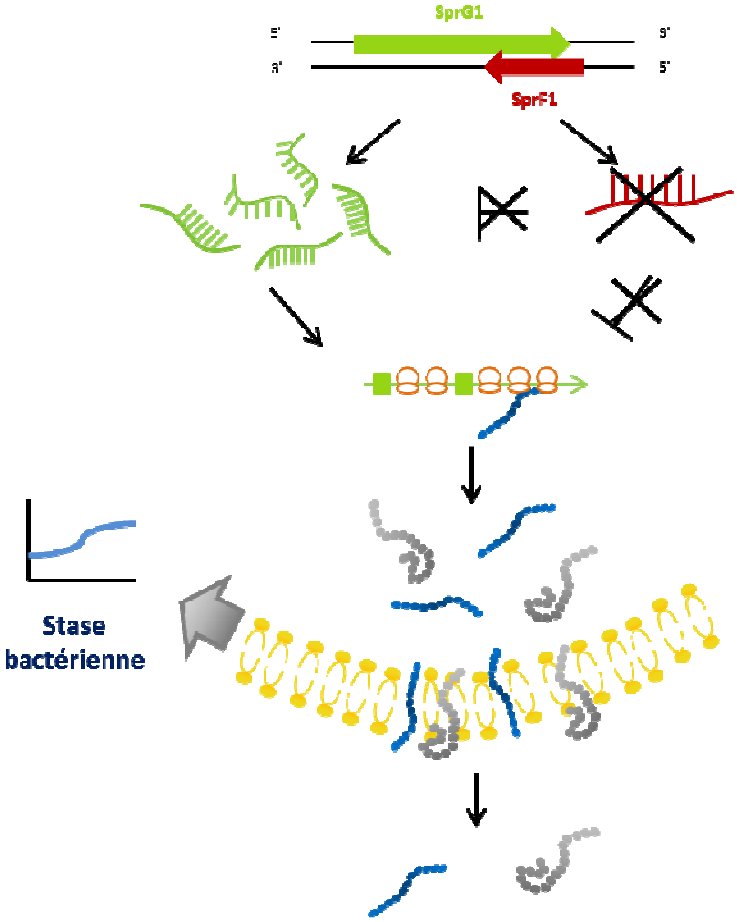


Figure 49 : Modèle de la dérépression de *sprG1* en condition de carence nutritive globale. En condition de carence nutrive l'expression de l'antitoxine SprF1 (rouge) est inhibée, laissant librement les ARNm *sprG1* (vert) s'accumuler dans la bactérie et être traduits en deux peptides toxiques, $PepG1_{44}$ (gris) et $PepG1_{31}$ (bleu). Ces peptides sont partiellement sécrétés dans le milieu extracellulaire mais sont majoritairement présents à la membrane d'où ils induisent une stase bactérienne.

- Partie II -

Etude fonctionnelle d'ARN régulateurs associés aux ribosomes bactériens

Introduction et objectifs

Une régulation coordonnée de l'expression génique en réponse à des signaux intra- et extracellulaires est un évènement essentiel à la survie d'un organisme. La régulation de la synthèse protéique, étape fréquemment ciblée lors de l'expression génique, implique des protéines régulatrices mais également des petits ARN, pour la plupart non codants. Ces ARN présentent l'avantage d'être immédiatement disponibles pour agir sur le taux d'ARNm sans nécessiter la synthèse d'un polypeptide pour exercer leurs fonctions cellulaires. Certains sont capables de réguler la synthèse protéique (miRNA/siRNA chez les eucaryotes ou ARN régulateurs chez les procaryotes) en ciblant directement les ARNm plutôt que les ribosomes. Une étude récente a montré chez *Haloferax volcanii* que des fragments dérivés d'ARNs de transfert (tRFs), découverts par Deep RNA sequencing associé à une nouvelle méthode d'analyse transcriptomique, informatique et automatisée, appelée APART (Automatited Pipeline for Analysis of RNA Transcripts) (Zywicki *et al.*, 2012), pouvaient avoir un rôle d'ARNrég. Ces tRFs peuvent en effet se fixer directement aux ribosomes pour réguler l'expression de certains gènes en condition de stress environnemental, probablement pour un réglage fin du taux de production de protéines (Gebetsberger *et al.*, 2012)(Gebetsberger et *al.*, 2012). Une autre étude (Pircher *et al.*, 2014) a montré chez *Saccharomyces cerevisiae* que des ARNnc dérivés d'ARNm peuvent cibler directement le ribosome pour réguler sa fonction globale.

Dans ce contexte, nous souhaitons identifier une nouvelle classe d'ARN régulateurs (ARNrég) capables de cibler directement et de réguler le ribosome chez *S. aureus*.

Résultats

1. Mise en évidence de fragments d'ARN associés aux ribosomes de *S. aureus*

Nous avons initié ce projet en optimisant la purification des ribosomes avant et après gradient de sucrose dans la souche N315 de *S. aureus.* Nous avons cultivé la souche en milieu BHI jusqu'en phase exponentielle et stationnaire de croissance, où nous avons récolté les bactéries par centrifugation. Après deux lavages consécutifs dans un tampon pour le profil des ribosomes (TPR) (Hepes 0,02 M, pH 7,5 ; MgOAc 0,01 M ; NH_4Cl 0,1 M ; EDTA 0,001 M, pH8), les culots bactériens sont congelés à -80°C pour être broyés manuellement à l'aide d'un mortier froid (-80°C) et de poudre d'alumina jusqu'à l'obtention d'une pâte homogène. Les bactéries sont alors reprises dans le tampon TPR supplémenté avec de la DNase (1/2000 du volume final) et maintenues dans la glace pendant 30 minutes. Ensuite, une première centrifugation rapide permet d'enlever les gros débris cellulaires ainsi que l'alumina avant de réaliser une deuxième centrifugation de 30 min à 30 000g. Le culot obtenu, appelé S30, correspondant à la fraction totale est ensuite déposée sur un coussin de sucrose (TPR + 37% de sucrose) puis centrifugé pendant 15 h à 100 000g. A cette étape, le culot correspond à la fraction polysomale non purifiée. La purification des polysomes se fait ensuite par centrifugation sur un gradient linéaire de 10 à 30% de sucrose pendant 15 h à 50 000g. Le gradient est ensuite fractionné en chambre froide par un système de purification de protéines ÄKTA. Les échantillons correspondants aux ribosomes 70S ou aux sous-unités 50S et 30S sont identifiés par la lecture de la DO à 254 nm (**Figure 50**). Les différentes fractions indiquées sur le graphique sont collectées, poolées, rincées avec du tampon TPR pour éliminer le sucrose, puis concentrées. La qualité de la séparation des différentes fractions est ensuite contrôlée par électrophorèse en gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium (BET) où la mise en évidence des ARN 23S et 16S témoignent de la présence de la sous-unité 50S et 30S, respectivement.

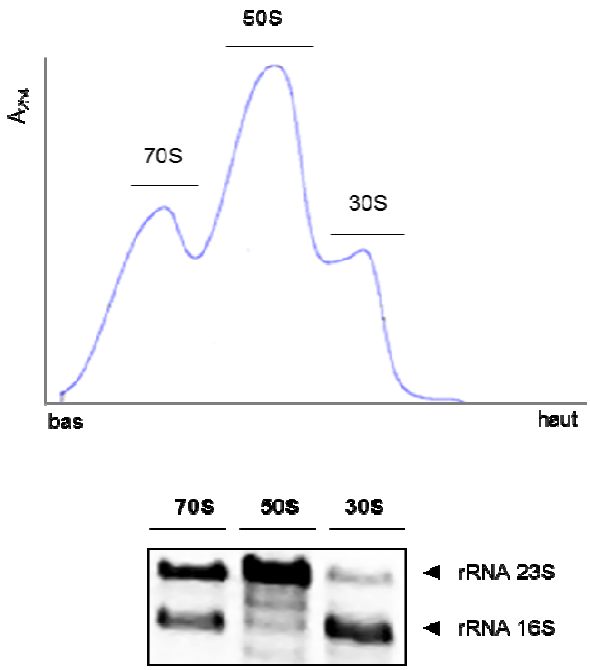


Figure 50 : Exemple d'un profil de fractions ribosomales de *S. aureus*. Les ribosomes sont extraits en cours de phase exponentielle de croissance de *S. aureus* N315 et séparés par un gradient linéaire de 10 à 30% de sucrose. Le profil d'absorption est mesuré à 254 nm. Chaque fraction indiquée sur le profil est collectée, rincée, concentrée et contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium. L'ARN 23S témoigne de la présence de la sous-unité 50S, alors que l'ARN 16S témoigne de la présence de la sous-unité 30S.

Nous avons extrait par extraction phénolique, purifié puis analysé les petits ARN (20-300 nucléotides) associés aux ribosomes, avant et après purification par le gradient de sucrose, par séquençage d'ARN haut débit en collaboration avec le Pr Polacek de l'Université de Bern en Suisse. A l'aide du logiciel APART, nous avons ainsi identifié une vingtaine d'ARNreg putatifs associés aux ribosomes. Les résultats préliminaires ont révélé trois catégories d'ARN retrouvés statistiquement fortement associés aux ribosomes : des fragments d'ARNr 5S, des fragments bien spécifiques d'ARN de transfert (tRF) et d'autres fragments tels que le « 2566 » qui possède une séquence identique à l'extrémité 3' de l'ARN SprF1 (**Tableau 7**).

ncRNAs identification	Name of the gene	Biotype	Genomic location	Strand	Orientation of the RNA to gene
2566	SprF1	IGR_ncRNA	2010949-2011011	+	Antisens of SprG1
714	5S rRNA fragment	intergenic	511818-511856	+	-
6938	5S rRNA fragment	intergenic	2108782-2108826	-	-
713	5S rRNA fragment	intergenic	511522-511596	+	-
6937	5S rRNA fragment	intergenic	2108518-2108570	-	-
781	5S rRNA fragment	intergenic	555832-555856	+	-
4700	Teg76	IGR_ncRNA	430542-430668	-	Antisens of purine riboswitch
628	RsaOW1	IGR_ncRNA	426659-426684	+	Antisens putatif of IS1181 transposase
1221	RsaOW3	IGR_ncRNA	893885-893910	+	Antisens putatif of IS1181 transposase
1492	RsaOW	IGR_ncRNA	1139063-1139088	+	Antisens putatif of IS1181 transposase
2194	Teg19	IGR_ncRNA	1761693-1761718	+	Antisense of the 5'UTR of IS1181 tnp
2395	RsaOW	IGR_ncRNA	1914785-1914810	+	Antisens putatif of IS1181 transposase
5158	RsaC	IGR_ncRNA	679615-679640	-	Antisens - Trans-encoded sRNA
6965	Teg17	IGR_ncRNA	2135729-2135754	-	Antisens putatif of IS1181 transposase
7597	Teg30	IGR_ncRNA	2568110-2568135	-	Antisens putatif of IS1181 transposase
6235	-	intergenic	1513645-1513689	-	-
6863	-	intergenic	2033566-2033612	-	-
6725	tRNA-Met	tRNA	1917257-1917430	-	sens
6682	tRNA-Met	tRNA	1882420-1882603	-	sens
6722	tRNA-Tyr	tRNA	1916998-1917078	-	sens
7104	tRNA-Tyr	tRNA	2230387-2230471	-	sens

Tableau 7 : Liste des fragments d'ARN statistiquement associés aux ribosomes. Les fragments ont été mis en évidence par séquençage d'ARN haut débit associé au logiciel APART à partir d'échantillons de ribosomes de *S. aureus* N315. La sélection correspond aux fragments d'ARN significativement enrichis dans la fraction de ribosomes purifiés par un gradient de sucrose par rapport à leur quantification dans la fraction de ribosomes non purifiés. Le numéro d'identification des fragments, le nom des gènes dont ils sont issus, leur localisation génomique, le brin sur lequel ils sont localisés ainsi que leur orientation sont présentés. L'encadré vert indique le fragment 2566 et les fragments que nous n'avons pas étudiés sont grisés.

Nous avons souhaité confirmer les résultats du séquençage d'ARN à haut débit par Northern blot et RT-qPCR. Nous avons ainsi purifié les ribosomes avant et après gradient de sucrose des souches N315 et HG003 de *S. aureus* cultivées jusqu'en phase exponentielle et stationnaire de croissance. Nous n'avons pas été en mesure de valider, par Northern blot et par RT-qPCR, l'expression et l'association aux ribosomes des fragments d'ARNr 5S et d'ARNt en raison de leur petite taille et de leur identité de séquence avec l'ARN 5S et les ARNt entiers, respectivement (**Figure 51**).

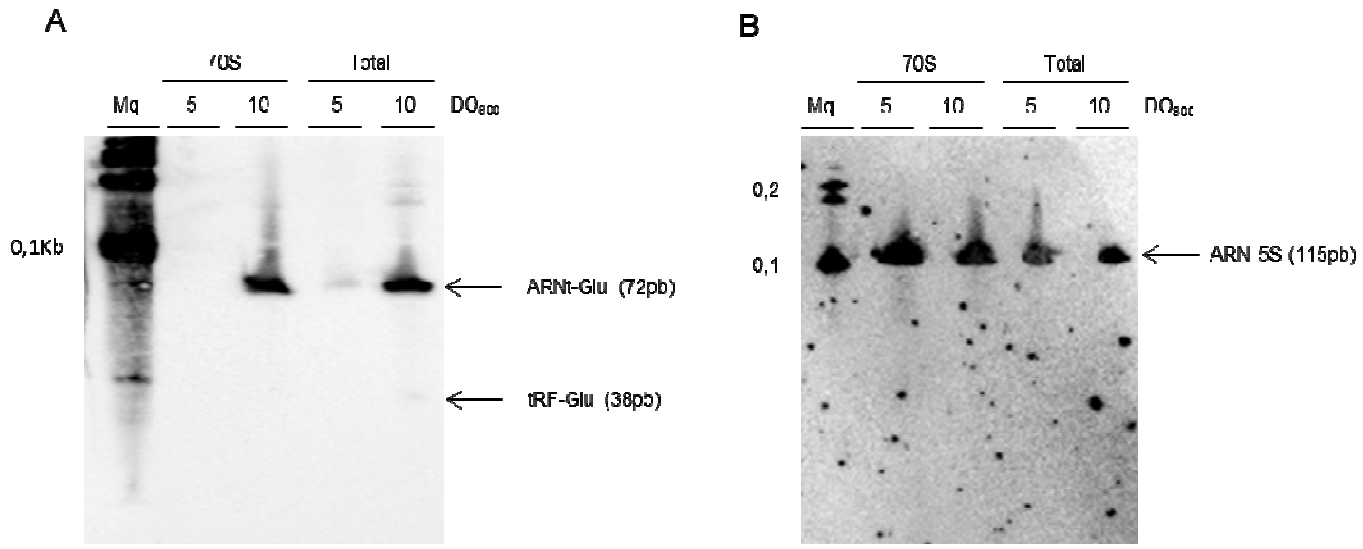


Figure 51 : Etude de l'expression par Northern blot d'un fragment d'ARNt et des fragments d'ARN 5S dans la fraction ribosomale de *S. aureus*. La souche N315 WT a été cultivée en milieu BHI jusqu'en fin de phase exponentielle de croissance (DO_{600} 5) et en phase de ralentissement de croissance (DO_{600} 10). Les ribosomes ont été isolés et les ARN ont été extraits des fractions totales et ribosomales (70S). (A) L'expression de ARNt de la glutamine et de son fragment ainsi que l'expression de (B) l'ARN 5S et de ces fragments a été analysée par Northern blot. Mq : Marqueur de taille.

Nous nous sommes donc naturellement intéressés au fragment « 2566 » qui correspond à l'extrémité 3' de l'antitoxine SprF1 et à la zone d'appariement de SprF1 avec l'ARNm *sprG1* puisque l'un des projets de cette thèse est d'étudier fonctionnellement le STA *sprG1*/SprF1.

2. Etude fonctionnelle du fragment « 2566 »

Afin de déterminer si le fragment d'ARN « 2566 » est un produit de clivage de SprF1, les souches HG001 délétées de la ribonucléase Y (ΔRNase Y) ou de la ribonucléase III (ΔRNase III) ont été cultivées en milieu BHI jusqu'en phase exponentielle et stationnaire de croissance. Les ARN sont ensuite extraits par extraction phénolique puis analysés par Northern blot. Nous avons montré une nette inhibition de l'expression du fragment « 2566 » dans les deux souches de délétion prouvant qu'il s'agit bien d'un produit de clivage de l'ARN SprF1 (**Figure 52**). Nous l'appellerons dorénavant SprF1-3' ou SprF1-3'.

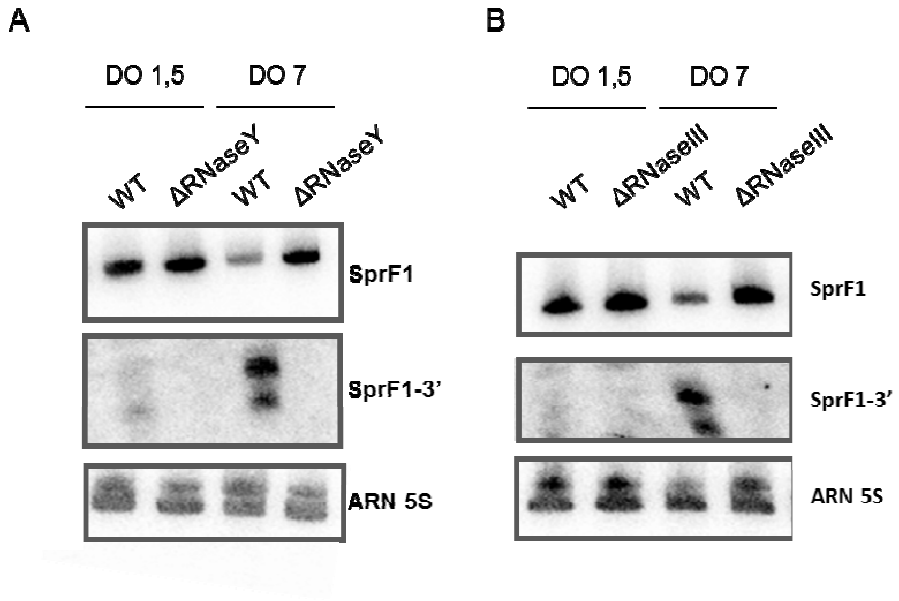


Figure 52 : Mise en évidence du rôle de la RNaseY et de la RNaseIII dans le clivage de SprF1 en fragment 3'-SprF1. Les souches HG001ΔRNaseY (A) et HG001ΔRNaseIII (B) ont été cultivées en BHI jusqu'en phase exponentielle (DO_{600} 1,5) et en phase stationnaire (DO_{600} 7) où les ARN ont été extraits. La présence de l'ARN SprF1, du fragment 3'-SprF1 et de l'ARN 5S, comme contrôle de dépôt, a été mise en évidence par Northern blot.

Nous avons ensuite voulu confirmer *in vitro* l'association de ce produit de clivage de SprF1 aux ribosomes par Dot blot. Nous avons également étudié l'association de l'ARN SprF1, de la toxine *sprG1*, et du fragment 3'-*sprG1* aux ribosomes et de l'ARN régulateur codant pour la δ-hémolysine, l'ARNIII, comme contrôle positif (Janzon *et al.*, 1989). Brièvement, nous avons incubé 1 pmol d'ARN radiomarqués avec 5 pmol de ribosomes 70S de *S. aureus* pendant 30 min à 37°C. Les réactions ont été ensuite déposées dans un appareil de filtration-fixation (Dot blot) où la présence d'une membrane de nitrocellulose retient les ARN associés aux ribosomes alors qu'une membrane de nylon retient simplement l'ARN libre. Nous avons, tout d'abord, validé la technique en démontrant l'association de l'ARNIII (aux ribosomes 70S de *S. aureus* (**Figure 53**). Les résultats montrent également que le fragment 3'-SprF1 ne se fixe pas aux ribosomes contrairement à ce qui était suggéré par le séquençage d'ARN à haut débit (**Tableau 7**). En revanche, nous avons montré par cette technique que l'ARN SprF1 est capable de se fixer aux ribosomes (**Figure 53**). Enfin, l'ARNm *sprG1* et le fragment 3'-*sprG1,* utilisé comme contrôle négatif*,* ne semblent pas être capable de s'associer aux ribosomes de *S. aureus in vitro*. Ce résultat nous a plus particulièrement intéressés compte tenu du fait que contrairement à l'ARNm *sprG1*, SprF1 ne semble pas coder pour un peptide.

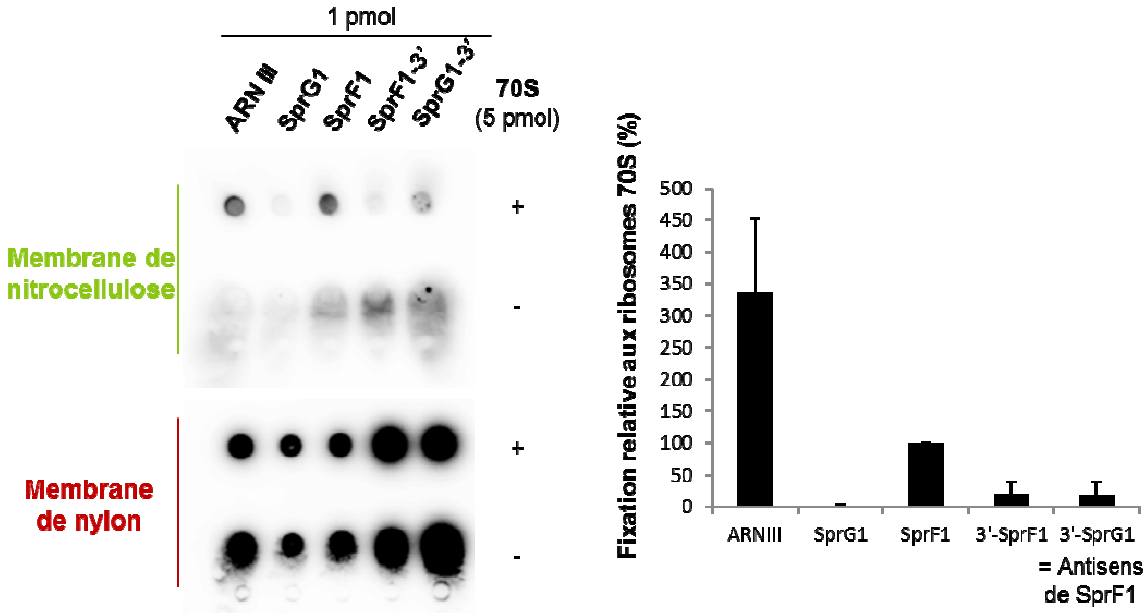


Figure 53 : SprF1 est capable de s'associer aux ribosomes *in vitro*. Test de filtration-fixation d'ARN radiomarqués (ARNIII, *sprG1*, SprF1, 3'-SprF1, 3'-*sprG1*) sur des ribosomes 70S de *S. aureus*. Quantification de la fixation relative où l'association de SprF1 au 70S est normalisée à 100%. Les signaux mesurés en absence de ribosomes (-) sont soustraits pour tous les points expérimentaux. Les résultats sont exprimés en moyennes ± écart-type de trois expériences indépendantes. L'ARNIII est utilisé comme contrôle positif de fixation aux ribosomes et le fragment 3'-*sprG1* comme contrôle négatif

3. Article 3: « Purification, identification, and functional analysis of polysomes from the human pathogen *Staphylococcus aureus* »

Afin de mettre en évidence l'association *in vivo* de SprF1 aux ribosomes en cours de traduction, nous avons mis en place une méthode d'enrichissement des polysomes chez *S. aureus*. Cette méthode a été adaptée d'un protocole utilisé chez les bactéries à Gram négatif (Cougot *et al.*, 2014) puisque jusqu'à présent aucun protocole détaillé pour l'enrichissement de polysomes chez les bactéries à Gram positif n'était disponible. La méthode que nous avons mise en place décrit précisément toutes les étapes de préparation, d'enrichissement et de contrôle de qualité des différentes fractions ribosomales : polysomes, monosomes 70S et sous-unités 50S et 30S. Nous avons également montré que les polysomes ainsi extraits sont traductionnellement actifs. Toutes les étapes décrites dans la méthode sont nécessaires à l'utilisation de ces polysomes et ribosomes de *S. aureus* pour des études structurales ou pour réaliser des études du translatome, c'est-à-dire des ARNm en cours de traduction à petite ou à large échelle. Nous avons également pu mettre en évidence la présence d'ARNrég dans la fraction polysomale de *S. aureus*. Cette méthode a permis la publication de l'article « Purification, identification, and functional analysis of polysomes from the human pathogen *Staphylococcus aureus* » **Régine Brielle,** Marie-Laure Pinel-Marie, Sophie Chat, Reynald Gillet et Brice Felden, publié dans Methods en octobre 2016.

Article III

Purification, identification, and functional analysis of polysomes from the human pathogen *Staphylococcus aureus*.

Régine Brielle, Marie-Laure Pinel-Marie, Sophie Chat, Reynald Gillet and Brice Felden

Methods. 2016 Oct 8.

Methods xxx (2016) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymeth

Purification, identification, and functional analysis of polysomes from the human pathogen *Staphylococcus aureus*

Régine Brielle [a], Marie-Laure Pinel-Marie [a,*], Sophie Chat [b], Reynald Gillet [b,c], Brice Felden [a,*]

[a] *Inserm U835 Pharmaceutical Biochemistry, University of Rennes 1, 2 avenue du Prof. Léon Bernard, 35043 Rennes, France*
[b] *UMR CNRS 6290 IGDR Team Translation and Folding, University of Rennes 1, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes Cedex, France*
[c] *Institut Universitaire de France, France*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 29 July 2016
Received in revised form 21 September 2016
Accepted 6 October 2016
Available online xxxx

Keywords:
Polysome
Ribosome
Translation
Staphylococcus aureus
Sucrose gradient purification
Translatome

ABSTRACT

Polysomes are macromolecular complexes made up of multiple ribosomes simultaneously translating a single mRNA into polypeptide chains. Together, the cellular mRNAs translated in this way are referred to 'translatome.' Translation determines a cell's overall gene expression profile. Studying translatome leads to a better understanding of the translational machinery and of its complex regulatory pathways. Given its fundamental role in cell homeostasis and division, bacterial translation is an important target for antibiotics. However, there are no detailed protocols for polysome purification from *Staphylococcus aureus*, the human pathogen responsible for the majority of multi-drug resistance issues. We therefore developed methods for the isolation of active polysomes, ribosomes, and ribosomal subunits, examining the purity and quality of each fraction and monitoring polysomal activity during protein synthesis. These steps are mandatory for the use of purified *S. aureus* polysomes and ribosomes for structural studies or for genome-scale analysis of most translated mRNAs.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

Contents

1. Introduction . . . 00
2. Materials and methods . . . 00
2.1. *S. aureus* strains, plasmids, and genetic constructions . . . 00
2.2. Polysome enrichment . . . 00
2.2.1. *S. aureus* cell extract preparation . . . 00
2.2.2. Cell lysis and polysome isolation . . . 00
2.2.3. Polysome and ribosome fractionations . . . 00
2.3. Quality control of the polysome fractions . . . 00
2.3.1. Agarose gel electrophoresis of the ribosomal fractions . . . 00
2.3.2. Electron microscopy imaging of the *S. aureus* polysomes and ribosomes using negative staining . . . 00
2.4. Assessing polysome functionality . . . 00
2.4.1. *In vitro* translation assays using purified *S. aureus* polysomes . . . 00
2.4.2. RNA extraction and RT-qPCR analyses . . . 00
2.4.3. Protein extraction and Western blot analysis . . . 00
3. Results and discussion . . . 00
Acknowledgments . . . 00
Appendix A. Supplementary data . . . 00
References . . . 00

* Corresponding authors.
E-mail addresses: marie-laure.pinel@univ-rennes1.fr (M.-L. Pinel-Marie), bfelden@univ-rennes1.fr (B. Felden).

http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.10.003
1046-2023/© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Protein synthesis, or 'translation', has a central role in gene expression regulation in all cells, and is an highly energy-intensive process. Translation is mediated by ribosomes, which are macromolecular complexes that translate the genetic information from mRNA codon triplets into specific amino acid sequences [1,2]. Bacterial ribosomes are composed of two subunits: 30S, that selects the amino acids according to the mRNA sequence; and 50S, that combines amino acids to form polypeptides. These subunits are the main targets for the antibiotics in current clinical use [1].

In actively growing bacteria, multiple ribosomes begin translation simultaneously and range along a single mRNA to synthesize the same proteins. Because they move faster through sucrose gradients, these 'polysomes' or 'polyribosomes' are distinct from single ribosomes or ribosomal subunits [3]. Interestingly, in any living cell the polysomal fraction is considered to be a snapshot of the translation activity, although it was recently shown in *Saccharomyces cerevisiae* that monosomes make up a significant part of the active ribosomes that translate special RNAs [4].

In bacteria, investigations into translation based on the use of purified polysomes [5] have been much less common than those done using isolated ribosomes [6–8]. Yet polysomal and ribosomal profiling provide different information, and both approaches are required to better understand this process [9]. Most published protocols describe polysome purification from eukaryotic cells [10] or from Gram-negative bacteria [10,11], with little available on Gram-positive bacteria [12]. This is particularly true for the important human pathogen *(S. aureus)*, a commensal organism that can become deadly. The pathogen targets various organs, resulting in different diseases ranging from skin and soft tissue infections to severe bacteremia. Due to its aggressiveness and to the existence and proliferation of many multidrug-resistant strains, *S. aureus* is a major public health concern [13]. To our knowledge, only *S. aureus* ribosomes and not the polysomes have been studied [4,14–18].

Starting from an *Escherichia coli* protocol [11], we created a robust method for purifying polysomes from *S. aureus*. Certain adjustments were made due to the increased difficulty of breaking the wall of Gram-positive bacteria, and because ribosomal sedimentation coefficients differ according to the investigated species. The method discussed here allows for the separation of polysomes, ribosomes monomers, and subunits in a single sucrose gradient. The purity of each fraction is checked using agarose gel electrophoresis. The polysomes and 70S monosomes are then visualized using electron microscopy. We are able to reveal the translational functions of the polysomal fractions, supporting the use of polysomes as handy biotechnological tools. We also show that the isolated ribosome fractions can be used to detect specific mRNA and nascent proteins, as well as ribosome-associated proteins and small regulatory RNA (sRNA) during *S. aureus* translation. The technique presented here will be applied to the purification and use of polysomes, 70S ribosomes, and 50S and 30S subunits from different *S. aureus* clinical isolates, allowing us to employ various technologies to evaluate the overall translational processes at play in this important human pathogen.

2. Materials and methods

Polysomes are very sensitive to ribonuclease (RNase) cleavages [19]. RNase-free equipment and materials are thus essential throughout this protocol. It is particularly important to use ultrapure (Milli-Q) or RNase-free water during buffer preparations, and then to purify it using 0.22 μm filters.

2.1. S. aureus strains, plasmids, and genetic constructions

Polysome and ribosome enrichment is performed in two *S. aureus* strains, N315 [20] and HG003 [21]. The HG003 strain overexpresses a flagged version of δ-hemolysin using pCN35 plasmid vector containing a chloramphenicol resistance cassette [22]. For strain construction, the *rnaIII* sequence plus 248 nt upstream and 296 nt downstream is added with a 3xFLAG within the δ-hemolysin sequence upstream from its termination codon. This 1126 nt long fragment, with flanking EcoRI and PstI restriction sites, is then inserted into pCN35. The resulting plasmid is transformed into the *S. aureus* RN4220 shuttle strain and then into HG003, which contains the endogenous RNA III promoter.

2.2. Polysome enrichment

2.2.1. S. aureus cell extract preparation

Grow the bacteria at 37 °C in TSB medium (Thermo Fisher, Dardilly, France). According to our research, bacterial growth can be performed in impoverished medium. Nevertheless, low-nutrient mediums such as chemically defined medium (CDM) are not recommended, as the final amount of polysomes will be too low.

To increase the proportion of translating ribosomes that are located in the polysomal fraction, we encourage you to harvest cells during the exponential phase of growth (OD_{600} of 2). Moreover, cells should be frozen as quickly as possible to prevent the accumulation of 70S monomers, which would in turn decrease the polysome count [23]. We recommend translation stalling by immediate freezing at −80 °C or with liquid nitrogen. After cell harvesting, all steps must be carried out on ice or at +4 °C (in a cold room). Use the antibiotic chloramphenicol [6,24] to increase the proportion of purified polysomes. If the strains carry a '*cat*' resistance gene, substitute the same concentration of tetracycline for this antibiotic [6].

The protocol described here is for the *S. aureus* N315 strain, which is grown in TSB medium.

(1) Grow *S. aureus* cells in 1 L of TSB medium at 37 °C, with shaking, until the exponential phase.
(2) Block protein synthesis suddenly with 100 μg/ml chloramphenicol, immediately transferring the bacterial suspension into centrifuge bottles that have been stored at −80 °C.
(3) Centrifuge the cells at 4500 rpm for 15 min at 4 °C until they pellet.
(4) Discard the supernatant and re-suspend the pellets in 10 ml ice-cold polysome profile buffer (PPB) (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NH_4Cl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 100 μg/ml chloramphenicol) [11].
(5) Centrifuge at 4500 rpm for 15 min at 4 °C.
(6) Discard the supernatant and immediately freeze the pellets at −80 °C until they are frozen enough that they can subsequently be broken.

2.2.2. Cell lysis and polysome isolation

In cold lysates, polysomes are stable, whereas from whole intact cells they are usually converted into ribosomes [23]. Thus for the purposes of this protocol, we must avoid lysostaphin, usually used to lyse *staphylococci* cell walls. Instead this is replaced by manual crushing of the frozen cells, using a chilled mortar. Note that a French press cannot be used on pathogenic bacteria due to aerosol production and user contamination concerns.

At the end of this step, the 'S21 extract' pellet corresponds to the 'S30 extract' obtained by centrifugation at 21,000*g* instead of 30,000*g* [25].

Please cite this article in press as: R. Brielle et al., Methods (2016), http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.10.003

(1) Using a mortar previously stored at −80 °C, crush the frozen pellets with alumina powder (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) until it has the consistency of a homogeneous paste.
(2) Re-suspend the broken cells with 4 ml of PPB, and vigorously mix the suspension for 20 s.
(3) Add 2 µl DNase 1 (Life Technologies, Courtaboeuf, France) to the suspension.
(4) Incubate on ice for 10 min with regular agitation.
(5) Pellet the bacterial cell debris and alumina powder by centrifugation at 21,000*g* (13,200 rpm) for 5 min at 4 °C, using a Sorvall SS-34 rotor and an RC 6 ultracentrifuge (Thermo Fisher, Osterode am Harz, Germany).
(6) Filter the supernatant containing the polysomes and the ribosomes with a 0.45 µm membrane.

Note that if you want to stop here, the S21 extracts can be stored at −80 °C without altering the polysomal profiles [19].

2.2.3. Polysome and ribosome fractionations

In this step, polysomes, 70S ribosomes, and the dissociated 50S and 30S ribosomal subunits are separated into sucrose gradients prepared with a sucrose-supplemented PPB. For an optimal profile resolution, the gradient must be handled as gently as possible, and should be kept at 4 °C for 4–16 h before use. To avoid gradient saturation and a poor resolution, we recommend loading less than 60 OD_{260} units.

The sucrose gradients are adjusted and adapted according to the strain to obtain an optimal separation of the different ribosomal fractions.

Note that sucrose gradients allow for the isolation and enrichment of ribosomal fractions, but the obtained fractions are only enriched and not pure.

(1) Prepare enough linear sucrose gradients to load all of the ribosome suspension with a gradient maker in a 26.3 mL tube (#355618; Beckman Coulter) which will fit into a 50.2 Ti Rotor.
   a. Pour 12 mL of the 40% sucrose solution into the mixing chamber of the gradient maker with a magnetic stir bar. Stir at moderate speed to prevent bubbles in the solution.
   b. Add 12 mL of the less concentrated solution in sucrose: 18% sucrose solution to the N315 strain, 25% sucrose solution to the HG003 one.
   c. Insert the gradient maker's output tubing into the top of the tube so that it does not contact the gradient. The solution should run along the tube's side to avoid disrupting the sucrose gradient.
   d. Pump only the 40% sucrose solution slowly, until it reaches 1 cm high at the bottom of the tube.
   e. Open the connection between the two chambers and continue to pump the solutions at a normal speed.
(2) Gently load up to 60 OD_{260} units of S21 extracts at the top of the sucrose gradients.
(3) Use a 50.2 Ti Rotor precooled to +4 °C and an L90K ultracentrifuge (Beckman Coulter, Villepinte, France) to centrifuge the gradients at 131,000*g* (33,000 rpm) for 3 h at 4 °C.
(4) Fractionate the gradients in the cold room (+4 °C), collecting 500 µl per fraction using an ÄKTA protein purification system (GE Healthcare, Orsay, France). To identify the polysomes, 70S ribosomes, and the 50S and 30S subunit peaks, determine the OD_{254} absorbency profile of each of the gradient fractions (Figs. 1A, SA1).
(5) Separately concentrate the polysome, monomer, and subunit fractions to a final volume of ~500 µL using 10 kDa Centricon centrifugal filter units (Dutscher, Brumath, France) as per the manufacturer's recommendations.
(6) Remove the sucrose by performing two successive washes with sucrose-free PPB.
(7) Wash the membranes of the centrifuge filter unit in order to collect each sample, then freeze the samples at −80 °C.

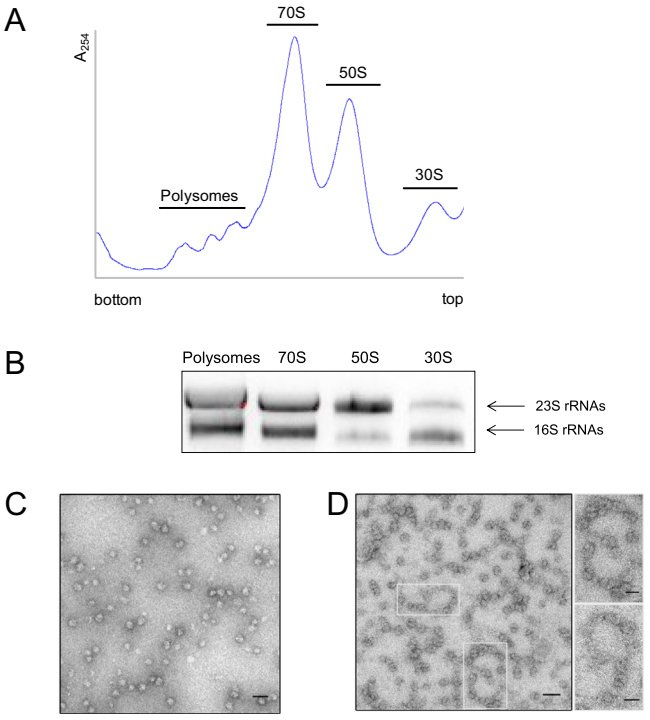


Fig. 1. Fractionation and monitoring of polysomes, 70S, and dissociated 50S and 30S subunits isolated from the *Staphylococcus aureus* N315 strain. (A) FPLC profiles of ribosomal fractions analyzed by sucrose gradient separation of cell extracts on 18–40% linear sucrose density gradients. The absorption profile was measured at 254 nm. The graph corresponds to one of the three ribosomal fractions profiled. (B) Each fraction indicated in the profile is pooled, rinsed, concentrated, and then checked by agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide. 23S rRNA refers to the 50S subunit enrichment, and 16S rRNA to the 30S subunit enrichment. (C and D) Electron micrographs of 70S ribosomes (C) and polysomes (D) negatively stained with 2% uranyl acetate. Scale bars: 50 nm; 25 nm in the inserts. All the experiments were performed in triplicate.

2.3. Quality control of the polysome fractions

2.3.1. Agarose gel electrophoresis of the ribosomal fractions

(1) Mix 1 µg of the samples with loading dye buffer to a final concentration of 1X.
(2) Load and migrate samples on 1% agarose gel supplemented with ethidium bromide.
(3) Use an ultraviolet transilluminator to visualize the 23S and 16S rRNA of the various ribosomal fractions (Figs. 1B, SA2).

2.3.2. Electron microscopy imaging of the S. aureus polysomes and ribosomes using negative staining

In electron microscopy, the interaction of an electron beam with the sample generates an amplitude contrast that is proportional to the mass of the specimen atoms. In biology, samples mostly consist of low-mass atoms and thus have weak diffusion power. Negative staining involves adding heavy metal salts, as they have strong diffusion power. The stain surrounds the samples, but is excluded from the volume they occupy. Therefore the stained specimens appear white and are outlined by the stain's shading.

Negative staining is particularly useful for determining the purity of biological specimens and to evaluate their heterogeneity. Advantages of this method include the fact that samples can be easily and rapidly prepared, and high contrast results.

(1) Dilute the *S. aureus* 70S or polysome samples to the appropriate concentration (40 ng/μL) with the PPB.
(2) To render the films hydrophilic before use, perform a glow discharge on 300 mesh copper grids coated with collodion and carbon (Delta Microscopies, Mauressac, France).
(3) Lay a fresh sheet of parafilm on the bench. For each grid, prepare three drops of distilled water and one drop of 2% uranyl acetate aqueous solution.
(4) Put a 4 μL drop of this diluted sample onto the collodion-carbon grid and hold the grid with tweezers for 60 s to adsorb the particles on the film. Next, remove most of the solution with filter paper.
(5) Wash the grid by successively touching the surface with three drops of distilled water.
(6) Remove the excess water from the grid with a filter paper.
(7) Leave the grid on a drop of stain for 20 s.
(8) After 20 s, remove the excess stain using a filter paper.

We acquired transmission electron microscopy images using a Tecnai Sphera operating at 200 kV (FEI, Eindhoven, Netherlands) equipped with a 4 × 4 k CCD UltraScan camera (Gatan, Pleasanton, USA) (Figs. 1C–D, SA3-4). This equipment is part of the MRic microscopy platform at BIOSIT (Rennes, France).

2.4. Assessing polysome functionality

2.4.1. In vitro translation assays using purified S. aureus polysomes

We tested the activity of the polysomes extracted using our protocol by setting up an *in vitro* translation assay. This consists of running cell-free translation reactions to produce a model protein. It is essential to remove all trace of antibiotics before starting this test, because the antibiotics used during polysome enrichment will stall translation [26].

(1) Concentrate each fraction, S21 and polysome, to a final volume of ~50 μL using 10 kDa Centricon centrifugal filter units, as per the manufacturer's recommendations.
(2) Rinse twice with S30 buffer (10 mM Tris-acetate pH 8, 14 mM Mg-acetate, 60 mM K-acetate, 1 mM DTT).
(3) Wash the membranes of the centrifuge filter units to collect each sample.
(4) Initiate *in vitro* translation of δ-hemolysin, which is used as a model polypeptide. The assay is performed using [^{35}S]-methionine and the '*E. coli* S30 extraction system for linear templates' (Promega, Charbonnière Les Bains, France), following the manufacturer's instructions and replacing *E. coli* S30 extracts with the different purified *S. aureus* samples.
(5) To the translation products, add Tris-Tricine sample buffer to a final concentration of 1X (0.75% SDS, 7.5% glycerol, 0.0125% Coomassie blue, 37.5 mM Tris HCl pH7).
(6) Load the samples onto a 16% Tris-Tricine-SDS-PAGE gel.
(7) Vacuum dry the gel after its migration.
(8) Expose the gel with a screen and scan it with a Typhoon FLA 9500 Phosphor Imager (GE Healthcare, Freiburg, Germany) (Fig. 2A–B).

2.4.2. RNA extraction and RT-qPCR analyses

Check for the presence of RNA (mRNAs and sRNAs) in each ribosomal fraction through reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR). Results are normalized against the 5S ribosomal RNA (rRNA) and the 16S rRNA relative to amount of 50S subunits or 30S subunits, respectively. Both controls should be used to compare all fractions, including the 50S and 30S subunits (Figs. 2C, SB1). These procedures will indicate RNA enrichments in the different fractions, but a precise quantitative analysis is not possible.

(1) Extract the total RNA using a phenol-chloroform RNA extraction protocol (adapted from Cheung *et al.* [27]).
(2) Degrade any putative contaminant DNA from 2 μg RNA extract using amplification-grade DNase I enzyme (Life Technologies).
(3) Synthesize the complementary DNA (cDNA) using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies).
(4) Perform RT-qPCR using a RealMasterMIX SYBR Kit (5′PRIME, Life Technologies) on a StepOnePlus Real-Time PCR system (GE Healthcare, Saint Aubin, France). The DNA primers we used are listed in Table 1.
(5) Use the comparative ΔΔCt method to normalize the amount of detected mRNA and sRNA against the 5S and 16S rRNA references.

Table 1
Sequences of the DNA primers used to detect mRNAs and sRNAs.

RNA being detected	Primers	Sequences, 5′ → 3′
spa mRNA	ProtA-F2	GGATGAAACCATTGCGTTGTTC
	ProtA-R2	AAACGAATCTCAAGCACCGAAA
sarA mRNA	SarA-F	CGTAATGAGCATGATGAAAGAACT
	SarA-R	TGTTTGCTTCAGTGATTCGTTT
sbi mRNA	Sbi-F2	GTTGGGGCAGCAACAATTAC
	Sbi-R2	TTTCACTCGCTTTTGCTTCC
RNA III sRNA	RNAIII-F	GAATTTTGTTCACTGTGTCGATAATCCATTT
	RNAIII-R	GAAGGAGTGATTTCAATGGCACAAGATAT
SprD sRNA	SprD-F	ATTGATTTGGAAAGCGCAAA
	SprD-R	TATTGCTCCTTTTCGGGCTA
tmRNA	tmRNA-F	CACTCTGCATCGCCTAACAG
	tmRNA-R	GATTTGAACCCGCGTCCAG

2.4.3. Protein extraction and Western blot analysis

Check for the presence of proteins in the ribosomal fractions by using Western blots with specific polyclonal antibodies.

(1) Concentrate the samples to a final volume of 50 μL using 10 kDa Centricon centrifugal filter units, as per the manufacturer's recommendations.
(2) Add Tris-Tricine sample buffer to a final concentration of 1X (0.75% SDS, 7.5% glycerol, 0.0125% Coomassie blue, 37.5 mM Tris HCl pH7).
(3) Separate the samples onto 16% Tris-Tricine-SDS-PAGE gel.
(4) Transfer the separated samples from the gel onto Hybond PVDF membranes (Dutscher).
(5) Block the membranes with 5% milk.
(6) Incubate the membranes with the appropriate primary and secondary antibodies.
(7) Develop the blots using an ECL Plus Kit (Dutscher) and scan it with an LAS 4000 imager (GE Healthcare, Freiburg, Germany).
(8) Perform, in parallel of the Western blot, a loading control of all the samples by Coomassie Blue staining (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

3. Results and discussion

Isolation of polysomes is very important for studying the molecular basis of translation, the structures of active ribosomes, and the overall translatome of any organism. Here, we propose a detailed procedure for the *in vitro* isolation and validation of the

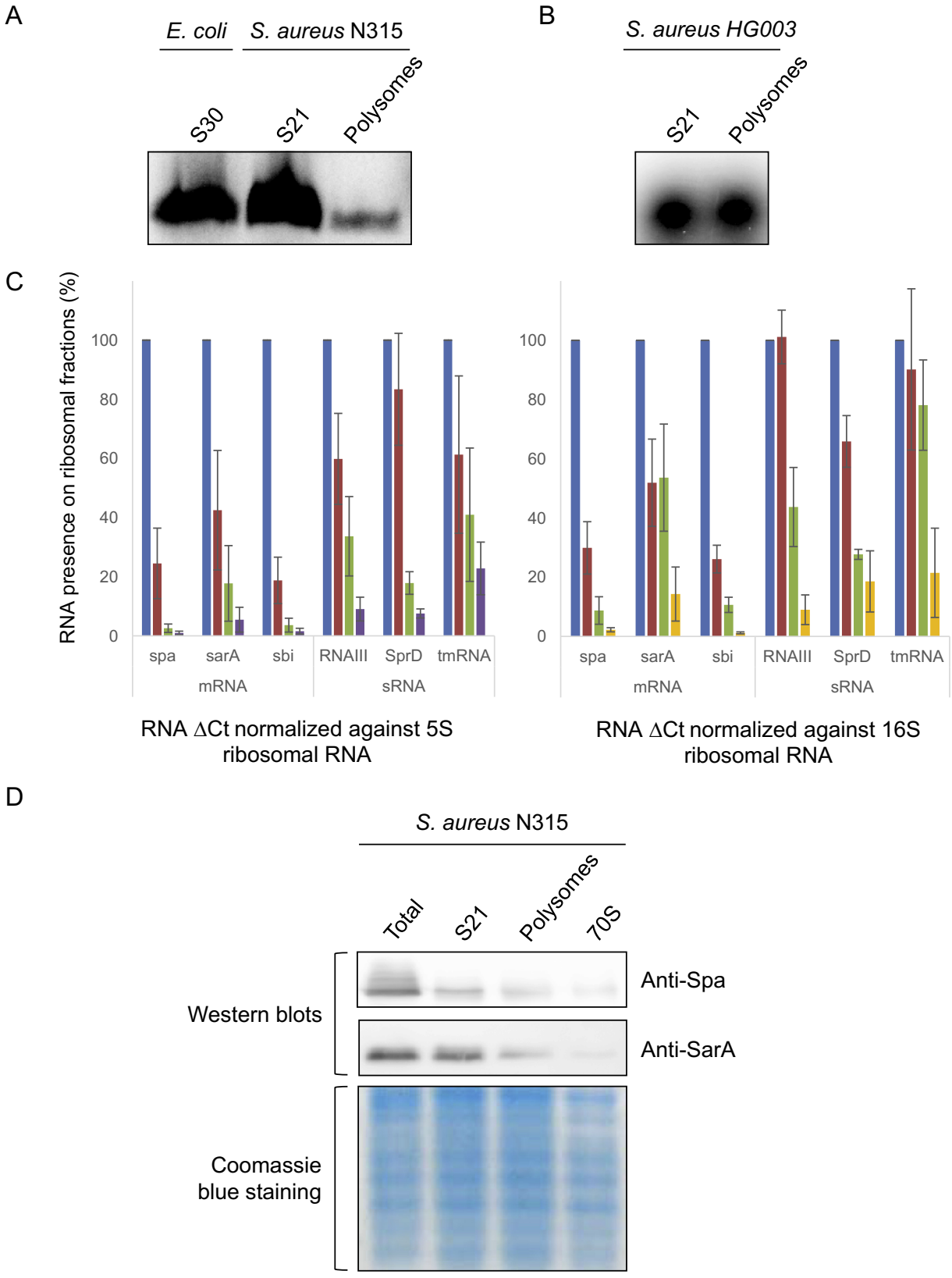


Fig. 2. Validation of *Staphylococcus aureus* polysome translation activity. *In vitro* translation assays on N315 (A) and HG003 (B) strains showed that *Staphylococcus aureus* S21 and polysomes are functional. Scans from a phosphoimager are presented here. *Escherichia coli* S30 extracts from the assay kit were used as positive controls. The δ-hemolysin peptide produced was encoded by *S. aureus* RNA III. (C) RT-qPCR analysis showing the presence of three mRNAs and three sRNAs in ribosomal fractions. This is expressed as percentages and compared to their presence in the total fraction (blue), arbitrarily set to 100% and is the mean ± SD of two independent experiments. Polysomal fractions are red, 70S are green, 50S are purple, and 30S are yellow. The 50S ribosomal subunit is compared to 5S rRNA, and the 30S is compared to 16S rRNA. (D) Immunoblotting detection of translated proteins or proteins associated to the polysomal and ribosomal fractions. Anti-Spa and anti-SarA antibodies were used to identify the translated proteins *in vivo* in the enriched fractions. Coomassie blue staining was used as loading control. The experiments were performed twice.

Please cite this article in press as: R. Brielle et al., Methods (2016), http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.10.003

translational activity of polysomes coming from a Gram-positive pathogen, *S. aureus*.

In this method, two *S. aureus* strains, wild-type N315 and HG003 expressing a flagged version of δ-hemolysin, are first cultivated until the logarithmic phase, when the amount of polysomes is optimal [23]. The δ-hemolysin is encoded by multifunctional RNAIII [28] which regulates *agr* quorum-sensing and is involved in *S. aureus* virulence [29]. Sucrose gradient centrifugation is used to separate polysomes, 70S ribosomes, and the two ribosomal subunits according to their sedimentation coefficients. Studies have shown that structure of bacterial ribosomes reveals species-specific but not yet strains-specific features [2,15]. However, during our studies, we demonstrate that to obtain an optimal separation of the fractions, the sucrose percentage in the gradients must be adjusted according to the *S. aureus* strain. This result suggests putative disparities between polysomes and/or ribosomes of the two *S. aureus* strains, maybe due to mutations in some of the ribosomal proteins. The ribosomal profiles are obtained by measuring absorbency at 254 nm. Peak assignments are shown in Fig. 1A for strain N315, and in Fig. SA1 for strain HG003. As expected, the polysome fraction represents only a small part (∼5%) of the total ribosomal fraction (Figs. 1A, S1). This is due to part of ribosomes that end translation and dissociate from their mRNA templates at all steps of fractionation [23].

The purity of the previously pooled and concentrated ribosomal fractions is monitored by agarose gel electrophoresis. As shown in Figs. 1B and SA2, both 23S and 16S rRNAs are observed in the polysome and ribosome fractions, with 23S enriched in the 50S subunit, and 16S rRNA in the 30S one. After negative staining, transmission electron microscopy is used to monitor the purity of the polysomes and 70S ribosomes (Figs. 1C–D, SA3–4). In Figs. 1C and SA3, the 70S ribosome enrichment is confirmed by the presence of isolated structures in which, according to their orientation, both the large and small ribosomal subunits are detected. In contrast, the higher-density sucrose gradient fraction contains mostly polysome chains habitually composed of 5–6 ribosomes, with few isolated ribosomes (Figs. 1D, SA4). Together, these biochemical and structural data show the enrichment quality of each ribosomal fraction.

To investigate the efficiency of the purified polysomes in protein synthesis, we set up an *in vitro* translation assay focusing on the RNAIII-encoded δ-hemolysin, using both the *S. aureus* S21 and the polysome fractions. As shown in Fig. 2A–B, both have comparable translational activity to that of the *E. coli* S30 extract, used as a positive control. Interestingly, the functioning of the S21 extracts and polysomes suggests their possible utility in cell-free translation systems. The S21 extracts are particularly needed, as they provide a rapid, efficient, and inexpensive *in vitro* translation method for *S. aureus* [30,31]. Moreover, the purified 70S ribosomes and the ribosomal subunits could be used for other *in vitro* translational techniques such as dot blots, toeprint [16] or footprint assays. Using in-house preparations of *S. aureus* ribosome extracts, instead of commercial products, has the advantage of ensuring the use of the same strain background, and allows for the customization of cell extracts for specific applications through the utilization of genetically modified strains [25].

To demonstrate the translational activity of our purified polysomes, we monitored the ongoing synthesis of two immunoglobulin-binding proteins *in vivo*, Spa [32] and Sbi [33], as well as the transcription factor SarA [34]. These three proteins are expressed in *S. aureus*, and their expression levels were monitored by RT-qPCR (for mRNA) and Western blots (for proteins). As shown in Fig. 2C, *spa*, *sbi* and *sarA* mRNAs are more detected in the polysome fraction than within the 70S ribosome or subunit fractions of the N315 *S. aureus* strain. Next, we showed that the Spa and SarA proteins are detected within the total, S21, and polysome fractions (Fig. 2D). A very low signal is also observed in the 70S fraction, but this is probably due to contamination from the polysomal fraction. Nevertheless, in the HG003 *S. aureus* strain, we observed the association of RNAIII and δ-hemolysin in the polysome and 70S fractions (Fig. SB1–2). This difference can be explained because, as it was recently shown in *Saccharomyces cerevisiae*, polysomes contribute to the translation of mRNA that encode for abundant proteins (e.g. Spa and SarA for our study), while, the 70S monosomes mainly contribute to the translation of small RNA with short open reading frames (e.g. δ-hemolysin for our study) [4]. Together, these results give *in vivo* validation for the enrichment of the polysome fractions from two different *S. aureus* strains, one clinical isolate (N315) and one reference strain (HG003). The co-purification of mRNAs and their respective proteins with the polysome fractions also suggests that these proteins are actively translated by our purified polysomes. We cannot rule out, however, that the Spa and SarA proteins could potentially co-purify with the various ribosome fractions, whereas this is unlikely since both proteins are not involved in protein synthesis.

The purified polysomes provide a snapshot of translation activity in *S. aureus* cells at a given moment and during specific environmental conditions. They can be powerful tools for the visualization of mRNAs being translated and synthesized proteins. Ribosome-binding proteins and sRNAs interacting with the ribosomes can also be studied [35,36]. Here, we have confirmed *in vivo* the presence of the *trans*-translation effector transfer-messenger RNA (tmRNA) [37] and the SprD regulatory RNA [38] into the ribosomal fractions. We have also shown that both are more detected into the polysomal fraction (Fig. 2C).

During polysomal profiling, the RNA bound onto polysomes can be monitored by Northern blots or by RT-qPCR, as done here, or by deep RNA-sequencing for global studies. Similarly, the proteins being translated can be monitored by Western blots or by proteomics for large-scale studies. Most genome-wide studies focusing on translation have compared the translational status of mRNA in various strains and/or during different experimental conditions. Global mRNA profiling in the polysomal fractions allows for mapping, ribosomal occupancy (i.e. percentage of an individual RNA species located in a polysomal fraction), and ribosomal density (i.e. number of ribosomes per mRNA unit length) on all the expressed mRNAs [39]. In many bacteria, after ribosome fractionation one can perform ribosomal profiling, which is based on deep RNA sequencing of the ribosome-protected mRNA fragments (RPFs) that remain after RNase I treatment [40]. As recently done with *S. aureus* [17], this global assessment of translation at near nucleotide-resolution allows both for the accurate establishment of the ribosomal positioning on the translated mRNAs, and provides the ribosomal density for each mRNA being translated. Two variants of the technique were developed: profiling of initiating ribosomes; and profiling of elongating ribosomes [9]. Polysomal and ribosomal profiling are complementary approaches, bridging the technological gap between the transcriptome and the proteome [41], thus deepening our understanding of the molecular basis of translation.

Cryo-electron microscopic (cryo-EM) and X-ray crystallographic structures of isolated ribosomes from many bacterial and eukaryotic species in various states are available. Polysomal fractions isolated according to their sedimentation coefficients can therefore be used for in-depth structural studies of *S. aureus* ribosomes in complex with mRNA or sRNA. The crystallographic structure of the large ribosomal subunit from *S. aureus* shows structural motifs that are unlike any in nonpathogenic bacteria. These motifs constitute potential targets for the design of drugs working selectively against this deadly pathogen, which is unfortunately notorious for its multi-drug resistant strains [1,13,15]. Indeed, as protein-synthesizing factories, ribosomes represent privileged targets for a large and diverse array of antibiotics currently in use [1].

Please cite this article in press as: R. Brielle et al., Methods (2016), http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.10.003

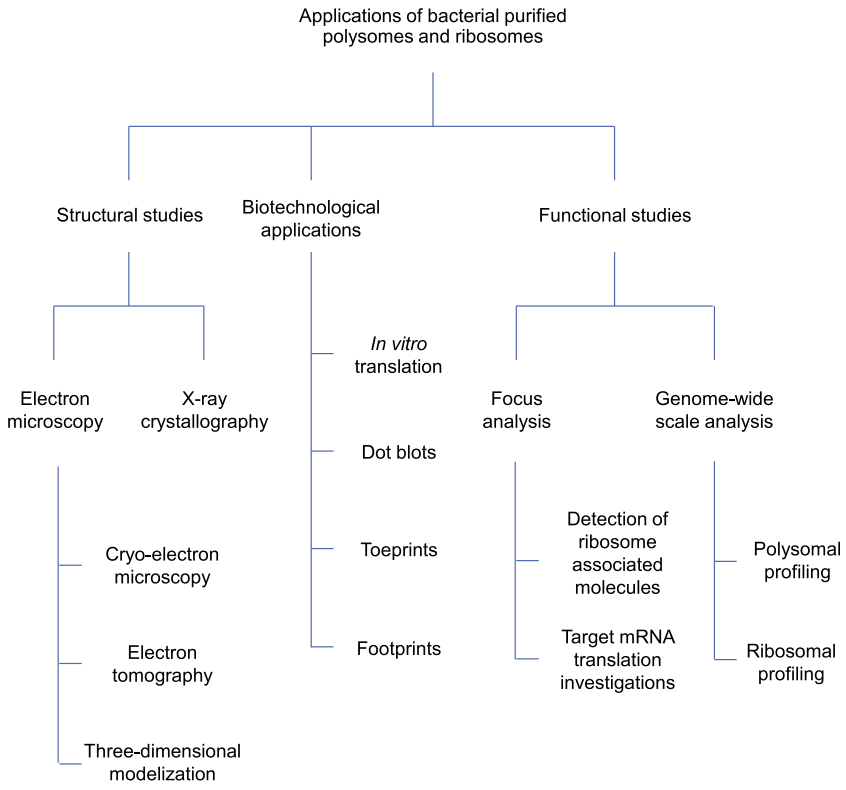


Fig. 3. Diagram of possible applications for the use of isolated and active *Staphylococcus aureus* polysomes and ribosomes. *S. aureus* polysomes and ribosomes can be studied structurally via electron microscopy or X-ray crystallography. Small- and large-scale functional studies of these useful molecules can also be done. Finally, they can also be used as biotechnological tools to improve numerous well-known studies.

Crystallographic and cryo-EM studies of isolated ribosomes provide essential structural information about the many antibiotic-ribosome complexes, giving insights into the mechanisms of action of the antibiotics at the atomic level [15,42]. On the other hand, due to their intrinsic structural heterogeneity, little is known about the three-dimensional (3D) organization of ribosomes in the context of polysomal translation [11,43]. However, recent advances in cryo-EM techniques have yielded new ways to describe the 3D organization of large macromolecular complexes such as polysomes [44–46]. Recent data such as this whets our appetite for future structural studies focusing on polysomes. These should allow us to elucidate, at atomic resolution, the interactions between physiologically active ribosomes with antibiotics or any other molecules, such as sRNAs and proteins [42].

To conclude, the techniques described can be used as guidelines for preparing biological tools for the study of how the major pathogen *S. aureus* synthesizes its proteins, including many virulence factors (Fig. 3). Purified polysomes and ribosomes can be used to highlight the translation of dedicated mRNAs as well as the presence of essential ribosome-binding proteins and sRNAs. This paves the road for large-scale translatomic studies that should provide essential information about *S. aureus* physiology and how this commensal bacteria becomes pathogenic. This data will be a great help for the development of new antibacterial strategies specific to this widespread human pathogen, which would represent a major public health breakthrough.

Acknowledgments

We thank A. Eyraud for the plasmid overexpressing the flagged δ-hemolysin and J. Berland for help with editing. We received financial support from the universities of Rennes, Bern, and Sherbrooke, as well as from the National Institute of health and medical research (Inserm), the National Center of Scientific Research (CNRS), the School of Pharmacy and Medical Sciences of Rennes University, and the French Medical Research Foundation (FRM).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.10.003.

References

[1] D.N. Wilson, Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance, Nat. Rev. Microbiol. 12 (1) (2014) 35–48.
[2] D. Sohmen, S. Chiba, N. Shimokawa-Chiba, C.A. Innis, O. Berninghausen, R. Beckmann, K. Ito, D.N. Wilson, Structure of the *Bacillus subtilis* 70S ribosome reveals the basis for species-specific stalling, Nat. Commun. 6 (2015) 6941.
[3] H. Noll, The discovery of polyribosomes, BioEssays 30 (11–12) (2008) 1220–1234.
[4] E.E. Heyer, M.J. Moore, Redefining the translational status of 80S monosomes, Cell 164 (4) (2016) 757–769.
[5] F. Picard, H. Milhem, P. Loubiere, B. Laurent, M. Cocaign-Bousquet, L. Girbal, Bacterial translational regulations: high diversity between all mRNAs and major role in gene expression, BMC Genomics 13 (2012) 528.
[6] K. Nakahigashi, Y. Takai, M. Kimura, N. Abe, T. Nakayashiki, Y. Shiwa, H. Yoshikawa, B.L. Wanner, Y. Ishihama, H. Mori, Comprehensive identification of translation start sites by tetracycline-inhibited ribosome profiling, DNA Res. 23 (3) (2016) 193–201.
[7] G.Y. Fisunov, D.V. Evsyutina, A.A. Arzamasov, I.O. Butenko, V.M. Govorun, Profiling of *Mycoplasma gallisepticum* ribosomes, Acta Nat. 7 (4) (2015) 107–112.
[8] F. Mohammad, C.J. Woolstenhulme, R. Green, A.R. Buskirk, Clarifying the translational pausing landscape in bacteria by ribosome profiling, Cell Rep. 14 (4) (2016) 686–694.
[9] H.A. King, A.P. Gerber, Translatome profiling: methods for genome-scale analysis of mRNA translation, Brief Funct. Genomics 15 (1) (2016) 22–31.
[10] M.C. Rivera, B. Maguire, J.A. Lake, Purification of polysomes, Cold Spring Harb. Protoc. 2015 (3) (2015) 303–305.

[11] N. Cougot, A.E. Molza, J. Delesques, E. Giudice, A. Cavalier, J.P. Rolland, G. Ermel, C. Blanco, D. Thomas, R. Gillet, Visualizing compaction of polysomes in bacteria, J. Mol. Biol. 426 (2) (2014) 377–388.
[12] S. Guha, J. Szulmajster, Analysis of ribosomal protein conformation in *Bacillus subtilis* by reductive methylation. Identification of proteins with different conformation in monosomes and polysomes, FEBS Lett. 118 (1) (1980) 103–108.
[13] L. Thomer, O. Schneewind, D. Missiakas, Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* bloodstream infections, Annu. Rev. Pathol. 11 (2016) 343–364.
[14] N. Nakasone, T. Kawata, K. Masuda, Electron microscopic demonstration and isolation of ribosomes in mesosomes from *Staphylococcus aureus*, Microbiol. Immunol. 31 (1) (1987) 35–44.
[15] Z. Eyal, D. Matzov, M. Krupkin, I. Wekselman, S. Paukner, E. Zimmerman, H. Rozenberg, A. Bashan, A. Yonath, Structural insights into species-specific features of the ribosome from the pathogen *Staphylococcus aureus*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 112 (43) (2015) E14–E5805.
[16] P. Fechter, C. Chevalier, G. Yusupova, M. Yusupov, P. Romby, S. Marzi, Ribosomal initiation complexes probed by toeprinting and effect of trans-acting translational regulators in bacteria, Methods Mol. Biol. 540 (2009) 247–263.
[17] A. Basu, M.N. Yap, Ribosome hibernation factor promotes Staphylococcal survival and differentially represses translation, Nucleic Acids Res. 44 (10) (2016) 4881–4893.
[18] M. Ueta, C. Wada, A. Wada, Formation of 100S ribosomes in *Staphylococcus aureus* by the hibernation promoting factor homolog SaHPF, Genes Cells 15 (1) (2010) 43–58.
[19] E.Z. Ron, R.E. Kohler, B.D. Davis, Polysomes extracted from *Escherichia coli* by freeze-thaw-lysozyme lysis, Science 153 (3740) (1966) 1119–1120.
[20] K. Kuwahara-Arai, N. Kondo, S. Hori, E. Tateda-Suzuki, K. Hiramatsu, Suppression of methicillin resistance in a mecA-containing pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain is caused by the mecI-mediated repression of PBP 2′ production, Antimicrob. Agents Chemother. 40 (12) (1996) 2680–2685.
[21] S. Herbert, A.K. Ziebandt, K. Ohlsen, T. Schafer, M. Hecker, D. Albrecht, R. Novick, F. Gotz, Repair of global regulators in *Staphylococcus aureus* 8325 and comparative analysis with other clinical isolates, Infect. Immun. 78 (6) (2010) 2877–2889.
[22] E. Charpentier, A.I. Anton, P. Barry, B. Alfonso, Y. Fang, R.P. Novick, Novel cassette-based shuttle vector system for gram-positive bacteria, Appl. Environ. Microbiol. 70 (10) (2004) 6076–6085.
[23] D. Qin, K. Fredrick, Analysis of polysomes from bacteria, Methods Enzymol. 530 (2013) 159–172.
[24] D. Moazed, H.F. Noller, Chloramphenicol, erythromycin, carbomycin and vernamycin B protect overlapping sites in the peptidyl transferase region of 23S ribosomal RNA, Biochimie 69 (8) (1987) 879–884.
[25] J.F. Zawada, Preparation and testing of *E. coli* S30 in vitro transcription translation extracts, Methods Mol. Biol. 805 (2012) 31–41.
[26] D.N. Wilson, On the specificity of antibiotics targeting the large ribosomal subunit, Ann. N. Y. Acad. Sci. 1241 (2011) 1–16.
[27] A.L. Cheung, K.J. Eberhardt, V.A. Fischetti, A method to isolate RNA from gram-positive bacteria and mycobacteria, Anal. Biochem. 222 (2) (1994) 511–514.
[28] L. Janzon, S. Lofdahl, S. Arvidson, Identification and nucleotide sequence of the delta-lysin gene, hld, adjacent to the accessory gene regulator (agr) of *Staphylococcus aureus*, Mol. Gen. Genet. 219 (3) (1989) 480–485.
[29] R.P. Novick, H.F. Ross, S.J. Projan, J. Kornblum, B. Kreiswirth, S. Moghazeh, Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule, EMBO J. 12 (10) (1993) 3967–3975.
[30] P.M. McNicholas, D.J. Najarian, P.A. Mann, D. Hesk, R.S. Hare, K.J. Shaw, T.A. Black, Evernimicin binds exclusively to the 50S ribosomal subunit and inhibits translation in cell-free systems derived from both gram-positive and gram-negative bacteria, Antimicrob. Agents Chemother. 44 (5) (2000) 1121–1126.
[31] R.W. Murray, E.P. Melchior, J.C. Hagadorn, K.R. Marotti, Staphylococcus aureus cell extract transcription-translation assay: firefly luciferase reporter system for evaluating protein translation inhibitors, Antimicrob. Agents Chemother. 45 (6) (2001) 1900–1904.
[32] A. Forsgren, U. Forsum, Role of protein A in nonspecific immunofluorescence of *Staphylococcus aureus*, Infect. Immun. 2 (4) (1970) 387–391.
[33] L. Zhang, K. Jacobsson, J. Vasi, M. Lindberg, L. Frykberg, A second IgG-binding protein in *Staphylococcus aureus*, Microbiology 144 (Pt 4) (1998) 985–991.
[34] A.L. Cheung, S.J. Projan, Cloning and sequencing of sarA of *Staphylococcus aureus*, a gene required for the expression of agr, J. Bacteriol. 176 (13) (1994) 4168–4172.
[35] J. Gebetsberger, M. Zywicki, A. Kunzi, N. Polacek, TRNA-derived fragments target the ribosome and function as regulatory non-coding RNA in *Haloferax volcanii*, Archaea 2012 (2012) 260909.
[36] A. Pircher, K. Bakowska-Zywicka, L. Schneider, M. Zywicki, N. Polacek, An mRNA-derived noncoding RNA targets and regulates the ribosome, Mol. Cell 54 (1) (2014) 147–155.
[37] E. Giudice, K. Mace, R. Gillet, Trans-translation exposed: understanding the structures and functions of tmRNA-SmpB, Front. Microbiol. 5 (2014) 113.
[38] S. Chabelskaya, O. Gaillot, B. Felden, A *Staphylococcus aureus* small RNA is required for bacterial virulence and regulates the expression of an immune-evasion molecule, PLoS Pathog. 6 (6) (2010) e1000927.
[39] X. Qin, S. Ahn, T.P. Speed, G.M. Rubin, Global analyses of mRNA translational control during early *Drosophila* embryogenesis, Genome Biol. 8 (4) (2007) R63.
[40] A.L. Starosta, J. Lassak, K. Jung, D.N. Wilson, The bacterial translation stress response, FEMS Microbiol. Rev. 38 (6) (2014) 1172–1201.
[41] A.M. Michel, P.V. Baranov, Ribosome profiling: a Hi-Def monitor for protein synthesis at the genome-wide scale, Wiley Interdiscip. Rev. RNA 4 (5) (2013) 473–490.
[42] S. Arenz, D.N. Wilson, Blast from the past: reassessing forgotten translation inhibitors, antibiotic selectivity, and resistance mechanisms to aid drug development, Mol. Cell 61 (1) (2016) 3–14.
[43] F. Brandt, S.A. Etchells, J.O. Ortiz, A.H. Elcock, F.U. Hartl, W. Baumeister, The native 3D organization of bacterial polysomes, Cell 136 (2) (2009) 261–271.
[44] Z.A. Afonina, A.G. Myasnikov, V.A. Shirokov, B.P. Klaholz, A.S. Spirin, Conformation transitions of eukaryotic polyribosomes during multi-round translation, Nucleic Acids Res. 43 (1) (2015) 618–628.
[45] F. Brandt, L.A. Carlson, F.U. Hartl, W. Baumeister, K. Grunewald, The three-dimensional organization of polyribosomes in intact human cells, Mol. Cell 39 (4) (2010) 560–569.
[46] G. Viero, L. Lunelli, A. Passerini, P. Bianchini, R.J. Gilbert, P. Bernabo, T. Tebaldi, A. Diaspro, C. Pederzolli, A. Quattrone, Three distinct ribosome assemblies modulated by translation are the building blocks of polysomes, J. Cell Biol. 208 (5) (2015) 581–596.

4. Article 4: « Ribosome grab by a small RNA decelerates translation and triggers bacterial persistence »

Après avoir mis au point l'enrichissement des différentes fractions ribosomales y compris des polysomes chez *S. aureus*, nous avons analysé par RT-qPCR la présence de SprF1 et de *sprG1* dans la fraction des polysomes, des ribosomes et des sous-unités 50S et 30S extraits de la souche N315 WT. Nous avons confirmé l'absence de l'ARNm *sprG1* aux ribosomes *in vivo* et validé la spécificité de la méthode en montrant également l'absence d'un autre petit ARN exprimé par *S. aureus*, SprB, utilisé ici comme contrôle négatif (**Figure 1A, article 4**). En revanche, les résultats montrent qu'une part significative de l'ARN SprF1 présent dans la bactérie est associée aux polysomes *in vivo* et dans une moindre mesure aux ribosomes (**Figure 1A, article 4**).

Pour déterminer le site de fixation de SprF1 sur les ribosomes, de nouveaux tests de Dot blot ont été réalisés avec l'ARN SprF1 radiomarqué et chacune des sous-unités du ribosome dissociées ou associées en ribosome 70S. Les résultats montrent que l'ARN SprF1 fixe préférentiellement le ribosome 70S avec une constante de dissociation comparable à celle d'un ARNm, mais qu'il peut également se fixer aux deux sous-unités dissociées (**Figure 1C, article 4**). Nous avons également montré que l'addition d'un ARNm canonique n'empêche pas l'association de SprF1 aux ribosomes, suggérant une forte affinité de SprF1 pour ce complexe macromoléculaire (**Figure 1D, article 4**). Nous avons également montré que SprF1 inhibe d'environ 40% de la fixation de l'ARNm canonique sur les ribosomes 70S (**Figure 1E, article 4**).

La présence de SprF1 aux polysomes et aux ribosomes suggère que SprF1pourrait être capable de réguler la traduction globale des protéines chez *S. aureus* et pas uniquement la traduction de la toxine *sprG1*. Pour mettre en évidence le rôle de SprF1 sur la traduction, nous avons réalisé des tests de traduction *in vitro* en utilisant des extraits ribosomaux de *E. coli*. Les résultats montrent que SprF1, contrairement à SprB, est capable d'inhiber significativement et de manière dose dépendante la synthèse protéique *in vitro* (**Figures 2A-2B, article 4**).

Nous avons ensuite voulu déterminer l'étape de la traduction ciblée par SprF1. Pour étudier le rôle de SprF1 dans l'inhibition de l'initiation de la traduction, un test de traduction *in vitro* en utilisant des extraits ribosomaux de *E. coli*, de la méthionine-[^{35}S], de l'ARNt^{fMet} et de la puromycine, un antibiotique capable uniquement d'inhiber l'étape de l'élongation de la traduction (Yamashita *et al.*, 2014), a été adapté pour évaluer l'effet de SprF1 sur la

formation du complexe d'initiation de la traduction. L'incorporation de méthionine-[^{35}S] dans les complexes d'initiation est analysée par Dot blot. Les résultats montrent que SprF1 inhibe la formation du complexe d'initiation à un niveau comparable à celui de la Streptomycine, un antibiotique inhibant l'étape d'initiation de la traduction (Tai PC, Wallace BJ, Davis BD. Proc Natl Acad Sci U S A. 1978) (**Figure 2C, article 4**) suggérant que SprF1 inhibe l'étape d'initiation de la traduction. Afin de montrer l'effet inhibiteur de SprF1 *in vivo* sur la traduction globale de *S. aureus*, nous avons réalisé un test de marquage métabolique en mesurant l'incorporation de la méthionine-[^{35}S] dans les protéines nouvellement synthétisées. Pour cette expérience, nous avons analysé les phénotypes de souches N315 exprimant différents niveaux de SprF1 : WT et ΔΔ complémentées ou non avec pCN35Ω*sprF1* ou pCN35Ω*sprG1*/*sprF1.* Les souches ont été incubées 3 heures à 37°C. Les résultats montrent une inhibition de la traduction globale pour les souches WT, ΔΔ+pCN35Ω*sprF1* et ΔΔ+pCN35Ω*sprG1*/*sprF1,* en condition de stress hyperosmotique, contrairement à la souche ΔΔ (**Figure 2D, article 4**). Ces résultats indiquent que SprF1, *via* son association aux polysomes, est capable d'inhiber la traduction globale de *S. aureus*. Pour mieux connaître les mécanismes moléculaires impliqués dans l'inhibition de la synthèse protéique globale, nous avons déterminé la structure secondaire de SprF1 par probing, révélant trois tiges boucles (H1-L1 à H3-L3) (**Figure 3, article 4**). La structure primaire montre que SprF1 possède deux séquences SD putatives suivie par une ORF. Cependant, actuellement aucune traduction de SprF1 n'a été mise en évidence (Pinel-Marie *et al.*, 2014) suggérant que SprF1 ne serait pas traduit. Nous pouvons penser que la présence de ces séquences SD et de ces ORF permettrait à SprF1 de piéger les ribosomes. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé un toeprint sur le complexe ternaire d'initiation de la traduction qui inclut les ribosomes purifiés, l'ARNt^{fMet} initiateur et SprF1. Deux toeprints ont été mis en évidence : le premier au niveau du codon d'initiation putatif et le deuxième au niveau du codon de terminaison de la deuxième ORF putative (**Figure 4A, article 4**). Nous avons ensuite transcrit *in vitro* les deux fragments 3'- et 5'-SprF1 où les deux RBS putatifs sont localisés sur le fragment 5'-SprF1. Comme attendu, nous avons observé par Dot blot et par traduction *in vitro* que seul le fragment 5'-SprF1 était capable de s'associer aux ribosomes et d'inhiber la traduction globale de manière comparable à l'ARN SprF1 (**Figures 4B-4C, article 4**). Ces résultats suggèrent que SprF1 serait capable de se fixer aux ribosomes par l'intermédiaire de deux RBS localisés dans son extrémité 5' dans le but de bloquer la traduction globale, probablement en réponse à un stress environnemental.

Nous avons donc testé l'impact de différents stress rencontrés par *S. aureus* au cours de l'infection, c'est-à-dire les stress oxydant, osmotique et acide, sur l'expression des deux

ARN *sprG1* et SprF1 et des peptides $PepG1_{44}$ et $PepG1_{31}$ par Northern blot et Western blot (**Figure 3, partie 1 ; Figures 5A-5B-5C, article 4**). Les résultats montrent une augmentation significative de l'expression des ARN SprF1 et *sprG1* en condition de stress osmotique. En revanche, aucun des stress testés n'a eu d'incidence sur l'expression des peptides $PepG1_{44}$ et $PepG1_{31}$. De plus, l'absence du STA *sprG1*/SprF1 n'impacte pas la croissance de la bactérie dans ces conditions de stress (**Figure 5C, article 4**). Nous avons ensuite poursuivi nos investigations sur le stress hyperosmotique et nous avons montré par RT-qPCR que la surexpression de SprF1 en condition de stress hyperosmotique est dose dépendante avec une induction maximale à une concentration de 1M de NaCl (**Figure 5D, article 4**).

Nous avons alors voulu vérifier l'hypothèse selon laquelle SprF1 inhiberait la traduction globale en réponse au stress hyperosmotique. Nous avons donc analysé par RT-qPCR la localisation de SprF1 et de *sprG1* dans les différentes fractions ribosomales en fonction de l'exposition ou non de la bactérie à un stress hyperosmotique. Les résultats montrent que non seulement l'expression de SprF1 est induite au cours d'un stress hyperosmotique mais également que SprF1 est proportionnellement deux fois plus associé aux polysomes (**Figures 6A-6B, article 4**). Malgré le fait que l'expression de l'ARN *sprG1* est induite lors du stress hyperosmotique, nous n'avons également pas mis en évidence d'association de *sprG1* aux polysomes et aux ribosomes dans cette condition de stress (**Figure 6A, article 4**). Pour mettre en évidence le rôle de SprF1 sur la traduction en condition de stress hyperosmotique, nous avons de nouveau réalisé un test de marquage métabolique. Pour cette expérience, nous avons analysé les phénotypes de souches N315 exprimant différents niveaux de SprF1 : WT et ΔΔ complémentées ou non avec pCN35Ω*sprF1* ou pCN35Ω*sprG1*/*sprF1.* Les souches ont été incubées 3 heures à 37°C en présence ou non de NaCl 1M. Nous avons observé par Northern blot une induction de l'expression de SprF1 lors du stress hyperosmotique contrairement à l'expression de *sprG1* qui est diminuée, suggérant que 3h après le stress hyperosmotique SprF1 serait de nouveau capable de réguler l'expression de *sprG1* (**Figure 6C, article 4**). Les résultats présentés en Figure 6D montrent une inhibition de la traduction globale pour les souches WT et ΔΔ+pCN35Ω*sprF1*, avec un effet moins important pour la souche ΔΔ+pCN35Ω*sprG1*/*sprF1,* en condition de stress hyperosmotique, contrairement à la souche ΔΔ (**Figure 6D, article 4**). Ces résultats indiquent que SprF1, *via* son association aux polysomes, est capable d'inhiber la traduction globale de *S. aureus* lorsque la bactérie est confrontée à un stress hyperosmotique.

Les bactéries persistantes sont une fraction de la population bactérienne pour laquelle la traduction est fortement inhibée (Cho *et al.*, 2015, Kwan *et al.*, 2013). De plus, le

stress hyperosmotique a déjà été impliqué dans la formation de bactéries persistantes chez d'autres espèces de Staphylocoques (Onyango *et al.*, 2013). Pour mettre en évidence le rôle putatif de SprF1 dans la formation de bactéries persistantes au cours d'un stress hyperosmotique, nous avons mesuré le taux de survie des souches N315 WT et ΔΔ complementées ou non avec pCN35Ω*sprF1* ou pCN35Ω*sprG1*/*sprF1* cultivées en milieu TSB dilué au 1/10 puis exposées ou non 30 minutes à 1M de NaCl. Ce taux de survie correspond au pourcentage de bactéries persistantes capables de survivre à une exposition de 24h en présence d'une concentration de 1,6 *µ*g/ml de ciprofloxacine, correspondant à 40 fois la concentration minimale inhibitrice (CMI) (**Figure S3, article 4**). Les résultats montrent, dans un premier temps, qu'une concentration en NaCl de 1M est suffisante pour induire le phénomène de persistance chez *S. aureus* (**Figure 7A, article 4**). Nous avons également montré que la souche surexprimant uniquement SprF1 a un pourcentage de bactéries survivantes plus important que les souches WT et ΔΔ complémentée ou non par pCN35Ω*sprG1*/*sprF1*, suggérant un rôle de SprF1 dans l'entrée de *S. aureus* en état de persistance au cours d'un stress hyperosmotique.

Conclusion

L'ensemble de ces résultats suggèrent que lorsque les conditions de croissance sont optimales, SprF1 agit comme l'antitoxine de *sprG1*. Dans cette condition, SprF1 inhibe *sprG1* au niveau ARN et traductionnel par appariement de bases au niveau de leur zone de chevauchement, à leurs extrémités 3' respectives (Pinel-Marie *et al.*, 2014). En revanche, en condition de stress hyperosmotique, SprF1 s'associe directement aux ribosomes par deux RBS localisés à son extrémité 5', laissant ainsi l'ARN *sprG1* s'accumuler dans la cellule pendant un temps donné (<3h). Sur le ribosome, SprF1 aurait un rôle de régulateur traductionnel général, inhibant ainsi la synthèse de l'ensemble des protéines y compris des peptides $PepG1_{44}$ et $PepG1_{31}$ (**Figure 54**). Il interviendrait notamment dans l'inhibition de l'étape d'initiation de la traduction, favorisant ainsi l'entrée de *S. aureus* en état de persistance. L'ensemble de ces résultats fait l'objet d'un article : « Ribosome grab by a small RNA decelerates translation and triggers bacterial persistence » **Régine Brielle**[1] and Marie-Laure Pinel-Marie[1] et Brice Felden, en cours de préparation. ([1]co-auteurs)

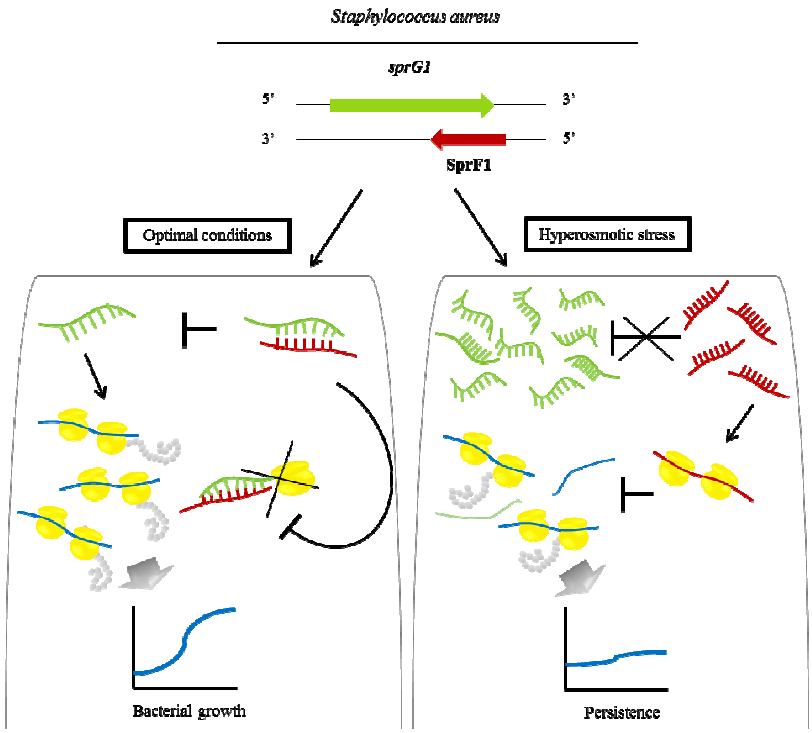


Figure 54 : Modèle hypothétique résumant les connaissances actuelles sur les mécanismes d'action et les fonctions de SprF1. *S. aureus*, exprime deux gènes chevauchants *sprF1* (rouge) et *sprG1* (vert), codant respectivement une antitoxine et une toxine de type I fonctionnelles. L'ARN SprF1 s'apparie parfaitement avec la toxine *sprG1* qu'il inhibe au niveau ARN et traductionnel, la traduction générale est mainetnue (ex d'un ARNm en bleu) pour laisser la bactérie croître, en condition optimale de croisance. Cepdendant, en condition de stress hyperosmotique, l'ARN SprF1 est surexprimé mais ne semble pas réguler le niveau cellulaire d'ARNm *sprG1* au cours des trois premières heures. Il s'associe directement aux ribosomes (jaune), par l'intermédiaire de deux RBS (ribosomes-binding site) et inhibe jusqu'à 30% de la traduction globale pour favoriser l'entrée de la bactérie en persistence.

Article IV

Ribosome grab by a small RNA decelerates translation and triggers bacterial persistence.

Régine Brielle[1] and Marie-Laure Pinel-Marie[1] and Brice Felden

En préparation

Ribosome grab by a small RNA decelerates translation and triggers bacterial persistence

Régine Brielle[*], Marie-Laure Pinel-Marie[*$], and Brice Felden[$]

Inserm U835 Pharmaceutical Biochemistry, Rennes University, 2 av Prof. Léon Bernard, Rennes, France.

[*] Joint first authorships

[§] Corresponding author: bfelden@univ-rennes1.fr; marie-laure.pinel@univ-rennes1.fr

Abstract

Persisters are quiescent bacteria associated with chronic infections and antibiotic tolerance, two major health issues. The molecular mechanisms underlying persistence are, for the most part, unknown. We report that an RNA antisense from a type I toxin-antitoxin system, SprF1 (srn_3830) expressed by the human pathogen *Staphylococcus aureus*, associates with polysomes and ribosomes to slow down protein synthesis. SprF1 interacts with the 70S ribosomes by contacting the large and small subunits, with an affinity comparable to canonical mRNAs. SprF1 blocks translation initiation on these ribosomes and could reduce the pool of active ribosomes in the bacteria. Osmotic stress increases SprF1 expression that binds and recruits ribosomes, in turn reducing general translation that induces bacterial persistence. These findings provide a novel role for an RNA antitoxin and a molecular process for persister formation in a leading pathogen.

Introduction

Bacterial drug resistance is dramatically escalating in magnitude. Persisters constitute a subpopulation of genetically identical, metabolically slow-growing (dormant) bacteria which are refractory to antibiotic treatment, implicated in recurrent human infections (Kaldalu, Hauryliuk et al. 2016). Persisters survive the treatment by bactericidal antibiotics without harboring a specific antibiotic resistance determinant (Balaban 2011). Persister formation can be induced by environmental stresses, such as starvation, intracellular residence or osmotic stress (Gerdes 2016). Tackling persistence, however, is a serious challenge because these cell types are extremely difficult to study and, consequently, little is known about their physiology and the factors that lead to their emergence (Balaban, Gerdes et al. 2013). Toxin-antitoxin (TA) modules are prevalent in networks underlying persistence, and their analysis enables predictions about the factors controlling persistence (Rotem, Loinger et al. 2010).

Nearly all bacteria and archaea encode TA modules. Although not essential for normal cell growth, they are linked to various roles in cell physiology including plasmid maintenance, stress response, persistence, protection from phage infection and virulence (Fernandez-Garcia, Blasco et al. 2016; Patel 2016). They express toxin proteins that interfere with vital cellular functions, and are counteracted by antitoxins. The activity of toxins is tightly regulated in a variety of ways (Otsuka 2016). TAs are intracellular time bombs which, when activated, can temporarily disable their bacterial host from the inside. Dependent on the chemical nature of the antitoxins, proteins or RNAs, and how they control toxin activity, TA systems are divided into six different types. TA systems play central roles in the persister state, but an overall view from the external signals involved to the molecular mechanisms inducing reversible dormancy is lagging behind. Targeting TA systems for antimicrobial discovery, possibly representing 'druggable' targets, is investigated (Page and Peti 2016).

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) is a Gram positive commensal, colonizing about one third of the world's human population. It is also the etiologic agent of many diseases, from superficial infections to life-threatening sepsis, causing substantial morbidity and mortality by multi-drug resistant strains (DeLeo, Otto et al. 2010). It is a leading cause of bacteremia and infective endocarditis as well as osteoarticular, skin and soft tissue, pleuropulmonary, and device-related infections (Tong, Davis et al. 2015). Its versatility depends on its

ability to sense and respond to environmental changes by modulating gene expression, using transcription factors (TFs) and regulatory small RNAs (sRNAs). Many of these virulence regulators are essential for infection (Priest, Rudkin et al. 2012). The expression of *S. aureus* virulence factors is tightly controlled by multiple regulators, including TFs, two-component systems and sRNAs (Bronesky, Wu et al. 2016), including TA modules.

TA systems are present in *S. aureus* (Schuster and Bertram 2016), and were originally identified through their role in plasmid maintenance in *E. coli*. Research on type I TA systems in *S. aureus* was promoted by the identification of ~160 regulatory RNAs (sRNAs), all gathered into the SRD database (Sassi, Augagneur et al. 2015). Many sRNAs with a known function act by antisense pairings at or around the ribosome binding site to modulate translation initiation, but sRNAs can also bind the coding sequence of the 3'-UTRs (Wagner and Romby 2015). Among a number of postulated TA loci in the *S. aureus* genome, only two type I TA systems have been experimentally demonstrated and characterized in this organism: the *sprA1*/*sprA1*$_{AS}$ (Sayed, Jousselin et al. 2011) and *sprG1*/*sprF1* (Pinel-Marie, Brielle et al. 2014) type I TA pairs, that are post-transcriptionally regulated by RNA antitoxins, and encode cell damaging peptides. Under normal growth conditions, antitoxins potently inhibit the activities of the toxins. In contrast, under stress conditions, the antitoxins are selectively degraded, freeing the toxins to inhibit essential cellular processes, such as DNA replication and protein translation. This inhibition results in rapid growth arrest that is reversed when growth returns to normal.

Our report provides substantial experimental evidences indicating that under stress, the mechanism of action of a type I TA system, expressed by a major human pathogen, is directed by an antitoxin RNA that interacts with the bacterial polysomes to reduce translation, to swap into persistence. These findings are original because the usual regulatory mechanisms for antisense sRNAs are inhibition of translation initiation by direct binding with target mRNAs. Here, we show that upon osmotic stress, the SprF1 RNA antisense binds to ribosomes, to shut down the overall *S. aureus* protein synthesis, in turn initiating persistence. Despite accumulating under osmotic stress, toxic *sprG1* mRNA does not interact with the ribosomes and the toxin is not produced. This is an unprecedented function for an antisense RNA, and also for an antitoxin that is part of a TA system.

Materials and methods

Strains, plasmids, media and bacterial growth

Bacterial strains, plasmids and primers are listed in Table S1. Strains were grown overnight in tryptic soy broth (TSB, Thermo Fisher, Dardilly, France) diluted to 1/10th. The cultures were diluted to OD_{600} of 0.1 and were grown at 37°C with shaking at 160 rpm in TSB diluted to 1/10th until DO_{600} of 1, corresponding to the exponential growth phase. At this time, bacterial suspensions were divided in two: in the first one, fresh TSB 1/10 + 5M NaCl was added to a final concentration of NaCl 1M; in the other one, the same volume of fresh TSB 1/10 without NaCl was added. According to the experiment, bacterial growths were resumed for 15, 30 min or 3h under osmotic stress. For strains carrying resistance genes, chloramphenicol was used only in the pre-cultures at 10 μg/ml. Cell growth was monitored by measuring OD_{600}.

Experimental conditions under stress

Strains were grown overnight in TSB with chloramphenicol at 10 μg/ml for strains carrying resistance genes. The cultures were diluted to 1/100 in TSB at 37°C and shaked at 160 rpm to OD_{600} of 1, where bacterial suspensions were divided to add the different stresses. HCl to reach a pH of 4.5 for acid stress; NaCl at 0.5 M for osmotic stress; H_2O_2 at 10 mM for the oxidant stress. After the stress agents' addition, bacterial growth was resumed during 15 min before harvesting cells by centrifugation followed by storage at -80°C.

Polysome and ribosome extractions, enrichment and analysis

After bacterial growth with or without osmotic stress (see media and growth conditions), polysomes were extracted and enriched, as published (Brielle, Pinel-Marie et al. 2016). Total RNA were harvested just after bacterial growth. The ribosome-associated RNAs were purified and used for RT-qPCR analyses.

RNA extractions, Northern blots and qPCR

After *S. aureus* growth with or without stress, bacteria were pelleted and mechanically lysed through beads beating in phenol pH 4 and lysis buffer (SDS 0.5%, sodium acetate 20 mM, EDTA 1 mM, pH 5.5). RNAs were extracted by phenol/chloroform/isoamyl-alcohol (PCI) RNA extraction protocol (Cheung, Eberhardt et al. 1994). For Northern blot assays, RNAs were separated on denaturing 8% PAGE and electro-transferred onto a Zeta probe GT membrane (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) in 0.5× TBE buffer (90 mM Tris/90 mM boric acid/2 mM EDTA). Specific ^{32}P probes (Table S2) were hybridized with ExpressHyb solution (Ozyme, Saint-Quentin-en- Yvelines, France) overnight on the membranes that were washed twice in 2X SSC + 0.05% for 10 min and once in 0.1X SSC + 0.1% SDS for 10 min, exposed and scanned with a PhosphorImager (Molecular Dynamics, GE Healthcare, Saint Aubin, France). The counts were normalized to the 5S rRNAs, used as controls. For Real Time quantitative PCR (RT-qPCR), putative contaminant DNA was degraded from 2 μg RNA extract using amplification-grade DNase 1 enzyme (Life technologies, Courtaboeuf, France). The complementary DNAs (cDNAs) were synthesized using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, Courtaboeuf, France). RT-qPCR was performed using a RealMasterMix SYBR Kit (5'PRIME, Life Technologies, Courtaboeuf, France) on a StepOnePlus Real-Time PCR system (GE Healthcare, Saint Aubin, France). The DNA primers used are listed on Table S2. We have used the comparative cycle threshold ($\Delta\Delta$Ct) method to normalize the amount of detected RNA against the 5S and 16S rRNA references.

Protein extractions and Western blots

For protein extractions, bacterial pellets were suspended, in equivalent cells quantities, in lysis buffer (50 mM Tris-EDTA, pH 7.7, 5 mM $MgCl_2$, 90 μg/ml lysostaphin), incubated for 15 min at 37 °C, then transferred onto ice and protease inhibitor cocktail (Roche, Basel, Switzerland) was added before sonication. Equal amounts of total proteins were loaded for Western blots. The samples were separated on 16% Tris-tricine-SDS-PAGE gel, stained by imidazole-zinc method (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) as loading control and transferred on Hybond-P PVDF membrane (Dutscher, Brumath, France). After blocking, membranes were incubated with the mouse monoclonal anti-FLAG® M2-Peroxidase (HRP) antibody (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France).

After washing, Imidiazole-zinc staining and transfer membrane were revealed using the Amersham ECL Plus detection Kit and scanned with the LAS4000 imager (GE-Healthcare, Saint Aubin, France).

Transcription, RNA labeling and structural probing in solution

All the RNAs used in this study were transcribed from PCR-amplified templates using N315 genomic DNA and forward primers containing a T7 promoter sequence (Table S2). PCR-generated DNA was used as a template for transcription using a MEGAscript T7 kit (Ambion, Foster City, USA). For the transcription of the canonical mRNA, template was produced by annealing the primers listed on Table S2. RNAs were gel-purified, eluted, and ethanol precipitated. 5'-end labeling of RNAs was performed as described (Antal, Bordeau et al. 2005). Structural analysis of SprF1 were prepared by incubating 0.5 pmol of labeled SprF1 into binding buffer (80 mM K-HEPES pH 7.5, 4 mM $MgCl_2$, 330 mM KCl) 20 min at 30°C. Digestions with the V_1 and S_1 nucleases and lead acetate (V_1 at 5.10^{-5} unit; S_1 at 5 units; lead acetate at 1 mM) were performed for 10 min at 30°C in the presence of 1 μg of total tRNA from yeast. Digestions with the U_2 and T_1 ribonucleases (U_2 at 0.01 unit; T_1 at 0.25 unit) were performed for 15 min at 50°C in the presence of 1 μg of total tRNA from *yeast*. Reactions were stopped, ethanol precipitated and the pellets were re-suspended with loading buffer II (Ambion, Foster City, USA). The digestion products were loaded and separated on a urea 8% PAGE gel. The gel was dried prior exposition onto a screen. The solution structure of SprF1 was determined using alkaline ladder performed by incubating labeled SprF1 with 50 mM sodium bicarbonate (pH 9) for 3 min at 75°C. The results were analyzed on a PhosphorImager.

Filter binding assays

Binding studies of SprF1 onto purified ribosomes or ribosomal subunits were performed using a dot blot-filtering device. For the experiments, 1 pmol of 5'-[^{32}P]-end-labeled synthetic RNAs, SprF1, SprG1, RNAIII and a canonical mRNA with the sequence 5'- GGCAAGGAGGUAAAAAUGUUUAAACGUAAAUCUACU-3' as positive controls, and SprB as negative control, were incubated in a binding buffer, containing 20 mM Tris-acetate (pH 7.5), 60 mM NH_4Cl, 1 mM DTT, for 1 min at 90°C and chilled on ice for 1 min. Renaturation was

performed in 10 mM $MgCl_2$ at 20°C for 15 min. Purified HG003 *S. aureus* ribosomal particles (70S, 50S or 30S) were diluted in the binding buffer in the presence of 1 mM $MgCl_2$ and activated for 15 min at 37°C. Then, 5 pmol of ribosomes were added, followed by 5 min incubation at 37°C and the $MgCl_2$ concentration was adjusted to 10 mM. For the competition experiments, unlabeled SprF1 or canonical *mRNA* were simultaneously added with ribosomes in the reactions. After 10 min at 37°C, 12.5 pmol of uncharged $tRNA^{fMet}$ were added and the samples were incubated for 15 min at 37°C. The final volume was set to 20 µl. After 5 min incubation on ice, the reactions were filtered through a nitrocellulose membrane (0.45 µm diameter, Dutscher, Brumath, France) using a vacuum device, followed by three washing steps with binding buffer. The membranes were air-dried prior exposition onto a screen. The results were analyzed on a PhosphorImager.

Toeprint assays

Annealing mixtures containing 0.15 pmol of unlabeled SprF1 and 1.5 pmol of labeled primer 'SprF1-AS' in 20 mM Tris-acetate (pH 7.5), 60 mM NH_4Cl and 1 mM DTT were incubated for 1 min at 90°C and quickly chilled on ice for 1 min. Renaturation proceeded in 10 mM $MgCl_2$ at 20°C for 15 min. The purified *E. coli* 70S ribosomes were diluted in the reaction buffer in presence of 1 mM $MgCl_2$, and then activated for 15 min at 37°C. For the toeprint assays, 1 to 5 pmol of 70S ribosomes were added to samples, followed by 5 min incubation at 37°C and the $MgCl_2$ concentration was adjusted to 10 mM. After 10 min at 37°C, 12.5 pmol of uncharged $tRNA^{fMet}$ were added and the samples incubated for 5 min at 37°C. The cDNAs were synthesized using two units of AMV RT (New England Biolabs, Ipswich, USA) for 15 min at 37°C. Reactions were stopped by adding 15 µl of loading buffer II (Ambion, Foster City, USA). The cDNAs were loaded and separated on a urea 8% PAGE gel. The gel was dried prior exposition onto a screen. The toeprint positions onto SprF1 were determined by DNA sequencing. The results were analyzed on a PhosphorImager.

Overall translation and translation initiation assays

In vitro translation of [^{35}S]-methionine was performed using an *E. coli* S30 Extract System for Linear Templates (Promega, Charbonnière Les Bains, France), following the manufacturer's instructions. The

pBEST*luc*™ vector was used as DNA template for the translation of luciferase and β-lactamase. Briefly, 1 μg of pBEST*luc*™ vector were incubated for 30 min at 37°C with or without SprF1 in a range of concentrations (1 to 5 μM), 10 μL of S30 premix, 7.5 μL of S30 extracts, 2.5 μL of amino acids without methionine, and 0.5 μL of [^{35}S]-methionine (5 μCi) in a final volume of 25 μL. The samples were placed 5 min on ice and loaded onto a 10% Tris-glycine-SDS-PAGE gel. After migration, the gel was air-dried, exposed with a screen and scanned with a Phosphor Imager. To monitor the formation of the initiation complex, reactions contained 7.5 pmol of RNA (RNAIII and canonical mRNA) or 0.15 μg of pBEST*luc*™, 25 pmol of tRNA^{fMet}, 0.5 μL of [^{35}S]-methionine (5 μCi), 5 μL S30 extracts, 1 μg/mL puromycin, and 7 μL S30 premix in a final volume of 20 μL. After 5 min of incubation at 37°C, SprF1 and Streptomycin were added at 4 μM and 5 μM, respectively. Samples were then incubated for 10 min at 37°C. After 5 min incubation on ice, the reactions were filtered through a nitrocellulose membrane (0.45 µm diameter, Dutscher, Brumath, France) using a vacuum device, followed by three washing steps with binding buffer. The membranes were air-dried prior exposition onto a screen. The results were analyzed on a PhosphorImager.

S. aureus cell labeling assays

The wild-type and *sprG1*/*sprF1*-deleted N315 *S. aureus* strains complemented with the pCN35 plasmid vector empty or overexpressed *sprG1* and/or SprF1 under the control of their endogenous promoter (Table S1) were grown in TSB medium (a 10-fold dilution) to a 0.1 (OD_{600}) density and were incubated 3h at 37°C with or without 1M NaCl and 0.5 μL of [^{35}-S]-methionine (5 μCi). The reaction was stopped 5 min on ice and the samples were loaded onto a 10% Tris-glycine-SDS-PAGE gel. After migration, the gel was fixed with 10% acetic acid and 30% ethanol, exposed with a screen and scanned with a Phosphor Imager. Then, the gel was washed twice with water and stained with Coomassie blue as loading control.

Ciprofloxacin MIC determination

The preculture of N315 *S. aureus* containing pCN35 vector strain in TSB medium was diluted in fresh medium to OD_{600} of 0.1. The ciprofloxacin minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by micro-dilution

technique in microplate at 37°C (Bergamini, 1996). The MIC value was recorded as the lowest antibiotic concentration at which there was no visible bacterial growth during a 24h exposure.

Persistence assays

After bacterial growth with or without osmotic stress (see the media and growth conditions), the overall bacterial population was monitored by successive dilutions in 9/1000 saline solution and plating onto BHI agar. To select persistent bacteria, 40 fold Ciprofloxacin MIC (1.6 μg/ml) was added to the bacterial suspensions which were re-incubated at 37°C with shaking at 160 rpm during 24h. The surviving cell population, referred as persistent cells, were monitored as the total population. The count of colony-forming units (CFU) of total and surviving bacteria was performed after 18h and 24h incubation's, respectively.

Statistical analyses

Data were expressed as mean ± SD of at least 2 independent experiments. Significant differences were evaluated using the Student's *t* test. $p<0.05$ was considered as statistically significant.

Results

SprF1 antisense, but not toxic SprG1 RNA, associates with polysomes and ribosomes *in vivo*.

To identify the molecular mechanisms of toxin *sprG1* (srn_3840) translation regulation by its SprF1 (srn_3830) antitoxin (Pinel-Marie, Brielle et al. 2014), the presence of *sprG1* and SprF1 on *in vivo* extracted polysomes, ribosomes and ribosomal subunits fractions was investigated in *S. aureus* strain N315 under growth in the absence of environmental triggers. Surprisingly, *sprG1* containing two internal open reading frames (ORFs) was not detected at the polysome and ribosome fractions, whereas the SprF1 antisense was associated with the polysomes, *e.g.* the ribosomes actively engaged in protein synthesis and, to a lesser extent, into the 70S fraction (Figure 1A). By comparing the RT-qPCR analysis for SprF1 in the total fraction (arbitrarily set to 100%), with the corresponding polysome fraction, ~20% was detected associated with the polysomes. However, both *sprG1* and SprB (srn_3600, an untranslated *S. aureus* sRNA used as negative control) RNAs do not associate with

either the polysomes or the 70S ribosomes (Figure 1A). These results demonstrate that whereas toxic *sprG1* RNA does not interact with the translating ribosomes, a significant proportion of cellular SprF1 is strikingly associated with the polysomes *in vivo*.

SprF1 interacts with specificity and affinity with the 70S ribosomes, as canonical mRNAs do.

To thoroughly investigate the association of SprF1 with ribosomes, radiolabeled synthetic SprF1 was incubated with purified *S. aureus* 70S ribosomes in a filter binding setup, using nitrocellulose membranes that retain the RNAs associated with ribosomes and nylon membranes that retain free RNAs. Multifunctional regulatory RNAIII, that expresses hemolysin δ, and a canonical mRNA (Gulnara et al, 2001) were used as internal positive controls. Both RNAs indeed efficiently associate with our purified 70S ribosomes from *S. aureus*, implying that the 70S ribosomes are functional for both canonical mRNA and translatable sRNA bindings. SprF1 associates with purified 70S ribosomes but not *sprG1* and SprB RNAs, highlighting binding specificity of SprF1 onto the 70S particles (Figure 1B). These *in vitro* results are consistent with the association of SprF1 with the polysomes *in vivo*. Interestingly, in the case of SprF1, no additional cellular macromolecules are required for 70S ribosome binding, whereas toxic *sprG1* RNA requires additional component(s). SprF1 preferentially binds the 70S monosomes but can interact with each of the two ribosomal subunits (Figure 1C). The estimated apparent binding affinity of SprF1 with purified *S. aureus* 70S ribosomes (K_d ~100 ±30 nM) is comparable to that for canonical mRNAs (K_d ~90 ±20 nM, Figure 1C). Interestingly, the combined addition of canonical mRNAs with labeled SprF1, at a one-to-one or ten-to-one mRNA/SprF1 molar ratios, does not alter the association of labeled SprF1 with the purified 70S ribosomes (Figure 1D). However, the combined addition of SprF1 with labeled canonical mRNAs, at a one-to-one or ten-to-one mRNA/SprF1 molar ratios, inhibits about 40% of the association of labeled labeled canonical mRNAs with the purified 70S ribosomes (Figure 1E). Altogether, these results imply that SprF1 should interact with the ribosomes and polysomes during protein synthesis.

SprF1 slows down protein synthesis *in vitro* and *in vivo* and interferes with translation initiation.

To understand the role of SprF1 on protein synthesis, we performed *in vitro* translation assays using *E. coli* S30 extracts in its presence. The addition of SprF1 significantly reduces, in a dose-dependent manner, luciferase and

β-lactamase mRNA translations, used as two reported genes (Figure 2A). The apparent IC_{50} (SprF1 concentration that inhibits half translation) for luciferase and β-lactamase translation were ~4.3 μM and ~4.2 μM, respectively. Compared to translation inhibitor chloramphenicol, used as positive control (Moazed, 1987), SprF1 activity on translation occurs at lower concentrations (Figure 2A). SprB, used as a negative control RNA, did not impact protein synthesis at concentrations identical to that of the IC50 of SprF1 (4 μM) (Figure 2B). Translation starts with mRNA binding onto the 30S ribosomal subunit, with $tRNA^{fMet}$ in the P site and the 50S subunit. To gain further insights about how SprF1 interferes with translation, an *in vitro* translation assay using *E. coli* S30 extracts, [^{35}S]-methionine, $tRNA^{fMet}$ and puromycin, a structural analogue of the aminoacyl-transfer RNA 3′ end that binds to and blocks the A site, was set up. [^{35}S]-methionine incorporation into these translation initiation complexes was determined by filter binding and compared to Streptomycin, as described (Tai, Wallace et al. 1978). SprF1 impairs initiation complex formation onto three RNAs, multifunctional RNAIII, as well as luciferase-encoded mRNA (pBESTluc) and short (MF36) mRNAs, as efficiently as Streptomycin does (Figure 2C). These results indicate that SprF1 can interfere with the early steps of protein synthesis. To assess if this increase of SprF1 influences the overall translation *in vivo*, metabolic labeling assays were conducted in *S. aureus* cells by measuring ^{35}S-Met incorporation into newly synthesized proteins. For these experiments, we analyzed the phenotypes of *S. aureus* N315 with various SprF1 expression levels: strains N315 and N315-Δ*sprG1*/*sprF1* strains complemented, or not, with pCN35Ω*sprF1* or pCN35Ω*sprG1*/*sprF1*. Strains were cultivated in TSB medium diluted 10-fold during 3h at 37°C. As shown in the Figures 2D and S1, the overall translation decelerates in strains N315 WT, N315-Δ*sprG1*/*sprF1* pCN35ΩsprF1 and N315-Δ*sprG1*/*sprF1* pCN35Ω *sprG1*/*sprF1*, all expressing SprF1. In strain N315-Δ*sprG1*/*sprF1* unable to express SprF1, translation is higher, probably because the lack of SprF1 expression cannot reduce protein synthesis. Altogether, these results indicate that SprF1, when associated with the polysomes, inhibits global translation in *S. aureus* cells.

SprF1 structure owns two ribosome binding sites and its 5'-section is essential to attenuate translation.

To understand the molecular mechanism underlying the inhibitory effect of SprF1 onto protein synthesis, SprF1 solution structure was analyzed in solution using structural probes. Chemical (lead acetate (II)) and enzymatic

probes (nuclease S_1 and RNase V_1) were used. Nuclease S_1 cleaves accessible single-stranded RNAs and RNase V_1 cleaves at RNA helices or at stacked nucleotides. As shown in Figure 3A, the presence of multiple V_1 cuts with no S_1 or lead cleavages supports the existence of three stems (H1 to H3). The existence of many S_1 and lead cleavages without V_1 cuts favors the existence of three loops (L1 to L3) and an extended single-strand stretch (from A_{68} to U_{99}). The solution probing data support a SprF1 structure as drawn in Figure 3B. SprF1 possesses a predicted Shine-Dalgarno (SD) sequence (A_9AAAAG_{14}) followed by an internal open-reading frame (ORF). Previous translation assays onto SprF1 (Pinel-Marie, Brielle et al. 2014) indicated that it is not translated. However, we assumed that this SD sequence, followed by an internal ORF, could allow ribosome loading. To test this hypothesis, toeprint assays were performed on ternary initiation complexes that included purified ribosomes, initiator $tRNA^{fMet}$, and SprF1. In the presence of increasing concentrations of SprF1, two ribosome toeprints were detected at positions G_{23} and A_{79} (Figure 4A). Ribosome toeprint at A_{79} probably corresponds to a predicted ORF starting at a $G_{62}UG_{64}$ initiation codon (Figure 3B), thus located 17nt downstream from the toeprint at A_{79}. The toeprint at position G_{23} is less understandable, implying that a second ribosome can load at the very 5'-end of SprF1.

Since the predicted nucleotide determinants for ribosome association are at the 5'end of SprF1 structure (from A_1 to A_{79}, Figure 3B), we split SprF1 structure in two, leading to 5'-SprF1 (A_1 to A_{79}) and 3'-SprF1 (A_{80} to A_{134}) RNAs (Figure 3B). Labeled 5'-SprF1, that contains two predicted ORFs, interacts with purified *S. aureus* 70S ribosomes, whereas 3'-SprF1 does not (Figure 4B). It provides experimental support for the requirement of the 5'-half of SprF1 for ribosome binding, whereas its 3'-portion is dispensable. Next, cell-free translation of luciferase and β-lactamase reporter constructs demonstrated that 5'-SprF1 significantly inhibits protein synthesis whereas 3'-SprF1 does not, reinforcing the functional importance of SprF1 5'-half on translation inhibition, but not its 3'-half (Figure 4C). Nevertheless, the translation attenuation of 5'-SprF1 is lower than that of full-length SprF1, implying that ribosome loading onto SprF1 is more efficient when its 3'-end is present. Altogether, these results suggest that SprF1, thanks to the presence of two predicted RBS embedded into its structure, can load ribosomes to attenuate protein synthesis, possibly in response to specific environmental stresses.

SprF1 expression is induced upon osmotic stress.

SprF1 interacts with polysomes and ribosomes, and attenuates protein synthesis. We conjectured that SprF1 expression in *S. aureus* cells might be regulated in response to specific environmental stress. Exploratory experiments were conducted to identify the environmental triggers that will influence SprF1 expression levels, as well as its cognate *sprG1* RNA toxin together with its associated encoded peptides, $PepG1_{31}$ and $PepG1_{44}$ (Pinel-Marie, Brielle et al. 2014). The experiments were implemented onto *S. aureus strains* N315, N315-*ΔsprG1/sprF1,* and complemented N315-*ΔsprG1/sprF1*-pCN35Ω*sprG1*-Flag (Pinel-Marie, Brielle et al. 2014). Chemical stress with either an oxidant (10 mM hydrogen peroxide), an osmotic stress (from 0.5 M to 2 M Sodium Chloride) or an acidic down-shift (lowering the pH from 7.5 to 4.5), for 30 min, were performed. Northern blot assays indicate that, compared to a control experiment without stress, SprF1 and *sprG1* expressions are both significantly induced under an osmotic stress (Figure 5, panels A and B). Immunoblots performed with anti-FLAG antibodies reveal that none of these three environmental variations influence the expression levels of flagged $PepG1_{31}$ and $PepG1_{44}$ peptides (Figure 5C). Under osmotic stress, the growth kinetics of the different strains indicate a slight growth defect for strain N315Δ*sprG1/sprF1,* compared to N315, that is reversed when the two RNAs are complemented *in trans* in strain N315-*ΔsprG1/sprF1*-pCN38*sprG1-sprF1* (Figure 5D). The increase of SprF1 expression during an osmotic stress is dose-dependent according to the NaCl concentration, up to a 4-fold induction at a 1M NaCl (Figure 5E).

SprF1 binding to the polysomes increases under osmotic stress to diminish protein synthesis

The putative functional connection between SprF1 expression induction upon osmotic stress, with its implication in bacterial translation, was investigated *in vivo*. Polysome profiling analyses and metabolic labeling assays were performed on meticillin-resistant strain N315, grown with and without an osmotic stress. The ribosomes were collected and purified in these two conditions, and the FPLC profiles were obtained by measuring absorbency at 254 nm (Figure 6A). The resulting fractions corresponding to the polysomes, 70S ribosomes, 50S and 30S ribosomal subunits were pooled, concentrated and their quality monitored by agarose gel electrophoresis. Both the 23S and 16S rRNAs were detected in the polysome and 70S fractions, as expected

(Figure 6A, bottom panels). The 23S rRNAs were enriched in the pooled fractions corresponding to the 50S subunits, and the 16S rRNAs in those corresponding to the 30S subunits, substantiating the FPLC separation of each fraction (Figure 6A, bottom panels). RT-qPCR assays monitoring the presence and amount of SprF1 in each fraction revealed that, with and without osmotic stress, SprF1 is preferentially detected in the actively translating polysomes and only a negligible fraction is associated with the 70S ribosomes or the ribosomal subunits. Interestingly, the amount of SprF1 associated with the polysomes increases under osmotic stress, compared to its quantity detected without increasing the osmolarity (Figure 6B). There is a ~two-fold increase of the amount of SprF1 located on the polysome fraction after NaCl addition (Figure 6B). To assess if this increase of SprF1 under hyperosmotic stress influences the overall translation *in vivo*, metabolic labeling assays were conducted in *S. aureus* cells by measuring ^{35}S-Met incorporation into newly synthesized proteins. For these experiments, we analyzed the phenotypes of *S. aureus* N315 with various SprF1 expression levels: strains N315 and N315-Δ*sprG1*/*sprF1* strains complemented, or not, with pCN35Ω*sprF1* or pCN35Ω*sprG1*/*sprF1*. Strains were incubated in the presence and absence of 1M NaCl during 3h at 37°C. Northern blot analysis confirmed that SprF1 expression is induced upon a 3h incubation with 1M NaCl in each *S. aureus* strain (Figure 6C). However, *sprG1* expression was diminished after 3h incubation with 1M NaCl, suggesting that the *sprG1* expression could be regulated by SprF1 3h after the hyperosmotic stress. When hyperosmolarity occurs, the overall translation decelerates in strains N315 and N315-Δ*sprG1*/*sprF1* pCN35Ω*sprF1*, both expressing SprF1. In strain N315-*ΔsprG1*/*sprF1* unable to express SprF1, translation is significantly higher, probably because the lack of SprF1 expression cannot reduce protein synthesis. In a complemented strain N315-*ΔsprG1*/*sprF1pCN35Ω sprG1*/*sprF1*, translation gets back to lower levels (Figures 6D-S1). Altogether, these results indicate that SprF1, when associated with the polysomes, inhibits global translation in *S. aureus* cells when osmolarity raises.

General translation drop under osmotic stress induced by SprF1 promotes *S. aureus* persistence.

Persister cells are not growing and dividing, and therefore are tolerant to many antibiotics (Cho, Rogers et al. 2015). In this fraction of the bacterial population, translation is switched off, compared with rapidly growing

cells (Cho, Rogers et al. 2015). *Staphylococci* persister formation is triggered by exposures to various conditions including osmotic challenges (Onyango, Hugh Dunstan et al. 2013). To investigate whether SprF1 influence persister formation during an osmotic stress, the percentage of surviving cells was measured in the N315 strains in which SprF1 expression is present, absent, or restored. Strains were cultivated with or without a 30 min 1M NaCl exposure. Survival rates were monitored after a 24h exposure of a 40-fold excess of ciprofloxacin relative to its minimal inhibitory concentration (MIC). Ciprofloxacin MIC was determined by the micro-dilution technique, and was estimated at ~0.04 μg/ml (Figure S4). In strain N315-pCN35, the percentage of persisters increases ~7-fold upon an hyperosmotic stress (Figure 7A). This result confirms that an osmotic stress significantly enhances *S. aureus* persister formation. To check if SprF1 is involved in this dramatic increase in the amount of persister cells, the percentage of surviving cells was monitored upon an osmotic stress in strains N315-pCN35, N315-Δ*sprG1*/*sprF1*-pCN35, N315-Δ*sprG1*/*sprF1*-pCN35Ω*sprF1* and N315-Δ*sprG1*/*sprF1*pCN35Ω*sprG1*/*sprF1*. There are no differences between strains N315 and N315-Δ*sprG1*/*sprF1*. Interestingly, when SprF1 expression is induced, the percentage of persisters increases, but not when both SprF1 and *sprG1* expression are induced (Figure 7B). Taken together, it suggests that under regular bacterial growth, SprF1 antitoxin inhibits *sprG1* expression at both the RNA and translational levels, by direct interaction between the two RNAs (Pinel-Marie, Brielle et al. 2014). When osmolarity increases, SprF1 switches function and behave as an sRNA to interact with the active translational machinery to reduce the rate of general translation, in turn enhancing *S. aureus* persistence (Figure 7B).

Discussion

Toxin-antitoxin (TA) systems are widespread in bacteria and archaea (Fernandez-Garcia, Blasco et al. 2016). They express a stable toxin-encoded mRNA, leading to stasis or cell death unless its cognate, unstable, antitoxin counteracts its toxicity. In type I TA systems, the antitoxin is an antisense RNA that interacts with the toxic mRNA to inhibit its expression at post-transcriptional level. *S. aureus* expresses two functionally characterized type I TA systems, *sprA1*/SprA1$_{AS}$ (Sayed, Nonin-Lecomte et al. 2012) and *sprG1*/SprF1 (Pinel-Marie, Brielle et al. 2014). At the *sprG1*/*sprF1* locus, the *sprG1* toxin encodes two peptides from a single open reading frame

(ORF) that, when expressed, lyse the *S. aureus* cells that produce them. During bacterial growth, *cis*-antisense SprF1 prevents *sprG1*-encoded peptide toxicity by reducing *sprG1* steady state RNA levels and inhibiting translation onto *sprG1* internal ORFs. To explore the molecular mechanisms though which SprF1 inhibits *sprG1* translation, the presence of *sprG1* and SprF1 on each polysome and ribosome fractions during exponential growth phase in rich medium, when SprF1 should act as an antitoxin. In these conditions, *sprG1* is undetectable in each ribosome fraction (Figure 1A), presumably because of *S. aureus* does not express toxic peptides under exponential growth. Surprisingly, SprF1 was found associated with the polysomal fraction. The presence of the antitoxin SprF1 RNA in the polysomal fraction was further confirmed by *in vitro* approaches. *In vitro* binding assays evidenced that SprF1 interacts with the 70S ribosomes, with an apparent association constant comparable to that of canonical mRNAs (Figures 1B-C). The concomittant addition of up to a ten-fold excess of mRNA does not interfere with the SprF1 binding (Figure 1D). It implies that once SprF1 is loaded onto the 70S ribosomes and impair translation, an excess of mRNAs cannot displace it. In contrast, the concomitant addition of up to a ten-fold excess of SprF1 interferes with the mRNA binding (Figure 1E), suggesting that SprF1 could enter on competition with mRNA to bind ribosomes on the mRNA tunnel located in the 30S subunit. The association of SprF1 onto 70S ribosomes *in vitro* and also to polysomes *in vivo* suggests that this RNA possesses another function besides acting as an antitoxin, related to translation regulation under environmental shifts.

Protein synthesis is an essential checkpoint for sophisticated regulations, especially to modulate gene expression in response to environmental stimuli. Translation regulations involve diverse macromolecules, including proteins and sRNAs. In eukaryotes and prokaryotes, the plethora of functionally and mechanistically characterized sRNAs regulating translation all interact with their mRNA targets rather than with the translational machinery directly. Recently, two examples of tRNA and mRNA fragments reducing the overall translation by targeting the ribosomes were identified. Indeed, a valine tRNA-fragment, produced in a stress-dependent manner, regulates protein synthesis by interfering with peptidyl transferase activity in an archae (Gebetsberger, Zywicki et al. 2012). The second is an mRNA-derived fragment, an 18-mer RNA, which binds to polysomes under osmotic stress to reduce translation in *Saccharomyces cerevisiae* (Pircher, Bakowska-

Zywicka et al. 2014). In this report, we provide compelling evidences that an antisense RNA from *S. aureus* that belongs to a type I TA system, associates with the translating ribosomes, to reduce global protein synthesis under an osmotic stress, leading to persister formation. This is the first example of an sRNA reducing translation by directly interacting with the ribosomes. SprF1 weakens *in vitro* translation of all the tested mRNAs in a dose-response manner (Figure 2A) and *in vivo* translation (Figure 2D). Ribosome-associated sRNAs could potentially influence one of the different steps involved in protein synthesis. The *TRM10* 18-mer mRNA fragment targets the translational initiation to reduce protein synthesis (Pircher, Bakowska-Zywicka et al. 2014) whereas the $tRNA^{val}$ fragment interferes with peptide bond formation (Gebetsberger, Zywicki et al. 2012). SprF1, when bound to the ribosomes, prevent initiation complex formation, suggesting that the sRNA impairs protein synthesis through its interference with translation initiation (Figure 2C). We showed previously that SprF1 cannot be translated *in vitro* (Pinel-Marie, Brielle et al. 2014), suggesting that it is a non-coding RNA. Nevertheless, two ribosome toeprints were detected onto SprF1, and the RNA is predicted to encompass two RBS within its structure. The first RBS contains a SD sequence with an initiation codon 7nts downtream followed by a 17 aminoacids internal ORF, followed by an in frame termination codon. A second, tiny ORF (5 residues) could start at initiation codon $G_{62}UG_{64}$ and ends at $U_{77}AA_{79}$ (Figure 4A). These two internal ORFs, within SprF1, could possibly trap ribosomes to reduce the pool of active ribosomes in the cells. In *S. aureus*, the number of ribosomes is much lower than in *E. coli* cells, containing between 10,000 to 72,000 ribosomes depending of the growth phase (Bremer and Dennis 2008). This observation was inferred from comparative ribosome purifications in these two bacteria, implying that reducing the amount of active ribosomes in *S. aureus* will immediately impact translation.

Full length SprF1, as well as its isolated 5'-end domain (5'-SprF1), both containing the two putative RBS, interact efficiently with the 70S ribosomes *in vitro*, but not the 3'-domain of SprF1 (Figure 4B). The function of SprF1 on translation reduction is optimal for full-length SprF1, probably because of its higher stability when in complex with the ribosomes (Figure 4C). Altogether, these results suggest that SprF1 could sequester the ribosomes by using two RBS, to reduce global translation in response to hyperosmolarity and, perhaps, to other environmental signals that remain to be characterized. The signal that stimulates SprF1 expression, and also

sprG1 production and/or stability is an osmotic stress. Inducing expression of an antitoxin should inhibit production of its cognate toxin, unless the antitoxin has additional target in the cell, as the ribosomes. Since SprF1 binds the polysomes and ribosomes, it becomes unable to pair with *sprG1* during a short time (<3h), in turn inducing a transient progressive accumulation of *sprG1* in the bacteria, under hyperosmolarity (Figures 6C-S2-S3). *sprG1*-encoded toxic peptides production is still prevented by SprF1, being the rationale for the uniform expression of the toxic peptides with and without increasing osmolarity. Noteworthy, hyperosmolarity enhances the presence of SprF1 on the polysomes and inducing SprF1 expression reduces global translation by approximately one-third, compared to a strain deleted from both SprF1 and *sprG1* (Figures 6B-6D). SprF1 is implicated in the bacterial adaptation to hyperosmolarity, by reducing protein synthesis that affects the overall metabolic activity of *S. aureus*, facilitating its entrance into persistence. 1M NaCl supplementation in a growth medium substantially stimulates persister formation, and SprF1 is a major component into that physiological response (Figures 7A-7B). Under hyperosmolar conditions, the association of SprF1 with the polysomes in *S. aureus* cells reduces protein synthesis and promotes *S. aureus* persistence.

SprF1 is a functional type I antitoxin during optimal growth conditions, but is also competent to switch to general regulatory functions, upon an hyperosmotic stress, by shutting down protein synthesis and inducing persistence (Figure 7C). SprF1 belongs to a novel class of sRNAs that are able to regulate translation by their direct association with the ribosomes. Some type I TA systems have already been shown to be implicated in stress response (Sayed, Nonin-Lecomte et al. 2012; Chukwudi and Good 2015) or in persistence (Dorr, Vulic et al. 2010; Verstraeten, Knapen et al. 2015), but it is a first documented case in which the leading factor is the antitoxin, but not the toxin. Usually, the sole role for a type I antitoxin is to inhibit the expression of its cognate toxin. Therefore, SprF1 represents a major conceptual advance in the fast-moving field of regulatory RNAs. As a conclusion, SprF1 is a bi-functional sRNA, and it suggests that type I, *cis*-encoded antitoxins may have several physiological functions that await to be disclosed. Future investigations on type I antitoxins may shed new lights and smash into pieces the current paradigm that antitoxins only target their associated toxins, and that it is the toxin that determines the biological function of TA systems.

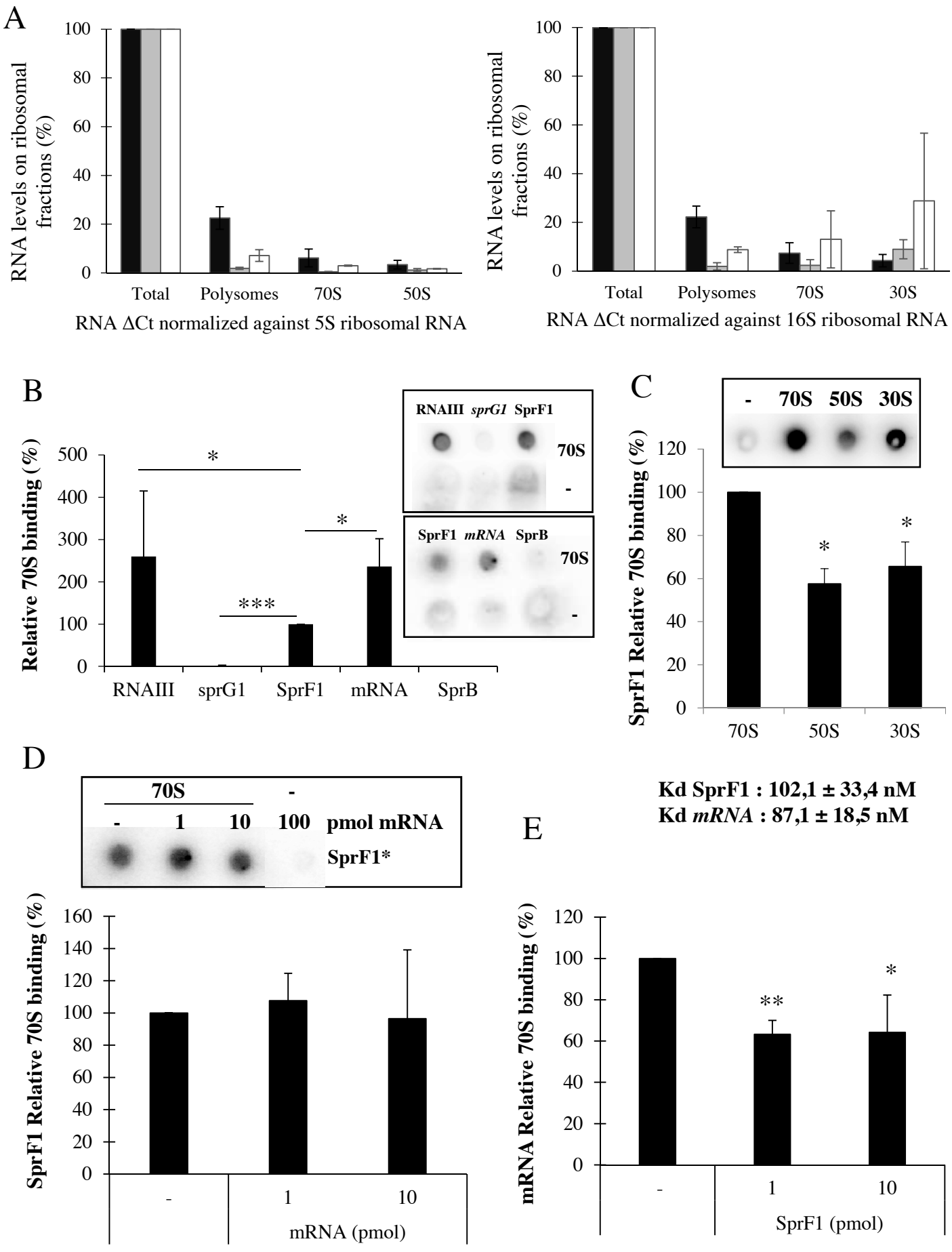

A
RNA levels on ribosomal fractions (%)
Total
Polysomes
70S
50S
RNA ΔCt normalized against 5S ribosomal RNA
30S
RNA ΔCt normalized against 16S ribosomal RNA
B
Relative 70S binding (%)
RNAIII
sprG1
SprF1
mRNA
SprB
RNAIII sprG1 SprF1
SprF1 mRNA SprB
70S
C
SprF1 Relative 70S binding (%)
- 70S 50S 30S
D
pmol mRNA
SprF1*
mRNA (pmol)
Kd SprF1 : 102,1 ± 33,4 nM
Kd mRNA : 87,1 ± 18,5 nM
E
mRNA Relative 70S binding (%)
SprF1 (pmol)

Figure 1: SprF1 is present on polysomes fraction *in vivo* and is able to bind *S. aureus* ribosomes *in vitro*. (A) RT-qPCR analysis showing the presence of SprF1 (black), *sprG1* (grey) and SprB (white) RNAs in N315 WT ribosomal fractions. The data are expressed as percentages and compared to the RNAs presence in the total fraction, arbitrarily set to 100% and are the mean ± SD of three independent experiments. The 50S ribosomal subunit is compared to 5S rRNA, and the 30S is compared to 16S rRNA. (B-D) *In vitro* filter binding studies of radiolabeled synthetic RNAs (i.e. SprF1, *sprG1*, SprB, canonical *mRNA*, RNAIII) on 70S ribosomes from *S. aureus*. Quantification of relative binding whereas association of SprF1 to 70S was normalized to 100%. Signals measured in the absence of any ribosomal particles (-) were subtracted from all experimental points. Error bars show the mean and standard deviation of at least three independent experiments. (B) As a positive control, binding of RNAIII and a canonical *mRNA* to *S. aureus* 70S was monitored. To confirm specific binding of SprF1, the small RNA, SprB, served as negative control. (C) *In vitro* association of SprF1 on *S. aureus* ribosomal particles (70S, 50S and 30S). (D) Effect of the addition of the canonical *mRNA* on the association of labeled SprF1 on ribosomes. Quantification of relative binding whereas association of labeled SprF1 to 70S was normalized to 100%. (E) Effect of the addition of SprF1 on the association of labeled canonical *mRNA* on ribosomes. Quantification of relative binding whereas association of labeled *mRNA* to 70S was normalized to 100%.
p values by student *t* test: *$p < 0.05$; **$p<0.01$; ***$p < 0.001$.

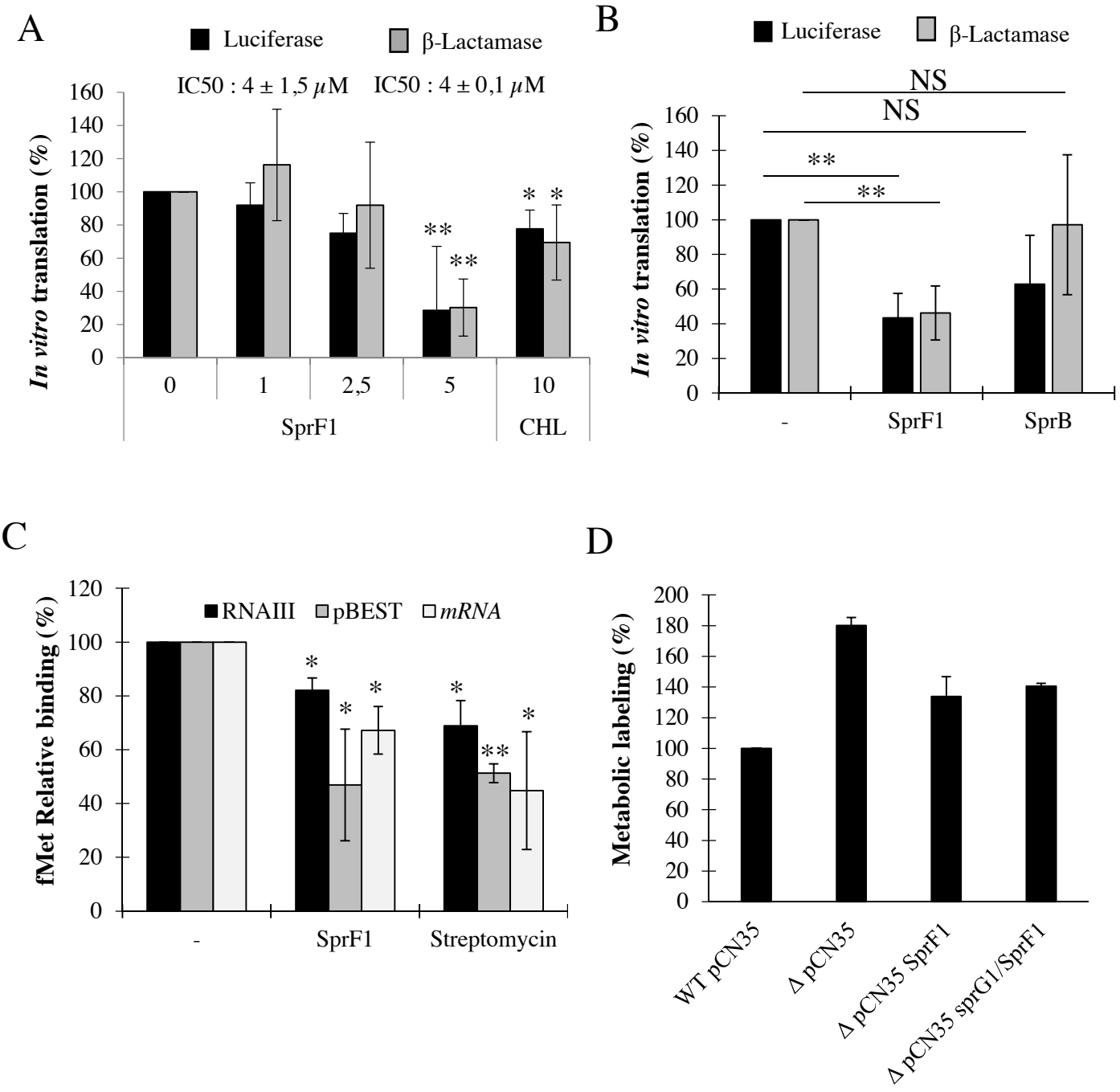
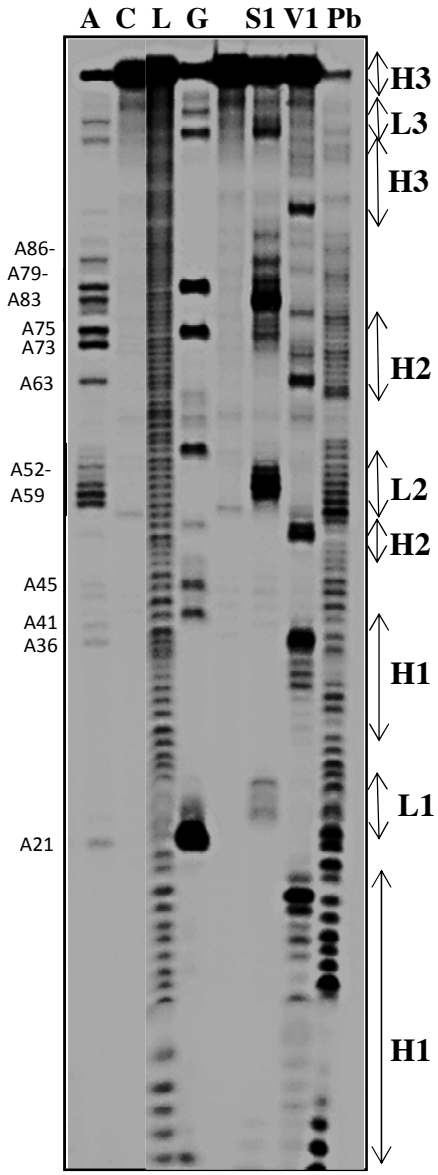

A
Luciferase
β-Lactamase
IC50 : 4 ± 1,5 μM
IC50 : 4 ± 0,1 μM
In vitro translation (%)
0
1
2,5
5
10
SprF1
CHL
B
Luciferase
β-Lactamase
NS
NS
**
**
In vitro translation (%)
-
SprF1
SprB
C
RNAIII
pBEST
mRNA
fMet Relative binding (%)
-
SprF1
Streptomycin
D
Metabolic labeling (%)
WT pCN35
Δ pCN35
Δ pCN35 SprF1
Δ pCN35 sprG1/SprF1

Figure 2: SprF1 slows down *in vitro* and *in vivo* translation and prevents translation initiation.

(A) Dose response of the effect of SprF1 on *in vitro* translation of luciferase and β-lactamase in cell-free extracts of *E. coli* using pBEST*luc*™ vector. The relative amount of radiolabeled proteins in the absence (-) or in the presence of 1 to 5 µM SprF1 is shown. The chloramphenicol (10μM) served as positive control. The IC50 were determined. (B) Effect of SprF1 and SprB on *in vitro* translation of luciferase and β-lactamase in cell-free extracts of *E. coli* using pBEST*luc*™ vector. The relative amount of radiolabeled proteins in the absence (-) or in the presence of 4 µM SprF1 and 4 μM SprB, used as negative control, is shown. (C) *In vitro* filter binding studies of radiolabeled initiator [^{35}S]tRNA^{fMet} bound to a ribosome-*mRNA* complex. RNAIII, pBEST*luc*™ and canonical *mRNA* were used as RNA template. SprF1 and Streptomycin was added at 4 μM and 5 μM, respectively. Values are shown as percentage of the control reaction containing only puromycin. (D) The strains N315 WTΩpCN35 (WT pCN35), Δ*sprG1/sprF1*ΩpCN35 (Δ pCN35) , Δ*sprG1/sprF1*ΩpCN35*sprF1* (Δ pCN35SprF1) and, Δ*sprG1/sprF1*ΩpCN35*sprG1/sprF1* (Δ pCN35*SprG1/SprF1*) were cultivated during 3h at 37°C with [35S]-methionine. The incorporation of the [35S]-methionine into the proteome was visualized by SDS-PAGE and autoradiography. The incorporation was quantified and expressed as percentages compared with the radiolabeled proteins of the WTΩpCN35 strain, arbitrarily set to 100%. The results were expressed as the mean ± SD of at least two independent experiments. p values by student *t* test: *p < 0.05; **p<0.01 ***p < 0.001. NS: no significant.

A


A C L G S1 V1 Pb
H3
L3
H3
A86-
A79-
A83
A75
A73
A63
H2
A52-
A59
L2
H2
A45
A41
A36
H1
L1
A21
H1

B

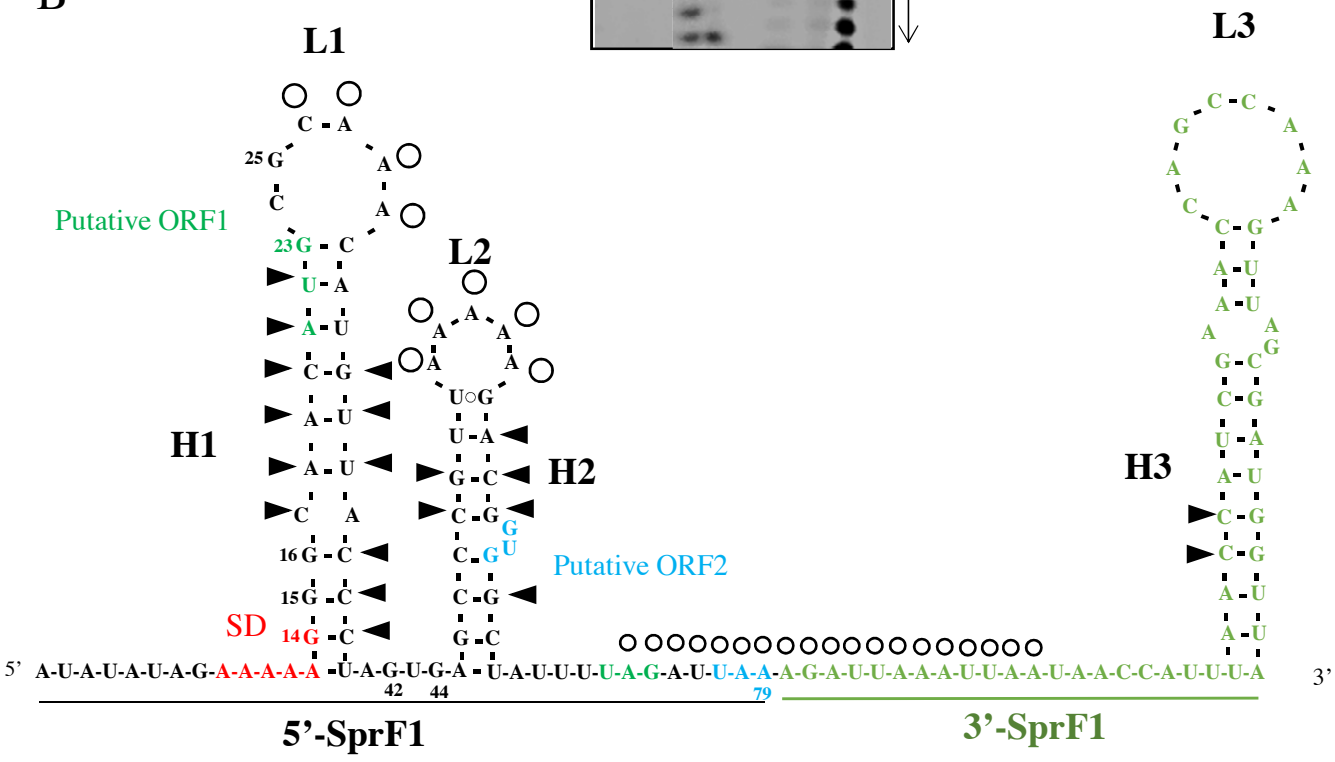

L1
L3
Putative ORF1
L2
H1
H2
H3
Putative ORF2
SD
5' A-U-A-U-A-U-A-G-A-A-A-A-A-U-A-G-U-G-A-U-A-U-U-U-U-A-G-A-U-A-A-A-G-A-U-U-A-A-A-U-U-A-A-A-U-A-A-C-C-A-U-U-U-A 3'
5'-SprF1
3'-SprF1

Figure 3: Structural probe monitoring of SprF1 conformation in solution. (A) 5′-labeled SprF1 was probed by RNase V1, which cleaves double-strands or stacked nucleotides; and by nuclease S1 and lead acetate, both of which cleave accessible single-strands. Lanes are: C, control; S1, Nuclease S1; V1, RNase V1; Pb, lead(II)-induced cleavages; G, RNase T2; A, RNase U2; and L, alkaline ladder. (B) Secondary structure of SprF1 from strain N315 based on probing data. The putative Shine-Dalgarno sequence, the two putative ORF and the SprF1 mutants with 5' and 3'-ends were positioned. V1 cuts (arrow) and S1 cuts (circle) were indicated on the SprF1 sequence.

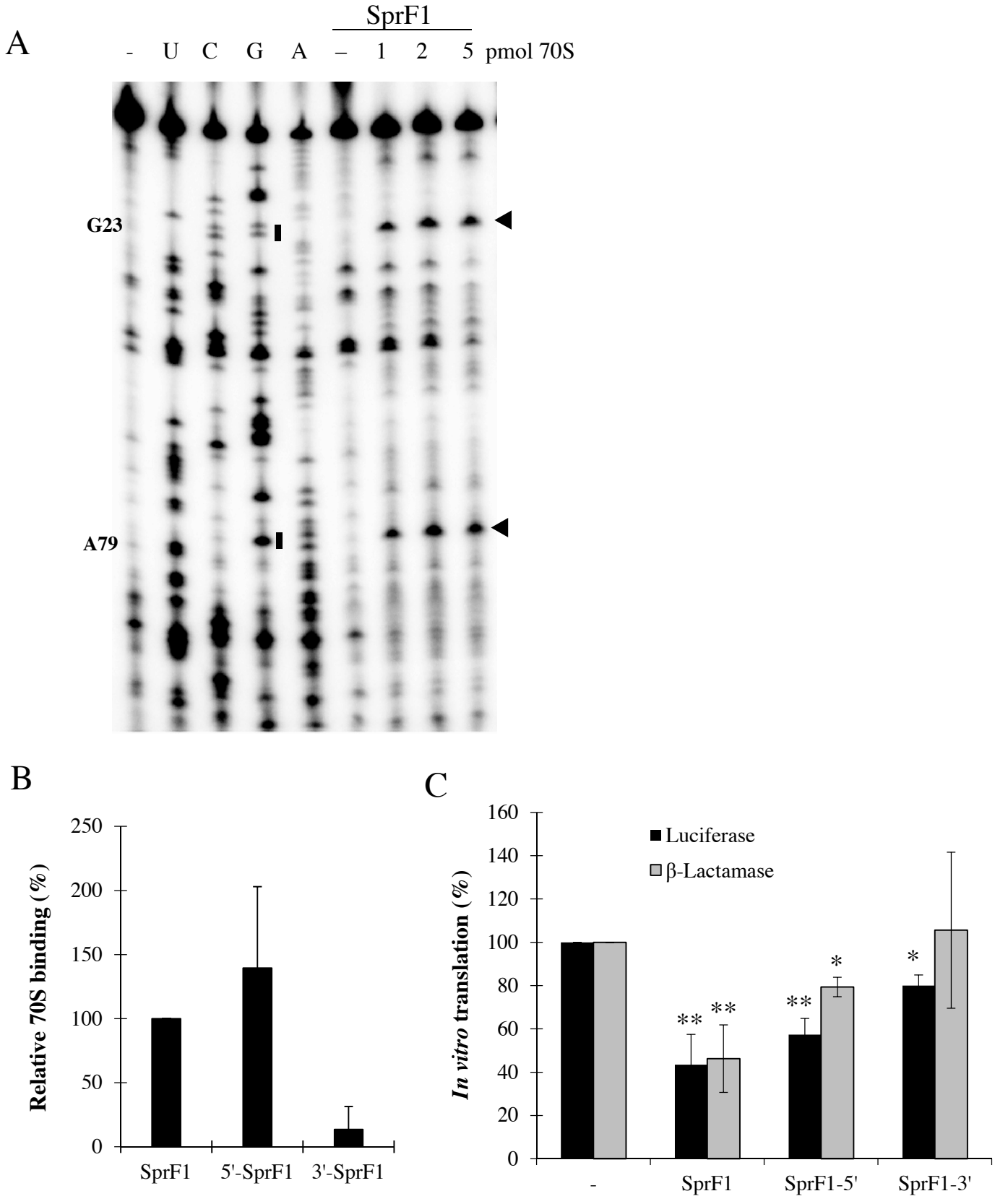

A
SprF1
- U C G A – 1 2 5 pmol 70S
G23
A79
B
Relative 70S binding (%)
250
200
150
100
50
0
SprF1
5'-SprF1
3'-SprF1
C
In vitro translation (%)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Luciferase
β-Lactamase
**
**
**
*
*
-
SprF1
SprF1-5'
SprF1-3'

Figure 4: SprF1 exhibits two ribosome binding sites (RBS).
(A) Two experimentally determined ribosome toeprints on SprF1 (arrows) at the positions G23 and A79. U, C, G, and A refer to the SprF1 sequencing ladder. (B) *In vitro* filter binding studies of radiolabeled 5'- and 3'-ends of SprF1 on 70S ribosomes from *S. aureus*. Quantification of relative binding whereas association of SprF1 to 70S was normalized to 100%. Signals measured in the absence of any ribosomal particles (-) were subtracted from all experimental points. Error bars show the mean and standard deviation of two independent experiments. (C) Effect of 5'- and 3'-ends of SprF1 on *in vitro* translation of luciferase and β-lactamase in cell-free extracts of *E. coli* using pBEST*luc*™ vector. The relative amount of radiolabeled proteins in the absence (-) or in the presence of 4 μM RNAs is shown. Error bars show the mean and standard deviation of three independent experiments. p values by student *t* test: *$p < 0.05$; **$p<0.01$.

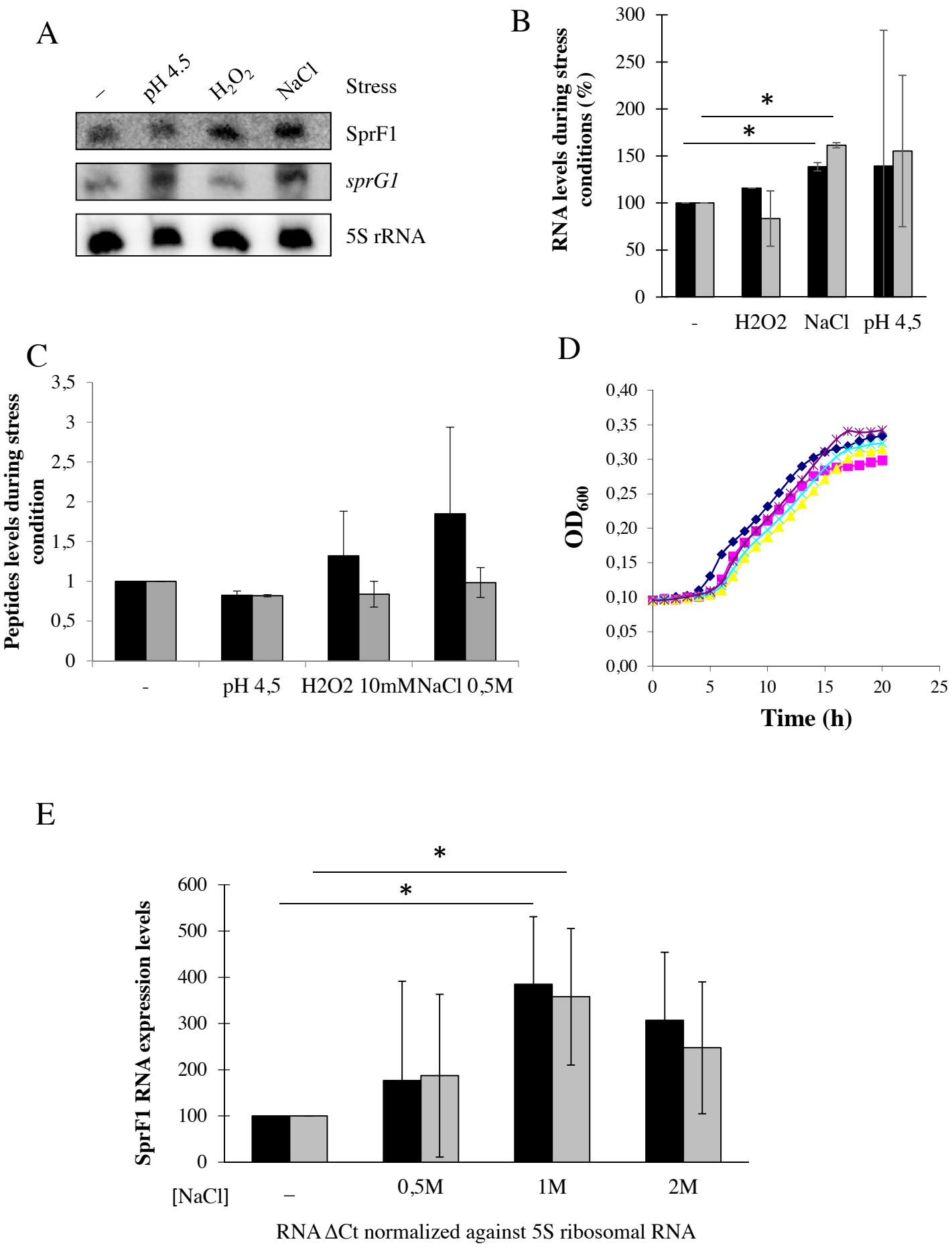

A
–
pH 4.5
H_2O_2
NaCl
Stress
SprF1
sprG1
5S rRNA
B
RNA levels during stress conditions (%)
300
250
200
150
100
50
0
*
*
-
H2O2
NaCl
pH 4,5
C
Peptides levels during stress condition
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
-
pH 4,5
H2O2 10mM
NaCl 0,5M
D
OD_{600}
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
0
5
10
15
20
25
Time (h)
E
SprF1 RNA expression levels
600
500
400
300
200
100
0
*
*
[NaCl]
–
0,5M
1M
2M
RNA ΔCt normalized against 5S ribosomal RNA

Figure 5: SprF1 is overexpressed under osmotic stress. (A-B) Northern blots analysis of SprF1 (black) and *sprG1* (grey) RNAs expression levels during *S. aureus* N315 growth in stress conditions and quantification of expression levels against that of 5S rRNA control. (C) Immunoblotting with anti-FLAG to monitor $PepG1_{44}$ (black) and $PepG1_{31}$ (grey) expression levels during N315 Δ*sprG1*/*sprF1*pCN35Ω*sprG1*-Flag growth in stress conditions. (D) Growth kinetics of N315 WT (dark blue), Δ*sprG1*/*sprF1* (pink), Δ*sprG1*/*sprF1*ΩpCN38 (yellow), Δ*sprG1*/*sprF1*ΩpCN38SprF1 (blue) and Δ*sprG1*/*sprF1*ΩpCN38*sprG1*/SprF1 (purple) strains under osmotic stress. (E) RT-qPCR analysis showing the percentage of SprF1 expression levels according to the NaCl concentration applied during 15 min (black) or 30 min (grey). Using the comparative cycle threshold (ΔΔCt) method, we normalized the amount of SprF1 against that of 5S rRNA relative to that for control without stress. All histogrammes display the percentages of the levels expression under stress conditions compared to their levels without stress, arbitrarily set to 100% and are the mean ± SD of three independent experiments. p values by student : $^{*}p < 0.05$.

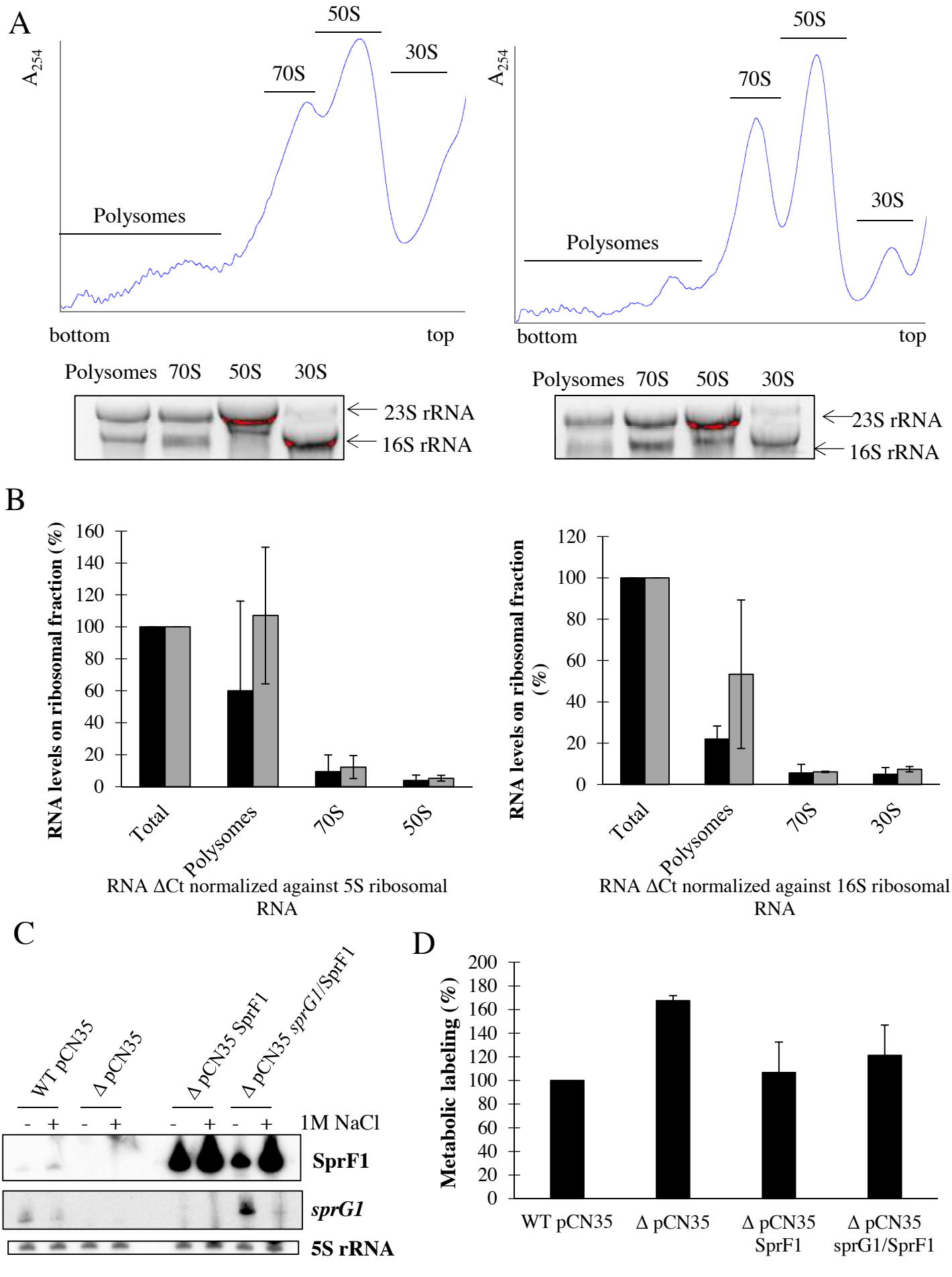
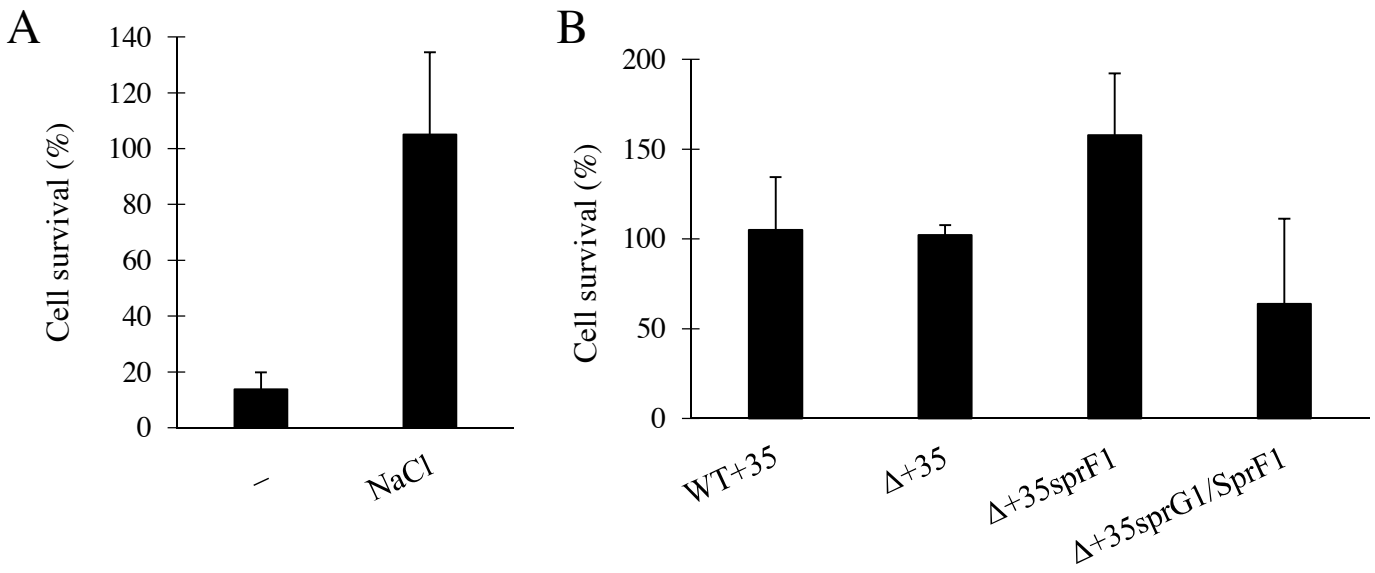

A
50S
70S
30S
Polysomes
A254
bottom
top
Polysomes 70S 50S 30S
23S rRNA
16S rRNA
B
RNA levels on ribosomal fraction (%)
Total
Polysomes
70S
50S
RNA ΔCt normalized against 5S ribosomal RNA
RNA levels on ribosomal fraction (%)
30S
RNA ΔCt normalized against 16S ribosomal RNA
C
WT pCN35
Δ pCN35
Δ pCN35 SprF1
Δ pCN35 sprG1/SprF1
1M NaCl
SprF1
sprG1
5S rRNA
D
Metabolic labeling (%)
WT pCN35
Δ pCN35
Δ pCN35 SprF1
Δ pCN35 sprG1/SprF1

Figure 6: SprF1 is able to inhibit global translation of *S. aureus* under osmotic stress. (A) FPLC profiles of ribosomal fractions extract during N315 WT exponential phase of growth in TSB 1/10 alone (at the right) or supplemented with 1M NaCl (at the left). They are analyzed by sucrose gradient separation of cell extracts on 18 to 40% linear sucrose density gradients. The absorption profile was measured at 254 nm. The graph corresponds to one of the three ribosomal fractions profiled. Each fraction indicated in the profile is pooled, rinsed, concentrated, and then checked by agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide. 23S rRNA refers to the 50S subunit enrichment, and 16S rRNA to the 30S subunit enrichment. (B) RT-qPCR analysis showing the presence of SprF1 RNA in ribosomal fractions in TSB 1/10 (black) and in TSB 1/10 supplemented with 1M NaCl (grey). This is expressed as percentages and compared to its presence in the total fraction, arbitrarily set to 100% and is the mean ± SD of two independent experiments. Using the comparative cycle threshold (ΔΔCt) method, the 50S ribosomal subunit is compared to 5S rRNA, and the 30S is compared to 16S rRNA. (C-D) The strains N315 WTΩpCN35 (WT pCN35), Δ*sprG1/sprF1*ΩpCN35 (Δ pCN35) , Δ*sprG1/sprF1*ΩpCN35*sprF1* (Δ pCN35SprF1) and, Δ*sprG1/sprF1*ΩpCN35*sprG1/sprF1* (Δ pCN35SprF1/SprG1) were cultivated in the absence or presence of 1M NaCl during 3h at 37°C. (C) After RNA extraction, the expression of *sprG1* and SprF1 were analyzed by Northern blot. (D) For the Metabolic labeling assay, [^{35}S]-methionine was added in the culture. The incorporation of the [^{35}S]-methionine into the proteome was visualized by SDS-PAGE and autoradiography. The incorporation was quantified and expressed.as percentages compared with the radiolabeled proteins of the WTΩpCN35 strain, arbitrarily set to 100%. The results were expressed as the mean ± SD of two independent experiments.


A
Cell survival (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
–
NaCl
B
Cell survival (%)
200
150
100
50
0
WT+35
Δ+35
Δ+35sprF1
Δ+35sprG1/SprF1

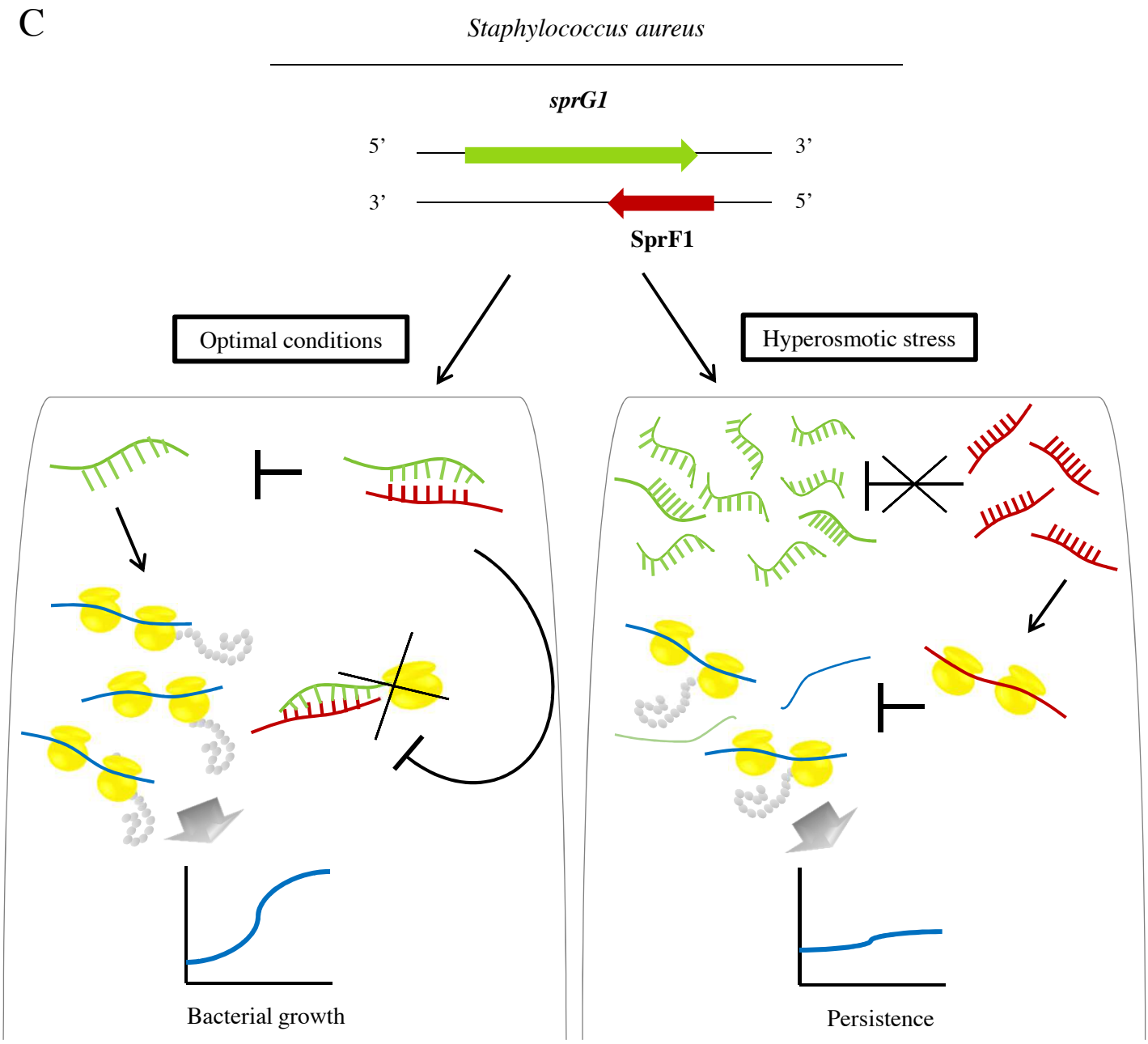

C
Staphylococcus aureus
sprG1
5’
3’
3’
5’
SprF1
Optimal conditions
Hyperosmotic stress
Bacterial growth
Persistence

Figure 7 : Effect of SprF1 and *sprG1* on persister cell formation under osmotic stress. Persistence was measured by determining survival upon 24h exposure to 40x MIC of ciprofloxacin. It is expressed in percentage of CFU after ciprofloxacin treatment compared to amount of CFU before treatment. (A) N315 WTpCN35 was grown in TSB 1/10 to a DO_{600} of 1 at 37°C with shaking at 160 rpm. Then, the sample is divided in two: in the first one, fresh TSB 1/10 + 5M NaCl was added to a final concentration of 1M NaCl, in the second one, the same volume of fresh TSB 1/10 without NaCl was added. After 30 min of growth under stress the antibiotic treatment is applied. (B) N315 WTpCN35 (WT + 35); N315 Δ*sprG1*/*sprF1*pCN35 (Δ+35); pCN35Ω*sprF1* (Δ+35*sprF1*); pCN35Ω*sprG1*/*sprF1* (Δ+35*sprG1*/*sprF1*) were grown in TSB 1/10 to a DO_{600} of 1, then supplemented with 1M final NaCl during 30 min before antibiotic treatment. Histogrammes display the mean ± SD of two independent experiments. (C) Hypothesized working model summarizing our knowledges about the functions and mechanisms of the antitoxin SprF1. In *S. aureus* genome, *sprF1* (red) overlaps and perfectly match its cognate toxin, *sprG1* (green), it inhibits at both, RNA and translational levels, and overall translation is maintain (e.g. of mRNA in blue) to carry on bacterial growth under optimal conditions. However, under hyperosmotic stress, SprF1 RNA is overexpressed and doesn't seem to regulate *sprG1* at RNA level during a short time (<3h). It appears to directly bind ribosomes (yellow) though two ribosome-binding sites and inhibits about 30% global translation to support the bacterial entrance in persistent state.

Table S1. Strains and plasmids used in this study.

Strains	Relevant characteristics	References
***E. coli* strain** DH5α	F- ϕ80 Δ*lacZ* Δ*M15* Δ(*lacZA-argF*)*U169 deoR recA1 endA1 hsdR17* (rK- mK-) *phoA supE44* λ- *thi-1 gyrA96 relA1*	Sambrook et *al*., 1989
***S. aureus* strains**		
RN4220	Restriction-defective derivative of 8325-4	Kreiswirth et *al*., 1983
N315	Meticillin-resistant *S aureus (*MRSA) strain isolated in 1982 from the pharyngeal smear of a Japanese patient	Kuwahara-Arai et *al*., 1996
N315Δ*sprG1/sprF1*	N315 strain deleted for *sprG1* and *sprF1*	Pinel-Marie et *al*., 2014
Plasmids		
pCN35	Modified High-copy-number shuttle with Amp^R in *E. coli* and Cat^R in *S. aureus*	Charpentier et *al*., 2004
pCN35Ω*sprG1*-FLAG	pCN35ΩSprG1with a 3XFLAG sequence before the terminaison codon of the predicted internal coding sequence of *sprG1*	Pinel-Marie et *al*., 2014
pCN35Ω*sprF1*	pCN35 with *sprF1* under the control of its endogenous promoter	Pinel-Marie et *al*., 2014
pCN35Ω*sprG1/sprF1*	pCN35 with *sprG1/sprF1* under the control of its endogenous promoter	Pinel-Marie et al., 2014

Table S2. DNA primers used in this study.

DNAs	Sequences		Purposes
SprF1-NB	TAACTTTGGCTGGTTTCGATGGTT		SprF1 Northern Blot
SprG1-NB	ATGCCACCATAGGCACCACCTCCTT		SprG1 Northern Blot
5S RNA -NB	CGT AAGTTCGACTACCATCG		5S RNA Northern Blot
SprF1	SprF1-F2	GTGAGCCCGTTAAAAAGACG	SprF1 RT-qPCR
	SprF1-R2	GGCTGGTTCGATGGTTAAA	
sprG1	SprG1-F	TAAGGAGGTGGTGCCTATGG	SprG1 RT-qPCR
	SprG1-R	CAGCCAAAGTTAGCGATGGT	
SprB	SprB-F	CTTTGGCAAGTTGGAATGGT	RT-qPCR
	SprB-R	CGAACATGTCGTCAAAGCAA	
5S RNA	5SRTFor	GCAAGGAGGTCACACCTGTT	RT-qPCR
	5SRTRev	GCCTGGCAACGTTCTACTCT	
16S RNA	16SRTFor-2	GAACCGCATGGTTCAAAAGT	RT-qPCR
	16SRTRev-2	TATGCATCGTTGCCTTGGTA	
SprF1	SprF1-T7	TAATACGACTCACTATAGGGATATATAGAAA AAGGGCAAC	*In vitro* transcription
	SprF1-rev	AACCATCGCTAACTTTGGCT	
sprG1	sprG1-T7	TAATACGACTCACTATAGGGCTTTGAGCAAG TTGGATAGATGGTGGCTAT	*In vitro* transcription
	sprG1-rev	TAGAAAAAGGGCAACATGCGCAAACATGTT	
canonical mRNA	mRNA-for	TAATACGACTCACTATAGGGGGCAAGGAGG TAAAAATGTTTAAACGTAAATCTACT	*In vitro* transcription
	mRNA-rev	AGTAGATTTACGTTTAAACATTTTTACCTCCT TGCCCCCTATAGTGAGTCGTATTA	
RNAIII	RNAIII-for	CTTCCTTAATTAAGATAAAAATTC	*In vitro* transcription
	RNAIII-rev	TAATACGACTCACTATAGGGCTAGCATGTAA GCTATCGTAAACAACA	
SprB	SprB-for		*In vitro* transcription
	SprB-rev		
5'-SprF1	SprF1-T7	TAATACGACTCACTATAGGGATATATAGAAA AAGGGCAAC	*In vitro* transcription
	5'-SprF1-rev	CTAAAATAGCCACCGTCTTTTTAACG	
3'-SprF1	3'-SprF1-for	TAATACGACTCACTATAGGGATTAAAGATTA AATTAATAACCATTT	*In vitro* transcription
	SprF1-rev	AACCATCGCTAACTTTGGCT	

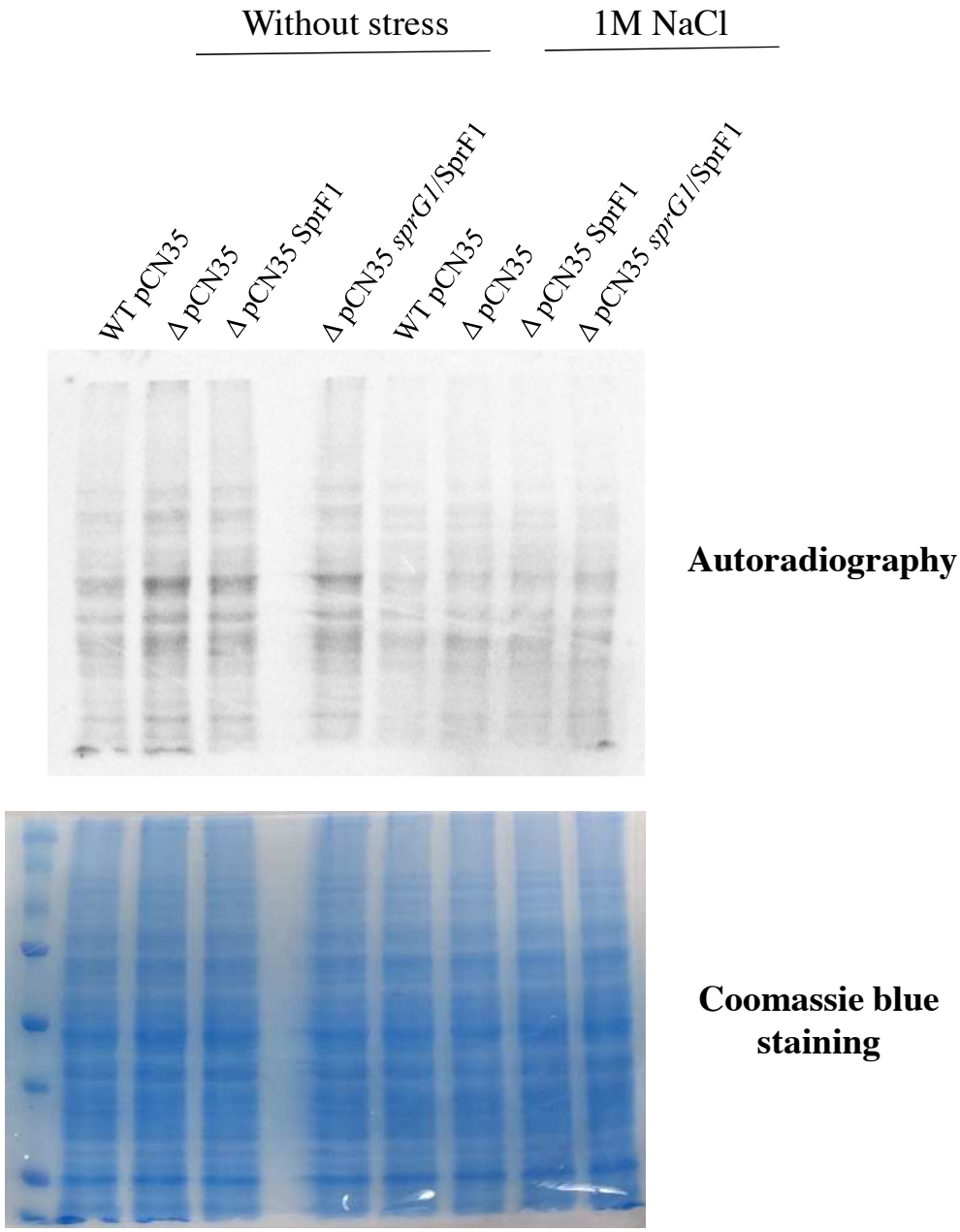


Figure S1: SprF1 inhibits *in vivo* global translation with or without hyperosmotic stress. The strains N315 WTΩpCN35 (WT pCN35), Δ*sprG1*/*sprF1*ΩpCN35 (Δ pCN35) , Δ*sprG1*/*sprF1*ΩpCN35*sprF1* (Δ pCN35SprF1) and, Δ*sprG1*/*sprF1*ΩpCN35*sprG1*/*sprF1* (Δ pCN35SprG1/SprF1) were incubated in the absence or presence of 1M NaCl during 3h at 37°C with [^{35}S]-methionine. The incorporation of the [^{35}S]-methionine into the proteome was visualized by SDS-PAGE and autoradiography. Coomassie blue staining was used as loading control.

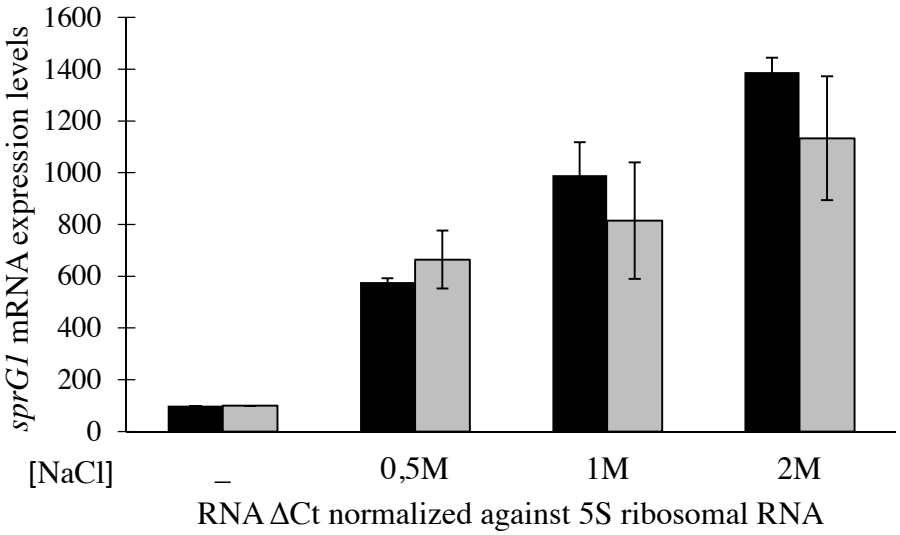


Figure S2 *: sprG1* is overexpressed under osmotic stress. RT-qPCR analysis showing the percentage of *sprG1* expression levels according to the NaCl concentration applied during 15 min (black) or 30 min (grey). Using the comparative cycle threshold (ΔΔCt) method, we normalized the amount of *sprG1* against that of 5S rRNA relative to that for control without stress. The histogramme displays the percentages of the levels expression under stress conditions compared to its level without hyperosmotic stress, arbitrarily set to 100% and are the mean ± SD of two independent experiments.

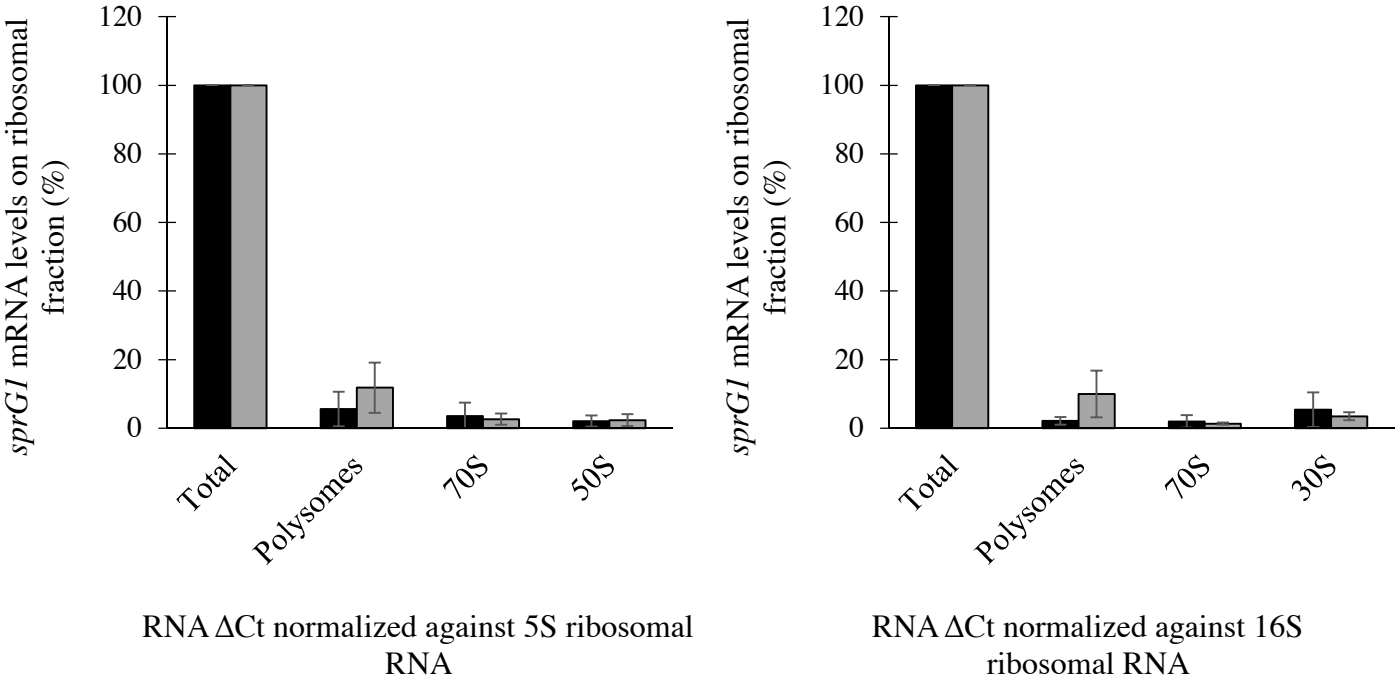


Figure S3: *spG1* is not able to bind ribosomes even under osmotic stress. RT-qPCR analysis showing the presence of *sprG1* mRNA in ribosomal fractions in TSB 1/10 (black) and in TSB 1/10 supplemented with 1M NaCl (grey). This is expressed as percentages and compared to its presence in the total fraction, arbitrarily set to 100% and is the mean ± SD of three independent experiments. Using the comparative cycle threshold (ΔΔCt) method, the 50S ribosomal subunit is compared to 5S rRNA, and the 30S is compared to 16S rRNA.

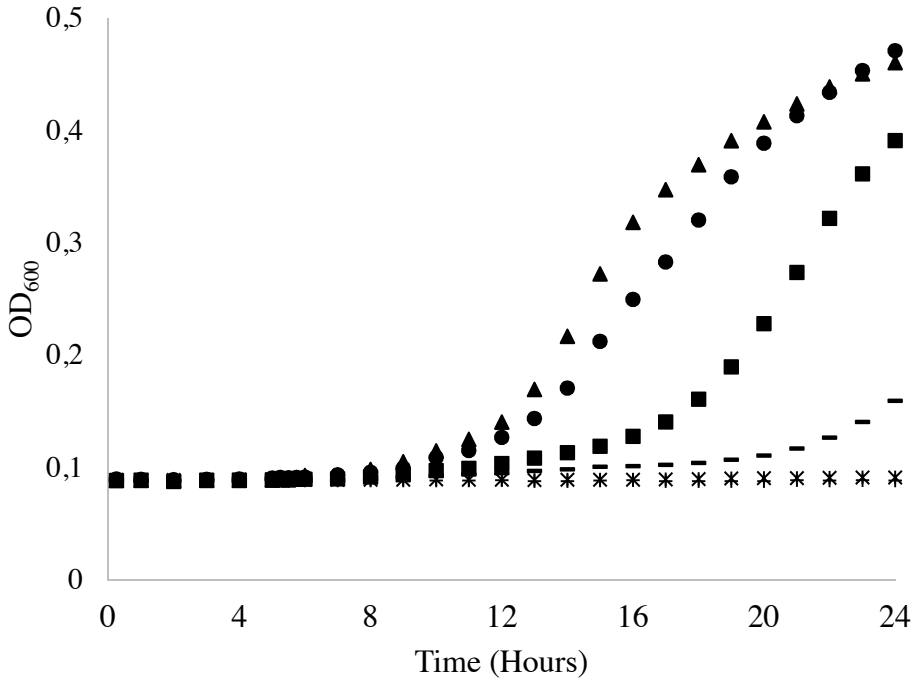


Figure S4 : Determination of ciprofloxacin MIC on *S. aureus* N315 strain. 24 hours growth kinetics of *S. aureus* N315 in TSB alone (triangle) or supplemented with 0.005μg/ml (circle); 0.01μg/ml (square); 0.02μg/ml (dash); 0.04μg/ml (star) and 0.08μg/ml (cross) of ciprofloxacin.

Acknowledgments

We received financial support from the universities of Rennes, Bern, and Sherbrooke, as well as from INSERM, CNRS, the School of Pharmacy and Medical Sciences of Rennes University, and the French Medical Research Foundation (FRM - FDT20150532050).

References

Antal, M., V. Bordeau, et al. (2005). "A small bacterial RNA regulates a putative ABC transporter." The Journal of biological chemistry **280**(9): 7901-7908.

Balaban, N. Q. (2011). "Persistence: mechanisms for triggering and enhancing phenotypic variability." Current opinion in genetics & development **21**(6): 768-775.

Balaban, N. Q., K. Gerdes, et al. (2013). "A problem of persistence: still more questions than answers?" Nature reviews. Microbiology **11**(8): 587-591.

Bremer, H. and P. P. Dennis (2008). "Modulation of Chemical Composition and Other Parameters of the Cell at Different Exponential Growth Rates." EcoSal Plus **3**(1).

Brielle, R., M. L. Pinel-Marie, et al. (2016). "Purification, identification, and functional analysis of polysomes from the human pathogen Staphylococcus aureus." Methods.

Bronesky, D., Z. Wu, et al. (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.

Cheung, A. L., K. J. Eberhardt, et al. (1994). "A method to isolate RNA from gram-positive bacteria and mycobacteria." Analytical biochemistry **222**(2): 511-514.

Cho, J., J. Rogers, et al. (2015). "Escherichia coli persister cells suppress translation by selectively disassembling and degrading their ribosomes." Molecular microbiology **95**(2): 352-364.

Chukwudi, C. U. and L. Good (2015). "The role of the hok/sok locus in bacterial response to stressful growth conditions." Microbial pathogenesis **79**: 70-79.

DeLeo, F. R., M. Otto, et al. (2010). "Community-associated meticillin-resistant Staphylococcus aureus." Lancet **375**(9725): 1557-1568.

Dorr, T., M. Vulic, et al. (2010). "Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in Escherichia coli." PLoS biology **8**(2): e1000317.

Fernandez-Garcia, L., L. Blasco, et al. (2016). "Toxin-Antitoxin Systems in Clinical Pathogens." Toxins **8**(7).

Gebetsberger, J., M. Zywicki, et al. (2012). "tRNA-derived fragments target the ribosome and function as regulatory non-coding RNA in Haloferax volcanii." Archaea **2012**: 260909.

Gerdes, K. (2016). "Hypothesis: type I toxin-antitoxin genes enter the persistence field-a feedback mechanism explaining membrane homoeostasis." Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences **371**(1707).

Kaldalu, N., V. Hauryliuk, et al. (2016). "Persisters-as elusive as ever." Applied microbiology and biotechnology **100**(15): 6545-6553.

Onyango, L. A., R. Hugh Dunstan, et al. (2013). "Phenotypic variants of staphylococci and their underlying population distributions following exposure to stress." PloS one **8**(10): e77614.

Otsuka, Y. (2016). "Prokaryotic toxin-antitoxin systems: novel regulations of the toxins." Current genetics **62**(2): 379-382.

Page, R. and W. Peti (2016). "Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence." Nature chemical biology **12**(4): 208-214.

Patel, S. (2016). "Drivers of bacterial genomes plasticity and roles they play in pathogen virulence, persistence and drug resistance." Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases **45**: 151-164.

Pinel-Marie, M. L., R. Brielle, et al. (2014). "Dual toxic-peptide-coding Staphylococcus aureus RNA under antisense regulation targets host cells and bacterial rivals unequally." Cell reports **7**(2): 424-435.

Pircher, A., K. Bakowska-Zywicka, et al. (2014). "An mRNA-derived noncoding RNA targets and regulates the ribosome." Molecular cell **54**(1): 147-155.

Priest, N. K., J. K. Rudkin, et al. (2012). "From genotype to phenotype: can systems biology be used to predict Staphylococcus aureus virulence?" Nature reviews. Microbiology **10**(11): 791-797.

Rotem, E., A. Loinger, et al. (2010). "Regulation of phenotypic variability by a threshold-based mechanism underlies bacterial persistence." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **107**(28): 12541-12546.

Sassi, M., Y. Augagneur, et al. (2015). "SRD: a Staphylococcus regulatory RNA database." RNA **21**(5): 1005-1017.

Sayed, N., A. Jousselin, et al. (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.

Sayed, N., S. Nonin-Lecomte, et al. (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.

Schuster, C. F. and R. Bertram (2016). "Toxin-Antitoxin Systems of Staphylococcus aureus." Toxins **8**(5).

Tai, P. C., B. J. Wallace, et al. (1978). "Streptomycin causes misreading of natural messenger by interacting with ribosomes after initiation." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **75**(1): 275-279.

Tong, S. Y., J. S. Davis, et al. (2015). "Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management." Clinical microbiology reviews **28**(3): 603-661.

Verstraeten, N., W. J. Knapen, et al. (2015). "Obg and Membrane Depolarization Are Part of a Microbial Bet-Hedging Strategy that Leads to Antibiotic Tolerance." Molecular cell **59**(1): 9-21.

Wagner, E. G. and P. Romby (2015). "Small RNAs in bacteria and archaea: who they are, what they do, and how they do it." Advances in genetics **90**: 133-208.

Discussion

Ma thèse s'inscrit dans la continuité d'un projet ayant permis la découverte de sept nouveaux petits ARN exprimés par le pathogène majeur *S. aureus* (Pichon & Felden, 2005). Ces ARN sont localisés au niveau de régions inter-géniques présentes sur des îlots de pathogénie (PI). Ces îlots sont originaires d'éléments extra-chromosomiques comme des phages ou des transposons. Ils sont porteurs de nombreux gènes codants des facteurs de virulence ou de résistance aux antibiotiques. La présence des petits ARN « Spr » sur ces éléments génétiques suggère donc qu'ils auraient un rôle dans la virulence ou la résistance aux antibiotiques. Comme cela a déjà été vérifié pour les ARN SprD et SprC, qui régulent la virulence *de S. aureus* sur modèle murin de septicémie (Chabelskaya *et al.*, 2010, Le Pabic *et al.*, 2015) et pour SprX qui favorise la résistance aux antibiotiques de la famille des glycopeptides (Eyraud *et al.*, 2014). Deux autres ARN « Spr » chevauchants constituent un STA de type I fonctionnel. Dans ce système, la toxine *sprA1*, synthétise un peptide toxique, PepA1, en condition de stress acide et oxydant. Ce peptide est capable de se localiser à la membrane bactérienne et d'entraîner la mort de *S. aureus* (Sayed *et al.*, 2012b).

Au cours de ma thèse, nous avons travaillé sur deux autres ARN « Spr » chevauchants, *sprG1* et SprF1. Les locus *sprG*/*sprF* sont présents en multiples copies (3 ou 4) dans l'ensemble des souches de *S. aureus* étudiées. Les différentes copies sont présentes dans le core génome à l'exception de la copie 1, localisée au niveau de l'îlot de pathogénie ϕSa3 PI.

Le locus *sprG1*/*sprF1* exprime un STA de type I fonctionnel

Des études ont suggéré, sur la base d'analogie de séquence, que les ARN *sprG1* et SprF1 coderaient respectivement pour une toxine, présentant une homologie avec la toxine TxpA de *B. subtilis*, et une antitoxine de type I chez *S. aureus* (Beaume *et al.*, 2010, Fozo *et al.*, 2010). Dans un premier temps, nous avons montré que les ARN *sprG1* et SprF1 sont exprimés de façon concomittante et constitutive pendant la croissance de *S. aureus*. *sprG1* est un ARN stable qui code pour deux peptides membranaires, $PepG1_{44}$ et $PepG1_{31}$ (de 44 et 31 acides aminés respectivement) dont la surexpression induit la mort de *S. aureus*. Cette toxicité est réversée par un ARN instable, l'antisens SprF1. Ces résultats nous ont permis d'identifié un nouveau STA de type I exprimé par *S. aureus*. En effet, *S. aureus* est capable d'exprimer plusieurs STA lors de conditions de croissance particulière : le STA de type I *sprA1*/$SprA1_{AS}$, les STA de type II chromosomiques MazE/MazF, YefM/YoeB et Omega/Epsilon/Zeta et le STA de type II plasmidique PemK/PemI (Schuster & Bertram, 2016).

La présence du locus *sprG1*/*sprF1* sur un îlot de pathogénie, suggère qu'il pourait avoir un rôle dans le maintien de l'EGM (Van Melderen & Saavedra De Bast, 2009). Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions regarder si la délétion de l'îlot de pathogénie est léthale pour *S. aureus*.

Le gène *sprG1* est transcrit en deux ARN actifs

Le gène *sprG1* est exprimé par l'intermédiaire de deux transcrits de 311 et 439 nucléotides à partir de deux promoteurs distincts. Une autre toxine de type I, *shoB* est également transcrite en deux ARN (Fozo, 2012), dans cet exemple, seule la forme courte est traductionnellement active. Ici, nous avons montré que les deux transcrits de *sprG1* sont capables de traduire les deux peptides.

Les peptides, PepG1$_{44}$ et PepG1$_{31}$, sont toxiques pour *S. aureus*, les bactéries compétitrices et les érythrocytes humains

Chez *S. aureus*, il existe des exemples de petits ARN capables de coder des petits peptides, c'est le cas de l'ARN III qui code la δ-hémolysine (Balaban & Novick, 1995) et de *sprA1* qui code le peptide PepA1 de 31 acides aminés (Sayed *et al.*, 2011). L'exemple de *sprG1* n'est pas conventionnel puisqu'il code deux peptides, PepG1$_{31}$ et PepG1$_{44}$, à partir d'une seule et même ORF mais possède deux codons d'initiation distincts seulement séparés par 12 codons. L'utilisation de plusieurs codons d'initiation peut permettre l'expression de plusieurs isoformes peptidiques à partir d'un seul transcrit comme c'est le cas de l'ARNm *clpA* exprimé par *E. coli* (Seol *et al.*, 1994). Ici, nous avons montré que PepG1$_{44}$ est majoritairement exprimé par *S. aureus* suggèrant la présence d'une compétition ou d'une interférence entre les deux séquences SD, comme cela a déjà été montré (Nishizawa *et al.*, 2010).

Ces petits peptides ont la particularité d'être hydrophobes, polycationiques et d'être également sécrétés dans le milieu extracellulaire (**Figure 55**). Ces différentes caractéristiques sont communes avec celles des peptides cationiques antimicrobiens, exprimés par tout le royaume du vivant comme moyens de défense, leur confèrant ainsi une activité bactéricide ou bactériostatique mais également hémolytique (Ageitos *et al.*, 2016).

Figure 55 : Structure primaire des peptides PepG1$_{31}$ et PepG1$_{44}$

Nous avons montré que PepG1$_{44}$ et PepG1$_{31}$ sont capables de lyser les érythrocytes humains et les bactéries compétitrices avec PepG1$_{44}$ qui est plus hémolytique que PepG1$_{31}$ et inversement PepG1$_{31}$ qui possède une plus grande activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries à Gram positif. Il semblerait que la petite taille de PepG$_{31}$ favoriserait sa pénétration à travers la paroi de peptidoglycane des bactéries à Gram positif, mais qu'elle ne présenterait pas d'avantage pour traverser les membranes de bactéries à Gram négatif.

Puisque chacun des peptides semble privilégier une cible, il est envisageable que *S. aureus* puisse favoriser la synthèse de l'un ou l'autre des peptides en fonction du type cellulaire présent dans son environnement. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de suivre la synthèse de PepG1$_{44}$ et de PepG1$_{31}$ par *S. aureus* cultivé en présence de compétiteurs bactériens ou en présence d'hématies humaines dans un milieu carencé ou non en fer.

Très peu d'études existent sur la description précise du mécanisme d'action des toxines de type I. Pour cette raison, nous avons proposé de classer ces toxines en trois classes correspondant aux principaux mécanismes d'actions décrits dans la littérature : la formation de pores membranaires et le remodelage des chromosomes par les toxines membranaires et le clivage des acides nucléiques par les toxines cytoplasmiques (**Brielle** et *al.*, 2016). En outre, les peptides antimicrobiens, qui possèdent des caractéristiques communes avec PepG1$_{31}$ et PepG1$_{44}$, présentent différents mécanismes d'action dont la formation de pores membranaires, l'altération de la formation du septum, l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire, des acides nucléiques et des protéines. Ils peuvent également inhiber l'activité enzymatique de la bactérie (Park & Hahm, 2005).

Ainsi, nous souhaitons identifier le mécanisme d'action de PepG1$_{31}$ et PepG1$_{44}$ dont la présence à la membrane nous laisse supposer qu'ils auraient un rôle dans la formation de pores membranaires ou le remodelage chromosomique (Kawano *et al.*, 2007, Guo *et al.*, 2014, Brielle *et al.*, 2016). Nous avons donc initié, en collaboration avec le Dr Nonin-Lecomte de l'Université de Paris-Descartes, la résolution de la structure tridimentionnelle de nos peptides par la technique de RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) (**Figure 56**). Les

premiers résultats suggèrent, qu'en solution aqueuse, $PepG1_{31}$ se présente sous la forme d'une hélice qui serait plus structurée que pour $PepG1_{44}$.

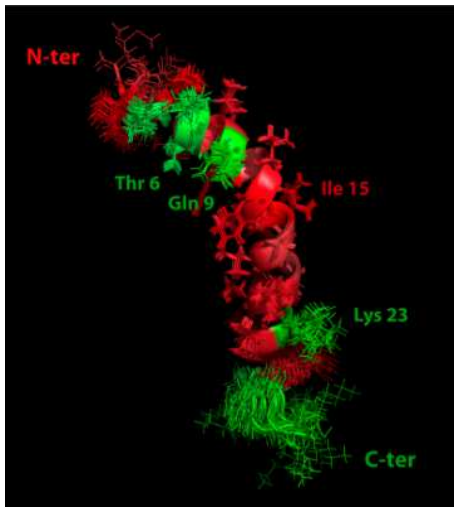


Figure 56 : Structure tridimensionnelle de $PepG1_{31}$ obtenue par résonance magnétique nucléaire

Ce résultat suggère que les 13 acides aminés présents uniquement chez $PepG1_{44}$ déstabiliseraient la structure en hélice du peptide long. Nous souhaitons maintenant confirmer ce résultat dans une solution contenant du SDS, mimant l'environnement membranaire (Silva *et al.*, 2016). Une différence de structure entre les deux peptides, associée à la présence d'une séquence supplémentaire riche en lysine sur le peptide long (Solecki *et al.*, 2015) (**Figure 55**) pourraient expliquer les différences d'activité hémolytique et cytolytique observées entre ces deux peptides.

D'autres résultats préliminaires suggèrent qu'une faible concentration (1μg/ml) de chacun des peptides augmente la conductance électrique de membranes artificielles favorisant ainsi leur effondrement. Cela suggère que ces peptides endommageraient probablement les membranes des bactéries et des érythrocytes par formation de pores, par déstabilisation de la membrane ou en interférant avec les fonctions associées aux membranes. Il serait donc intéressant de tester, dans un premier temps, le rôle putatif de $PepG1_{31}$ et $PepG1_{44}$ sur la perméabilisation membranaire de bactéries compétitrices en utilisant une souche bactérienne déficiente en lactose perméase, comme déjà réalisé au laboratoire pour le peptide PepA1 (Solecki *et al.*, 2015). Dans un second temps, l'observation par microscopie électronique (Watson, 1998) ou à fluorescence (Jahn *et al.*, 2015), nous permettrait de déterminer précisément l'effet des deux peptides sur les structures bactériennes notamment au niveau de la membrane ou du chromosome. La

technique double-hybride BATCH (BActerial Two-Hybrid) nous permettrait de mettre d'éventuelles interactions entres les deux peptides ou avec d'autres protéines (Hancock & Lehrer, 1998).

L'analyse du profil d'expression de $PepG1_{31}$ et $PepG1_{44}$ au cours de la croissance, a été réalisée avec une souche de *S. aureus* surexprimant les peptides flaggés. Puisque, l'utilisation de ce Flag peut entraîner un biais dans l'expression, la localisation et la fonction de ces peptides, nous avons cherché à mettre en évidence par spectrométrie de masse l'expression *in vivo* des peptides natifs, non flaggés. Cependant, nous n'avons pas été en mesure de mettre en évidence nos peptides naturellement synthétisés par la bactérie. Une autre approche qui pourrait-être envisagée serait de marquer les peptides synthétiques avec de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC pour Fluorescein IsoThioCyanate) afin de suivre leur localisation dans les structures cellulaires des bactéries compétitrices ou des hématies (Hancock & Lehrer, 1998).

Ainsi, les peptides toxiques $PepG1_{31}$ et $PepG1_{44}$ pourraient avoir un rôle altruiste en lysant une fraction de la population de *S. aureus* dans le but de favoriser la survie de la population générale. Ils pourraient également avoir un rôle d'inhibiteur des bactéries compétitrices présentes dans l'environnement proche de la bactérie (Sayed *et al.*, 2012a), ou encore dans l'acquisition du fer présent dans les hématies (Saederup *et al.*, 2016).

L'antitoxine SprF1 inhibe la toxicité de *sprG1* par appariement de base

Lorsque les conditions de croissance sont favorables, la toxine *sprG1* est inhibée par l'antitoxine SprF1 par appariement de base. Les antitoxines de type I caractérisées régulent l'expression de leur cible en favorisant la dégradation de l'ARNm, en inhibant la traduction de la toxine, ou par l'intermédiaire des deux mécanismes (Brantl, 2012, Jahn *et al.*, 2012).

Nous avons montré que SprF1 altère le niveau cellulaire d'ARNm *sprG1* et qu'il inhibe sa traduction. Nous n'avons pas pu identifier si l'affaiblissement du niveau d'ARNm *sprG1* est dû à une inhibition de la transcription ou à la promotion de la dégradation. A l'heure actuelle, l'inhibition de la transcription d'une toxine par une antitoxine de type I n'a encore jamais été rapportée, suggérant que SprF1 interviendrait probablement sur la stabilité de l'ARNm *sprG1*. Généralement, les antitoxines de type I interférant dans la stabilité de leur cible agissent par formation d'un complexe ARN-ARN ciblé par des RNases spécifiques des séquences d'ARN double brin, comme la RNase III (Durand *et al.*, 2012, Vogel *et al.*, 2004, Jahn *et al.*, 2012). L'utilisation d'une souche de délétion de *rnc*, codant la RNase III, a montré que seul l'ARN SprF1 est clivé par l'endoribonucléase. Ce résultat suggère que la RNase III n'intervient pas dans la dégradation de la toxine en complexe avec l'antitoxine,

mais qu'elle serait impliquée dans la faible stabilité de l'antitoxine SprF1. Il serait intéressant de déteminer la demi-vie des ARN dans les mutants de délétion des différentes RNases exprimées par *S. aureus* (Bonnin & Bouloc, 2015).

SprF1 inhibe également l'expression de *sprG1* au niveau traductionnel. Différents mécanismes de régulation de la traduction de la toxine par l'antitoxine sont caractérisés chez les STA de type I : l'inhibition traductionnel d'un peptide leader (e.g. Sok (Thisted & Gerdes, 1992)), la séquestration de la séquence SD ou du codon d'initiation de la traduction (e.g. SymR (Kawano *et al.*, 2007)), la fixation sur une séquence « stand-by » en amont du RBS (IstR-1 (Darfeuille *et al.*, 2007, Wagner & Unoson, 2012) ou encore par une interaction ARN-ARN n'impliquant pas la région chevauchante (e.g. $SprA1_{AS}$ (Sayed *et al.*, 2012a)). La détermination de la structure secondaire du complexe d'ARN *sprG1*-SprF1 par probing, nous permettrait de déterminer les séquences nucléotidiques et les réarrangements structuraux impliqués dans la régulation de la traduction de *sprG1* par SprF1.

Le STA *sprG1*/SprF1 est activé en condition de carence nutritive où il inhibe la croissance de *S. aureus*

Les STA de type I chromosomiques ont déjà été impliqués dans un grand nombre de fonctions biologiques dont la réponse à différents stress environnementaux (Sayed *et al.*, 2012b, Chukwudi & Good, 2015), la résistance aux antibiotiques (Guo *et al.*, 2014), la recombinaison (Weel-Sneve *et al.*, 2013), le métabolisme (Kawano *et al.*, 2002b), le recyclage d'ARN endommagés (Kawano *et al.*, 2007), la persistance (Verstraeten *et al.*, 2015, Dorr *et al.*, 2010, Koyanagi & Levesque, 2013) et la formation de biofilms (Bloom-Ackermann *et al.*, 2016).

Nous n'avons pas mis en évidence le rôle de *sprG1*/SprF1 dans la formation de biofilms, ni dans la résistance aux antibiotiques. Cependant, nous avons montré qu'en condition de carence nutritive, l'expression de l'antitoxine SprF1 est inhibée, favorisant ainsi l'induction de l'expression de *sprG1* et de ces peptides responsables de la stase bactérienne.

Nous avons également montré que l'absence du locus *sprG1*/*sprF1* induisait un fort retard de croissance de la bactérie en condition de carence en leucine, un acide aminé ramifié impliqué notamment dans la synthèse protéique, la biogénèse des membranes bactériennes (Beck *et al.*, 2004, Kaiser *et al.*, 2016), la croissance et la virulence de *S. aureus* (Kaiser *et al.*, 2016). Cependant, l'expression des ARN *sprG1* et SprF1 est réprimée

dans cette condition de croissance. Ces résultats semblent indiquer que l'inhibition de croissance observée pour le mutant de délétion ne serait pas directement liée au STA. En effet, l'inhibition d'expression des ARN *sprG1* et SprF1 dans la souche sauvage est en contradiction avec l'hypothèse selon laquelle la présence de *sprG1*/SprF1 apporterait un avantage à la bactérie lorsqu'elle est confrontée à une carence en leucine ainsi qu'avec les résultats obtenus en cours de carence nutritive globale. Nous avons cependant montré que le répresseur CodY est régulé par *sprG1*/SprF1 mais que cette régulation n'a pas d'effet sur l'expression des gènes de l'opéron *ilv-leu* au niveau transcriptionnel.

Nous savons également que malgré la présence de l'ensemble des gènes impliqués dans la synthèse des BCAA, *S. aureus* présente une auxotrophie vis-à-vis de la leucine et de la valine (Onoue & Mori, 1997, Lincoln *et al.*, 1995). Il semble en effet que *S. aureus* assimile les BCAA synthétisés par l'hôte avec l'aide de deux transporteurs, BrnQ1 et BcaP, pour maintenir une concentration intracellulaire optimale (Kaiser *et al.*, 2016). Nous pourrions également regarder, en condition de carence en leucine, l'impact de l'absence ou de la surexpression de *sprG1*/SprF1 sur l'expression de ces transporteurs.

Nous n'avons pas été en mesure d'identifier un nutriment responsable de l'inhibition de croissance observée en condition de carence nutritive pour la souche de surexpression de *sprG1* et de ces peptides. Il semble donc que la carence nutritive globale soit responsable de l'expression de la toxine et de ces peptides toxiques dans le but d'induire une stase bactérienne. Nous pourrions décrypter les mécanismes moléculaires de régulation de l'expression de SprF1 et de *sprG1* lors de la carence nutritive en étudiant notamment la voie de la réponse stringente et plus précisément le médiateur principal (p)ppGpp (Hauryliuk, 2015). Nous pourrions suivre l'expression du STA *sprG1*/SprF1 dans la souche de délétion de *rsh*, ou également suivre l'accumulation de (p)ppGpp par marquage au P^{13} (Mwangi, 2013) en fonction du niveau d'expression de *sprG1*/SprF1 dans la bactérie. Par ces deux approches complémentaires, nous pourrons mettre en évidence soit le rôle de la réponse stringente dans l'activation de notre système, soit le rôle de *sprG1*/SprF1 dans l'activation de la réponse stringente. Enfin, une étude à large échelle du transcriptome, translatome ou du métabolome, pourrait être envisagée afin de nous orienter vers des cibles moléculaires de *sprG1*/SprF1 qui expliqueraient l'activation du STA en condition de carence nutritive globale.

Le STA *sprG1*/SprF1 pourrait également intervenir dans la réponse de *S. aureus* à d'autres stress rencontrés par la bactérie au cours de l'infection et qu'il serait intéressant de tester, notamment les variations soudaines de température, la présence d'une concentration sub-inhibitrice d'antibiotiques (Stevens *et al.*, 2007, Joo *et al.*, 2010, Ohlsen *et al.*, 1998), une

concentration limitée en oxygène (Fuchs *et al.,* 2007) ou encore la présence d'oxyde nitrique (Grosser *et al.*, 2016).

Recherche du rôle putatif de *sprG1*/SprF1 dans la persistance, la virulence et la phagocytose de *S. aureus*

La toxine de type I (Verstraeten *et al.*, 2015), dont la surexpression dépend de (p)ppGpp, favorise l'entrée de *E. coli* en état de persistance en dépolarisant la membrane plasmique. Le STA de type I *tisB*/ItsR-1 favorise l'entrée d'*E.coli* en persistance en réponse à un stress SOS (Dorr *et al.*, 2010). A l'inverse, une légère surexpression du STA *fst-Sm*/SrSm inhibe la persistance de *Streptococcus mutans* (Koyanagi & Levesque, 2013). Nous souhaiterions donc déterminer si *sprG1*/SprF1, inhibe la croissance dans le but de favoriser l'entré de *S. aureus* en persistance en réponse à une carence nutritive.

La réponse stringente et la persistance bactérienne sont directement impliqués dans la survie de *S. aureus* dans les phagocytes humains et les cellules phagocytaires non professionnelles, comme les cellules épithéliales et endothéliales (Geiger *et al.*, 2012, Kahl *et al.*, 2016, Schroder *et al.*, 2006). Une étude récente à montré que l'internalisation de *Salmonella* par les macrophages induisait la formation de cellules persitantes (Helaine *et al.*, 2014). Il serait donc intéressant d'étudier la phagocytose de *S. aureus* en utilisant les souches exprimant différents niveaux de STA *sprG1*/SprF1.

Le locus *sprG1*/*sprF1* est localisé sur un îlot de pathogénie et exprime un STA impliqué dans l'adaptation de *S. aureus* à une carence nutritive globale, notamment rencontrée par la bactérie au cours de la colonisation des fosses nasales (Krismer *et al.*, 2014, Dastgheyb & Otto, 2015), et dans la régulation du répresseur CodY connu pour réguler des gènes de virulence en support ou en substitution du système quorum sensing *agr* (Pohl *et al.*, 2009). De plus, les peptides codés par *sprG1* et notamment $PepG1_{44}$ sont capables de lyser les cellules humaines. Tous ces indices nous suggèrent que *sprG1*/SprF1 pourrait être impliqué dans la virulence de *S. aureus.* En effet, l'absence de certains STA peut altérer le cours de l'infection bactérienne ce qui sous-entend qu'ils contribueraient à la virulence de leur hôte (Lobato-Marquez *et al.*, 2016). Nous souhaitons donc étudier l'effet de *sprG1* et SprF1 sur la virulence de *S. aureus* dans un modèle murin de septicémie (Le Pabic *et al.*, 2015, Chabelskaya *et al.*, 2010).

La conservation des systèmes *sprG*/SprF en multiples copies dans l'ensemble des génomes de *S. aureus* étudiés sous-entend qu'elles auraient un rôle important dans la survie ou la virulence de la bactérie. L'importante homologie de séquence entre les différentes copies suggère qu'elles pourraient interférer entre elles ou avoir une activité redondante. Il

serait intéressant d'étudier le rôle et le mécanisme d'action de chacune d'elles. Nous avons déjà montré que les copies 2 et 3 sont également des STA de type I fonctionnels, alors que la copie 4 ne semble pas être exprimée. C'est également ce qui est observé chez *E. coli* qui exprime 12 copies de *hok*/*sok*, dont certaines sont des insertions ou des dégénérescences qui ne produisent pas de peptides ni d'antitoxine (Pedersen & Gerdes, 1999). Maintenant, nous souhaiterions mettre en évidence d'éventuelles régulations croisées entre les toxines et les antitoxines de copies différentes. Enfin, la souche de délétion de l'ensemble des copies fonctionnelles nous permettrait de mieux mettre en évidence leur foncion biologique, dans l'hypothèse où elles auraient un rôle redondant.

L'antitoxine SprF1 est clivée par des RNases

L'un des objectifs de ma thèse est d'identifier une nouvelle classe d'ARNrég capable de réguler directement le ribosome chez *S. aureus*. Lors de cette étude, nous avons identifié le fragment 3' de SprF1 par séquençage d'ARN à haut débit dans les fractions ribosomales de *S. aureus*. Grâce aux mutants de délétion de la RNase Y ou de la RNaseIII, nous avons montré qu'il s'agit d'un produit de clivage de SprF1.

Un test de clivage d'ARN *in vitro* nous permettrait de déterminer précisément le ou les site(s) de coupure de l'ARN SprF1 (Durand *et al.*, 2012). Dans le but de mettre en évidence une éventuelle fonction biologique de ce produit de clivage, nous devrions suivre son profil d'expression au cours de la croissance de *S. aureus* confrontés ou non à diférents stress. Aux vus des résultats obtenus avec la forme longue, SprF1 ou le STA complet, *sprG1*/SprF1, nous pouvons supposer que le clivage de SprF1 interviendrait lorsque *S. aureus* est confronté à une carence nutritive ou à un stress osmotique. Chez *B. subtilis*, l'antitoxine SR5 appartenant au STA de type I *bsrE*/SR5 est principalement dégradée par la RNaseJ1 sous l'influence de différents stress dont le pH, l'anoxie et la carence en fer (Muller *et al.*, 2016).

Des résultats préliminaires suggèrent que SprF1-3' se fixe sur l'extrémité 3' de l'ARNm *sprG1* et inhibe la traduction de $PepG1_{44}$ mais active la traduction de $PepG1_{31}$, ce qui nous laisse penser que l'activation du clivage de SprF1 dans des conditions particulières de croissance peut en patie expliquer la différence d'expression des peptides codés par *sprG1*.

Ainsi, nous avons mis en évidence l'existence d'un produit de clivage de SprF1. Nous avons également mis en évidence que ce produit de clivage n'est pas capable de se fixer aux ribosomes de *S. aureus* contrairement à SprF1.

L'ARN SprF1 est capable de piéger le ribosome pour inhiber la traduction et favoriser la persistance bactérienne en condition de stress hyperosmotique.

Nous avons montré *in vivo* et *in vitro* que SprF1, s'associe aux ribosomes et particulièrement à la fraction des polysomes, à l'inverse de l'ARNm *sprG1*. Nous supposons que l'ARNm *sprG1* n'est pas associé aux ribosomes en phase exponentielle parce que dans cette condition la bactérie n'a pas intérêt à synthétiser les peptides toxiques. Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions regarder la présence de *sprG1* aux polysomes et aux ribosomes en condition de carence nutritive, c'est-à-dire lorsque des peptides sont traduits. Une étude a récemment montré chez *Saccharomyces cerevisiae* que les polysomes contribuent à la synthèse des ARNm codant des protéines abondantes, alors que les ribosomes contribuent principalement à la traduction de petits ARNm avec une petite ORF (Heyer & Moore, 2016). Il ne serait donc pas surprenant de retrouver l'ARN *sprG1* dans la fraction des ribosomes 70S en condition de carence nutritive.

La présence de l'antitoxine, non codante, sans la présence de la toxine dans la fraction polysomale suggère que SprF1 aurait une autre fonction que celle d'antitoxine de *sprG1*. En effet, nous avons montré que l'ARN est capable d'inhiber la synthèse protéique globale *in vitro* et *in vivo* en ciblant l'initiation de la traduction. Cependant, nous n'avons pas encore regardé si SprF1 interagit également avec les autres étapes de la traduction, c'est-à-dire l'élongation, la terminaison et le recyclage.

Nous avons montré que l'antitoxine SprF1 fixe les ribosomes par l'intermédiaire de deux RBS putatifs, suggérant qu'il fixerait deux ribosomes simultanément pour inhiber la traduction. Afin de confirmer l'existence et la localisation des deux RBS putatifs, nous souhaitons suivre *in vitro* la fixation aux ribosomes de mutants SprF1 dépourvus de l'un ou l'autre des RBS ainsi que l'effet de ces mutations sur l'inhibition de la traduction. Pour vérifier si la présence de SprF1 majoritairement aux polysomes est liée à ces deux RBS, nous pourrions vérifier par polysome profiling la re-localisation du SprF1 dépourvu de l'un ou l'autre des RBS vers la fraction des ribosomes 70S. Afin d'identifier précisément le site de fixation de SprF1 sur le ribosome et les arrangements moléculaires mis en jeu, nous pourrions étudier la structure du complexe SprF1-ribosome par cristallographie aux rayons-X ou par cryo-electron microscopie (Mankin, 2006).

Nous avons ensuite montré que le stress hyperosmotique augmente significativement l'expression de SprF1 et de *spG1* mais n'influence pas la synthèse de $PepG1_{31}$ et de $PepG1_{44}$. Dans cette condition, la proportion de SprF1 aux polysomes ainsi que son activité inhibitrice sur la synthèse protéique sont également significativement augmentés. Ce résultat

suggère que dans cette condition, l'ARN SprF1, fixer aux polysomes, ne remplit pas sa fonction d'antitoxine, laissant ainsi l'ARNm *sprG1* s'accumuler dans la cellule pendant un lapse de temps inférieur à 3h après le stress hyperosmotique. Nous supposons que la synthèse des deux peptides est inhibée par appariement direct de SprF1 sur les polysomes.

La formation et le maintien de cellules persistantes est régulée au niveau traductionnel (Shah *et al.*, 2006, Cho *et al.*, 2015). Elle est également régulée par les signaux environnementaux, y compris l'exposition prolongée au stress osmotique, faisant intervenir le facteur général de réponse aux stress, sigmaB (van Schaik & Abee, 2005). Nous avons montré que SprF1 favorise l'entrée de S. aureus en état de persistance en condition de stress hyperosmotique. Afin de vérifier si l'induction de persistance apportée par SprF1 est associée à son rôle de régulateur traductionnel, nous devrions déterminer le pourcentage de survie d'une souche de *S. aureus* surexprimant l'ARN SprF1 dépourvu du ou des RBS.

Nous savons que, chez *S. aureus*, la formation de persisters est associée à une diminution du niveau d'ATP (Conlon *et al.*, 2016). Pour étudier la persistance de *S. aureus,* nous avons comparé la proportion de bactéries qui ont survécu à une exposition à une forte concentration en ciprofloxacine pendant 24h entre les souches exprimant différents niveaux de SprF1. Pour confirmer que ces bactéries sont bien dans un état de persitance, nous souhaitons doser le niveau intracellulaire d'ATP (Conlon *et al.*, 2016). Une autre méthode récemment développée, le persister-FACSeq, combine le tri des cellules activées par fluorescence (FACS pour Fluorescence-Activated Cell Soring), les tests d'antibio-tolérance, et le séquençage de nouvelle génération (NGS pour Next Generation Sequencing) pour déterminer la physiologie et l'hétérogénéité des persisters (Henry & Brynildsen, 2016).

Chez *E. coli*, une toxine de type II, HipA, est capable de supprimer la traduction par le désassemblage et la dégradation des ribosomes (Cho *et al.*, 2015). En effet, la protéine, par l'intermédiaire de la voie de la réponse stringente, est capable de dissocier les deux sous-unités ribosomales. L'étude montre également que les ribosomes dissociés sont ensuite dégradés par la RNase I pour les ARNr et par la protéase Lon pour les protéines ribosomales. Moins de 25% des ribosomes ne sont pas dégradés mais les ribosomes persistants sont hétérogènes et dépourvus de sept protéines ribosomales. Il serait intéressant de regarder également l'effet de SprF1 sur les structures ribosomales des bactéries persistantes. Nous pourrions également regarder l'influence de SprF1 sur la stabilité des ARNr et des protéines ribosomales.

La persistance est associée à la formation de biofilms (Kahl *et al.*, 2003b, Conlon *et al.*, 2015) et à la survie de la bactérie dans le milieu intracellulaire (Schroder *et al.*, 2006,

Sendi & Proctor, 2009, Helaine *et al.*, 2014). Il serait alors intéressant d'étudier le rôle de SprF1 dans la virulence de *S. aureus*, notamment dans la formation de biofilms, la phagocytose et la mise en place d'une infection chronique sur modèle murin d'infection chronique (Conlon *et al.*, 2013).

Il serait également intéressant de déterminer si SprF1 est un ARNrég général ou stress spécifique en étudiant le rôle de SprF1 sur la synthèse protéique et la persitance de *S. aureus* confronté à différentes conditions de stress.

Les alignements de séquence entre les trois ARN SprF exprimés par *S. aureus* nous montre notamment une zone avec une meilleure conservation de séquences entre la deuxième séquence SD putative et le codon d'initiation de la deuxième ORF putative suggérant que les ARN SprF seraient capables de s'associer aux ribosomes de *S. aureus* par l'intermédiaire de ce RBS et d'induire une inhibition de la traduction globale (**Figure 57**).

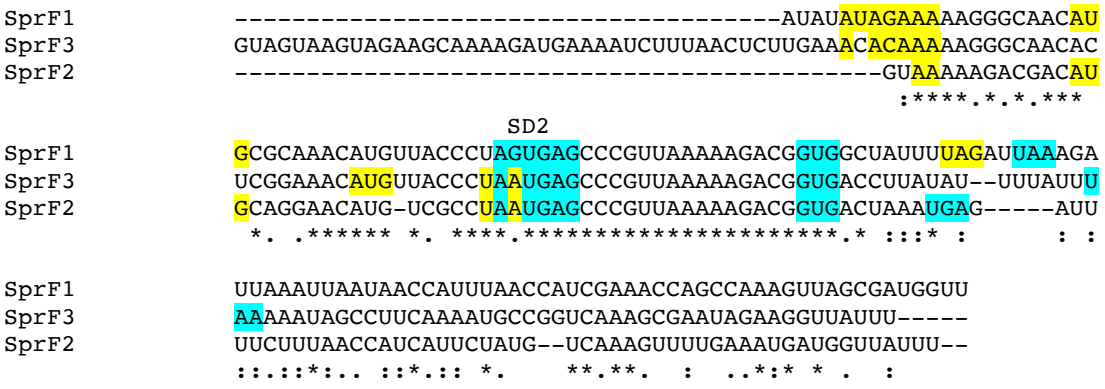


Figure 57 : Alignement de séquences des ARN SprF exprimés par *S. aureus*. Les deux séquences Shine-Dalgarno putatives sont surlignées en jaune et bleu (notées SD1 et SD2). Le codon d'initiation et le codon stop des deux ORF putatives des ARN SprF sont surlignés en jaune et bleu.

Conclusion

En conclusion, nous avons montré que *sprG1*/SprF1 constitue un STA de type I fonctionnel où *sprG1* code pour deux peptides toxiques membranaires et sécrétés dans le milieu extracellulaire. En condition normale de croissance, l'expression de la toxine est régulée par l'antitoxine SprF1 au niveau transcriptionnel et/ou post-transcriptionnel et traductionnel, permettant au pathogène *S. aureus* de croître normalement. En revanche, lorsque la bactérie est confrontée à une carence nutritive globale, l'expression de l'antitoxine est réprimée, laissant ainsi la toxine *sprG1* s'accumuler dans la cellule et traduire les peptides toxiques $PepG1_{44}$ et $PepG1_{31}$, responsables de la stase bactérienne. Nous avons également montré que les deux peptides sécrétés étaient capables de lyser les bactéries compétitrices présentes dans le milieu et les érythrocytes humains. Ces peptides pourraient être utilisés comme une base dans le design d'un nouvel outil thérapeutique, comme cela se fait également pour le peptide PepA1, exprimé par le STA de type I *sprA1*/$SprA1_{AS}$ au sein du laboratoire (Solecki *et al.*, 2015).

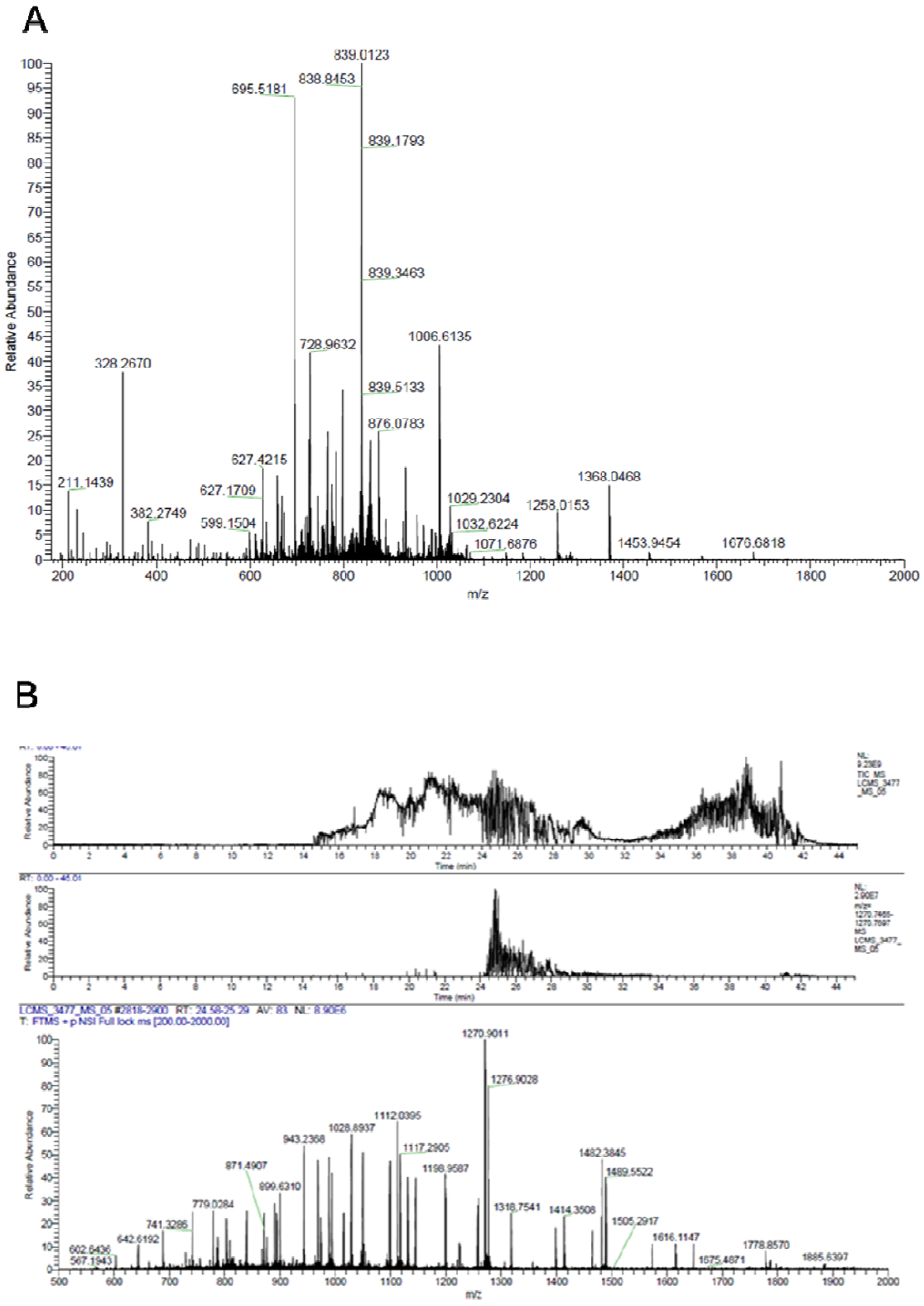
Nous avons également montré, qu'en condition de stress hyperosmotique, SprF1 fixe directement les ribosomes, probablement par l'intermédiaire d'un ou de deux RBS, afin de réguler la synthèse protéique globale et de favoriser la persistance de *S. aureus*. Ces résultats montrent que SprF1 appartient à une nouvelle classe émergente d'ARNrég régulant la traduction par fixation directe sur le ribosome. Le STA *sprG1*/SprF1 est le premier exemple de STA de type I où l'antitoxine est le principal acteur de la fonction biologique. En effet, généralement, la seule fonction de l'antitoxine de type I est de réguler l'expression de sa toxine associée.

Ainsi, nous avons montré que SprF1 est un ARNrég bifonctionnel capable d'adapter son activité régulatrice en fonction des conditions environnementales rencontrées par la bactérie. Les deux voies de régulation impliquant SprF1 semblent mener à la persistance de *S. aureus*. Ce résultat suggère qu'une antitoxine de type I codée en *cis*- peut avoir différentes cibles moléculaires. Une étude approfondie de l'activité des antitoxines peut bouleverser le paradigme selon lequel l'antitoxine de type I ne régule que l'expression de sa toxine et que c'est essentiellement la toxine qui détermine la fonction biologique d'un STA de type I.

Les STA favorisent l'adaptation des bactéries aux différentes contraintes environnementales en initiant l'arrêt du cycle cellulaire ou un programme altruiste de mort autoprogrammée. Nos résultats semblent indiquer que le STA *sprG1*/SprF1 pourrait contribuer activement à la pathogénicité de *S. aureus* par deux mécanismes via la production de deux nouveaux facteurs de virulence, $PepG1_{44}$ et $PepG1_{31}$, codés par la toxine *sprG1* en réponse à une carence nutritive et *via* la formation de cellules persistantes médiée par l'antitoxine SprF1 en réponse à un stress hyperosmotique, notamment rencontré par la bactérie au cours d'infections pulmonaires chez des patients atteints de mucoviscidose (Nakanishi *et al.*, 1978).

Enfin, une meilleure connaissance des mécanismes d'action et de régulation du système *sprG1*/SprF1 pourrait nous permettre d'envisager le STA comme un nouvel outil thérapeutique ou biotechnologique. En effet, les STA sont d'ores et déjà envisagés comme des dispositifs visant à favoriser le maintien de plasmide comme des gènes rapporteurs. Ils peuvent également constituer de nouvelles cibles thérapeutiques ou être utilisés dans le développement de nouveaux vaccins (Ghafourian *et al.*, 2014, Demidenok & Goncharenko, 2013). Il serait également intéressant d'envisager le rôle de *sprG1*/SprF1 dans la mise en place d'une nouvelle stratégie thérapeutique ciblant les bactéries persistantes qui sont fortement impliquées dans les infections chroniques et les échecs thérapeutiques (Kim *et al.*, 2015). L'émergence d'études visant à identifier ou designer des molécules capables de cibler cette fraction de la population bactérienne témoigne de l'ampleur du problème qu'elle suscite (Kim *et al.*, 2015, Lewis, 2013, Gil & Paredes-Sabja, 2016, Bahar *et al.*, 2015, Feng *et al.*, 2015, Lebeaux *et al.*, 2014).

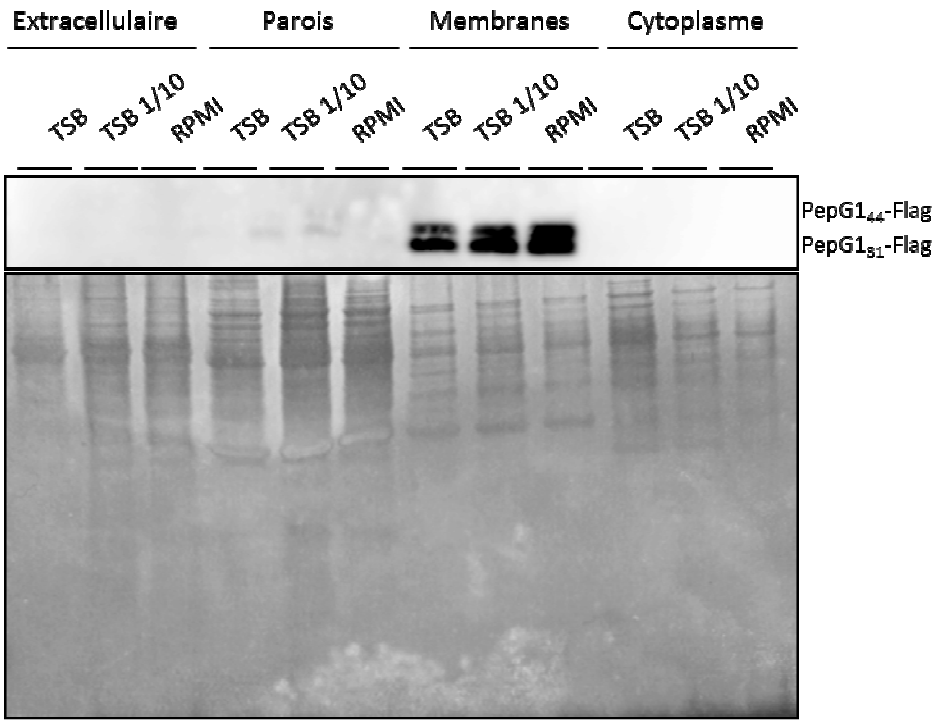
Annexes



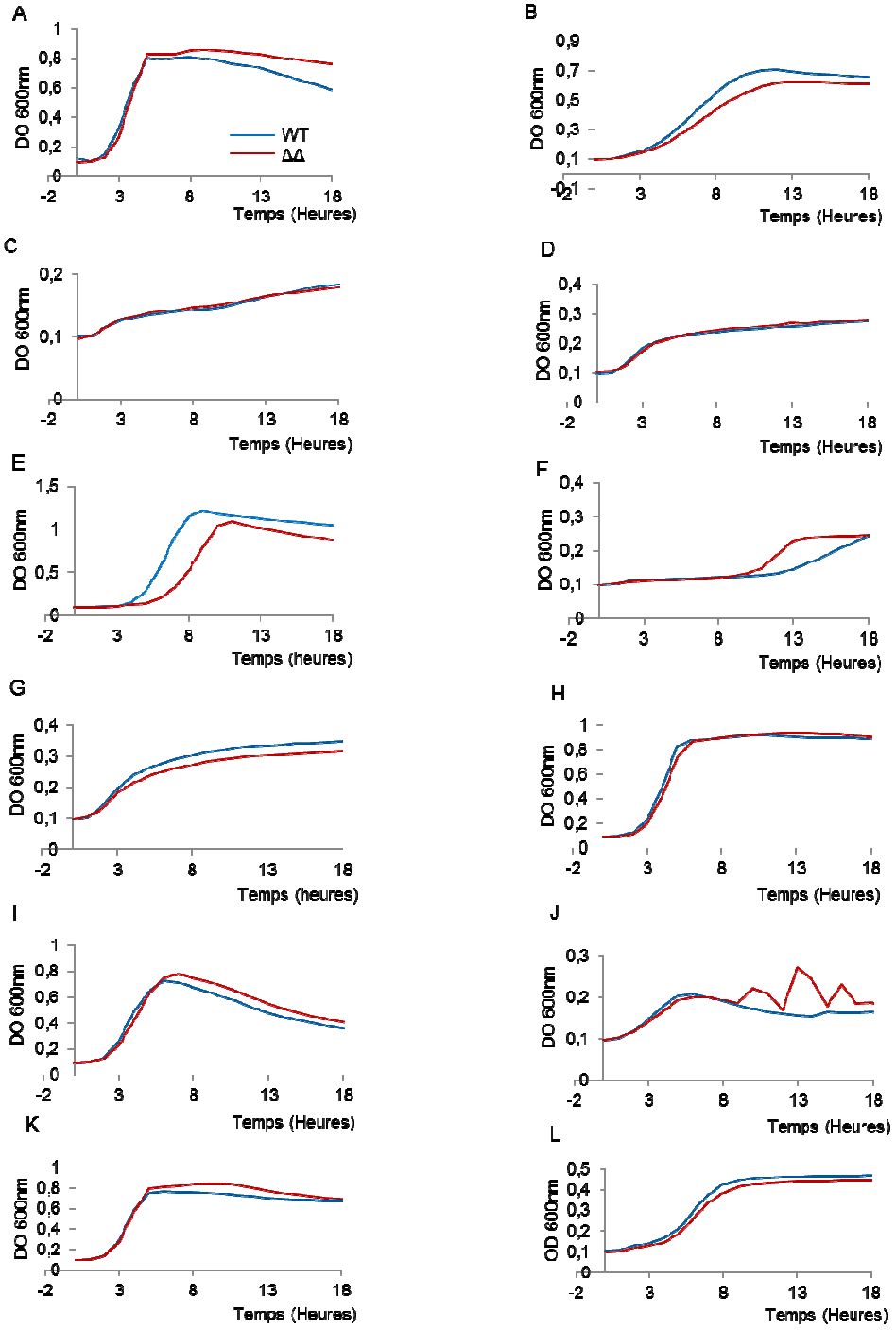
Annexe 1 : Résultats de spectrométrie de masse. (A) Mise en évidence du peptide synthétique PepG1$_{44}$ comme contrôle. (B) Analyse des extraits membranaire de *S. aureus* N315+pALCΩ*sprG1.*

ARN détectés	Amorces	Séquences, 5'→3'	Utilisation
SprF1	SprF1-F2	GTGAGCCCGTTAAAAAGACG	RT-qPCR
	SprF1-R2	GGCTGGTTCGATGGTTAAA	RT-qPCR
sprG1	sprG1-F	TAAGGAGGTGGTGCCTATGG	RT-qPCR
	sprG1-R	CAGCCAAAGTTAGCGATGGT	RT-qPCR
CodY	CodY_qPCR_R3	AAAGAAGCGCGCGATAAAGC	RT-qPCR
	CodY_qPCR_F3	TCCGTACCGCCAAGTTCTTCA	RT-qPCR
Gcp	GcpFor-2	ATCACGGCACTTTTCAACCC	RT-qPCR
	GcpRev-2	TCCCTCGTGTTTGGTTGGAT	RT-qPCR
IlvA	IlvARTFof-2	TTGGTGCTGTTTCTGGCATC	RT-qPCR
	IlvARTRev-2	CATCAGCCGGAAATCATGCA	RT-qPCR
IlvC	IlvCRTFof-2	TATTCGCCCAGGACGTTCTT	RT-qPCR
	IlvCRTRev-2	CTGCAACAGGGAACACATCA	RT-qPCR
IlvD	IlvDRTFof	CACCCGGTATGATTTTAGCAG	RT-qPCR
	IlvDRTRev	ACAAGTAGGGCAGGCATTTTG	RT-qPCR
IlvE	IlvERTFof	GGCGTTGGTGCATCACATCAGTAT	RT-qPCR
	IlvERTRev	CCACGAACAGCACGCACATATTCA	RT-qPCR
LeuA	LeuARTFof	CGGCCTTCAAAGTGCTGTTGTTGT	RT-qPCR
	LeuARTRev	ACTTCTGCTTGGGCATCAGTACCT	RT-qPCR
5S rRNA	5SRTFor	GCAAGGAGGTCACACCTGTT	RT-qPCR
	5SRTRev	GCCTGGCAACGTTCTACTCT	RT-qPCR
NB-SprF1	SprF1-NB	TAACTTTGGCTGGTTTCGATGGTT	Northern blot
NB-SprG1	SprG1-NB	ATGCCACCATAGGCACCACCTCCTT	Northern blot
NB- ARN 5S	ARN5S-NB	CGT AAGTTCGACTACCATCG	Northern blot

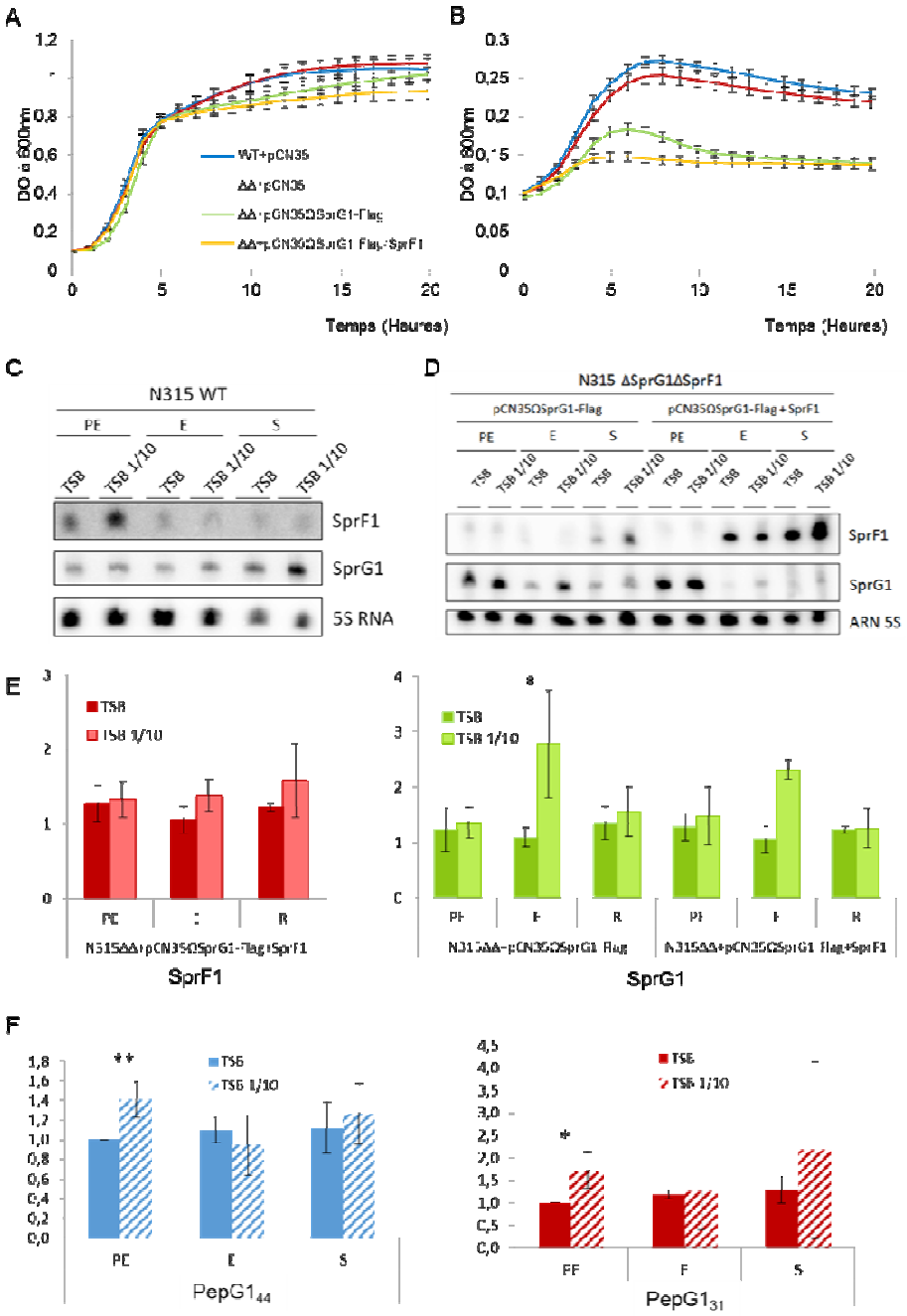
Annexe 2 : Séquences des amorces d'ADN utilisés en NB et qPCR



Annexe 3 : Répartition de PepG1$_{31}$ et PepG1$_{44}$ dans les différents compartiments cellulaires en fonction des conditions de croissance. La souche N315 ΔΔ+pCN35Ω*sprG1-Flag* a été cultivée à 37°C en milieu TSB, TSB 1/10 ou RPMI jusqu'en phase exponentielle de croissance. Après le fractionnement cellulaire, les niveaux d'expression des peptides PepG1$_{31}$ et PepG1$_{44}$ ont été analysés par Western blot avec le contrôle de dépôt par coloration des protéines totales au zinc-imidazole.



Annexe 4 : Mise en évidence du groupe de nutriments impliqué dans l'activation du STA *sprG1*/SprF1 en carence nutritive. Cinétiques de croissance des souches *S. aureus* N315 WT et Δ*sprG1*/*sprF1* en milieu chimiquement définis (MCD) (A) ; MCD sans les acides aminés (aa) du groupe 1 (tryptophane, tyrosine et phénilalanine) (B) ; MCD sans les aa du groupe 2 (cystéine, histidine, méthionine) (C) ; MCD sans les aa du groupe 3 (glutamine, acide glutamique, glycine, proline) (D) ; MCD sans les BCAA (isoleucine, leucine, thréonine, valine) (E) ; MCD sans les aa du groupe 5 (alanine, arginine, acide aspartique, lysine, hydroxy-proline, sérine) (F) ; MCD sans les vitamines (biotine, acide aminobenzoïque, acide folique, niacinamide, β nicotinamide adenine dinucléotide, calcium de panthotenate, pyridoxal, pyridoxamine dihydrochloride, riboflavine, thiamine hydrochloride, vitaminde B12) (G) ; MCD sans les bases azotées (adénine, hydrochlorure de guanine, uracil (H) ; (I et J) MCD sans les sels K_2HPO_4 et KH_2PO_4 (I) ; NaH_2PO_4, $MgSO_4$, $CaCl_2$ (J) ; MCD sans Na_2HPO_4 (K) ; MCD sans glucose (L). Le pH de chaque milieu a été ajusté à 7.0. Représentation des moyennes de trois expériences indépendantes. Dans un souci de clarté, les écart-types n'apparaissent pas sur les graphiques. Pour plus de détail sur les concentrations en nutriments, se référer à la publication de Pohl et *al.*, 2009.



Annexe 5 : Influence de la carence nutritive sur l'activation du STA *sprG1*/SprF1 après culture de *S. aureus* en milieu TSB dilué au 1/10. La souche sauvage (WT) et le mutant de délétion (ΔΔ) complémenté avec le plasmide pCN35 vide, pCN35Ω*sprG1*-Flag, pCN35Ω*sprG1*-Flag/*sprF1* ont été cultivés en milieu en milieu TSB (A) et en milieu TSB 1/10 (B). A DO_{600} 1, les ARN et les protéines ont été extraits. Les niveaux d'expression des ARN *sprG1* et SprF1 ont été analysés par Northern blot (C-E) et ceux des peptides $PepG1_{31}$ et $PepG1_{44}$ par Western blot (F). Les résultats sont exprimés en moyennes ± écart-type de trois expériences indépendantes avec le contrôle sans stress arbitrairement mis à 100%. Valeur-p par *t* test de student : *p < 0.05; **p < 0.01.

Références

Aakre, C.D., T.N. Phung, D. Huang & M.T. Laub, (2013) A bacterial toxin inhibits DNA replication elongation through a direct interaction with the beta sliding clamp. *Mol Cell* **52**: 617-628.

Abdallah, M., C. Benoliel, D. Drider, P. Dhulster & N.E. Chihib, (2014) Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Arch Microbiol* **196**: 453-472.

Abu-Qatouseh, L.F., S.V. Chinni, J. Seggewiss, R.A. Proctor, J. Brosius, T.S. Rozhdestvensky, G. Peters, C. von Eiff & K. Becker, (2010) Identification of differentially expressed small non-protein-coding RNAs in Staphylococcus aureus displaying both the normal and the small-colony variant phenotype. *J Mol Med (Berl)* **88**: 565-575.

Aedo, S. & A. Tomasz, (2016) Role of the Stringent Stress Response in the Antibiotic Resistance Phenotype of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother* **60**: 2311-2317.

Agafonov, D.E., V.A. Kolb & A.S. Spirin, (2001) Ribosome-associated protein that inhibits translation at the aminoacyl-tRNA binding stage. *EMBO Rep* **2**: 399-402.

Ageitos, J.M., A. Sanchez-Perez, P. Calo-Mata & T.G. Villa, (2016) Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. *Biochem Pharmacol*.

Aizenman, E., H. Engelberg-Kulka & G. Glaser, (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.

Alibayov, B., K. Zdenkova, H. Sykorova & K. Demnerova, (2014) Molecular analysis of Staphylococcus aureus pathogenicity islands (SaPI) and their superantigens combination of food samples. *J Microbiol Methods* **107**: 197-204.

Allard, M., H. Moisan, E. Brouillette, A.L. Gervais, M. Jacques, P. Lacasse, M.S. Diarra & F. Malouin, (2006) Transcriptional modulation of some Staphylococcus aureus iron-regulated genes during growth in vitro and in a tissue cage model in vivo. *Microbes and infection* **8**: 1679-1690.

Altuvia, S., (2004) Regulatory small RNAs: the key to coordinating global regulatory circuits. *J Bacteriol* **186**: 6679-6680.

Altuvia, S., D. Kornitzer, D. Teff & A.B. Oppenheim, (1989) Alternative mRNA structures of the cIII gene of bacteriophage lambda determine the rate of its translation initiation. *J Mol Biol* **210**: 265-280.

Alvarez-Bravo, J., S. Kurata & S. Natori, (1994) Novel synthetic antimicrobial peptides effective against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Biochem J* **302 (Pt 2)**: 535-538.

Amitai, S., I. Kolodkin-Gal, M. Hananya-Meltabashi, A. Sacher & H. Engelberg-Kulka, (2009) Escherichia coli MazF leads to the simultaneous selective synthesis of both "death proteins" and "survival proteins". *PLoS Genet* **5**: e1000390.

Anderson, K.L., C. Roberts, T. Disz, V. Vonstein, K. Hwang, R. Overbeek, P.D. Olson, S.J. Projan & P.M. Dunman, (2006) Characterization of the Staphylococcus aureus heat shock, cold shock, stringent, and SOS responses and their effects on log-phase mRNA turnover. *J Bacteriol* **188**: 6739-6756.

Andrey, D.O., A. Jousselin, M. Villanueva, A. Renzoni, A. Monod, C. Barras, N. Rodriguez & W.L. Kelley, (2015) Impact of the Regulators SigB, Rot, SarA and sarS on the Toxic Shock Tst Promoter and TSST-1 Expression in Staphylococcus aureus. *PLoS One* **10**: e0135579.

Anger, A.M., J.P. Armache, O. Berninghausen, M. Habeck, M. Subklewe, D.N. Wilson & R. Beckmann, (2013) Structures of the human and Drosophila 80S ribosome. *Nature* **497**: 80-85.

Arenz, S., M. Abdelshahid, D. Sohmen, R. Payoe, A.L. Starosta, O. Berninghausen, V. Hauryliuk, R. Beckmann & D.N. Wilson, (2016) The stringent factor RelA adopts an

open conformation on the ribosome to stimulate ppGpp synthesis. *Nucleic Acids Res* **44**: 6471-6481.
Argaman, L. & S. Altuvia, (2000) fhlA repression by OxyS RNA: kissing complex formation at two sites results in a stable antisense-target RNA complex. *J Mol Biol* **300**: 1101-1112.
Atkinson, G.C., T. Tenson & V. Hauryliuk, (2011) The RelA/SpoT homolog (RSH) superfamily: distribution and functional evolution of ppGpp synthetases and hydrolases across the tree of life. *PLoS One* **6**: e23479.
Bahar, A.A., Z. Liu, M. Garafalo, N. Kallenbach & D. Ren, (2015) Controlling Persister and Biofilm Cells of Gram-Negative Bacteria with a New 1,3,5-Triazine Derivative. *Pharmaceuticals (Basel)* **8**: 696-710.
Bahassi, E.M., M.H. O'Dea, N. Allali, J. Messens, M. Gellert & M. Couturier, (1999) Interactions of CcdB with DNA gyrase. Inactivation of Gyra, poisoning of the gyrase-DNA complex, and the antidote action of CcdA. *J Biol Chem* **274**: 10936-10944.
Balaban, N. & R.P. Novick, (1995) Translation of RNAIII, the Staphylococcus aureus agr regulatory RNA molecule, can be activated by a 3'-end deletion. *FEMS Microbiol Lett* **133**: 155-161.
Barends, S., A.W. Karzai, R.T. Sauer, J. Wower & B. Kraal, (2001) Simultaneous and functional binding of SmpB and EF-Tu-TP to the alanyl acceptor arm of tmRNA. *J Mol Biol* **314**: 9-21.
Baroja, M.L., C.A. Herfst, K.J. Kasper, S.X. Xu, D.A. Gillett, J. Li, G. Reid & J.K. McCormick, (2016) The SaeRS Two-Component System Is a Direct and Dominant Transcriptional Activator of Toxic Shock Syndrome Toxin 1 in Staphylococcus aureus. *J Bacteriol* **198**: 2732-2742.
Beaume, M., D. Hernandez, L. Farinelli, C. Deluen, P. Linder, C. Gaspin, P. Romby, J. Schrenzel & P. Francois, (2010) Cartography of methicillin-resistant S. aureus transcripts: detection, orientation and temporal expression during growth phase and stress conditions. *PLoS One* **5**: e10725.
Beck, H.C., A.M. Hansen & F.R. Lauritsen, (2004) Catabolism of leucine to branched-chain fatty acids in Staphylococcus xylosus. *J Appl Microbiol* **96**: 1185-1193.
Behshad, E., F.J. Ruzicka, S.O. Mansoorabadi, D. Chen, G.H. Reed & P.A. Frey, (2006) Enantiomeric free radicals and enzymatic control of stereochemistry in a radical mechanism: the case of lysine 2,3-aminomutases. *Biochemistry* **45**: 12639-12646.
Belanger, M. & S. Moineau, (2015) Mutational Analysis of the Antitoxin in the Lactococcal Type III Toxin-Antitoxin System AbiQ. *Appl Environ Microbiol* **81**: 3848-3855.
Ben-Shem, A., N. Garreau de Loubresse, S. Melnikov, L. Jenner, G. Yusupova & M. Yusupov, (2011) The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 A resolution. *Science* **334**: 1524-1529.
Berg, T., N. Firth, S. Apisiridej, A. Hettiaratchi, A. Leelaporn & R.A. Skurray, (1998) Complete nucleotide sequence of pSK41: evolution of staphylococcal conjugative multiresistance plasmids. *J Bacteriol* **180**: 4350-4359.
Bernard, P. & M. Couturier, (1992) Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol* **226**: 735-745.
Bhattacharya, M., D.J. Wozniak, P. Stoodley & L. Hall-Stoodley, (2015) Prevention and treatment of Staphylococcus aureus biofilms. *Expert Rev Anti Infect Ther* **13**: 1499-1516.
Biswas, R., L. Voggu, U.K. Simon, P. Hentschel, G. Thumm & F. Gotz, (2006) Activity of the major staphylococcal autolysin Atl. *FEMS Microbiol Lett* **259**: 260-268.
Blomberg, P., K. Nordstrom & E.G. Wagner, (1992) Replication control of plasmid R1: RepA synthesis is regulated by CopA RNA through inhibition of leader peptide translation. *Embo J* **11**: 2675-2683.
Bloom-Ackermann, Z., N. Steinberg, G. Rosenberg, Y. Oppenheimer-Shaanan, D. Pollack, S. Ely, N. Storzi, A. Levy & I. Kolodkin-Gal, (2016) Toxin-Antitoxin systems eliminate defective cells and preserve symmetry in Bacillus subtilis biofilms. *Environ Microbiol*.

Blower, T.R., G.P. Salmond & B.F. Luisi, (2011) Balancing at survival's edge: the structure and adaptive benefits of prokaryotic toxin-antitoxin partners. *Curr Opin Struct Biol* **21**: 109-118.

Boel, G., P.C. Smith, W. Ning, M.T. Englander, B. Chen, Y. Hashem, A.J. Testa, J.J. Fischer, H.J. Wieden, J. Frank, R.L. Gonzalez, Jr. & J.F. Hunt, (2014) The ABC-F protein EttA gates ribosome entry into the translation elongation cycle. *Nat Struct Mol Biol* **21**: 143-151.

Boggild, A., N. Sofos, K.R. Andersen, A. Feddersen, A.D. Easter, L.A. Passmore & D.E. Brodersen, (2012) The crystal structure of the intact E. coli RelBE toxin-antitoxin complex provides the structural basis for conditional cooperativity. *Structure* **20**: 1641-1648.

Bohn, C., C. Rigoulay, S. Chabelskaya, C.M. Sharma, A. Marchais, P. Skorski, E. Borezee-Durant, R. Barbet, E. Jacquet, A. Jacq, D. Gautheret, B. Felden, J. Vogel & P. Bouloc, (2010) Experimental discovery of small RNAs in Staphylococcus aureus reveals a riboregulator of central metabolism. *Nucleic Acids Res* **38**: 6620-6636.

Boisset, S., T. Geissmann, E. Huntzinger, P. Fechter, N. Bendridi, M. Possedko, C. Chevalier, A.C. Helfer, Y. Benito, A. Jacquier, C. Gaspin, F. Vandenesch & P. Romby, (2007) Staphylococcus aureus RNAIII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism. *Genes Dev* **21**: 1353-1366.

Bonnin, R.A. & P. Bouloc, (2015) RNA Degradation in Staphylococcus aureus: Diversity of Ribonucleases and Their Impact. *Int J Genomics* **2015**: 395753.

Bordeau, V., A. Cady, M. Revest, O. Rostan, M. Sassi, P. Tattevin, P.Y. Donnio & B. Felden, (2016) Staphylococcus aureus Regulatory RNAs as Potential Biomarkers for Bloodstream Infections. *Emerg Infect Dis* **22**: 1570-1578.

Bore, E., S. Langsrud, O. Langsrud, T.M. Rode & A. Holck, (2007) Acid-shock responses in Staphylococcus aureus investigated by global gene expression analysis. *Microbiology* **153**: 2289-2303.

Bosch, T., M. van Luit, G.N. Pluister, D. Frentz, A. Haenen, F. Landman, S. Witteveen, N. van Marm-Wattimena, H.G. van der Heide & L.M. Schouls, (2016) Changing characteristics of livestock-associated meticillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from humans - emergence of a subclade transmitted without livestock exposure, the Netherlands, 2003 to 2014. *Euro Surveill* **21**.

Bosi, E., J.M. Monk, R.K. Aziz, M. Fondi, V. Nizet & B.O. Palsson, (2016) Comparative genome-scale modelling of Staphylococcus aureus strains identifies strain-specific metabolic capabilities linked to pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**: E3801-3809.

Botelho, A.M., M.O. Costa, C.O. Beltrame, F.A. Ferreira, M.F. Cortes, P.T. Bandeira, N.C. Lima, R.C. Souza, L.G. Almeida, A.T. Vasconcelos, M.F. Nicolas & A.M. Figueiredo, (2016) Complete genome sequence of an agr-dysfunctional variant of the ST239 lineage of the methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain GV69 from Brazil. *Stand Genomic Sci* **11**: 34.

Botka, T., V. Ruzickova, H. Konecna, R. Pantucek, I. Rychlik, Z. Zdrahal, P. Petras & J. Doskar, (2015) Complete genome analysis of two new bacteriophages isolated from impetigo strains of Staphylococcus aureus. *Virus Genes* **51**: 122-131.

Bouvier, M., C.M. Sharma, F. Mika, K.H. Nierhaus & J. Vogel, (2008) Small RNA binding to 5' mRNA coding region inhibits translational initiation. *Mol Cell* **32**: 827-837.

Brantl, S., (2012) Bacterial type I toxin-antitoxin systems. *RNA Biol* **9**: 1488-1490.

Brantl, S. & N. Jahn, (2015) sRNAs in bacterial type I and type III toxin-antitoxin systems. *FEMS Microbiol Rev* **39**: 413-427.

Bravo, A., G. de Torrontegui & R. Diaz, (1987) Identification of components of a new stability system of plasmid R1, ParD, that is close to the origin of replication of this plasmid. *Mol Gen Genet* **210**: 101-110.

Breaker, R.R., (2012) Ancient, giant riboswitches at atomic resolution. *Nat Struct Mol Biol* **19**: 1208-1209.
Brielle, R., M.L. Pinel-Marie & B. Felden, (2016) Linking bacterial type I toxins with their actions. *Curr Opin Microbiol* **30**: 114-121.
Brodersen, D.E., W.M. Clemons, Jr., A.P. Carter, R.J. Morgan-Warren, B.T. Wimberly & V. Ramakrishnan, (2000) The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell* **103**: 1143-1154.
Bronesky, D., Z. Wu, S. Marzi, P. Walter, T. Geissmann, K. Moreau, F. Vandenesch, I. Caldelari & P. Romby, (2016) Staphylococcus aureus RNAIII and Its Regulon Link Quorum Sensing, Stress Responses, Metabolic Adaptation, and Regulation of Virulence Gene Expression. *Annu Rev Microbiol* **70**: 299-316.
Bukowski, M., R. Lyzen, W.M. Helbin, E. Bonar, A. Szalewska-Palasz, G. Wegrzyn, G. Dubin, A. Dubin & B. Wladyka, (2013) A regulatory role for Staphylococcus aureus toxin-antitoxin system PemIKSa. *Nat Commun* **4**: 2012.
Bukowski, M., B. Wladyka & G. Dubin, (2010) Exfoliative toxins of Staphylococcus aureus. *Toxins (Basel)* **2**: 1148-1165.
Cadena, J., J. Thinwa, E.A. Walter & C.R. Frei, (2016) Risk factors for the development of active methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) infection in patients colonized with MRSA at hospital admission. *Am J Infect Control*.
Cambray, G., A.M. Guerout & D. Mazel, (2010) Integrons. *Annu Rev Genet* **44**: 141-166.
Cassat, J.E., N.D. Hammer, J.P. Campbell, M.A. Benson, D.S. Perrien, L.N. Mrak, M.S. Smeltzer, V.J. Torres & E.P. Skaar, (2013) A secreted bacterial protease tailors the Staphylococcus aureus virulence repertoire to modulate bone remodeling during osteomyelitis. *Cell Host Microbe* **13**: 759-772.
Castro-Roa, D., A. Garcia-Pino, S. De Gieter, N.A. van Nuland, R. Loris & N. Zenkin, (2013) The Fic protein Doc uses an inverted substrate to phosphorylate and inactivate EF-Tu. *Nat Chem Biol* **9**: 811-817.
Chabelskaya, S., V. Bordeau & B. Felden, (2014) Dual RNA regulatory control of a Staphylococcus aureus virulence factor. *Nucleic Acids Res* **42**: 4847-4858.
Chabelskaya, S., O. Gaillot & B. Felden, (2010) A Staphylococcus aureus small RNA is required for bacterial virulence and regulates the expression of an immune-evasion molecule. *PLoS Pathog* **6**: e1000927.
Chan, E.S., P. Fernandez & B.N. Cronstein, (2007) Adenosine in inflammatory joint diseases. *Purinergic Signal* **3**: 145-152.
Chan, P.F. & S.J. Foster, (1998) The role of environmental factors in the regulation of virulence-determinant expression in Staphylococcus aureus 8325-4. *Microbiology* **144 (Pt 9)**: 2469-2479.
Chan, W.T. & M. Espinosa, (2016) The Streptococcus pneumoniae pezAT Toxin-Antitoxin System Reduces beta-Lactam Resistance and Genetic Competence. *Front Microbiol* **7**: 1322.
Chan, W.T., M. Espinosa & C.C. Yeo, (2016) Keeping the Wolves at Bay: Antitoxins of Prokaryotic Type II Toxin-Antitoxin Systems. *Front Mol Biosci* **3**: 9.
Chang, Q. & J.M. Petrash, (2008) Disruption of aldo-keto reductase genes leads to elevated markers of oxidative stress and inositol auxotrophy in Saccharomyces cerevisiae. *Biochim Biophys Acta* **1783**: 237-245.
Chang, W., D.A. Small, F. Toghrol & W.E. Bentley, (2006) Global transcriptome analysis of Staphylococcus aureus response to hydrogen peroxide. *J Bacteriol* **188**: 1648-1659.
Charpentier, E., A.I. Anton, P. Barry, B. Alfonso, Y. Fang & R.P. Novick, (2004) Novel cassette-based shuttle vector system for gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol* **70**: 6076-6085.
Chatterjee, A., C.T. Jurgenson, F.C. Schroeder, S.E. Ealick & T.P. Begley, (2007) Biosynthesis of thiamin thiazole in eukaryotes: conversion of NAD to an advanced intermediate. *J Am Chem Soc* **129**: 2914-2922.

Chatterjee, A., Y. Li, Y. Zhang, T.L. Grove, M. Lee, C. Krebs, S.J. Booker, T.P. Begley & S.E. Ealick, (2008) Reconstitution of ThiC in thiamine pyrimidine biosynthesis expands the radical SAM superfamily. *Nat Chem Biol* **4**: 758-765.

Chatterjee, S.S. & M. Otto, (2013) How can Staphylococcus aureus phenol-soluble modulins be targeted to inhibit infection? *Future Microbiol* **8**: 693-696.

Chatterji, D., N. Fujita & A. Ishihama, (1998) The mediator for stringent control, ppGpp, binds to the beta-subunit of Escherichia coli RNA polymerase. *Genes Cells* **3**: 279-287.

Chavakis, T., K. Wiechmann, K.T. Preissner & M. Herrmann, (2005) Staphylococcus aureus interactions with the endothelium: the role of bacterial "secretable expanded repertoire adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thromb Haemost* **94**: 278-285.

Chen, B., G. Boel, Y. Hashem, W. Ning, J. Fei, C. Wang, R.L. Gonzalez, Jr., J.F. Hunt & J. Frank, (2014) EttA regulates translation by binding the ribosomal E site and restricting ribosome-tRNA dynamics. *Nat Struct Mol Biol* **21**: 152-159.

Cheng, A.G., M. McAdow, H.K. Kim, T. Bae, D.M. Missiakas & O. Schneewind, (2010) Contribution of coagulases towards Staphylococcus aureus disease and protective immunity. *PLoS Pathog* **6**: e1001036.

Cherny, I., L. Rockah & E. Gazit, (2005) The YoeB toxin is a folded protein that forms a physical complex with the unfolded YefM antitoxin. Implications for a structural-based differential stability of toxin-antitoxin systems. *J Biol Chem* **280**: 30063-30072.

Cheung, A.L., K.J. Eberhardt, E. Chung, M.R. Yeaman, P.M. Sullam, M. Ramos & A.S. Bayer, (1994) Diminished virulence of a sar-/agr- mutant of Staphylococcus aureus in the rabbit model of endocarditis. *J Clin Invest* **94**: 1815-1822.

Cheung, A.L., K. Nishina & A.C. Manna, (2008) SarA of Staphylococcus aureus binds to the sarA promoter to regulate gene expression. *J Bacteriol* **190**: 2239-2243.

Cheung, G.Y., R. Wang, B.A. Khan, D.E. Sturdevant & M. Otto, (2011) Role of the accessory gene regulator agr in community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus pathogenesis. *Infect Immun* **79**: 1927-1935.

Chevalier, C., S. Boisset, C. Romilly, B. Masquida, P. Fechter, T. Geissmann, F. Vandenesch & P. Romby, (2010) Staphylococcus aureus RNAIII binds to two distant regions of coa mRNA to arrest translation and promote mRNA degradation. *PLoS Pathog* **6**: e1000809.

Chien, Y., A.C. Manna, S.J. Projan & A.L. Cheung, (1999) SarA, a global regulator of virulence determinants in Staphylococcus aureus, binds to a conserved motif essential for sar-dependent gene regulation. *J Biol Chem* **274**: 37169-37176.

Cho, J., J. Rogers, M. Kearns, M. Leslie, S.D. Hartson & K.S. Wilson, (2015) Escherichia coli persister cells suppress translation by selectively disassembling and degrading their ribosomes. *Mol Microbiol* **95**: 352-364.

Chopra, I. & M. Roberts, (2001) Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**: 232-260 ; second page, table of contents.

Choy, J.S., L.L. Aung & A.W. Karzai, (2007) Lon protease degrades transfer-messenger RNA-tagged proteins. *J Bacteriol* **189**: 6564-6571.

Christensen, S.K., M. Mikkelsen, K. Pedersen & K. Gerdes, (2001) RelE, a global inhibitor of translation, is activated during nutritional stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 14328-14333.

Chukwudi, C.U. & L. Good, (2015) The role of the hok/sok locus in bacterial response to stressful growth conditions. *Microb Pathog* **79**: 70-79.

Chunhua, M., L. Yu, G. Yaping, D. Jie, L. Qiang, T. Xiaorong & Y. Guang, (2012) The expression of LytM is down-regulated by RNAIII in Staphylococcus aureus. *J Basic Microbiol* **52**: 636-641.

Claassen-Weitz, S., A.O. Shittu, M.R. Ngwarai, L. Thabane, M.P. Nicol & M. Kaba, (2016) Fecal Carriage of Staphylococcus aureus in the Hospital and Community Setting: A Systematic Review. *Front Microbiol* **7**: 449.

Clarke, S.R. & S.J. Foster, (2006) Surface adhesins of Staphylococcus aureus. *Adv Microb Physiol* **51**: 187-224.
Condon, C., (2006) Shutdown decay of mRNA. *Mol Microbiol* **61**: 573-583.
Conlon, B.P., E.S. Nakayasu, L.E. Fleck, M.D. LaFleur, V.M. Isabella, K. Coleman, S.N. Leonard, R.D. Smith, J.N. Adkins & K. Lewis, (2013) Activated ClpP kills persisters and eradicates a chronic biofilm infection. *Nature* **503**: 365-370.
Conlon, B.P., S.E. Rowe, A.B. Gandt, A.S. Nuxoll, N.P. Donegan, E.A. Zalis, G. Clair, J.N. Adkins, A.L. Cheung & K. Lewis, (2016) Persister formation in Staphylococcus aureus is associated with ATP depletion. *Nat Microbiol* **1**: 16051.
Conlon, B.P., S.E. Rowe & K. Lewis, (2015) Persister cells in biofilm associated infections. *Adv Exp Med Biol* **831**: 1-9.
Connell, S.R., D.M. Tracz, K.H. Nierhaus & D.E. Taylor, (2003a) Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 3675-3681.
Connell, S.R., C.A. Trieber, G.P. Dinos, E. Einfeldt, D.E. Taylor & K.H. Nierhaus, (2003b) Mechanism of Tet(O)-mediated tetracycline resistance. *Embo J* **22**: 945-953.
Cook, G.M., J.R. Robson, R.A. Frampton, J. McKenzie, R. Przybilski, P.C. Fineran & V.L. Arcus, (2013) Ribonucleases in bacterial toxin-antitoxin systems. *Biochim Biophys Acta* **1829**: 523-531.
Correia, F.F., A. D'Onofrio, T. Rejtar, L. Li, B.L. Karger, K. Makarova, E.V. Koonin & K. Lewis, (2006) Kinase activity of overexpressed HipA is required for growth arrest and multidrug tolerance in Escherichia coli. *J Bacteriol* **188**: 8360-8367.
Cougot, N., A.E. Molza, J. Delesques, E. Giudice, A. Cavalier, J.P. Rolland, G. Ermel, C. Blanco, D. Thomas & R. Gillet, (2014) Visualizing compaction of polysomes in bacteria. *J Mol Biol* **426**: 377-388.
Cox, G., G.S. Thompson, H.T. Jenkins, F. Peske, A. Savelsbergh, M.V. Rodnina, W. Wintermeyer, S.W. Homans, T.A. Edwards & A.J. O'Neill, (2012) Ribosome clearance by FusB-type proteins mediates resistance to the antibiotic fusidic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 2102-2107.
Cruz, J.W., F.P. Rothenbacher, T. Maehigashi, W.S. Lane, C.M. Dunham & N.A. Woychik, (2014) Doc toxin is a kinase that inactivates elongation factor Tu. *J Biol Chem* **289**: 7788-7798.
Cruz, J.W., J.D. Sharp, E.D. Hoffer, T. Maehigashi, I.O. Vvedenskaya, A. Konkimalla, R.N. Husson, B.E. Nickels, C.M. Dunham & N.A. Woychik, (2015) Growth-regulating Mycobacterium tuberculosis VapC-mt4 toxin is an isoacceptor-specific tRNase. *Nat Commun* **6**: 7480.
Dambach, M., M. Sandoval, T.B. Updegrove, V. Anantharaman, L. Aravind, L.S. Waters & G. Storz, (2015) The ubiquitous yybP-ykoY riboswitch is a manganese-responsive regulatory element. *Mol Cell* **57**: 1099-1109.
Darfeuille, F., C. Unoson, J. Vogel & E.G. Wagner, (2007) An antisense RNA inhibits translation by competing with standby ribosomes. *Mol Cell* **26**: 381-392.
Das, S., C. Lindemann, B.C. Young, J. Muller, B. Osterreich, N. Ternette, A.C. Winkler, K. Paprotka, R. Reinhardt, K.U. Forstner, E. Allen, A. Flaxman, Y. Yamaguchi, C.S. Rollier, P. van Diemen, S. Blattner, C.W. Remmele, M. Selle, M. Dittrich, T. Muller, J. Vogel, K. Ohlsen, D.W. Crook, R. Massey, D.J. Wilson, T. Rudel, D.H. Wyllie & M.J. Fraunholz, (2016) Natural mutations in a Staphylococcus aureus virulence regulator attenuate cytotoxicity but permit bacteremia and abscess formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**: E3101-3110.
Dastgheyb, S.S. & M. Otto, (2015) Staphylococcal adaptation to diverse physiologic niches: an overview of transcriptomic and phenotypic changes in different biological environments. *Future Microbiol* **10**: 1981-1995.
Davis, B.D., (1987) Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbiol Rev* **51**: 341-350.

Demidenok, O.I. & A.V. Goncharenko, (2013) [Bacterial toxin-antitoxin systems and perspectives for their application in medicine: a review]. *Prikl Biokhim Mikrobiol* **49**: 539-546.
Dengler, V., L. Foulston, A.S. DeFrancesco & R. Losick, (2015) An Electrostatic Net Model for the Role of Extracellular DNA in Biofilm Formation by Staphylococcus aureus. *J Bacteriol* **197**: 3779-3787.
Dennis, P.P. & M. Nomura, (1974) Stringent control of ribosomal protein gene expression in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**: 3819-3823.
Dennis, P.P. & M. Nomura, (1975) Stringent control of the transcriptional activities of ribosomal protein genes in E. coli. *Nature* **255**: 460-465.
Doerfel, L.K., I. Wohlgemuth, C. Kothe, F. Peske, H. Urlaub & M.V. Rodnina, (2013) EF-P is essential for rapid synthesis of proteins containing consecutive proline residues. *Science* **339**: 85-88.
Donegan, N.P. & A.L. Cheung, (2009) Regulation of the mazEF toxin-antitoxin module in Staphylococcus aureus and its impact on sigB expression. *J Bacteriol* **191**: 2795-2805.
Donhofer, A., S. Franckenberg, S. Wickles, O. Berninghausen, R. Beckmann & D.N. Wilson, (2012) Structural basis for TetM-mediated tetracycline resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 16900-16905.
Dorr, T., M. Vulic & K. Lewis, (2010) Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in Escherichia coli. *PLoS Biol* **8**: e1000317.
DuMont, A.L., P. Yoong, X. Liu, C.J. Day, N.M. Chumbler, D.B. James, F. Alonzo, 3rd, N.J. Bode, D.B. Lacy, M.P. Jennings & V.J. Torres, (2014) Identification of a crucial residue required for Staphylococcus aureus LukAB cytotoxicity and receptor recognition. *Infect Immun* **82**: 1268-1276.
Dunman, P.M., E. Murphy, S. Haney, D. Palacios, G. Tucker-Kellogg, S. Wu, E.L. Brown, R.J. Zagursky, D. Shlaes & S.J. Projan, (2001) Transcription profiling-based identification of Staphylococcus aureus genes regulated by the agr and/or sarA loci. *J Bacteriol* **183**: 7341-7353.
Durand, S., N. Jahn, C. Condon & S. Brantl, (2012) Type I toxin-antitoxin systems in Bacillus subtilis. *RNA Biol* **9**: 1491-1497.
Edwards, A.M., J.R. Potts, E. Josefsson & R.C. Massey, (2010) Staphylococcus aureus host cell invasion and virulence in sepsis is facilitated by the multiple repeats within FnBPA. *PLoS Pathog* **6**: e1000964.
Engelberg-Kulka, H., S. Amitai, I. Kolodkin-Gal & R. Hazan, (2006) Bacterial programmed cell death and multicellular behavior in bacteria. *PLoS Genet* **2**: e135.
Eyraud, A., P. Tattevin, S. Chabelskaya & B. Felden, (2014) A small RNA controls a protein regulator involved in antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. *Nucleic Acids Res* **42**: 4892-4905.
Farrell, D.J., M. Castanheira & I. Chopra, (2011) Characterization of global patterns and the genetics of fusidic acid resistance. *Clin Infect Dis* **52 Suppl 7**: S487-492.
Fechter, P., I. Caldelari, E. Lioliou & P. Romby, (2014) Novel aspects of RNA regulation in Staphylococcus aureus. *FEBS Lett* **588**: 2523-2529.
Felden, B. & R. Gillet, (2011) SmpB as the handyman of tmRNA during trans-translation. *RNA Biol* **8**: 440-449.
Feng, B., C.S. Mandava, Q. Guo, J. Wang, W. Cao, N. Li, Y. Zhang, Z. Wang, J. Wu, S. Sanyal, J. Lei & N. Gao, (2014) Structural and functional insights into the mode of action of a universally conserved Obg GTPase. *PLoS Biol* **12**: e1001866.
Feng, J., P.G. Auwaerter & Y. Zhang, (2015) Drug combinations against Borrelia burgdorferi persisters in vitro: eradication achieved by using daptomycin, cefoperazone and doxycycline. *PLoS One* **10**: e0117207.
Feng, S., Y. Chen, K. Kamada, H. Wang, K. Tang, M. Wang & Y.G. Gao, (2013) YoeB-ribosome structure: a canonical RNase that requires the ribosome for its specific activity. *Nucleic Acids Res* **41**: 9549-9556.

Fineran, P.C., T.R. Blower, I.J. Foulds, D.P. Humphreys, K.S. Lilley & G.P. Salmond, (2009) The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 894-899.

Fitzgerald, J.R., (2014) Evolution of Staphylococcus aureus during human colonization and infection. *Infect Genet Evol* **21**: 542-547.

Floss, H.G. & T.W. Yu, (2005) Rifamycin-mode of action, resistance, and biosynthesis. *Chem Rev* **105**: 621-632.

Flynn, J.M., I. Levchenko, M. Seidel, S.H. Wickner, R.T. Sauer & T.A. Baker, (2001) Overlapping recognition determinants within the ssrA degradation tag allow modulation of proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10584-10589.

Foster, T.J., J.A. Geoghegan, V.K. Ganesh & M. Hook, (2014) Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of Staphylococcus aureus. *Nat Rev Microbiol* **12**: 49-62.

Foulston, L., A.K. Elsholz, A.S. DeFrancesco & R. Losick, (2014) The extracellular matrix of Staphylococcus aureus biofilms comprises cytoplasmic proteins that associate with the cell surface in response to decreasing pH. *MBio* **5**: e01667-01614.

Fozo, E.M., (2012) New type I toxin-antitoxin families from "wild" and laboratory strains of E. coli: Ibs-Sib, ShoB-OhsC and Zor-Orz. *RNA Biol* **9**: 1504-1512.

Fozo, E.M., M. Kawano, F. Fontaine, Y. Kaya, K.S. Mendieta, K.L. Jones, A. Ocampo, K.E. Rudd & G. Storz, (2008) Repression of small toxic protein synthesis by the Sib and OhsC small RNAs. *Mol Microbiol* **70**: 1076-1093.

Fozo, E.M., K.S. Makarova, S.A. Shabalina, N. Yutin, E.V. Koonin & G. Storz, (2010) Abundance of type I toxin-antitoxin systems in bacteria: searches for new candidates and discovery of novel families. *Nucleic Acids Res* **38**: 3743-3759.

Franch, T. & K. Gerdes, (1996) Programmed cell death in bacteria: translational repression by mRNA end-pairing. *Mol Microbiol* **21**: 1049-1060.

Franch, T., A.P. Gultyaev & K. Gerdes, (1997) Programmed cell death by hok/sok of plasmid R1: processing at the hok mRNA 3'-end triggers structural rearrangements that allow translation and antisense RNA binding. *J Mol Biol* **273**: 38-51.

Fu, Z., S. Tamber, G. Memmi, N.P. Donegan & A.L. Cheung, (2009) Overexpression of MazFsa in Staphylococcus aureus induces bacteriostasis by selectively targeting mRNAs for cleavage. *J Bacteriol* **191**: 2051-2059.

Fuchs, R.T., F.J. Grundy & T.M. Henkin, (2006) The S(MK) box is a new SAM-binding RNA for translational regulation of SAM synthetase. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 226-233.

Gao, N., A.V. Zavialov, W. Li, J. Sengupta, M. Valle, R.P. Gursky, M. Ehrenberg & J. Frank, (2005) Mechanism for the disassembly of the posttermination complex inferred from cryo-EM studies. *Mol Cell* **18**: 663-674.

Gao, W., D.R. Cameron, J.K. Davies, X. Kostoulias, J. Stepnell, K.L. Tuck, M.R. Yeaman, A.Y. Peleg, T.P. Stinear & B.P. Howden, (2013) The RpoB H(4)(8)(1)Y rifampicin resistance mutation and an active stringent response reduce virulence and increase resistance to innate immune responses in Staphylococcus aureus. *J Infect Dis* **207**: 929-939.

Gao, W., K. Chua, J.K. Davies, H.J. Newton, T. Seemann, P.F. Harrison, N.E. Holmes, H.W. Rhee, J.I. Hong, E.L. Hartland, T.P. Stinear & B.P. Howden, (2010) Two novel point mutations in clinical Staphylococcus aureus reduce linezolid susceptibility and switch on the stringent response to promote persistent infection. *PLoS Pathog* **6**: e1000944.

Gebetsberger, J., R. Fricker & N. Polacek, (2015) cDNA library generation for the analysis of small RNAs by high-throughput sequencing. *Methods Mol Biol* **1296**: 139-149.

Gebetsberger, J., M. Zywicki, A. Kunzi & N. Polacek, (2012) tRNA-derived fragments target the ribosome and function as regulatory non-coding RNA in Haloferax volcanii. *Archaea* **2012**: 260909.

Geiger, T., P. Francois, M. Liebeke, M. Fraunholz, C. Goerke, B. Krismer, J. Schrenzel, M. Lalk & C. Wolz, (2012) The stringent response of Staphylococcus aureus and its

impact on survival after phagocytosis through the induction of intracellular PSMs expression. *PLoS Pathog* **8**: e1003016.
Geiger, T., C. Goerke, M. Mainiero, D. Kraus & C. Wolz, (2008) The virulence regulator Sae of Staphylococcus aureus: promoter activities and response to phagocytosis-related signals. *J Bacteriol* **190**: 3419-3428.
Geiger, T., B. Kastle, F.L. Gratani, C. Goerke & C. Wolz, (2014) Two small (p)ppGpp synthases in Staphylococcus aureus mediate tolerance against cell envelope stress conditions. *J Bacteriol* **196**: 894-902.
Geisinger, E., R.P. Adhikari, R. Jin, H.F. Ross & R.P. Novick, (2006) Inhibition of rot translation by RNAIII, a key feature of agr function. *Mol Microbiol* **61**: 1038-1048.
Geissmann, T., S. Marzi & P. Romby, (2009) The role of mRNA structure in translational control in bacteria. *RNA Biol* **6**: 153-160.
Gentry, D.R., V.J. Hernandez, L.H. Nguyen, D.B. Jensen & M. Cashel, (1993) Synthesis of the stationary-phase sigma factor sigma s is positively regulated by ppGpp. *J Bacteriol* **175**: 7982-7989.
George, S.E., T. Nguyen, T. Geiger, C. Weidenmaier, J.C. Lee, J. Liese & C. Wolz, (2015) Phenotypic heterogeneity and temporal expression of the capsular polysaccharide in Staphylococcus aureus. *Mol Microbiol* **98**: 1073-1088.
Gerdes, K., (2016) Hypothesis: type I toxin-antitoxin genes enter the persistence field-a feedback mechanism explaining membrane homoeostasis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **371**.
Gerdes, K., F.W. Bech, S.T. Jorgensen, A. Lobner-Olesen, P.B. Rasmussen, T. Atlung, L. Boe, O. Karlstrom, S. Molin & K. von Meyenburg, (1986a) Mechanism of postsegregational killing by the hok gene product of the parB system of plasmid R1 and its homology with the relF gene product of the E. coli relB operon. *Embo J* **5**: 2023-2029.
Gerdes, K., S.K. Christensen & A. Lobner-Olesen, (2005) Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat Rev Microbiol* **3**: 371-382.
Gerdes, K., A. Nielsen, P. Thorsted & E.G. Wagner, (1992) Mechanism of killer gene activation. Antisense RNA-dependent RNase III cleavage ensures rapid turn-over of the stable hok, srnB and pndA effector messenger RNAs. *J Mol Biol* **226**: 637-649.
Gerdes, K., P.B. Rasmussen & S. Molin, (1986b) Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 3116-3120.
Gerdes, K., T. Thisted & J. Martinussen, (1990) Mechanism of post-segregational killing by the hok/sok system of plasmid R1: sok antisense RNA regulates formation of a hok mRNA species correlated with killing of plasmid-free cells. *Mol Microbiol* **4**: 1807-1818.
Gerdes, K. & E.G. Wagner, (2007) RNA antitoxins. *Curr Opin Microbiol* **10**: 117-124.
Germain, E., D. Castro-Roa, N. Zenkin & K. Gerdes, (2013) Molecular mechanism of bacterial persistence by HipA. *Mol Cell* **52**: 248-254.
Ghafourian, S., M. Raftari, N. Sadeghifard & Z. Sekawi, (2014) Toxin-antitoxin Systems: Classification, Biological Function and Application in Biotechnology. *Curr Issues Mol Biol* **16**: 9-14.
Giacometti, A., O. Cirioni, M.S. Del Prete, F. Barchiesi, A.M. Paggi, E. Petrelli & G. Scalise, (2000) Comparative activities of polycationic peptides and clinically used antimicrobial agents against multidrug-resistant nosocomial isolates of Acinetobacter baumannii. *J Antimicrob Chemother* **46**: 807-810.
Gil, F. & D. Paredes-Sabja, (2016) Acyldepsipeptide antibiotics as a potential therapeutic agent against Clostridium difficile recurrent infections. *Future Microbiol* **11**: 1179-1189.
Gillet, R. & B. Felden, (2007) [Lost in translation]. *Med Sci (Paris)* **23**: 633-639.
Glue, P. & R.P. Clement, (1999) Cytochrome P450 enzymes and drug metabolism--basic concepts and methods of assessment. *Cell Mol Neurobiol* **19**: 309-323.

Goeders, N., R. Chai, B. Chen, A. Day & G.P. Salmond, (2016) Structure, Evolution, and Functions of Bacterial Type III Toxin-Antitoxin Systems. *Toxins (Basel)* **8**.
Gottesman, S., E. Roche, Y. Zhou & R.T. Sauer, (1998) The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system. *Genes Dev* **12**: 1338-1347.
Graham, J.E. & B.J. Wilkinson, (1992) Staphylococcus aureus osmoregulation: roles for choline, glycine betaine, proline, and taurine. *J Bacteriol* **174**: 2711-2716.
Greene, C., D. McDevitt, P. Francois, P.E. Vaudaux, D.P. Lew & T.J. Foster, (1995) Adhesion properties of mutants of Staphylococcus aureus defective in fibronectin-binding proteins and studies on the expression of fnb genes. *Mol Microbiol* **17**: 1143-1152.
Greenfield, T.J., T. Franch, K. Gerdes & K.E. Weaver, (2001) Antisense RNA regulation of the par post-segregational killing system: structural analysis and mechanism of binding of the antisense RNA, RNAII and its target, RNAI. *Mol Microbiol* **42**: 527-537.
Greenfield, T.J. & K.E. Weaver, (2000) Antisense RNA regulation of the pAD1 par post-segregational killing system requires interaction at the 5' and 3' ends of the RNAs. *Mol Microbiol* **37**: 661-670.
Grosser, M.R., A. Weiss, L.N. Shaw & A.R. Richardson, (2016) Regulatory Requirements for Staphylococcus aureus Nitric Oxide Resistance. *J Bacteriol* **198**: 2043-2055.
Gualerzi, C.O. & C.L. Pon, (2015) Initiation of mRNA translation in bacteria: structural and dynamic aspects. *Cell Mol Life Sci* **72**: 4341-4367.
Guillet, J., M. Hallier & B. Felden, (2013) Emerging functions for the Staphylococcus aureus RNome. *PLoS Pathog* **9**: e1003767.
Guo, Y., C. Quiroga, Q. Chen, M.J. McAnulty, M.J. Benedik, T.K. Wood & X. Wang, (2014) RalR (a DNase) and RalA (a small RNA) form a type I toxin-antitoxin system in Escherichia coli. *Nucleic Acids Res* **42**: 6448-6462.
Gurnev, P.A., R. Ortenberg, T. Dorr, K. Lewis & S.M. Bezrukov, (2012) Persister-promoting bacterial toxin TisB produces anion-selective pores in planar lipid bilayers. *FEBS Lett* **586**: 2529-2534.
Hallier, M., J. Desreac & B. Felden, (2006) Small protein B interacts with the large and the small subunits of a stalled ribosome during trans-translation. *Nucleic Acids Res* **34**: 1935-1943.
Han, K., K.S. Kim, G. Bak, H. Park & Y. Lee, (2010) Recognition and discrimination of target mRNAs by Sib RNAs, a cis-encoded sRNA family. *Nucleic Acids Res* **38**: 5851-5866.
Hanawa-Suetsugu, K., M. Takagi, H. Inokuchi, H. Himeno & A. Muto, (2002) SmpB functions in various steps of trans-translation. *Nucleic Acids Res* **30**: 1620-1629.
Hancock, R.E. & R. Lehrer, (1998) Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol* **16**: 82-88.
Harder, J. & J.M. Schroder, (2005) Antimicrobial peptides in human skin. *Chem Immunol Allergy* **86**: 22-41.
Hauryliuk, V., G.C. Atkinson, K.S. Murakami, T. Tenson & K. Gerdes, (2015) Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nat Rev Microbiol* **13**: 298-309.
Hayes, C.S., B. Bose & R.T. Sauer, (2002) Proline residues at the C terminus of nascent chains induce SsrA tagging during translation termination. *J Biol Chem* **277**: 33825-33832.
Hayes, F. & B. Kedzierska, (2014) Regulating toxin-antitoxin expression: controlled detonation of intracellular molecular timebombs. *Toxins (Basel)* **6**: 337-358.
Hayes, F. & L. Van Melderen, (2011) Toxins-antitoxins: diversity, evolution and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **46**: 386-408.
Heilmann, C., (2011) Adhesion mechanisms of staphylococci. *Adv Exp Med Biol* **715**: 105-123.

Helaine, S., A.M. Cheverton, K.G. Watson, L.M. Faure, S.A. Matthews & D.W. Holden, (2014) Internalization of Salmonella by macrophages induces formation of nonreplicating persisters. *Science* **343**: 204-208.
Hennekinne, J.A., M.L. De Buyser & S. Dragacci, (2012) Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol Rev* **36**: 815-836.
Henry, T.C. & M.P. Brynildsen, (2016) Development of Persister-FACSeq: a method to massively parallelize quantification of persister physiology and its heterogeneity. *Sci Rep* **6**: 25100.
Herman, C., D. Thevenet, P. Bouloc, G.C. Walker & R. D'Ari, (1998) Degradation of carboxy-terminal-tagged cytoplasmic proteins by the Escherichia coli protease HflB (FtsH). *Genes Dev* **12**: 1348-1355.
Hernandez-Arriaga, A.M., W.T. Chan, M. Espinosa & R. Diaz-Orejas, (2014) Conditional Activation of Toxin-Antitoxin Systems: Postsegregational Killing and Beyond. *Microbiol Spectr* **2**.
Heyer, E.E. & M.J. Moore, (2016) Redefining the Translational Status of 80S Monosomes. *Cell* **164**: 757-769.
Himeno, H., N. Nameki, D. Kurita, A. Muto & T. Abo, (2015) Ribosome rescue systems in bacteria. *Biochimie* **114**: 102-112.
Hindley, J., (1967) Fractionation of 32P-labelled ribonucleic acids on polyacrylamide gels and their characterization by fingerprinting. *J Mol Biol* **30**: 125-136.
Hirschhausen, N., T. Schlesier, M.A. Schmidt, F. Gotz, G. Peters & C. Heilmann, (2010) A novel staphylococcal internalization mechanism involves the major autolysin Atl and heat shock cognate protein Hsc70 as host cell receptor. *Cell Microbiol* **12**: 1746-1764.
Holmqvist, E., J. Reimegard, M. Sterk, N. Grantcharova, U. Romling & E.G. Wagner, (2010) Two antisense RNAs target the transcriptional regulator CsgD to inhibit curli synthesis. *Embo J* **29**: 1840-1850.
Holmqvist, E., J. Reimegard & E.G. Wagner, (2013) Massive functional mapping of a 5'-UTR by saturation mutagenesis, phenotypic sorting and deep sequencing. *Nucleic Acids Res* **41**: e122.
Holtfreter, S., T.T. Nguyen, H. Wertheim, L. Steil, H. Kusch, Q.P. Truong, S. Engelmann, M. Hecker, U. Volker, A. van Belkum & B.M. Broker, (2009) Human immune proteome in experimental colonization with Staphylococcus aureus. *Clin Vaccine Immunol* **16**: 1607-1614.
Homerova, D., M. Bischoff, A. Dumolin & J. Kormanec, (2004) Optimization of a two-plasmid system for the identification of promoters recognized by RNA polymerase containing Staphylococcus aureus alternative sigma factor sigmaB. *FEMS Microbiol Lett* **232**: 173-179.
Hooper, D.C., (2001) Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg Infect Dis* **7**: 337-341.
Howden, B.P., M. Beaume, P.F. Harrison, D. Hernandez, J. Schrenzel, T. Seemann, P. Francois & T.P. Stinear, (2013) Analysis of the small RNA transcriptional response in multidrug-resistant Staphylococcus aureus after antimicrobial exposure. *Antimicrob Agents Chemother* **57**: 3864-3874.
Howden, B.P., J.K. Davies, P.D. Johnson, T.P. Stinear & M.L. Grayson, (2010) Reduced vancomycin susceptibility in Staphylococcus aureus, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* **23**: 99-139.
Huttenhofer, A. & J. Vogel, (2006) Experimental approaches to identify non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res* **34**: 635-646.
Inganas, M., S.G. Johansson & H.H. Bennich, (1980) Interaction of human polyclonal IgE and IgG from different species with protein A from Staphylococcus aureus:

demonstration of protein-A-reactive sites located in the Fab'2 fragment of human IgG. *Scand J Immunol* **12**: 23-31.
Ito, T., Y. Katayama & K. Hiramatsu, (1999) Cloning and nucleotide sequence determination of the entire mec DNA of pre-methicillin-resistant Staphylococcus aureus N315. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 1449-1458.
Jackman, J.E., R.K. Montange, H.S. Malik & E.M. Phizicky, (2003) Identification of the yeast gene encoding the tRNA m1G methyltransferase responsible for modification at position 9. *Rna* **9**: 574-585.
Jackson, M.P. & J.J. Iandolo, (1986) Sequence of the exfoliative toxin B gene of Staphylococcus aureus. *J Bacteriol* **167**: 726-728.
Jacob, W.F., M. Santer & A.E. Dahlberg, (1987) A single base change in the Shine-Dalgarno region of 16S rRNA of Escherichia coli affects translation of many proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 4757-4761.
Jaffe, A., T. Ogura & S. Hiraga, (1985) Effects of the ccd function of the F plasmid on bacterial growth. *J Bacteriol* **163**: 841-849.
Jahn, N. & S. Brantl, (2013) One antitoxin--two functions: SR4 controls toxin mRNA decay and translation. *Nucleic Acids Res* **41**: 9870-9880.
Jahn, N., S. Brantl & H. Strahl, (2015) Against the mainstream: the membrane-associated type I toxin BsrG from Bacillus subtilis interferes with cell envelope biosynthesis without increasing membrane permeability. *Mol Microbiol*.
Jahn, N., H. Preis, C. Wiedemann & S. Brantl, (2012) BsrG/SR4 from Bacillus subtilis--the first temperature-dependent type I toxin-antitoxin system. *Mol Microbiol* **83**: 579-598.
Janzon, L., S. Lofdahl & S. Arvidson, (1989) Identification and nucleotide sequence of the delta-lysin gene, hld, adjacent to the accessory gene regulator (agr) of Staphylococcus aureus. *Mol Gen Genet* **219**: 480-485.
Ji, G., R. Beavis & R.P. Novick, (1997) Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science* **276**: 2027-2030.
Ji, G., R.C. Beavis & R.P. Novick, (1995) Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 12055-12059.
Jiang, M., K. Datta, A. Walker, J. Strahler, P. Bagamasbad, P.C. Andrews & J.R. Maddock, (2006) The Escherichia coli GTPase CgtAE is involved in late steps of large ribosome assembly. *J Bacteriol* **188**: 6757-6770.
Jiang, M., S.M. Sullivan, P.K. Wout & J.R. Maddock, (2007) G-protein control of the ribosome-associated stress response protein SpoT. *J Bacteriol* **189**: 6140-6147.
Johansson, J., P. Mandin, A. Renzoni, C. Chiaruttini, M. Springer & P. Cossart, (2002) An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in Listeria monocytogenes. *Cell* **110**: 551-561.
Joo, H.S., J.L. Chan, G.Y. Cheung & M. Otto, (2010) Subinhibitory concentrations of protein synthesis-inhibiting antibiotics promote increased expression of the agr virulence regulator and production of phenol-soluble modulin cytolysins in community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 4942-4944.
Jusko, M., J. Potempa, T. Kantyka, E. Bielecka, H.K. Miller, M. Kalinska, G. Dubin, P. Garred, L.N. Shaw & A.M. Blom, (2014) Staphylococcal proteases aid in evasion of the human complement system. *J Innate Immun* **6**: 31-46.
Kahl, B.C., K. Becker, A.W. Friedrich, J. Clasen, B. Sinha, C. Von Eiff & G. Peters, (2003a) agr-dependent bacterial interference has no impact on long-term colonization of Staphylococcus aureus during persistent airway infection of cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* **41**: 5199-5201.
Kahl, B.C., K. Becker & B. Loffler, (2016) Clinical Significance and Pathogenesis of Staphylococcal Small Colony Variants in Persistent Infections. *Clin Microbiol Rev* **29**: 401-427.
Kahl, B.C., A. Duebbers, G. Lubritz, J. Haeberle, H.G. Koch, B. Ritzerfeld, M. Reilly, E. Harms, R.A. Proctor, M. Herrmann & G. Peters, (2003b) Population dynamics of

persistent Staphylococcus aureus isolated from the airways of cystic fibrosis patients during a 6-year prospective study. *J Clin Microbiol* **41**: 4424-4427.
Kaiser, J.C., S. Sen, A. Sinha, B.J. Wilkinson & D.E. Heinrichs, (2016) The role of two branched-chain amino acid transporters in Staphylococcus aureus growth, membrane fatty acid composition and virulence. *Mol Microbiol*.
Kamada, K., F. Hanaoka & S.K. Burley, (2003) Crystal structure of the MazE/MazF complex: molecular bases of antidote-toxin recognition. *Mol Cell* **11**: 875-884.
Katayama, Y., T. Ito & K. Hiramatsu, (2000) A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 1549-1555.
Kathirvel, M., H. Buchad & M. Nair, (2016) Enhancement of the pathogenicity of Staphylococcus aureus strain Newman by a small noncoding RNA SprX1. *Med Microbiol Immunol*.
Kawamoto, H., T. Morita, A. Shimizu, T. Inada & H. Aiba, (2005) Implication of membrane localization of target mRNA in the action of a small RNA: mechanism of post-transcriptional regulation of glucose transporter in Escherichia coli. *Genes Dev* **19**: 328-338.
Kawano, M., (2012) Divergently overlapping cis-encoded antisense RNA regulating toxin-antitoxin systems from E. coli: hok/sok, ldr/rdl, symE/symR. *RNA Biol* **9**: 1520-1527.

Kawano, M., S. Kanaya, T. Oshima, Y. Masuda, T. Ara & H. Mori, (2002a) Distribution of repetitive sequences on the leading and lagging strands of the Escherichia coli genome: comparative study of Long Direct Repeat (LDR) sequences. *DNA Res* **9**: 1-10.
Kawano, M., T. Oshima, H. Kasai & H. Mori, (2002b) Molecular characterization of long direct repeat (LDR) sequences expressing a stable mRNA encoding for a 35-amino-acid cell-killing peptide and a cis-encoded small antisense RNA in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **45**: 333-349.
Kawano, M., G. Storz, B.S. Rao, J.L. Rosner & R.G. Martin, (2005) Detection of low-level promoter activity within open reading frame sequences of Escherichia coli. *Nucleic Acids Res* **33**: 6268-6276.
Kedzierska, B. & F. Hayes, (2016) Emerging Roles of Toxin-Antitoxin Modules in Bacterial Pathogenesis. *Molecules* **21**.
Keiler, K.C., P.R. Waller & R.T. Sauer, (1996) Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. *Science* **271**: 990-993.
Kiedrowski, M.R. & A.R. Horswill, (2011) New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. *Ann N Y Acad Sci* **1241**: 104-121.
Kim, C., M. Mwangi, M. Chung, C. Milheirico, H. de Lencastre & A. Tomasz, (2013) The mechanism of heterogeneous beta-lactam resistance in MRSA: key role of the stringent stress response. *PLoS One* **8**: e82814.
Kim, W., A.L. Conery, R. Rajamuthiah, B.B. Fuchs, F.M. Ausubel & E. Mylonakis, (2015) Identification of an Antimicrobial Agent Effective against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Persisters Using a Fluorescence-Based Screening Strategy. *PLoS One* **10**: e0127640.
Kim, Y., X. Wang, Q. Ma, X.S. Zhang & T.K. Wood, (2009) Toxin-antitoxin systems in Escherichia coli influence biofilm formation through YjgK (TabA) and fimbriae. *J Bacteriol* **191**: 1258-1267.
Kinkel, T.L., C.M. Roux, P.M. Dunman & F.C. Fang, (2013) The Staphylococcus aureus SrrAB two-component system promotes resistance to nitrosative stress and hypoxia. *MBio* **4**: e00696-00613.
Kint, C., N. Verstraeten, J. Hofkens, M. Fauvart & J. Michiels, (2014) Bacterial Obg proteins: GTPases at the nexus of protein and DNA synthesis. *Crit Rev Microbiol* **40**: 207-224.

Koyanagi, S. & C.M. Levesque, (2013) Characterization of a Streptococcus mutans intergenic region containing a small toxic peptide and its cis-encoded antisense small RNA antitoxin. *PLoS One* **8**: e54291.

Kretschmer, D., A.K. Gleske, M. Rautenberg, R. Wang, M. Koberle, E. Bohn, T. Schoneberg, M.J. Rabiet, F. Boulay, S.J. Klebanoff, K.A. van Kessel, J.A. van Strijp, M. Otto & A. Peschel, (2010) Human formyl peptide receptor 2 senses highly pathogenic Staphylococcus aureus. *Cell Host Microbe* **7**: 463-473.

Krismer, B., M. Liebeke, D. Janek, M. Nega, M. Rautenberg, G. Hornig, C. Unger, C. Weidenmaier, M. Lalk & A. Peschel, (2014) Nutrient limitation governs Staphylococcus aureus metabolism and niche adaptation in the human nose. *PLoS Pathog* **10**: e1003862.

Kurita, D., Y. Chadani, A. Muto, T. Abo & H. Himeno, (2014) ArfA recognizes the lack of mRNA in the mRNA channel after RF2 binding for ribosome rescue. *Nucleic Acids Res* **42**: 13339-13352.

Kuroda, H., M. Kuroda, L. Cui & K. Hiramatsu, (2007) Subinhibitory concentrations of beta-lactam induce haemolytic activity in Staphylococcus aureus through the SaeRS two-component system. *FEMS Microbiol Lett* **268**: 98-105.

Kuroda, M., H. Kuroda, T. Oshima, F. Takeuchi, H. Mori & K. Hiramatsu, (2003) Two-component system VraSR positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in Staphylococcus aureus. *Mol Microbiol* **49**: 807-821.

Kuroda, M., T. Ohta, I. Uchiyama, T. Baba, H. Yuzawa, I. Kobayashi, L. Cui, A. Oguchi, K. Aoki, Y. Nagai, J. Lian, T. Ito, M. Kanamori, H. Matsumaru, A. Maruyama, H. Murakami, A. Hosoyama, Y. Mizutani-Ui, N.K. Takahashi, T. Sawano, R. Inoue, C. Kaito, K. Sekimizu, H. Hirakawa, S. Kuhara, S. Goto, J. Yabuzaki, M. Kanehisa, A. Yamashita, K. Oshima, K. Furuya, C. Yoshino, T. Shiba, M. Hattori, N. Ogasawara, H. Hayashi & K. Hiramatsu, (2001) Whole genome sequencing of meticillin-resistant Staphylococcus aureus. *Lancet* **357**: 1225-1240.

Kusch, K., K. Hanke, S. Holtfreter, M. Schmudde, C. Kohler, C. Erck, J. Wehland, M. Hecker, K. Ohlsen, B. Broker & S. Engelmann, (2011) The influence of SaeRS and sigma(B) on the expression of superantigens in different Staphylococcus aureus isolates. *Int J Med Microbiol* **301**: 488-499.

Kwan, B.W., J.A. Valenta, M.J. Benedik & T.K. Wood, (2013) Arrested protein synthesis increases persister-like cell formation. *Antimicrob Agents Chemother* **57**: 1468-1473.

Kwong, S.M., R.A. Skurray & N. Firth, (2004) Staphylococcus aureus multiresistance plasmid pSK41: analysis of the replication region, initiator protein binding and antisense RNA regulation. *Mol Microbiol* **51**: 497-509.

Lalaouna, D., A. Eyraud, S. Chabelskaya, B. Felden & E. Masse, (2014) Regulatory RNAs involved in bacterial antibiotic resistance. *PLoS Pathog* **10**: e1004299.

Lannergard, J., S. Cao, T. Norstrom, A. Delgado, J.E. Gustafson & D. Hughes, (2011) Genetic complexity of fusidic acid-resistant small colony variants (SCV) in Staphylococcus aureus. *PLoS One* **6**: e28366.

Larson, A.S. & P.J. Hergenrother, (2014) Light activation of Staphylococcus aureus toxin YoeBSa1 reveals guanosine-specific endoribonuclease activity. *Biochemistry* **53**: 188-201.

Latteyer, F., H. Peisert, N. Gohring, A. Peschel & T. Chasse, (2010) Vibrational and electronic characterisation of Staphylococcus aureus wall teichoic acids and relevant components in thin films. *Anal Bioanal Chem* **397**: 2429-2437.

Lays, C., C. Romilly, A. Tomasini, I. Caldelari, Y. Benito, P. Hammann, T. Geissmann, S. Boisset, P. Romby & F. Vandenesch, (2014) [RsaA non-coding RNA promotes bacterial persistence and attenuates virulence in Staphylococcus aureus]. *Med Sci (Paris)* **30**: 839-841.

Le Pabic, H., N. Germain-Amiot, V. Bordeau & B. Felden, (2015) A bacterial regulatory RNA attenuates virulence, spread and human host cell phagocytosis. *Nucleic Acids Res* **43**: 9232-9248.

Lebeaux, D., A. Chauhan, S. Letoffe, F. Fischer, H. de Reuse, C. Beloin & J.M. Ghigo, (2014) pH-mediated potentiation of aminoglycosides kills bacterial persisters and eradicates in vivo biofilms. *J Infect Dis* **210**: 1357-1366.

Lei, M.G. & C.Y. Lee, (2015) RbsR Activates Capsule but Represses the rbsUDK Operon in Staphylococcus aureus. *J Bacteriol* **197**: 3666-3675.

Lei, T., J. Yang, L. Zheng, T. Markowski, B.A. Witthuhn & Y. Ji, (2012) The essentiality of staphylococcal Gcp is independent of its repression of branched-chain amino acids biosynthesis. *PLoS One* **7**: e46836.

Leplae, R., D. Geeraerts, R. Hallez, J. Guglielmini, P. Dreze & L. Van Melderen, (2011) Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families. *Nucleic Acids Res* **39**: 5513-5525.

Lewis, K., (2013) Platforms for antibiotic discovery. *Nat Rev Drug Discov* **12**: 371-387.

Li, G.Y., Y. Zhang, M. Inouye & M. Ikura, (2009) Inhibitory mechanism of Escherichia coli RelE-RelB toxin-antitoxin module involves a helix displacement near an mRNA interferase active site. *J Biol Chem* **284**: 14628-14636.

Li, L., A. Cheung, A.S. Bayer, L. Chen, W. Abdelhady, B.N. Kreiswirth, M.R. Yeaman & Y.Q. Xiong, (2016) The Global Regulon sarA Regulates beta-lactam Antibiotic Resistance In Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) In Vitro and In Endovascular Infections. *J Infect Dis*.

Li, M., D.J. Cha, Y. Lai, A.E. Villaruz, D.E. Sturdevant & M. Otto, (2007) The antimicrobial peptide-sensing system aps of Staphylococcus aureus. *Mol Microbiol* **66**: 1136-1147.

Li, W., G.C. Atkinson, N.S. Thakor, U. Allas, C.C. Lu, K.Y. Chan, T. Tenson, K. Schulten, K.S. Wilson, V. Hauryliuk & J. Frank, (2013) Mechanism of tetracycline resistance by ribosomal protection protein Tet(O). *Nat Commun* **4**: 1477.

Li, X., Q. Sun, C. Jiang, K. Yang, L.W. Hung, J. Zhang & J.C. Sacchettini, (2015) Structure of Ribosomal Silencing Factor Bound to Mycobacterium tuberculosis Ribosome. *Structure* **23**: 1858-1865.

Li, X., M. Yagi, T. Morita & H. Aiba, (2008) Cleavage of mRNAs and role of tmRNA system under amino acid starvation in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **68**: 462-473.

Lin, C.F., C.L. Chen, W.C. Huang, Y.L. Cheng, C.Y. Hsieh, C.Y. Wang & M.Y. Hong, (2010) Different types of cell death induced by enterotoxins. *Toxins (Basel)* **2**: 2158-2176.

Lincoln, R.A., J.A. Leigh & N.C. Jones, (1995) The amino acid requirements of Staphylococcus aureus isolated from cases of bovine mastitis. *Vet Microbiol* **45**: 275-279.

Lindsay, J.A. & M.T. Holden, (2004) Staphylococcus aureus: superbug, super genome? *Trends Microbiol* **12**: 378-385.

Lister, J.L. & A.R. Horswill, (2014) Staphylococcus aureus biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Front Cell Infect Microbiol* **4**: 178.

Liu, Q. & K. Fredrick, (2016) Intersubunit Bridges of the Bacterial Ribosome. *J Mol Biol* **428**: 2146-2164.

Liu, Y., C. Mu, X. Ying, W. Li, N. Wu, J. Dong, Y. Gao, N. Shao, M. Fan & G. Yang, (2011) RNAIII activates map expression by forming an RNA-RNA complex in Staphylococcus aureus. *FEBS Lett* **585**: 899-905.

Lobato-Marquez, D., R. Diaz-Orejas & F. Garcia-Del Portillo, (2016) Toxin-antitoxins and bacterial virulence. *FEMS Microbiol Rev* **40**: 592-609.

Luidalepp, H., S. Berger, O. Joss, T. Tenson & N. Polacek, (2016) Ribosome Shut-Down by 16S rRNA Fragmentation in Stationary-Phase Escherichia coli. *J Mol Biol* **428**: 2237-2247.

Lyon, B.R. & R. Skurray, (1987) Antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus: genetic basis. *Microbiol Rev* **51**: 88-134.

Majdalani, N., C. Cunning, D. Sledjeski, T. Elliott & S. Gottesman, (1998) DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 12462-12467.

Majdalani, N., D. Hernandez & S. Gottesman, (2002) Regulation and mode of action of the second small RNA activator of RpoS translation, RprA. *Mol Microbiol* **46**: 813-826.
Majerczyk, C.D., P.M. Dunman, T.T. Luong, C.Y. Lee, M.R. Sadykov, G.A. Somerville, K. Bodi & A.L. Sonenshein, (2010) Direct targets of CodY in Staphylococcus aureus. *J Bacteriol* **192**: 2861-2877.
Makarova, K.S., Y.I. Wolf & E.V. Koonin, (2009) Comprehensive comparative-genomic analysis of type 2 toxin-antitoxin systems and related mobile stress response systems in prokaryotes. *Biol Direct* **4**: 19.
Malachowa, N. & F.R. DeLeo, (2010) Mobile genetic elements of Staphylococcus aureus. *Cell Mol Life Sci* **67**: 3057-3071.
Malmgren, C., H.M. Engdahl, P. Romby & E.G. Wagner, (1996) An antisense/target RNA duplex or a strong intramolecular RNA structure 5' of a translation initiation signal blocks ribosome binding: the case of plasmid R1. *Rna* **2**: 1022-1032.
Mandal, M. & R.R. Breaker, (2004) Gene regulation by riboswitches. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 451-463.
Mandin, P. & S. Gottesman, (2010) Integrating anaerobic/aerobic sensing and the general stress response through the ArcZ small RNA. *Embo J* **29**: 3094-3107.
Mankin, A., (2006) Antibiotic blocks mRNA path on the ribosome. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 858-860.
Mann, E.E., K.C. Rice, B.R. Boles, J.L. Endres, D. Ranjit, L. Chandramohan, L.H. Tsang, M.S. Smeltzer, A.R. Horswill & K.W. Bayles, (2009) Modulation of eDNA release and degradation affects Staphylococcus aureus biofilm maturation. *PLoS One* **4**: e5822.
Marman, H.E., A.R. Mey & S.M. Payne, (2014) Elongation factor P and modifying enzyme PoxA are necessary for virulence of Shigella flexneri. *Infect Immun* **82**: 3612-3621.
Masuda, H., Q. Tan, N. Awano, K.P. Wu & M. Inouye, (2012a) YeeU enhances the bundling of cytoskeletal polymers of MreB and FtsZ, antagonizing the CbtA (YeeV) toxicity in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **84**: 979-989.
Masuda, H., Q. Tan, N. Awano, Y. Yamaguchi & M. Inouye, (2012b) A novel membrane-bound toxin for cell division, CptA (YgfX), inhibits polymerization of cytoskeleton proteins, FtsZ and MreB, in Escherichia coli. *FEMS Microbiol Lett* **328**: 174-181.
Mauro, T., A. Rouillon & B. Felden, (2016) Insights into the regulation of small RNA expression: SarA represses the expression of two sRNAs in Staphylococcus aureus. *Nucleic Acids Res*.
Mayer, C., C. Kohrer, E. Kenny, C. Prusko & U.L. RajBhandary, (2003) Anticodon sequence mutants of Escherichia coli initiator tRNA: effects of overproduction of aminoacyl-tRNA synthetases, methionyl-tRNA formyltransferase, and initiation factor 2 on activity in initiation. *Biochemistry* **42**: 4787-4799.
McDevitt, D., T. Nanavaty, K. House-Pompeo, E. Bell, N. Turner, L. McIntire, T. Foster & M. Hook, (1997) Characterization of the interaction between the Staphylococcus aureus clumping factor (ClfA) and fibrinogen. *European journal of biochemistry* **247**: 416-424.
Meissner, C., N. Jahn & S. Brantl, (2016) In Vitro Characterization of the Type I Toxin-Antitoxin System bsrE/SR5 from Bacillus subtilis. *J Biol Chem* **291**: 560-571.
Mina, E.G. & C.N. Marques, (2016) Interaction of Staphylococcus aureus persister cells with the host when in a persister state and following awakening. *Sci Rep* **6**: 31342.
Mitchell, G., E. Brouillette, D.L. Seguin, A.E. Asselin, C.L. Jacob & F. Malouin, (2010a) A role for sigma factor B in the emergence of Staphylococcus aureus small-colony variants and elevated biofilm production resulting from an exposure to aminoglycosides. *Microb Pathog* **48**: 18-27.
Mitchell, G., D.L. Seguin, A.E. Asselin, E. Deziel, A.M. Cantin, E.H. Frost, S. Michaud & F. Malouin, (2010b) Staphylococcus aureus sigma B-dependent emergence of small-colony variants and biofilm production following exposure to Pseudomonas aeruginosa 4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide. *BMC Microbiol* **10**: 33.
Moazed, D. & H.F. Noller, (1989) Interaction of tRNA with 23S rRNA in the ribosomal A, P, and E sites. *Cell* **57**: 585-597.

Moazed, D., J.M. Robertson & H.F. Noller, (1988) Interaction of elongation factors EF-G and EF-Tu with a conserved loop in 23S RNA. *Nature* **334**: 362-364.
Moazed, D., B.J. Van Stolk, S. Douthwaite & H.F. Noller, (1986) Interconversion of active and inactive 30 S ribosomal subunits is accompanied by a conformational change in the decoding region of 16 S rRNA. *J Mol Biol* **191**: 483-493.
Moll, I. & H. Engelberg-Kulka, (2012) Selective translation during stress in Escherichia coli. *Trends Biochem Sci* **37**: 493-498.
Moller-Jensen, J., T. Franch & K. Gerdes, (2001) Temporal translational control by a metastable RNA structure. *J Biol Chem* **276**: 35707-35713.
Moon, B.Y., J.Y. Park, D.A. Robinson, J.C. Thomas, Y.H. Park, J.A. Thornton & K.S. Seo, (2016) Mobilization of Genomic Islands of Staphylococcus aureus by Temperate Bacteriophage. *PLoS One* **11**: e0151409.
Morfeldt, E., D. Taylor, A. von Gabain & S. Arvidson, (1995) Activation of alpha-toxin translation in Staphylococcus aureus by the trans-encoded antisense RNA, RNAIII. *Embo J* **14**: 4569-4577.
Morita, M.T., Y. Tanaka, T.S. Kodama, Y. Kyogoku, H. Yanagi & T. Yura, (1999) Translational induction of heat shock transcription factor sigma32: evidence for a built-in RNA thermosensor. *Genes Dev* **13**: 655-665.
Morrison, J.M., E.W. Miller, M.A. Benson, F. Alonzo, 3rd, P. Yoong, V.J. Torres, S.H. Hinrichs & P.M. Dunman, (2012) Characterization of SSR42, a novel virulence factor regulatory RNA that contributes to the pathogenesis of a Staphylococcus aureus USA300 representative. *J Bacteriol* **194**: 2924-2938.
Muller, P., N. Jahn, C. Ring, C. Maiwald, R. Neubert, C. Meissner & S. Brantl, (2016) A multistress responsive type I toxin-antitoxin system: bsrE/SR5 from the B. subtilis chromosome. *RNA Biol* **13**: 511-523.
Mutschler, H., M. Gebhardt, R.L. Shoeman & A. Meinhart, (2011) A novel mechanism of programmed cell death in bacteria by toxin-antitoxin systems corrupts peptidoglycan synthesis. *PLoS Biol* **9**: e1001033.
Nakanishi, N., T. Oshida, S. Yano, K. Takeda, T. Yamaguchi & Y. Ito, (1986) Construction and characterization of new cloning vectors derived from Streptomyces griseobrunneus plasmid pBT1 and containing amikacin and sulfomycin resistance genes. *Plasmid* **15**: 217-229.
Nakanishi, S., A. Inoue, T. Kita, S. Numa, A.C. Chang, S.N. Cohen, J. Nunberg & R.T. Schimke, (1978) Construction of bacterial plasmids that contain the nucleotide sequence for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**: 6021-6025.
Nameki, N., T. Someya, S. Okano, R. Suemasa, M. Kimoto, K. Hanawa-Suetsugu, T. Terada, M. Shirouzu, I. Hirao, H. Takaku, H. Himeno, A. Muto, S. Kuramitsu, S. Yokoyama & G. Kawai, (2005) Interaction analysis between tmRNA and SmpB from Thermus thermophilus. *J Biochem* **138**: 729-739.
Navarre, W.W., S.B. Zou, H. Roy, J.L. Xie, A. Savchenko, A. Singer, E. Edvokimova, L.R. Prost, R. Kumar, M. Ibba & F.C. Fang, (2010) PoxA, yjeK, and elongation factor P coordinately modulate virulence and drug resistance in Salmonella enterica. *Mol Cell* **39**: 209-221.
Neubauer, C., Y.G. Gao, K.R. Andersen, C.M. Dunham, A.C. Kelley, J. Hentschel, K. Gerdes, V. Ramakrishnan & D.E. Brodersen, (2009) The structural basis for mRNA recognition and cleavage by the ribosome-dependent endonuclease RelE. *Cell* **139**: 1084-1095.
Newton, B.A., (1956) The properties and mode of action of the polymyxins. *Bacteriol Rev* **20**: 14-27.
Nguyen, F., A.L. Starosta, S. Arenz, D. Sohmen, A. Donhofer & D.N. Wilson, (2014) Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biol Chem* **395**: 559-575.

Nielsen, J.S., M.H. Christiansen, M. Bonde, S. Gottschalk, D. Frees, L.E. Thomsen & B.H. Kallipolitis, (2011) Searching for small sigmaB-regulated genes in Staphylococcus aureus. *Arch Microbiol* **193**: 23-34.

Nishizawa, A., M. Nakayama, T. Uemura, Y. Fukuda & S. Kimura, (2010) Ribosome-binding site interference caused by Shine-Dalgarno-like nucleotide sequences in Escherichia coli cells. *J Biochem* **147**: 433-443.

Noble, W.C., R.E. Williams, M.P. Jevons & R.A. Shooter, (1964) Some Aspects of Nasal Carriage of Staphylococci. *J Clin Pathol* **17**: 79-83.

Noller, H.F. & J.B. Chaires, (1972) Functional modification of 16S ribosomal RNA by kethoxal. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**: 3115-3118.

Noller, H.F., C. Chang, G. Thomas & J. Aldridge, (1971) Chemical modification of the transfer RNA and polyuridylic acid binding sites of Escherichia coli 30 s ribosomal subunits. *J Mol Biol* **61**: 669-679.

Norstrom, T., J. Lannergard & D. Hughes, (2007) Genetic and phenotypic identification of fusidic acid-resistant mutants with the small-colony-variant phenotype in Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother* **51**: 4438-4446.

Novick, R.P. & D. Jiang, (2003) The staphylococcal saeRS system coordinates environmental signals with agr quorum sensing. *Microbiology* **149**: 2709-2717.

Novick, R.P., H.F. Ross, S.J. Projan, J. Kornblum, B. Kreiswirth & S. Moghazeh, (1993) Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *Embo J* **12**: 3967-3975.

O'Neill, A.J. & I. Chopra, (2006) Molecular basis of fusB-mediated resistance to fusidic acid in Staphylococcus aureus. *Mol Microbiol* **59**: 664-676.

O'Neill, A.J., A.R. Larsen, A.S. Henriksen & I. Chopra, (2004) A fusidic acid-resistant epidemic strain of Staphylococcus aureus carries the fusB determinant, whereas fusA mutations are prevalent in other resistant isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 3594-3597.

O'Neill, E., C. Pozzi, P. Houston, H. Humphreys, D.A. Robinson, A. Loughman, T.J. Foster & J.P. O'Gara, (2008) A novel Staphylococcus aureus biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. *J Bacteriol* **190**: 3835-3850.

O'Toole, G.A. & R. Kolter, (1998) Initiation of biofilm formation in Pseudomonas fluorescens WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* **28**: 449-461.

Ogawara, H., (1981) Antibiotic resistance in pathogenic and producing bacteria, with special reference to beta-lactam antibiotics. *Microbiol Rev* **45**: 591-619.

Ogston, A., (1881) Report upon Micro-Organisms in Surgical Diseases. *Br Med J* **1**: 369 b362-375.

Ogston, A., (1882) Micrococcus Poisoning. *J Anat Physiol* **17**: 24-58.

Ogura, T. & S. Hiraga, (1983) Partition mechanism of F plasmid: two plasmid gene-encoded products and a cis-acting region are involved in partition. *Cell* **32**: 351-360.

Ohlsen, K., W. Ziebuhr, K.P. Koller, W. Hell, T.A. Wichelhaus & J. Hacker, (1998) Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on alpha-toxin (hla) gene expression of methicillin-sensitive and methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 2817-2823.

Onoue, Y. & M. Mori, (1997) Amino acid requirements for the growth and enterotoxin production by Staphylococcus aureus in chemically defined media. *Int J Food Microbiol* **36**: 77-82.

Onyango, L.A., R. Hugh Dunstan, T.K. Roberts, M.M. Macdonald & J. Gottfries, (2013) Phenotypic variants of staphylococci and their underlying population distributions following exposure to stress. *PLoS One* **8**: e77614.

Oogai, Y., M. Kawada-Matsuo & H. Komatsuzawa, (2016) Staphylococcus aureus SrrAB Affects Susceptibility to Hydrogen Peroxide and Co-Existence with Streptococcus sanguinis. *PLoS One* **11**: e0159768.

Otsuka, Y., (2016) Prokaryotic toxin-antitoxin systems: novel regulations of the toxins. *Curr Genet* **62**: 379-382.
Otto, M., (2010) Basis of virulence in community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Annu Rev Microbiol* **64**: 143-162.
Otto, M., (2014) Staphylococcus aureus toxins. *Curr Opin Microbiol* **17**: 32-37.
Paharik, A.E. & A.R. Horswill, (2016) The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, Regulation, and Host Response. *Microbiol Spectr* **4**.
Pandey, D.P. & K. Gerdes, (2005) Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res* **33**: 966-976.
Pane-Farre, J., B. Jonas, K. Forstner, S. Engelmann & M. Hecker, (2006) The sigmaB regulon in Staphylococcus aureus and its regulation. *Int J Med Microbiol* **296**: 237-258.
Pantosti, A. & M. Venditti, (2009) What is MRSA? *Eur Respir J* **34**: 1190-1196.
Park, Y. & K.S. Hahm, (2005) Antimicrobial peptides (AMPs): peptide structure and mode of action. *J Biochem Mol Biol* **38**: 507-516.
Pedersen, K. & K. Gerdes, (1999) Multiple hok genes on the chromosome of Escherichia coli. *Mol Microbiol* **32**: 1090-1102.
Pedersen, K., A.V. Zavialov, M.Y. Pavlov, J. Elf, K. Gerdes & M. Ehrenberg, (2003) The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site. *Cell* **112**: 131-140.
Peil, L., A.L. Starosta, K. Virumae, G.C. Atkinson, T. Tenson, J. Remme & D.N. Wilson, (2012) Lys34 of translation elongation factor EF-P is hydroxylated by YfcM. *Nat Chem Biol* **8**: 695-697.
Peng, Y., J.E. Curtis, X. Fang & S.A. Woodson, (2014) Structural model of an mRNA in complex with the bacterial chaperone Hfq. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 17134-17139.
Periti, P., T. Mazzei, E. Mini & A. Novelli, (1993) Adverse effects of macrolide antibacterials. *Drug Saf* **9**: 346-364.
Peschel, A., R.W. Jack, M. Otto, L.V. Collins, P. Staubitz, G. Nicholson, H. Kalbacher, W.F. Nieuwenhuizen, G. Jung, A. Tarkowski, K.P. van Kessel & J.A. van Strijp, (2001) Staphylococcus aureus resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with l-lysine. *J Exp Med* **193**: 1067-1076.
Peschel, A. & M. Otto, (2013) Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. *Nat Rev Microbiol* **11**: 667-673.
Peschel, A., M. Otto, R.W. Jack, H. Kalbacher, G. Jung & F. Gotz, (1999) Inactivation of the dlt operon in Staphylococcus aureus confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem* **274**: 8405-8410.
Peske, F., M.V. Rodnina & W. Wintermeyer, (2005) Sequence of steps in ribosome recycling as defined by kinetic analysis. *Mol Cell* **18**: 403-412.
Pichon, C. & B. Felden, (2005) Small RNA genes expressed from Staphylococcus aureus genomic and pathogenicity islands with specific expression among pathogenic strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 14249-14254.
Pinel-Marie, M.L., R. Brielle & B. Felden, (2014) Dual toxic-peptide-coding Staphylococcus aureus RNA under antisense regulation targets host cells and bacterial rivals unequally. *Cell Rep* **7**: 424-435.
Pircher, A., K. Bakowska-Zywicka, L. Schneider, M. Zywicki & N. Polacek, (2014) An mRNA-derived noncoding RNA targets and regulates the ribosome. *Mol Cell* **54**: 147-155.
Pohl, K., P. Francois, L. Stenz, F. Schlink, T. Geiger, S. Herbert, C. Goerke, J. Schrenzel & C. Wolz, (2009) CodY in Staphylococcus aureus: a regulatory link between metabolism and virulence gene expression. *J Bacteriol* **191**: 2953-2963.
Polaski, J.T., E.D. Holmstrom, D.J. Nesbitt & R.T. Batey, (2016) Mechanistic Insights into Cofactor-Dependent Coupling of RNA Folding and mRNA Transcription/Translation by a Cobalamin Riboswitch. *Cell Rep* **15**: 1100-1110.

Polikanov, Y.S., G.M. Blaha & T.A. Steitz, (2012) How hibernation factors RMF, HPF, and YfiA turn off protein synthesis. *Science* **336**: 915-918.

Postma, B., M.J. Poppelier, J.C. van Galen, E.R. Prossnitz, J.A. van Strijp, C.J. de Haas & K.P. van Kessel, (2004) Chemotaxis inhibitory protein of Staphylococcus aureus binds specifically to the C5a and formylated peptide receptor. *J Immunol* **172**: 6994-7001.

Pragman, A.A., Y. Ji & P.M. Schlievert, (2007) Repression of Staphylococcus aureus SrrAB using inducible antisense srrA alters growth and virulence factor transcript levels. *Biochemistry* **46**: 314-321.

Pragman, A.A., J.M. Yarwood, T.J. Tripp & P.M. Schlievert, (2004) Characterization of virulence factor regulation by SrrAB, a two-component system in Staphylococcus aureus. *J Bacteriol* **186**: 2430-2438.

Price-Whelan, A., C.K. Poon, M.A. Benson, T.T. Eidem, C.M. Roux, J.M. Boyd, P.M. Dunman, V.J. Torres & T.A. Krulwich, (2013) Transcriptional profiling of Staphylococcus aureus during growth in 2 M NaCl leads to clarification of physiological roles for Kdp and Ktr K+ uptake systems. *MBio* **4**.

Proctor, R.A., A. Kriegeskorte, B.C. Kahl, K. Becker, B. Loffler & G. Peters, (2014) Staphylococcus aureus Small Colony Variants (SCVs): a road map for the metabolic pathways involved in persistent infections. *Front Cell Infect Microbiol* **4**: 99.

Proctor, R.A., C. von Eiff, B.C. Kahl, K. Becker, P. McNamara, M. Herrmann & G. Peters, (2006) Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol* **4**: 295-305.

Queck, S.Y., M. Jameson-Lee, A.E. Villaruz, T.H. Bach, B.A. Khan, D.E. Sturdevant, S.M. Ricklefs, M. Li & M. Otto, (2008) RNAIII-independent target gene control by the agr quorum-sensing system: insight into the evolution of virulence regulation in Staphylococcus aureus. *Mol Cell* **32**: 150-158.

Rahimi, F., M. Katouli & S. Karimi, (2016) Biofilm production among methicillin resistant Staphylococcus aureus strains isolated from catheterized patients with urinary tract infection. *Microb Pathog* **98**: 69-76.

Raskin, D.M., N. Judson & J.J. Mekalanos, (2007) Regulation of the stringent response is the essential function of the conserved bacterial G protein CgtA in Vibrio cholerae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 4636-4641.

Rechtin, T.M., A.F. Gillaspy, M.A. Schumacher, R.G. Brennan, M.S. Smeltzer & B.K. Hurlburt, (1999) Characterization of the SarA virulence gene regulator of Staphylococcus aureus. *Mol Microbiol* **33**: 307-316.

Reeves, M.W., (1989) Effect of trace metals on the synthesis of toxic shock syndrome toxin 1. *Rev Infect Dis* **11 Suppl 1**: S145-149; discussion S149-150.

Regassa, L.B. & M.J. Betley, (1993) High sodium chloride concentrations inhibit staphylococcal enterotoxin C gene (sec) expression at the level of sec mRNA. *Infect Immun* **61**: 1581-1585.

Regassa, L.B., R.P. Novick & M.J. Betley, (1992) Glucose and nonmaintained pH decrease expression of the accessory gene regulator (agr) in Staphylococcus aureus. *Infect Immun* **60**: 3381-3388.

Resch, A., R. Rosenstein, C. Nerz & F. Gotz, (2005) Differential gene expression profiling of Staphylococcus aureus cultivated under biofilm and planktonic conditions. *Appl Environ Microbiol* **71**: 2663-2676.

Richards, R.L., R.D. Haigh, B. Pascoe, S.K. Sheppard, F. Price, D. Jenkins, K. Rajakumar & J.A. Morrissey, (2015) Persistent Staphylococcus aureus isolates from two independent cases of bacteremia display increased bacterial fitness and novel immune evasion phenotypes. *Infect Immun* **83**: 3311-3324.

Richardson, A.R., P.M. Dunman & F.C. Fang, (2006) The nitrosative stress response of Staphylococcus aureus is required for resistance to innate immunity. *Mol Microbiol* **61**: 927-939.

Righetti, F. & F. Narberhaus, (2014) How to find RNA thermometers. *Front Cell Infect Microbiol* **4**: 132.
Roche, F.M., R. Downer, F. Keane, P. Speziale, P.W. Park & T.J. Foster, (2004) The N-terminal A domain of fibronectin-binding proteins A and B promotes adhesion of Staphylococcus aureus to elastin. *J Biol Chem* **279**: 38433-38440.
Rogasch, K., V. Ruhmling, J. Pane-Farre, D. Hoper, C. Weinberg, S. Fuchs, M. Schmudde, B.M. Broker, C. Wolz, M. Hecker & S. Engelmann, (2006) Influence of the two-component system SaeRS on global gene expression in two different Staphylococcus aureus strains. *J Bacteriol* **188**: 7742-7758.
Romilly, C., C. Lays, A. Tomasini, I. Caldelari, Y. Benito, P. Hammann, T. Geissmann, S. Boisset, P. Romby & F. Vandenesch, (2014) A non-coding RNA promotes bacterial persistence and decreases virulence by regulating a regulator in Staphylococcus aureus. *PLoS Pathog* **10**: e1003979.
Rowland, S.J. & K.G. Dyke, (1989) Characterization of the staphylococcal beta-lactamase transposon Tn552. *Embo J* **8**: 2761-2773.
Rudd, K.E., (1999) Novel intergenic repeats of Escherichia coli K-12. *Res Microbiol* **150**: 653-664.
Saederup, K.L., K. Stoedkilde, J.H. Graversen, C.F. Dickson, A. Etzerodt, S.W. Hansen, A. Fago, D. Gell, C.B. Andersen & S.K. Moestrup, (2016) The Staphylococcus aureus Protein IsdH Inhibits Host Hemoglobin Scavenging to Promote Heme Acquisition by the Pathogen. *J Biol Chem*.
Sako, T. & N. Tsuchida, (1983) Nucleotide sequence of the staphylokinase gene from Staphylococcus aureus. *Nucleic Acids Res* **11**: 7679-7693.
Sakoulas, G., G.M. Eliopoulos, R.C. Moellering, Jr., C. Wennersten, L. Venkataraman, R.P. Novick & H.S. Gold, (2002) Accessory gene regulator (agr) locus in geographically diverse Staphylococcus aureus isolates with reduced susceptibility to vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 1492-1502.
Salim, N.N. & A.L. Feig, (2010) An upstream Hfq binding site in the fhlA mRNA leader region facilitates the OxyS-fhlA interaction. *PLoS One* **5**.
Samson, J.E., S. Spinelli, C. Cambillau & S. Moineau, (2013) Structure and activity of AbiQ, a lactococcal endoribonuclease belonging to the type III toxin-antitoxin system. *Mol Microbiol* **87**: 756-768.
Sassi, M., Y. Augagneur, T. Mauro, L. Ivain, S. Chabelskaya, M. Hallier, O. Sallou & B. Felden, (2015) SRD: a Staphylococcus regulatory RNA database. *Rna* **21**: 1005-1017.
Sassi, M., B. Felden & Y. Augagneur, (2014) Draft Genome Sequence of Staphylococcus aureus subsp. aureus Strain HG003, an NCTC8325 Derivative. *Genome Announc* **2**.
Sayed, N., A. Jousselin & B. Felden, (2011) A cis-antisense RNA acts in trans in Staphylococcus aureus to control translation of a human cytolytic peptide. *Nat Struct Mol Biol* **19**: 105-112.
Sayed, N., A. Jousselin & B. Felden, (2012a) A cis-antisense RNA acts in trans in Staphylococcus aureus to control translation of a human cytolytic peptide. *Nat Struct Mol Biol* **19**: 105-112.
Sayed, N., S. Nonin-Lecomte, S. Rety & B. Felden, (2012b) Functional and structural insights of a Staphylococcus aureus apoptotic-like membrane peptide from a toxin-antitoxin module. *J Biol Chem* **287**: 43454-43463.
Schellhorn, H.E., J.P. Audia, L.I. Wei & L. Chang, (1998) Identification of conserved, RpoS-dependent stationary-phase genes of Escherichia coli. *J Bacteriol* **180**: 6283-6291.
Schifano, J.M., R. Edifor, J.D. Sharp, M. Ouyang, A. Konkimalla, R.N. Husson & N.A. Woychik, (2013) Mycobacterial toxin MazF-mt6 inhibits translation through cleavage of 23S rRNA at the ribosomal A site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 8501-8506.
Schifano, J.M. & N.A. Woychik, (2014) 23S rRNA as an a-Maz-ing new bacterial toxin target. *RNA Biol* **11**: 101-105.

Schmidt, K.A., A.C. Manna, S. Gill & A.L. Cheung, (2001) SarT, a repressor of alpha-hemolysin in Staphylococcus aureus. *Infect Immun* **69**: 4749-4758.
Schroder, A., B. Schroder, B. Roppenser, S. Linder, B. Sinha, R. Fassler & M. Aepfelbacher, (2006) Staphylococcus aureus fibronectin binding protein-A induces motile attachment sites and complex actin remodeling in living endothelial cells. *Mol Biol Cell* **17**: 5198-5210.
Schumacher, M.A., K.M. Piro, W. Xu, S. Hansen, K. Lewis & R.G. Brennan, (2009) Molecular mechanisms of HipA-mediated multidrug tolerance and its neutralization by HipB. *Science* **323**: 396-401.
Schureck, M.A., J.A. Dunkle, T. Maehigashi, S.J. Miles & C.M. Dunham, (2015) Defining the mRNA recognition signature of a bacterial toxin protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: 13862-13867.
Schureck, M.A., T. Maehigashi, S.J. Miles, J. Marquez, S.E. Cho, R. Erdman & C.M. Dunham, (2014) Structure of the Proteus vulgaris HigB-(HigA)2-HigB toxin-antitoxin complex. *J Biol Chem* **289**: 1060-1070.
Schuster, C.F. & R. Bertram, (2016) Toxin-Antitoxin Systems of Staphylococcus aureus. *Toxins (Basel)* **8**.
Schuster, C.F., L. Mechler, N. Nolle, B. Krismer, M.E. Zelder, F. Gotz & R. Bertram, (2015) The MazEF Toxin-Antitoxin System Alters the beta-Lactam Susceptibility of Staphylococcus aureus. *PLoS One* **10**: e0126118.
Secor, P.R., L.K. Jennings, G.A. James, K.R. Kirker, E.D. Pulcini, K. McInnerney, R. Gerlach, T. Livinghouse, J.K. Hilmer, B. Bothner, P. Fleckman, J.E. Olerud & P.S. Stewart, (2012) Phevalin (aureusimine B) production by Staphylococcus aureus biofilm and impacts on human keratinocyte gene expression. *PLoS One* **7**: e40973.
Sendi, P. & R.A. Proctor, (2009) Staphylococcus aureus as an intracellular pathogen: the role of small colony variants. *Trends Microbiol* **17**: 54-58.
Seol, J.H., S.J. Yoo, K.I. Kim, M.S. Kang, D.B. Ha & C.H. Chung, (1994) The 65-kDa protein derived from the internal translational initiation site of the clpA gene inhibits the ATP-dependent protease Ti in Escherichia coli. *J Biol Chem* **269**: 29468-29473.
Serganov, A. & E. Nudler, (2013) A decade of riboswitches. *Cell* **152**: 17-24.
Shah, D., Z. Zhang, A. Khodursky, N. Kaldalu, K. Kurg & K. Lewis, (2006) Persisters: a distinct physiological state of E. coli. *BMC Microbiol* **6**: 53.
Sharma, C.M., F. Darfeuille, T.H. Plantinga & J. Vogel, (2007) A small RNA regulates multiple ABC transporter mRNAs by targeting C/A-rich elements inside and upstream of ribosome-binding sites. *Genes Dev* **21**: 2804-2817.
Shimizu, Y. & T. Ueda, (2002) The role of SmpB protein in trans-translation. *FEBS Lett* **514**: 74-77.
Short, F.L., X.Y. Pei, T.R. Blower, S.L. Ong, P.C. Fineran, B.F. Luisi & G.P. Salmond, (2013) Selectivity and self-assembly in the control of a bacterial toxin by an antitoxic noncoding RNA pseudoknot. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: E241-249.
Shyp, V., S. Tankov, A. Ermakov, P. Kudrin, B.P. English, M. Ehrenberg, T. Tenson, J. Elf & V. Hauryliuk, (2012) Positive allosteric feedback regulation of the stringent response enzyme RelA by its product. *EMBO Rep* **13**: 835-839.
Sihto, H.M., T. Tasara, R. Stephan & S. Johler, (2014) Validation of reference genes for normalization of qPCR mRNA expression levels in Staphylococcus aureus exposed to osmotic and lactic acid stress conditions encountered during food production and preservation. *FEMS Microbiol Lett* **356**: 134-140.
Sihto, H.M., T. Tasara, R. Stephan & S. Johler, (2015) Temporal expression of the staphylococcal enterotoxin D gene under NaCl stress conditions. *FEMS Microbiol Lett* **362**.
Silva, O.N., E.S. Alves, C. de la Fuente-Nunez, S.M. Ribeiro, S.M. Mandal, D. Gaspar, A.S. Veiga, M.A. Castanho, C.A. Andrade, J.M. Nascimento, I.C. Fensterseifer, W.F. Porto, J.R. Correa, R.E. Hancock, S. Korpole, A.L. Oliveira, L.M. Liao & O.L. Franco,

(2016) Structural Studies of a Lipid-Binding Peptide from Tunicate Hemocytes with Anti-Biofilm Activity. *Sci Rep* **6**: 27128.
Silvaggi, J.M., J.B. Perkins & R. Losick, (2005) Small untranslated RNA antitoxin in Bacillus subtilis. *J Bacteriol* **187**: 6641-6650.
Singh, R. & P. Ray, (2014) Quorum sensing-mediated regulation of staphylococcal virulence and antibiotic resistance. *Future Microbiol* **9**: 669-681.
Solecki, O., A. Mosbah, M. Baudy Floc'h & B. Felden, (2015) Converting a Staphylococcus aureus toxin into effective cyclic pseudopeptide antibiotics. *Chem Biol* **22**: 329-335.
Somerville, G.A. & R.A. Proctor, (2009) At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in Staphylococci. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**: 233-248.
Sonnleitner, E., N. Gonzalez, T. Sorger-Domenigg, S. Heeb, A.S. Richter, R. Backofen, P. Williams, A. Huttenhofer, D. Haas & U. Blasi, (2011) The small RNA PhrS stimulates synthesis of the Pseudomonas aeruginosa quinolone signal. *Mol Microbiol* **80**: 868-885.
Soo, V.W. & T.K. Wood, (2013) Antitoxin MqsA represses curli formation through the master biofilm regulator CsgD. *Sci Rep* **3**: 3186.
Starosta, A.L., J. Lassak, K. Jung & D.N. Wilson, (2014) The bacterial translation stress response. *FEMS Microbiol Rev* **38**: 1172-1201.
Steinhuber, A., C. Goerke, M.G. Bayer, G. Doring & C. Wolz, (2003) Molecular architecture of the regulatory Locus sae of Staphylococcus aureus and its impact on expression of virulence factors. *J Bacteriol* **185**: 6278-6286.
Steitz, J.A. & K. Jakes, (1975) How ribosomes select initiator regions in mRNA: base pair formation between the 3' terminus of 16S rRNA and the mRNA during initiation of protein synthesis in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**: 4734-4738.
Sterba, K.M., S.G. Mackintosh, J.S. Blevins, B.K. Hurlburt & M.S. Smeltzer, (2003) Characterization of Staphylococcus aureus SarA binding sites. *J Bacteriol* **185**: 4410-4417.
Stevens, D.L., Y. Ma, D.B. Salmi, E. McIndoo, R.J. Wallace & A.E. Bryant, (2007) Impact of antibiotics on expression of virulence-associated exotoxin genes in methicillin-sensitive and methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *J Infect Dis* **195**: 202-211.
Surewaard, B.G., C.J. de Haas, F. Vervoort, K.M. Rigby, F.R. DeLeo, M. Otto, J.A. van Strijp & R. Nijland, (2013) Staphylococcal alpha-phenol soluble modulins contribute to neutrophil lysis after phagocytosis. *Cell Microbiol* **15**: 1427-1437.
Sussman, J.K., E.L. Simons & R.W. Simons, (1996) Escherichia coli translation initiation factor 3 discriminates the initiation codon in vivo. *Mol Microbiol* **21**: 347-360.
Svensson, S.L. & C.M. Sharma, (2016) Small RNAs in Bacterial Virulence and Communication. *Microbiol Spectr* **4**.
Syal, K. & D. Chatterji, (2015) Differential binding of ppGpp and pppGpp to E. coli RNA polymerase: photo-labeling and mass spectral studies. *Genes Cells* **20**: 1006-1016.
Tashiro, F., H. Niwa & J. Miyazaki, (1999) Constructing adenoviral vectors by using the circular form of the adenoviral genome cloned in a cosmid and the Cre-loxP recombination system. *Hum Gene Ther* **10**: 1845-1852.
Thammavongsa, V., H.K. Kim, D. Missiakas & O. Schneewind, (2015) Staphylococcal manipulation of host immune responses. *Nat Rev Microbiol* **13**: 529-543.
Thisted, T. & K. Gerdes, (1992) Mechanism of post-segregational killing by the hok/sok system of plasmid R1. Sok antisense RNA regulates hok gene expression indirectly through the overlapping mok gene. *J Mol Biol* **223**: 41-54.
Thomer, L., O. Schneewind & D. Missiakas, (2016) Pathogenesis of Staphylococcus aureus Bloodstream Infections. *Annu Rev Pathol* **11**: 343-364.
Thompson, K.M., N. Abraham & K.K. Jefferson, (2010) Staphylococcus aureus extracellular adherence protein contributes to biofilm formation in the presence of serum. *FEMS Microbiol Lett* **305**: 143-147.

Tomasini, A., P. Francois, B.P. Howden, P. Fechter, P. Romby & I. Caldelari, (2014) The importance of regulatory RNAs in Staphylococcus aureus. *Infect Genet Evol* **21**: 616-626.

Traber, K.E., E. Lee, S. Benson, R. Corrigan, M. Cantera, B. Shopsin & R.P. Novick, (2008) agr function in clinical Staphylococcus aureus isolates. *Microbiology* **154**: 2265-2274.

Ude, S., J. Lassak, A.L. Starosta, T. Kraxenberger, D.N. Wilson & K. Jung, (2013) Translation elongation factor EF-P alleviates ribosome stalling at polyproline stretches. *Science* **339**: 82-85.

Udekwu, K.I., F. Darfeuille, J. Vogel, J. Reimegard, E. Holmqvist & E.G. Wagner, (2005) Hfq-dependent regulation of OmpA synthesis is mediated by an antisense RNA. *Genes Dev* **19**: 2355-2366.

Ueta, M., R.L. Ohniwa, H. Yoshida, Y. Maki, C. Wada & A. Wada, (2008) Role of HPF (hibernation promoting factor) in translational activity in Escherichia coli. *J Biochem* **143**: 425-433.

Ueta, M., H. Yoshida, C. Wada, T. Baba, H. Mori & A. Wada, (2005) Ribosome binding proteins YhbH and YfiA have opposite functions during 100S formation in the stationary phase of Escherichia coli. *Genes Cells* **10**: 1103-1112.

Ulrich, M., M. Bastian, S.E. Cramton, K. Ziegler, A.A. Pragman, A. Bragonzi, G. Memmi, C. Wolz, P.M. Schlievert, A. Cheung & G. Doring, (2007) The staphylococcal respiratory response regulator SrrAB induces ica gene transcription and polysaccharide intercellular adhesin expression, protecting Staphylococcus aureus from neutrophil killing under anaerobic growth conditions. *Mol Microbiol* **65**: 1276-1287.

Valle, J., M. Vergara-Irigaray, N. Merino, J.R. Penades & I. Lasa, (2007) sigmaB regulates IS256-mediated Staphylococcus aureus biofilm phenotypic variation. *J Bacteriol* **189**: 2886-2896.

Van Melderen, L. & M. Saavedra De Bast, (2009) Bacterial toxin-antitoxin systems: more than selfish entities? *PLoS Genet* **5**: e1000437.

van Schaik, W. & T. Abee, (2005) The role of sigmaB in the stress response of Gram-positive bacteria -- targets for food preservation and safety. *Curr Opin Biotechnol* **16**: 218-224.

van Wamel, W.J., S.H. Rooijakkers, M. Ruyken, K.P. van Kessel & J.A. van Strijp, (2006) The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of Staphylococcus aureus are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages. *J Bacteriol* **188**: 1310-1315.

Vanassche, T., M. Peetermans, L.N. Van Aelst, W.E. Peetermans, J. Verhaegen, D.M. Missiakas, O. Schneewind, M.F. Hoylaerts & P. Verhamme, (2013) The role of staphylothrombin-mediated fibrin deposition in catheter-related Staphylococcus aureus infections. *J Infect Dis* **208**: 92-100.

VanEperen, A.S. & J. Segreti, (2016) Empirical therapy in Methicillin-resistant Staphylococcus Aureus infections: An Up-To-Date approach. *J Infect Chemother* **22**: 351-359.

Vecerek, B., I. Moll & U. Blasi, (2007) Control of Fur synthesis by the non-coding RNA RyhB and iron-responsive decoding. *Embo J* **26**: 965-975.

Verhoeven, P.O., J. Gagnaire, E. Botelho-Nevers, F. Grattard, A. Carricajo, F. Lucht, B. Pozzetto & P. Berthelot, (2014) Detection and clinical relevance of Staphylococcus aureus nasal carriage: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther* **12**: 75-89.

Verstraeten, N., W.J. Knapen, C.I. Kint, V. Liebens, B. Van den Bergh, L. Dewachter, J.E. Michiels, Q. Fu, C.C. David, A.C. Fierro, K. Marchal, J. Beirlant, W. Versees, J. Hofkens, M. Jansen, M. Fauvart & J. Michiels, (2015) Obg and Membrane Depolarization Are Part of a Microbial Bet-Hedging Strategy that Leads to Antibiotic Tolerance. *Mol Cell* **59**: 9-21.

Vesper, O., S. Amitai, M. Belitsky, K. Byrgazov, A.C. Kaberdina, H. Engelberg-Kulka & I. Moll, (2011) Selective translation of leaderless mRNAs by specialized ribosomes generated by MazF in Escherichia coli. *Cell* **147**: 147-157.

Vila-Sanjurjo, A., B.S. Schuwirth, C.W. Hau & J.H. Cate, (2004) Structural basis for the control of translation initiation during stress. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 1054-1059.
Vogel, J., L. Argaman, E.G. Wagner & S. Altuvia, (2004) The small RNA IstR inhibits synthesis of an SOS-induced toxic peptide. *Curr Biol* **14**: 2271-2276.
Wada, A., K. Igarashi, S. Yoshimura, S. Aimoto & A. Ishihama, (1995) Ribosome modulation factor: stationary growth phase-specific inhibitor of ribosome functions from Escherichia coli. *Biochem Biophys Res Commun* **214**: 410-417.
Wagner, E.G., (2013) Cycling of RNAs on Hfq. *RNA Biol* **10**: 619-626.
Wagner, E.G. & P. Romby, (2015) Small RNAs in bacteria and archaea: who they are, what they do, and how they do it. *Adv Genet* **90**: 133-208.
Wagner, E.G. & C. Unoson, (2012) The toxin-antitoxin system tisB-istR1: Expression, regulation, and biological role in persister phenotypes. *RNA Biol* **9**: 1513-1519.
Wang, X., D.M. Lord, H.Y. Cheng, D.O. Osbourne, S.H. Hong, V. Sanchez-Torres, C. Quiroga, K. Zheng, T. Herrmann, W. Peti, M.J. Benedik, R. Page & T.K. Wood, (2012) A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS. *Nat Chem Biol* **8**: 855-861.
Wann, E.R., S. Gurusiddappa & M. Hook, (2000) The fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of Staphylococcus aureus is a bifunctional protein that also binds to fibrinogen. *J Biol Chem* **275**: 13863-13871.
Warner, J.R., P.M. Knopf & A. Rich, (1963) A multiple ribosomal structure in protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **49**: 122-129.
Waters, L.S. & G. Storz, (2009) Regulatory RNAs in bacteria. *Cell* **136**: 615-628.
Weaver, K.E., E.A. Ehli, J.S. Nelson & S. Patel, (2004) Antisense RNA regulation by stable complex formation in the Enterococcus faecalis plasmid pAD1 par addiction system. *J Bacteriol* **186**: 6400-6408.
Weel-Sneve, R., K.I. Kristiansen, I. Odsbu, B. Dalhus, J. Booth, T. Rognes, K. Skarstad & M. Bjoras, (2013) Single transmembrane peptide DinQ modulates membrane-dependent activities. *PLoS Genet* **9**: e1003260.
Weidenmaier, C., J.F. Kokai-Kun, S.A. Kristian, T. Chanturiya, H. Kalbacher, M. Gross, G. Nicholson, B. Neumeister, J.J. Mond & A. Peschel, (2004) Role of teichoic acids in Staphylococcus aureus nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. *Nat Med* **10**: 243-245.
Weidenmaier, C., A. Peschel, V.A. Kempf, N. Lucindo, M.R. Yeaman & A.S. Bayer, (2005) DltABCD- and MprF-mediated cell envelope modifications of Staphylococcus aureus confer resistance to platelet microbicidal proteins and contribute to virulence in a rabbit endocarditis model. *Infect Immun* **73**: 8033-8038.
Weinrick, B., P.M. Dunman, F. McAleese, E. Murphy, S.J. Projan, Y. Fang & R.P. Novick, (2004) Effect of mild acid on gene expression in Staphylococcus aureus. *J Bacteriol* **186**: 8407-8423.
Weis, F., P. Bron, E. Giudice, J.P. Rolland, D. Thomas, B. Felden & R. Gillet, (2010a) tmRNA-SmpB: a journey to the centre of the bacterial ribosome. *Embo J* **29**: 3810-3818.
Weis, F., P. Bron, J.P. Rolland, D. Thomas, B. Felden & R. Gillet, (2010b) Accommodation of tmRNA-SmpB into stalled ribosomes: a cryo-EM study. *Rna* **16**: 299-306.
Wen, J. & E.M. Fozo, (2014) sRNA antitoxins: more than one way to repress a toxin. *Toxins (Basel)* **6**: 2310-2335.
Wendrich, T.M., G. Blaha, D.N. Wilson, M.A. Marahiel & K.H. Nierhaus, (2002) Dissection of the mechanism for the stringent factor RelA. *Mol Cell* **10**: 779-788.
Wertheim, H.F., D.C. Melles, M.C. Vos, W. van Leeuwen, A. van Belkum, H.A. Verbrugh & J.L. Nouwen, (2005) The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections. *Lancet Infect Dis* **5**: 751-762.
Williams, R.E., (1963) Healthy carriage of Staphylococcus aureus: its prevalence and importance. *Bacteriol Rev* **27**: 56-71.

Wilson, D.N., (2009) The A-Z of bacterial translation inhibitors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **44**: 393-433.
Wilson, D.N., (2014) Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat Rev Microbiol* **12**: 35-48.
Wilson, D.N., (2016) The ABC of Ribosome-Related Antibiotic Resistance. *MBio* **7**.
Wilson, D.N. & J.H. Doudna Cate, (2012) The structure and function of the eukaryotic ribosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**.
Wilson, G.J., K.S. Seo, R.A. Cartwright, T. Connelley, O.N. Chuang-Smith, J.A. Merriman, C.M. Guinane, J.Y. Park, G.A. Bohach, P.M. Schlievert, W.I. Morrison & J.R. Fitzgerald, (2011) A novel core genome-encoded superantigen contributes to lethality of community-associated MRSA necrotizing pneumonia. *PLoS Pathog* **7**: e1002271.
Winstel, V., P. Kuhner, F. Salomon, J. Larsen, R. Skov, W. Hoffmann, A. Peschel & C. Weidenmaier, (2015) Wall Teichoic Acid Glycosylation Governs Staphylococcus aureus Nasal Colonization. *MBio* **6**: e00632.
Winther, K.S., D.E. Brodersen, A.K. Brown & K. Gerdes, (2013) VapC20 of Mycobacterium tuberculosis cleaves the sarcin-ricin loop of 23S rRNA. *Nat Commun* **4**: 2796.
Winther, K.S. & K. Gerdes, (2011) Enteric virulence associated protein VapC inhibits translation by cleavage of initiator tRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 7403-7407.
Wood, T.L. & T.K. Wood, (2016) The HigB/HigA toxin/antitoxin system of Pseudomonas aeruginosa influences the virulence factors pyochelin, pyocyanin, and biofilm formation. *Microbiologyopen* **5**: 499-511.
Woolstenhulme, C.J., S. Parajuli, D.W. Healey, D.P. Valverde, E.N. Petersen, A.L. Starosta, N.R. Guydosh, W.E. Johnson, D.N. Wilson & A.R. Buskirk, (2013) Nascent peptides that block protein synthesis in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: E878-887.
Wright, J.S., 3rd, R. Jin & R.P. Novick, (2005) Transient interference with staphylococcal quorum sensing blocks abscess formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 1691-1696.
Wu, S., N. Duan, H. Gu, L. Hao, H. Ye, W. Gong & Z. Wang, (2016) A Review of the Methods for Detection of Staphylococcus aureus Enterotoxins. *Toxins (Basel)* **8**.
Xue, T., X. Zhang, H. Sun & B. Sun, (2014) ArtR, a novel sRNA of Staphylococcus aureus, regulates alpha-toxin expression by targeting the 5' UTR of sarT mRNA. *Med Microbiol Immunol* **203**: 1-12.
Yamaguchi, Y., J.H. Park & M. Inouye, (2011) Toxin-antitoxin systems in bacteria and archaea. *Annu Rev Genet* **45**: 61-79.
Yamamoto, H., Y. Qin, J. Achenbach, C. Li, J. Kijek, C.M. Spahn & K.H. Nierhaus, (2014) EF-G and EF4: translocation and back-translocation on the bacterial ribosome. *Nat Rev Microbiol* **12**: 89-100.
Yamamoto, Y., T. Sunohara, K. Jojima, T. Inada & H. Aiba, (2003) SsrA-mediated trans-translation plays a role in mRNA quality control by facilitating degradation of truncated mRNAs. *Rna* **9**: 408-418.
Yamashita, Y., Y. Kadokura, N. Sotta, T. Fujiwara, I. Takigawa, A. Satake, H. Onouchi & S. Naito, (2014) Ribosomes in a stacked array: elucidation of the step in translation elongation at which they are stalled during S-adenosyl-L-methionine-induced translation arrest of CGS1 mRNA. *J Biol Chem* **289**: 12693-12704.
Yanagisawa, T., T. Sumida, R. Ishii, C. Takemoto & S. Yokoyama, (2010) A paralog of lysyl-tRNA synthetase aminoacylates a conserved lysine residue in translation elongation factor P. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 1136-1143.
Yarmolinsky, M.B., (1995) Programmed cell death in bacterial populations. *Science* **267**: 836-837.
Yoshida, H., Y. Maki, S. Furuike, A. Sakai, M. Ueta & A. Wada, (2012) YqjD is an inner membrane protein associated with stationary-phase ribosomes in Escherichia coli. *J Bacteriol* **194**: 4178-4183.

Yoshida, H., Y. Maki, H. Kato, H. Fujisawa, K. Izutsu, C. Wada & A. Wada, (2002) The ribosome modulation factor (RMF) binding site on the 100S ribosome of Escherichia coli. *J Biochem* **132**: 983-989.

Yuan, J., Y. Yamaichi & M.K. Waldor, (2011) The three vibrio cholerae chromosome II-encoded ParE toxins degrade chromosome I following loss of chromosome II. *J Bacteriol* **193**: 611-619.

Zhang, S., X. Shu & B. Sun, (2016) SigmaB regulates ccrAB expression and SCCmec excision in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Int J Med Microbiol* **306**: 406-414.

Zhang, Y., J. Zhang, K.P. Hoeflich, M. Ikura, G. Qing & M. Inouye, (2003) MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in Escherichia coli. *Mol Cell* **12**: 913-923.

Ziebandt, A.K., H. Weber, J. Rudolph, R. Schmid, D. Hoper, S. Engelmann & M. Hecker, (2001) Extracellular proteins of Staphylococcus aureus and the role of SarA and sigma B. *Proteomics* **1**: 480-493.

Zywicki, M., K. Bakowska-Zywicka & N. Polacek, (2012) Revealing stable processing products from ribosome-associated small RNAs by deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Res* **40**: 4013-4024.

Résumé

Staphylococcus aureus, est un pathogène humain majeur responsable d'infections nosocomiales et communautaires. Avec l'utilisation excessive des antibactériens, l'incidence et l'émergence de souches de *S. aureus* multi-résistantes aux antibiotiques ont augmenté rapidement depuis plusieurs années et constituent un véritable problème de santé publique. Le succès de *S. aureus* en tant que pathogène est lié à sa capacité à s'adapter rapidement à un nouvel environnement et à produire un arsenal de facteurs de virulence dont l'expression fait intervenir des protéines mais également des ARN régulateurs (ARNrég).

Au cours de cette thèse, nous avons montré que les ARNrég *sprG1* et SprF1 constitue un système toxine-antitoxine (STA) de type I fonctionnel où *sprG1* code pour deux peptides toxiques. En condition normale de croissance, l'expression de la toxine est régulée par l'antitoxine SprF1 au niveau transcriptionnel et/ou post-transcriptionnel et traductionnel, permettant au pathogène *S. aureus* de croître normalement. En revanche, lorsque la bactérie est confrontée à une carence nutritive globale, l'expression de l'antitoxine est réprimée, laissant ainsi la toxine *sprG1* s'accumuler dans la cellule et traduire les peptides toxiques $PepG1_{44}$ et $PepG1_{31}$, responsables de la stase bactérienne. Les deux peptides sécrétés sont capables de lyser les bactéries compétitrices présentes dans le milieu et les érythrocytes humains. Nous avons également montré, qu'en condition de stress hyperosmotique, SprF1 fixe directement les ribosomes, probablement par l'intermédiaire d'un ou de deux sites de fixation aux ribosomes, afin de réguler la synthèse protéique globale et de favoriser la persistance de *S. aureus*. Ces résultats montrent que SprF1 appartient à une nouvelle classe émergente d'ARNrég régulant la traduction par fixation directe sur le ribosome. Le STA *sprG1*/SprF1 est le premier exemple de STA de type I où l'antitoxine est le principal acteur de la fonction biologique.

Mots clés : *Staphylococcus aureus*, système toxine-antitoxine, persistance, ARN régulateurs

Summary

Staphylococcus aureus is a major human pathogen responsible for nosocomial and community-acquired diseases. With the excessive use of antibiotics, incidence and emergence of multidrug-resistant strains of *S. aureus* have rapidly increased over the last decade and constitute a serious public health concern. The success of *S. aureus* as a pathogen is due to its ability to adapt quickly to new environment and to produce an arsenal of virulence factors whose expressions are regulated by proteins and regulatory RNA (regRNA).

During my PhD thesis, we showed that RNAs *sprG1* and SprF1 constitute a functional type I toxin-antitoxin system (TAS) where *sprG1* encodes two toxic peptides. During normal growth conditions, toxin expression is regulated by the antitoxin SprF1 at transcriptional and/or post-transcriptional and translational level, allowing the pathogen to grow. Conversaly, when bacteria are confronted to global nutritive starvation, the antitoxin expression is repressed. This allows accumulation of the *sprG1* toxin in cell and translation of both toxic peptides, $PepG1_{44}$ and $PepG1_{31}$, responsible for bacterial stasis. Interestingly, both secreted peptides are able to lyse competitor bacteria in the medium and human erythrocytes. We also showed that upon hyperosmotic stress, SprF1 directly binds ribosomes, probably though one or two ribosome-binding sites, to regulate overall protein synthesis and promote *S. aureus* persistence. These results suggest that SprF1 belongs to the new emerging class of regRNA regulating translation by direct ribosome-binding. The *sprG1*/SprF1 TAS is the first example of type I TAS where antitoxin is the leading player of the biological function.

Mots clés: *Staphylococcus aureus*, toxin-antitoxin system, persistence, regulatory RNA