



HAL
open science

Rôle de la protéine chaperonne Hfq dans la réponse des ARN messagers à la régulation par les petits ARN

Benoit Guillemardet

► **To cite this version:**

Benoit Guillemardet. Rôle de la protéine chaperonne Hfq dans la réponse des ARN messagers à la régulation par les petits ARN. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris-Saclay, 2016. Français. NNT : 2016SACLS226 . tel-01393921

HAL Id: tel-01393921

<https://theses.hal.science/tel-01393921>

Submitted on 8 Nov 2016

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

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

NNT : 2016SACLS226

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
L'UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE N°577
Structure et Dynamique des Systèmes Vivants (SDSV)
Spécialité de doctorat : Sciences de la Vie et de la Santé

Par

M Benoit Guillemardet

Rôle de la protéine chaperonne Hfq dans la réponse des ARN messagers à la
régulation par les petits ARN.

Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le 23 septembre 2016

Composition du Jury :

| | | |
|---------------------------|--------------------------------------|---------------------|
| Mme. Figueroa-Bossi Nara, | Directrice de Recherche, CNRS | Directrice de thèse |
| M. Gautheret Daniel, | Professeur, Université Paris-Sud | Président du Jury |
| M. Uzan Marc, | Directeur de Recherche, CNRS, | Rapporteur |
| Mme. Guillier Maude | Chargée de Recherche, CNRS | Rapporteuse |
| M. Boulloc Phillipe | Directeur de Recherche, CNRS | Invité |
| M. Repoila Francis | Chargé de Recherche, INRA, | Invité |
| M. Bossi Lionello | Directeur de Recherche émérite, CNRS | Invité |

NNT : 2016SACLS226

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
L'UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE N°577
Structure et Dynamique des Systèmes Vivants (SDSV)
Spécialité de doctorat : Sciences de la Vie et de la Santé

Par

M Benoit Guillemardet

Rôle de la protéine chaperonne Hfq dans la réponse des ARN messagers à la
régulation par les petits ARN.

Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le 23 septembre 2016

Composition du Jury :

| | | |
|---------------------------|--------------------------------------|---------------------|
| Mme. Figueroa-Bossi Nara, | Directrice de Recherche, CNRS | Directrice de thèse |
| M. Gautheret Daniel, | Professeur, Université Paris-Sud | Président du Jury |
| M. Uzan Marc, | Directeur de Recherche, CNRS, | Rapporteur |
| Mme. Guillier Maude | Chargée de Recherche, CNRS | Rapporteuse |
| M. Boulloc Phillipe | Directeur de Recherche, CNRS | Invité |
| M. Repoila Francis | Chargé de Recherche, INRA, | Invité |
| M. Bossi Lionello | Directeur de Recherche émérite, CNRS | Invité |

Remerciement

Tout d'abord, je tiens à remercier Mme Maude Guillier et M. Marc Uzan d'avoir accepté d'étudier mon travail de thèse en tant que rapporteurs. Je remercie également M. Daniel Gautheret d'avoir accepté d'être le président du jury et M. Philippe Bouloc et M. Francis Repoila d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je remercie Mme Maude Guillier et M. Marc Boudvillain pour avoir participé au comité de thèse pendant toute ses années.

Je tiens également à remercier Mme Nara Figueroa-Bossi et M. Lionello Bossi pour m'avoir accueilli dans l'équipe Régulation génétique chez Salmonella et ses phages au sein du CGM puis de l'I2BC pendant 6 années (Thèse + Master).

Je tiens à remercier en plus l'ex-Université Paris-Sud maintenant devenue Paris-Saclay pour le financement de cette dernière.

Je remercie toute les personnes qui ont, de près ou de loin, contribué à la réalisation de ce projet et qui m'ont soutenu et épaulé dans les moments de doutes et de désespoir.

Plus précisément, il y a plusieurs personnes que je souhaite remercier.

Patricia, merci pour tous, d'avoir été là dans les moments de solitudes et de doutes. Je te dois vraiment beaucoup. Profite bien du fait d'être grand-mère et je te souhaite que du bonheur.

Damien, grâce à toi, j'ai pu tenir. Tes conseils, ton amitié ont été de précieux alliés pour ces travaux. Merci à toi et je te souhaite que du bonheur pour la suite de tes aventures.

Mathilde, je pense que le labo est beaucoup plus calme sans moi. Toi aussi, tu as été une bouffée d'oxygène et je t'en remercie sincèrement.

Florian, merci à toi pour ces bons moments de détente et bonne chance à toi pour ta thèse.

Merci à tous les stagiaires qui sont passé dans le labo, Laura, Arzou, Floriant, ect.

Merci à tous les amis pour les soirées, les jeux, d'être là. Guillaume, Caroline et Alexandre, Lettie, Benjamin et Maude, Olivier et Aurélie, Vincent et Hoa-my, Pierre et Laure, Alexandre, Samia et Axel, Kathy et Max, Nathaly et Killian, Maxime, Cécille et Yann et plein d'autres mais je ne peux pas tous les cités. Merci à vous

Merci à ma famille de m'avoir soutenu pendant toute la durée de cette thèse

Pour finir, un grand MERCI à ma petite femme, Cindy. Tu as été là tout le temps, tu m'as soutenu dans les moments durs, était heureuse avec moi dans les bons moments. Merci à toi pour tout. Je t'aime mon ange. Tu m'offres, pour cette fin de thèse, le plus beau des cadeaux. Notre famille va s'agrandir et j'espère me montrer digne d'être un bon papa pour notre petite Naru.

Table des matières

| | |
|---|-----------|
| <i>l) Introduction</i> | 1 |
| 1. La transcription | 2 |
| 2.1) Les acteurs de la transcription | 2 |
| 2.1.1) L'ARN polymérase..... | 2 |
| 2.1.2) Les facteurs sigma | 3 |
| 2.1.3) Le promoteur | 4 |
| 2.2) Mécanisme de la transcription | 5 |
| 2.2.1) Initiation de la transcription : | 5 |
| 2.2.2) Élongation de la transcription : | 6 |
| 2.2.3) Terminaison de la transcription : | 7 |
| 2.3) Régulation de la transcription : | 8 |
| 2.3.1) Régulation de l'initiation de la transcription : | 8 |
| 2.3.2) Régulation de la terminaison de la transcription : | 10 |
| 2. Le facteur de terminaison de la transcription Rho | 13 |
| 3.1) Structure | 13 |
| 3.2) Interaction de Rho avec l'ARN | 16 |
| 3.2.1) Les sites d'interactions de l'ARN sur Rho | 16 |
| 3.2.2) Le site d'interaction de Rho sur l'ARN | 18 |
| 3.3) Activité ATPase de Rho | 20 |
| 3.4) Activité Hélicase de Rho..... | 22 |
| 3.5) Modèle de terminaison Rho-dépendante | 22 |
| 3. La traduction | 26 |
| 4.1) Les acteurs de la traduction,..... | 26 |
| 4.1.1) L'Acide RiboNucléique messenger..... | 26 |
| 4.1.2) Le ribosome | 27 |
| 4.1.3) L'ARN de transfert | 28 |
| 4.1.4) Autres facteurs : | 29 |
| 4.2) Mécanisme de la traduction | 30 |
| 4.2.1) Initiation de la traduction : | 30 |
| 4.2.2) Élongation de la traduction | 30 |
| 4.2.3) Terminaison de la traduction : | 32 |
| 4.3) Régulation de la traduction | 32 |
| 4.3.1) Régulation de l'initiation de la traduction..... | 32 |
| 4.3.2) Protéine inhibitrice de la traduction | 33 |
| 4.3.3) Régulation de la traduction par des molécules d'ARN..... | 34 |

| | |
|---|-----------|
| 4. Les ARN régulateurs bactériens | 35 |
| 5.1) LES ARN CRISPR : | 36 |
| 5.2) Les ARN agissants en cis..... | 38 |
| 5.2.1) Les riboswitchs..... | 38 |
| 5.2.2) Les thermosenseurs..... | 40 |
| 5.3) Les petits ARN régulateurs bactériens..... | 41 |
| 5.3.1) Les petits ARN régulateurs ciblant les protéines..... | 42 |
| 5.3.2) Les petits ARN régulateurs en cis : | 43 |
| 5.4) Les petits ARN régulateurs en <i>trans</i> | 46 |
| 5.4.1) RyhB et l'homéostasie du fer..... | 49 |
| 5.4.2) GcvB et les acides aminés..... | 54 |
| 5.4.3) ChiX et les chitosucres | 56 |
| 5. La protéine chaperonne d'ARN Hfq..... | 60 |
| 6.1) Expression et régulation | 60 |
| 6.2) Structure | 61 |
| 6.3) Interaction avec les ARN | 63 |
| 6.3.1) Site d'interaction | 63 |
| 6.4) Hfq et l'inhibition du facteur Rho | 67 |
| 6.5) Hfq et les ribonucléases..... | 67 |
| 6.6) Protéine chaperonne | 68 |
| 6.7) Régulation des ARNm par les petits ARN régulateurs | 69 |
| 6.8) Hfq et la virulence | 71 |
| 6.9) Interaction avec l'ADN | 72 |
| II) Résultats..... | 74 |
| 1. Étude de la régulation des ARNm par les petits ARN régulateurs : Rôle des sites de fixation d'Hfq | 75 |
| 1.1) Introduction | 75 |
| 1.2) Étude préliminaire : Étude du rôle des sites de fixation d'Hfq aux ARN par l'intermédiaire de chimères..... | 75 |
| 1.2.1) Étude préliminaire : ARNm chimères | 76 |
| 1.2.2) Étude préliminaire : Chimères de petits ARN régulateurs | 80 |
| 1.2.3) Étude préliminaire : Fusion des chimères | 88 |
| 1.3) Article 1 : Distinct Pathways of Hfq:mRNA recognition revealed by the analysis of sRNA-targeted mini mRNA chimeras | 92 |
| 1.4) Étude complémentaire : Rôle de la structure en tige-boucle en aval du site de fixation d'Hfq..... | 124 |
| 1.5) Étude complémentaire : Formation du complexe ternaire ARNm : Hfq : petit ARN régulateur <i>in vitro</i> | 128 |

| | |
|---|------------|
| 1.6) Étude complémentaire : Rôle du domaine C-terminal d’Hfq dans la régulation des ARNm par les petits ARN régulateurs..... | 136 |
| 2. Polarité transcriptionnelle dans la régulation par ChiX de l’opéron <i>chiPQ</i> .. | 142 |
| 2.1) Introduction | 142 |
| 2.2) Article 2 : A role for Rho-dependent polarity in gene regulation by a non-coding small RNA..... | 143 |
| 2.3) Conclusion et perspectives | 164 |
| 3. La répression de l’opéron <i>dppABCDF</i> de <i>S. Typhimurium</i> par GcvB implique-t-elle un mécanisme de polarité Rho-dépendant ?..... | 165 |
| 3.1) L’opéron <i>dppABCDF</i> | 165 |
| 3.2) Approches expérimentales mises en œuvre pour tester l’hypothèse. | 167 |
| 4. Participation du facteur Rho dans la régulation de l’expression de l’opéron <i>pgaABCD</i> d’<i>Escherichia coli</i>. | 172 |
| 4.1) Introduction | 172 |
| 4.2) Article 3 : RNA remodeling by bacterial global regulator CsrA promotes Rho-dependent transcription termination | 174 |
| 5. Caractérisation de la terminaison Rho-dépendante | 202 |
| 5.1) La régulation de l’opéron <i>chiPQ</i> par le petit ARN ChiX comme modèle pour la caractérisation de la terminaison Rho-dépendante NusG-dépendante..... | 202 |
| 5.1.1) La position du site <i>rut</i> au sein de la séquence de l’ARNm <i>chiPQ</i> influence-t-elle la terminaison de la transcription Rho-dépendante NusG-dépendante ?..... | 203 |
| 5.1.2) La terminaison Rho-dépendante NusG-dépendante du site <i>rut</i> de <i>chiP</i> est fonctionnelle même accolée au +5 de transcription. | 207 |
| 5.2) Etude de la différence d’activité entre le site <i>rut</i> cryptique de <i>chiP</i> chez <i>S. Typhimurium</i> et <i>E. coli</i> | 210 |
| III) Discussion | 216 |
| 1. Étude de la régulation des ARNm par les petits ARN régulateurs : Rôle des sites de fixation d’Hfq | 217 |
| 2. Étude de la terminaison prématurée Rho-dépendante..... | 220 |
| 3. Caractérisation de la terminaison Rho-dépendante | 222 |
| IV) Matériels et Méthodes..... | 224 |
| 1. Matériel | 225 |
| 1.1) Conditions de cultures | 225 |
| 1.2) Plasmides et ADN matrices..... | 225 |
| 1.3) Constructions de souches | 226 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 1.3.1) | Étude de la régulation des ARNm par les petits ARN régulateurs : Rôle des sites de fixation d'Hfq..... | 226 |
| 1.3.2) | La répression de l'opéron dppABCDF de <i>S. Typhimurium</i> par GcvB implique-t-elle un mécanisme de polarité Rho-dépendant ?..... | 227 |
| 1.3.3) | Caractérisation de la terminaison Rho-dépendante | 228 |
| 2. | Techniques génétiques | 230 |
| 2.1) | Transduction généralisée..... | 230 |
| 2.1.1) | Préparation du lysat transducteur | 230 |
| 2.1.2) | Protocole de transduction | 231 |
| 2.2) | Ingénierie du chromosome..... | 231 |
| 2.2.1) | Préparation et transformation de cellules électrocompétentes | 231 |
| 2.2.2) | Méthode de recombinaison médiée par λ Red..... | 231 |
| 2.2.3) | Variation sur la technique de recombinaison λ Red | 232 |
| 2.2.4) | Génération de fusion <i>lacZ</i> dans un site spécifique..... | 233 |
| 3. | Techniques Biochimiques | 234 |
| 3.1) | Dosage de l'activité β -galactosidase..... | 234 |
| 4. | Techniques de Biologie Moléculaire..... | 234 |
| 4.1) | Extraction d'ARN | 234 |
| 4.2) | Analyse des ARN par Northern Blot..... | 235 |
| 4.3) | Radiomarquage des oligonucléotides..... | 236 |
| 4.4) | Transcription et radiomarquage <i>in vitro</i> d'ARN..... | 236 |
| 4.5) | Expérience d'interaction ARN : ARN <i>in vitro</i> en retard sur gel..... | 237 |
| 4.6) | Expérience d'interaction ARN : Hfq : ARN <i>in vitro</i> en retard sur gel | 238 |
| | BIBLIOGRAPHIE | 239 |
| V) | ANNEXES | 272 |
| 1. | Annexe 1 : Structure des ARNm chimères | 273 |
| 2. | Annexe 2 : Structure des petits ARN régulateurs chimériques..... | 275 |
| 3. | Annexe 3 : Liste des souches et leurs génotypes par thématique | 279 |
| 4. | Annexe 4 : Liste des oligonucléotides par thématique..... | 287 |

Tables des Figures

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Structure de du complexe ARN polymérase..... | 3 |
| Figure 2 : Cycle de la transcription bactérienne..... | 5 |
| Figure 3 : Interaction spécifique entre l’holoprotéine ARN polymérase et la région promotrice sur l’ADN d’après [4] | 6 |
| Figure 4 : Atténuation de la transcription de l’opéron histidine..... | 11 |
| Figure 5 : Structure du protomère de Rho. | 14 |
| Figure 6 : Structure de l’hexamère de la protéine Rho. | 15 |
| Figure 7 : Site primaire d’interaction aux ARN du facteur Rho. | 17 |
| Figure 8 : Sites d’interaction secondaires aux ARN et de fixation de l’ATP du facteur Rho.. | 19 |
| Figure 9 : Représentation schématique du modèle « The one nucleotide per ATP ». | 21 |
| Figure 10 : Représentation schématique du modèle « Tethered-tracking » d’après [20]. | 23 |
| Figure 11 : Représentation schématique des différents modèles de terminaison Rho-dépendante d’après [8]. | 24 |
| Figure 12 : Assemblage du ribosome..... | 27 |
| Figure 13 : Cycle de la traduction bactérienne d’après [19]. | 31 |
| Figure 14 : Régulation de l’ARNm <i>glgCAP</i> par la protéine CsrA d’après [17]. | 34 |
| Figure 15 : Interférences guidées par les ARNcr d’après [6]..... | 37 |
| Figure 16 : Régulation de l’ARNm <i>lysC</i> par un riboswitch d’après [23]. | 39 |
| Figure 17 : Régulation de l’ARNm <i>cspA</i> par un thermosenseur d’après [22]. | 40 |
| Figure 18 : Structure secondaire des petits ARN CsrB et CsrC d’après [15]. | 42 |
| Figure 19 : Régulation de l’ARNm <i>mgtC</i> par le petit ARN AmgR d’après [11]..... | 44 |
| Figure 20 : Stabilisation de l’ARNm <i>gadXW</i> par le petit ARN GadY d’après [9]..... | 46 |
| Figure 21 : Exemple de petit ARN régulateur et de leurs réseaux de régulations | 48 |
| Figure 22 : Le petit ARN RyhB, régulateur du fer dans la cellule d’après [5]. | 51 |
| Figure 23 : Le petit ARN régulateur GcvB, le régulateur de nombreux gènes..... | 54 |
| Figure 24 : Le petit ARN régulateur ChiX, régulateur des chitosucres d’après [28]..... | 58 |
| Figure 25 : La protéine Hfq au sein des différentes espèces. | 62 |
| Figure 26 : Surface d’interaction entre Hfq et les ARN..... | 66 |
| Figure 27 : Représentation schématique de l’action d’Hfq dans la polyadénylation par la PAP I d’après [16]. | 68 |
| Figure 28 : Représentation schématique de la régulation de <i>rpoS</i> par DsrA d’après [10]. | 71 |
| Figure 29 : Structure secondaire des séquences 5’UTR des ARNm chimères dérivées de <i>chiP::lacZ</i> | 77 |
| Figure 30 : Régulation des ARNm chimères par les petits ARN régulateurs sauvage..... | 79 |
| Figure 31 : Structure secondaire des séquences 5’UTR des ARNm chimères dérivées de l’ARNm <i>yifK::lacZ</i> | 78 |
| Figure 32 : Structure secondaire des séquences des petits ARN régulateurs chimères dérivés de ChiX. | 82 |
| Figure 33 : Structure secondaire des séquences des petits ARN régulateurs chimères dérivés de RyhB. | 83 |

| | |
|--|-----|
| Figure 34 : Structure secondaire des séquences des petits ARN régulateurs chimères dérivées de GcvB..... | 85 |
| Figure 35 : Northern Blot réalisé afin de vérifier la stabilité et la taille des petits ARN régulateurs..... | 86 |
| Figure 36 : Régulation des ARNm sauvages par les petits ARN régulateurs chimères..... | 88 |
| Figure 37 : Régulation des ARNm chimères par les petits ARN régulateurs chimères..... | 89 |
| Figure 38 : Régulation de <i>yifKP4</i> et <i>yifKP5</i> par les petits ARN régulateurs ChiX, GcvBX et RyhBX..... | 125 |
| Figure 39 : Expérience de retard sur gels pour observer les interactions ARN:ARN..... | 129 |
| Figure 40 : Expérience de retard sur gel pour observer les complexes ternaires GcvB : Hfq : ARNm..... | 131 |
| Figure 41 : Expérience de retard sur gels pour observer les complexes ternaires ChiX : Hfq : ARNm et GcvBX : Hfq : ARNm..... | 133 |
| Figure 42 : Délétion du domaine C-terminal de la protéine Hfq..... | 137 |
| Figure 43 : Impact de la délétion du domaine C-terminal d'Hfq dans la régulation des ARNm <i>chiP</i> , <i>yifK</i> et <i>sodB</i> par les petits ARN régulateurs..... | 138 |
| Figure 44 : Impact de la délétion du domaine C-terminal d'Hfq dans la régulation des ARNm <i>yifKP1</i> et <i>yifKP2</i> par les petits ARN régulateurs..... | 140 |
| Figure 45: Structure de l'ARNm <i>chiPQ</i> | 142 |
| Figure 46 : Présentation de l'opéron <i>dppABCDF</i> | 166 |
| Figure 47 : Construction des souches rapportrices ARNt ^{S.a.} et <i>lacZ</i> | 168 |
| Figure 48 : Etude des rapporteurs dans les souches <i>dppA WT</i> , <i>dppA Δrut</i> et <i>dppA_{AGG}</i> | 170 |
| Figure 49 : Constructions des différentes délétions du gène <i>chiP</i> | 204 |
| Figure 50 : Impact de la position du site <i>rut</i> cryptique de <i>chiP</i> dans son activité terminatrice de la transcription Rho-dépendante NusG-dépendante..... | 206 |
| Figure 51 : Impact de la position du site <i>rut</i> cryptique de <i>chiP</i> dans le contexte <i>chiPΔ1045</i> dans son activité terminatrice de la transcription Rho-dépendante NusG-dépendante..... | 208 |
| Figure 52 : Différence entre le site <i>rut</i> cryptique de <i>chiP</i> chez <i>S. Typhimurium</i> et <i>E. coli</i> .. | 211 |
| Figure 53 : Etude des différences de sensibilité des sites <i>rut</i> de <i>chiP</i> de <i>S. Typhimurium</i> et d' <i>E. coli</i> aux facteurs Rho et NusG..... | 213 |
| Figure 54 : Différence de sensibilité du site <i>rut</i> de <i>S. Typhimurium</i> et d' <i>E.coli</i> au facteur NusG ainsi qu'à la position du site par rapport au +1 de transcription..... | 215 |
| Figure 55 : Structure secondaire des séquences 5'UTR des ARNm chimères dérivés de l'ARNm <i>chiP</i> | 273 |
| Figure 56 : Structure secondaire des séquences 5'UTR des ARNm chimères dérivés de l'ARNm <i>yifK</i> | 274 |
| Figure 57 : Structure secondaire des séquences des petits ARN régulateurs chimères dérivés de ChiX..... | 275 |
| Figure 58 : Structure secondaire des séquences des petits ARN régulateurs chimères dérivés de GcvB..... | 277 |
| Figure 59 : Structure secondaire des séquences des petits ARN régulateurs chimères dérivés de RyhB..... | 278 |

Liste des abréviations :

Bases :

| | |
|---|-------------------------|
| A | Adénine |
| C | Cytosine |
| G | Guanine |
| T | Thymine |
| U | Uracile |
| N | A, C, T, G |
| R | Purine (A ou G) |
| Y | Pyrimidines (C, T ou U) |

Nucléotides triphosphate:

| | |
|-----|------------------------|
| ATP | Adénosine TriPhosphate |
| CTP | Cytosine TriPhosphate |
| GTP | Guanosine TriPhosphate |
| UTP | Uracile TriPhosphate |

Acide Aminés :

| | |
|----------|------------------|
| Ala ou A | Alanine |
| Arg ou R | Arginine |
| Asn ou N | Asparagine |
| Asp ou D | Acide aspartique |
| Cys ou C | Cystéine |
| Gln ou Q | Glutamine |
| Glu ou E | Acide glutamique |
| Gly ou G | Glycine |
| His ou H | Histidine |
| Ile ou I | Isoleucine |
| Leu ou L | Leucine |
| Lys ou K | Lysine |
| Met ou M | Méthionine |
| Phe ou F | Phénylalanine |
| Pro ou P | Proline |
| Ser ou S | Sérine |
| Thr ou T | Thréonine |
| Trp ou W | Tryptophane |
| Tyr ou Y | Tyrosine |
| Val ou V | Valine |

ADN :

| | |
|-----|--------------------------|
| ADN | Acide DéoxyriboNucléique |
| IG | InterGénique |

ARN :

| | |
|-------|---------------------|
| ARN | Acide RiboNucléique |
| ARNas | ARN anti-sens |
| ARNcr | ARN CRISPR |
| ARNm | ARN messenger |
| ARNmi | Micro ARN |

| | |
|--------|---|
| ARNnc | ARN noncodant |
| ARNr | ARN ribosomique |
| ARNt | ARN de transfert |
| ARNs | Small ARN |
| IF | Facteur d'initiation |
| ORF | Phase ouverte de lecture |
| RBS | Site de fixation des ribosomes |
| RF | Facteur de terminaison |
| SD | Shine et Dalgarno |
| TSS | Site d'initiation de la transcription |
| TSP | Site de terminaison de la transcription |
| 5' UTR | Région 5' non traduite |
| 3' UTR | Région 3' non traduite |

Protéine :

| | |
|-------|---------------------------|
| ARNP | ARN polymérase |
| CAS | CRISPR associated protein |
| Hfq | Host Factor QB |
| CTD | Domaine Carboxy-Terminal |
| NTD | Domaine Amino-Terminal |
| RNase | RiboNucléases |
| PDB | Protéin Data Base |

Outil Biochimique :

| | |
|------|--|
| BSA | Albumine de Sérum Bovin |
| SDS | Sodium Dodécyl Sulfate |
| DTT | DiThioThréitol |
| ONPG | Ortho-NitroPhénol - β -Galactoside |

Généralités :

| | |
|-----|---------------------|
| Å | Ångström |
| °C | Degré Celsius |
| Ci | Curie |
| Da | Dalton |
| DO | Densité Optique |
| g | Gramme |
| g | Gravité |
| L | Litre |
| M | Molaire |
| mol | Mole |
| min | Minute |
| nm | NanoMètre |
| nt | Nucléotide |
| nt | Paire de Bases |
| pH | Potentiel Hydrogène |
| rpm | Rotation Par Minute |
| s | Seconde |
| UV | UltraViolet |

Introduction

1. La transcription

À la fin des années 1950, plus aucun biologiste ne doute que les gènes codent pour des protéines. François Jacob et Jacques Monod, travaillant sur *Escherichia coli* dans le laboratoire d'André Lwoff à l'institut Pasteur de Paris, découvrent en 1961 le facteur X, molécule intermédiaire transcrite à partir des gènes [36]. Ce facteur X fut identifié, par la suite comme étant l'ARNm qui lui, sera traduit en protéine. À la différence de l'ADN qui est constitué de désoxyribonucléotides, l'ARN est un enchaînement de ribonucléotides. Chacun de ses nucléotides est composé d'un ribose, un groupement phosphate et une base azotée. Chez l'ARN, il existe quatre bases azotées : l'adénine (A), la guanine (G), la cytosine (C) et l'uracile (U) qui remplace la thymine (T) présente dans l'ADN.

Le but de la transcription est de synthétiser un ARN simple brin complémentaire à partir d'un gène grâce à une enzyme appelée ARN polymérase.

1.1) Les acteurs de la transcription

Le mécanisme de la transcription requiert un grand nombre de facteurs aussi bien nucléiques que protéiques qui vont jouer un rôle soit dans la transcription à proprement parler soit dans sa régulation. Parmi ces différents facteurs, certains vont avoir des rôles essentiels dans la transcription comme l'ARN polymérase, les différents facteurs σ et les promoteurs.

1.1.1) L'ARN polymérase

Chez les bactéries, il existe une seule ARN polymérase qui va avoir pour rôle de synthétiser l'ensemble des ARN de la cellule [37]. Cette dernière existe d'abord sous la forme d'une apoenzyme de 5 sous-unités : $\alpha 2\beta\beta'\omega$ [38]. L'apoenzyme de l'ARN polymérase seule n'est pas fonctionnelle pour initier la transcription. En effet, elle possède une affinité pour l'ADN, mais ne distingue pas les séquences promotrices du reste des séquences présentes sur ce dernier. Une sixième sous-unité, appelée facteur σ va avoir pour rôle d'améliorer l'affinité du complexe pour les séquences promotrices au détriment des autres séquences de l'ADN. L'ajout du facteur σ sur l'apoenzyme permet la formation de l'holoenzyme ARN polymérase fonctionnelle (Figure 1).

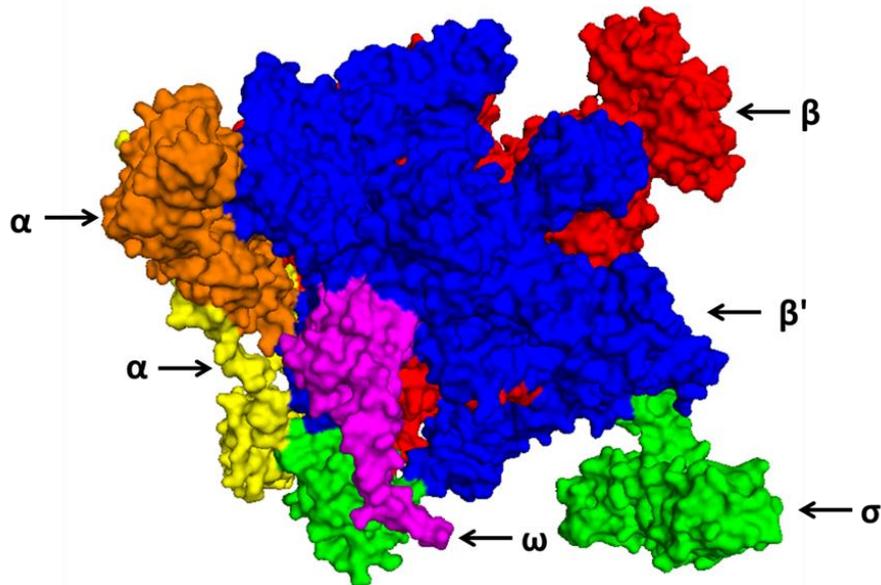


Figure 1 : Structure de du complexe ARN polymérase

Structure cristallographique de l'holoprotéine ARN polymérase en association avec le facteur σ^{32} de la famille des σ^{70} (PDB=4YG2) [18]. Chacune des sous-unités protéiques formant le complexe ARN polymérase est représentée par une couleur différente. Les deux sous-unités α sont représentées en jaune et en orange, les sous-unités β et β' sont représenté en rouge et en bleu respectivement, la sous-unité ω est représentée en violet et le facteur σ est représenté en vert.

1.1.2) Les facteurs sigma

Il existe de nombreux facteurs σ au sein d'une même espèce bactérienne ainsi qu'un nombre différent de facteurs chez les différentes espèces. Par exemple, il a été répertorié 1 unique facteur σ chez *Mycoplasma genitalium*, 7 chez *E.coli*, 18 chez *Bacillus subtilis* et jusqu'à 109 chez *Sorangium cellulosum* [39,40]. Dans un premier temps, ces facteurs sigma ont été classés selon leurs poids moléculaires ; autrement dit, le facteur σ^{38} correspond au facteur σ qui a un poids de 38 kDa. Ce type de nomenclature fut abandonné au profit d'une nouvelle nomenclature utilisant des lettres afin de pouvoir être incorporée dans des familles génétiques. Dans notre exemple, le facteur σ^{38} a été renommé σ^S ou sigS. Chacun de ces facteurs sigma permet à l'holoenzyme de reconnaître une séquence promotrice différente, généralement dérivée de la séquence consensus reconnu par le facteur σ^D .

Introduction

Lors de la croissance cellulaire, l'ensemble des gènes dits de « ménages » est synthétisé de manière constitutive par l'intermédiaire d'un seul facteur sigma qui est également appelé le facteur sigma primaire. Chez *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) et les bacilles à Gram négatif, ce rôle est desservi par le facteur σ^{70} ou σ^D . Au cours de la phase exponentielle de croissance, ce facteur sigma représente entre 60 à 95 % de la quantité totale des facteurs sigmas cellulaires [41].

L'ensemble des autres facteurs sigmas, dits facteurs sigmas alternatifs, est transcrit de manière constitutive, mais leur expression est très finement régulée par l'intermédiaire de régulations post-transcriptionnelles ou post-traductionnelles. Ces différentes régulations permettent à la bactérie d'exprimer ces facteurs sigma au plus près de ses besoins physiologiques. Par exemple, lorsque les bactéries entrent en phase stationnaire de croissance ou en condition de stress, ces facteurs sigmas alternatifs vont être exprimés par la cellule. Ils entrent en compétition avec le facteur σ^D pour se lier à l'apoenzyme afin de jouer un rôle prédéfini permettant l'adaptation des cellules aux nouvelles conditions environnementales.

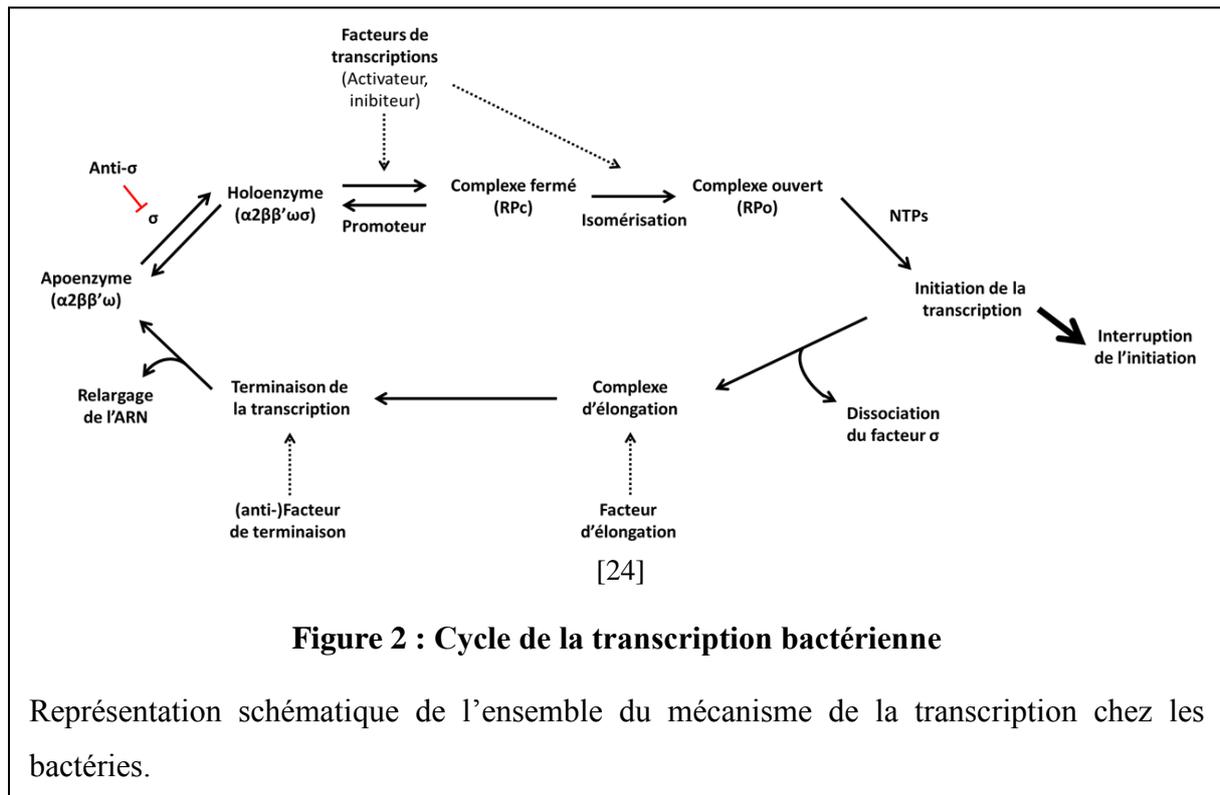
1.1.3) Le promoteur

Le promoteur est une séquence d'ADN de taille variable, présente en amont du +1 de transcription permettant l'initiation ainsi que l'orientation de la transcription. Il est reconnu spécifiquement par la sous-unité σ de l'ARN polymérase. Le promoteur permet la transcription d'un gène ou dans le cas des opérons, de plusieurs gènes.

Chez les procaryotes, le premier promoteur caractérisé fut le promoteur précoce du phage T7 reconnu par l'ARN polymérase d'*E. coli*. Il est divisé en 2 séquences majeures nommées « -10 » et « -35 » en raison de leurs positions par rapport au +1 de transcription. La séquence « -10 », ou boîte de Pribnow, a une taille de 6 nucléotides et a pour séquence consensus TATAAT [42,43]. La séquence « -35 », espacée de la boîte de Pribnow par 16 à 18 nucléotides, a une taille équivalente à la première et a pour séquence consensus TTGACA [24,44].

Le facteur σ interagit avec les différentes séquences du promoteur pour initier la transcription. Le domaine σ^1 va se lier à la séquence en aval de la boîte de Pribnow alors que les domaines σ^2 et σ^3 vont interagir avec cette dernière. Finalement, le domaine σ^4 va interagir avec la séquence en « -35 » (Figure 3).

1.2) Mécanisme de la transcription

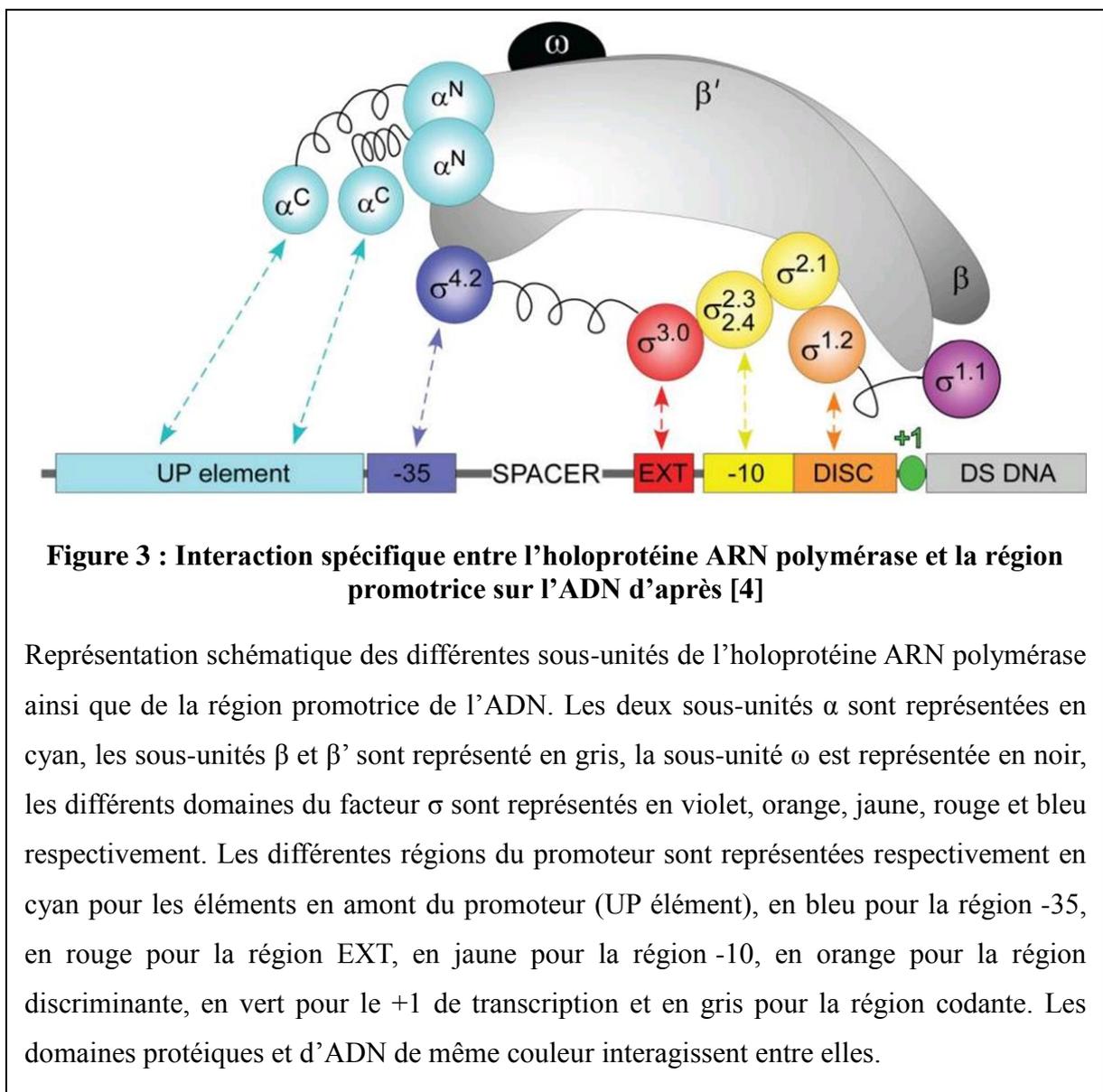


1.2.1) Initiation de la transcription :

La transcription débute lorsque l'holoenzyme ARN polymérase se lie au promoteur du gène à transcrire. Cette liaison s'effectue au niveau des séquences -10 et -35 présents sur l'ADN avec les domaines σ^2 à σ^4 de la sous-unité σ de l'ARN polymérase (Figure 2 et 3). La fixation de l'ARN polymérase sur le promoteur forme un complexe fermé stable (RPC) qui couvre environ 50 paires de bases. Des changements de conformations de l'ARN polymérase vont entraîner un passage du complexe fermé à une forme ouverte de ce dernier (RPO), caractérisé par l'ouverture d'une « bulle » de transcription d'une taille d'environ 17 nt entre les nucléotides -11 et +6 [45]. Le complexe d'élongation (ARN polymérase/ADN/ARN) incorpore les nucléotides complémentaires de l'ADN à l'ARN naissant au niveau du site 3'-OH dans le sens $5' \rightarrow 3'$. Cette synthèse se déroule jusqu'à former un petit transcrit d'une dizaine de nucléotides. Ce dernier entraîne une déstabilisation du complexe et engage la dissociation du facteur σ de l'ARN polymérase qui sera réutilisé pour initier un nouveau démarrage de la transcription. La transcription se poursuit avec l'ARN polymérase sous la forme $\alpha_2\beta\beta'\omega$, également appelée complexe d'élongation (Figure 2).

1.2.2) Élongation de la transcription :

La synthèse du transcrit s'effectue à une vitesse de 30 à 100 nucléotides par secondes [46,47]. Cette vitesse est dépendante de plusieurs facteurs, dont la concentration en nucléotides, la séquence de l'ADN ainsi que les signaux de pauses. Au cours de l'élongation de la transcription, la « bulle de transcription » avance par l'action de topoisomérase permettant de séparer les deux brins d'ADN. Ceci permet à l'ARN polymérase de continuer à accéder au brin matrice pour synthétiser le transcrit d'ARN. L'élongation de la transcription continue jusqu'à ce que le complexe d'élongation atteigne une région terminatrice de la transcription (Figure 2).



1.2.3) Terminaison de la transcription :

Arrivé à la région terminatrice de la transcription, le complexe d'élongation se dissocie, ce qui entraîne le relargage de l'ARN néo-synthétisé. Ce mécanisme, essentiel au même titre que l'initiation ou l'élongation de la transcription, permet de définir l'unité de transcription (gène ou opéron). Chez les bactéries, il existe deux mécanismes indépendants de terminaison de la transcription. Un premier mécanisme majoritaire dépendant uniquement de la séquence d'ADN (dit Rho-indépendant) et un second mécanisme minoritaire dépendant de l'action de l'hélicase à ARN Rho (dit Rho-dépendant) (Figure 2).

1.2.3.1) Terminaison de la transcription intrinsèque :

Ce mécanisme de terminaison de la transcription affecte environ 80 % des transcrits totaux de la cellule [48]. Il s'agit d'un mécanisme simple puisqu'il ne requiert l'aide d'aucun facteur extérieur. En effet, la terminaison de la transcription dépend d'une séquence présente sur l'ADN qui, une fois transcrite, induit une déstabilisation du complexe ternaire ARN polymérase/ARN/ADN.

La région terminatrice est caractérisée par une séquence palindromique inversée riche en G:C, qui forme une structure en tige-boucle d'une taille de 7 à 20 nucléotides, suivie d'une série de thymines. La formation de cette structure en tige-boucle, extrêmement stable, entraîne une pause de l'ARN polymérase. De plus, le duplex ARN:ADN (PolyU :PolyA) est très instable. Ces différents événements entraînent la dissociation du complexe d'élongation et donc le relargage de l'ARN polymérase ainsi que l'ARN transcrit [48].

1.2.3.2) Terminaison de la transcription Rho-dépendante :

Dans 20 % des cas, la terminaison de la transcription nécessite un facteur protéique qui va permettre d'initier cette terminaison : le facteur de terminaison Rho [48].

Rho est une protéine essentielle. Elle est fonctionnelle sous une configuration homohexamérique (monomère de 419aa) avec une structure en forme d'anneau ouvert ou fermé présentant une activité hélicase à ARN ATP-dépendant [49]. Rho se lie, dans la majorité des cas, au niveau de la région terminatrice. Cette dernière n'est pas clairement définie, mais elle serait composée de deux éléments distincts sur une région d'ARN d'une taille de 150 à 200nt. La première séquence est le site « *rut* » (Rho Utilization) [50]. Ce site a une taille de 70-80 nucléotides ayant un fort rapport cystéine (C) : guanine (G), peu ou pas de structure secondaire et est dépourvu de ribosome. La seconde séquence est le site de

Introduction

terminaison de la transcription à proprement parler également nommée tsp (Transcription Stop Point) [51-57].

Au cours de la transcription, Rho va reconnaître le site *rut* sur la séquence d'ARN et interagir avec ce dernier au niveau de site primaire d'interaction. Ces sites sont localisés dans les domaines N-terminaux des protomères, qui vont permettre de positionner l'ARN simple brin au centre de l'anneau [58]. Ceci va entraîner une seconde série d'interaction au niveau des sites secondaires de Rho, présent sur les domaines C-terminaux, qui vont entraîner la fermeture de la structure en anneau sur l'ARN [59]. Ces changements conformationnels entraînent l'activation de son activité hélicase par une hydrolyse de trois molécules d'ATP [60]. Rho se déplace sur l'ARN simple brin dans le sens 5' → 3' jusqu'à atteindre le complexe d'élongation arrêté au niveau d'un site de pause de la transcription. Les interactions entre Rho et le complexe d'élongation entraînent la terminaison de la transcription et le relargage de l'ARN néo-synthétisé [61].

1.3) Régulation de la transcription :

La transcription est un mécanisme essentiel extrêmement bien régulée. La bactérie orchestre un réglage précis du niveau d'expression de la plupart de ses gènes afin d'avoir une quantité de protéine suffisante. Ces différentes régulations jouent un rôle majeur dans l'aptitude de la cellule à s'adapter à des changements environnementaux.

1.3.1) Régulation de l'initiation de la transcription :

Un des moyens de réguler l'expression d'un gène est d'altérer l'initiation de sa transcription. Ce phénomène peut se faire de deux manières : en l'inhibant ou en permettant son activation. Ce mécanisme peut être effectué grâce à des éléments de séquences présents sur l'ADN et/ou à l'aide de facteurs protéiques.

1.3.1.1) Facteur Anti- σ

Comme nous l'avons vu précédemment, la cellule utilise différents promoteurs afin de pouvoir exprimer certains gènes au moment opportun. Le nombre de facteurs σ disponible impacte directement l'initiation de la transcription. Afin de moduler la quantité de facteurs disponibles, la cellule peut utiliser des protéines spécifiques appelées facteur anti- σ . Ces protéines se lient de manière spécifique aux facteurs sigma et inhibent par conséquent l'expression des gènes dépendant de ces mêmes facteurs [62]. Ce mécanisme permet ainsi

Introduction

d'inhiber l'expression d'un ensemble de gènes dont les promoteurs sont spécifiques de ces facteurs σ (Figure 2).

1.3.1.2) Facteur de transcription

La cellule utilise également un grand nombre de protéines nommées facteurs de transcription. Plus de 300 ont été identifiés chez *E.coli*. Ces derniers interagissent avec une séquence d'ADN nommée opérateur, généralement proche du promoteur cible. Cette interaction modifie ainsi l'activité du promoteur en l'activant soit en le réprimant [63]. Les répresseurs empêchent la fixation de l'ARN polymérase alors que les activateurs améliorent l'affinité du promoteur pour cette même enzyme. Les facteurs de transcription régulent un nombre variable des gènes allant de 1 à plusieurs centaines. Cela permet de réguler de façon synergique l'expression d'un ensemble de gènes d'une même voie métabolique. Parmi ce grand nombre de facteurs de transcription, il existe sept facteurs généraux de la transcription (Lrp, IHF, Fis, FNR, CRP, ArcA et NarL) qui régulent près de la moitié des gènes d'*E. coli*.

1.3.1.2.1) Les activateurs transcriptionnels

Ces facteurs de transcriptions vont agir de manière positive sur l'initiation de la transcription en se liant au promoteur ou à l'ARN polymérase afin de faciliter leurs activités. Les différentes études réalisées autour de ces protéines ont permis d'identifier 3 classes d'activateurs transcriptionnels :

- L'activateur de classe 1 se lie à son opérateur en amont de l'élément « -35 » du promoteur cible et favorise le recrutement de l'ARN polymérase par des interactions avec sa sous-unité α et plus particulièrement l' α -CTD [64].
- L'activateur de classe 2 favorise le recrutement de l'ARN polymérase en améliorant la reconnaissance du promoteur par le facteur σ . L'activateur interagit avec son opérateur présent au niveau de l'élément « -35 » du promoteur cible et avec le domaine σ^4 du facteur sigma [65].
- L'activateur de classe 3 remodèle l'architecture du promoteur. Il se lie à son opérateur qui est situé entre les éléments « -35 » et « -10 » du promoteur et réorganisée ce dernier afin d'optimiser la distance séparant ces deux éléments [66].

Introduction

1.3.1.2.2) *Les répresseurs transcriptionnels*

À l'inverse des activateurs transcriptionnels, les répresseurs, en se liant au promoteur ou à l'ARN polymérase, vont inhiber l'initiation de la transcription. Ces derniers vont agir de différentes manières afin d'exercer leurs activités répressives :

- En se liant à son opérateur, le répresseur va empêcher l'ARN polymérase de se lier au promoteur par des phénomènes d'encombrements stériques [67].
- À l'inverse des activateurs de classe 3, la fixation du répresseur sur son opérateur modifie l'architecture du promoteur et ainsi diminuer l'affinité du facteur σ pour ce dernier [68].
- La fixation du répresseur sur son opérateur bloque la liaison d'un activateur à sa cible et ainsi inhiber son activation [68].

Les promoteurs peuvent avoir un certain nombre d'opérateurs et donc être régulés par plusieurs facteurs de transcriptions différents. Cette pléiade de possibilités permet de moduler l'expression d'un gène de multiples manières, soit de façon coopérative, synergique ou antagoniste. Ces situations complexes permettent d'adapter le niveau d'expression d'un gène en réponse à un ou plusieurs signaux environnementaux.

1.3.2) **Régulation de la terminaison de la transcription :**

À juste titre, la régulation de la transcription se fait en grande partie au niveau de l'initiation. Mais il existe également des mécanismes précis qui permettent de moduler l'expression d'un gène en aval du processus d'initiation. Parmi ces mécanismes, la terminaison précoce de la transcription est une des stratégies utilisées par les bactéries.

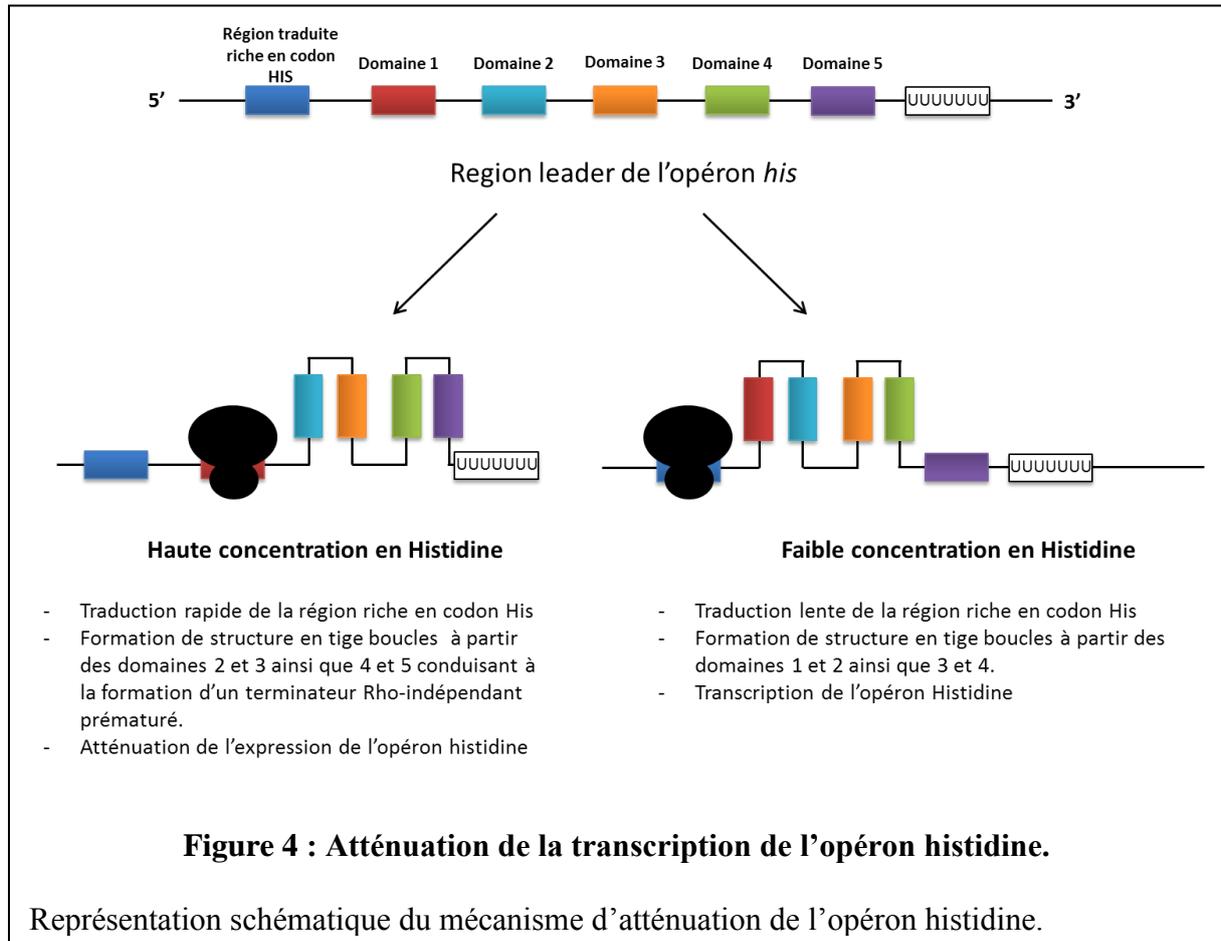
Au cours de l'évolution, les différents organismes ont mis en place un grand nombre de signaux permettant la régulation de la terminaison. Ces signaux peuvent être classés en deux catégories bien distinctes : l'atténuation et l'anti-terminaison de la transcription [69].

1.3.2.1) Le phénomène d'atténuation de la transcription :

L'atténuation, ou terminaison prématurée de la transcription correspond au contrôle de la transcription d'un ou plusieurs gènes proches les uns des autres par la régulation de la terminaison. Ce mécanisme dépend de séquences d'ARN capables de former des structures alternatives nommées anti-terminateurs et terminateurs. Les deux structures, anti-terminatrice

Introduction

et terminatrice, partagent une partie de leurs séquences de sorte que leurs formations soient mutuellement exclusives [70-72].



La plupart des opérons impliqués dans la synthèse ou l'utilisation des acides aminés sont régulés au niveau transcriptionnel par ce type de mécanisme. D'ailleurs, ce type de mécanisme a été identifié lors de l'étude de l'opéron *trp* permettant la synthèse du tryptophane (Trp) chez *E.coli* ainsi que dans la régulation de l'opéron *his*, permettant la synthèse de l'histidine (His), chez *S. Typhimurium* [73,74]. Dans ces opérons, le phénomène d'atténuation est régulé par la concentration intracellulaire de leurs propres produits, dans ce cas, les acides aminés tryptophane et histidine respectivement. Cette régulation est caractérisée par la présence d'une région « leader » présente en amont du premier gène de l'opéron. Cette région « leader » contient une phase ouverte de lecture (ORF) permettant la synthèse d'un petit peptide ou peptide leader. Ce dernier contient plusieurs codons de l'acide aminé synthétisé par l'opéron. Dans le cas de l'opéron *his*, le petit peptide codé par la région leader contient sept codons His répétés en tandem [74]. Lorsque l'histidine est en excès dans la cellule, la traduction du peptide leader est couplée à la transcription de l'ARN. Ce couplage entraîne la formation d'un terminateur de la transcription Rho-indépendant qui inhibe la

Introduction

transcription du reste de l'opéron *his*. À l'inverse, lorsque la cellule est en pénurie d'histidine, le ribosome n'arrive pas à synthétiser le peptide leader, ce qui entraîne un découplage de la traduction et de la transcription. Ce découplage permet la formation de l'anti-terminateur. Cette structure inhibe la formation du terminateur intrinsèque et permet à l'ARN polymérase de continuer la transcription de l'intégralité de l'opéron *his* (Figure 4) [74].

1.3.2.2) L'anti-terminaison processive de la transcription

À la différence du phénomène d'atténuation, ce mécanisme agit sur le complexe d'élongation par des interactions directes avec des protéines ou des acides nucléiques. Ces modifications affectent la terminaison intrinsèque, mais peuvent également altérer l'activité de la protéine Rho. À l'inverse du phénomène d'atténuation, l'anti-terminaison est un mécanisme processif, c'est-à-dire que l'ARN polymérase peut résister à des terminateurs situés loin en aval du signal d'anti-terminaison. Ce mécanisme a été découvert, dans un premier temps, chez le phage λ . Par la suite, il a également été mis en évidence dans la régulation de certains opérons bactériens dont notamment les opérons *rrn* codant pour les ARN ribosomiaux et certains ARN de transfert (ARNt) [75-77]. Chez *E. coli*, la biosynthèse des ribosomes consomme environ 50 % de l'énergie disponible chez la bactérie en phase exponentielle de croissance [78]. La synthèse des ARN et des protéines composant les ribosomes doit donc être extrêmement bien régulée. De plus, malgré la présence de nombreux terminateurs Rho-dépendants et l'absence de traduction de ces ARN, ces opérons ne sont pas soumis au phénomène de polarité [79,80]. Cette absence de polarité transcriptionnelle peut être liée à un mécanisme d'anti-terminaison. Chez *E. coli*, l'anti-terminaison de la transcription fait intervenir les protéines NusA, NusB, NusG ainsi que la protéine ribosomale S10 (codé par le gène *nusE*) en plus de l'ARN polymérase. [81-83] Bien que ces protéines soient indispensables pour réaliser l'anti-terminaison, elles ne sont pas suffisantes [84,85]. Ceci indique qu'il existe d'autres facteurs intervenant dans ce mécanisme [86]. L'étude de l'opéron *rrn* a pu mettre en évidence deux structures conservées composées d'une séquence conservée de 12 nucléotides (UGCUCUUUAACA) nommée BoxA, localisée entre les gènes codant les ARNr 16S et 23S. La seconde séquence nommée BoxB forme une structure en tige-boucle, présente à 10nt en aval du promoteur P2 de l'opéron *rrn* [87]. NusB reconnaît la séquence BoxA et s'y fixe grâce à la protéine S10 [88]. Ceci initie la création d'un complexe multiprotéique qui va stabiliser le complexe d'élongation et former le complexe d'anti-terminaison. Ce nouveau complexe peut maintenant franchir les terminateurs Rho-dépendants,

mais pas les terminateurs intrinsèques [89,90] **Le facteur de terminaison de la transcription Rho**

Le facteur de terminaison de la transcription Rho a été découvert en 1969 à partir d'un extrait bactérien par Roberts JW. Il a, dans un premier temps, été identifié comme un facteur protéique capable de modifier la taille de transcrit d'ARN du phage λ au cours de synthèse *in vitro* [75]. De nombreuses études ont suivi cette découverte du facteur Rho et ont permis de mettre en évidence son rôle dans la terminaison de la transcription d'un grand nombre d'ARN [49,56,91]. Le facteur Rho est une protéine très bien conservée et est présente dans environ 90 % des espèces bactériennes séquencées [92]. Pourtant il existe des différences sur la nécessité de ce facteur entre ces différentes espèces. En effet, le facteur Rho est une protéine essentielle chez *E. coli* et *S. Typhimurium*, il en est tout autre chez *B. subtilis* et *S. aureus* où cette même protéine peut-être supprimée sans engendrer une mort cellulaire [13,93-96]. Cette différence de sensibilité au facteur Rho ne semble pas être dû à une différence de fonction puisque des expériences de complémentations ont montré que le facteur Rho de *S. aureus* est capable de remplacer ce même facteur chez *E. coli* [96].

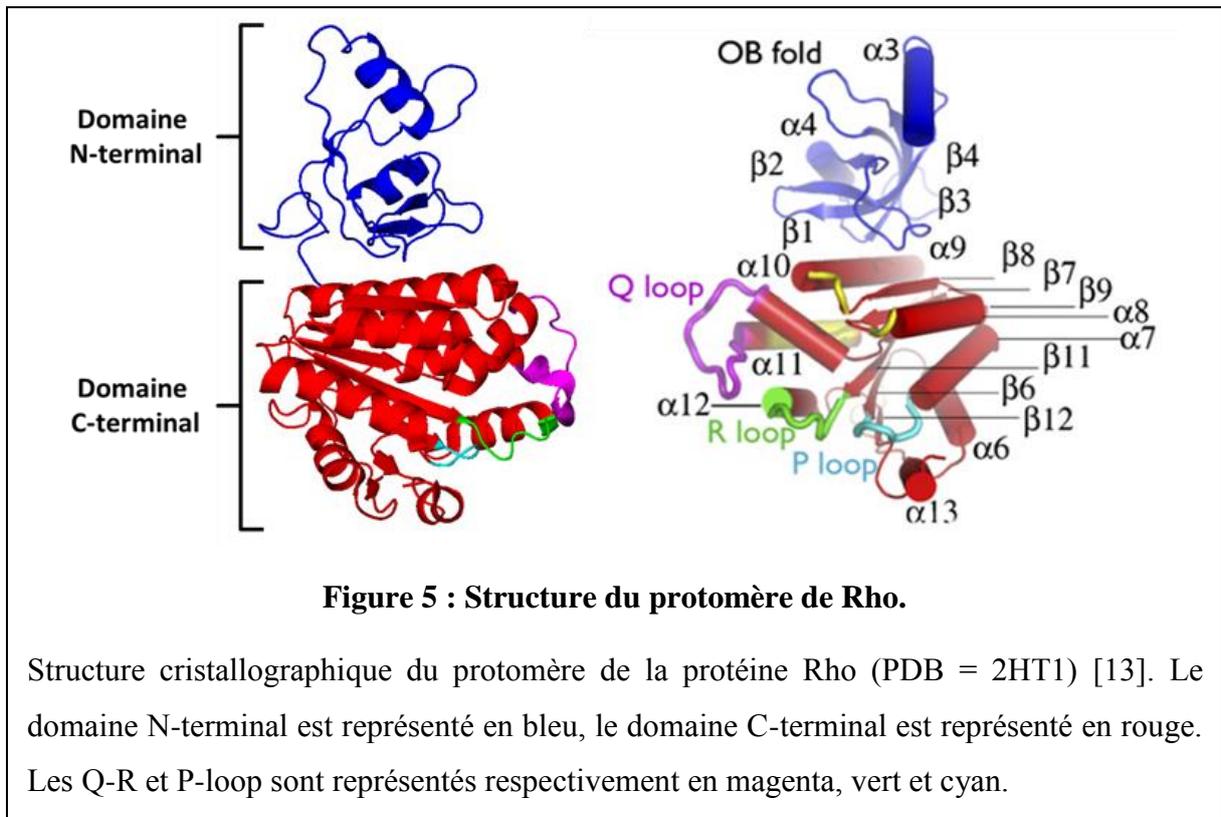
Au cours de ce chapitre, nous allons analyser le facteur Rho ainsi que sa fonction.

2.1) Structure

Bien avant l'obtention de structure cristallographique de la protéine Rho, les études, à partir de l'image obtenue à l'aide d'un microscope électronique, ont montré que la protéine Rho forme un hexamère dont les différentes sous-unités forment un anneau de 120Å de diamètre doté d'un pore central d'une taille de 30Å (Figure 6) [97,98]. Par la suite, le séquençage du gène *rho* a permis de mieux appréhender la structure ainsi que certaine propriété physico-chimique de la protéine [99]. Rho est une protéine de 419 acides aminés et est composé de deux domaines fonctionnels distincts, le domaine N-terminal et le domaine C-terminal, relié par un linker [100,101]. Le domaine N-terminal, correspondant aux 130 premiers acides aminés de la protéine, a pour fonction la liaison de la protéine à l'ARN (Figure 5) [102,103]. Ce dernier possède des motifs similaires à ceux qui peuvent être trouvés dans différentes classes de protéines se liant à l'ARN [51]. Le domaine C-terminal, constitué des 268 derniers acides aminés, interagit également avec l'ARN mais possèdent également

Introduction

une fonction ATPase, indispensable à son rôle dans la terminaison de la transcription (Figure 5) [104-106].



L'obtention de la structure cristallographique de la protéine Rho a confirmé et complété les différentes informations obtenues au cours des précédentes études et a ainsi offert une meilleure compréhension de la structure et de la conformation de la protéine Rho [26]. La cristallisation du domaine N-terminal a permis de mieux comprendre son organisation ainsi que sa fonction. Notamment la structure des 50 premiers résidus qui sont organisés dans une série de 3 hélices α terminée par un tonneau β caractéristique des motifs «OB» (oligosaccharide/oligonucleotide-binding) [107]. Le domaine C-terminal possède, quant à lui, différents motifs structuraux présentant différentes caractéristiques. Le premier de ces motifs structuraux est homologues à ceux retrouvés dans différentes ATPases [108]. Il s'agit de la P-loop qui est formée entre le feuillet $\beta 6$ et l'hélice $\alpha 7$ [59]. Ce domaine possède également un site secondaire d'interaction aux ARN (ou SBS : « Secondary RNA Binding Sites ») constitués de deux motifs structuraux : Q et R-loops [109].

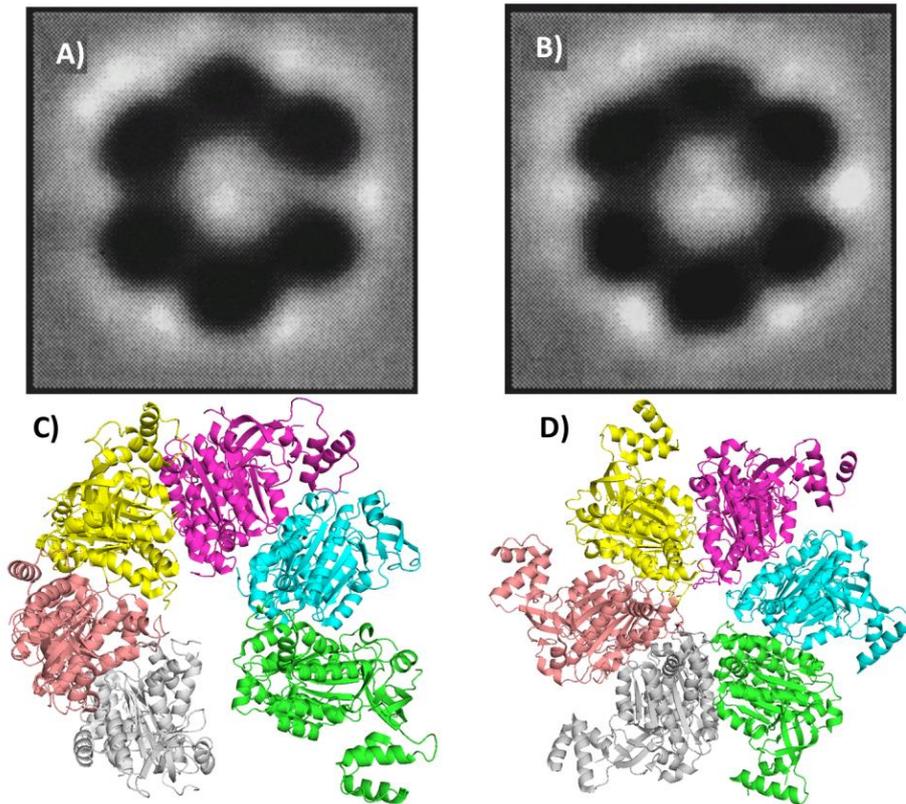


Figure 6 : Structure de l'hexamère de la protéine Rho.

Les différentes formes de la structure de l'hexamère de la protéine ont été obtenues à partir de différentes techniques, mais présentent des résultats similaires. A-B : Images obtenues à partir d'un microscope électronique de l'hexamère de la protéine Rho sous forme d'un anneau ouvert A) et d'un anneau fermé B) [25] . C-D, Structure cristallographique de l'hexamère de la protéine Rho sous forme d'un anneau ouvert C) (PDB = 1PV4) et d'un anneau fermé D) (PDB = 3ICE) [5,14,26]. Chacun des monomères est représenté avec une couleur différente.

Comme vu précédemment, Rho est une protéine fonctionnelle sous la forme d'homohexamère composé en trimères de dimères qui peut adopter différentes conformations en fonction de son ligand [13,14,26]. Lors de l'acquisition de la première structure quaternaire de Rho, il a pu être identifié un écart de 12Å entre les protomères A et F au niveau de pore central laissant ouvert la structure sous forme d'anneau (Figure 6 A et C) [26]. Cette ouverture permettrait le passage du transcrit d'ARN en cours de synthèse. Par la suite, une structure de la protéine Rho a été obtenue sous une forme d'anneau fermé (Figure 6 B et D) [13]. Cette modification de structure entraînant la fermeture de l'anneau de Rho serait due à une rotation de l'ensemble des sous-unités de la protéine [13]. Ces deux structures, ouvertes

Introduction

et fermées, confirmaient les résultats obtenus précédemment grâce à la microscopie électronique (Figure 6 A et B) [25]. La dernière structure obtenue de la protéine Rho présente une conformation différente pour ces différentes sous-unités [14]. Ensemble, ces différentes structures proposent différentes conformations que peut adopter la protéine en fonction de ses ligands.

2.2) Interaction de Rho avec l'ARN

Le facteur Rho est une protéine essentielle chez les entérobactéries intervenant dans la terminaison de la transcription de l'ARN. Ce mécanisme nécessite une interaction directe entre la protéine Rho et l'ARN en cours de transcription. De nombreuses études ont permis de mieux comprendre comment se font ces interactions.

Comme dit précédemment, le domaine N-terminal de la protéine Rho contient des motifs qui lui permettraient de se lier à l'ARN. Les structures du domaine N-terminal en présence ou en absence d'ARN ont mis en évidence la présence d'un motif «OB» caractéristique des domaines de liaisons aux ADN / ARN simple brin [107,110,111]. In vitro, Rho a démontré une forte affinité pour les séquences d'ARN poly(C) qui stimulent son activité ATPase [104]. L'obtention d'une structure cristalline du domaine N-terminal de Rho lié à un oligonucléotide composé de 9 cytosines a permis de mieux comprendre l'affinité de Rho pour ce type de séquences [110]. Différentes études utilisant de grandes variétés de substrats ARN ont permis de mieux comprendre les interactions entre Rho et l'ARN [110,112]. En particulier, l'étude de la terminaison de la transcription de deux ARNm ont permis d'avancer grandement dans la compréhension de ces interactions : les ARNm *trp t'* et λ *cro* [53,113-115].

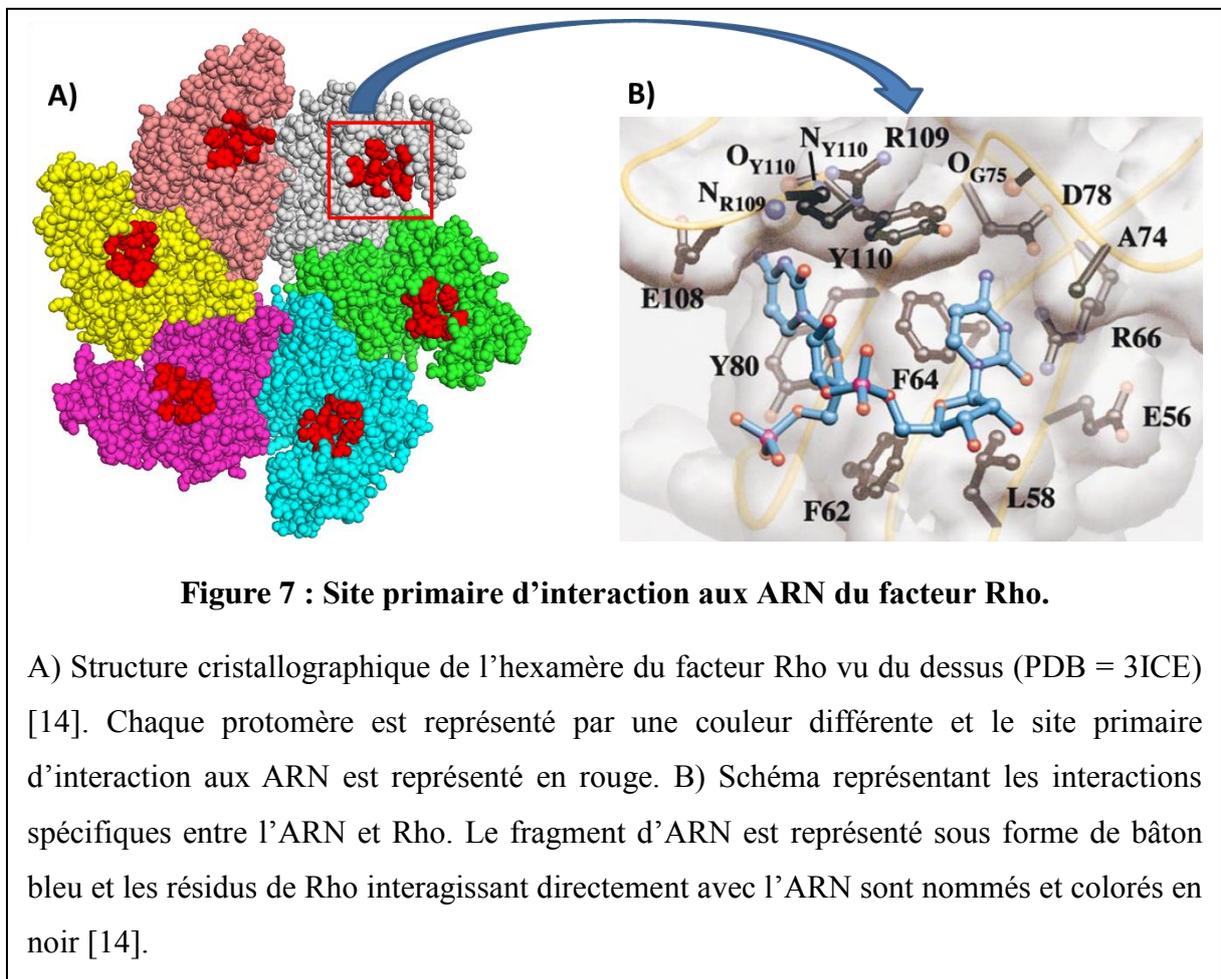
2.2.1) Les sites d'interactions de l'ARN sur Rho

Ces différentes informations ont permis de montrer que Rho possède en réalité deux sites de fixations des ARN, mais possédant différentes affinités pour ces derniers [112,116,117]. Ces deux sites sont nommés respectivement site primaire et site secondaire [116].

Le site primaire d'interaction aux ARN (ou PBS : « Primary RNA Binding Sites ») correspond au site caractérisé par le motif «OB». Ce dernier est présent dans le domaine N-terminal de chacun des protomères de Rho et permet la fixation d'environ 60 à 80nt d'ARN [51,118]. Il est composé des résidus 22 à 116 [58]. Les études des structures

Introduction

cristallographiques ont mis en évidence trois régions distinctes dans le domaine N-terminal qui forment le site d'interaction primaire. La première région est composée des résidus 58 à 62 dont la leu58 et la Phe62 qui forment une poche hydrophobe [110]. La seconde région est la boucle permettant la liaison entre les feuillets $\beta 3$ et $\beta 4$ [59]. La dernière région est composée des résidus 103 à 110 contenant également une poche hydrophobe composée des résidus Glu108, Arg109 et Tyr110 [59] (Figure 7). Les interactions entre ce site et l'ARN nécessitent la présence de pyrimidines et plus précisément de cytosines dans ce dernier [104,116]. De plus, il a également été montré que ce site pouvait fixer des séquences d'ADN simple brin, mais avec une affinité beaucoup plus faible que pour l'ARN simple brin [26,119,120].



Le site secondaire d'interaction aux ARN est, quant à lui, localisé au niveau du domaine C-terminal de chacun des protomères de Rho (Figure 8 A). Il est constitué de deux motifs structuraux nommés Q et R-loops [109]. Les différents motifs Q-loops, composés des résidus 282 à 292, sont présents sur la partie haute du domaine C-terminal et sont dirigés vers

Introduction

le centre de la protéine [26]. Les R-loops sont, quant à elles, composées des résidus 321 à 329 et sont impliquées à la fois dans l'hydrolyse de l'ATP et la liaison à l'ARN [121]. Les R-loops sont localisés à l'interface entre les protomères au niveau du domaine C-terminal proche du site de fixation de l'ATP. Des mutants de Rho au niveau des Q et des R-loops affectent le site secondaire d'interaction [59,109,117]. À l'inverse du site primaire, ce dernier n'est spécifique qu'aux séquences d'ARN simple brin bien qu'il est une plus faible affinité que le site primaire. Les interactions entre le site secondaire et les molécules d'ARN ne semblent pas nécessiter de nucléotides spécifiques [112,116]. Ces dernières se font sur une région de 8 nucléotides et sont essentielles pour l'induction de l'hydrolyse de l'ATP [116].

2.2.2) Le site d'interaction de Rho sur l'ARN

Environ 20 % de la terminaison de la transcription chez *E. coli* serait dépendante de l'action de la protéine Rho [48]. Cette terminaison s'initie lorsque Rho se lie, dans la majorité des cas, au niveau de la région terminatrice. Cette dernière n'est pas clairement définie, mais elle serait composée de deux éléments distincts sur une région d'ARN d'une taille de 150 à 200nt. La première séquence est le site « *rut* » (Rho Utilization) [50]. La seconde séquence est le site de terminaison de la transcription à proprement parler également nommée *tsp* (Transcription Stop Point) [57].

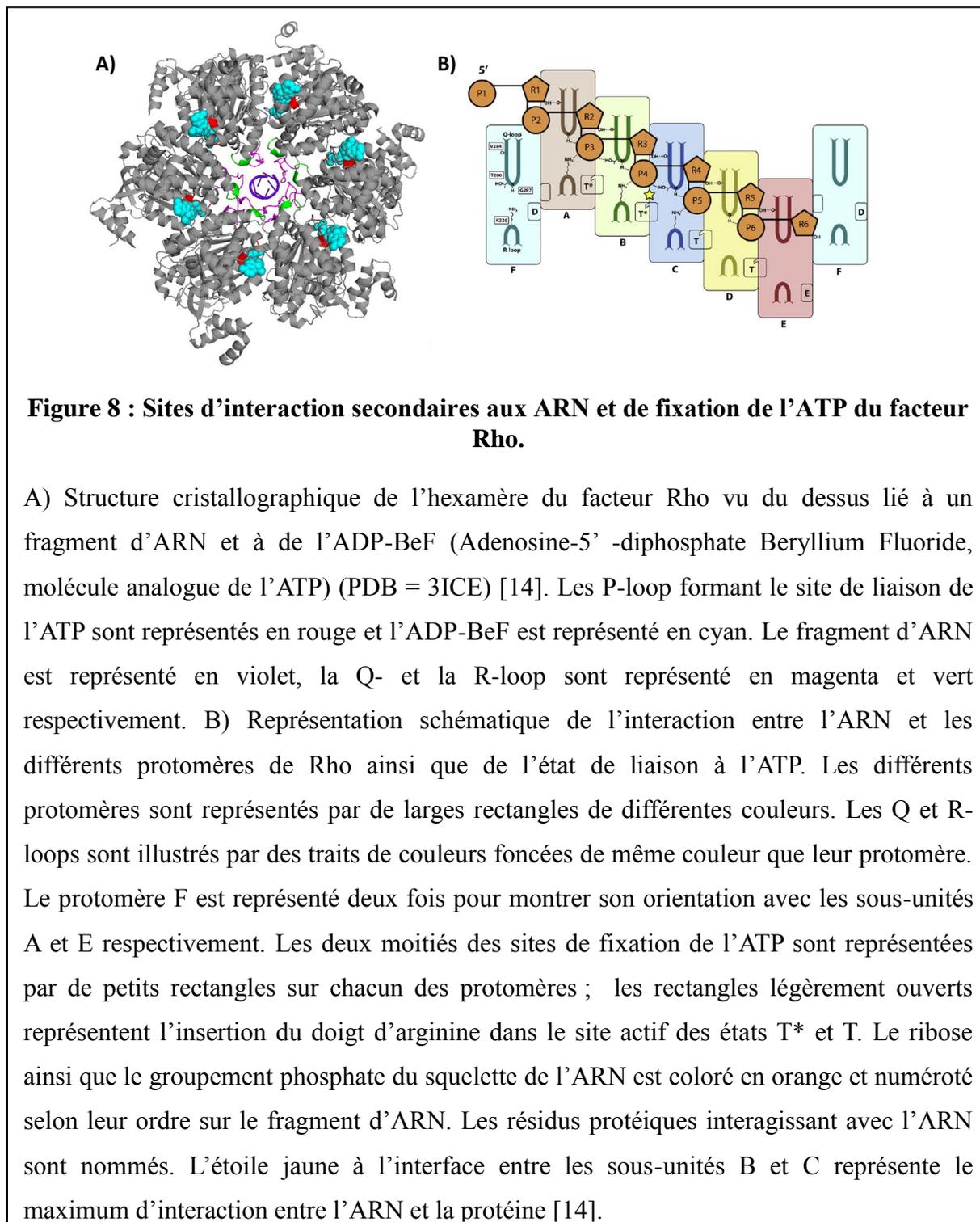
2.2.2.1) Le site *rut*

Bien que le site *rut* ne soit pas encore une séquence clairement définie, plusieurs éléments communs aux sites *rut* ont pu être caractérisés par les différentes études réalisées sur différents sites connus. Le site *rut* possède le plus souvent une taille de 70-80 nucléotides ayant un fort rapport cytosine (C) : guanine (G), peu ou pas de structure secondaire et dépourvue de ribosome [51-56]. Bien que ces éléments permettent d'identifier une grande partie des sites *rut*, certaines composantes restent relativement variables en fonction des sites *rut*, ce qui rend difficile le fait de définir clairement ce type de site. Par exemple, la taille du site est un élément très variable pouvant aller du simple au double en fonction des sites *rut* étudiés. Les études de protection de l'ARN contre l'activité de la RNase A ont montré que Rho protège un fragment de 70-80nt d'un polymère poly(C) et de l'ARNm *trp t'* [118,122]. A contrario, il a également pu être montré que les 44nt définissant le site *rut* de l'ARNm *λtR1* permettent l'induction d'une terminaison de la transcription Rho-dépendante *in vitro* [50,123]. Différentes études ont tenté de mieux caractériser les résidus cytosine essentiels pour

Introduction

l'induction de la terminaison Rho-dépendante dans les sites *rut*, mais n'ont pu clairement identifier ces derniers [124,125].

Ces différents résultats semblent indiquer que le site *rut* est défini comme une séquence d'ARN suffisamment longue pour être reconnu par Rho, contenant peu de structure secondaire et un fort ratio C:G.



Introduction

2.2.2.2) Le site de terminaison de la transcription

Si le site *rut* correspond au site de fixation de Rho sur l'ARNm en cours de synthèse, le site de terminaison de la transcription correspond comme son nom l'indique au site de relargage du transcrit. Bien que ce site soit connu, il est très difficile de la caractériser et pour l'instant, la seule définition existante est qu'il s'agit d'une ou plusieurs séquences d'ARN en aval du site *rut* et induisant une pause du complexe d'élongation [50,52,126].

Des études ont pu montrer qu'il existe un couplage cinétique entre Rho et le complexe d'élongation [127]. Ce couplage cinétique est induit par le fait qu'une fois l'ARN au niveau du site *rut*, Rho doit rejoindre par translocation le complexe d'élongation qui lui continue la transcription de l'ARNm afin d'effectuer le relargage du transcrit. La présence de sites de pauses aux niveaux des tsp permettrait de ralentir le complexe d'élongation et ainsi de permettre au facteur Rho de rattraper ce complexe. Les différentes études réalisées sur les sites tsp ont pu montrer que ces derniers ne sont pas responsables de la spécificité de la terminaison Rho-dépendante. Bien qu'ils soient indispensables pour la terminaison, ils peuvent être remplacés par d'autres séquences induisant des pauses transcriptionnelles [57].

Ces différents résultats semblent indiquer que le site *rut* est l'élément essentiel des terminateurs Rho-dépendant. Le site de terminaison de la transcription est, quant à lui, moins important et peut-être aisément remplacé tant que la séquence contient un site permettant d'induire une pause du complexe d'élongation.

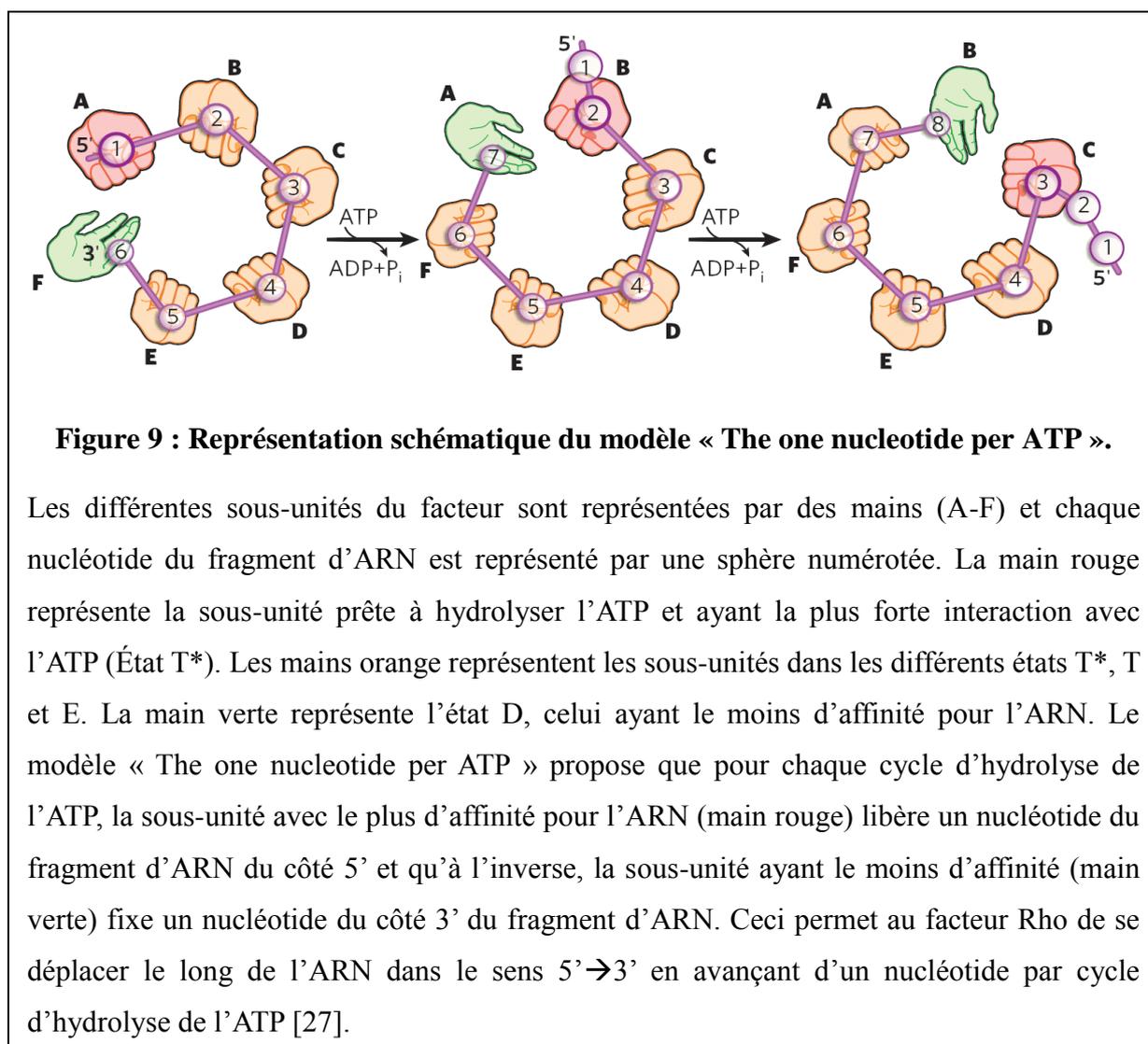
2.3) Activité ATPase de Rho

Le site de fixation de l'ATP est localisé à l'interface des domaines C-terminaux des différents protomères et il est composé des résidus 167 à 419 [108]. Rho est capable d'hydrolyser n'importe quelle NTPs, mais son efficacité est maximale pour l'ATP [104]. Il possède les caractéristiques des motifs Walker A et B qui sont retrouvées dans les autres ATPases [26,128]. Le motif Walker A, connu également comme le motif structural P-loop, est constitué de la séquence consensus G/AXXXGKT/S où X correspond à n'importe quel acide aminé. Le motif Walker B a pour séquence consensus $\phi\phi\phi\phi$ D où ϕ représente un acide aminé hydrophobe [128]. Ces motifs aident à la liaison et au positionnement de l'ATP dans le site de liaison.

Les études des homologies de structure ainsi que les analyses phylogénétiques indiquent que Rho est un membre de la superfamille des NTPases à P-loop. Il possède de

Introduction

nombreuses homologues de structure du domaine de liaison à l'ATP comme la F1 ATP synthase, RecA ou de PspF qui sont toutes des ATPases et des moteurs protéiques [129-131]. Rho possède également des homologues de structure avec d'autres hélicases hexamériques comme RuvB et DnaB chez *E.coli* ou la T7 DNA hélicase [132]. Toutes ces protéines font partie de la superfamille des NTPases à P-loop et possèdent des homologues de structures avec Rho [133].



Les études cristallographiques de Rho lié à l'ATP ont pu montrer que chacun des monomères possède 1 site de liaisons à l'ATP et qu'ils sont également liés à l'ARN (Figure 8B) [14]. Ces sites peuvent-être divisés en différents états dépendant de la conformation de la protéine : un état très stable (T*) et 3 états moins stables (T, D et E). L'état T* est une conformation prise par deux sous-unités de Rho dans lesquels l'hydrolyse de l'ATP peut se faire. Cette conformation est stable et lie fortement à la fois l'ATP. L'état T est une

Introduction

conformation prise par deux sous-unités de Rho lorsque ces derniers sont liés à l'ATP. L'état D est une conformation prise lorsque l'hydrolyse a eu lieu et que le site est lié au produit de dégradation de l'ATP. Le dernier état, l'état E, correspond à une conformation où le site de liaison à l'ATP est libre. De plus, les états des sites de liaison à l'ATP qui le lient très fortement (T*) sont également liés fortement à l'ARN. À l'inverse, les sites de liaison à l'ATP faible sont faiblement liés à l'ARN [27]. La transition entre ces différents états serait due à des changements de conformation qui modifieraient les positions des boucles Q et R des sous-unités adjacentes et induiraient des changements allostériques des sites de liaison de l'ARN. Ces modifications de la structure de Rho sont en corrélation avec le modèle proposé : « the one nucleotide per ATP » (Figure 9) [14]. Ce modèle propose que l'hydrolyse de l'ATP se déroule dans un ordre précis et que Rho remonte l'ARN à raison d'un nucléotide par molécule d'ATP hydrolysé.

2.4) Activité Hélicase de Rho

Comme nous avons pu le voir précédemment, Rho possède de nombreuses homologues de structures avec différentes hélicases d'*E.coli* ou de bactériophage [132]. Rho possède une activité hélicase ARN dépendante de l'hydrolyse de 3 molécules d'ATP [60]. Cette activité permet, *in vitro*, la dissociation d'un complexe ADN : ARN en aval d'un site *rut* [49]. Rho se déplace sur l'ARN simple brin dans le sens 5' → 3' jusqu'à atteindre le complexe d'élongation [134].

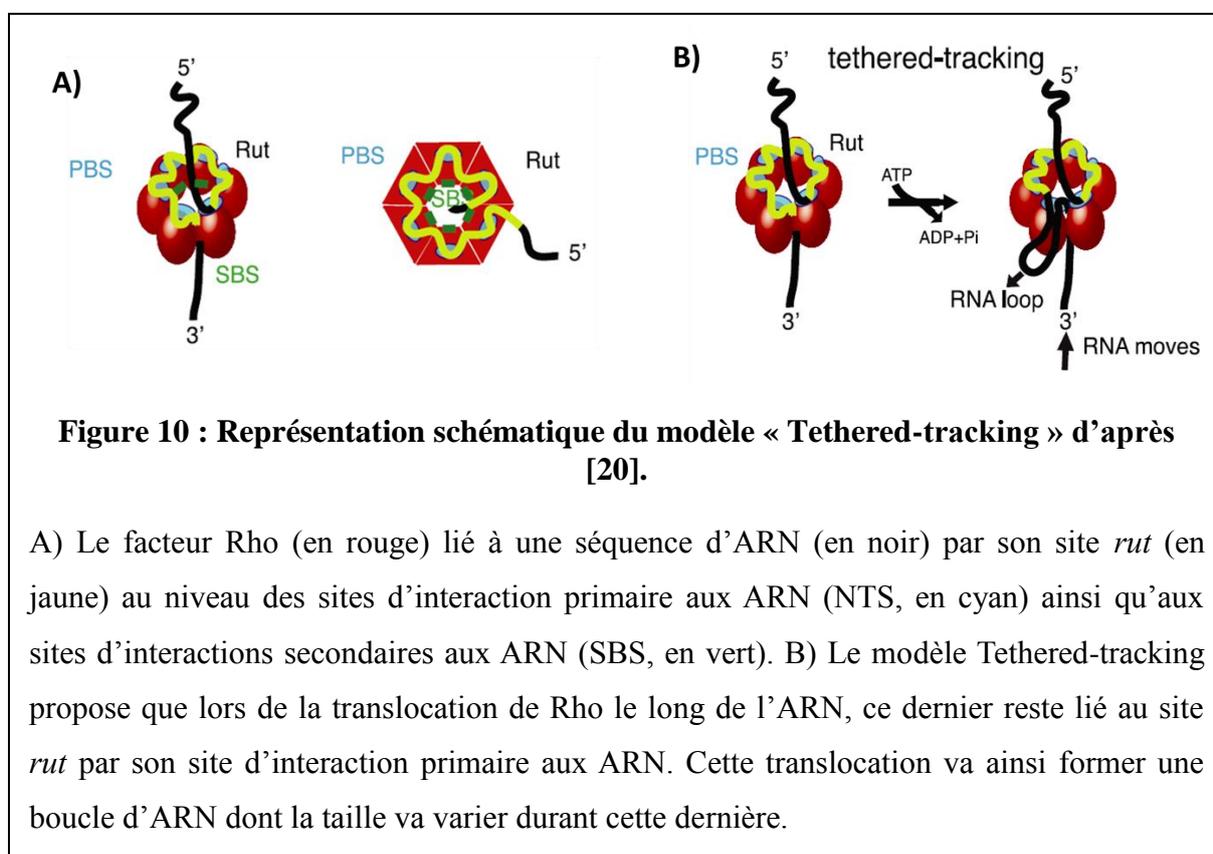
Rho, lors de sa translocation sur le brin d'ARN, est capable d'outrepasser les structures secondaires de l'ARN sur le transcrit naissant [135]. Ces structures vont, par contre, altérer la vitesse de translocation de la protéine. En effet, la présence de ces structures secondaires en aval du site *rut* influence négativement cette vitesse [53]. Rho est également capable, au cours de sa translocation, de désagréger, de façon ATP-dépendante, un complexe streptavidine lié à un ARN biotynilé [136]. Rho est donc capable de dissocier différents complexes liés de manière non covalente à l'ARN en cours de transcription. Ces différentes informations permettent de suggérer que l'activité hélicase de Rho aurait un rôle dans la dissociation du complexe d'élongation de l'ARNm en cours de synthèse.

2.5) Modèle de terminaison Rho-dépendante

La terminaison Rho-dépendante est un mécanisme complexe qui se déroule en différentes étapes. Bien qu'une grande partie de la terminaison soit actuellement plutôt bien

Introduction

comprise, il reste encore plusieurs zones d'ombres. Il existe de nombreux modèles permettant d'expliquer la terminaison Rho-dépendante. Au cours de ce chapitre, le modèle global qui vous sera proposé se basera sur deux modèles en relation avec la translocation de Rho sur l'ARN. Ces modèles sont « the one nucleotide per ATP » ainsi que le modèle « Tethered-tracking » [14,137]. Le modèle « the one nucleotide per ATP » propose qu'à chaque cycle d'hydrolyse de l'ATP, la sous-unité ayant la plus forte affinité pour l'ARN (État conformationnel T*) libère un nucléotide du côté 5' de l'ARN et interagit avec un nucléotide du côté 3' de l'ARN (Figure 9) [27]. Le modèle « Tethered-tracking » propose, quant à lui, que lors de la translocation de Rho sur l'ARN, ce dernier reste lié au site *rut* au niveau de ses sites d'interaction primaire à l'ARN (Figure 10) [20,137].



Au cours de la transcription, le complexe d'élongation peut transcrire une séquence d'ARN ayant un fort ratio C:G présentant peu ou pas de structure secondaire : le site *rut*. Le facteur Rho, dans une conformation d'anneau ouvert, va reconnaître le site *rut* et se lier à ce dernier grâce à ses sites d'interaction primaire à l'ARN présents dans le domaine N-terminal de la protéine. Ces interactions vont permettre de positionner l'ARNm en cours de transcription au centre de l'anneau afin de favoriser les interactions avec les sites d'interactions secondaires présent au niveau du domaine C-terminal de Rho [58]. Ces

Introduction

interactions avec les sites secondaires vont entraîner l'hydrolyse de molécules d'ATP de manière séquentielle qui vont permettre une série de changement conformationnel de la protéine et conduire ainsi la fermeture de l'anneau [60]. Ces changements vont également activer la fonction ATPase de la protéine [14]. À cet instant, Rho est sous une forme d'anneau fermé avec l'ARNm en cours de synthèse passant en son centre. Cet ARNm est lié de manière stable à Rho par son site *rut* qui interagit avec les sites d'interaction primaire de la protéine. La région d'ARN en aval du site *rut* est, quant à elle, liée de manière non spécifique aux sites d'interactions secondaires (Figure 10). Les protomères de Rho ont pris des conformations différentes en fonction de leurs états par rapport à l'ATP (T*, T, D et E) (Figure 9 B et 10). L'hydrolyse de l'ATP va se faire de manière séquentielle permettant ainsi de fournir l'énergie permettant la translocation de Rho le long de l'ARNm à raison d'un nucléotide par ATP consommé (Figure 9). Rho va donc se déplacer le long de l'ARNm en cours de synthèse tout en maintenant sa liaison avec le site *rut* par son site d'interaction primaire. Cette translocation dans le sens 5'→3' va continuer le long du transcrit jusqu'à ce que Rho rattrape le complexe d'élongation arrêté au niveau du site de terminaison de la transcription.

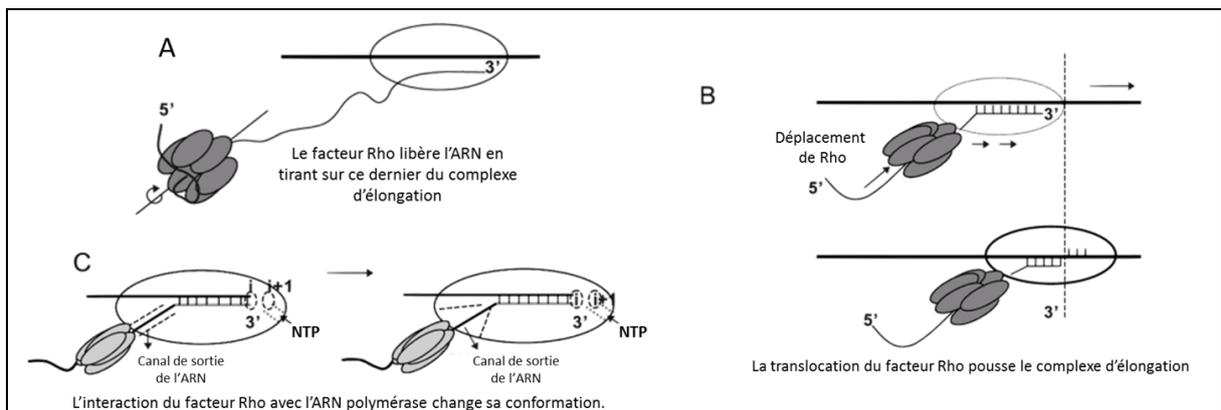


Figure 11: Représentation schématique des différents modèles de terminaison Rho-dépendante d'après [8].

A) Représentation schématique du modèle « RNA spooling », le facteur Rho tire l'ARN en cours de transcription en le tirant du complexe d'élongation. B) Représentation schématique du modèle «Hyper translocation», le complexe d'élongation va être déplacé le long du brin d'ADN par la translocation du facteur Rho. C) Représentation schématique du modèle «allosteric», l'interaction du facteur Rho avec l'ARN polymérase entraîne une modification de la conformation de l'ARN polymérase entrainant la dissociation du complexe d'élongation.

Introduction

Lorsque Rho entre en contact avec le complexe d'élongation, il va entraîner la dissociation de ce dernier. Les détails précis permettant d'expliquer cette étape restent encore largement inconnus même si l'action de certaines protéines tierces a pu être démontrée dans des cas spécifiques [138,139]. La dissociation du complexe d'élongation permet à Rho d'initier la dernière étape de la terminaison Rho-dépendante. Cette dernière consiste à libérer l'ARNm transcrit en le tirant du complexe hybride ADN-ARN grâce à son activité hélicase [55,140]. Ici aussi, plusieurs modèles ont été proposés afin d'expliquer cette étape (Figure 11). Le modèle « RNA spooling » propose que Rho extrait l'ARN du complexe d'élongation en utilisant l'énergie issue de son activité ATPase pour séparer l'hybride ADN-ARN (Figure 11 A) [26]. Le modèle « Hyper translocation » propose que la translocation de Rho puisse pousser le complexe d'élongation de long de l'ADN matrice sans que ce dernier puisse transcrire la séquence d'ARN complémentaire (Figure 11 B). Ceci permet à Rho d'avoir accès à l'hybride ADN-ARN [141]. Le modèle « allostérique » propose que Rho modifie le site catalytique de l'ARN polymérase par des changements allostériques entraînant la dissociation du complexe d'élongation. Pour ce faire, Rho entre dans l'ARN polymérase où il va entraîner la dissociation de l'hybride ADN-ARN et des changements conformationnels qui vont engendrer l'inactivation du complexe d'élongation et sa dissociation de l'ADN matrice (Figure 11 C) [142].

3. La traduction

La traduction est le processus cellulaire permettant la synthèse fidèle d'une protéine à partir d'un ARNm. Les protéines jouent un grand nombre de rôles au sein de la cellule, que ce soit au niveau des processus permettant la reconnaissance de l'environnement, des réponses au stress et de bien d'autres mécanismes. La traduction est un mécanisme essentiel à la survie cellulaire. En effet, lors d'études sur les génomes minimaux permettant la survie d'un organisme, une grande majorité des 60 gènes essentiels est liée à des protéines impliquées dans la traduction dont des homologues ont été identifiés dans toutes les branches de l'arbre du vivant [143]. Les ribosomes traduisent l'ARNm par triplets de nucléotides, également appelés codons.

La traduction, comme la transcription, est un processus qui peut être découpé en trois étapes : initiation, l'élongation et la terminaison. Ces différentes étapes font intervenir un grand nombre de molécules qui permet de réaliser une synthèse protéique.

3.1) Les acteurs de la traduction,

3.1.1) L'Acide RiboNucléique messenger

Comme nous l'avons vu précédemment, l'ARNm est synthétisé à partir d'une séquence d'ADN codante. Il s'agit d'une molécule simple brin permettant le passage de l'information entre l'ADN et les protéines. La synthèse de l'ARNm ne copie pas seulement la séquence codante de l'ADN permettant la synthèse de la protéine, mais également une partie des régions en amont et en aval de cette dernière. D'ailleurs, l'ARNm peut être divisé en 3 régions ayant des fonctions distinctes :

- La région 5' UTR (Région 5' non traduite) contient des éléments de séquences qui permettent l'initiation de la traduction, sa régulation ou encore qui intervient sur la stabilité de l'ARNm
- La région codante contenant une ou plusieurs (dans le cas des opérons) séquences codante (ORF pour « Open Reading Frame ») permettant la synthèse de la (ou des) protéine (s) codée (s) par cet ARNm. L'ORF est défini par deux éléments principaux. Le codon initiateur permettant le début de la traduction par le ribosome et le codon terminateur.

Introduction

- La région 3' UTR (Région 3' non traduite) contient dans la majorité des cas des éléments régulateurs.

Les ARNm, contrairement aux protéines et à l'ADN, sont des molécules extrêmement instables. Chez *E. coli*, la durée de vie de ces derniers peut aller de quelques secondes à plus d'une heure, mais il est généralement plus court que le temps de doublement bactérien [144]. Cette courte durée de vie des ARNm fait partie des mécanismes permettant aux bactéries de répondre rapidement aux changements de conditions environnementales.

3.1.2) Le ribosome

Le ribosome est la macromolécule au cœur de la traduction. Il a été découvert en 1955 par des techniques de microscopie électronique [145]. Il s'agit d'une ribonucléoprotéine complexe, c'est-à-dire qu'il est composé d'ARNr (ARN ribosomiaux) et de protéines. Le ribosome a une taille d'environ 200 Å de diamètres et est présent en grande quantité (environ 15 000 ribosomes / cellule) représentant environ 25 % de la masse totale d'*E. coli* [146,147]. Sa vitesse de synthèse est estimée à 6 – 20 acides aminés / seconde avec un taux d'erreur de 1 sur 10 000 [148,149]. Il est composé de deux différentes sous-unités. La première sous-unité ou petite sous-unité 30S est composée de l'ARNr 16S et de 21 protéines ribosomiales (S1 à S21) (Figure 12). La seconde sous-unité, nommée grande sous-unité 50S, est constituée des ARNr 23S et 5S ainsi que de 34 protéines ribosomiales (L1 à L34) (Figure 12). La structure des ribosomes est connue depuis 1968 [150,151] et sa structure cristallographique a été obtenue en 1983 [152-154].

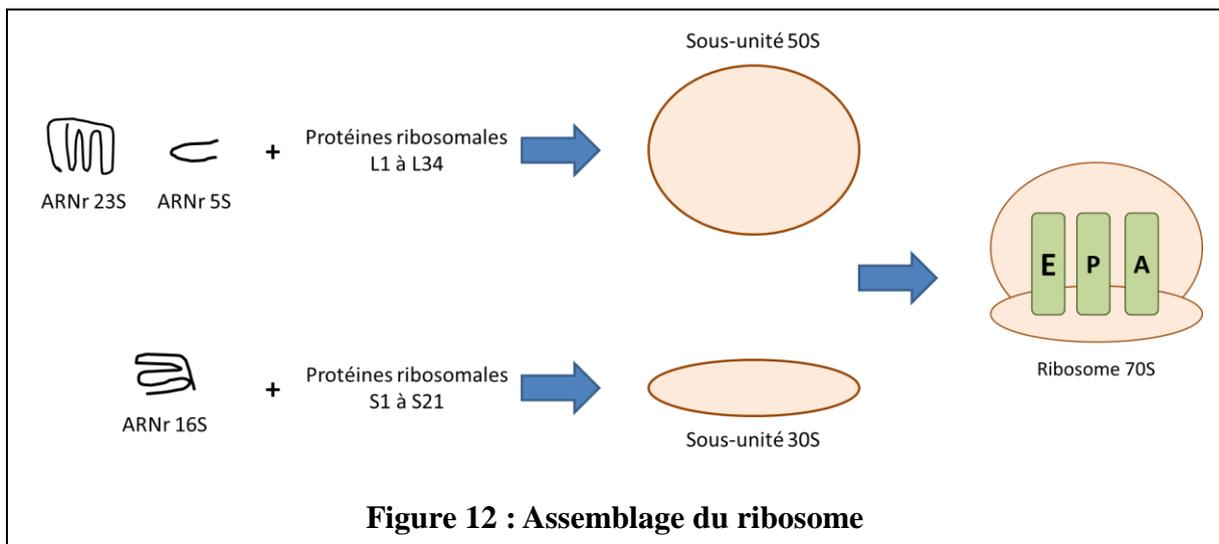


Figure 12 : Assemblage du ribosome

Introduction

Représentation schématique de l'assemblage des ribosomes. Les ARNr 23S et 5S ainsi que les protéines ribosomales L1 à L34 vont s'associer pour former la sous-unité 50S. L'ARNr 16S et les protéines ribosomales S1 à S21 vont également s'associer pour former la sous-unité 30S du ribosome. Les deux sous-unités du ribosome vont s'associer sur l'ARNm pour former un ribosome 70S fonctionnel. Le ribosome 70S possède trois sites permettant la synthèse des ARNm : le site A, P et E.

Synthétisé à partir des 7 opérons *rrn*, les trois ARNr (23S, 16S et 5S) proviennent d'un même transcrit qui est clivé et modifié de façon post-transcriptionnelle. Ces ARNr ont un grand nombre de séquences courtes complémentaires qui leur permet d'être structurés par des repliements de façon extrêmement précise [155]. Les 52 protéines ribosomales sont codées par une vingtaine d'opérons localisés à 14 loci différents sur le chromosome d'*E. coli* [156]. L'expression de ses protéines est majoritairement régulée au niveau traductionnel. Lorsque la quantité de protéine ribosomale est trop importante, ces dernières inhibent leurs propres traductions et entraînent une diminution de la demi-vie de leurs ARNm [157,158].

La petite sous-unité 30S contient les sites de fixation des ARN de transfert (ARNt) et participe ainsi à la reconnaissance des codons présents sur l'ARNm. L'activité catalytique permettant la synthèse des protéines se trouve dans la grande sous-unité 50S. Cette région se nomme centre peptidyl-transférase et sa fonction est de former les liaisons peptidiques entre les acides aminés. La grande sous-unité 50S contient trois sites (A ou site Aminoacyl, P ou site Peptidyl et E ou site Exit) où se fixent ARNt porteurs des acides aminés pendant la traduction (Figure 12). Les ARNt transitent d'un site à l'autre par des changements de conformations du ribosome et des réactions biochimiques [159,160].

3.1.3) L'ARN de transfert

Dès 1955, Francis Crick prédisait l'existence de molécules adaptatrice permettant le passage de l'information génétique sous forme d'ARNm en protéine [161]. La molécule d'ARNt fut découverte trois ans plus tard et fut l'objet d'importantes études qui ont notamment permis la résolution de la structure tridimensionnelle de l'ARNt_{Phe} de levure au cours des années 1970 [162-165].

Les ARNt ont une taille moyenne de 76 nucléotides. L'enchaînement des nucléotides est spécifique à chaque ARNt et définit ainsi sa structure primaire. Après repliement, l'ARNt adopte une structure secondaire caractéristique extrêmement bien conservée sous forme « d'une feuille de trèfle ». Cette structure secondaire est formée de cinq régions distinctes.

Introduction

Parmi ces régions, la tige anticodon contient l'anticodon qui interagit avec le codon présent sur l'ARNm tandis que la tige acceptrice est liée à l'acide aminé correspondant à l'ARNt. La structure tridimensionnelle de l'ARNt présente une forme caractéristique en forme de « L » [162-165]. Ce repliement de l'ARNt permet de positionner le site de fixation de l'acide aminé et l'anticodon aux deux extrémités de la molécule.

Au cours de la traduction, les ARNt assurent la lecture des codons présents sur l'ARNm par l'intermédiaire de leurs anticodons au niveau des sites A et P du ribosome. Les 61 ARNt peuvent être divisés en trois catégories : l'ARNt initiateur, les 60 ARNt élongateurs et les 3 ARNt terminateur. Les 64 ARNt permettent d'apporter les 20 acides aminés naturels requis par les 64 codons résultant des différentes combinaisons de trois nucléotides écrits avec les bases A, U, C, G de l'ARNm. Ce code est dit dégénéré, car plusieurs codons codent pour un même acide aminé. Ils existent donc des ARNt portant le même acide aminé qui reconnaissent différents codons, ceux-ci sont appelés ARNt isoaccepteurs.

3.1.4) Autres facteurs :

Il existe également un grand nombre d'autres acteurs moléculaires (protéine ou ARN) impliquées dans le mécanisme de traduction.

- Les aminoacyl-ARNt synthétase (ou synthétases) sont des enzymes qui permettent de charger le bon acide aminé sur l'ARNt correspondant. Cette réaction étant spécifique pour chaque acide aminé, il existe donc autant de synthétases que d'acides aminés dans la cellule [166,167].
- Les facteurs d'initiation (IF-1 à 3) sont utilisés lors du démarrage de la traduction. Ils permettent de faciliter le recrutement du ribosome sur l'ARNm en stabilisant les interactions entre ces derniers [168].
- Le facteur d'élongation Tu (EF-Tu) se lie aux aminoacyl-ARNt afin de les stabiliser avant qu'ils n'interagissent avec le site A du ribosome [169].
- Le facteur d'élongation G (EF-G) est utilisé par le ribosome au cours de la translocation [169].
- Les facteurs de terminaison (RF1 à 3) reconnaissent les codons stop et permettent aux ribosomes de se dissocier de l'ARNm [170].
- Le facteur de recyclage des ribosomes (RRF pour «Ribosome Releasing Factor») permet la séparation des sous-unités ribosomales de l'ARNm à la fin de traduction.

Introduction

- Les protéines chaperonnes (DnaK, HtpG, ...) permettent de faciliter le repliement des protéines après leur synthèse.

- L'hydrolyse du GTP en GDP constitue la source d'énergie permettant la synthèse protéique. En moyenne, la liaison d'un acide aminé à la chaîne peptique consomme 4 molécules de GTP [171].

3.2) Mécanisme de la traduction

3.2.1) Initiation de la traduction :

L'initiation de la traduction commence par la reconnaissance du site de fixation des ribosomes (RBS) sur l'extrémité 5-UTR de l'ARNm par la sous-unité 30S (Figure 13). Ce dernier est composé de deux éléments distincts. Le premier élément est la séquence dite de « Shine-Dalgarno » (SD), complémentaire à l'extrémité 3' de l'ARNr 16S. Le second élément est le codon initiateur de la traduction. Il se situe une dizaine de nucléotides en aval de la séquence SD et correspond, dans la majorité des cas, au codon AUG, mais peut également être le codon GUG ou UUG [172,173]. Les facteurs IF1 et IF2 et l'ARNt initiateur (Aminoacyl ARNt_{finet}) s'associe au complexe ARNm / sous-unité 30S pour former le complexe de préinitiation 30S. Le facteur IF3 s'associe à la sous-unité 30S afin de l'aider à se lier à la séquence SD, de placer le codon d'initiation dans le site P de la sous-unité 30S du ribosome ainsi qu'en maintenant les sous-unités 30S et 50S dissociées tant que la sous-unité 30S n'est pas fixé à l'ARNm. Le facteur IF2 aide, pour sa part, l'ARNt initiateur à se lier à ce même site P tandis que le facteur IF1 bloque le site A de la sous-unité 30S [168,174]. Les différentes interactions, dont notamment l'interaction codon / anticodon, permettent de placer le ribosome dans le bon cadre de lecture. Par la suite, l'hydrolyse du GTP par IF2 et la séparation d'IF1 et IF3 du complexe permettent le recrutement de la sous-unité 50S et ainsi de former un ribosome entier et fonctionnel sur l'ARNm. Ce complexe contient l'ARNm, le ribosome contenant l'ARNt initiateur au niveau du site P et les sites A et E vides [175].

3.2.2) Élongation de la traduction

L'élongation correspond à l'étape d'incorporation des différents acides aminés dans la chaîne polypeptidique en croissance. Chaque cycle d'élongation consiste au recrutement d'un ARNt chargé par le ribosome de manière « codon spécifique », l'acide aminé correspondant

Introduction

est ajouté à la chaîne polypeptidique puis le ribosome se décale d'un codon sur l'ARNm, c'est-à-dire 3 nucléotides.

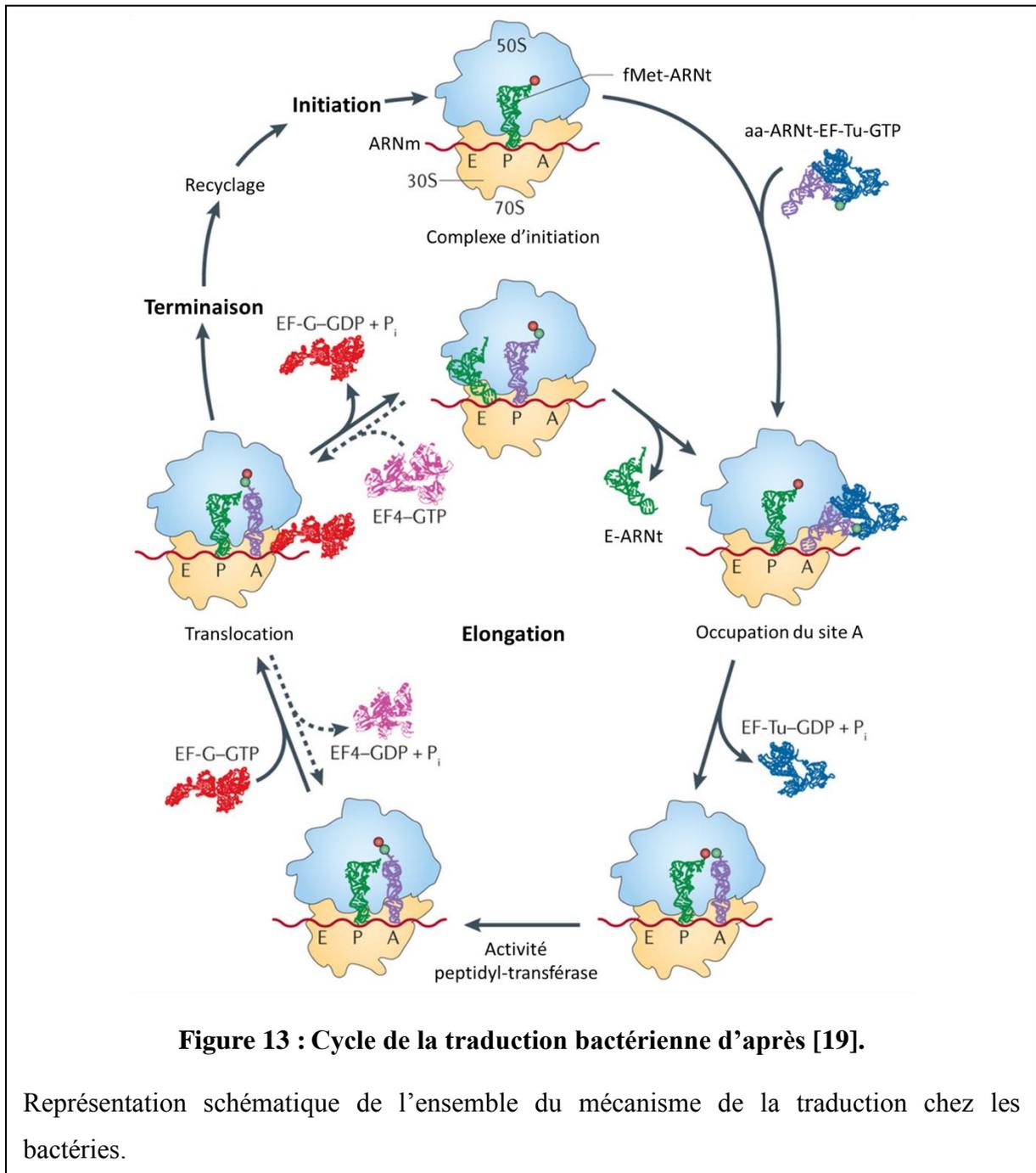


Figure 13 : Cycle de la traduction bactérienne d'après [19].

Représentation schématique de l'ensemble du mécanisme de la traduction chez les bactéries.

Au début du premier cycle d'élongation, le site P du ribosome est occupé par l'ARNt initiateur et le site A est vide. L'élongation commence par le recrutement dans le site A d'un aminoacyl-ARNt lié au facteur d'élongation EF-Tu-GTP dont l'anticodon est complémentaire du codon situé dans ce même site. Ce processus est médié par l'hydrolyse de GTP apporté par le facteur d'élongation EF-Tu. Une fois l'aminoacyl-ARNt en place sur le site A, il y a

Introduction

formation d'une liaison covalente entre l'extrémité amine de l'acide aminé porté par l'ARNt et l'extrémité carboxylée du peptide en cours de formation. Cette action est réalisée par le ribosome et ne requiert aucun facteur extérieur. Cette étape effectuée, la translocation de l'ARNm au sein du ribosome a lieu grâce au facteur EF-G et à l'hydrolyse d'une molécule de GTP. Ceci conduit le déplacement de l'ARNt déchargé du site P au site E et de l'ARNt avec la chaîne polypeptidique du site A au site P [176,177]. Ces différentes étapes se répètent jusqu'à l'arrivée d'un codon Stop présent sur l'ARNm dans le site A du ribosome qui déclenchera la terminaison de la transcription (Figure 13).

3.2.3) Terminaison de la traduction :

La terminaison intervient lorsqu'un codon stop arrive au niveau du site A du ribosome, et est reconnu par les facteurs RF1 ou RF 2. Les codons stop sont au nombre de trois : UAA reconnu par RF1, UGA et UAG reconnus par RF2. Lorsqu'un de ces codons arrive au niveau du site A, il n'est reconnu par aucun des ARNt, mais par un des facteurs RF1 ou 2. Ces molécules ressemblent aux ARNt, mais portent une molécule d'eau. Le facteur RF se place au niveau du site A et le ribosome induit une phase d'élongation qui permet la libération de la chaîne polypeptidique néo-synthétisée dans le cytoplasme. Aidé par le facteur RF déjà présent dans le ribosome, le facteur RF3 intervient ensuite afin d'accélérer la dissociation du ribosome. Finalement, les facteurs de recyclage assurent le recyclage des sous-unités du ribosome qui pourront être réutilisées pour produire une nouvelle protéine [170,178] (Figure 13).

3.3) Régulation de la traduction

La traduction est une étape très coûteuse en énergie pour la cellule. Afin de ne pas synthétiser une protéine inutile, la cellule a mis au point différents moyens de régulation pour contrôler l'expression des gènes. Comme nous l'avons vu précédemment avec la transcription, chaque étape de la traduction peut être régulée de manière très fine.

3.3.1) Régulation de l'initiation de la traduction

Plusieurs mécanismes permettent un contrôle fin de la synthèse de la protéine ou des protéines codée par un ARNm. Ce type de régulation peut avoir lieu en même temps que la transcription, c'est-à-dire de manière co-transcriptionnelle, ou une fois la transcription de l'ARNm achevée. La régulation de la traduction est dépendante d'éléments de séquence présents dans l'ARNm et/ou dépendante de liaison de différentes molécules (ARN, protéines,

Introduction

métabolites). Parmi les différentes étapes de la traduction, le démarrage est un des processus les plus complexes et représente une phase clé pour la régulation. En effet, inhiber ou activer la traduction permet de contrôler la quantité de protéines dans la cellule.

3.3.2) Protéine inhibitrice de la traduction

Il existe un grand nombre de protéines qui, en se liant à l'ARNm, altèrent sa traduction et/ou sa stabilité. La fixation d'une protéine sur l'ARNm peut entraîner sa dégradation par le recrutement de différentes ribonucléases [179]. Ce mécanisme peut également inhiber la traduction lorsque la protéine se fixe au niveau de la séquence SD. Ceci empêche la reconnaissance de cette dernière par la sous-unité 30S du ribosome et donc l'initiation de la traduction. Il s'agit de ce type de régulation que nous allons voir en exemple.

Régulation de la traduction de *glgCAP* par la protéine CsrA

CsrA (Carbon Storage Regulator A) est une protéine de 61 acides aminés [180]. Il s'agit d'un régulateur post-transcriptionnel agissant sur la traduction et la stabilité de ces ARNm cibles. CsrA est un régulateur global, autrement dit, il régule un grand nombre de voies comme le métabolisme central du carbone, la formation de biofilm ou encore la virulence [180-182]. CsrA fait l'objet d'une régulation négative de son activité par les petits ARN régulateurs CsrB et CsrC [183,184].

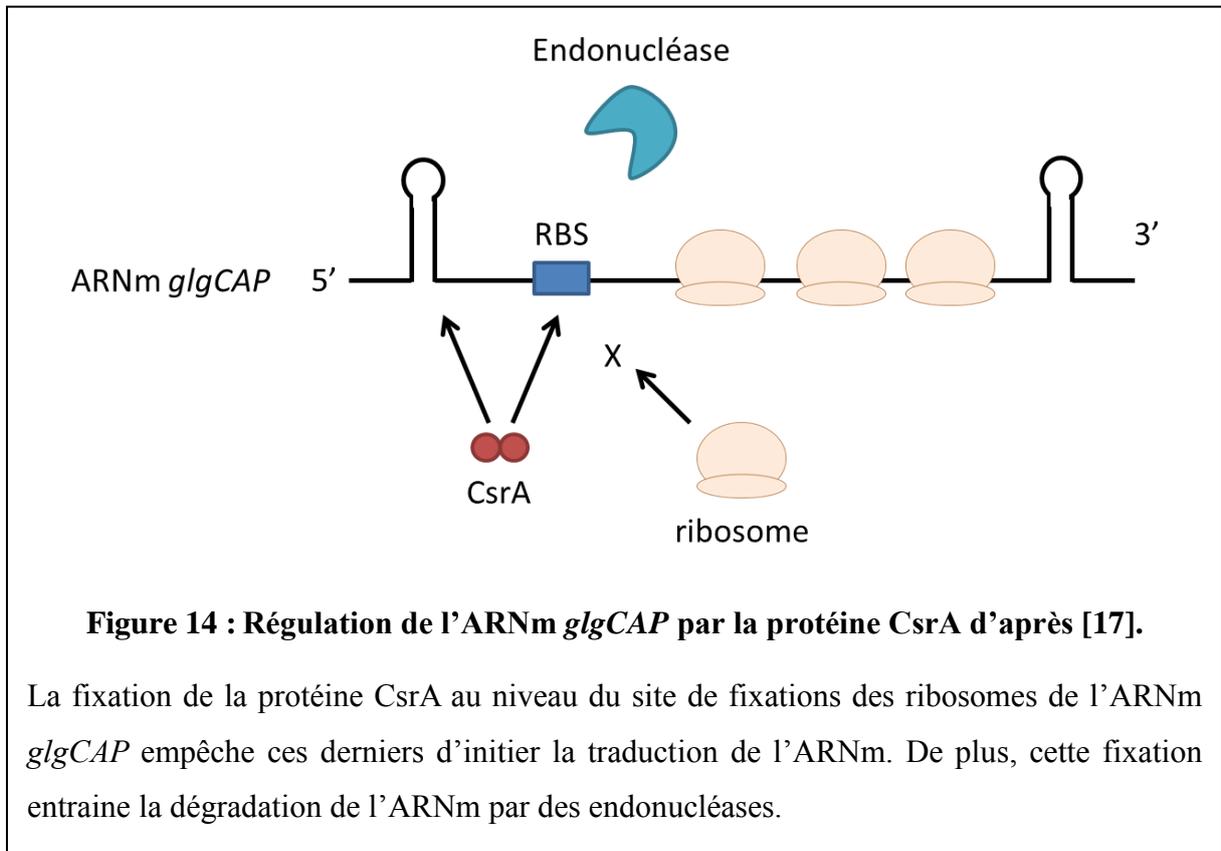
Il est composé de 5 feuillets β suivis d'une hélice α et est actif sous sa forme homodimérique [185]. CsrA reconnaît la séquence consensus 5'-RUACARGGAUGU-3' (où R est une purine) incluse dans une structure en tige-boucle dont le motif GGA est localisé dans la boucle [186].

Comme dit précédemment, CsrA régule un grand nombre de gènes dans plusieurs voies métaboliques. Afin d'expliquer comment, nous allons prendre en exemple la régulation de la traduction du gène *glgC* dans l'opéron *glgCAP* par CsrA [17].

L'opéron *glgCAP* code pour une ADP-glucose phosphorylase (*glgC*), une glycogène synthase (*glgA*) et pour une glycogène phosphorylase (*glgP*) qui font toutes partie de la voie de biosynthèse du glycogène. Lorsque les sources de carbones deviennent limitées, la cellule doit réduire l'expression des gènes de cette voie métabolique et, dans notre exemple, utilise la protéine CsrA pour inhiber la traduction de *glgC*. Dans ce contexte, CsrA se lie à une structure en tige-boucle contenant le motif GGA en amont du RBS de *glgC*. Il interagit également avec un second motif GGA présent au sein de la séquence SD dans la région 5' UTR de l'ARNm de l'opéron *glgCAP* [187]. CsrA, en se liant à la séquence SD, empêche

Introduction

donc la reconnaissance de cette dernière par la sous-unité 30S du ribosome. Ceci entraîne l'inhibition de la traduction de *glgC* et la dégradation de l'ARNm *glgCAP* par des séries de coupures réalisées par des endonucléases (Figure 14) [17,187].



3.3.3) Régulation de la traduction par des molécules d'ARN

La régulation de la traduction peut se faire par l'intermédiaire de protéine (Cf : CsrA), de région senseur d'un ligand spécifique dans la région 5' UTR de l'ARNm (Cf : riboswitch), mais elle peut également être induite par des molécules d'ARN régulateurs. Ces différents mécanismes vous seront présentés au cours du prochain chapitre.

4. Les ARN régulateurs bactériens

Pendant de nombreuses années, la communauté scientifique a pensé que les ARN avaient pour seul rôle de servir de support intermédiaire à l'information génétique par les ARNm et d'assurer la synthèse protéine par les ARNr et ARNt. La régulation de l'expression des gènes était alors exclusivement attribuée aux protéines régulatrices comme les activateurs et les répresseurs, qu'ils soient transcriptionnels ou traductionnels.

Cependant, au début des années 1980, deux équipes identifient un petit ARN impliqué dans la régulation de la réplication du plasmide ColE1 [188,189]. Ces travaux ont confirmé une des hypothèses de Jacob et Monod qui proposait que l'expression des gènes chez les bactéries pût être assurée par des ARN, en parallèle de l'activité des protéines régulatrices [36].

Au cours des années qui suivirent, de plus en plus de petits ARN régulateurs ont été identifiés comme impliqués dans des phénomènes de régulation du nombre de copies d'un plasmide, de l'expression de gène de transposons ou de bactériophage [189-191]. Ces petits ARN sont caractérisés par une petite taille, généralement comprise entre 70 et 400nt et n'ayant généralement pas de séquence codante. Ces petits ARN ont été regroupés dans la classe des ARN non codants (ARNnc) afin de les différencier des ARNm puis dans la classe « small RNA » (ARNs). La question de la présence de ces ARNs sur le chromosome bactérien s'est faite de plus en plus grande jusqu'à la découverte par hasard de MicF, premier ARNs d'origine chromosomique en 1984 [192]. MicF (pour « mRNA-interference complementary RNA ») est un ARNs de 93nt régulant la traduction de la protéine de la membrane externe OmpF en s'hybridant à l'ARNm de ce dernier [193]. Jusqu'au début des années 2000, un petit nombre d'ARNs d'origine chromosomique furent découverts tels que DsrA en 1995, OxyS en 1997 ou GcvB en 2000 [194-196]. Ce peu de résultats a suggéré un rôle mineur des ARNs dans la régulation de l'expression des gènes bactériens. Mais en 2001, les publications de 3 articles majeurs ont permis d'entrevoir l'importance des ARNs dans ce type de régulation [197-199]. Ces travaux, s'appuyant sur méthodes de comparaison de génome *in silico*, ont permis la découverte d'une soixantaine de nouveaux ARNs sur le génome d'*E. coli*. Ces nouveaux ARNs furent ensuite validés par différentes techniques moléculaires [197-199]. Depuis, le développement de nouvelles techniques d'identification des petits ARN à grande échelle (Clip-seq) a permis la découverte de centaines de ces molécules sur le chromosome bactérien [200]. Cela représente 3 à 5 % des gènes annotés [201].

Introduction

Parallèlement aux approches prédictives, des travaux de caractérisation fonctionnelle de ces petits ARN ont révélé leur implication dans de très nombreux processus physiologiques bactériens, comme le métabolisme du carbone, l'homéostasie du fer, la réponse aux stress environnementaux, etc. [202-204]. Ces différents travaux ont également pu montrer que la régulation induite par ces petits ARN peut se faire à différent stade de l'expression des gènes. Elle peut agir sur la maintenance de l'ADN, au cours de la transcription et/ou de la traduction, la stabilité de l'ARNm ou comme « silencer » [204]. Afin de permettre cette régulation, ils agissent de différentes façons, que ce soient en interagissant directement avec l'ADN, par des changements conformationnels de l'ARN, en s'appariant avec d'autres ARN ou en se liant à des protéines. Les ARN régulateurs bactériens sont regroupés en 3 classes : les ARN CRISPR (« Clustered regularly interspaced short palindromic repeats »), les ARN agissants en *cis* et les petits ARN régulateurs [205].

4.1) LES ARN CRISPR :

Le système CRISPR est un système de défense essentiel, distinct de l'interférence à l'ARN (ARNi) eucaryote, qui est retrouvé chez les bactéries et les archées. Ce dispositif permet aux bactéries de se défendre contre les acides nucléiques étrangers provenant de virus ou de plasmides [206]. Il utilise le principe des petits ARN régulateurs afin de détecter et de mettre sous silence les acides nucléiques étrangers [6]. Les premiers éléments CRISPR furent décrits pour la première fois en 1987 [207]. Les études réalisées sur ces derniers ont depuis montré qu'ils constituent une nouvelle classe d'ARN régulateurs bactériens conservée chez 40 % des bactéries et 90 % des archées [208].

Les ARN CRISPR (ARNcr) sont codés par des régions variables de l'ADN constitué d'une séquence leader de 550nt suivi par de multiples régions alternants séquences répétées et séquences non conservées. Pour être actifs, les ARNcr sont dépendants de l'expression des protéines CAS (« CRISPR ASSociated protein ») dont les véritables fonctions restent encore mal connues. Ces protéines sont toujours codées directement en amont de la séquence leader, mais leurs nombres varie d'un organisme à l'autre [209]. Les protéines CAS s'associent pour former le complexe protéique « Cascade » qui va servir à la maturation et au guidage des ARNcr [210,211]. La coopération entre les ARNcr et les protéines CAS est essentielle dans le système CRISPR.

Un Locus CRISPR est formé de séquences pseudo-palindromiques répétées de 21 à 37nt séparés par de courtes séquences (« spacer ») provenant de l'acide nucléique invasif

Introduction

d'une taille de 24 à 48nt [212]. Ces courtes séquences correspondent à des fragments d'ADN phagiques ou plasmidiques provenant d'infection antérieure. Ces régions constitueraient donc une « mémoire » et les éléments CRISPR représenteraient ainsi un système immunitaire bactérien [213,214]. L'interférence par le système CRISPR repose sur 3 étapes majeures : l'intégration de l'acide nucléique invasif dans le locus CRISPR, la biogenèse des ARNcr et l'interférence guidée par les ARNcr [6].

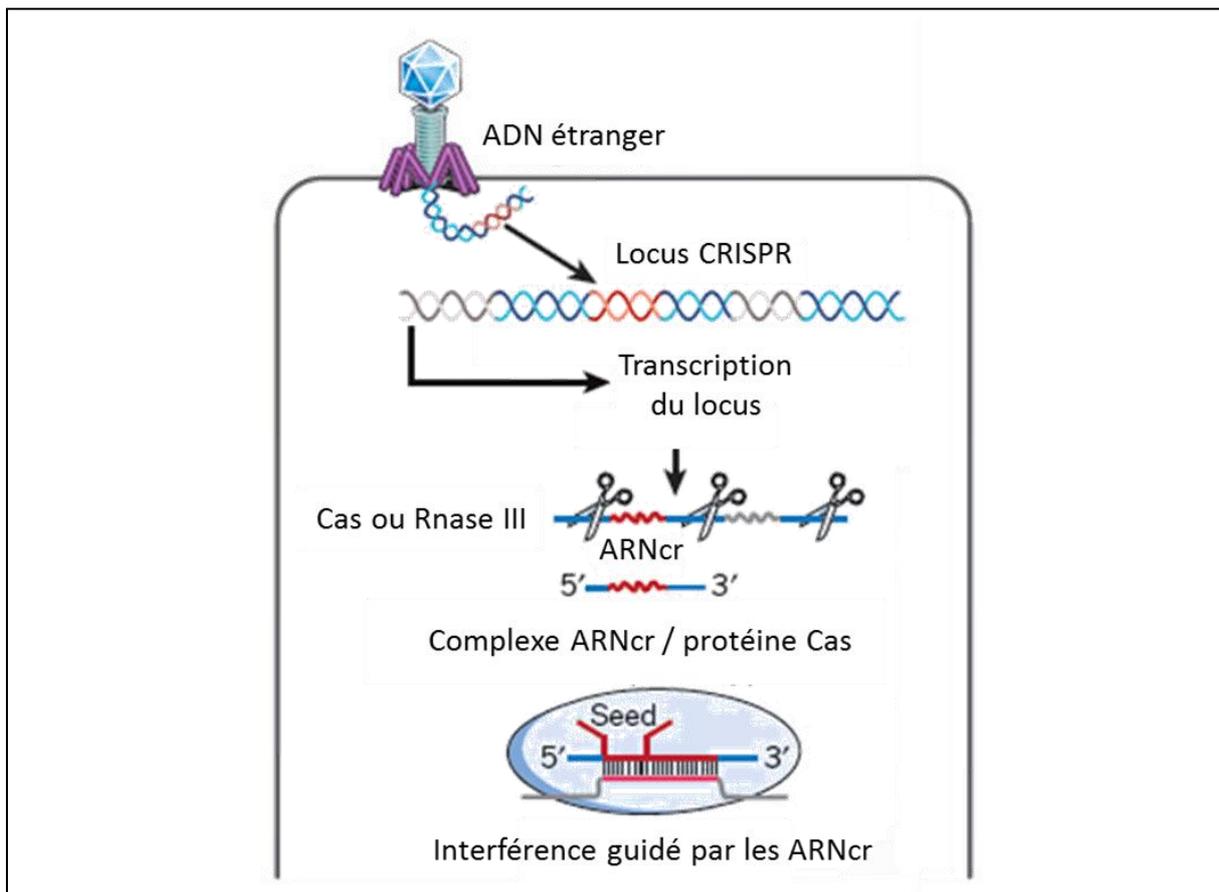


Figure 15 : Interférences guidées par les ARNcr d'après [6].

Lors de la pénétration d'ADN étranger dans la cellule, la bactérie va transcrire entièrement le locus CRISPR. Ce dernier est ensuite reconnu par les protéines CAS sous forme du complexe Cascade ou bien par la RNase III qui vont le découper suivant des motifs répétés nommés PAM. L'ARNcr ainsi préparé se lie au complexe Cascade et le guide vers l'ADN étranger. Les séquences PAM sont représentées en bleu et les séquences des ARNcr sont représentées en rouge et gris.

Le mécanisme permettant l'intégration de l'ADN étranger dans le système CRISPR est toujours inconnu, mais l'implication des protéines CAS a pu être mise en évidence dans ce

Introduction

phénomène [215]. Au cours de cette étape, un court fragment d'ADN exogène est intégré au début du locus CRISPR, entre deux séquences répétées [216].

La seconde étape majeure consiste en la biogenèse des ARNcr. Dans un premier temps, le locus CRISPR est transcrit sous la forme d'un long ARN précurseur de plusieurs centaines de nucléotides (Pré-ARNcr). Par la suite, ce transcrit est reconnu soit par le complexe Cascade ou soit par la RNase III afin d'être coupé à plusieurs reprises au niveau de motifs spécifiques nommée PAM (Protospacer Adjacent Motifs) [217,218]. Ces motifs sont présents au niveau des séquences non conservées du locus CRISPR. Ceci génère des ARNcr d'une cinquantaine de nucléotides constitués d'une région répétée et d'une région non conservée (Figure 15) [211].

La dernière étape correspond à l'interférence guidée par les ARNcr. Ce mécanisme d'interférence peut être utilisé par la bactérie de multiple manière. L'ARNcr peut rester lié au complexe Cascade et être guidé vers leur cible pour induire la répression des gènes [210]. Il peut également cibler indépendamment des protéines CAS les molécules d'ADN/ARN (Figure 15) [214]. Le mécanisme permettant cette régulation est encore mal compris, les différentes études suggèrent que les éléments CRISPR agissent sur la dégradation de l'ADN ou sur la modification des nucléotides.

4.2) Les ARN agissants en cis

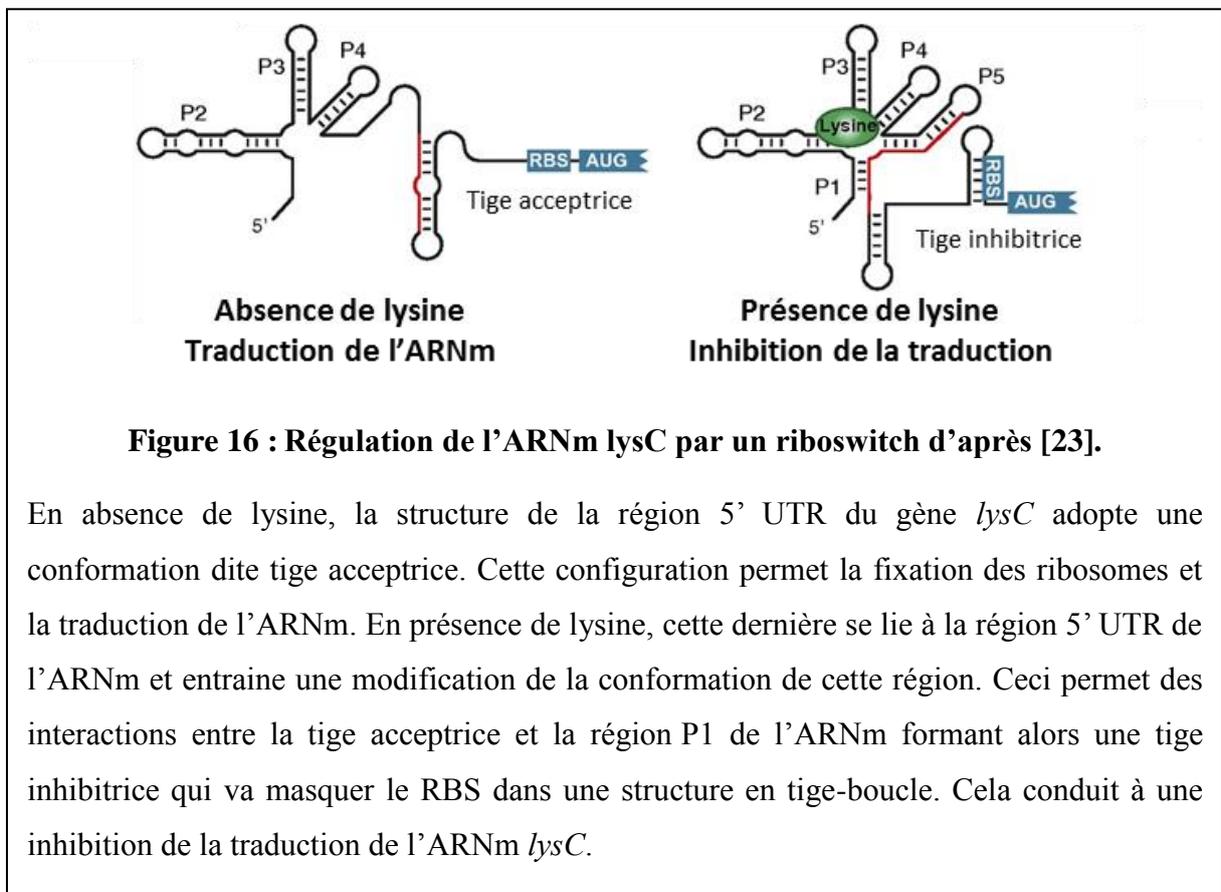
Au cours du temps, les régions 5' UTR de certains ARNm ont évolué afin de devenir de véritables senseurs de l'état métabolique de la cellule. Ces régions 5' UTR, communément appelées « riboswitch », sont capable de fixer des toutes sortes métabolites (Magnésium, lysine, guanine, etc.) sans l'aide d'un quelconque cofacteur [219]. Ils existent également les T-box qui, quant à elle, sont des senseurs des ARNt et vont moduler l'expression des aminoacyl-ARNt synthétases [220]. Les thermosenseurs sont le troisième membre de cette famille. Ces derniers sont capables de détecter les variations de température et d'ajuster l'expression des gènes qu'ils régulent afin d'optimiser leurs expressions [221].

4.2.1) Les riboswitchs

Le riboswitch ou riborégulateur est une région structurée de l'ARN, retrouvé dans les régions 5' UTR de certains ARNm. Ces éléments permettent la régulation de l'expression des gènes en aval suite à la liaison d'un ligand spécifique [222-226]. Dans la majorité des cas, un

Introduction

riboswitch est composé de deux éléments : un domaine aptamère extrêmement structuré qui permet la reconnaissance du ligand et un domaine régulateur nommé plateforme d'expression impliqué dans la régulation de l'expression de l'ARNm. La fixation du ligand sur l'aptamère entraîne une modification de la conformation du domaine régulateur et amène une régulation positive ou négative de l'expression du gène en aval du riboswitch [227]. De manière générale, le ligand reconnu par le riboswitch est directement relié au métabolisme des gènes sous le contrôle de du riboswitch [227].



Afin de mieux expliquer ce mécanisme, nous allons prendre en exemple la régulation de l'initiation de la traduction du gène *lysC*, gène codant pour l'aspartokinase III intervenant dans la voie de synthèse de la lysine (Figure 16). L'ARNm de *lysC* contient dans sa région 5'UTR un riboswitch sensible à la présence de lysine [23]. En absence de ce métabolite, le riboswitch a une structure permettant aux ribosomes de se lier au RBS et d'initier la traduction du gène *lysC*. À l'inverse, en présence de lysine, le riboswitch se lie à ce métabolite et ceci entraîne un changement de conformation de la plateforme d'expression. Cette modification de la structure de ce domaine entraîne la formation d'une structure en tige-boucle masquant le RBS et inhibant ainsi la traduction de *lysC*. De plus, ces changements de

Introduction

conformation de la région 5'UTR permettent le recrutement de la RNase E et induisent la dégradation de l'ARNm [23].

4.2.2) Les thermosenseurs

Dans la majorité des cas, les thermosenseurs sont des activateurs traductionnels dont le mécanisme est basé sur une dénaturation progressive de la région 5' UTR de l'ARNm en fonction de la température [228]. En effet, le RBS est souvent piégé dans une structure secondaire stable à basse température. Lorsque la température augmente, la structure en tige-boucle devient instable ce qui entraîne la libération du RBS. À ce moment, la sous-unité 30S du ribosome reconnaît le RBS et initie la traduction de l'ARNm.

La régulation du gène *cspA* (Cold-Shock Protein) chez *E. coli* est un exemple de régulation par un thermosenseur (Figure 17) [22]. CspA est une protéine chaperonne d'ARN, très fortement induite lors d'un choc thermique entraînant une diminution de la température [229].

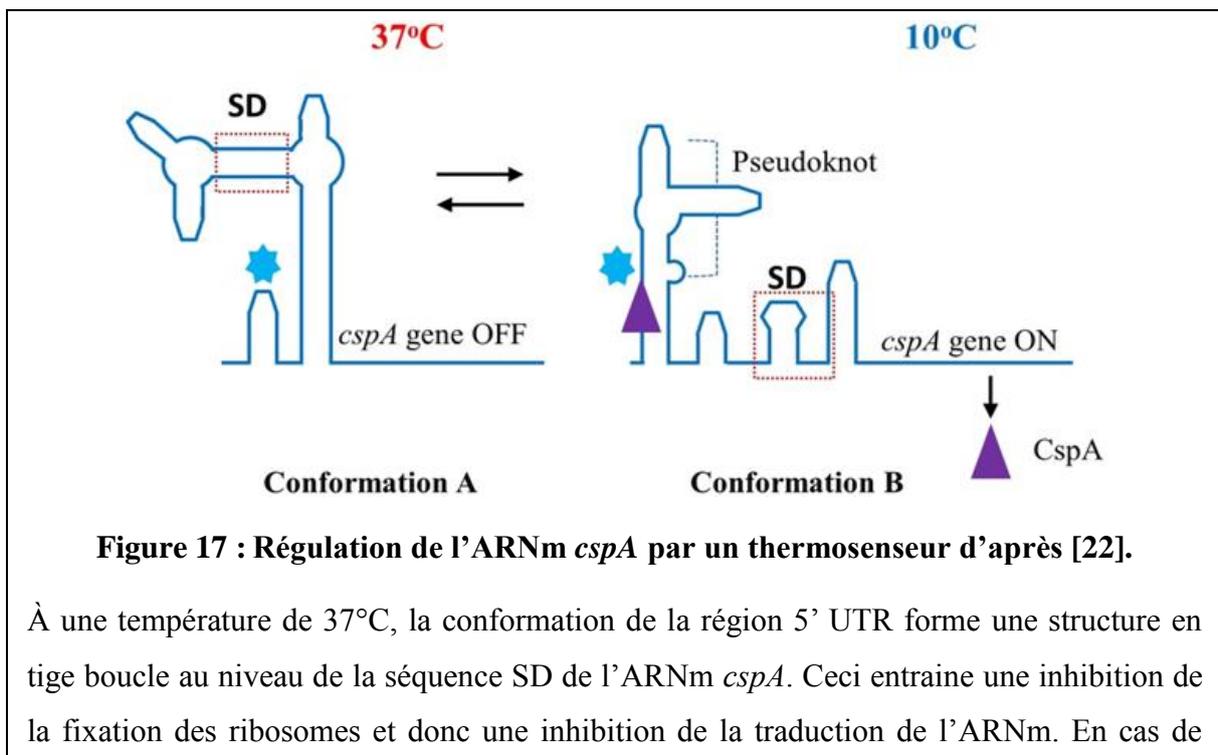


Figure 17 : Régulation de l'ARNm *cspA* par un thermosenseur d'après [22].

À une température de 37°C, la conformation de la région 5' UTR forme une structure en tige boucle au niveau de la séquence SD de l'ARNm *cspA*. Ceci entraîne une inhibition de la fixation des ribosomes et donc une inhibition de la traduction de l'ARNm. En cas de

Introduction

choc thermique entraînant une diminution de la température, la région 5' UTR va changer de conformation et ainsi modifier ces structures secondaires. Cela est le cas notamment de la structure en tige boucle masquant la séquence SD. Ce changement de conformation entraîne la libération de la séquence SD permettant ainsi aux ribosomes d'initier la traduction de l'ARNm *cspA*.

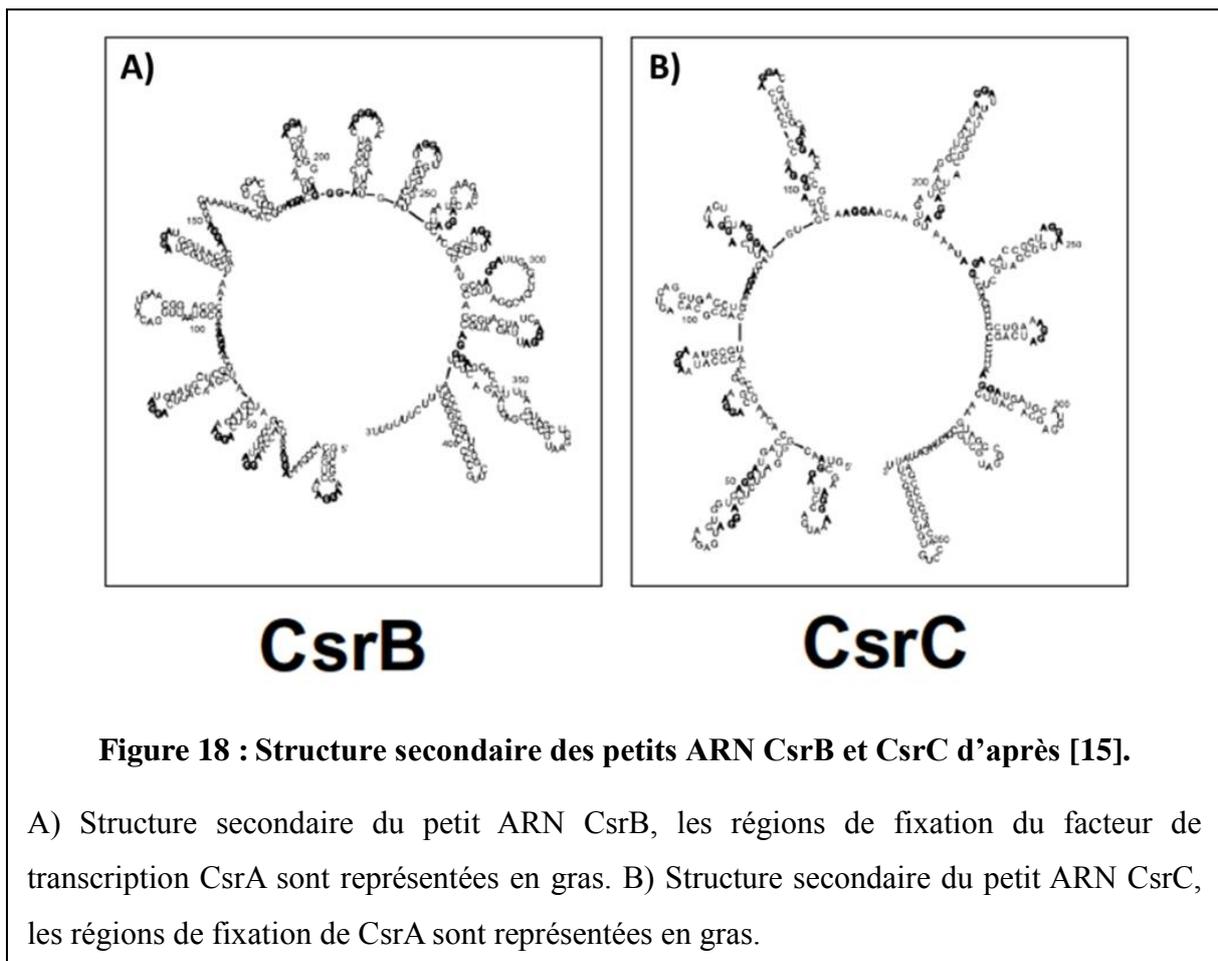
À 37°C, la région 5'UTR de l'ARNm *cspA* est composée d'une structure en tige-boucle d'une centaine de nucléotides résultant d'interactions longues distances entre la région 5' UTR et la région codante. La région initiateur de la traduction se retrouve emprisonnée dans une structure secondaire entraînant une inhibition de la traduction. Ces structures secondaires forment de nombreuses régions d'ARN double brin reconnu par les RNases et entraîne une instabilité de l'ARNm. Lorsque la synthèse de l'ARNm *cspA* est réalisée à une température inférieure à 20°C, la région 5' UTR s'ordonne dans des structures secondaires thermodynamiquement moins stables qu'à 37°C. Elle se replie en une structure ramifiée formée par plusieurs boucles de tige de longueur limitée générée par l'interaction de nucléotides contigus. Ces réarrangements positionnent le RBS dans des structures secondaires favorisant la traduction. De plus, l'ARNm est fortement stabilisé dans ces conditions par l'intermédiaire de différents mécanismes dont l'inactivation de la machinerie de dégradation des ARN et la protection de l'ARNm par les ribosomes [22].

4.3) Les petits ARN régulateurs bactériens

Les petits ARN régulateurs constituent la majorité des ARN régulateurs bactériens. Ils peuvent être divisés en 3 catégories distinctes. La première catégorie correspond aux petits ARN régulateurs interagissant avec les protéines. Dans la majorité des cas, ces derniers interagissent avec un facteur de régulation en mimant la structure de leurs ARNm cibles [230]. La seconde classe regroupe les petits ARN régulateurs codés en *cis*. Ces ARNs sont directement transcrits à partir du même locus que leur ARNm cible, mais à partir du brin d'ADN complémentaire. Cette particularité permet à ces petits ARN d'être parfaitement complémentaire à leur cible et d'agir sans l'aide de la protéine Hfq [9,231]. La dernière classe de petit ARN correspond à ceux codés en *trans*. La majorité des petits ARN régulateurs bactériens connus sont dans cette classe. Ces ARNs sont transcrits à partir de loci différents de leurs cibles. Dans la majorité des cas, l'appariement entre l'ARNs régulateur et sa cible se fait par des interactions partiellement complémentaires.

4.3.1) Les petits ARN régulateurs ciblant les protéines

Chez les bactéries, de nombreuses protéines régulent à un niveau post-transcriptionnel une grande quantité d'ARNm. Dans certains cas, ces protéines régulent directement leurs propres expressions en interagissant avec leurs propres ARNm. Ce type de rétro-inhibition peut être observé dans différentes voies métaboliques ou sur des gènes impliqués dans la traduction [230,232]. Dans ces cas, le petit ARN adopte une structure mimant les sites de reconnaissance des cibles sur l'ARNm de ces protéines régulatrices. Dans d'autres circonstances, cette régulation se fait par l'intermédiaire de molécules d'ARN synthétisées à partir d'un locus différent. Ici aussi, ces ARN vont piéger les protéines régulatrices en mimant leurs cibles naturelles. Ces protéines sont généralement des régulateurs post-transcriptionnels comme CsrA ou transcriptionnels comme des facteurs sigma [233,234]. Les avantages de piéger ces protéines par des petits ARN sont nombreux. En effet, cela permet de réguler rapidement, de manière coordonnée et indirecte l'expression d'un grand nombre de gènes. De plus, ces effets sont facilement réversibles dû à la faible durée de vie de ces petits ARN.



Introduction

Un parfait exemple de ce mécanisme est la régulation de la protéine CsrA par les petits ARN CsrB et CsrC (Figure 18). Comme expliqué précédemment, CsrA est un régulateur post-transcriptionnel global intervenant dans un grand nombre de voies métaboliques, notamment le métabolisme central du carbone. Il est donc essentiel pour la bactérie de réguler l'activité de CsrA sans pour autant inhiber totalement son activité. La bactérie a des besoins énergétiques variables au cours de ses différentes phases de croissance. Dans la majorité des cas, cette énergie est pourvue par la glycolyse avec la dégradation du glucose. En phase exponentielle, les bactéries vont utiliser cette énergie pour se multiplier. En phase stationnaire, les besoins énergétiques des bactéries diminuent. Elles adaptent donc l'expression de leurs gènes pour favoriser la glycogénèse au détriment de la glycolyse. Chez *E. coli*, cette régulation est en grande partie réalisée par la protéine CsrA [180]. En phase stationnaire de croissance, l'expression de petits ARN CsrB, CsrC permet la régulation de l'activité de CsrA [233]. Ces petits ARN possèdent des motifs répétés riches en purine, notamment en motif GGA, localisée à la fois dans des régions d'ARN simple brin et dans des structures en tige-boucle. La présence de ces motifs mime les sites reconnus par CsrA sur l'ARNm et permet à ces petits ARN de titrer la protéine CsrA [235]. CsrB possède 18 fois le motif GGA permettant la séquestration de 9 dimères CsrA (Figure 18 A) [183]. Ce même motif se retrouve 9 fois sur CsrC (Figure 18 B) [184]. Ces caractéristiques font qu'en présence de ces petits ARN, la concentration de CsrA libre dans la cellule est fortement diminuée. Il n'est donc plus capable de réguler aussi efficacement ces différentes cibles. Ceci entraîne donc un basculement du métabolisme du glucose de la glycolyse vers la glycogénèse. La stabilité des petits ARN CsrB et CsrC est contrôlée négativement la protéine CsrD avec le concours de la RNase E [236].

4.3.2) Les petits ARN régulateurs en cis :

Les petits ARN régulateurs en *cis* ou ARN anti-sens (ARNas) ont été les premiers petits ARN régulateurs identifiés chez les bactéries. Ces ARNas sont transcrits à partir du brin d'ADN complémentaire au brin codant les gènes dont ils régulent l'expression. Cette situation assure une complémentarité parfaite et généralement assez étendue de séquence avec l'ARNm. La plupart de ces ARNas proviennent de bactériophages, de plasmides ou de transposons et servent à maintenir un nombre optimal de copies de cet élément génétique [231]. La fonction de ces ARNas au niveau de ces éléments génétiques est plutôt bien comprise, ce qui n'est pas le cas pour les ARNas exprimés à partir du chromosome bactérien

Introduction

[204]. Une partie de ces ARNas chromosomiques ont une fonction antitoxine permettant de limiter l'expression de protéine toxique à forte concentration cellulaire [237]. Ils sont également impliqués dans la réponse à certains stress ou dans la virulence. Les mécanismes permettant cette régulation agissent sur la transcription, la traduction ou la stabilité des ARNm cibles [9]. À l'inverse des petits ARN régulateurs en *trans*, la régulation des ARNm par les ARNas n'est pas obligatoirement dépendante de la protéine Hfq [231,238]. En effet, la structure de l'ARNm cible et celui de l'ARNas est essentielle pour permettre une liaison rapide entre ces derniers et une régulation efficace [238].

4.3.2.1) L'ARNas AmgR : régulateur de la virulence chez *S. enterica* :

Lors des premières étapes de l'infection d'un hôte par *S. enterica*, la bactérie doit synthétiser un certain nombre de facteurs de virulence pour initier la colonisation de l'hôte. Au cours de l'infection, la survie de ces bactéries dépend de leurs capacités à camoufler leur présence au système immunitaire. Pour ce faire, elles doivent limiter la synthèse des facteurs de virulence [11]. La découverte d'un ARNas chromosomique d'une taille de 1.2kb nommé AmgR permet de mieux comprendre ce mécanisme (Figure 19).

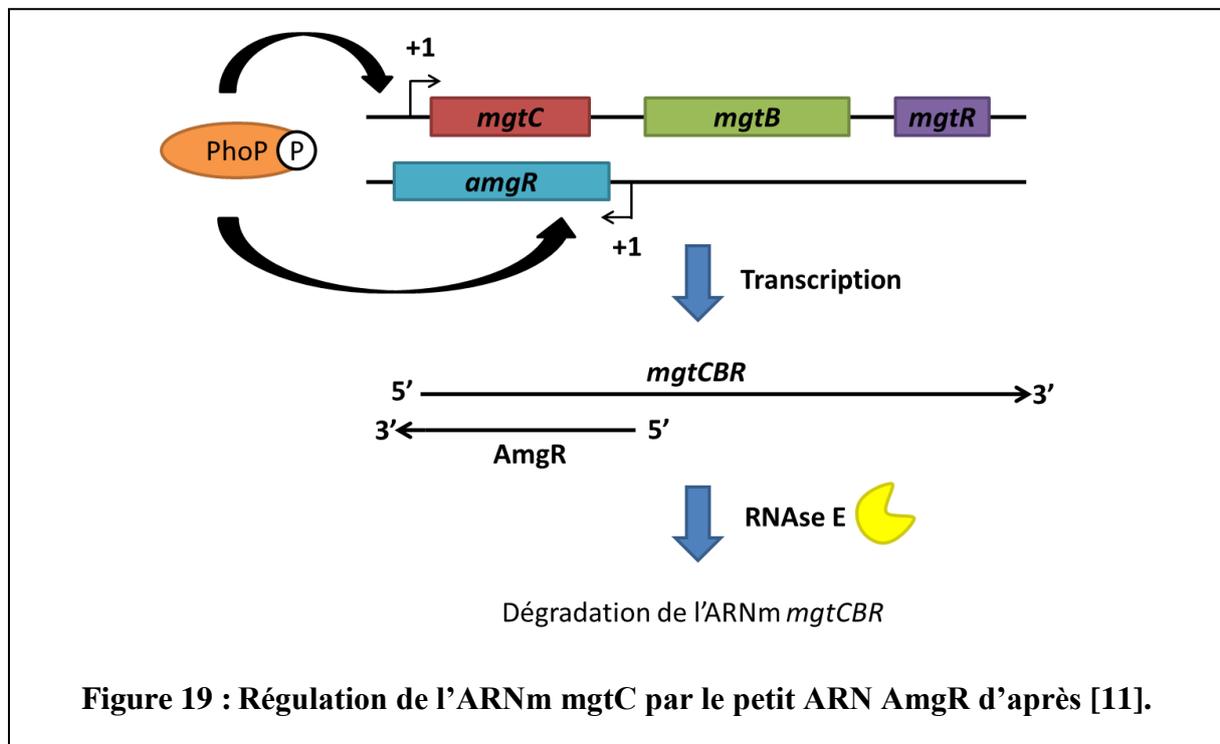


Figure 19 : Régulation de l'ARNm *mgtC* par le petit ARN *AmgR* d'après [11].

Introduction

Le facteur de transcription PhoP, une fois phosphorylé, active la transcription de l'ARNm *mgtCBR* ainsi que du petit ARN AmgR présent sur le brin complémentaire. Lorsque la concentration du petit ARN AmgR devient suffisante, il s'apparie avec l'ARNm *mgtCBR* au niveau de ses régions complémentaires et entraîne ainsi la dégradation de l'ARNm cible. L'expression des deux ARN n'est pas égale, l'ARNm *mgtCBR* est plus fortement exprimé que le petit ARN AmgR. Ce mécanisme permet d'obtenir une production des protéines MgtC, MgtB et MgtR suffisante avant que la concentration du petit ARN AmgR entraîne la dégradation de l'ARNm.

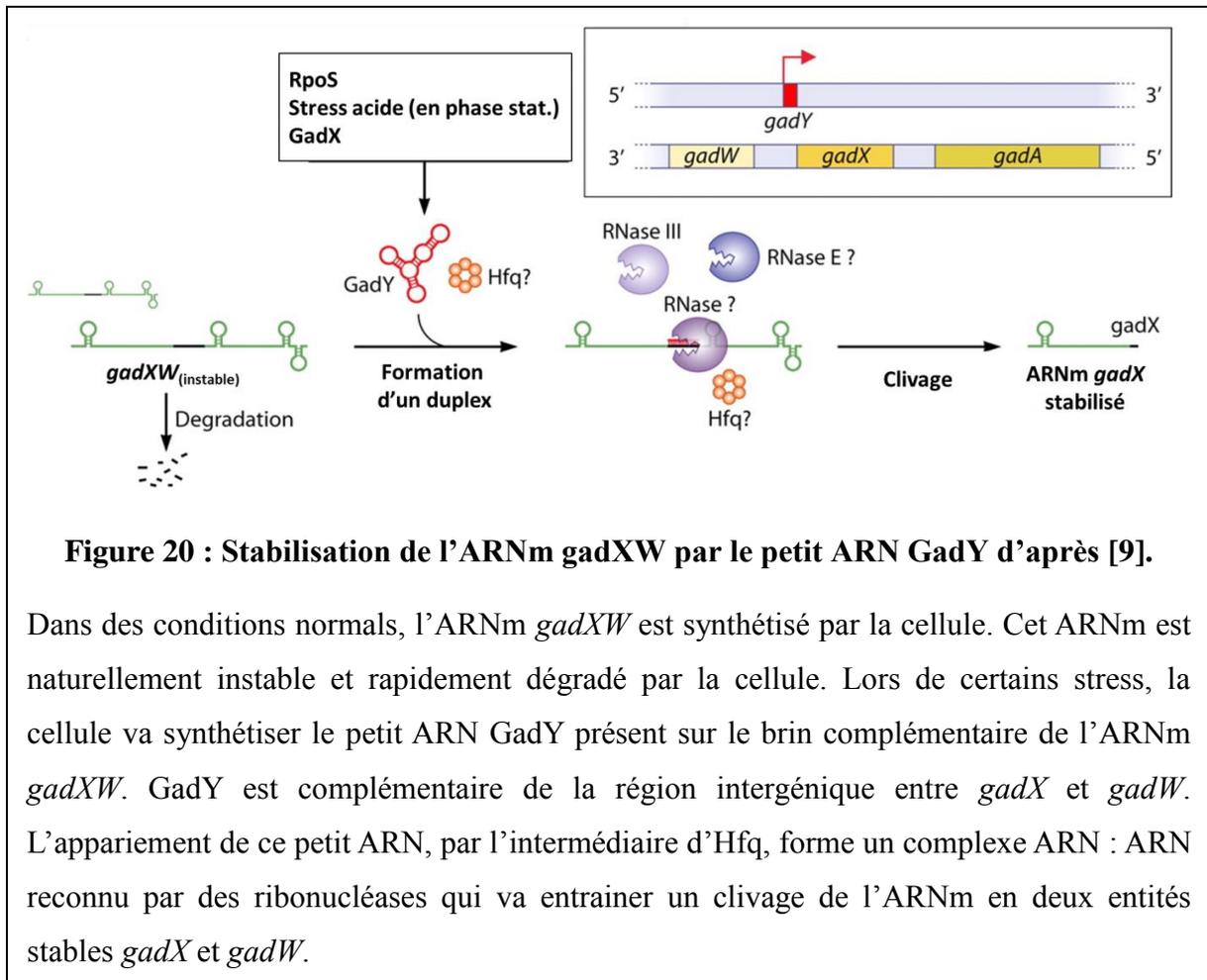
AmgR est complémentaire d'une grande partie de l'opéron *mgtCBR*. Plus exactement, cette complémentarité englobe une partie de la région 5' UTR ainsi que l'intégralité du gène *mgtC*. L'appariement de l'ARNas AmgR avec cet ARNm est indépendant de la protéine Hfq. Cette interaction entraîne une dégradation des ARN par l'intermédiaire de la RNase E. MgtC est une protéine indispensable à la virulence, à la survie intramacrophagique et lors de carences en Mg^{2+} [239]. Bien que synthétisé à partir de différents promoteurs, ces deux ARN sont contrôlés par le même facteur de transcription PhoP. Lors d'une carence en Mg^{2+} , PhoP active l'expression des deux ARN à la fois. Mais la transcription des deux ARN n'est pas équivalente, l'ARNm codant l'opéron *mgtCBR* est plus fortement exprimé que l'ARNas AmgR. Cette différence permet l'accumulation des protéines de l'opéron, notamment celle de MgtC, jusqu'à ce que la concentration d'AmgR devienne suffisante pour induire la régulation de l'expression de l'opéron. Ce mode d'action met en évidence l'utilisation d'un petit ARN régulateur comme d'une horloge biologique permettant l'expression d'un gène en réponse à un besoin [11].

4.3.2.2) L'ARNas GadY : acteur de la maturation de l'ARNm *gadXW* :

Un des principaux systèmes de réponse d'*E. coli* face à une acidification de l'environnement extérieur est d'induire l'expression des deux glutamate décarboxylases GadA et GadB. Cette induction se fait par l'intermédiaire de différents facteurs protéines comme GadE, GadX et GadW. Les protéines GadX et GadW sont codées à partir d'un même ARNm *gadXW*. Ce dernier est instable en absence de stress acide et est rapidement dégradé par la cellule. Lors de l'expression du facteur σ^S , la bactérie va transcrire un ARNas de 105 nucléotides nommés GadY [240]. Le gène codant GadY se trouve dans la région intergénique (IG) de l'opéron *gadXW* et est complémentaire à la région 3'-UTR de *gadX*. La liaison de

Introduction

GadY à l'ARNm stabilise ce dernier. Cette stabilisation est induite par une maturation de l'ARNm par la RNase III qui va couper le transcrite en deux dans la région d'appariement GadY/*gadXW* et générer 2 ARNm distincts et plus stables permettant la synthèse des régulateurs protéiques GadX et GadW (Figure 20) [241]. À l'inverse des autres régulations par un ARNas, cette dernière est dépendant de la protéine Hfq.



4.4) Les petits ARN régulateurs en *trans*

Les petits ARN régulateurs codés en *trans* sont une des classes d'ARN régulateurs ayant un rôle majeur dans la cellule dû fait de leurs capacités à réguler un ensemble de gène d'une même voie physiologique (Figure 21 B). À l'inverse des ARNas, ces ARN sont majoritairement transcrits à partir d'un locus différent de sa cible, généralement dans une région intergénique [242]. Ils ont une taille comprise entre 50 et 300 nucléotides et sont hautement structurés. La régulation induite par ces petits ARN est entièrement dépendante de la protéine Hfq, et ce pour plusieurs raisons. En absence d'Hfq, ces ARN sont extrêmement instables et sont rapidement dégradés par la cellule. De plus, Hfq facilite l'appariement du

Introduction

petit ARN avec son ARNm cible. [243,244] Bien qu'il existe un grand nombre de tailles et de structures variables, trois éléments sont communs et invariable à ces petits ARN : une région d'appariement avec l'ARNm cible, un site de fixation de la protéine Hfq et un terminateur Rho-indépendant se trouvant en 3' de l'ARNs (Figure 21 A).

La région d'appariement avec l'ARNm est une séquence d'une dizaine de nucléotides. L'intégralité de cette séquence n'est pas forcément utilisée pour réaliser l'appariement avec sa cible, la région d'interaction peut avoir une taille plus réduite de 6 à 8 nucléotides contigus [245,246]. En effet, l'appariement du petit ARN régulateur avec sa cible se fait par des interactions partiellement complémentaires. Ces derniers peuvent donc tolérer des mésappariement permettant de cibler des séquences variées. Il n'est donc pas rare qu'un ARNs régulateur puisse interagir avec un grand nombre de cibles différentes. À l'inverse, un même ARNm peut également être régulé par plusieurs ARNs en même temps [29,247,248]. Le positionnement de cette séquence sur le petit ARN régulateur n'est pas fixe. Elle peut être du côté 5' comme pour le petit ARN RybB, au cœur comme avec RyhB ou du côté 3' comme chez ChiX [28,245,249]. De même, la grande majorité des petits ARN ne possèdent qu'une seule région d'appariement, mais il existe des exceptions avec plusieurs de ces régions. C'est le cas de GcvB qui possède trois sites d'appariements distincts [250,251].

Le site de fixation d'Hfq sur l'ARN (HBS : « Hfq Binding Site ») est une séquence qui n'a pas encore été entièrement définie. Les différentes études effectuées sur ce dernier définissent l'HBS comme une région riche en U ou ayant un motif de type (ARN)_n positionné en amont et/ou en aval d'une structure en tige-boucle [33,252,253].

Le terminateur Rho indépendant est toujours positionné en 3' du petit ARN. Comme cela a déjà été expliqué (Cf : Termineur intrinsèque), le terminateur Rho indépendant est constitué d'une structure en tige-boucle suivie d'une séquence polyU.

Les petits ARN régulateurs codés en *trans* sont des régulateurs post-transcriptionnel. Ils peuvent agir comme activateurs ou comme répresseurs traductionnels en fonction de leurs ARNm cibles (Figure 21 B). Le petit ARN DsrA en est un parfait exemple. En effet, ce dernier est capable d'activer la traduction de l'ARNm *rpoS* et d'inhiber la traduction de la protéine H-NS [196,254]. La grande majorité des petits ARN régulateurs découverts jusqu'à maintenant agissent comme des répresseurs traductionnels. Ces ARN ont principalement deux modes d'action non exclusive pour inhiber l'expression de leurs cibles.

Introduction

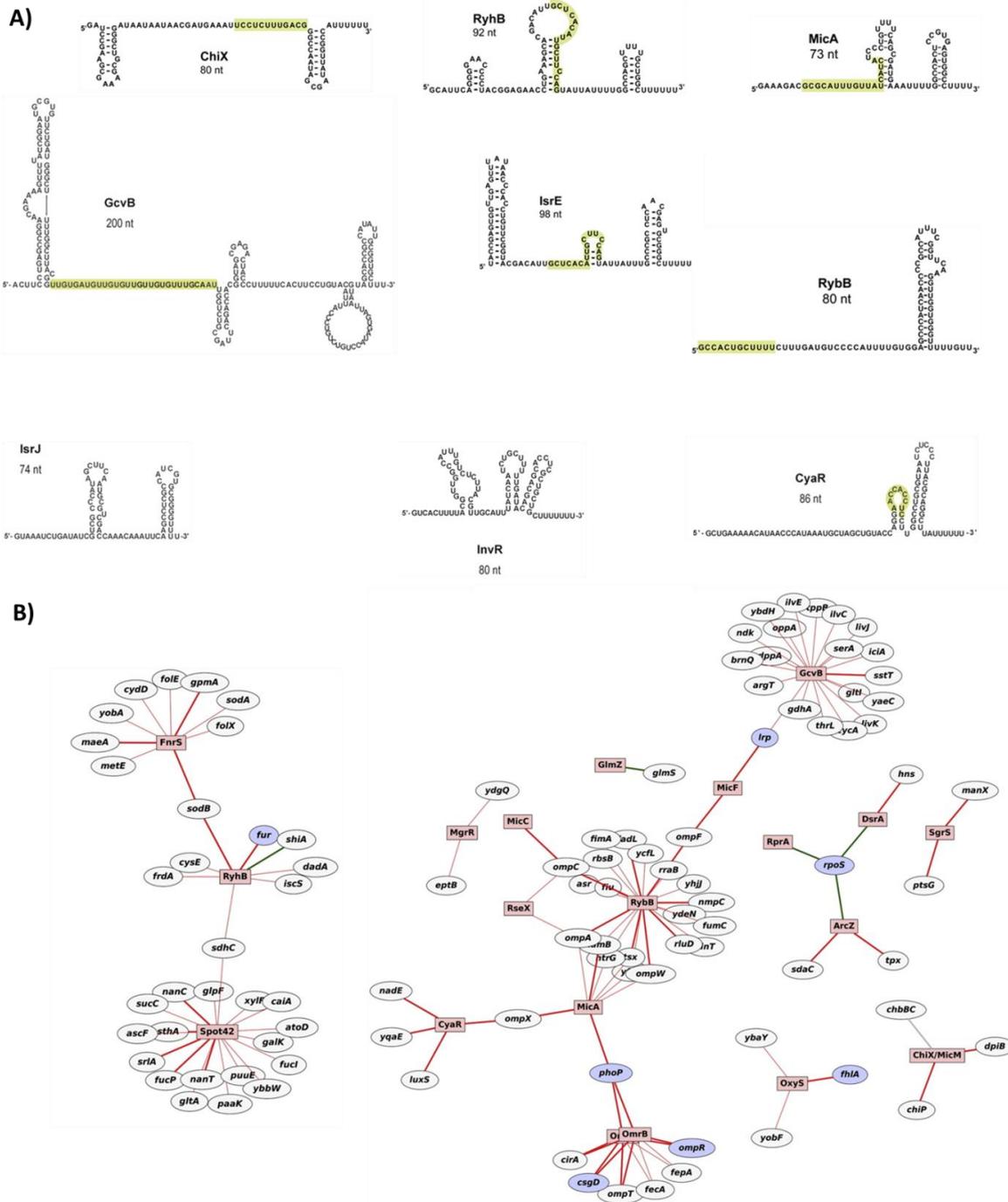


Figure 21 : Exemple de petit ARN régulateur et de leurs réseaux de régulations

A) Structure secondaire de quelques petits ARN régulateurs. Les régions d'appariement sont surlignées en jaune [12]. B) Réseau de régulation de quelques petits ARN régulateurs. Les petits ARN régulateurs sont représentés par des carrés rouges, les facteurs de transcription sont représentés par des ovales bleus et les ARNm sont représentés par des ovales blancs. Lorsque la liaison d'un petit ARN régulateur avec un ARN est rouge, le petit ARN agit comme un inhibiteur et quand il est vert, le petit ARN agit comme un activateur. L'intensité de la couleur rouge correspond à l'efficacité de la régulation [29].

Introduction

Un des modes d'action consiste à inhiber l'initiation de la traduction de l'ARNm. Dans ce cas, le petit ARN va s'apparier dans la région 5'UTR de l'ARNm et plus précisément au niveau de la séquence SD. Cette interaction forme un ARN double brin qui va empêcher la sous-unité 30S du ribosome de se lier à l'ARNm et d'initier la traduction [249,255]. De plus, cela peut entraîner la dégradation de l'ARNm. L'absence de traduction va révéler des sites cryptiques reconnus par les RNases normalement masqué par les ribosomes [256,257]. Le second mode d'action consiste à entraîner directement la dégradation de l'ARNm. L'appariement du petit ARN régulateur sur l'ARNm forme un duplex ARN : ARN. Cette structure est reconnue par la RNase E qui va cliver ce dernier et entraîner la dégradation du petit ARN et de l'ARNm en même temps [258,259].

Les petits ARN régulateurs peuvent aussi agir comme activateur traductionnel. Dans ce cas, l'appariement du petit ARN sur sa cible modifie la conformation de l'ARNm de sorte à permettre l'initiation de la traduction. Dans le plus grand nombre de cas, l'interaction du petit ARN avec sa cible révèle la séquence SD qui était masqué par une structure secondaire empêchant les ribosomes d'initier la traduction [260]. Dans une moindre mesure, les changements de conformation de l'ARNm lors de l'interaction avec son ARN régulateur augmentent sa stabilité. Dans ce cas, l'appariement inhibe l'action de la RNase E en masquant un site de clivage sur l'ARNm [261].

4.4.1) RyhB et l'homéostasie du fer

Le fer est un des métaux le plus abondants sur Terre. Il se retrouve sous deux formes interchangeables : la forme oxydée Fe^{3+} (fer ferrique) qui est majoritaire et la forme réduite Fe^{2+} (fer ferreux). Il peut adopter ces différentes formes en fonction des conditions de pH et la teneur en oxygène de l'environnement dans lequel il se trouve. Le fer est un élément essentiel à la vie pour la très grande majorité des organismes (animaux, plantes, ...). En biologie, la forme Fe^{2+} est incorporée dans les protéines sous forme de groupement hémique ou fer-soufre. Dans ces conditions, il agit comme un donneur d'électron ou comme catalyseur. Il est également impliqué dans de nombreux processus biologiques comme la photosynthèse, le cycle de Krebs, le transport d'oxygène et la synthèse d'ADN [262]. Le fer est essentiel pour les bactéries, mais l'acquérir et l'utiliser n'est pas sans difficulté. En effet, les bactéries ne sont pas capables d'utiliser le fer sous sa forme oxydée qui est pourtant la forme majoritaire dans l'environnement. De plus, l'oxygène en présence du fer favorise la

Introduction

production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS : reactive oxygen species) toxiques pour la cellule [263]. Les bactéries doivent donc utiliser différents moyens pour acquérir et détoxifier le fer.

Les bactéries ont développé des systèmes de régulation pour garder un niveau de fer optimal, c'est-à-dire assez élevés pour subvenir aux fonctions essentielles et assez faibles afin de ne pas être dommageable pour les composantes cellulaires. Ils existent plusieurs mécanismes régulant l'acquisition et le métabolisme du fer et le plus important est la protéine régulatrice Fur (Ferric Uptake Regulator). Ce régulateur global réprime la transcription de la majorité des gènes impliqués dans l'homéostasie du fer et dans différents processus cellulaires, mais certaines cibles sont directement régulées de façon positive [264]. De plus, une grande partie de ces gènes sont également régulés de façon post-transcriptionnelle par le petit ARN RyhB chez *E. coli* [265].

Fur est une protéine faisant partie de la famille de régulateur de type Fur qui a environ 800 homologues chez les bactéries [266]. Cette famille de régulateur affecte l'expression de nombreux gènes en réponse à différents signaux et inclut les protéines Fur (Fer), Zur (Zinc), Mur (Manganèse), Nur (Nickel). Ces différents régulateurs agissent principalement en inhibant la transcription de leurs cibles et dans de rares cas en les activant [264,266]. Fur est une protéine de 17KDa composée de 2 domaines. Le domaine C-Terminal permet la dimérisation de la protéine et contient également deux sites de liaison aux métaux. Le domaine N-Terminal permet la liaison de la protéine à l'ADN au niveau des promoteurs de ses cibles [267,268]. Fur est une protéine fonctionnelle sous une forme homodimérique complexée avec du Fe^{2+} [269]. Le dimère Fur- Fe^{2+} est un répresseur transcriptionnel. Le complexe se lie à l'ADN, dans la majorité des cas, dans la région promotrice de ces différentes cibles entre les séquences -10 et -35. Cela bloque l'accès à l'ARN polymérase et par conséquent, entraîne l'inhibition de l'expression des gènes en aval. Lorsque la concentration en fer diminue dans la cellule, Fur se dissocie du Fe^{2+} et devient inactif. Cela permet la dérégulation des gènes d'acquisition du fer [263,270]. Plus précisément, Fur se lie à l'ADN au niveau de séquence consensus appelé Fur-Box. Ces séquences forment un palindrome de 19nt : 5'- GATAATGATAATCATTATC - 3' [270,271]. Fur régule l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie du fer, comme la synthèse et le transport des sidérophores, le transport et le stockage du fer et plusieurs protéines liées au fer. Il est également impliqué dans d'autres fonctions comme la motilité, le cycle de Krebs, la respiration ou la virulence [272]. Cependant, lors d'expérience où Fur était inactif, un certain nombre de ces gènes cibles ont vu leurs expressions diminuées de façon inexplicable [273,274]. L'explication de cet effet

Introduction

viendra avec l'identification par bio-informatique et la caractérisation de l'ARN régulateur RyhB [197,198].

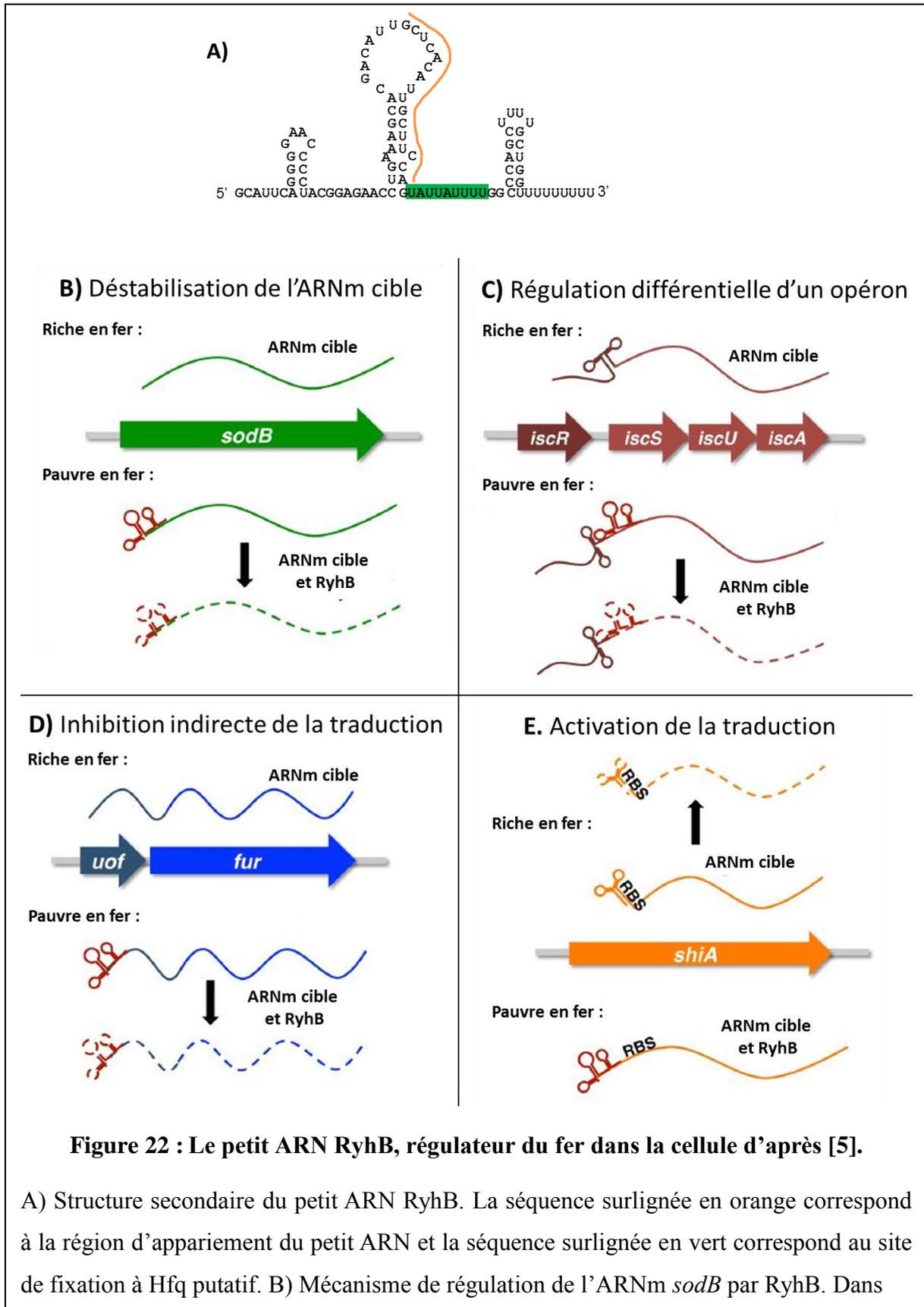


Figure 22 : Le petit ARN RyhB, régulateur du fer dans la cellule d'après [5].

A) Structure secondaire du petit ARN RyhB. La séquence surlignée en orange correspond à la région d'appariement du petit ARN et la séquence surlignée en vert correspond au site de fixation à Hfq putatif. B) Mécanisme de régulation de l'ARNm *sodB* par RyhB. Dans

Introduction

un milieu carencé en fer, RyhB se lie à la région 5' UTR de l'ARNm *sodB*, ce dernier entraîne la dégradation de l'ARNm cible ainsi que sa propre dégradation. C) En absence de fer, RyhB se lie à la région intergénique entre les gènes *iscR* et *iscS* de l'opéron *iscRSUA*. Cette fixation entraîne la dégradation d'une partie de l'opéron comprenant les gènes *iscSUA* ainsi que celle du petit ARN sans affecter la stabilité du gène *iscR* D) Lors d'une carence en fer, RyhB va inhiber la traduction du gène *uof* en se liant à ce dernier. Le gène *uof* est présent sur le même transcrit que le gène *fur*. La régulation d'*uof* par RyhB va donc indirectement impacté l'expression de *fur*. Cette liaison va entraîner la dégradation de l'ARNm *uof-fur*. E) En présence de Fer, l'ARNm *shiA* est instable et rapidement dégradé par la cellule. Lorsque la quantité de fer diminue, cela entraîne l'expression du petit ARN RyhB qui va se lier à l'ARNm *shiA* permettant sa stabilisation dans la cellule.

Chez *E. coli*, RyhB est un petit ARN régulateur de 90 nucléotides dont la structure secondaire est composée de deux tiges-boucles et d'un terminateur Rho-indépendant en 3' [265]. La caractérisation de RyhB a permis de montrer que sa transcription est régulée par Fur. En présence de fer, Fur se fixe dans la région promotrice de *ryhB* et inhibe sa transcription. Inversement, lorsque le fer est limitant, la répression de *ryhB* par Fur est levée et le petit ARN est transcrit [265,275]. Chez *S. Typhimurium*, il existe deux petits ARN homologues de RyhB : RfrA et RfrB (RNA for Fur Response) [265,276]. RfrA est un petit ARN de 96 nucléotides et il est orthologue de RyhB. RfrB est un paralogue de RfrA et a une taille de 98 nucléotides. Ils partagent plusieurs similarités comme une Fur-box dans leurs promoteurs, une structure secondaire similaire et une séquence conservée au niveau des nucléotides 37 à 69 [277].

RyhB est impliqué dans la régulation de l'homéostasie du fer en régulant l'expression de plusieurs protéines par des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle [278]. Les cibles de RyhB sont en majorité des gènes codant pour des protéines associées au fer dont une superoxyde dismutase (*sodB*), des enzymes du cycle de Krebs comme une succinate déshydrogénase (*sdhCDAB*), des récepteurs de la membrane externe (*iroN*), une aconitase (*acnA*) et une fumarase (*fumA*) [35,265]. De plus, des études utilisant des biopuces ont permis d'identifier 56 gènes compris dans 18 opérons dont les transcrits sont réprimés par RyhB. La majorité de ces gènes sont impliqués dans le métabolisme du fer [279]. Ces résultats montrent également que l'expression de RyhB permet l'activation de l'expression de certains gènes de façon directe ou indirecte.

Introduction

RyhB est un petit ARN agissant en s'appariant de façon partielle à sa cible. Son activité régulatrice est dépendante de la protéine Hfq (Figure 22 A). Dans la majorité des cas, RyhB joue un rôle d'inhibiteur de la traduction et son interaction avec les ARNm favorise leurs dégradations [278]. RyhB régule l'expression de ces ARNm cibles par l'intermédiaire de 4 mécanismes distincts (Figure 22 B, C, D et E) [5].

Le premier mécanisme d'action de RyhB est d'inhiber la traduction de l'ARNm cible et d'induire sa dégradation par le dégradosome et la RNase E. Un exemple de cette régulation est la régulation du gène *sodB* par RyhB [280]. Dans un premier temps, l'appariement du petit ARN RyhB, par l'intermédiaire d'Hfq, au niveau du RBS de l'ARNm *sodB* inhibe l'initiation de sa traduction. Par la suite, le dégradosome est recruté par le complexe RyhB / Hfq / *sodB*. Ce dernier réalise une première coupure de l'ARNm 350nt en aval du site d'appariement. Cette coupure produit une extrémité 5' phosphate (5' -P) qui est reconnu par la RNase E ainsi que par différentes exonucléases. Ces différentes enzymes vont entraîner une dégradation rapide de l'ARNm *sodB* (Figure 22 B) [280].

Le second mécanisme d'action de RyhB est de contrôler de manière différentielle l'expression des gènes d'un opéron [281]. En effet, RyhB va inhiber l'expression des gènes *iscSUA* de l'opéron *iscRSUA* sans altérer l'expression du gène *iscR*. RyhB s'apparie au niveau de la région intergénique entre *iscR* et *iscS* de l'opéron *iscRSUA*. Cet appariement induit la dégradation du transcrit en aval, *iscSUA*. Cependant, *iscR* est protégé de la dégradation par la présence d'une structure secondaire située dans la région 3' du transcrit (Figure 22 C) [281].

Le troisième mécanisme correspond à l'inhibition indirecte de la traduction de certains gènes [282]. C'est par ce mécanisme que RyhB régule l'expression de son régulateur Fur. L'ARNm *fur* est co-transcrit avec une ORF située tout juste en amont de *fur*. Cet ORF, appelé *uof* pour *upstream of fur*, est la cible de RyhB qui s'apparie au niveau de cette région du transcrit. Cela a pour effet de bloquer la traduction de *uof*, diminuant ainsi celle de *fur*, et d'induire une déstabilisation du transcrit *uof-fur* (Figure 22 D) [282].

À l'inverse de tous ces mécanismes, le dernier mécanisme d'action de RyhB est d'activer la traduction de l'ARNm cible [3]. C'est le cas de la régulation de l'ARNm *shiA* par RyhB. En absence du petit ARN régulateur, la région 5' UTR de *shiA* forme une structure double brin emprisonnant le RBS. Cette structure empêche la sous-unité 30S du ribosome d'accéder à la séquence SD et donc d'initier la traduction. Lorsque RyhB est exprimé, son appariement avec la région 5' UTR libère le RBS et permet au ribosome d'initier la traduction (Figure 22 E) [3].

4.4.2) GcvB et les acides aminés

Les acides aminés sont les briques essentielles à la synthèse des protéines. Chez la bactérie, les acides aminés sont synthétisés à partir de différentes sources d'azote ou bien directement importé du milieu extérieur par différents transporteurs spécialisés. Ces derniers vont transporter les acides aminés du milieu extérieur vers le cytoplasme cellulaire afin de les faire rentrer dans la synthèse des protéines. Ceci permet à la cellule d'économiser l'énergie nécessaire à la synthèse de ces derniers. Ces différents mécanismes, transports et synthèses des acides aminés, sont très régulés par la cellule. Cette régulation se fait par l'intermédiaire de nombreux mécanismes qui vont moduler l'expression de ces différents gènes en fonction des besoins métaboliques et de la disponibilité des sources d'azotes. Parmi ces mécanismes, un petit ARN régulateur joue un rôle prépondérant : GcvB.

GcvB (GcvA-regulated sRNA B) est un petit ARN régulateur d'une taille de 200 nucléotides [195]. C'est un petit ARN régulateur Hfq-dépendant régulant un grand nombre de cibles impliquées dans le transport d'acides aminés, de dipeptides et d'oligopeptides [195,250,283-285]. Il contribue à la régulation de certains gènes responsables de la synthèse d'acides aminés et dans l'expression de facteurs de transcription [250,251,286].

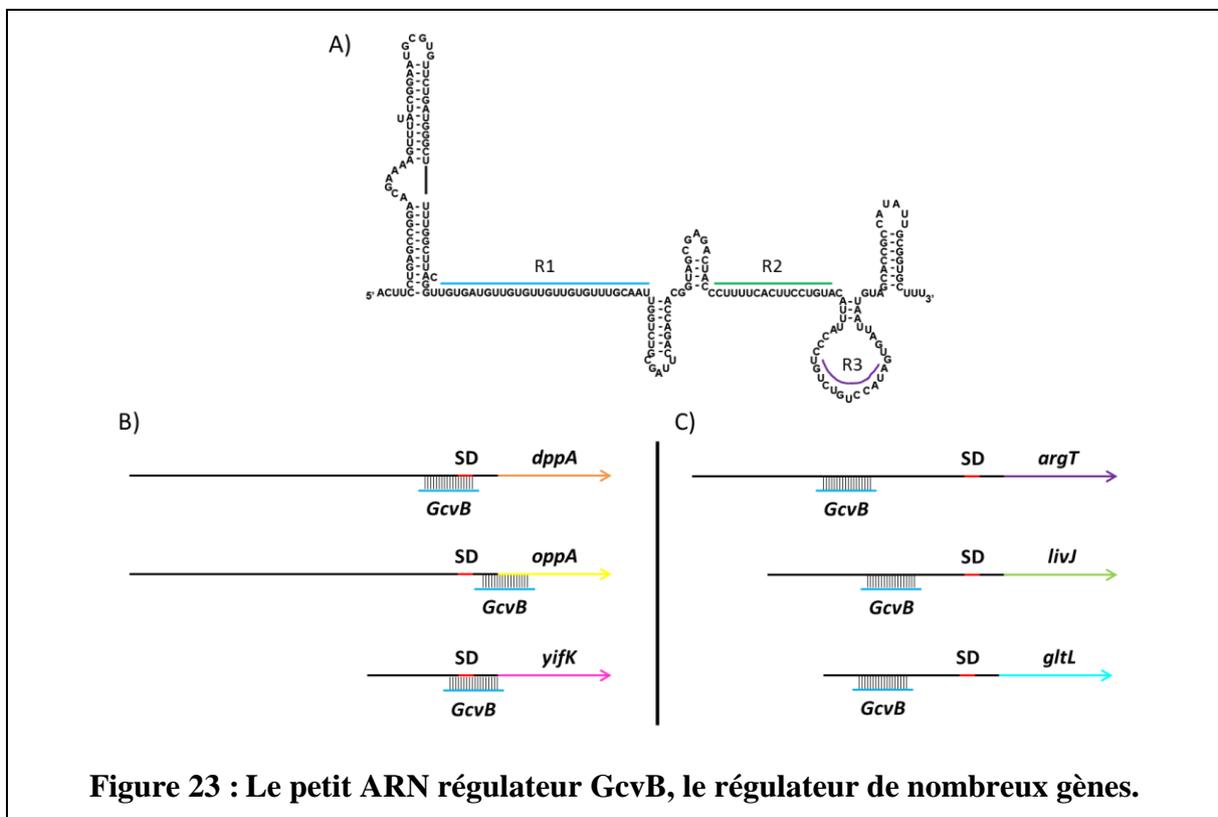


Figure 23 : Le petit ARN régulateur GcvB, le régulateur de nombreux gènes.

Introduction

A) Structure secondaire du petit ARN GcvB. Ce dernier possède trois régions d'appariement aux ARNm nommés R1, R2 et R3. Ces régions sont représentées surlignées en bleu, vert et violet respectivement. B) Premier mécanisme de régulation des ARNm par le petit ARN régulateur GcvB. La liaison de GcvB au niveau du site de fixation des ribosomes ou aval de ce site entraîne l'inhibition de la traduction de ces ARNm de manière directe. Cela est le cas pour les ARNm *dppA*, *oppA* et *yifK*. C) Second mécanisme de régulations des ARNm par le petit ARN régulateur GcvB. La fixation de GcvB sur l'ARNm en amont du site de fixation des ribosomes entraîne une inhibition de la traduction des ARNm à distance. Cela est le cas pour les ARNm *argT*, *livJ* et *gltL*.

GcvB est transcrit de façon divergente du gène *gcvA*. Son expression est régulée par plusieurs systèmes dans la cellule, notamment par les protéines GcvA et Lrp (Leucine Responsive Protein) [32,287]. GcvA est un régulateur transcriptionnel impliqué dans le système de dégradation de la glycine [288]. En absence de glycine, GcvA est inactivé par l'intermédiaire de GcvR [289]. En présence de glycine, cette dernière se lie à GcvR et qui libère GcvA. GcvA induit alors l'expression de GcvB ainsi que du système de dégradation de la glycine [195,288]. L'expression de GcvB est également régulée par l'action de Lrp. C'est un régulateur transcriptionnel majeur, régulant l'expression d'environ 10 % des gènes de *E. coli* [290]. Il contrôle l'expression de gènes impliqués dans le transport et le métabolisme des acides aminés, mais également des gènes impliqués dans la formation des pilis [291,292]. Lrp régule négativement GcvB en inhibant sa transcription [286]. Un des rôles physiologiques supposés de GcvB est de limiter les dépenses énergétiques de la cellule en synthétisant des protéines inutiles [286]. En effet, GcvB est fortement exprimé en phase exponentielle de croissance et en milieu riche [198,250]. Dans ces conditions, les différents métabolites nécessaires à la croissance bactérienne sont présents en abondance. Il n'est donc pas nécessaire à la cellule d'exprimer en abondance les différents transporteurs d'acides aminés et de gène de synthèse d'acides aminés.

GcvB est un petit ARN très conservé chez les bactéries à Gram négatif, notamment dans les régions impliquées dans les appariements avec les ARNm cibles (Figure 23 A). En effet, il a pu être identifié 3 régions d'appariements distincts (R1 à R3) aux ARNm. La principale région est R1. Il s'agit d'une région d'ARN riche en G/U avec lesquelles vont s'apparier la majorité des ARNm cibles de GcvB. La seconde région, R2, riche en U permet la régulation de l'ARNm *cycA* codant un transporteur d'alanine, de sérine et de glycine [286,293]. La dernière région R3 est, quant à elle, impliquée dans la régulation de l'ARNm

Introduction

phoP codant pour PhoP, composant du système de régulation à deux composants PhoP/PhoQ [251]. Il a également été montré que GcvB régule négativement l'expression de l'ARNm *lrp* sans que la région impliquée dans cette régulation n'ait pu être identifiée [286].

GcvB est un régulateur traductionnel qui va moduler l'expression de ces ARNm cibles en s'appariant avec ces derniers par l'intermédiaire d'Hfq [284,285]. Majoritairement, il induit l'inhibition de l'initiation de la traduction par plusieurs mécanismes.

Le premier mécanisme de GcvB pour inhiber la traduction est de s'apparier à sa cible au niveau du RBS ou du codon d'initiation de l'ARNm cible (Figure 23 B). Cette action empêche le ribosome de se fixer à l'ARNm et d'initier la traduction. Ce mécanisme est à l'origine de la régulation de *yifK*, *cycA*, *oppA*, *dppA* et *sstT* [32,283,294,295].

Le second mécanisme de GcvB consiste à s'apparier à la région 5' UTR de l'ARNm cible et d'induire à distance une inhibition de la traduction (Figure 23 C). En effet, GcvB s'apparie à des séquences proches de la région de démarrage de la traduction, mais également à des séquences relativement éloignées de ce dernier (50 nucléotides). Cet appariement entraîne une inhibition de la traduction des ARNm, mais le mécanisme sous-jacent à cette régulation n'a pas encore été élucidé. L'hypothèse proposée pour expliquer cette inhibition est que l'appariement de GcvB à l'ARNm au niveau de séquence riche en A/C réprimerait un activateur traductionnel présent dans la région 5' UTR de l'ARNm. De plus, cet appariement formerait également un signal inhibiteur de la fixation des ribosomes [250]. Ce type de régulation est impliqué dans la régulation de *argT*, *csgD*, *livJ*, *gltL* [250,296].

4.4.3) ChiX et les chitosucres

Les bactéries peuvent utiliser différents composés naturels disponibles dans l'environnement comme source de carbone et/ou source d'azote. Les sucres, produits par les plantes, les animaux, les champignons et divers autres micro-organismes, constituent une part importante des composés présents dans les milieux naturels. La capacité des bactéries d'utiliser plusieurs sources de sucres présente pour ces dernières un avantage compétitif pour croître dans un environnement concurrentiel [297]. De nombreuses bactéries sécrètent des hydrolases extracellulaires qui dégradent les polysaccharides d'origine naturelle tels que l'amidon, la cellulose ou la chitine. Cette dégradation va engendrer la formation de composé mono -, di- et oligosaccharides qui sont ensuite absorbés et métabolisés par les bactéries. Parmi ces différents polysaccharides, la chitine est une des sources les plus importantes dans le domaine du vivant derrière la cellulose. Elle se retrouve notamment dans les cuticules externes des insectes, des carapaces des crustacés ou encore dans la paroi de certains

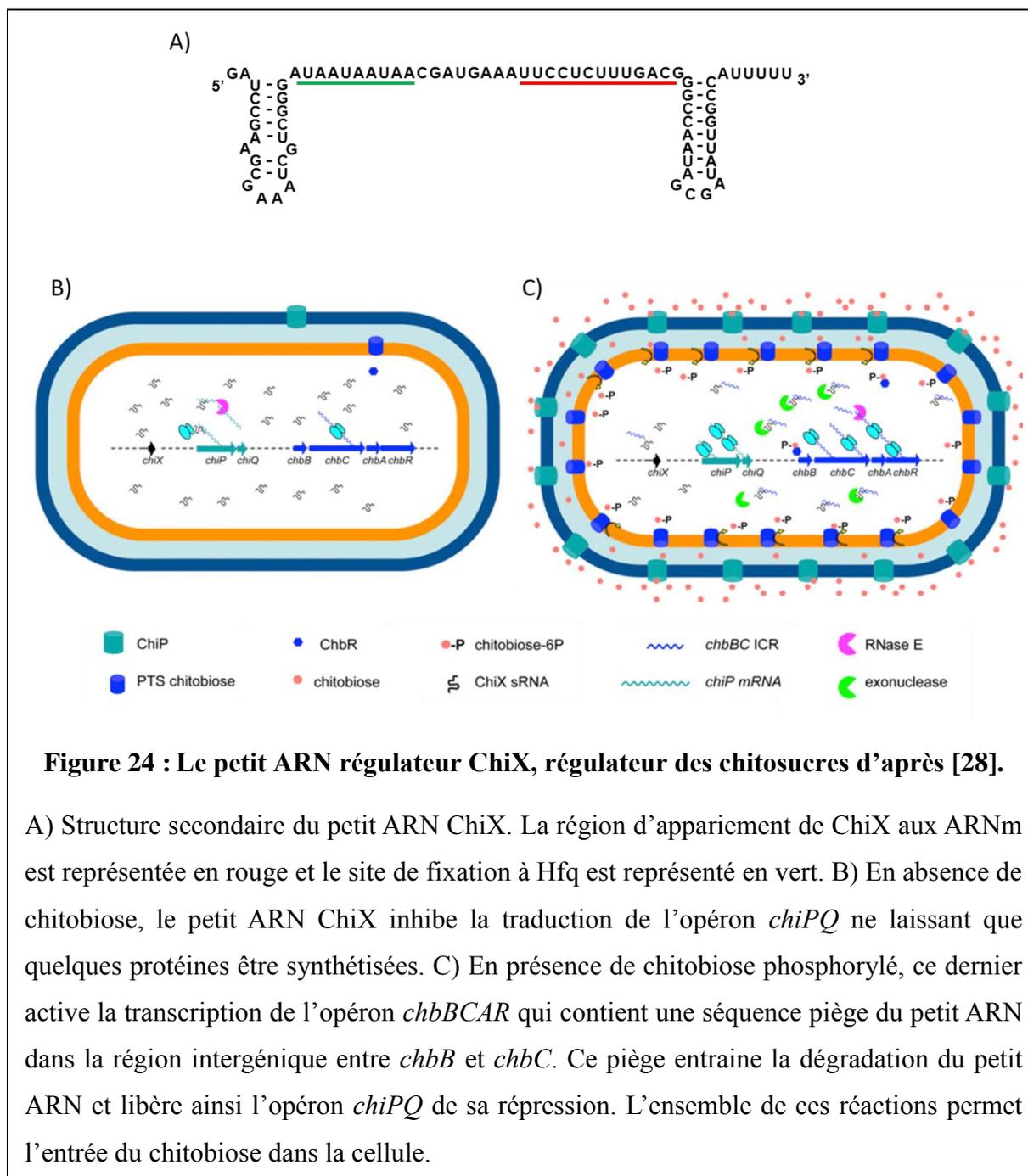
Introduction

champignons [298]. Malgré la présence d'un gène de chitinase, *E. coli* à l'inverse de *S. Typhimurium* est incapable de dégrader la chitine [299,300]. Cependant, ces deux espèces sont capables d'utiliser les résidus de dégradation de la chitine comme le chitobiose, le chitotriose et le N-acétylglucosamine [301].

Une des étapes clé pour leurs utilisations consiste à faire passer ces résidus du milieu extérieur jusqu'au cytoplasme à travers la paroi et la membrane plasmique. Chez *S. Typhimurium*, ce mécanisme est lié aux opérons *chiPQ* et *chbBCARFG* qui vont permettre le passage de ses résidus de chitine au travers de la paroi puis de la membrane plasmique respectivement. L'opéron *chiPQ* code pour la chitoporine *ChiP* (*YbfM*) permettant le passage du chitobiose du milieu extérieur vers le périplasme et une protéine *ChiQ* de fonction encore inconnu [28]. Quant à l'opéron *chbBCARFG*, il code pour des enzymes jouant un rôle dans le transport et l'utilisation du chitobiose [302]. L'expression de ses opérons est induite par la présence de chitobiose [28,302]. Cette régulation se fait par l'intermédiaire de différentes protéines telles que *NagC*, *ChbR* et *CAP*, mais également par le petit ARN régulateur *ChiX* (*MicM* ou *RybC*) [28,302-304].

ChiX est un petit ARN régulateur de 80 nucléotides dont l'action est Hfq-dépendante [28,303]. *ChiX* réprime fortement l'expression de *chiPQ* alors qu'il régule positivement l'expression de *tnaA*, *ydcN* et *nirC* [28,303,305]. À l'inverse de beaucoup de petits ARN régulateurs, *ChiX* est exprimé de manière constitutive par la cellule, mais sa stabilité est régulée en présence de chitobiose. La régulation de et par *ChiX* présente des mécanismes inédits qui vont vous être présenté ci-dessous (Figure 24 B et C).

Comme dit précédemment, l'expression de *ChiX* est constitutive, mais en présence de chitobiose, il n'est plus détecté dans la cellule [28]. Ce phénomène pourrait s'expliquer par deux mécanismes relativement simples. Une des explications pourrait être que le chitobiose réprime directement l'expression de *ChiX* par un riboswitch soit par l'intermédiaire d'une protéine régulatrice se fixant sur un opérateur ou alors que le chitobiose induit l'expression de l'opéron *chiPQ* en quantité suffisante pour titrer et dégrader *ChiX* [28]. Or, il n'en est rien. Par contre, le chitobiose induit l'expression de l'opéron *chbBCARFG* [302]. Cet opéron, essentiel pour l'utilisation du chitobiose par la cellule, contient dans la région intergénique (IG) entre *chbB* et *chbC* une région ARN « leurre » présentant une région d'appariement à *ChiX* [28,305]. *ChiX*, en se liant à ce leurre, va être dégradé par la cellule [28,305]. Ce mécanisme permet d'expliquer comment la présence de chitobiose réprime le niveau de *ChiX* (Figure 24 C).



La régulation de *chiPQ* par ChiX se fait, là aussi, par des mécanismes inédits : la polarité induite par un petit ARN. En absence de chitobiose, ChiX et *chiPQ* sont tous les deux exprimés dans la cellule. ChiX réprime la traduction de *chiP* en s'appariant au niveau de sa séquence RBS. Cet appariement bloque ainsi l'initiation de la traduction de ChiP en empêchant la sous-unité 30S de se lier à l'ARNm [28,303,305]. Ce type de régulation entraîne généralement une dégradation de l'ARNm [280,295]. Or dans notre cas, cette régulation altère l'expression du second cistron de l'opéron *chiPQ* par un mécanisme de terminaison prématuré de la transcription Rho-dépendant [306]. En effet, le couplage transcription / traduction

Introduction

protège l'ARNm en cours de synthèse de différentes protéines comme les RNases ou Rho. Cette protection est due à un « train » de ribosomes qui suit l'ARN polymérase. Or en présence de ChiX, l'appariement de ce dernier sur l'ARNm *chiPQ* inhibe l'initiation de la traduction de l'ARNm provoquant ainsi un découplage transcription/traduction [306]. L'ARNm en cours de transcription n'est donc plus protégé par les ribosomes. Rho se lie alors à l'ARNm *chiPQ* au niveau d'un site *rut* cryptique normalement masqué par les ribosomes [306]. L'interaction de Rho avec l'ARNm entraîne une terminaison prématurée de la transcription inhibant ainsi l'expression de *chiQ*. Cette terminaison prématurée de la transcription dépend à la fois du facteur Rho, mais également de la protéine NusG [306].

Tous ces mécanismes de régulation des ARNm par des petits ARN régulateurs présentés précédemment sont dépendants de la protéine chaperonne d'ARN : Hfq.

5. La protéine chaperonne d'ARN Hfq

La protéine Hfq a été découverte pour la première fois chez *E. coli* [307]. Elle fut d'abord identifiée comme un facteur protéique de l'hôte nécessaire à la réplication du brin d'ARN positif du phage Q β , ce qui lui valut son nom : Host Factor required for phage Q β RNA replication [308]. À l'inverse de la réplication du brin d'ARN négatif, la réplication fidèle du brin d'ARN positif nécessite Hfq et la protéine ribosomique S1 [309,310]. Chez *E. coli*, la délétion du gène *hfq* est très délétère pour la cellule sans pour autant être létal [311]. Cette délétion impacte aussi bien la croissance que la forme des bactéries, altère sa résistance à différents stress, modifie la composition protéique de sa membrane, etc. [311-314]. Des études bioinformatiques ont montré que le gène *hfq* est présent dans près de la moitié des différentes espèces séquencées, sans distinction entre bactéries à Gram positif et négatif [315]. Si Hfq est essentiel pour la régulation des ARNm par les petits ARN régulateurs chez les bactéries à Gram négatif, il ne l'est pas forcément pour les bactéries à Gram positif [316,317]. De plus, des expériences de complémentation ont montré que la protéine Hfq de *S. Typhimurium* ne peut être remplacée par sa protéine homologue de *S. aureus* ou de *Borrelia burgdorferi* [318]. A contrario, la protéine Hfq d'*E. coli* peut être complétement par la protéine Hfq de *Clostridium difficile* pour la plupart de ces fonctions [319].

5.1) Expression et régulation

L'expression du gène *hfq* est relativement complexe et dépendant d'un certain nombre de facteurs transcriptionnels et post-transcriptionnels. Le gène *hfq* fait partie du superopéron *amiB-mutL-miaA-hfq-hflX-hflK-hflC* [311]. Ce dernier contient quatre promoteurs reconnus par le facteur sigma de ménage σ^D ainsi que par trois promoteurs dépendant du facteur σ^H en réponse à un choc thermique [320]. Les promoteurs reconnus par σ^H servent notamment à maintenir un niveau d'expression de la protéine Hfq stable dans des conditions de stress. En effet, la présence de protéine Hfq fonctionnelle est considérée comme essentielle pour la survie des bactéries à des températures supérieures à 45°C [320]. De plus, la quantité de protéine Hfq est régulée par elle-même [321]. En effet, Hfq régule négativement sa propre expression en se liant à son ARNm. Il interagit avec deux sites distincts A et B présents sur la région 5' UTR de son ARNm. Le site A est une région riche en uracile en amont d'une tige boucle et le site B est une région riche en adénine au niveau du RBS. Ces interactions induisent une inhibition de l'initiation de la traduction en bloquant l'accès du RBS à la sous-

Introduction

unité 30S du ribosome [322]. L'expression d'Hfq est également régulée par CsrA qui va inhiber la traduction de l'ARNm [323]. CsrA se lie à l'ARNm au niveau du même site de fixation d'Hfq sur le RBS. Ceci entraîne l'inhibition de la traduction de l'ARNm sans entraîner sa dégradation [323]. Malgré ces différentes régulations, Hfq est fortement présent dans la cellule. Dans des conditions optimales, Hfq est présent entre 50 000 et 60 000 exemplaires, soit environ 10 000 hexamères [324].

5.2) Structure

La structure de la protéine Hfq est caractérisée par une hélice α en N-terminal suivie par 5 feuillets β repliés sur eux-mêmes, dont la topologie est $\beta 5\alpha 1\beta 1\beta 2\beta 3\beta 4$ (Figure 25 A). C'est une protéine cytosolique qui s'oligomérise sous forme d'un hexamère en forme d'anneau. Hfq, sous sa structure quaternaire à un diamètre d'environ 70Å, une épaisseur de 25Å et d'un pore interne de 8 à 12Å [21,325]. Les interactions entre les différents protomères d'Hfq permettent de stabiliser la structure quaternaire de la protéine. Notamment, la région d'interaction entre deux protomères est formée, en partie, par des interactions hydrophobes entre les résidus de l'hélice α d'un protomère et des feuilles $\beta 2$ et $\beta 3$ d'un autre protomère. En outre, les interactions entre les feuillets $\beta 4$ et le feuillet $\beta 5$ du protomère suivant stabilisent également la structure. Ces différentes interactions présents sur chaque protomère permettent de former une structure continue composée de 30 feuillets β le long de l'hexamère permettant de le stabiliser [21,325]. La structure tridimensionnelle de la protéine Hfq peut être divisée en 4 zones distinctes : la face proximale arborant l'hélice α , la face distale, le pore central et l'anneau externe (Figure 25 B). Chacune de ses zones présente un intérêt pour les différentes fonctions de la protéine que nous verrons ultérieurement.

Hfq est une protéine faisant partie de la superfamille des SM / L-SM (Like-SM) protéines [326,327]. Cette superfamille de protéine est présente aussi bien chez les organismes eucaryotes que procaryote. Hfq possède les deux motifs très conservés de cette famille séparés par une région variable : les motifs SM1 et SM2. Le motif SM1 englobe les 3 premiers feuillets β ($\beta 1\beta 2\beta 3$), alors que le motif SM2 est composé du feuillet $\beta 4$ et $\beta 5$ [328,329]. À l'inverse des bactéries où Hfq forme un homohexamère, les protéines SM et L-SM présentent chez les eucaryotes et les archées forment des hétéroheptamère composées de différentes protéines de type SM et L-SM [330-332]. De même que chez les procaryotes, cette superfamille de protéine est impliquée dans plusieurs aspects du métabolisme des ARN comme l'épissage ou la dégradation des ARNm [333].

Introduction

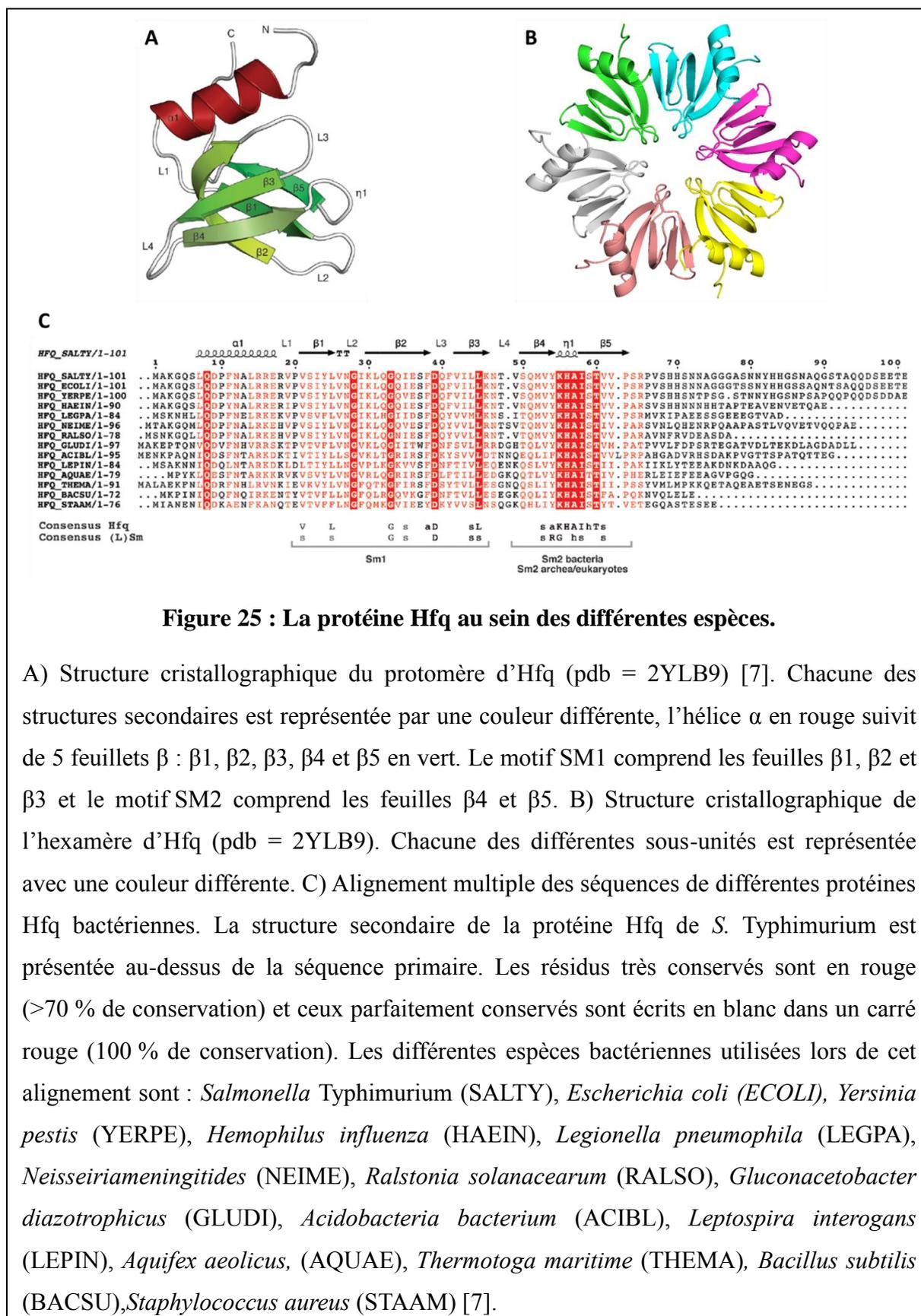


Figure 25 : La protéine Hfq au sein des différentes espèces.

A) Structure cristallographique du protomère d’Hfq (pdb = 2YLB9) [7]. Chacune des structures secondaires est représentée par une couleur différente, l’hélice α en rouge suivit de 5 feuillets β : $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$ et $\beta 5$ en vert. Le motif SM1 comprend les feuilles $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 3$ et le motif SM2 comprend les feuilles $\beta 4$ et $\beta 5$. B) Structure cristallographique de l’hexamère d’Hfq (pdb = 2YLB9). Chacune des différentes sous-unités est représentée avec une couleur différente. C) Alignement multiple des séquences de différentes protéines Hfq bactériennes. La structure secondaire de la protéine Hfq de *S. Typhimurium* est présentée au-dessus de la séquence primaire. Les résidus très conservés sont en rouge (>70 % de conservation) et ceux parfaitement conservés sont écrits en blanc dans un carré rouge (100 % de conservation). Les différentes espèces bactériennes utilisées lors de cet alignement sont : *Salmonella Typhimurium* (SALTY), *Escherichia coli* (ECOLI), *Yersinia pestis* (YERPE), *Hemophilus influenza* (HAEIN), *Legionella pneumophila* (LEGPA), *Neisseiriameningitides* (NEIME), *Ralstonia solanacearum* (RALSO), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (GLUDI), *Acidobacteria bacterium* (ACIBL), *Leptospira interrogans* (LEPIN), *Aquifex aeolicus*, (AQUAE), *Thermotoga maritime* (THEMA), *Bacillus subtilis* (BACSU), *Staphylococcus aureus* (STAAM) [7].

Introduction

La première structure cristallographique de la protéine Hfq a été obtenue chez la bactérie à Gram positif *Staphylococcus aureus* [325]. Par la suite, de nombreuses autres structures de la protéine Hfq, seules ou liées à des ARN, ont été obtenues à partir de différentes espèces bactériennes aussi bien à Gram positif comme *Pseudomonas aeruginos*, *Bacillus subtilis* ou *Listeria monocytogenes* qu'à Gram négatif comme *Escherichia coli*, *S. Typhimurium* ou *Pseudomonas aeruginosa* [21,31,325,334-342]. Bien que les protéines Hfq soient structurellement très proches entre les différences espèces bactériennes, il existe de nombreuses différences entre ces dernières. Parmi ces différences, la variabilité en taille du domaine C-Terminal de la protéine en est un bon exemple. Bien que le domaine N-Terminal (Acide aminée 1 à 65), contenant les motifs SM1 et SM2, soit extrêmement bien conservé entre les différentes espèces bactériennes, la taille du domaine C-Terminal varie de 7 acides aminés chez *B. subtilis* à 37 chez *E. coli* (Figure 25 C) [7,315]. Un second exemple de ses différences peut se faire au niveau des charges électrostatiques du domaine N-terminal des différentes protéines Hfq. Ces différences de charges sont principalement présentes au niveau de la face latérale ainsi que sur la face distale de la protéine [343].

5.3) Interaction avec les ARN

5.3.1) Site d'interaction

Comme les autres membres de la famille SM / L-SM, Hfq interagit très fortement avec l'ARN. Ces interactions se font principalement au niveau de séquence poly(U) ou ayant un motif répété (ARN)_n en amont et/ou en aval d'une structure en tige boucle [7,344,345]. En fonction de la séquence de l'ARN, la fixation d'Hfq sur ce dernier peut se faire au niveau de trois régions spécifiques : la face distale, la face proximale et l'anneau externe (Figure 26) [7].

5.3.1.1) Interaction avec la face proximale

La face proximale de la protéine Hfq correspond à la surface de la protéine présentant l'hélice α . Il a pu être montré lors d'études de cristallographie que cette région de la protéine Hfq se lie de préférence avec des séquences d'ARN riche en U [325]. En effet, au cours de cette étude, la protéine Hfq de *Staphylococcus aureus* a été cristallisée avec un oligonucléotide de séquence 5' -AUUUUUG-3' (Figure 26 A). L'analyse de ce cristal a pu montrer que cet ARN se lie en anneau à la surface proximale de la protéine, plus précisément au niveau du pore central de la protéine. Cette liaison se fait par l'intermédiaire des 6 premiers nucléotides de l'ARN qui vont chacun interagir avec un des protomères de la protéine,

Introduction

laissant la guanine en 3' exposée. D'autres structures de protéines Hfq de *S. aureus* ou d'*E. coli* en complexe avec des ARN polyU ont par la suite été obtenus [31,339,342,346]. Ces structures montrent un mécanisme similaire de liaison de l'ARN au niveau du pore central où un nucléotide interagit avec un protomère d'Hfq. Plus précisément, ces interactions se font au niveau principalement avec les acides aminés aromatiques (Phe42 pour *E. coli* et tyrosine 42 (Tyr42) pour *S. aureus*) présents sur chaque protomère au niveau du pore central. Plusieurs autres acides aminés présents dans la même région permettent de stabiliser ces interactions comme la glutamine 8 (Gln8), la lysine 41 (Lys41), Lys57 et l'histidine 58 (His58). D'autres études incluant des techniques de mutagenèse ont permis de montrer l'implication d'acide aminé présent dans d'autres régions de la face proximale d'Hfq impliqué dans les interactions avec les ARN comme l'acide aspartique 9 (Asp9), la leucine12 (Leu12), la Phe39, l'Asp40 et la Tyr55 [347-350].

5.3.1.2) Interaction avec la face distale

La face distale de la protéine Hfq correspond à la face opposée à la face proximale. Cette face de la protéine Hfq a une forte affinité pour les séquences d'ARN riche en purines. En effet, l'affinité d'Hfq pour les séquences riches en adénosine est connue depuis 1980 [351]. Depuis, les différentes études réalisées chez *E. coli* ont permis d'affiner ce résultat jusqu'à identifier un motif répété (ARN)_n (A, Adenosine ; R, Purine ; N, tous les nucléotides) [10,253,346,352,353]. La cristallisation de protéine Hfq avec des séquences d'ARN polyA ou ayant le motif (ARN)_n a permis de confirmer l'affinité de la face distale pour ce type de séquence ainsi que de comprendre comment cette séquence d'ARN se lie à la protéine Hfq (Figure 26 C) [31,336,346,354].

Chez *E. coli*, ces interactions se font par l'intermédiaire de trois sites présent sur la face distale de la protéine et interagissant chacun avec un des nucléotides du motif (ARN)_n. Le site A, interagissant avec l'Adénosine, est situé entre les feuillets $\beta 2$ et $\beta 4$. Cette liaison est également stabilisée par l'intermédiaire de liaison hydrogène entre le résidu Gln33 et la base adénine ainsi que par des interactions polaires avec les résidus Leu32 et la Gln52. Le site R est dans une poche hydrophobe formé entre les feuillets $\beta 4$ et $\beta 5$ de deux différents protomères d'Hfq. Cet interstice permet une forte interaction entre la base purine du nucléotide et les résidus Tyr25, Leu26, isoleucine 30 (Ile30) et Leu32. De surcroît, des interactions entre ce nucléotide et le résidu Gln52 permettent de lier les sites A et R. Le site R est présent sur la surface de la face distale de la protéine. Il discrimine faiblement les séquences d'ARN et semble être le point d'entrée et de sortie des ARN interagissant avec la

Introduction

face distale de la protéine Hfq (Figure 26 C). De plus des études complémentaires de mutagenèse ont permis de confirmer l'importance de certains de ses acides aminés dans la stabilisation des interactions entre les ARN et Hfq [347,349].

Bien que la protéine Hfq de bactéries à Gram positive comme *S. aureus* et *B. subtilis* interagissent également avec les ARN polyA avec leur face distale, le motif d'ARN identifié est différent et de séquence $(RN)_n$ (R, Purine ; N, tous les nucléotides). Cette différence dans la séquence de reconnaissance est due au fait que la face distale d'Hfq des bactéries à Gram positives ne possède que deux sites d'interaction : le site R et le site L [336,355]. Le site R, ayant une forte affinité pour les purines et surtout l'adénosine, forme une poche entre les feuillets β_2 et β_2' de différent protomère d'Hfq. Cette liaison entre Hfq et la purine se fait via des interactions entre cette dernière et les résidus Phe25 du feuillet β_2 du premier protomère ainsi que des résidus Phe26, Leu27, Phe30 et la méthionine 32 (Met32) du feuillet β_2 du second protomère. De plus, différents types d'interactions chimiques vont permettre de stabiliser cette liaison, notamment avec l'asparagine 28 (Asn28) et la Gly29. Le site L se trouve au niveau du résidu Gln31 présent sur la face distale de la protéine. Ce dernier interagit avec le ribose du nucléotide adjacent à l'adénosine entraînant un changement de sa conformation et permettant une stabilisation de la liaison. D'autres interactions ont également lieu avec le résidu arginine 32 (Arg32) chez *B. subtilis* et le résidu Lys33 chez *S. aureus* permettant là aussi de stabiliser les interactions entre l'ARN et la protéine Hfq.

5.3.1.3) Interactions avec l'anneau externe

À l'inverse des faces distales et proximales, les interactions entre les ARNs et l'anneau externe de la protéine n'ont pas été découvertes par des études de cristallographie, mais par des expériences de mutagenèse. Ces différentes expériences ont permis d'identifier que ces interactions étaient principalement dues à une triade d'arginine présente sur cette surface : les résidus Arg16, Arg17 et Arg19 (Figure 26 B) [337,349,356,357]. Cette triade interagissait avec les séquences d'ARN polyU et aurait pour but de stabiliser le complexe ARN/Hfq ainsi que de faciliter les interactions ARNm/ ARNs [357,358]. Récemment, il a également pu être montré que les résidus acides présents dans la région proche de la triade d'arginine joué un rôle dans la sélectivité de cette dernière pour les ARN [359,360].

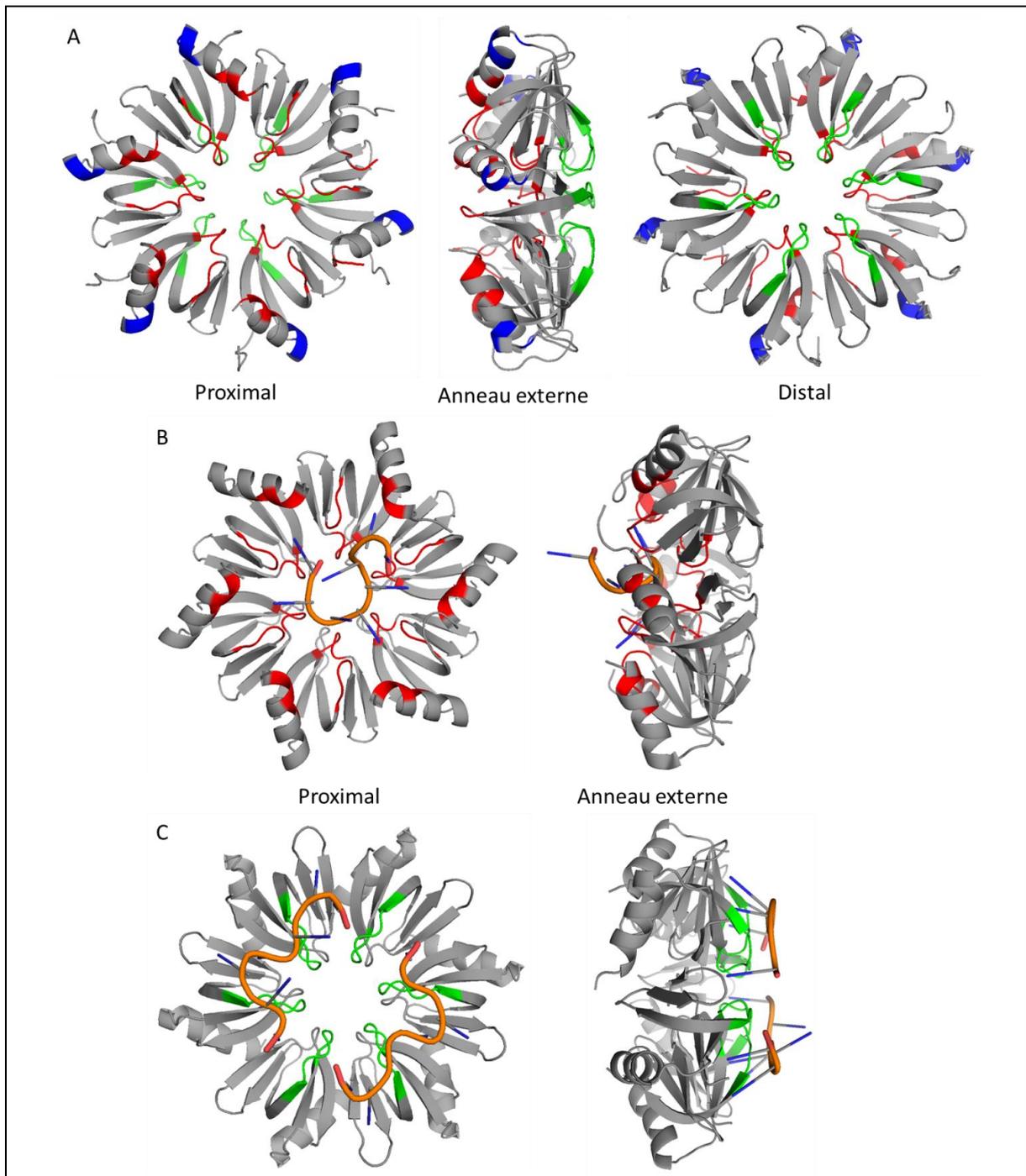


Figure 26 : Surface d'interaction entre Hfq et les ARN

A) Structure cristallographique de l'hexamère d'Hfq en vue proximal, de l'anneau externe et distal (PDB = 1HK9) [21]. Les sites d'interactions avec les ARNs sont représentés en couleur : Rouge pour la face proximale, Bleu pour l'anneau externe et Vert pour la face distal. B) Structure cristallographique de l'hexamère d'Hfq lié à un ARN A (U)₆ A en vue proximal et de l'anneau externe (PDB = 3RER) [30]. C) Structure cristallographique de l'hexamère d'Hfq lié à un ARN poly (A)₇ en vue distal et de l'anneau externe (PDB = 4HT8) [31].

5.4) Hfq et l'inhibition du facteur Rho

Bien que la majorité des fonctions connues de la protéine Hfq soit liée à son rôle dans la régulation post-transcriptionnelle, Hfq est également capable d'agir de manière transcriptionnelle et plus précisément au niveau de la terminaison de la transcription Rho-dépendante. Hfq est capable de se lier directement au facteur Rho et d'inhiber ses fonctions ATPases, sa capacité à séparer les duplex ainsi que son activité terminateur de la transcription [361]. Lors de l'étude du terminateur *λtRI*, Hfq inhibe la terminaison en se liant à la fois au facteur Rho et au transcrit dans une séquence riche en A/U juste en amont du site *rut*. L'activité antiterminatrice de la transcription d'Hfq peut varier en fonction de différents cofacteurs comme NusG qui vont affecter la liaison d'Hfq avec le facteur Rho ou le transcrit [361].

5.5) Hfq et les ribonucléases

La protéine Hfq est connue depuis longtemps pour altérer la stabilité des ARN. Hfq est une protéine capable de se lier aux séquences d'ARN simple brin riche en A/U comme les petits ARN régulateurs ou certains ARNm [257,362,363]. Ceci permet de protéger ces derniers de l'action de la RNase E et des Polynucleotide Phosphorylase (PNPase) [344,364]. En effet, les sites reconnus par la RNase E sur les ARN simple brin ont une séquence similaire à ceux reconnus par Hfq [344]. La fixation d'Hfq sur ces séquences va donc protéger les ARN de la dégradation par la RNase E [284,344,362]. Hfq interagit avec les petits ARN régulateurs au niveau de leurs terminateurs Rho indépendant [339]. Dans ces conditions, l'extrémité 3' polyU des petits ARN est protégée de l'activité de la PNPase par ses interactions avec la protéine Hfq [364]. Hfq est également capable d'interagir avec les extrémités polyadénylées des ARN [365]. Cette interaction va stimuler l'activité de la polyA polymérase I (PAP I) et protéger l'ARN polyadénylé de la dégradation par les exoribonucléases 3'-5' comme la PNPase (Figure 27) [16,362,365-367].

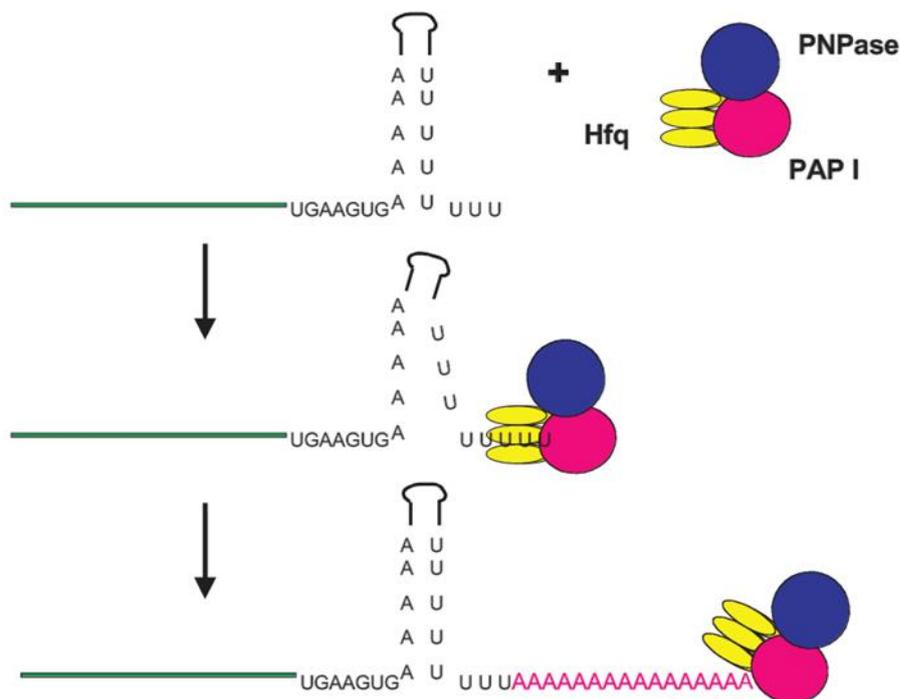


Figure 27 : Représentation schématique de l'action d'Hfq dans la polyadénylation par la PAP I d'après [16].

Un complexe protéique contenant Hfq sous forme d'hexamère, la polyA polymérase I (PAP I) ainsi que la Polynucleotide Phosphorylase (PNPase) se lie à un ARNm à son extrémité 3' au niveau de sa séquence polyU issu d'un terminateur Rho-indépendant. Dans ce modèle, Hfq se lie à la base de la structure en tige boucle du terminateur entraînant une déstabilisation transitoire de ce dernier permettant à la PAP I de réaliser la polyadénylation de l'ARNm.

Hfq est également capable d'induire la dégradation des ARN par l'action des RNases. En effet, de nombreuses études ont pu mettre en évidence des interactions entre Hfq et les différentes ribonucléases [243,368,369]. Ces interactions peuvent faire partie des mécanismes de régulation des ARNm par les petits ARN régulateurs. L'appariement du petit ARN régulateur sur son ARNm cible par l'intermédiaire de la protéine Hfq permettrait un recrutement rapide des ribonucléases conduisant à la dégradation des ARNm [179,280,370].

5.6) Protéine chaperonne

Les protéines chaperonnes d'ARN ont pour activité de faciliter le repliement de l'ARN en empêchant les mauvais repliements ou en réajustant les structures d'ARN mal repliées [371]. Une autre caractéristique des protéines chaperonne d'ARN est de stimuler les liaisons

Introduction

intramoléculaires entre des acides nucléiques complémentaires [372]. Les études sur la réplication de l'ARN du bactériophage Q β ont pu montrer qu'Hfq se liait à la région 3' terminale du brin positif de l'ARN. Cette interaction induit un changement de conformation de cette extrémité qui permet aux réplicases d'initier leurs activités [373]. De plus, de récentes études ont également pu montrer que la fixation d'Hfq sur la région 5' UTR de l'ARNm *rpoS* modifiait sa conformation et facilitait les interactions de cet ARNm avec les petits ARN régulateurs [253,374].

5.7) Régulation des ARNm par les petits ARN régulateurs

Afin d'expliquer au mieux le rôle d'Hfq dans la régulation des ARNm par les petits ARN régulateurs, je vais vous présenter la régulation de l'ARNm *rpoS* par un petit ARN régulateur. En effet, cette régulation fait intervenir l'ensemble des mécanismes d'Hfq.

Tous les changements dans les conditions environnementales telles que la température, le pH, l'osmolarité et la disponibilité des nutriments induisent une réponse adaptée chez la bactérie. Cependant, même une croissance rapide en présence d'une quantité suffisante de nutriments peut conduire à l'induction de stress liés à la production de ROS (Reactive Oxygen Species) par la respiration cellulaire dans les milieux riches [375]. Un des stress les plus communs affectant les bactéries est la diminution de la disponibilité des nutriments. Pour faire face à ce stress, les bactéries ont développé des mécanismes conduisant à un ajustement de la morphologie et de la physiologie de la cellule [376]. La réponse à ce type de stress est dirigée par le facteur sigma alternatif σ^s , codé par le gène *rpoS* [377]. De par son importance, l'expression du facteur σ^s est fortement régulée par la cellule. Cette régulation peut prendre de multiples formes et agir aussi bien sur sa transcription, sa traduction ou sa stabilité. Parmi ces différentes régulations, nous allons nous intéresser à la régulation de la traduction et plus précisément, la régulation de l'initiation de la traduction par l'action conjointe de la protéine Hfq ainsi que du petit ARN régulateur DsrA [378].

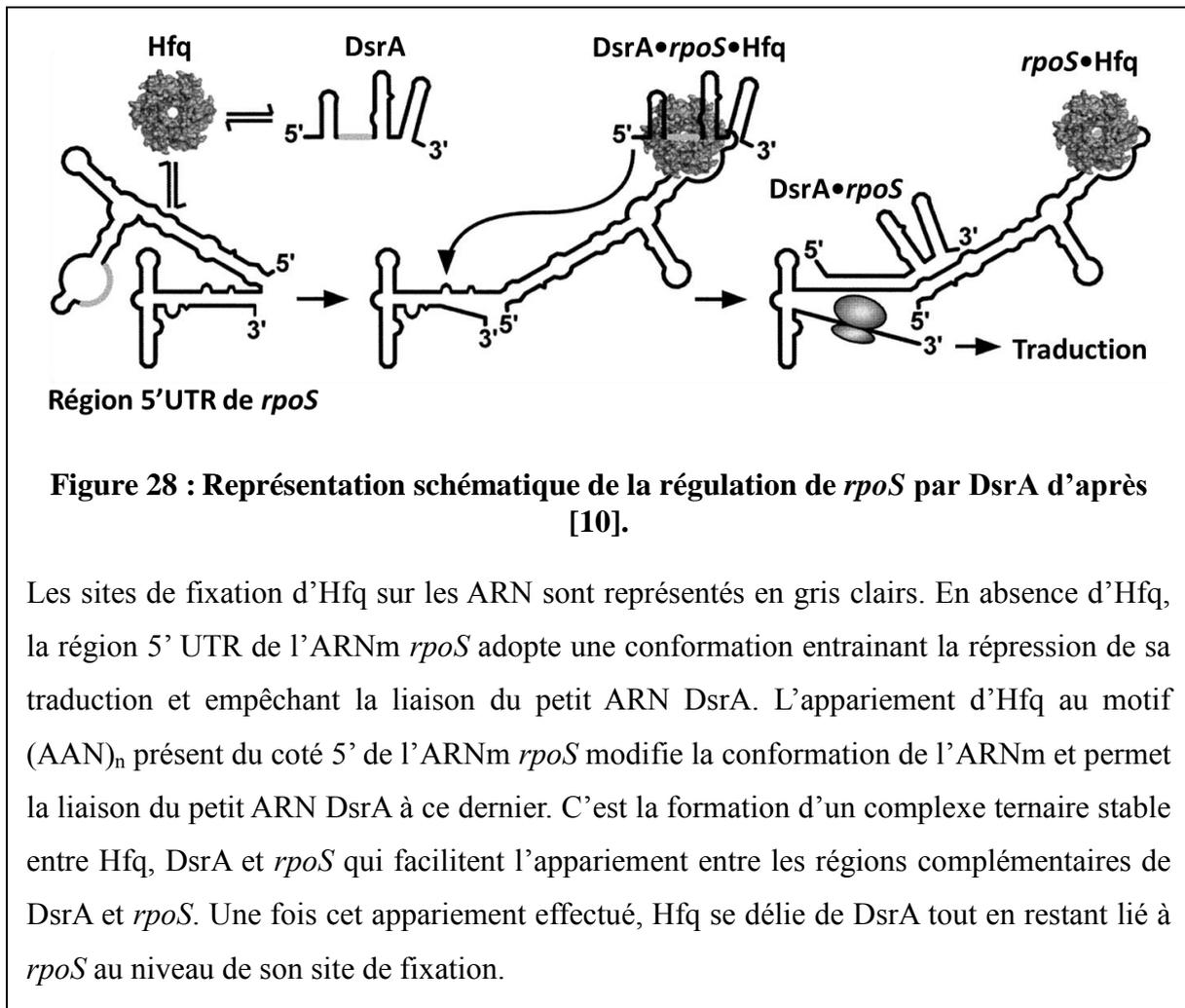
La région 5' UTR de *rpoS* joue un rôle essentiel dans la régulation de la stabilité et de la traduction de l'ARNm. Il s'agit d'une grande région de 567 nucléotides extrêmement bien structurés, notamment par de multiples structures en tige-boucle. Les analyses de la région 5' UTR de *rpoS* ont pu mettre en évidence 3 domaines importants pour la régulation de ce dernier : le domaine 3' inhibiteur, le domaine de liaison à Hfq et le domaine 5' [253]. Le domaine 3' inhibiteur forme une structure en tige-boucle entre la séquence SD et la région

Introduction

d'appariement des petits ARN régulateurs. Ceci provoque l'inhibition de l'initiation de la traduction [197,378-381]. Le second domaine contient le site de fixation à la protéine Hfq. En effet, il s'agit d'une région riche en A qui comprend les motifs (AAN)₄ et A₆. De plus, la séquence de ce domaine suggère que *rpoS* se lie à Hfq au niveau de la face distale de la protéine [7,325]. Le domaine 5' est une région d'ARN stable et très structuré par quatre structures en tige-boucle formant une hélice [253]. La fixation d'Hfq sur le second domaine de l'ARNm *rpoS* entraîne des changements de conformation de la région 5'UTR facilitant les interactions entre la région 5'UTR de *rpoS* et les petits ARN régulateurs [253].

DsrA est un petit ARN régulateur de 85 nucléotides impliqué dans la régulation de l'expression des protéines RpoS et H-NS [196,254]. Son action dans cette régulation est dépendante de la protéine Hfq [382-384]. DsrA est composé d'une succession de trois structures en tige-boucle nommée DI, DII et DIII respectivement. La première structure DI contient la région d'appariement à l'ARNm *rpoS*. Les structures DII et DIII sont, quant à eux, impliquées dans la liaison à la protéine Hfq. En effet, en amont de la structure DII se trouve une région riche en U et la structure DIII est un terminateur Rho indépendant [252,383]. Dans un premier temps, DsrA se lie à Hfq sur sa face proximale. [252] Cette fixation se fait grâce au domaine DIII et notamment à la séquence polyU en 3' du terminateur Rho-indépendant. Par la suite, le domaine DII de DsrA se lie par sa séquence polyU au niveau de l'anneau externe de la protéine Hfq. Cette fixation permet de laisser le domaine DI contenant la séquence d'appariement à *rpoS* libre [252].

La régulation de *rpoS* par DsrA se fait par l'intermédiaire de la protéine Hfq (Figure 28). Plusieurs études ont pu montrer que cette régulation impliquée la formation de complexe ternaire *rpoS* / Hfq / DsrA [31,385]. Les différentes études sur le sujet suggèrent un modèle pour expliquer cette régulation :



Comme expliqué précédemment, DsrA se lie à Hfq au niveau de l'anneau externe et de la face proximale avec ses régions DIII et DII respectivement. Par la suite, ce complexe DsrA / Hfq interagit avec le domaine de liaison à Hfq de l'ARNm *rpoS*. Cette interaction se fait au niveau de la face distale d'Hfq et induit une modification de la conformation de *rpoS*. Ce changement conformationnel permet de faciliter les interactions entre la région DI de DsrA et le domaine 3' inhibiteur de *rpoS*. Finalement, le petit ARN s'apparie à sa séquence complémentaire présente sur l'ARNm. Cet appariement permet de libérer la séquence SD qui devient alors accessible aux ribosomes permettant l'initiation de la traduction de *rpoS* [31,386,387]

5.8) Hfq et la virulence

La délétion du gène *hfq* chez *E.coli* impacte très fortement la croissance et la forme des bactéries, altère sa résistance à différents stress, modifie la composition protéique de sa membrane, etc. [311-314]. Cette conjugaison d'effet est principalement due à l'activité de

Introduction

régulations des ARNm par les petits ARN régulateurs, notamment la régulation de facteur sigma alternatif σ^s [381,388]. Chez *S. Typhimurium*, ce facteur joue un rôle prépondérant dans la virulence de la bactérie, notamment par sa capacité à induire l'expression du plasmide de virulence de *Salmonella* (spv) [389]. Par la suite, de nombreuses études ont pu mettre en évidence un lien entre la protéine Hfq et la virulence chez de nombreuses espèces bactériennes aussi bien à Gram négatif que positive : *S. Typhimurium*, *E. coli*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia Pestis*, *L. monocytogenes*, *P. aureus*, ... [390-399]. Dans la majorité de ces cas, la délétion de la protéine Hfq entraîne une atténuation de la virulence ainsi qu'une diminution de la capacité des bactéries à coloniser et/ou survivre dans l'hôte infecté [390,393,395,396]. Bien qu'impactant la virulence dans les deux cas, la délétion d'Hfq a une répercussion beaucoup plus forte chez les bactéries à Gram négatifs que sur les bactéries à Gram positifs [389,391,393,398]. Cette différence doit se faire en parallèle de l'importance de la protéine Hfq pour ces différents types de bactéries. En effet, Hfq est indispensable pour la régulation des ARNm par les petits ARN régulateurs chez les bactéries à Gram négatif alors qu'elle est beaucoup moins essentielle pour ce même type de régulation chez les bactéries à Gram positif [316,317].

5.9) Interaction avec l'ADN

Même si la majorité des fonctions connues d'Hfq dans la cellule est liée à sa capacité à interagir avec les différentes molécules d'ARN, Hfq est également capable de se lier à l'ADN mais son affinité pour cette molécule est beaucoup plus faible que pour l'ARN [400,401]. Malgré cela, des études ont démontré que près de 20 % des molécules d'Hfq sont en interaction dans nucléoïde accompagné par de nombreuses autres protéines se liant à l'ADN [401-403]. Bien que présent dans le nucléoïde, la répartition de la protéine Hfq au sein de ce dernier ne se fait pas de manière uniforme, à l'inverse de ce qui peut être observé avec la protéine H-NS (Histone-like Nucleoid Structuring protéine) [402]. Des études ont pu commencer à éclairer les différents rôles dans le métabolisme de l'ADN comme la réplication, le maintien du surenroulement négatif, la régulation de la transcription ainsi que dans la régulation des éléments transposables [311,361,404-407].

Résultats

1. Étude de la régulation des ARNm par les petits ARN régulateurs : Rôle des sites de fixation d'Hfq

1.1) Introduction

Hfq est une protéine clé chez les bactéries à Gram négatif pour la régulation des ARNm par les petits ARN régulateurs. Son rôle est multiple dans ce type de régulation. Elle est indispensable à la stabilité de la grande majorité des petits ARN régulateurs. Elle est également proposée pour faciliter l'interaction entre le petit ARN et son ARNm cible [10]. Hfq possède deux faces distinctes lui permettant d'interagir avec les ARN : la face distale ayant une forte affinité pour les ARN présentant un motif $(AAN)_n$ et la face proximale ayant, elle, une forte affinité pour les séquences d'ARN riche en uracile [7]. Ces séquences se retrouvent sur les ARN interagissant avec Hfq en amont ou en aval d'une structure en tige-boucle. Bien que différentes, ces séquences ne sont pas spécifiques d'un type d'ARN donné, mais se retrouvent aussi bien chez les ARNm que chez les petits ARN régulateurs. Par exemple, le motif $(AAN)_n$ se retrouve aussi bien chez le petit ARN *ChiX* que sur l'ARNm *yjK* [32,408]. De même, le motif polyU se retrouve chez le petit ARN *RyhB* et l'ARNm *chiPQ* [34,409].

1.2) Étude préliminaire : Étude du rôle des sites de fixation d'Hfq aux ARN par l'intermédiaire de chimères

Au cours de ces expérimentations, nous avons voulu comprendre quels étaient les éléments de séquences présents sur l'ARNm qui pouvaient jouer un rôle dans la régulation de ces ARN par les petits ARN régulateurs. En effet, l'idée répandue est que cette régulation ne dépendait finalement que de la présence de deux éléments de séquence sur l'ARNm : un site d'appariement des petits ARN régulateurs et un site de fixation d'Hfq. De nombreux travaux ont déjà été réalisés sur le site d'appariement des petits ARN régulateurs et ont démontrés la capacité du petit ARN régulateur à se lier à l'ARNm et donc à le réguler [32,409]. Par contre, il y a moins de connaissances disponibles concernant les sites de fixation d'Hfq. Il a été montré qu'il existe deux sites de fixation d'Hfq aux ARN : un site de fixation de motifs polyU permettant à l'ARN de se lier à la face proximale de la protéine et un site de fixation pour le

Résultats

motif (AAN)_n au niveau de la face distale d'Hfq [325,346]. Ces différences de sites se présentent à la fois sur les ARNm et sur les petits ARN régulateurs. Nous nous sommes donc posé la question de savoir s'il existait une compatibilité des sites de fixations d'Hfq sur les ARN qui pouvait jouer un rôle dans la régulation de ces derniers. En d'autres termes, nous avons voulu savoir si les ARN devaient se lier sur une face différente d'Hfq pour initier la régulation (site de fixation d'Hfq compatible) ou si les ARN pouvaient se lier sur la même face ou sur deux protéines Hfq différentes.

Tableau 1 : Liste des ARNm ainsi que leurs caractéristiques.

| Nom de l'ARNm | Site de fixation d'Hfq de l'ARNm | Référence | Petit ARN régulateur | Site de fixation d'Hfq du petit ARN régulateur | Référence |
|---------------|----------------------------------|-----------|----------------------|--|-----------|
| <i>chiP</i> | Poly(U) | [28] | ChiX | (AAN) ₃ | [28] |
| <i>yifK</i> | (AAN) ₃ | [32] | GcvB | polyU | [33] |
| <i>dppA</i> | (AAN) ₄ | / | | | |
| <i>sodB</i> | A/U riche | [34] | RyhB | A/U riche | [34] |
| <i>iroN</i> | A/U riche | [35] | | | |

1.2.1) Étude préliminaire : ARNm chimères

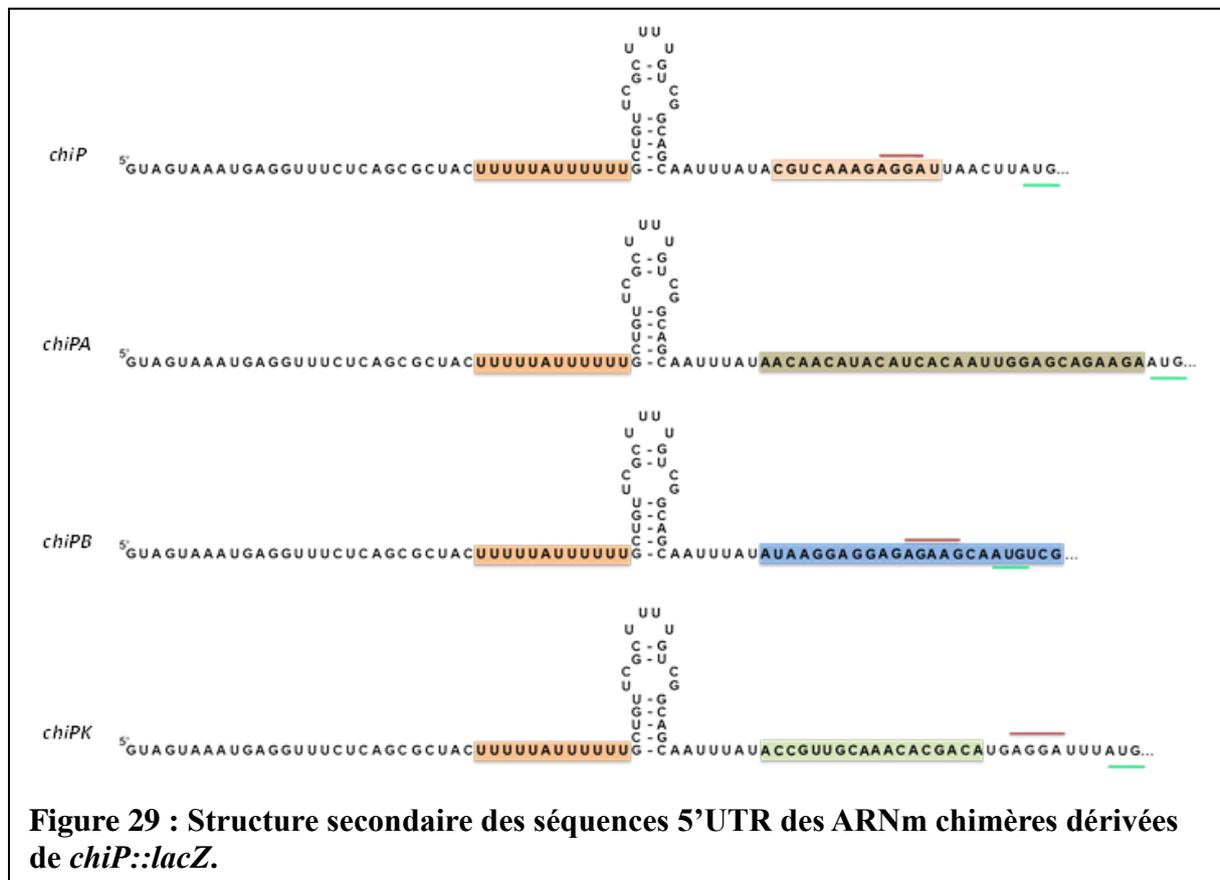
Afin de répondre à ces questions, nous sommes partis de l'hypothèse que les sites de fixation d'Hfq entre les ARNm et leurs petits ARN régulateurs devaient être compatibles. En partant de ce postulat, j'ai construit des ARNm chimère dans lequel j'ai remplacé la région d'appariement d'un ARNm X ayant un site de fixation d'Hfq polyU régulé par un petit ARN A par la région équivalente d'un ARNm Y régulé par le petit ARN B dont le site de fixation à Hfq est (AAN)_n. Ceci résulte dans un ARNm Z ayant un site de fixation d'Hfq polyU mais pouvant maintenant s'apparier avec le petit ARN régulateur B. Il se peut que ce petit ARN régulateur ne soit pas capable de réguler correctement l'ARNm Z. J'ai réalisé plusieurs constructions de ce type à partir du squelette de deux ARNm différents : *chiP* et *yifK*, tous les deux caractérisés au laboratoire en tant que cibles de régulations par les petits ARN ChiX et GcvB respectivement [32,409]. L'ARNm *chiP* possède un site de fixation d'Hfq polyU et est régulé négativement par ChiX alors que l'ARNm *yifK* possède, quant à lui, un site de fixation à Hfq de motif (AAN)₃ et est régulé par le petit ARN régulateur GcvB. Les différentes régions

Résultats

5'UTR des ARNm utilisés ainsi que leurs sites de fixation à Hfq proposés et/ou ayant été démontrés par les différents travaux sont résumés dans le Tableau 1. J'ai réalisé les différents ARNm chimères en suivant le protocole de recombinaison sans cicatrice. Les souches utilisées pour ces constructions contenaient le rapporteur traductionnel *lacZ* fusionné à *chiP* ou à *yifK*, en fonction de l'ARNm ayant servi de squelette, permettant ainsi d'observer et de quantifier leurs régulations par les petits ARN. La liste des différents ARNm chimères que j'ai réalisés est récapitulée dans le Tableau 2 ainsi que dans les Figures 29 et 30.

Tableau 2 : Liste des ARNm chimères

| Chimère dérivée de la région 5'UTR de <i>chiP</i> | | Chimère dérivée de la région 5'UTR de <i>yifK</i> | |
|---|------------------------------------|---|------------------------------------|
| Nom de l'ARN chimère | Séquence d'interaction importée de | Nom de l'ARN chimère | Séquence d'interaction importée de |
| <i>chiPA</i> | <i>dppA</i> | <i>yifKB</i> | <i>dppA</i> |
| <i>chiPB</i> | <i>sodB</i> | <i>yifKP</i> | <i>chiP</i> |
| <i>chiPK</i> | <i>yifK</i> | | |



Résultats

Représentation schématique des ARNm chimères *chiPA*, *chiNT* et *chiPK* dérivée de l'ARNm *chiP::lacZ*. La séquence de fixation d'Hfq sur *chiP* est représentée en orange. Les séquences d'interaction des ARNm *chiP*, *dppA*, *sodB* et *yifK* avec leurs petits ARN régulateurs respectifs sont représentés en orange claire, marron clair, bleu et vert respectivement. L'AUG initiateur est souligné en vert.

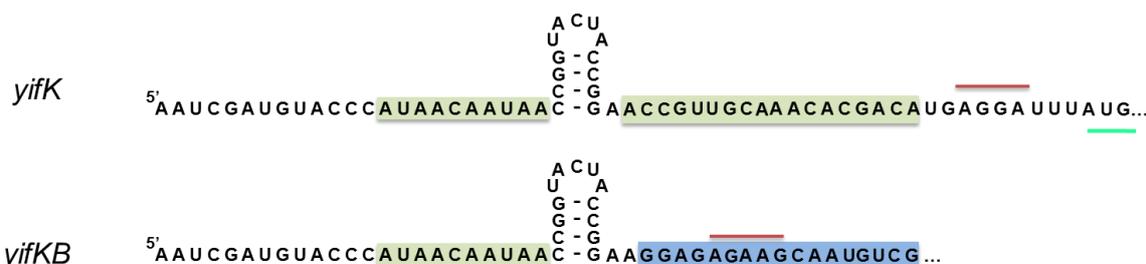


Figure 30 : Structure secondaire des séquences 5'UTR des ARNm chimères dérivées de l'ARNm *yifK::lacZ*.

Représentation schématique l'ARNm chimère *yifKB* dérivée de l'ARNm *yifK::lacZ*. La séquence de fixation d'Hfq sur *yifK* est représentée en vert. Les séquences d'interaction des ARNm *yifK* et *sodB* avec leurs petits ARN régulateurs respectifs sont représentées en vert et bleu respectivement. L'AUG initiateur est souligné en vert.

Une fois ces constructions réalisées, j'ai effectué les dosages de l'activité du rapporteur *lacZ* en présence du petit ARN régulateur natif (par exemple ChiX pour les ARNm dérivés de *chiP*) ainsi qu'en présence de leurs nouveaux régulateurs ou en absence des petits ARN régulateurs.

Les ARNm chimères construits à partir du squelette de l'ARNm *chiP* sont *chiPA*, *chiPK* et *chiPB* (Tableau 2 et Figure 29). Les résultats des dosages de l'activité β -galactosidase montrent que dans le cas des ARNm *chiPA* et *chiPK* ayant respectivement les sites d'appariement de *dppA* et *yifK* reconnu normalement par GcvB, ces ARNm ne sont pas régulés par ChiX et peu ou pas par GcvB (Figure 31 A et B). En effet, l'activité mesurée du rapporteur dans la souche *chiPK* ne varie pas en fonction de la présence ou non des petits ARN régulateurs restant aux environs de 700 unités de Miller. Dans le cas de *chiPA*, les mesures semblent indiquer que GcvB régule légèrement l'expression du rapporteur faisant passer l'activité de 7100 à 5400 unités de Miller. Dans le cas de *chiPB*, une forte diminution de l'activité β -galactosidase mesurée est observable en présence du petit ARN RyhB passant

Résultats

de 7900 à 1200 unités de Miller (Figure 31 C). En toute logique, ces ARNm ne sont pas régulés par ChiX, car il n'y a plus de séquence d'appariement entre l'ARNm et le petit ARN régulateur. Chose plus surprenante, RyhB semble très bien réguler l'ARNm *chiPB* alors qu'à l'inverse, il semble que GcvB ne soit pas capable de faire de même sur les ARNm *chiPA* et *chiPK*. La construction réalisée à partir du squelette de *yifK* est nommée *yifKB* (Figure 30). Les résultats des dosages de l'activité β -galactosidase nous montrent qu'*yifKB* est, comme dans le cas de *chiPB*, très bien régulée par RyhB diminuant l'activité d'un facteur 60 passant ainsi de 700 à 12 unités de Miller (Figure 31 D).

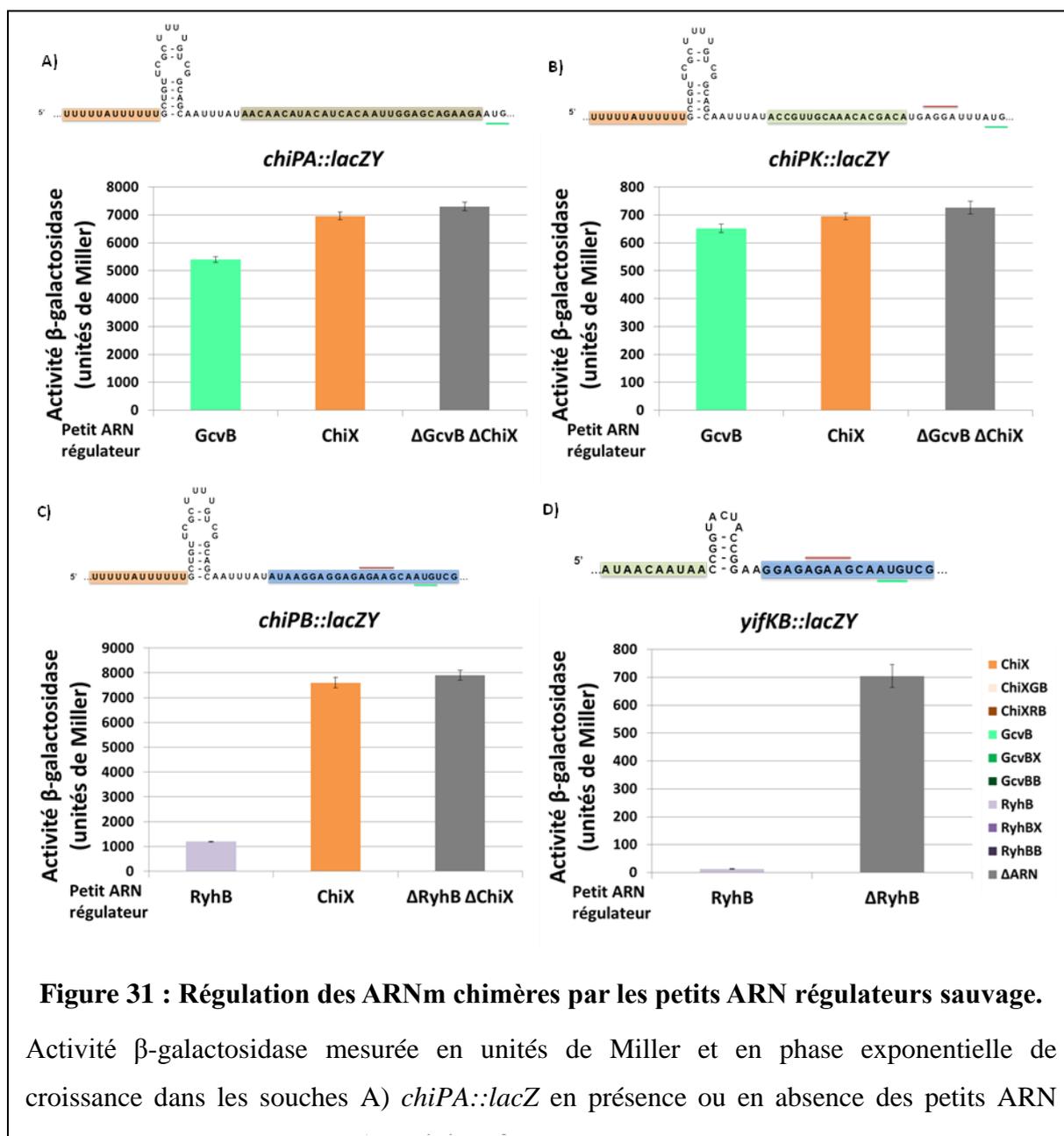


Figure 31 : Régulation des ARNm chimères par les petits ARN régulateurs sauvage.

Activité β -galactosidase mesurée en unités de Miller et en phase exponentielle de croissance dans les souches A) *chiPA::lacZ* en présence ou en absence des petits ARN

Résultats

croissance dans les souches A) *chiPA::lacZ* en présence ou en absence des petits ARN régulateurs ChiX et GcvB ; B) *chiPK::lacZ* en présence ou en absence des petits ARN régulateurs ChiX et GcvB ; C) *chiPB::lacZ* en présence ou en absence des petits ARN régulateurs ChiX et RyhB ; D) *yifKB::lacZ* en présence ou en absence du petit ARN régulateur RyhB.

Ces résultats bien qu'intéressant ne nous permettent pas de valider ou d'invalider notre hypothèse. En effet, les ARNm chimères *chiPA* et *chiPK* ne sont pas régulés par GcvB alors qu'il possède au demeurant toutes les séquences nécessaires (site de fixation d'Hfq et site d'appariement). Suivant notre hypothèse, ces ARNm ne sont pas régulés, car ils ne possèdent pas un site de fixation à Hfq compatible avec le site de GcvB. En effet, les ARNm ainsi que le petit ARN régulateur GcvB possèdent tous les deux un site de fixation à Hfq de type polyU. À l'inverse, les ARNm chimères *chiPB* et *yifKB* sont bien régulés par RyhB et cela quel que soit la séquence du site de fixation d'Hfq. En effet, *chiPB* a un site de fixation à Hfq de type polyU alors qu'*yifKB* a, lui, un site de fixation d'Hfq de motifs (AAN)₃. Pourtant, bien qu'ils soient tous les deux régulés par RyhB, cette régulation n'est pas équivalente entre les deux ARNm. En effet, *chiPB* n'est régulé « que d'un facteur 6 » par RyhB alors qu'*yifKB*, possédant le site de fixation à Hfq compatible avec RyhB, est régulé d'un facteur 60. Il semble donc, bien que cela reste à confirmer, que la compatibilité des sites de fixations à Hfq est un facteur permettant d'obtenir une régulation optimale des ARNm par les petits ARN régulateurs. Afin de nous permettre de mieux comprendre ces résultats, nous avons entrepris une expérience dans l'autre sens. C'est-à-dire que nous avons échangé les séquences d'appariement aux ARNm sur les petits ARN régulateurs.

1.2.2) Étude préliminaire : Chimères de petits ARN régulateurs

Pour ce faire, j'ai utilisé trois petits ARN régulateurs qui sont régulièrement employés au laboratoire : ChiX, GcvB et RyhB (Tableau 1). Comme pour les ARNm, j'ai échangé les régions d'appariement de ces petits ARN régulateurs entre eux pour former différentes chimères listées dans le Tableau 3 ainsi que dans les Figures 32, 33 et 34. Afin de pouvoir étudier les petits ARN chimères dérivés de RyhB, nous avons réalisé ces constructions dans une souche délétée pour le gène *fur* et le petit ARN RyhB2 ($\Delta fur \Delta ryhB2$). Le gène *fur* code

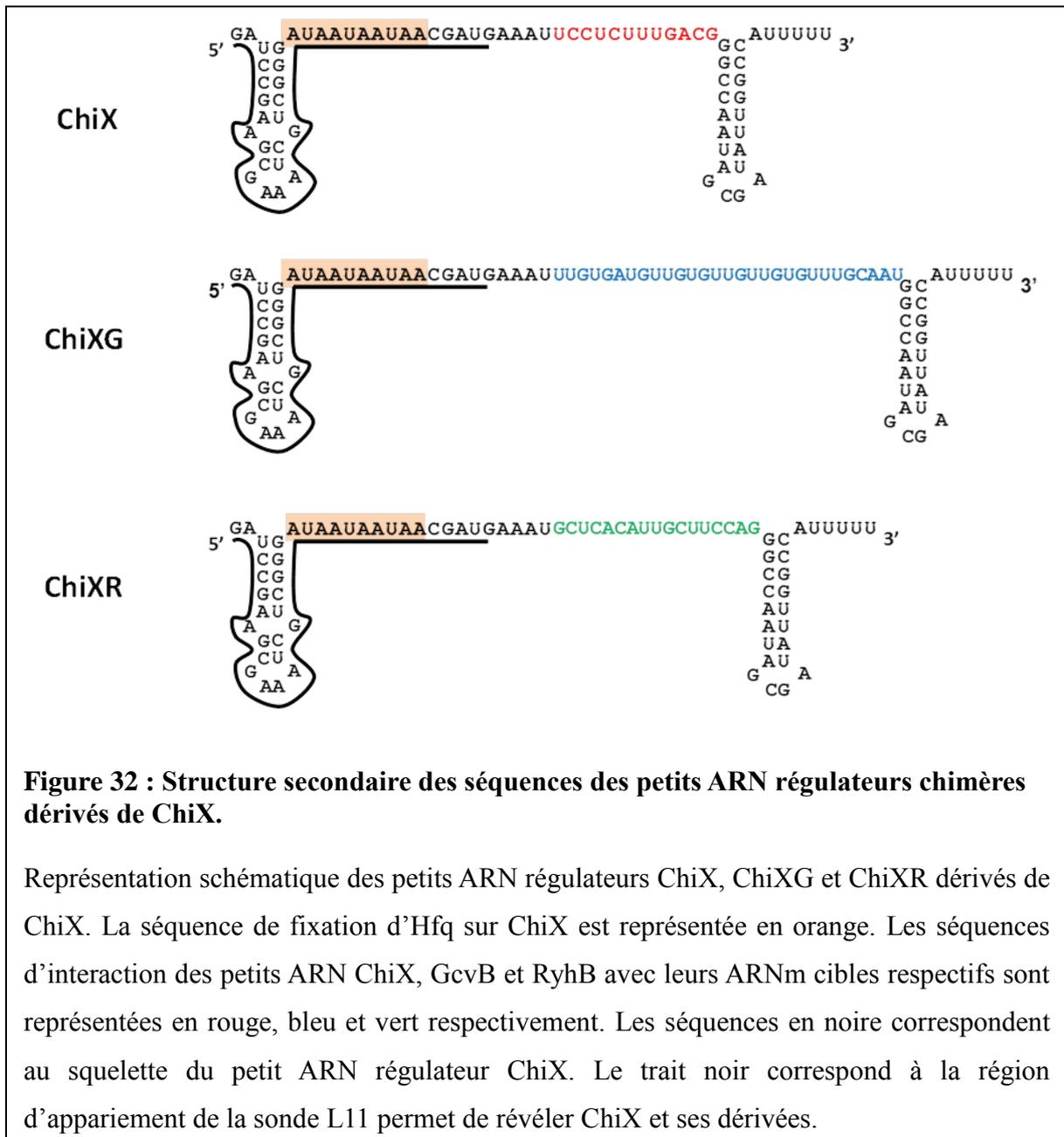
Résultats

pour le facteur de transcription Fur qui réprime l'expression de RyhB en condition standard et le petit ARN RyhB2 est un homologue de RyhB [265,277].

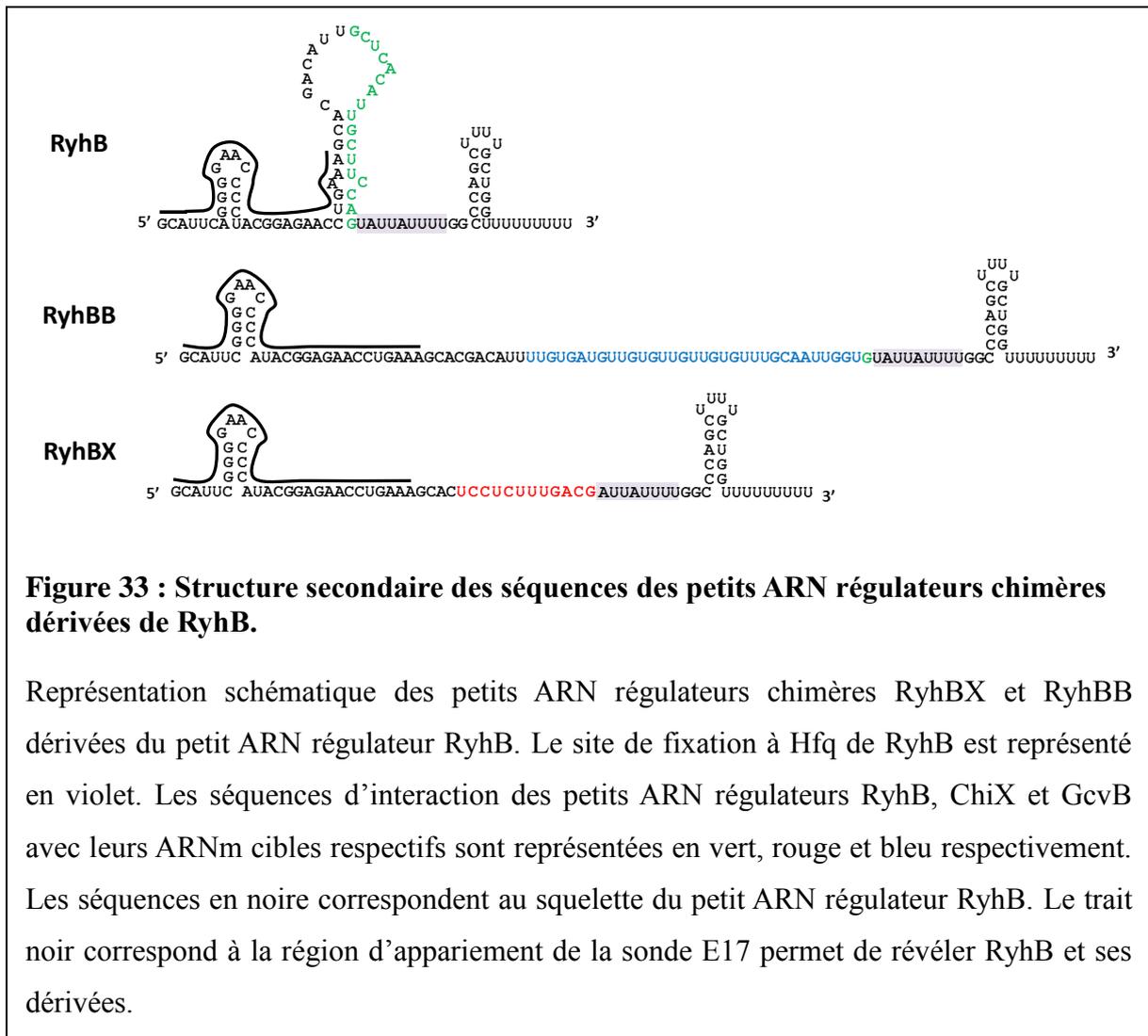
Tableau 3 : Liste des petits ARN régulateurs chimères

| Chimère dérivée de ChiX | | Chimère dérivée de GcvB | | Chimère dérivée de RyhB | |
|--------------------------|------------------------------------|--------------------------|------------------------------------|--------------------------|------------------------------------|
| Nom du petit ARN chimère | Séquence d'appariement importée de | Nom du petit ARN chimère | Séquence d'appariement importée de | Nom du petit ARN chimère | Séquence d'appariement importée de |
| ChiXG | GcvB | GcvBX | ChiX | RyhBX | ChiX |
| ChiXR | RyhB | GcvBB | RyhB | RyhBB | GcvB |

Résultats

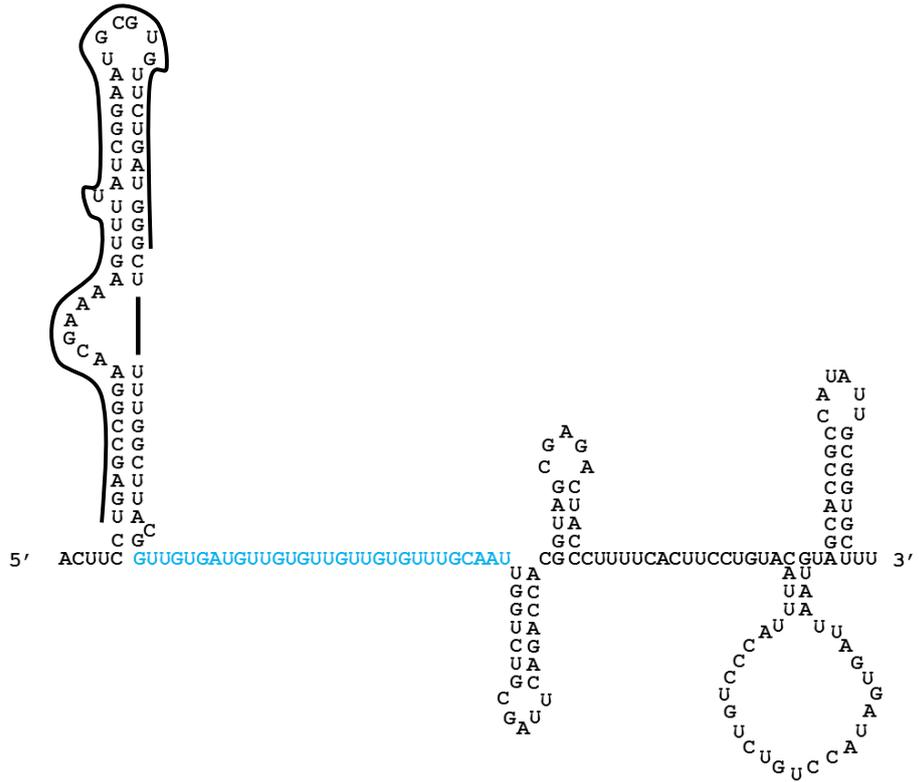


Résultats

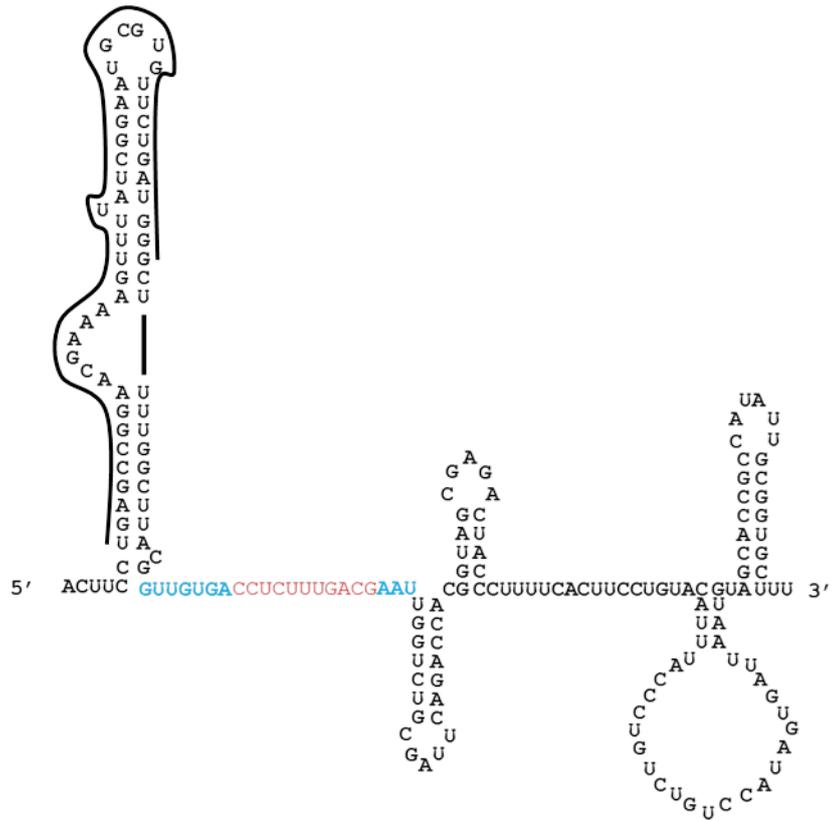


Résultats

GcvB

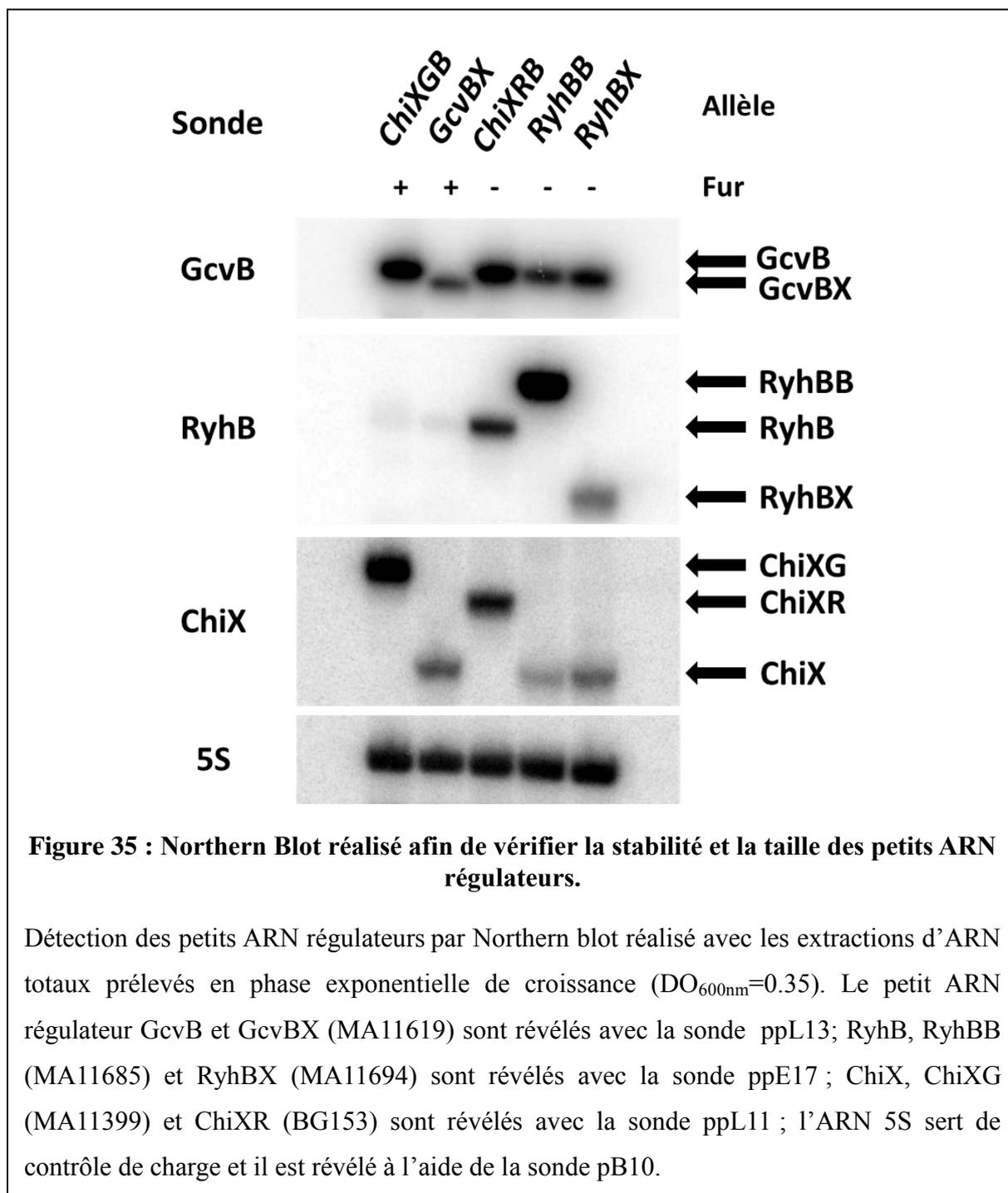


GcvBX



Résultats

être observée. En effet, les ARN dérivés de ChiX sont plus stables que le petit ARN original. Par contre, l'effet inverse est observé avec les chimères de GcvB qui sont légèrement moins abondantes que GcvB sauvage (Figure 35). Le petit ARN régulateur GcvBB présente un résultat similaire à celui observé avec GcvBX (résultat non présenté). Finalement, les petits ARN régulateurs dérivés de RyhB ont une stabilité très différente de l'original. RyhBB est présent en plus grande quantité que RyhB alors que RyhBX est présent en plus faible concentration (Figure 35).



Résultats

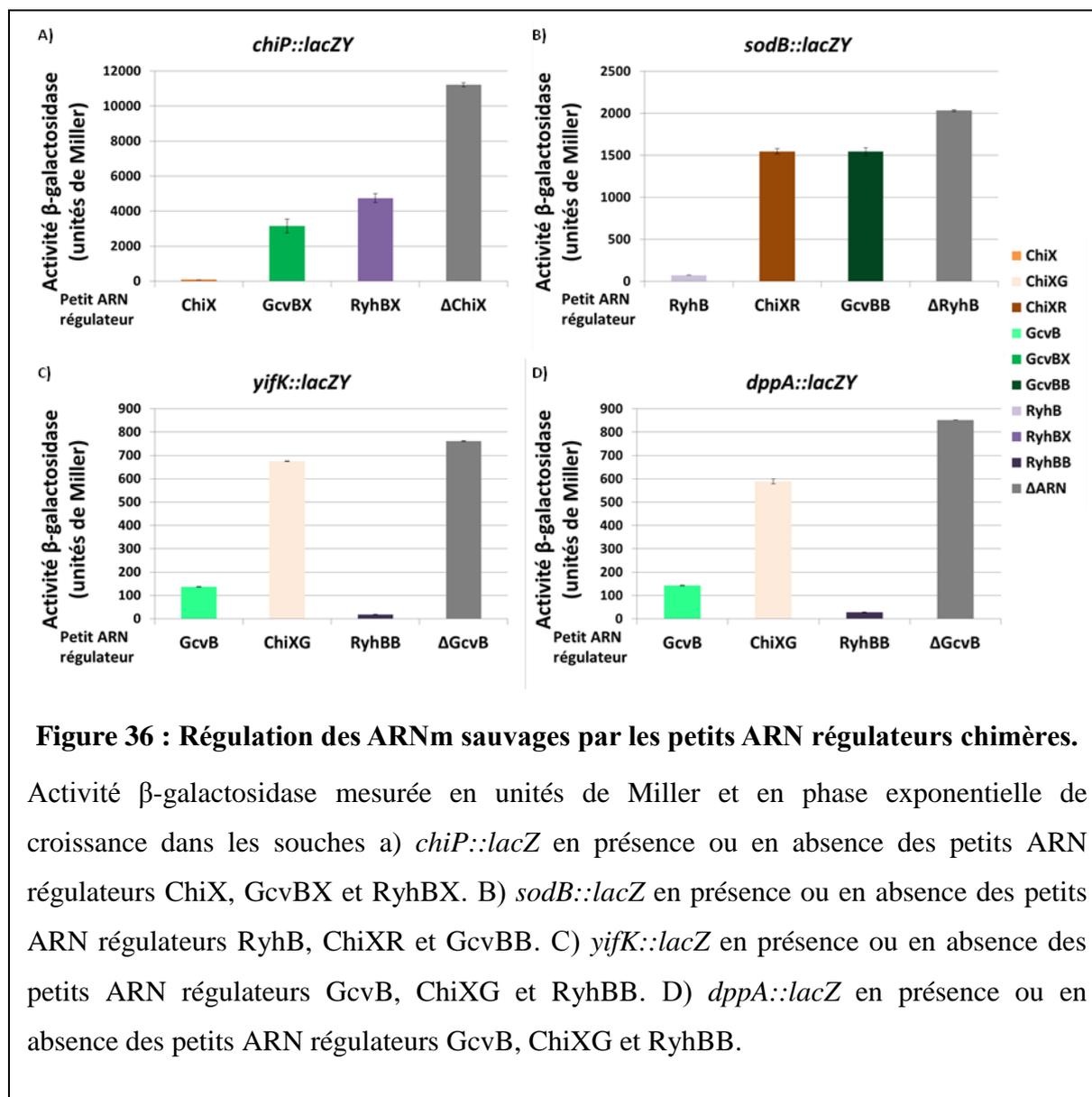
Une fois leurs présences confirmées, les petits ARN régulateurs chimères ont été testés afin de savoir s'ils étaient capables de réguler les ARNm *chiP*, *yifK*, *dppA* et *sodB* fusionnés à un rapporteur traductionnelle *lacZ*. J'ai donc réalisé les dosages de l'activité β -galactosidase dans nos différents rapporteurs en présence des différentes constructions capables de les réguler (Figure 36).

Les résultats de ces dosages montrent des capacités de régulation très fluctuantes en fonction des couples ARNm / petits ARN régulateurs étudiés. En observant la régulation de *chiP*, tous les petits ARN étudiés montrent une capacité de réguler l'ARNm plus ou moins forte (Figure 34 A). ChiX, petit ARN régulateur natif est extrêmement efficace faisant passer l'activité du β -galactosidase de 11000 à 75 unités de Miller soit une diminution d'un facteur de 150. GcvBX et RyhBX ont un effet beaucoup plus modéré et entraînent une diminution de l'activité de 11000 à 3150 et 4750 unités de Miller respectivement (Figure 36 A). Dans le cas de *sodB*, les résultats sont beaucoup plus hétérogènes (Figure 36 B). RyhB, le petit ARN régulant naturellement *sodB*, entraîne une diminution de l'activité β -galactosidase de 2000 à 70 unités de Miller alors que les petits ARN chimères ChiXR et GcvBB ne régulent que peu son expression entraînant une faible chute passant de 2000 à 1500 unités de Miller dans les deux cas (Figure 36B). Les dosages de l'activité β -galactosidase des ARNm *yifK* et *dppA* montrent un effet significatif qui est similaire dans les deux cas (Figure 36 C et D). Ils sont tous les deux régulés efficacement par GcvB induisant une décroissance de l'activité du rapporteur passant de 760 à 135 unités de Miller avec *yifK* et de 850 à 140 unités de Miller avec *dppA*. Ils ne sont que peu ou pas régulés par ChiXG entraînant une diminution de l'activité de 760 à 675 unités de Miller et de 850 à 590 unités de Miller pour *yifK* et *dppA* respectivement. À l'inverse, ils sont bien régulés par la chimère RyhBB, qui fait diminuer l'activité d'un facteur 35 passant de 760 à 17 chez *yifK* et de 850 à 28 chez *dppA* (Figure 36 C et D).

Ces expérimentations conduisent à des résultats très variés en fonction des rapporteurs étudiés. Dans le cas de l'ARNm *sodB*, les résultats semblent aller dans le sens de l'hypothèse de départ, puisque les petits ARN régulateurs sont incapables de réguler correctement l'ARNm. À l'inverse, pour les résultats obtenus avec l'ARNm *chiP*, il est évident que les petits ARN régulateurs chimères sont bien capables de réguler l'ARNm même si cette régulation n'est pas aussi efficace que ce que nous pouvions attendre. Le troisième cas présente un résultat intermédiaire. En effet, les ARNm *yifK* et *dppA* sont régulés très efficacement par le petit ARN régulateur RyhBB, dérivé du petit ARN RyhB alors que

Résultats

ChiXG est incapable de réguler les deux ARNm. Afin de compléter au mieux cette étude préliminaire, nous avons rassemblé nos deux groupes d'ARN chimères. Le petit ARN ChiXR est-il capable de réguler les ARNm *chiPA* et *chiPK* ? Comme nous l'avons vu précédemment, ChiXR est incapable de réprimer correctement *yifK* ou *dppA*. Or ce petit ARN est dérivé de ChiX qui possède un site de fixation à Hfq de motif (AAN)₃ alors que ces ARNm ont également un site présentant un motif de fixation à Hfq équivalent. A contrario, *chiPA* et *chiPK* ont un site de fixation à Hfq polyU.

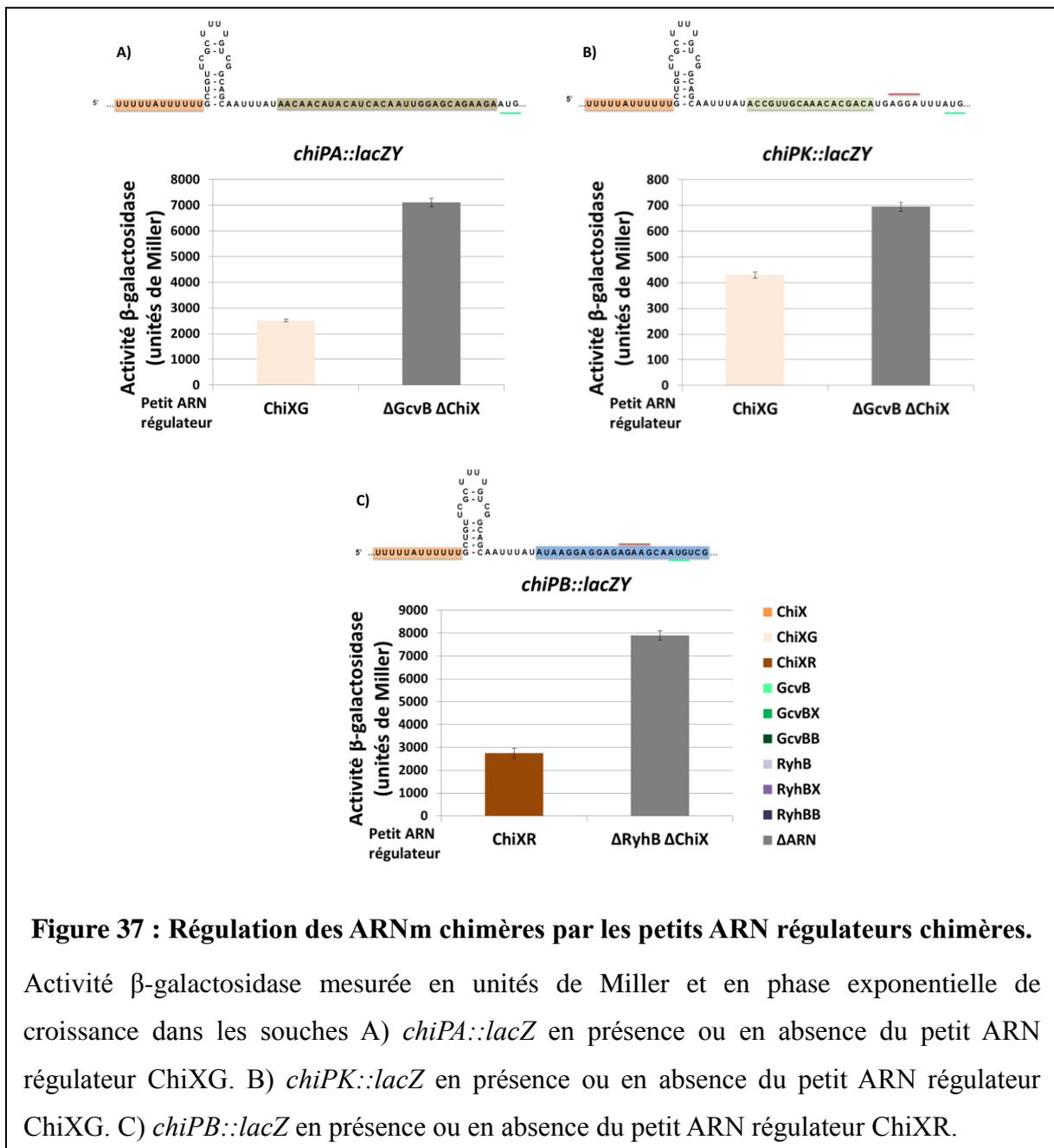


1.2.3) Étude préliminaire : Fusion des chimères

Pour répondre à ces questions, j'ai construit, par transductions, des souches portant les ARNm chimères avec les petits ARN chimères complémentaires. Les dosages de l'activité β-

Résultats

galactosidase des rapporteurs ont été réalisés en fonction des différents contextes génétiques. Les résultats de ces dosages nous apportent des informations intéressantes. En effet, les petits ARN régulateurs chimères sont capables, dans tous les cas étudiés, de réguler plus ou moins efficacement leurs ARNm chimères cibles (Figure 37). Le petit ARN régulateur ChiXG réprime les deux ARNm, *chiPA* et *chiPK*, d'un facteur 3 et 1.5 faisant passer l'activité du rapporteur de 7100 à 2500 unités de Miller et de 700 à 430 unités de Miller respectivement (Figure 37 A et B). Un phénomène identique est observable pour ChiXR qui réprime *chiPB* faisant passer l'activité β -galactosidase de 7900 à 2700 unités de Miller (Figure 37 C).



Résultats

L'ensemble des résultats de cette étude préliminaire nous a permis de commencer à avoir une idée du rôle du site de fixation d'Hfq. Les ARNm chimères ne sont pas ou peu régulés par les petits ARN régulateurs natifs de la cellule bien que la région d'appariement présent sur l'ARNm soit celle qu'ils reconnaissent sur leur substrat naturel. Sauf dans le cas du petit ARN RyhB qui parvient à réguler ses différentes cibles. Avec les petits ARN régulateurs chimères, le constat est différent. En fonction des ARNm étudiés, les petits ARN régulateurs chimères parviennent ou non à induire la régulation de leurs cibles. Dans le cas de *chiP*, l'ensemble des petits ARN étudiés arrive à réprimer son expression (GcvBX et RyhBX). À l'inverse, l'ARNm *sodB* n'est que peu régulé par les petits ARN chimères (ChiXR et GcvBB). Finalement, les ARNm *yjK* et *dppA* ont un petit ARN chimère capable de les réguler efficacement (RyhBB) alors que l'autre ne parvient que peu à réprimer leurs expressions (ChiXG). Néanmoins, en combinant ces ARNm chimères et leurs petits ARN régulateurs complémentaires, une régulation de nos rapporteurs est observable. Or ces derniers, pris indépendamment, ne sont pas régulés par les petits ARN sauvages pour l'ARNm chimère (*chiPA* et *chiPK*) et n'induisent pas de régulation des ARNm natifs dans le cas des petits ARN régulateurs chimères (ChiXG et ChiXR). Il semble donc qu'il existe des éléments de séquence supplémentaires qui seraient nécessaires à la régulation des ARNm par les petits ARN régulateurs en plus du site d'appariement afin d'obtenir une régulation optimale. En se référant à nos différentes constructions et en analysant les couples ARNm / petits ARN régulateurs dont les régulations sont les plus efficaces, il semble qu'un autre élément de séquence semble jouer un rôle dans cette régulation : le site de fixation à Hfq.

La séquence du site de fixation à Hfq peut contenir deux motifs différents, un site polyU permettant la fixation des ARN à la face proximale de la protéine et un motif (AAN)_n permettant la fixation des ARN à sa face distale. Ces séquences semblent se compléter en ce qui concerne le mécanisme de régulation. En effet, l'ARNm *chiP* possède un site de fixation à Hfq polyU alors qu'à l'inverse, ChiX possède lui un site de fixation de type (AAN)₃. Cette observation se retrouve dans l'ensemble des couples ARNm / petits ARN régulateurs natifs utilisés lors de ces travaux. Si cette complémentarité des sites de fixation à la protéine est nécessaire pour observer une régulation optimale alors cela permet d'expliquer en partie nos résultats. Lors de l'étude de la régulation des ARNm chimères par les petits ARN régulateurs natifs, le petit ARN GcvB n'est pas capable de réguler ces ARNm chimères cibles puisque ces derniers, tout comme lui, ont un site de fixation à Hfq de type polyU. Le petit ARN régulateur RyhB a un site de fixation à Hfq de type polyU mais il parvient à

Résultats

réguler à la fois l'ARNm *chiPB* (site polyU), mais également l'ARNm *yifKB* ayant lui un site de fixation à Hfq de type (AAN)₃. Or, lorsque les sites de fixation à Hfq sont compatibles, comme cela est le cas avec l'ARNm *yifKB*, nous observons une régulation de l'ARNm beaucoup plus efficace. Les résultats sont plus ambigus lorsque nous analysons les couples d'ARNm natif avec les petits ARN régulateurs chimères. Dans ces cas, il est très difficile de connaître le rôle du site de fixation à Hfq dans ces régulations, car l'ensemble des possibilités est présent. En effet, l'ARNm *chiP* est régulé par GcvBX et RyhBX bien que ces derniers ont un site de fixation à Hfq de même motif. Bien que nous observons ces régulations, leurs efficacités de réprimer l'expression de *chiP* restent « faibles » comparés à leurs capacités de réguler d'autres ARNm ayant un site de fixation à Hfq compatible (Cf article 1). Avec l'ARNm *sodB*, aucune des deux petits ARN régulateurs (ChiXR et GcvBB) ne parvient à réprimer son expression alors que le site de fixation à Hfq de GcvB (de motif polyU) est compatible avec celui de l'ARNm *sodB* (de motifs (AAN)_n). Finalement, la régulation des ARNm *yifK* et *dppA* semble conforme à notre hypothèse. Le petit ARN ChiXG ne réprime pas ces ARNm alors que le petit ARN RyhBB les réprime efficacement. En effet, *yifK* et *dppA* ont un site de fixation à Hfq de motifs (AAN)_n comme celui de ChiXG tandis que RyhBB a un site de fixation à Hfq compatible de motifs polyU. Enfin, en croissant les différents ARN chimères, nous obtenons une régulation des ARNm par les petits ARN régulateurs. Cette régulation se fait dans toutes nos conditions, quand bien même, les petits ARN régulateurs n'avaient pas montré de capacité à réguler les ARNm natifs. Cela nous laisse supposer que, bien que fonctionnelle, ces petits ARN chimères n'étaient pas dans des conditions pour induire cette régulation (site de fixation à Hfq identique). Or, avec les ARNm chimères, ils se trouvent en présence de site de fixation à Hfq compatible permettant ainsi d'observer une répression de l'expression de ces derniers.

Bien que préliminaires, ces travaux semblent aller dans le sens de notre hypothèse de départ. En effet, dans une majorité de cas, la régulation des ARNm n'est optimale qu'en présence de petits ARN régulateurs capables de se fixer à la face opposée de la protéine Hfq à celle qui interagit avec l'ARNm.

1.3) Article 1 : Distinct Pathways of Hfq:mRNA recognition revealed by the analysis of sRNA-targeted mini mRNA chimeras

Benoit Guillemardet, Mathilde Ratel, Lionello Bossi et Nara Figueroa-Bossi

En cours de rédaction

Distinct Pathways of Hfq:mRNA recognition revealed by the analysis of sRNA-targeted mini mRNA chimeras

Benoit Guillemardet, Mathilde Ratel, Lionello Bossi and Nara Figueroa-Bossi*

Institute de Biologie Integrative de la Cellule (I2BC-CNRS) Université Paris-Saclay, Université Paris Sud, 91198 Gifs-sur-Yvette, France

Running title: Paths to mRNA recognition by Hfq

For correspondence:

*E-mail: nara.figueroa@i2bc.paris-saclay.fr; Tel. (+33) 1 69823811; Fax. (+33) 1 69823150

Summary

Protein Hfq is required for the regulatory activity of most base-pairing small RNAs (sRNAs) in Gram-negative bacteria. Hfq has been shown to accelerate annealing of sRNA and target messenger RNA (mRNA) that are concomitantly bound to the Hfq surface. The present study was designed to assess the extent to which Hfq effectiveness in regulation depends on the “compatibility” of the Hfq binding sites (HBSs) in the sRNAs and in the mRNA. Such compatibility might be needed to allow the sRNA and the mRNA to accommodate on the Hfq surface as opposed to interfere with each other’s binding. This idea was tested by exchanging HBSs between sRNA-targeted mRNAs, including mRNAs whose sequence had been shortened to contain only the 5’ untranslated region (UTR) of the original transcript. These mini RNAs are highly unstable in the absence of Hfq *in vivo*, thus providing a direct assay for Hfq binding. Intriguingly, we found that depending on the nature of the HBS on the mini mRNA, accumulation of this RNA depended not only on the presence of Hfq but also on the presence of an sRNA capable of pairing with the mini mRNA. This suggests that Hfq does not always promote sRNA:mRNA pairing, but sometimes uses sRNA:mRNA pairing to find its binding site on the mRNA.

Introduction

Microorganisms adapt to environmental changes through a finely tuned interplay of transcriptional and post-transcriptional regulatory responses. Key players in this picture are scores of small noncoding RNAs that modulate expression of mRNA targets through Watson-Crick base pairing. In gram-negative bacteria, a major family of sRNAs require the binding of a chaperon protein, Hfq, for their activity [410]. Hfq binds both the sRNA and the target mRNA and it has been shown to accelerate the formation of the RNA duplex in vitro in relevant sRNA:mRNA pairs systems [411-415]. In addition, Hfq binding stabilizes the sRNA by masking ribonuclease recognition sites [416,417]. The fate of Hfq following the formation of the ternary complex is not entirely established and it may vary from one system to another. Most often, Hfq is likely to rapidly dissociate from the complex and be recycled [410,418]. However, some examples where regulation results from the formation of persistent Hfq:mRNA complex have also been described [419,420].

A member of the (L)Sm protein superfamily, Hfq, is a homo-hexamer that self-assembles into a toroidal structure with two major RNA binding surfaces: the so-called proximal face, containing an N-terminal α helix segment, and the distal face on the opposite side of the torus [410,421,422]. Combined crystal structure data and biochemical analyses indicate that the two faces of Hfq have affinity for different RNA sequences. The proximal face binds preferentially uridine-rich stretches [423-427] whereas the distal face has strong affinity for (AAN)_n repeats [414,424,428,429]. In addition, a third surface of the torus, the rim, was more recently implicated in the interactions with RNA. UA-rich sequences were shown to make contact with a conserved tetrapeptide motif (RRER, termed the arginine patch) on this lateral surface [430-433]. The variability in the occurrence of above sequences in sRNAs leads to marked differences in the way individual sRNAs interact with Hfq. In particular, two general modes of interaction were recently described on the basis of the differential stability of sRNAs in *E. coli* strains with mutations in specific residues on the Hfq surface. [418,434]. One class of sRNAs (Class I) bind primarily the proximal face and the rim of Hfq whereas a second class (Class II) target the distal face [418]. Significantly, the binding preferences of sRNAs were shown to dictate the nature of the HBS in the target mRNAs. Class I sRNAs regulated mRNAs with (AAN)_n repeats whereas Class II sRNA appear to target mRNAs with UA-rich rim binding HBSs[418].

The idea that Hfq binding motifs may not be assorted randomly in sRNA/mRNA pairs was at the origin of the present study. We envisioned a that productive sRNA:mRNA interaction would depend not only on the sequence complementarity of the interacting RNAs, but also on the “complementarity”, that is the “compatibility”, of their Hfq binding sites. To test this idea, chimeric mRNAs carrying the target sequence of the sRNA ChiX in different HBS contexts were analyzed for regulation by ChiX and by derivatives of the sRNAs GcvB and RyhB modified so as to recognize the

Résultats

ChiX target sequence. The analysis was performed in *Salmonella* strains either wild-type for Hfq or harboring mutations affecting all three RNA-binding surfaces of Hfq. The use of shortened variants of the chimeric mRNAs allowed monitoring the effects of the Hfq mutations on the binding of mRNA and sRNA concomitantly within the same Northern blot assay. The results obtained showed that the HBS assortment in sRNA and target mRNA is a key determinant of the regulatory proficiency of two of the three sRNAs tested. Interestingly, one of the mRNAs analyzed in this study only bound Hfq in the presence of the cognate sRNA or in a Hfq mutant predicted to abolish binding of a large fraction of RNA ligands in the cell. We propose that in mRNAs with low Hfq affinity, which are likely to be outcompeted by other RNAs for binding, the pathway to Hfq recognition might differ substantially from the canonical pathway and, namely, require the help of the sRNA.

Results

Construction of mRNA and sRNAs chimeras.

The mRNA constructs analyzed in this study were derived from *Salmonella yifK* and *chiP* genes. The *yifK* gene, encoding a putative amino acid transporter, is repressed by the GcvB sRNA, which inhibits *yifK* mRNA translation initiation by base pairing with a sequence in close proximity of the ribosome binding site [435]. The *chiP* gene encodes an outer membrane chitoporin and is repressed by the sRNA ChiX through a similar mRNA-pairing mechanism [28]. Previous work had identified an (AAY)₃ motif in *yifK* 5' UTR as a site of Hfq binding [435] and a uridine-rich track as the main (if not unique) determinant of Hfq binding to *chiP* 5' UTR (see below). Since ChiX HBS (AAUAAUAAC) [28] is very similar to *yifK* HBS (AACAAUAAC), the initial question was whether ChiX would be capable of recognizing its target sequence in the *yifK* backbone. To address this point, two constructs were made, one replacing both the pairing region and the (AAY)₃ motif of *yifK* with the corresponding region from *chiP* 5' UTR, the other changing only the pairing sequence of *yifK*, that is, placing the ChiX target sequence near the (AAY)₃ motif. The two constructs were named *yifKP1* and *yifKP2*, respectively (Fig. 1A). A derivative of *yifKP1* deleted for the U-rich track (*yifKP1*ΔU) was also constructed.

In a parallel, *Salmonella* GcvB and RyhB1 sRNAs were modified to recognize the target sequence of ChiX. This involved replacing the R1 sequence of GcvB [436] and the seed sequence of RyhB1 [437] with the seed sequence of ChiX. The resulting sRNA chimeras were confirmed to be stable by Northern blot analysis (Fig. S1) and were named GcvBX and RyhBX (Fig. 1B). Note that all experiments involving GcvBX and RyhBX sRNAs throughout this study were carried out in strains

Résultats

deleted for the *chiX* gene (GcvBX) or for both *chiX* and *fur* genes (RyhBX), as Fur normally represses *ryhB1* expression [437].

The regulatory activity of ChiX and GcvBX is dictated by the Hfq surface preferences of their mRNA targets

The abilities of ChiX, GcvBX and RyhBX to down regulate *yifKP1*, *yifKP2* and a *yifKP1*ΔU (Fig. 1A) were compared assaying β-galactosidase activity in strains carrying a translational *lacZ* fusion to the *yifK* gene (see Experimental Procedures). Results showed ChiX to repress *yifKP1* more than 100-fold (Fig. 2), similarly to what is normally observed in the ChiX regulation of its natural target, *chiP* [28,438]. The U-rich track appears to critically contribute to this high efficiency since the removal of this sequence (*yifKP1*ΔU) causes the repression ratio to drop from > 100-fold to about 3-fold. Notably, ChiX repression of *yifKP2* is also 3-fold, indicating that the (AAY)₃ motif in *yifKP2* does not contribute to regulation by ChiX to any significant extent (Fig. 2). Interestingly, GcvBX shows the opposite trend. GcvBX is considerably more efficient in repressing *yifKP2* (7-fold) than in repressing *yifKP1* (2-fold) (Fig. 2) The 7-fold variation corresponds to what observed in the repression of *yifK* by wt GcvB [435]. From the Hfq binding preferences of U-rich sequence and (AAN)_n motifs (see Introduction) *yifKP1* and *yifKP2* mRNAs are predicted to interact with the proximal and distal faces of the Hfq ring respectively. Recent evidence suggests that GcvB contacts the proximal face whereas ChiX binds Hfq on the distal face [418](see also below). Therefore, the most likely interpretation of the results in Fig. 2 is that efficient regulation by ChiX and GcvB requires the sRNA and its mRNA target to contact Hfq from opposite sides of the ring.

Intriguingly, the data in Fig. 2 show that RyhBX represses *yifKP1* and *yifKP2* with similar high efficiencies. In contrast, RyhBX is significantly less efficient in repressing *yifKP1*ΔU. One can infer that both the U-rich track in *yifKP1* and the (AAY)₃ motif in *yifKP2* contribute to regulation by RyhBX. Perhaps RyhBX makes contact with the Hfq surface in a way that is compatible with the interaction paths of both *yifKP1* and *yifKP2*. We considered that this system could be used to search for Hfq mutations specifically affecting one pathway but not the other.

Changes on opposite faces of the Hfq ring differentially affect the regulation of *yifKP1* and *yifKP2*

Low-level expression of the *yifK-lacZ* fusion in strains harboring either *yifKP1* or *yifKP2* in combination with RyhBX causes these strains to form white colonies on MacConkey lactose indicator plates. We expected that mutations affecting the repression mechanism would confer a pink or red

Résultats

color phenotype. To search for *hfq* mutations that might produce such phenotype, the *hfq* gene was randomly mutagenized by the polymerase chain reaction (PCR) and the resulting fragment was introduced in the chromosome of strains carrying either *yifKP1-lacZ* or *yifKP2-lacZ* (by λ -Red-mediated recombination). Mutants were systematically screened for their ability to elicit *lacZ* derepression in one background but not in the other (see details in Experimental Procedures). Two alleles causing derepression of *yifKP1-lacZ*, but not *yifKP2-lacZ*, were identified: P10L and N13Y. One allele eliciting the opposite effect harbored the change L32P. Examination of the position of the affected amino acid residues in the crystal structure of Hfq showed P10 and N13 to be located on the proximal face whereas L32 is located on the distal face (Fig. 3A). Thus, these data confirm the prediction that *yifKP1* and *yifKP2* bind to the proximal and distal faces, respectively. The differential effects of the mutation of *yifKP1* and *yifKP2* regulation were confirmed performing β -galactosidase assays (Fig. 3B).

Hfq proximal- and distal-face mutations have opposite effects on steady-state levels of sRNAs

Loss of Hfq binding typically leads to a marked increase of sRNA decay with the consequent drop in the levels of many sRNA in the cell (see Introduction). Thus measurement of sRNA levels in Hfq mutants can provide an indication as to whether the mutant is defective in binding. Northern blot analysis showed the distal face L32P mutation to cause the complete disappearance of ChiX at the same time with the overaccumulation of GcvB and GcvBX and to a lesser extent RyhB1. In contrast, proximal face alleles P10L and N13Y have little effect on GcvB, GcvBX and ChiX, while causing a significant decrease of the levels of RyhB1 and RyhBX (Fig. 4). Similar patterns were obtained in *E. coli* using related, although not identical, Hfq face mutants [418]. These authors interpreted the vast increase of GcvB and RyhB levels in the distal face mutants as an indication that these mutations, while not affecting sRNA binding, interfere with mRNA target recognition. Since sRNA pairing to targets contributes to sRNA turnover [439] and both GcvB and RyhB have many targets, hampering pairing increases sRNA stability [418]. Finding that GcvBX shows the same overaccumulation, in spite of having only one poorly recognized target, casts doubt on this interpretation. An alternative explanation for the increase might be found in the notion that Hfq is limiting in the cell and RNA ligands must compete for Hfq binding [440-442]. By hampering binding of a whole group of RNAs [presumably those containing high-affinity (AAN)_n motifs] the distal face mutation will cause a substantial increase of Hfq availability for the remaining RNAs (which are therefore stabilized). Of note is that the effects of the Hfq mutations of *yifKP1* and *yifKP2* appears to overrun the effects on RyhBX levels: i.e. *yifKP2-lacZ* derepresses in the L32P mutant in spite of the increase in the levels of the repressor sRNA; while the decreased levels of RyhBX in the proximal face mutants do not prevent full repression of *yifKP2-lacZ* (Fig. 3B).

Hfq-dependent stabilization of mini mRNA chimeras provides an assay for Hfq-mRNA binding *in vivo*

In all of the above work, Hfq binding to the mRNAs – or lack thereof – is inferred from the increase in *lacZ* activity consequent to the derepression of mRNA translation when such binding is defective (sRNA unable to repress). This method is indirect and subjected to unpredictable variations inherent to the translation component. Therefore, we developed a direct assay for measuring Hfq binding to mRNAs *in vivo*. This involved constructing “mini” variants of *yifK* and its derivatives in which the 5' UTR, without the initiating AUG, is fused to a Rho-independent transcription terminator (Fig. S2). Initial tests showed these mini transcripts to behave similarly to sRNAs: they could be detected in the presence but not in the absence of Hfq, suggesting that they are stabilized by Hfq binding. The *yifKP2* derivative showed the simplest pattern (Fig. 5A). The disappearance of *yifKP2* RNA in the L32P mutant suggests that this RNA binds to the distal face of Hfq presumably through the (AAY)₃ motif. Presence of ChiX or GcvBX does not appear to influence *yifKP2* RNA levels significantly (compare with Δ sRNA panel), likely reflecting the fact that these sRNAs act inefficiently on *yifKP2* (Fig. 2). In contrast, *yifKP2* RNA goes completely undetected in the presence of RyhBX, suggesting that pairing with this sRNA promotes *yifKP2* RNA degradation (Fig. 5A).

***yifKP1* RNA requires pairing with an sRNA in order to bind Hfq**

No *yifKP1*-related RNA is ever detected in the absence of Hfq or in the Hfq proximal face mutants, implying that *yifKP1* RNA is rapidly degraded if it cannot bind Hfq (Fig. 5B). In a wt Hfq strain, full-length *yifKP1* mini RNA and a slightly shorter species (*yifKP1**) are detected only provided that the strain expresses an sRNA that can pair with *yifKP1* (ChiX or RyhBX). In the absence of such sRNAs (Δ sRNA) or in the presence of GcvBX (which regulates *yifKP1* poorly), no *yifKP1*-related band is detected (Fig. 5B). We conclude that *yifKP1* mini transcript requires pairing with an sRNA in order to bind Hfq. In other words, Hfq binds *yifKP1* RNA after, not before, the establishment of the mRNA:sRNA interaction.

The pairing requirement appears to reflect a low affinity of Hfq for *yifKP1*'s (and hence for *chiP*'s) 5' UTR. This is consistent with the results of gel shift measurements, which showed that *in vitro* made *yifKP2* RNA binds Hfq with significantly greater affinity than *yifKP1* RNA (Fig. S3). Interestingly, *yifKP1* RNA becomes detectable in the presence of the L32P mutation regardless of the sRNA background. As proposed above, we believe that the effect of the L32P mutation is to offset all competing RNA ligands that normally bind to the distal face, *de facto* making more Hfq available to

Résultats

ligands that only require the proximal face for binding. Consistent with this interpretation, Hfq L32P downregulates the transcripts from the *chiPQ* locus in the absence of any sRNA (Fig. 6). Normally, *chiPQ* and *chiP* mRNAs accumulate in strains deleted for *chiX* since they are stabilized by the translational derepression [28]. Finding that this is not the case if the Δ *chiX* strain harbors the Hfq L32P mutation (last lane on the right), strongly suggests that the Hfq L32P can bind to the 5' UTR of *chiPQ* and *chiP* mRNAs, without the help of any sRNA, interfere with their translation and stimulate their decay.

Assessing the contribution of the arginine patch in the Hfq rim to *yifKP1* and *yifKP2* regulation

A large body of evidence indicates that the arginine patch in the lateral surface of the Hfq hexamer plays a major role in Hfq-mediated RNA transactions [418,431,433,434]. The RRER patch is highly conserved in Gram-negative bacteria, while conservation declines in the Hfq proteins from Gram-positive bacteria whose role in regulation is less established [431]. These include the Hfq proteins from *Bacillus subtilis* or *Staphylococcus aureus*, both of which fail to complement the loss of Hfq in *Salmonella* [318,443]. It was recently proposed that the divergence of the arginine patch sequences can account for the lack of complementation [433].

The arginine patch lies in close proximity of N13, one of the proximal face residues mutated in this study (Fig. S4). To gain further insight into the interaction paths of *yifKP1* and *yifKP2* on the Hfq surface, we constructed two rim mutants, one in which the RRER sequence is replaced by the corresponding sequence in the Hfq protein of *B. subtilis* (RKEN), the other with the sequence from *S. aureus* Hfq (KANQ). The effects of these mutations on *yifKP1* and *yifKP2* regulation were analyzed in the background of the *yifK-lacZ* fusions (Fig. 7A, in preparation). In parallel, binding of the mini mRNA derivatives and of ChiX, GcvBX and RyhBX to the mutant Hfqs was evaluated by examining the stability of these RNAs *in vivo* by Northern blot analysis (data not show)

Dominant negative phenotype of a Gfp insertion in the Hfq rim.

We have constructed a hybrid protein carrying the superfolder Gfp inserted in the rim of the Hfq hexamer. This chimera exhibits a dominant negative phenotype when combined with wild-type Hfq, presumably due to the formation of partially or completely inactive heterohexamers. We are analyzing the effects of this insertion mutant on *yifKP1* and *yifKP2* regulation and Hfq binding both in wt *hfq* and Δ *hfq* backgrounds (data not show).

Discussion (in preparation)

Experimental Procedures

Bacterial strains and culture conditions

Strains used in this work are derived from either of two strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: strain MA3409, a derivative of strain LT2 [444] cured for the Gifsy prophage [445]. The genotypes of the relevant strains used are listed in Table S1. Bacteria were cultured at 37°C in liquid media or in media solidified by the addition of 1.5% Difco agar. LB broth [446] was used as complex medium. Carbon-free medium (NCE) [447], supplemented with 0.2% glycerol or 0.2% lactose was used as minimal medium. Antibiotics (Sigma-Aldrich) were included at the following final concentrations: chloramphenicol, 10 µg ml⁻¹; kanamycin monosulphate, 50 µg ml⁻¹; sodium ampicillin 100 µg ml⁻¹; spectinomycin dihydrochloride, 80 µg ml⁻¹; tetracycline hydrochloride, 25 µg ml⁻¹. MacConkey agar plates containing 1% lactose [448] were used to monitor *lacZ* expression in bacterial colonies. Liquid cultures were grown in New Brunswick gyratory shakers and growth was monitored by measuring the optical density at 600 nm with a Shimadzu UV-mini 1240 spectrophotometer.

Genetic techniques

Generalized transduction was performed using the high-frequency transducing mutant of phage P22, HT 105/1 *int-201* [449] as described [450]. Chromosomal engineering (recombineering) was carried out by the λ *red* recombination method [451-453] implemented as in [451]. Chromosomal *lacZ* gene fusions were constructed with the two-step procedure of [454]. Marker-free scarless mutagenesis was carried out as described [455]. Unless specified otherwise, the latter protocol was used for construction of all chimeric molecules. Donor DNA fragments used in the all of the above procedures were generated by the polymerase-chain reaction (PCR) using plasmid DNA or chromosomal DNA or DNA oligonucleotides as templates. Amplified fragments were electroporated into appropriate strains harboring the conditionally replicating plasmid pKD46, which carries the λ *red* operon under the control of the NT^{AD} promoter [451]. Bacteria carrying pKD46 were grown at 30°C in the presence of ampicillin. Arabinose (10 mM) was added 3 hours prior to preparation of electrocompetent cells. Electroporation was carried out using a Bio-Rad MicroPulser under the conditions specified by the manufacturer. Recombinant colonies were selected on LB plates containing the appropriate selection agent. Constructs were verified by PCR and DNA sequence analysis (performed by GATC company). DNA oligonucleotides used as PCR primers in the above constructions are listed in Table S2.

Résultats

Measurement of β -galactosidase activity

β -galactosidase activity was assayed in toluene-permeabilized cells as described in [456] and is expressed in Miller units or as percentage of the activity measured in the wild-type strain in the same experiment. Typically, measurements were performed on duplicate or triplicate cultures grown in late exponential phase ($OD_{600} \approx 0.7$). Standard deviations were generally less than 5% of the mean.

RNA extraction and Northern blot analysis

RNA was prepared by the acid-hot-phenol method from exponentially growing cells (OD_{600} of 0.35) as previously described [457]. Total RNA was estimated from the value of the OD at 260nm. For Northern analysis, 7.5 μ g of total RNA were separated under denaturing conditions either by 8% polyacrylamide-8M urea in TBE (Tris-borate-EDTA pH 8.3) buffer or by 1.3% agarose-2.2 M formaldehyde gel electrophoresis in MOPS ([N-morpholino] propanesulfonic acid-sodium acetate-EDTA pH7.0) buffer. For polyacrylamide gels, transfer of the RNA onto Hybond-N⁺ membrane (Amersham), was performed with a semidry electrotransfer apparatus (Transblot SD; BioRad); in the case of agarose gels, transfer to the same support was done using a vacuum blotter (Boekel/Appligene) after mild denaturation treatment in 50 mM NaOH, 10 mM NaCl. RNA was crosslinked to membrane by UV irradiation (Statagene UV Stratalinker 2400). DNA Membranes were hybridized to DNA oligonucleotides probes (Table S2) as follows: 5 pmol of oligonucleotide were 5' end-labeled using 10 U of T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs) and 30 mCi of [γ -³²P]ATP (3,000 mCi mmol⁻¹, Hartmann Analytic). Unincorporated radioactivity was eliminated by passage through Micro-Bio Spin 6 chromatography columns (BioRad). Hybridization was carried out in Ambion Oligonucleotide Hybridization Buffer at 45-50°C following Ambion's protocol. RNA was analysed by Phosphorimaging using ImageQuant software.

References

- Balbontín, R., N. Villagra, M. Pardos de la Gandara, G. Mora, N. Figueroa-Bossi & L. Bossi, (2016) Expression of Iron, the Salmochelin siderophore receptor, requires mRNA activation by RyhB small RNA homologues. *Mol Microbiol* **100**: 139-155.
- Bertani, G., (2004) Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. *J Bacteriol* **186**: 595-600.
- Brennan, R. G. & T. M. Link, (2007) Hfq structure, function and ligand binding. *Curr Opin Microbiol* **10**: 125-133.
- Datsenko, K. A. & B. L. Wanner, (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6640-6645.
- Desnoyers, G. & E. Masse, (2012) Noncanonical repression of translation initiation through small RNA recruitment of the RNA chaperone Hfq. *Genes Dev* **26**: 726-739.
- Dimastrogiovanni, D., K. S. Frohlich, K. J. Bandyra, H. A. Bruce, S. Hohensee, J. Vogel & B. F. Luisi, (2014) Recognition of the small regulatory RNA RydC by the bacterial Hfq protein. *Elife* **3**: doi: 10.7554/eLife.05375.
- Ellermeier, C. D., A. Janakiraman & J. M. Slauch, (2002) Construction of targeted single copy lac fusions using lambda Red and FLP-mediated site-specific recombination in bacteria. *Gene* **290**: 153-161.
- Fender, A., J. Elf, K. Hampel, B. Zimmermann & E. G. Wagner, (2010) RNAs actively cycle on the Sm-like protein Hfq. *Genes Dev* **24**: 2621-2626.
- Figueroa, N., N. Wills & L. Bossi, (1991) Common sequence determinants of the response of a prokaryotic promoter to DNA bending and supercoiling. *Embo J* **10**: 941-949.
- Figueroa-Bossi, N. & L. Bossi, (2015) Recombineering applications for the mutational analysis of bacterial RNA-binding proteins and their sites of action. *Methods Mol Biol* **1259**: 103-116.
- Figueroa-Bossi, N., E. Coissac, P. Netter & L. Bossi, (1997) Unsuspected prophage-like elements in Salmonella typhimurium. *Mol Microbiol* **25**: 161-173.
- Figueroa-Bossi, N., M. Valentini, L. Malleret, F. Fiorini & L. Bossi, (2009) Caught at its own game: regulatory small RNA inactivated by an inducible transcript mimicking its target. *Genes Dev* **23**: 2004-2015.
- Folichon, M., V. Arluison, O. Pellegrini, E. Huntzinger, P. Regnier & E. Hajsndorf, (2003) The poly(A) binding protein Hfq protects RNA from RNase E and exoribonucleolytic degradation. *Nucleic Acids Res* **31**: 7302-7310.
- Geissmann, T. A. & D. Touati, (2004) Hfq, a new chaperoning role: binding to messenger RNA determines access for small RNA regulator. *Embo J* **23**: 396-405.

Résultats

- Hussein, R. & H. N. Lim, (2011) Disruption of small RNA signaling caused by competition for Hfq. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 1110-1115.
- Lemire, S., N. Figueroa-Bossi & L. Bossi, (2011) Bacteriophage crosstalk: coordination of prophage induction by trans-acting antirepressors. *PLoS Genet* **7**: e1002149.
- Lilleengen, K., (1948) Typing of *Salmonella typhimurium* by means of bacteriophage. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **77**: 2-125.
- Link, T. M., P. Valentin-Hansen & R. G. Brennan, (2009) Structure of Escherichia coli Hfq bound to polyriboadenylate RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 19292-19297.
- Macconkey, A., (1905) Lactose-Fermenting Bacteria in Faeces. *J Hyg (Lond)* **5**: 333-379.
- Maloy, S. R. & J. R. Roth, (1983) Regulation of proline utilization in Salmonella typhimurium: characterization of put::Mu d(Ap, lac) operon fusions. *J Bacteriol* **154**: 561-568.
- Massé, E., F. E. Escorcía & S. Gottesman, (2003) Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in Escherichia coli. *Genes Dev* **17**: 2374-2383.
- Mikulecky, P. J., M. K. Kaw, C. C. Brescia, J. C. Takach, D. D. Sledjeski & A. L. Feig, (2004) Escherichia coli Hfq has distinct interaction surfaces for DsrA, rpoS and poly(A) RNAs. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 1206-1214.
- Miller, J. H., (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics. A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Moll, I., T. Afonyushkin, O. Vytvytska, V. R. Kaberdin & U. Bläsi, (2003) Coincident Hfq binding and RNase E cleavage sites on mRNA and small regulatory RNAs. *RNA* **9**: 1308-1314.
- Moller, T., T. Franch, P. Hojrup, D. R. Keene, H. P. Bachinger, R. G. Brennan & P. Valentin-Hansen, (2002) Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction. *Mol Cell* **9**: 23-30.
- Moon, K. & S. Gottesman, (2011) Competition among Hfq-binding small RNAs in Escherichia coli. *Mol Microbiol*.
- Murphy, K. C., K. G. Campellone & A. R. Poteete, (2000) PCR-mediated gene replacement in Escherichia coli. *Gene* **246**: 321-330.
- Otaka, H., H. Ishikawa, T. Morita & H. Aiba, (2011) PolyU tail of rho-independent terminator of bacterial small RNAs is essential for Hfq action. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 13059-13064.
- Panja, S., D. J. Schu & S. A. Woodson, (2013) Conserved arginines on the rim of Hfq catalyze base pair formation and exchange. *Nucleic Acids Res* **41**: 7536-7546.
- Panja, S. & S. A. Woodson, (2012) Hfq proximity and orientation controls RNA annealing. *Nucleic Acids Res* **40**: 8690-8697.
- Plumbridge, J., L. Bossi, J. Oberto, J. T. Wade & N. Figueroa-Bossi, (2014) Interplay of transcriptional and small RNA-dependent control mechanisms regulates chitosugar uptake in Escherichia coli and Salmonella. *Mol Microbiol* **92**: 648-658.

Résultats

- Robinson, K. E., J. Orans, A. R. Kovach, T. M. Link & R. G. Brennan, (2014) Mapping Hfq-RNA interaction surfaces using tryptophan fluorescence quenching. *Nucleic Acids Res* **42**: 2736-2749.
- Rochat, T., P. Bouloc, Q. Yang, L. Bossi & N. Figueroa-Bossi, (2012) Lack of interchangeability of Hfq-like proteins. *Biochimie* **94**: 1554-1559.
- Rochat, T., O. Delumeau, N. Figueroa-Bossi, P. Noirot, L. Bossi, E. Dervyn & P. Bouloc, (2015) Tracking the Elusive Function of *Bacillus subtilis* Hfq. *PLoS One* **10**: e0124977.
- Salvail, H., M. P. Caron, J. Belanger & E. Masse, (2013) Antagonistic functions between the RNA chaperone Hfq and an sRNA regulate sensitivity to the antibiotic colicin. *EMBO J* **32**: 2764-2778.
- Sauer, E., (2013) Structure and RNA-binding properties of the bacterial LSm protein Hfq. *RNA Biol* **10**: 610-618.
- Sauer, E., S. Schmidt & O. Weichenrieder, (2012) Small RNA binding to the lateral surface of Hfq hexamers and structural rearrangements upon mRNA target recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 9396-9401.
- Sauer, E. & O. Weichenrieder, (2011) Structural basis for RNA 3'-end recognition by Hfq. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 13065-13070.
- Schmieger, H., (1972) Phage P22-mutants with increased or decreased transduction abilities. *Mol Gen Genet* **119**: 75-88.
- Schu, D. J., A. Zhang, S. Gottesman & G. Storz, (2015) Alternative Hfq-sRNA interaction modes dictate alternative mRNA recognition. *EMBO J* **34**: 2557-2573.
- Schumacher, M. A., R. F. Pearson, T. Moller, P. Valentin-Hansen & R. G. Brennan, (2002) Structures of the pleiotropic translational regulator Hfq and an Hfq-RNA complex: a bacterial Sm-like protein. *Embo J* **21**: 3546-3556.
- Sharma, C. M., K. Papenfort, S. R. Pernitzsch, H. J. Mollenkopf, J. C. Hinton & J. Vogel, (2011) Pervasive post-transcriptional control of genes involved in amino acid metabolism by the Hfq-dependent GcvB small RNA. *Mol Microbiol* **81**: 1144-1165.
- Soper, T., P. Mandin, N. Majdalani, S. Gottesman & S. A. Woodson, (2010) Positive regulation by small RNAs and the role of Hfq. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 9602-9607.
- Soper, T. J. & S. A. Woodson, (2008) The rpoS mRNA leader recruits Hfq to facilitate annealing with DsrA sRNA. *RNA* **14**: 1907-1917.
- Vogel, J. & B. F. Luisi, (2011) Hfq and its constellation of RNA. *Nat Rev Microbiol* **9**: 578-589.
- Yang, Q., N. Figueroa-Bossi & L. Bossi, (2014) Translation enhancing ACA motifs and their silencing by a bacterial small regulatory RNA. *PLoS Genet* **10**: e1004026.
- Yu, D., H. M. Ellis, E. C. Lee, N. A. Jenkins, N. G. Copeland & D. L. Court, (2000) An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 5978-5983.

Résultats

- Zhang, A., D. J. Schu, B. C. Tjaden, G. Storz & S. Gottesman, (2013) Mutations in interaction surfaces differentially impact E. coli Hfq association with small RNAs and their mRNA targets. *J Mol Biol* **425**: 3678-3697.
- Zhang, A., K. M. Wassarman, J. Ortega, A. C. Steven & G. Storz, (2002) The Sm-like Hfq protein increases OxyS RNA interaction with target mRNAs. *Mol Cell* **9**: 11-22.
- Zheng, A., S. Panja & S. A. Woodson, (2016) Arginine Patch Predicts the RNA Annealing Activity of Hfq from Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *J Mol Biol*.

Figure Legends

Figure 1. Sequences of mRNAs, sRNAs and chimeric derivatives analyzed in this study.

A) 5' UTR of mRNAs. GcvB-regulated *yifK* mRNA (center) has a (AAY)₃ Hfq binding motif (highlighted in pink). In the *yifKP1* chimera, top, A 51 nt segment including the GcvB target sequence and the (AAY)₃ motif was replaced by a 62 nt *chiP* segment encompassing the ChiX target sequence (highlighted in yellow) and the U-rich Hfq binding sequence (highlighted in light blue) from the *chiP* mRNA. A variant of *yifKP1* was constructed by deleting the U-rich segmented (deletion denoted by “ΔU” underline). The *yifKP2* derivative, bottom, also carries the sRNA binding sequence targeted by ChiX (in yellow). Only the pairing region is exchanged (as part of a 24 nt / 27 nt swap) so that the target sequence of ChiX is in the context of the (AAY)₃ motif.

B) sRNAs GcvBX and RhyBX were derived from GcvB and RyhB1, respectively, by replacing their pairing sequences with the pairing sequence of ChiX (highlighted in yellow). The putative Hfq binding sites on both sRNAs are highlighted in blue. The (AAY)₃-type Hfq binding site of ChiX is highlighted in pink.

Figure 2. Effect of reassorting the Hfq binding sites of sRNA and target mRNA on sRNA-mediated regulation.

β-galactosidase activity in strains carrying *lacZ* translational fusions to *yifKP1*, *yifKP2* and *yifKP1ΔU*. Activity was assayed in strains expressing chromosomally encoded ChiX, or GcvBX, or RhyBX, none of the three (ΔsRNA) and in a Δ*hfq* mutant strain (put MA numbers). Bacteria were grown in LB at 37°C to OD₆₀₀ of 0.4 and assays performed as described in Materials and Methods section. Fold effects in the expression of mRNAs as a function of the sRNA present in the cell are shown on the accompanying table. The full genotypes of the strains used are shown in Table S1

Figure 3. Identification of Hfq mutations affecting *yifKP1* and *yifKP2* repression by RyhBX differentially.

A: *Salmonella* Hfq protein, proximal and distal face views (PyMol, “surface” mode, PDB#2YLB). Mutations isolated here change proximal face residues P10 (red) and N13 (green) and distal face residue L32 (black).

Résultats

B) β -galactosidase activity in strains carrying *lacZ* translational fusions to *yifKP1*, *yifKP2* expressing the chromosomically encoded sRNA RhyBX, combined with wt *hfq*, Δhfq and the different *hfq* mutations. All strains contain a deletion of the *fur* gene (Table S1).

Figure 4. Northern analysis of the steady state levels of sRNAs in Hfq proximal and distal face mutants.

Total RNA extracted from exponentially growing cells (OD600 . 0.35) was fractionated on an 8% polyacrylamide-8M urea gel and electrotransferred onto a Hybond-N. membrane. Blots were hybridized to 5'-end labelled DNA oligonucleotide probes (Table S). 5S RNA is used as loading control. The strains used are listed in Table S1.

Figure 5: Northern analysis of steady state levels of mini-mRNAs in the presence of different sRNAs and different *hfq* alleles.

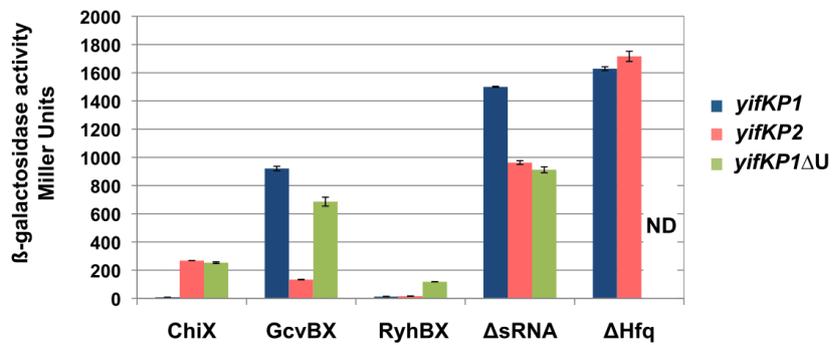
A) *yifKP2* mini-transcript made by replacing the initiating AUG by Rho-independent terminator B) *yifKP1* mini- transcript made as above. *yifKP1** is a shorter of *yifKP1* likely to result from processing. Total RNA extracted from exponentially growing cells (OD600 . 0.35) was fractionated on an 8% polyacrylamide-8M urea gel and electrotransferred onto a Hybond-N. membrane. Blots were hybridized to 5'-end labeled DNA oligonucleotide probes (Table S2). 5S RNA is used as loading control. Salmonella strains used are listed in Table S1.

Figure 6 Destabilizing direct effect of distal face Hfq mutant L32P on *chiPQ* mRNA.

Northern blot analysis was performed as follows; total RNA was extracted from exponentially growing cells (OD600 . 0.35) was fractionated on a 1.3% agarose-2.2 M formaldehyde gel in MOPS buffer pH7.0. Transfer of the RNA onto Hybond-N⁺ membrane (Amersham), was performed using a vacuum blotter (Boekel/Appligene) after mild denaturation treatment in 50 mM NaOH, 10 mM NaCl. Blots were hybridized to 5'-end labeled DNA oligonucleotide probes (Table S2). 5S RNA is used as loading control (Table S1).

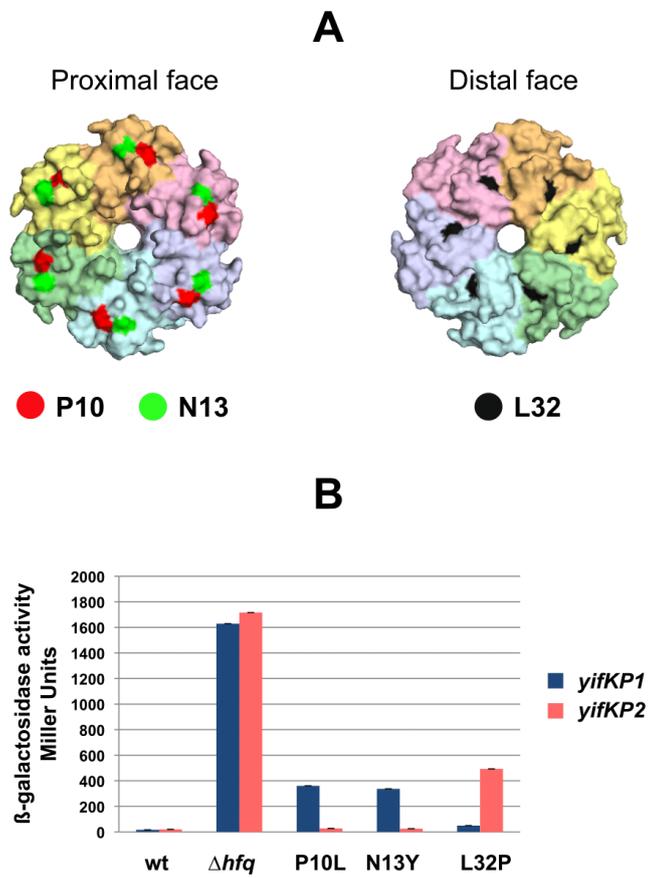
Résultats

Figure 2 --- Guillemardet *et al.*



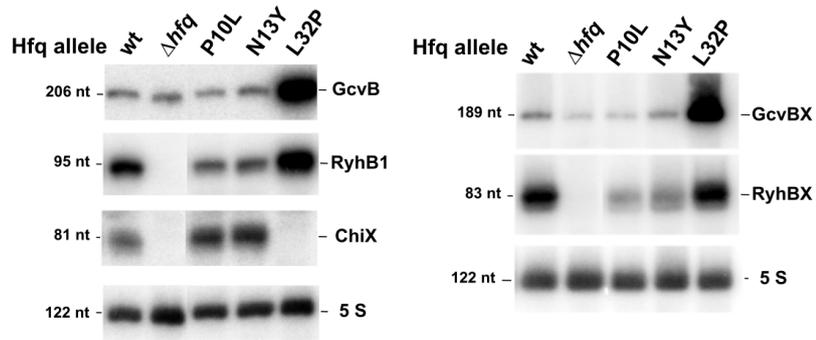
| Fold Repression | | | |
|-----------------|---------------|---------------|-----------------|
| | <i>yifKP1</i> | <i>yifKP2</i> | <i>yifKP1ΔU</i> |
| ChiX | > 100 | 3 | 3 |
| GcvBX | 2 | 7 | 1 |
| RyhBX | > 100 | 50 | 8 |

Figure 3 --- Guillemardet *et al.*



Résultats

Figure 4 --- Guillemardet *et al.*



Résultats

Figure 5 --- Guillemardet *et al.*

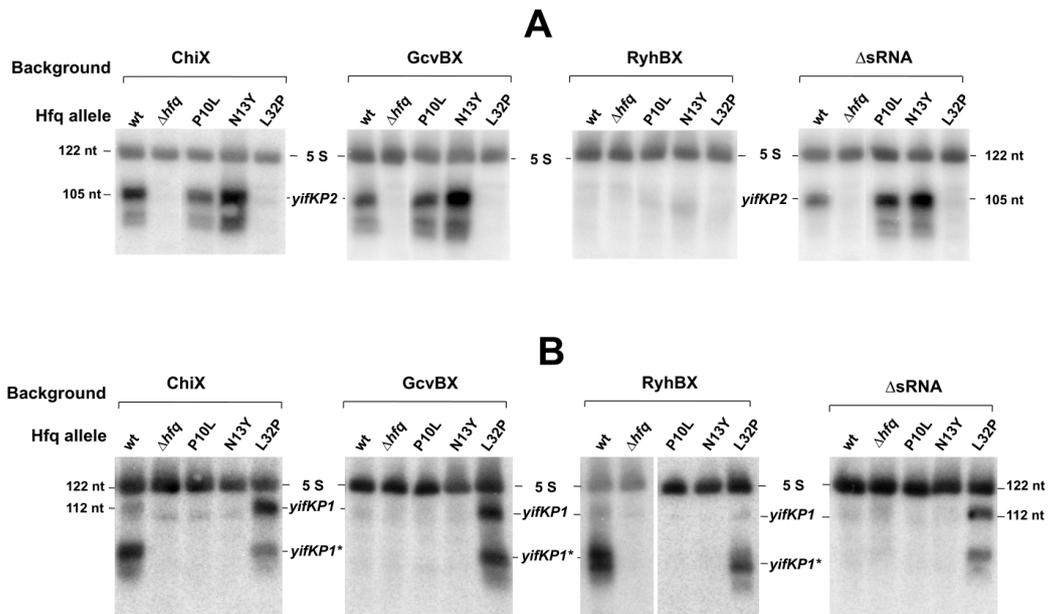


Figure 6 --- Guillemardet *et al.*

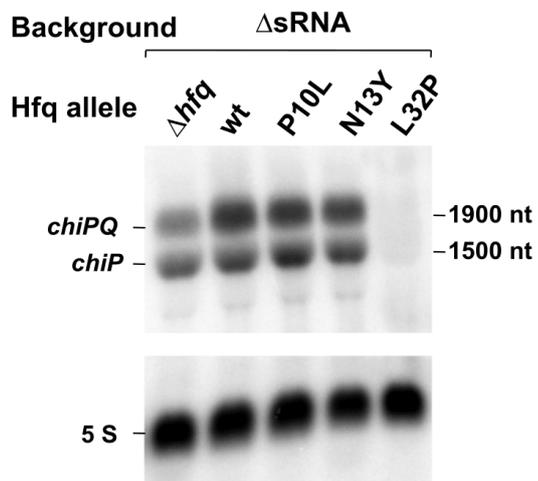


Figure S1 --- Guillemardet *et al.*

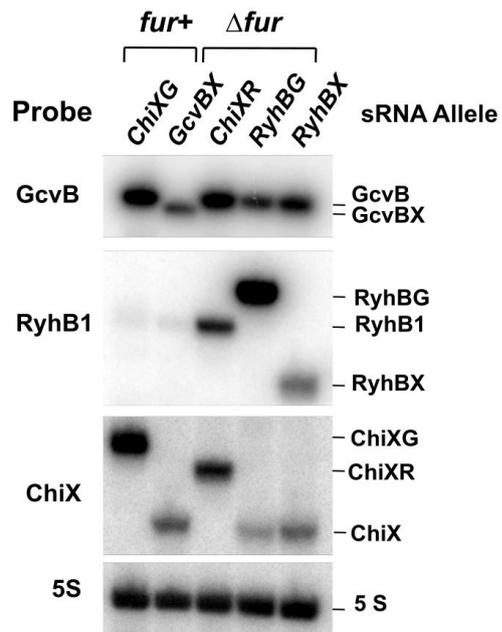
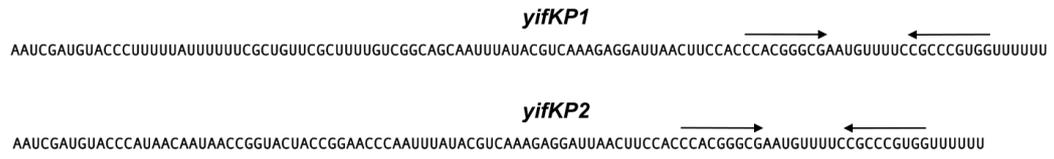


Figure S2 --- Guillemardet *et al.*



Résultats

Figure S3 --- Guillemardet *et al.*

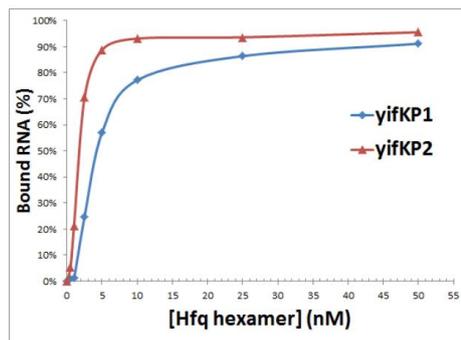
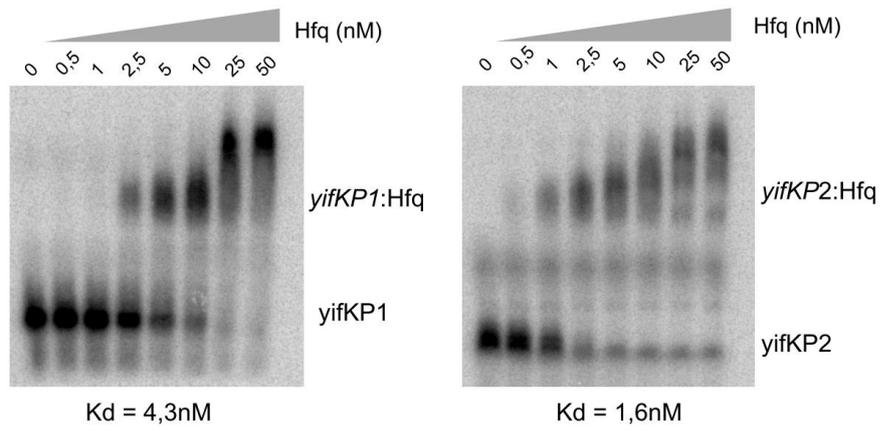
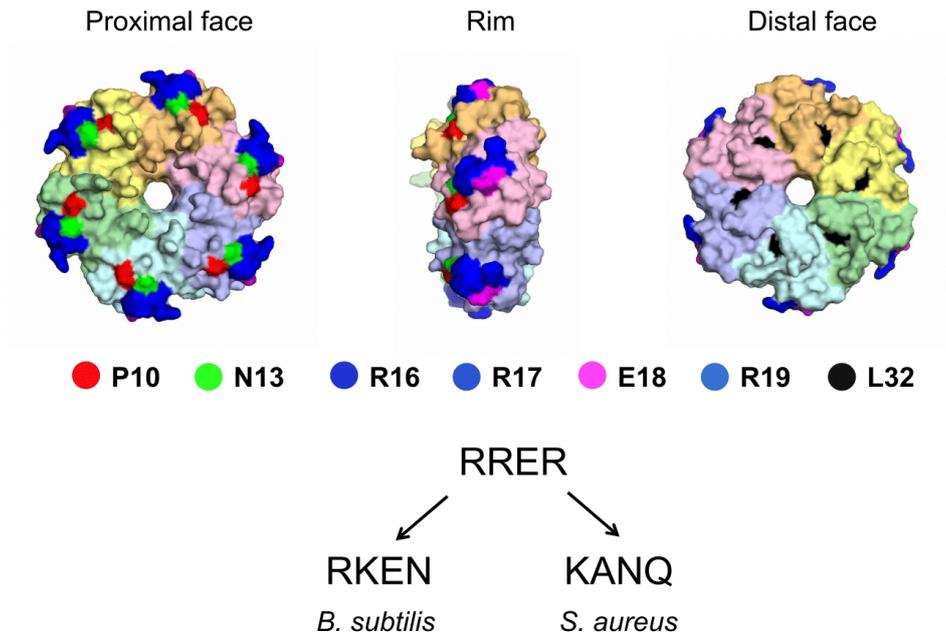


Figure S4 --- Guillemardet *et al.*



Résultats

Table S1. *Salmonella* strains used in this work. --- Guillemardet et al.

| Figure 2 | |
|----------|--|
| Strain | Génotype |
| BG220 | Gifsy-1[-] <i>yifKP1::lacZ</i> |
| BG229 | Gifsy-1[-] <i>yifKP1::lacZ Δ[chiX-ybaP]::cat</i> |
| BG231 | Gifsy-1[-] <i>yifKP1::lacZ Δ[chiX-ybaP]::cat gcvBX</i> |
| BG237 | Gifsy-1[-] <i>yifKP2::lacZ</i> |
| BG238 | Gifsy-1[-] <i>yifKP2::lacZ Δ[chiX-ybaP]::cat</i> |
| BG239 | Gifsy-1[-] <i>yifKP2::lacZ Δ[chiX-ybaP]::cat gcvBX</i> |
| BG262 | Gifsy-1[-] <i>yifKP1ΔU::lacZ</i> |
| BG263 | Gifsy-1[-] <i>yifKP1ΔU::lacZ Δ[chiX-ybaP]::cat</i> |
| BG264 | Gifsy-1[-] <i>yifKP1ΔU::lacZ Δ[chiX-ybaP]::cat gcvBX</i> |
| BG268 | Gifsy-1[-] <i>yifKP1::lacZ ryhBX ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Δ[chiX-ybaP]::scar</i> |
| BG269 | Gifsy-1[-] <i>yifKP2::lacZ ryhBX ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Δ[chiX-ybaP]::scar</i> |
| BG274 | Gifsy-1[-] <i>yifKP1ΔU::lacZ ryhBX ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Δ[chiX-ybaP]::scar</i> |
| BG625 | Gifsy-1[-] <i>yifKP1::lacZ Δhfq::cat</i> |
| BG637 | Gifsy-1[-] <i>yifKP2::lacZ Δhfq::cat</i> |

| Figure 3 | |
|----------|---|
| Strain | Génotype |
| BG483 | Gifsy-1[-] <i>yifKP1::lacZ ryhBX ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Δ[chiX-ybaP]::scar Δhfq::cat</i> |
| BG497 | Gifsy-1[-] <i>yifKP1::lacZ ryhBX ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Δ[chiX-ybaP]::scar hfq-3XFLAG-cat</i> |
| BG563 | Gifsy-1[-] <i>yifKP2::lacZ ryhBX ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Δ[chiX-ybaP]::scar Δhfq::cat</i> |
| BG601 | Gifsy-1[-] <i>yifKP2::lacZ ryhBX ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Δ[chiX-ybaP]::scar hfq-3XFLAG-cat</i> |
| BG610 | Gifsy-1[-] <i>yifKP1::lacZ ryhBX ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Δ[chiX-ybaP]::scar hfqP10L-3XFLAG-cat</i> |
| BG611 | Gifsy-1[-] <i>yifKP2::lacZ ryhBX ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Δ[chiX-ybaP]::scar hfqP20L-3XFLAG-cat</i> |
| BG612 | Gifsy-1[-] <i>yifKP1::lacZ ryhBX ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Δ[chiX-ybaP]::scar hfqN13Y-3XFLAG-cat</i> |
| BG613 | Gifsy-1[-] <i>yifKP2::lacZ ryhBX ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Δ[chiX-ybaP]::scar hfqN13Y-3XFLAG-cat</i> |
| BG616 | Gifsy-1[-] <i>yifKP1::lacZ ryhBX ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Δ[chiX-ybaP]::scar hfqL32P-3XFLAG-cat</i> |

Résultats

| | |
|-------|---|
| BG617 | Gifsy-1[-] <i>yifKP2::lacZ ryhBX ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Δ[chiX-ybaP]::scar hfqL32P-3XFLAG-cat</i> |
|-------|---|

Figure 4

| Strain | Génotype |
|--------|---|
| BG483 | Gifsy-1[-] <i>yifKP1::lacZ ryhBX ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Δ[chiX-ybaP]::scar Δhfq::cat</i> |
| BG497 | Gifsy-1[-] <i>yifKP1::lacZ ryhBX ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Δ[chiX-ybaP]::scar hfq-3XFLAG-cat</i> |
| BG610 | Gifsy-1[-] <i>yifKP1::lacZ ryhBX ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Δ[chiX-ybaP]::scar hfqP10L-3XFLAG-cat</i> |
| BG612 | Gifsy-1[-] <i>yifKP1::lacZ ryhBX ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Δ[chiX-ybaP]::scar hfqN13Y-3XFLAG-cat</i> |
| BG616 | Gifsy-1[-] <i>yifKP1::lacZ ryhBX ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Δ[chiX-ybaP]::scar hfqL32P-3XFLAG-cat</i> |
| BG630 | Gifsy-1[-] <i>yifKP1::lacZ gcvBX Δ[chiX-ybaP]::scar hfq-3XFLAG-cat</i> |
| BG631 | Gifsy-1[-] <i>yifKP1::lacZ gcvBX Δ[chiX-ybaP]::scar Δhfq::cat</i> |
| BG633 | Gifsy-1[-] <i>yifKP1::lacZ gcvBX Δ[chiX-ybaP]::scar hfqP10L-3XFLAG-cat</i> |
| BG634 | Gifsy-1[-] <i>yifKP1::lacZ gcvBX Δ[chiX-ybaP]::scar hfqN13Y-3XFLAG-cat</i> |
| BG635 | Gifsy-1[-] <i>yifKP1::lacZ gcvBX Δ[chiX-ybaP]::scar hfqL32P-3XFLAG-cat</i> |
| BG676 | Gifsy-1[-] <i>sodB::lacZ ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Hfq-3XFlag-cat</i> |
| BG677 | Gifsy-1[-] <i>sodB::lacZ ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Hfq::cat</i> |
| BG679 | Gifsy-1[-] <i>sodB::lacZ ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Hfq-P10L-cat</i> |
| BG680 | Gifsy-1[-] <i>sodB::lacZ ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Hfq-N13Yg-cat</i> |
| BG681 | Gifsy-1[-] <i>sodB::lacZ ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Hfq-L32P-cat</i> |

Figure 5

| Strain | Génotype |
|--------|---|
| BG737 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP1-mini Hfq-3XFlag-cat</i> |
| BG738 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP1-mini ΔHfq::cat</i> |
| BG740 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP1-mini Hfq-P10L-cat</i> |
| BG741 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP1-mini Hfq-N13Y-cat</i> |
| BG742 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP1-mini Hfq-L32P-cat</i> |
| BG743 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP2-mini Hfq-3XFlag-cat</i> |
| BG744 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP2-mini ΔHfq::cat</i> |
| BG746 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP2-mini Hfq-P10L-cat</i> |
| BG747 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP2-mini Hfq-N13Y-cat</i> |
| BG748 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP2-mini Hfq-L32P-cat</i> |

Résultats

| | |
|-------|---|
| BG763 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP1-mini ΔChiX::tetAR Hfq-3XFlag-cat</i> |
| BG764 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP1-mini ΔChiX::tetAR ΔHfq::cat</i> |
| BG766 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP1-mini ΔChiX::tetAR Hfq-P10L-cat</i> |
| BG767 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP1-mini ΔChiX::tetAR Hfq-N13Y-cat</i> |
| BG768 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP1-mini ΔChiX::tetAR Hfq-L32P-cat</i> |
| BG769 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP1-mini gcvBX Δ[chiX-ybaP]::scar Hfq-3XFlag-cat</i> |
| BG770 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP1-mini gcvBX Δ[chiX-ybaP]::scar ΔHfq::cat</i> |
| BG772 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP1-mini gcvBX Δ[chiX-ybaP]::scar Hfq-P10L-cat</i> |
| BG773 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP1-mini gcvBX Δ[chiX-ybaP]::scar Hfq-N13Y-cat</i> |
| BG774 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP1-mini gcvBX Δ[chiX-ybaP]::scar Hfq-L32P-cat</i> |
| BG775 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP1-mini ryhBX ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Δ[chiX-ybaP]::scar Hfq-3XFlag-cat</i> |
| BG776 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP1-mini ryhBX ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Δ[chiX-ybaP]::scar ΔHfq::cat</i> |
| BG778 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP1-mini ryhBX ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Δ[chiX-ybaP]::scar Hfq-P10L-cat</i> |
| BG779 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP1-mini ryhBX ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Δ[chiX-ybaP]::scar Hfq-N13Y-cat</i> |
| BG780 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP1-mini ryhBX ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Δ[chiX-ybaP]::scar Hfq-L32P-cat</i> |
| BG781 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP2-mini ΔChiX::tetAR Hfq-3XFlag-cat</i> |
| BG782 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP2-mini ΔChiX::tetAR ΔHfq::cat</i> |
| BG784 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP2-mini ΔChiX::tetAR Hfq-P20L-cat</i> |
| BG785 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP2-mini ΔChiX::tetAR Hfq-N13Y-cat</i> |
| BG786 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP2-mini ΔChiX::tetAR Hfq-L32P-cat</i> |
| BG787 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP2-mini gcvBX Δ[chiX-ybaP]::scar Hfq-3XFlag-cat</i> |
| BG788 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP2-mini gcvBX Δ[chiX-ybaP]::scar ΔHfq::cat</i> |
| BG790 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP2-mini gcvBX Δ[chiX-ybaP]::scar Hfq-P20L-cat</i> |
| BG791 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP2-mini gcvBX Δ[chiX-ybaP]::scar Hfq-N13Y-cat</i> |
| BG792 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP2-mini gcvBX Δ[chiX-ybaP]::scar Hfq-L32P-cat</i> |
| BG793 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP2-mini ryhBX ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Δ[chiX-ybaP]::scar Hfq-3XFlag-cat</i> |
| BG794 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP2-mini ryhBX ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Δ[chiX-ybaP]::scar ΔHfq::cat</i> |
| BG796 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP2-mini ryhBX ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Δ[chiX-ybaP]::scar Hfq-P20L-cat</i> |
| BG797 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP2-mini ryhBX ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Δ[chiX-ybaP]::scar Hfq-N13Y-cat</i> |
| BG798 | Gifsy-1[-] <i>yifK C>-32>A yifKP2-mini ryhBX ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Δ[chiX-ybaP]::scar Hfq-L32P-cat</i> |

Résultats

| Figure 6 | |
|----------|--|
| Strain | Génotype |
| BG692 | Gifsy-1[-] <i>yifK::MudK Hfq-3XFlag-cat ΔChiX::tetAR</i> |
| BG693 | Gifsy-1[-] <i>yifK::MudK Hfq::cat ΔChiX::tetAR</i> |
| BG695 | Gifsy-1[-] <i>yifK::MudK Hfq-P10L-cat ΔChiX::tetAR</i> |
| BG696 | Gifsy-1[-] <i>yifK::MudK Hfq-N13Y-cat ΔChiX::tetAR</i> |
| BG697 | Gifsy-1[-] <i>yifK::MudK Hfq-L32P-cat ΔChiX::tetAR</i> |

| Figure S1 | |
|-----------|--|
| Strain | Génotype |
| BG153 | Gifsy-1[-] <i>chiPB ::lacZ ChiXR Δfur::tetAR</i> |
| MA11399 | Gifsy-1[-] <i>ChiXG</i> |
| MA11619 | Gifsy-1[-] <i>gcvBX</i> |
| MA11685 | Gifsy-1[-] <i>ryhBB ΔryhB2::spec Δfur::tetAR</i> |
| MA11694 | Gifsy-1[-] <i>ryhBX ΔryhB2::spec Δfur::tetAR</i> |

Résultats

Table S2. DNA oligonucleotides uses in this work --- Guillemardet *et al.*

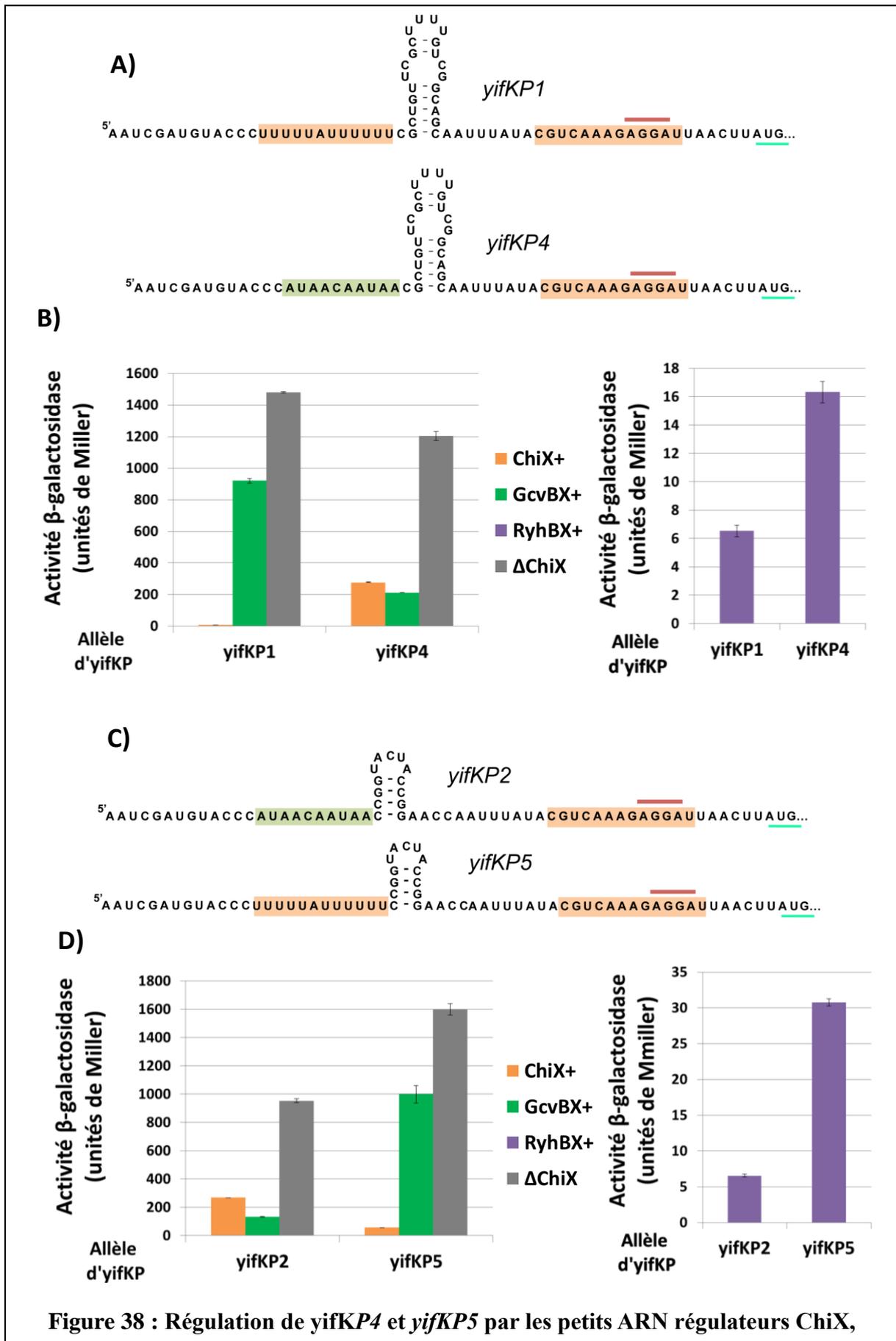
| Name | Sequence (5'-3') |
|-------|---|
| ppB10 | ACACTACCATCGGGCGCTACG |
| ppB68 | TGCCAATAATAGATGCCGCCGTTAACGTGGAGTCGTCGA |
| ppE17 | TGCTTTAGGTTCTCCGTAGGGGTTCCCCTGAATGCAAGG |
| ppI12 | ACCAGGTGCATCAGTTCGCT |
| ppI13 | CACCAGACGCGTAGCCAGAT |
| ppI22 | GGTAATACGACTCACTATAGGGCAATCGATGTACCCATAACAATAACCG |
| ppI23 | CCCGAGGGCAATCAATTCAA |
| ppL01 | GATCCGAAGCGAAAGCGTCGGGATAATAATAACGATGAAATTGTGATGTTGTGTTGTTGTGTTTGC |
| ppL02 | AAATATTGAAATAAAAAAATGGCCAATATCGCTATTGGCCATTGCAAACACAACAACACATCAC |
| ppL05 | GATCCGAAGCGAAAGCGTCGGGATAATAATAACGATGAAATGACATTGCTCACATTGCTTCCAGG |
| ppL06 | AAATATTGAAATAAAAAAATGGCCAATATCGCTATTGGCCCTGGAAGCAATGTGAGCAATG |
| ppL11 | CATCGTTATTATTATCCCAGCGTTTCGCTTCGGATC |
| ppL13 | CCCATCAGAACACGCATTCCGATAAAACTTTTCGTTCCGGCTCA |
| ppM31 | TTTATCGGAATGCGTGTCTGATGGGCTTTTGGCTTACGGTTGTGACCTCTTGACGAATTGGTC |
| ppM32 | AAAAGGGTAGTCTCGCTACCGTGGTCTGAATCGCAGACCAATTCGTCAAAGAGGGTCA |
| ppN22 | CTTGCAATTCAGGGGAACCCCTACGGAGAACCTGAAAGCACTTGTGATGTTGTGTTGTTGTGTTTGC |
| ppN23 | AAACCCAAAAAAAAGCCAGCAAAAAGCTGGCCAAAATAATACCAATTGCAAACACAACAACACATC |
| ppN24 | CTTGCAATTCAGGGGAACCCCTACGGAGAACCTGAAAGCACTCCTCTTTGACG |
| ppN25 | AAACCCAAAAAAAAGCCAGCAAAAAGCTGGCCAAAATAATCGTCAAAGAGGAGTGCTTTCAGG |
| ppO05 | AATCGATGTACCCATAACAATAACCGGTAACCGGAACCAATTTATACGTCAAAGAGG |
| ppO06 | CTTCCAGCCCACGCTGTAGCTCCGGTTTTTCTCTGCCATAAGTTAATCCTCTTTGACGTATAAATTGGG |
| ppO35 | GTCCAAATTTAAGAAAATATTCGCAACAATCGATGTACCCTTTTTATTTTTTCGCTGTTGCG |
| ppO36 | CTTCCAGCCCACGCTGTAGCTCCGGTTTTTCTCTGCCATAAGTTAATCCTCTTTGACGTATAAATT |
| ppO79 | GGTAATACGACTCACTATAGGGCAATCGATGTACCCTTTTTATTTTTTC |
| ppP02 | AATGCTCCATTTGCCATTTGTCCAAATTTAAGAAAATATTCGCAACAATCGATGTACCCCG |
| ppP03 | TCTTTGACGTATAAATTGCTGCCGACAAAAGCGAACAGCGGGGTACATCGATTGTTGC |
| ppV33 | TGTTTCGCTTTTGTGCGGCAGCAATTTATACGTCAAAGAGGATTAACCTCCACCCACGGGCGAATG |
| ppV34 | AACCGGTACTACCGGAACCAATTTATACGTCAAAGAGGATTAACCTCCACCCACGGGCGAATG |
| ppV35 | AATAATCGTGGTGACTTTGATCATCGCAAACCAGAACTCGATTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTT |
| ppV54 | GGTTCGGTAGTACCGGTTATTGTTATGGGTACATCGATT |
| ppV55 | TTTGACGTATAAATTGCTGCCGACAAAAGCGAACAGCGAAAAAATAAAAA |

1.4) Étude complémentaire : Rôle de la structure en tige-boucle en aval du site de fixation d'Hfq

Lors de l'étude précédente, nous avons observé que l'ARNm *yifKP1*, possédant le site de fixation d'Hfq de *chiP* (site polyU), est régulé de manière extrêmement efficace par ChiX (facteur 200X). Alors que le petit ARN régulateur chimérique GcvBX, dérivée de GcvB, n'arrive que très peu à réguler cette même construction. A contrario, dans la souche portant *yifKP2*, avec le site de fixation d'Hfq natif de *yifK* (motif (AAN)₃), la régulation par les petits ARN ChiX et GcvBX est inversée par rapport à celle qui est observée chez l'ARNm *yifKP1*. En effet, GcvBX régule fortement *yifKP2* (facteur 7) alors que ChiX le régule nettement moins efficacement. Bien que ces résultats puissent s'expliquer par les différences de séquences des sites de fixations d'Hfq des ARNm chimères par rapport aux petits ARN régulateurs, il existe d'autres changements au sein des séquences de ces ARNm, notamment la structure en tige-boucle en aval du site de fixation d'Hfq. En effet, lors de la construction de *yifKP1*, j'ai remplacé la séquence comprise entre le site de fixation d'Hfq et le site d'appariement de GcvB sur l'ARNm *yifK* par la séquence équivalente de *chiP* (Figure 38 A). Cette construction possède donc la structure en tige-boucle de *chiP* qui est différente de celle de *yifK* de par sa taille et par sa séquence. À l'inverse, lors de la construction de *yifKP2*, j'ai seulement remplacé la région d'appariement de GcvB de *yifK* par celle de ChiX chez *chiP* (Figure 38C). Ces différences de séquences, en plus de la différence du site de fixation d'Hfq, pourraient avoir un rôle dans la régulation de nos ARNm. Nous avons donc vérifié si la structure en tige-boucle en aval du site de fixation d'Hfq dans les ARNm *yifKP1* et *yifKP2* jouait un rôle dans la régulation par les petits ARN régulateurs ChiX et GcvBX.

Afin de vérifier cela, j'ai construit deux nouveaux ARNm chimères *yifKP4* et *yifKP5* pour vérifier notre hypothèse. Ces constructions ont été réalisées en suivant le protocole de recombinaison sans cicatrice à partir des souches portant *yifKP1::lacZ* et *yifKP2::lacZ*. La première chimère, *yifKP4*, est dérivée de *yifKP1*, mais possède le site de fixation d'Hfq de *yifK* à la place de celui de *chiP*, mais conserve la structure en tige-boucle de *chiP* (Figure 38 A). La seconde chimère, *yifKP5*, a été construite à partir de *yifKP2*, mais en remplaçant le site de fixation d'Hfq au motif (AAN)₃ par le motif polyU de *chiP* (Figure 38 C). J'ai ensuite transféré ces constructions par transductions dans différentes souches pour étudier leurs régulations par les différents petits ARN régulateurs.

Résultats



Résultats

A) Représentation des séquences et structures secondaires des ARNm *yifKP1* et *yifKP4*. Le site de fixation d'Hfq polyU de *chiP* est surligné en orange claire, le site de fixation d'Hfq de motif (AAN)₃ de *yifK* est surligné en vert. Le site d'appariement de ChiX est surligné en orange foncé. La séquence de SD est surlignée en rouge et l'AUG initiateur est sous-ligné en bleu clair. B) Activité β-galactosidase mesurée en unités de Miller et en phase exponentielle de croissance dans les souches *yifKP1::lacZ* et *yifKP4::lacZ* en présence des petits ARN régulateurs ChiX, GcvBX et RyhBX ou en leurs absences. C) Représentation des séquences et structures secondaires des ARNm *yifKP2* et *yifKP5*. Le site de fixation d'Hfq polyU de *chiP* est surligné en orange claire, le site de fixation d'Hfq de motif (AAN)₃ de *yifK* est surligné en vert. Le site d'appariement de ChiX est surligné en orange foncé. La séquence de SD est surlignée en rouge et l'AUG initiateur est sous-ligné en bleu clair. D) Activité β-galactosidase mesurée en unités de Miller et en phase exponentielle de croissance dans les souches *yifKP2::lacZ* et *yifKP5::lacZ* en présence des petits ARN régulateurs ChiX, GcvBX et RyhBX ou en leurs absences.

Finalement, j'ai réalisé un dosage de l'activité β-galactosidase de ces différentes constructions en présence des petits ARN régulateurs ChiX, GcvBX et RyhBX afin de les comparer aux résultats obtenus avec les ARNm *yifKP1* et *yifKP2* (Figure 38 B et D). L'analyse de ces résultats montre qu'en remplaçant le site de fixation d'Hfq polyU de *yifKP1* par le site de fixation d'Hfq (AAN)₃ de *yifK*, la régulation de cet ARNm a drastiquement changé. En effet, *yifKP1* est très bien régulé par ChiX et RyhBX et très peu par GcvBX alors qu'*yifKP4* présente une régulation opposée sauf pour RyhBX. En effet, il est très bien régulé par GcvBX passant de 920 à 210 unités de Miller entre les ARNm *yifKP1* et *yifKP4* respectivement (Figure 38 B). A contrario, ChiX ne réprime pas *yifKP4* (276 unités de Miller) aussi bien qu'il ne le fait pour *yifKP1* (8 unités de Miller). Enfin, RyhBX régule très efficacement les deux ARNm sans montrer de réelle différence d'expression du rapporteur passant de 6 unités de Miller avec *yifKP1* à 16 unités de Miller chez *yifKP2* (Figure 38 B).

L'effet inverse est observable en remplaçant le site de fixation d'Hfq (AAN)₃ de *yifKP2* par le site de fixation d'Hfq polyU de *chiP*. En effet, dans ce cas, la régulation de *yifKP5* par ChiX est plus efficace passant de 270 à 55 unités de Miller entre les ARNm *yifKP2* et *yifKP5* (Figure 38 D). En parallèle, la régulation de l'ARNm *yifKP5* par GcvBX est moins efficace que celle de *yifKP2*, passant de 130 à 1000 unités de Miller chez *yifKP2* et *yifKP5* respectivement (Figure 38 D). Ici aussi, la régulation par RyhBX n'est que très peu altérée par

Résultats

le changement du site de fixations à Hfq. En effet, ce dernier entraîne une légère diminution de la capacité de RyhBX à réguler l'ARNm faisant passer l'activité du rapporteur de 6 unités de Miller chez *yifKP2* à 30 unités de Miller chez *yifKP5* (Figure 38 D)

Ces résultats nous ont permis de confirmer que le changement du site de fixation d'Hfq peut modifier la régulation d'un ARNm par rapport à un petit ARN régulateur donné. Bien que ces résultats confortent notre hypothèse, il semble que la structure en tige-boucle pourrait aussi jouer un rôle, bien que non-essentiel, dans la régulation. En effet, l'ARNm *yifKP4* est moins bien régulé par GcvBX que ne l'est *yifKP2* alors qu'en même temps, *yifKP5* est moins bien régulé par ChiX qu'*yifKP1*. À la différence des autres petits ARN régulateurs, RyhBX est déjà capable de réguler aussi efficacement *yifKP1* et *yifKP2*. Les changements au niveau des sites de fixations à Hfq sur ces ARNm ne modifient que très peu sa capacité à les réguler, bien qu'ils aient un léger impact. Pourtant, les sites de fixations d'Hfq et d'appariement des petits ARN sont les mêmes. Les différences de séquences résident principalement dans la structure en tige-boucle qui diffère d'un ARNm à l'autre. Les reconnaissances entre les ARNm et leurs petits ARN régulateurs et le résultat de l'interaction qui en découle semblent donc suivre des règles plus complexes qu'ils n'y paraissent.

1.5) Étude complémentaire : Formation du complexe ternaire ARNm : Hfq : petit ARN régulateur *in vitro*

Au cours des expérimentations non présentés dans la thèse, nous avons pu montrer que les différents ARNm et petit ARN régulateurs chimères, étaient capables d'interagir avec la protéine Hfq *in vitro*, par des expériences de retard sur gel. Cette expérimentation nous a également permis de calculer l'affinité des différentes molécules d'ARN pour Hfq. En parallèle avec ces travaux, nous avons également voulu savoir s'il était possible d'observer, par des expériences analogues, la formation du complexe ternaire ARNm : Hfq : petit ARN régulateur.

Les ADN matrices permettant la synthèse des différents ARN ont été réalisés par PCR en utilisant des oligonucléotides sens ayant la séquence du promoteur reconnu par l'ARN polymérase du phage T7 en amont des séquences d'intérêt. Les ARN ont été synthétisés *in vitro*, puis une fraction fut radiomarqué. Les ARN synthétisés (radioactif ou non) ont par la suite été quantifiés pour réaliser les expériences de retard sur gel. Dans un premier temps, nous avons voulu savoir si cela était possible de voir les interactions entre les ARNm et les petits ARN régulateurs [1,458]. Les ARNm qui ont été sélectionnés pour cette étude sont *chiP* et son dérivé *chiPK* ainsi qu'*yifK* et ses dérivés *yifKP1* et *yifKP2*. Les petits ARN régulateurs utilisés sont ChiX, GcvB et son dérivé GcvBX.

Les résultats de ces expériences ARNm : petit ARN régulateur ont permis de confirmer l'existence des interactions entre les différentes molécules. En effet, en étudiant les interactions de l'ARNm *chiP* avec les différents petits ARN régulateurs, ce dernier est capable de former un complexe avec les petits ARN ChiX et GcvBX, mais pas avec le petit ARN GcvB dans les conditions de l'expérience (Figure 39 A). De même, l'ARNm *yifK* n'interagit qu'avec le petit ARN GcvB comme cela était attendu (Figure 39 B). Pour les ARNm *yifKP1* et *yifKP2*, nous pouvons observer, dans les deux cas, que les petits ARN régulateurs ChiX et GcvBX arrivent à former un complexe avec eux (Figure 39 C et D). Ce résultat n'a rien de surprenant puisque les ARNm *yifKP1* et *yifKP2* possèdent la séquence d'appariement de *chiP* à ChiX et que ChiX et GcvBX possèdent la séquence d'appariement complémentaire. Seule exception parmi ces résultats, l'ARNm *chiPK* ne semble pas être capable d'interagir avec GcvB alors que ce dernier possède la région d'appariement complémentaire. Mais, GcvB n'est pas capable de réguler l'ARNm *chiPK in vivo* donc ce résultat, bien que surprenant, n'est pas si étrange. Dans l'ensemble, les résultats de ces

Résultats

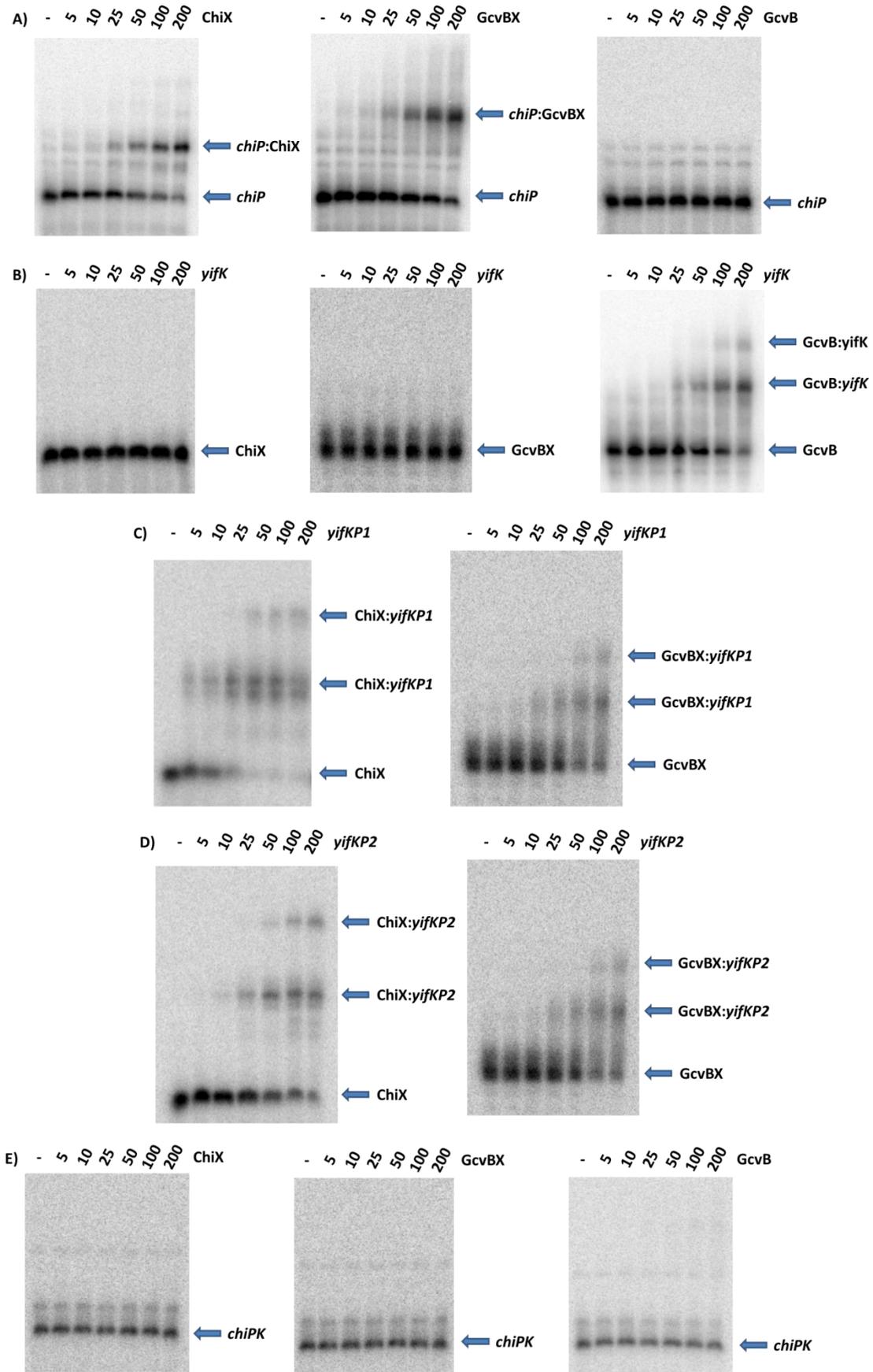


Figure 39 : Expérience de retard sur gels pour observer les interactions ARN:ARN.

Résultats

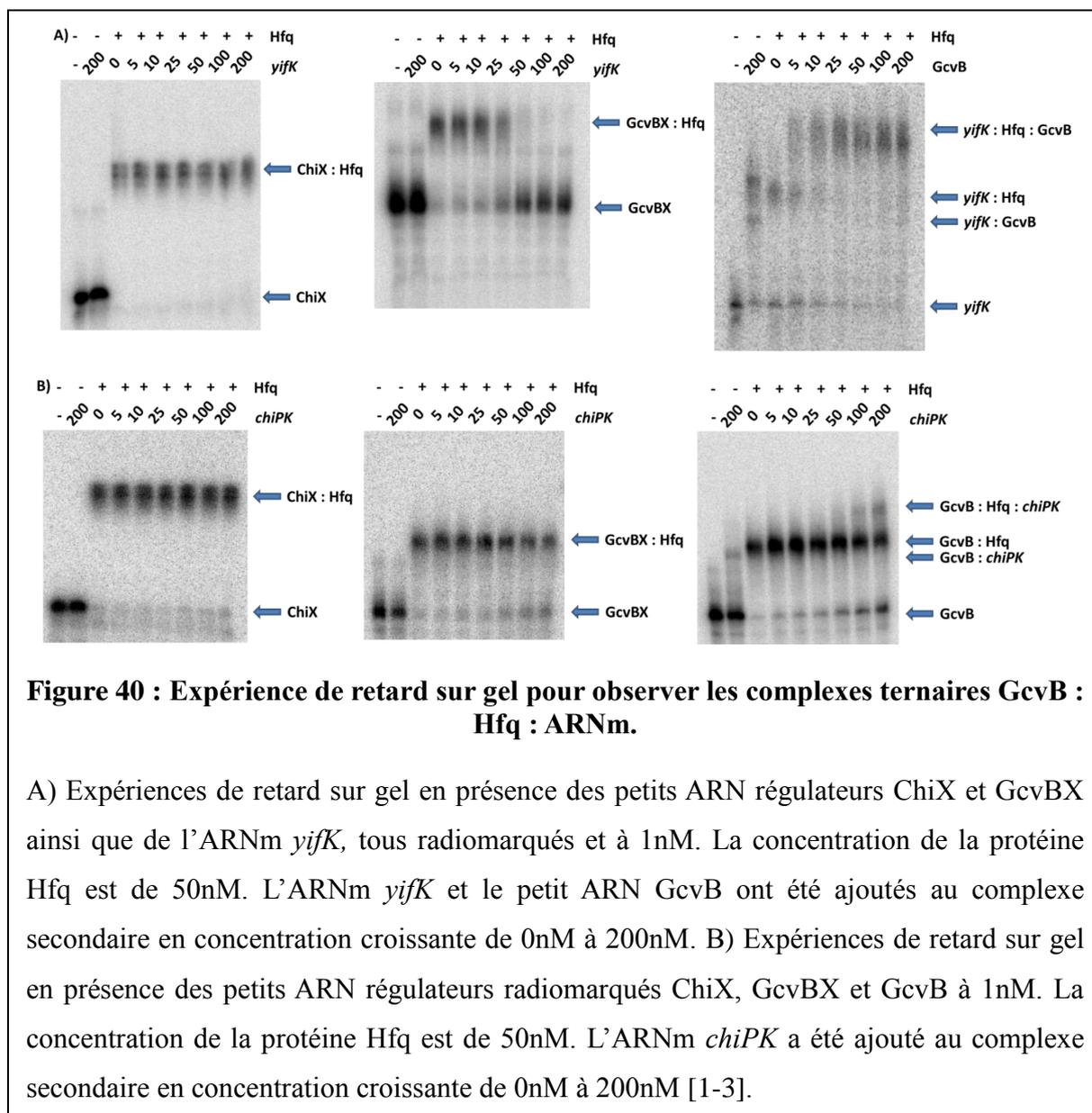
A) Expériences de retard sur gel en présence de l'ARNm *chiP* radiomarqué à 1nM. Les petits ARN régulateurs ChiX, GcvB et GcvBX ont été ajoutés en concentration croissante allant de 0nM à 200nM. B) Expériences de retard sur gel en présence des petits ARN régulateurs ChiX, GcvB et GcvBX radiomarqué à 1nM. L'ARNm *yifK* a été ajouté en concentration croissante allant de 0nM à 200nM. C) Expériences de retard sur gel en présence des petits ARN régulateurs ChiX et GcvBX radiomarqués à 1nM. L'ARNm *yifKP1* a été ajouté en concentration croissante allant de 0nM à 200nM. D) Expériences de retard sur gel en présence des petits ARN régulateurs ChiX et GcvBX radiomarqués à 1nM. L'ARNm *yifKP2* a été ajouté en concentration croissante allant de 0nM à 200nM. E) Expériences de retard sur gel en présence de l'ARNm *chiPK* radiomarqué à 1nM. Les petits ARN régulateurs ChiX, GcvB et GcvBX ont été ajoutés en concentration croissante allant de 0nM à 200nM.

expériences de retards sur gels sont très intéressants et permettent de confirmer *in vitro* les interactions entre les différents ARN. Ce point validé, nous pouvons nous intéresser au complexe ternaire *in vitro*.

Afin d'examiner les complexes ternaires par des expériences de retard sur gels, j'ai suivi le protocole suivant : i) préformer un complexe secondaire ARN : Hfq ; ii) ajouter le troisième partenaire pour former le complexe ternaire [1-3]. En suivant ce protocole, j'ai réalisé différentes expériences visant à visualiser les complexes ternaires *in vitro*. Les résultats de ces expérimentations sont regroupés dans les Figures 40 et 41.

Dans un premier temps, nous allons nous intéresser aux ARNm susceptibles d'interagir avec le petit ARN GcvB, en l'occurrence les ARNm *yifK* et *chiPK* (Figure 40 A et B). Dans le cas de l'ARNm *yifK*, en présence de GcvB, nous pouvons observer la formation d'un premier retard (shift) sur gel en présence de l'ARNm et de la protéine Hfq. Après ajout du petit ARN GcvB à 5nM, nous pouvons observer une bande apparaitre encore plus retardé que le complexe *yifK* : Hfq pouvant correspondre à un super retard (supershift) dû à la formation d'un complexe ternaire *yifK* : Hfq : GcvB (Figure 40 A). De façon intéressante, en augmentant la concentration du petit ARN GcvB, nous observons une disparition du shift *yifK* : Hfq au profit du supershift du complexe ternaire. A contrario, lorsque nous utilisons des petits ARN régulateurs ne pouvant pas interagir avec cet ARNm comme ChiX et GcvBX, nous ne voyons pas apparaitre le supershift. Plus intéressant encore, dans le cas du petit ARN GcvBX, nous observons une disparition progressive de la bande correspondant au complexe

Résultats



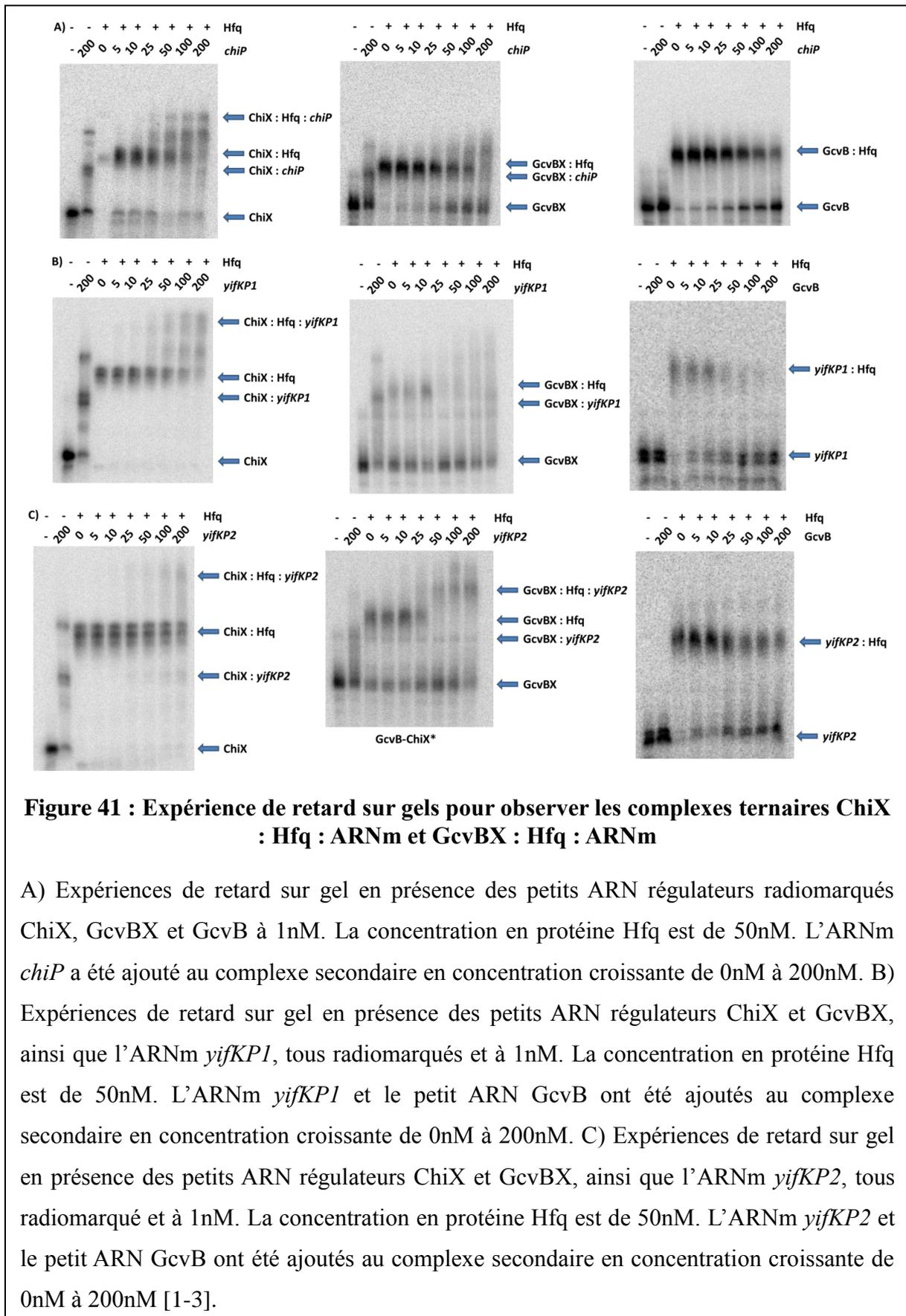
GcvBX : Hfq au profit de la bande correspondant à GcvBX en augmentant progressivement la concentration en ARNm *yifK* (Figure 40 A). Il semble donc, dans ce cas, que l'ARNm *yifK* titre la protéine Hfq du complexe GcvBX : Hfq. Dans le cas de l'ARNm *chiPK*, nous retrouvons un résultat légèrement différent de celui observé avec l'ARNm *yifK*. En effet, en augmentant la concentration de l'ARNm *chiPK*, nous pouvons observer deux phénomènes en présence du petit ARN GcvB. En premier, lorsque la concentration en ARNm atteint 100nM, nous pouvons observer la formation d'une bande correspondant à un supershift du complexe ternaire GcvB : Hfq : *chiPK* (Figure 40 B). En second, en augmentant progressivement la quantité de l'ARNm, nous pouvons observer une augmentation de la bande correspondant au petit ARN GcvB seul. Dans ce cas, nous pouvons supposer qu'une partie du complexe GcvB : Hfq forme, après ajout de *chiPK*, un complexe ternaire, mais, au vu de ces résultats, que

Résultats

l'ARNm rentre également en compétition avec GcvB pour Hfq. En effet, ces deux molécules possèdent le même site de fixation à la protéine Hfq : un site polyU. En présence des petits ARN ChiX ou GcvBX, nous constatons un résultat équivalent avec celui observé avec l'ARNm *yifK*. Les expériences avec ChiX ne révèlent pas un changement de profil en augmentant la quantité d'ARNm (Figure 40 B). Alors que pour GcvBX, nous observons que l'augmentation de la concentration de l'ARNm entraîne une compétition pour la protéine Hfq et diminue la proportion de complexes secondaire au profit du signal correspondant à GcvBX seul (Figure 40 B).

Ces premiers résultats d'observations des complexes ternaires *in vitro* sont très encourageants. En effet, l'ensemble de nos résultats semble confirmer les expériences que nous avons réalisées *in vivo* sur ces mêmes constructions. C'est-à-dire, seuls les couples *yifK* : GcvB et *chiPK* : GcvB forment des complexes ternaires. Nous allons maintenant nous intéresser aux ARNm capables d'interagir avec ChiX et GcvBX : *chiP*, *yifKP1* et *yifKP2* (Figure 41 A, B et C). Dans un premier temps, observons les résultats obtenus avec l'ARNm *chiP* (Figure 41 A). En présence du petit ARN ChiX, nous pouvons observer la formation d'un supershift caractérisé par une bande très retardée sur le gel qui commence à apparaître vers 25nM de *chiP* pouvant correspondre au complexe ternaire ChiX : Hfq : *chiP*. À haute concentration d'ARNm, nous remarquons la bande correspondant au supershift, la disparition de la bande correspondant au shift ChiX : Hfq ainsi que l'apparition de celle correspondant au complexe ChiX : *chiP* (Figure 41 A). Dans le cas du petit ARN GcvBX, les résultats sont plus contrastés (Figure 41 A). En effet, quel que soit les concentrations en ARNm utilisés, nous n'observons pas le supershift correspondant au complexe ternaire GcvBX : Hfq : *chiP*. Deux phénomènes liés sont observables : la formation d'un complexe GcvBX : *chiP* ainsi qu'une augmentation de la bande correspondant au petit ARN GcvBX seul (Figure 41 A). Cela peut s'expliquer par le fait que GcvBX et *chiP* ont le même site de fixation à Hfq. Les ARN vont donc se concurrencer pour la liaison à la protéine Hfq et l'ARNm *chiP* étant majoritaire, le complexe *chiP* : Hfq est privilégié. Et comme je l'ai montré précédemment, le complexe GcvBX : *chiP* se forme sans difficulté. Finalement, en présence du petit ARN GcvB, nous observons le même phénomène que celui observé avec GcvBX, mais sans la formation du complexe secondaire GcvB : *chiP* puisque ces derniers ne peuvent s'apparier (Figure 41 A).

Résultats



Résultats

Nous pouvons maintenant examiner les résultats obtenus pour l'ARNm *yifKP1* (Figure 41 B). En présence du petit ARN ChiX, nous pouvons observer, à concentration croissante d'ARNm *yifKP1*, une augmentation également progressive de la bande correspondant au supershift du complexe ternaire ChiX : Hfq : *yifKP1* ainsi qu'une diminution de la bande correspond au shift ChiX : Hfq (Figure 41 B). Dans le cas du petit ARN GcvBX, les résultats obtenus sont très proches de ceux avec l'ARNm *chiP*. En effet, la bande correspondant au supershift du complexe ternaire n'est pas présente, mais il apparaît la bande correspondant au shift du complexe GcvBX : *yifKP1* (Figure 41 B). Finalement pour le petit ARN GcvB, lorsque la concentration de ce dernier augmente, la bande correspondant au shift *yifKP1* : Hfq diminue jusqu'à disparaître totalement alors que la bande correspondant à *yifKP1* seul augmente (Figure 41 B). Enfin, nous allons examiner les résultats obtenus lors des expériences réalisées avec l'ARNm *yifKP2* (Figure 41 C). En présence du petit ARN ChiX, il y a apparition d'une faible bande correspondant au supershift du complexe ternaire ChiX : Hfq : *yifKP2* dans le cas concentration élevée de l'ARNm (Figure 41 C). Dans le cas de GcvBX, contrairement à ce que nous avons pu observer avec les ARNm *chiP* et *yifKP1*, nous détectons très nettement l'apparition d'une bande correspondant au supershift du complexe ternaire GcvBX : Hfq : *yifKP2* lorsque la concentration en ARNm *yifKP2* atteint 50nM. L'apparition de cette bande entraîne également la disparition progressive de la bande correspondant au shift du complexe GcvBX : Hfq (Figure 41 C). En dernier, nous allons regarder le cas de GcvB. Avec ce petit ARN, nous observons le même effet qu'avec *yifKP1*, mais en moins important. En effet, bien que la bande correspondant au shift *yifKP2* : Hfq diminue au profit de la bande correspondant à *yifKP2* seul, le complexe ne disparaît pas totalement même à des concentrations élevées du petit ARN GcvB.

Ces expériences nous ont permis d'observer des « supershifts » pouvant correspondre à des complexes ternaires ARNm : Hfq : petit ARN régulateur. De plus, les conditions de formations de ces complexes ternaires (couples ARNm : petit ARN régulateur) sont cohérentes avec ce que nous avons pu obtenir lors de nos expériences de régulation des ARNm par les petits ARN régulateurs *in vivo*. Dans les cas où les petits ARN régulateurs régulent fortement les ARNm, nous pouvons observer facilement la formation du complexe ternaire correspondant. Cela est le cas pour les couples ChiX : *chiP*, GcvB : *yifK*, ChiX : *yifKP1* et GcvBX : *yifKP2*. En outre, lorsque les régulations *in vivo* sont relativement faibles, comme cela est le cas pour les couples ChiX : *yifKP2*, GcvBX : *chiP*, GcvBX : *yifKP1*, nous n'observons pas, ou avec difficulté, la formation du complexe ternaire. De plus, il a été

Résultats

possible par cette approche d'obtenir des informations intéressantes sur les différentes interactions *in vitro* entre les différents protagonistes. Dans certains cas, au-delà de l'incapacité de former un complexe, nous avons pu observer la titration de la protéine Hfq engagée dans un complexe ARN : Hfq par un autre ARN, entraînant l'apparition soit d'une bande d'ARN seul soit d'une bande correspondant au complexe ARN : ARN. Dans la majorité de ces cas, cet effet n'est observable que lorsque le site de fixation de la protéine Hfq est du même type pour l'ARNm et pour le petit ARN régulateur.

1.6) Étude complémentaire : Rôle du domaine C-terminal d'Hfq dans la régulation des ARNm par les petits ARN régulateurs.

La protéine Hfq est subdivisée en deux domaines : le domaine N-terminal comprenant les acides aminés 1 à 65 et le domaine C-terminal composé du reste des acides aminés [7]. Le domaine N-terminal est une région très structurée chez Hfq et extrêmement bien conservée entre les différentes espèces [7]. Les différentes structures cristallographiques de la protéine Hfq sont réalisées exclusivement à partir de ce domaine [21,31,325,334-342]. Les différentes études sur les interactions entre Hfq et les ARN semblent indiquer que ce domaine est essentiel pour ce type d'interaction. En effet, les différentes mutations altérant ce domaine, qui ont été étudié dans la littérature ou au cours de cette thèse, ont montré qu'elles pouvaient impacter plus ou moins fortement la régulation des ARNm par les petits ARN régulateurs [349,359,418]. A l'inverse du domaine N-terminal, le domaine C-terminale varie énormément d'une espèce à l'autre, notamment au niveau de sa taille pouvant aller de 7 acides aminés à plus d'une trentaine (Figure 25)[7]. Le rôle de ce domaine reste moins clair. Des travaux réalisés sur ce dernier ont montré qu'il ne semblait pas jouer un rôle dans la régulation des ARNm par des petits ARN régulateurs notamment dans la régulation de l'ARNm *sodB* par RyhB [459]. Mais il aurait un rôle dans la localisation cytoplasmique de la protéine ainsi que dans la structuration de cette dernière [460,461].

Il a semblé intéressant de se poser des questions sur la fonction du domaine C-terminal de la protéine en utilisant les différents systèmes de régulations Hfq-dépendants ARNm : petit ARN régulateur étudiés au laboratoire. Pour ce faire, j'ai, dans un premier temps, réalisé deux délétions différentes du domaine C-terminal d'Hfq en utilisant la technique de recombinaison λ -red. La première délétion comprenait l'intégralité du domaine, englobant les acides aminés 70 à 102 (Hfq Δ 70-102) (Figure 42). La seconde délétion conservait les 4 derniers acides aminés de la protéine (Hfq Δ 70-98) (Figure 42). En effet, des séquences de même type (EETE chez *S. Typhimurium*) se retrouvent généralement à la même position dans d'autres espèces, dont *E. coli* (EETE), *S. aureus* (ESSE) et *B. subtilis* (LELE) [7]. J'ai ensuite combiné ces différentes mutations par transduction avec les souches rapportrice *chiP::lacZ*, *yifK::lacZ* et *sodB::lacZ*. Un dosage de l'activité β -galactosidase de l'ensemble des souches portant les gènes *hfq* sauvage, *hfq* Δ 70-98, *hfq* Δ 70-102 ou Δ *hfq* fut réalisé.

Résultats

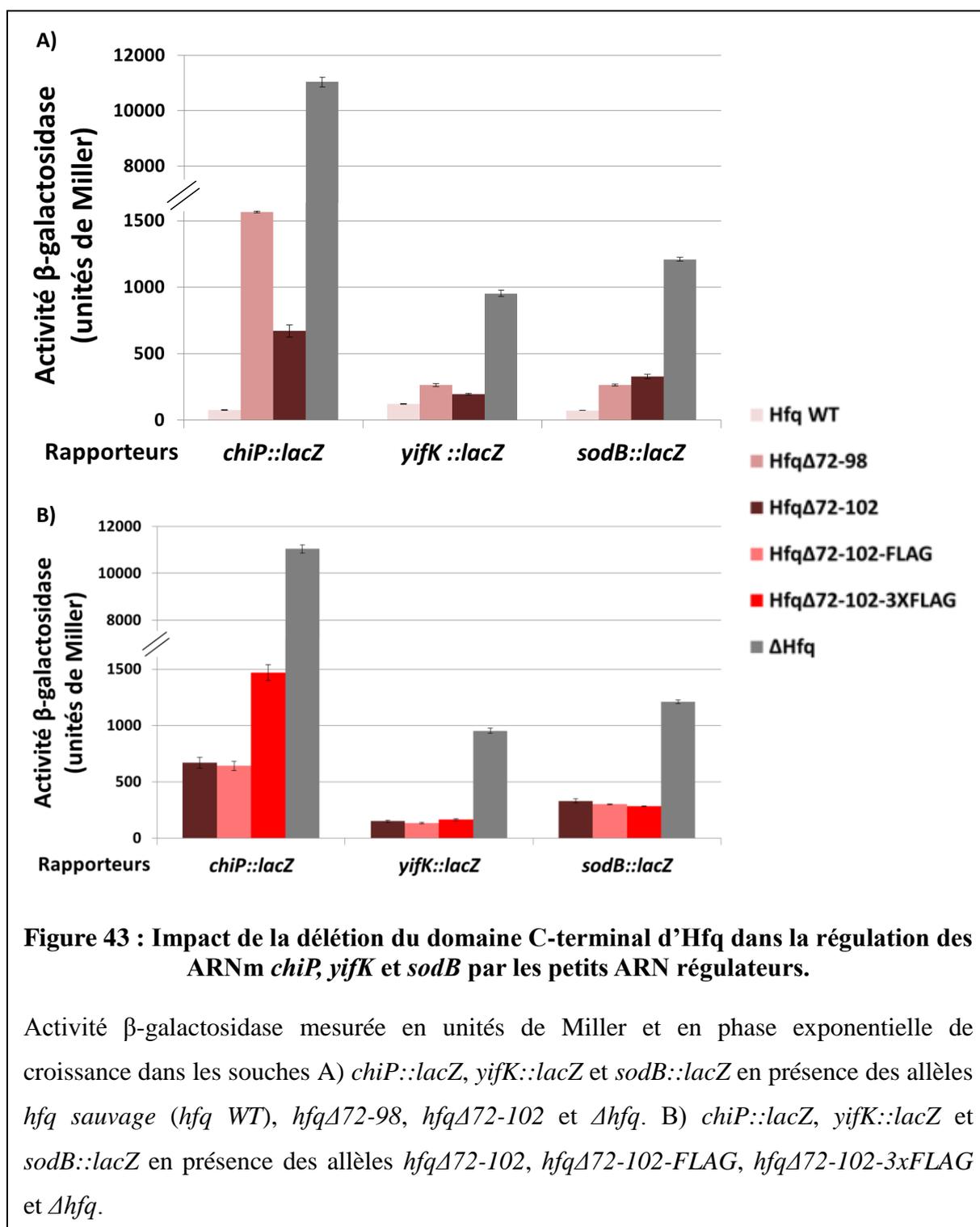
| | |
|----------------------------|---|
| Hfq WT | MAKGQSLQDPFLNALRRERVPVSIYLVNGIKLQGQIESFDQFVILLKNTVSQMVKHAISTVVPSRPVS HHSNNAGGGASNNYHGSNAQGSTAQQDSEETE* |
| Hfq Δ 70-98 | MAKGQSLQDPFLNALRRERVPVSIYLVNGIKLQGQIESFDQFVILLKNTVSQMVKHAISTVVPSRPVS EETE* |
| Hfq Δ 70-102 | MAKGQSLQDPFLNALRRERVPVSIYLVNGIKLQGQIESFDQFVILLKNTVSQMVKHAISTVVPSRPVS* |
| Hfq Δ 70-102-FLAG | MAKGQSLQDPFLNALRRERVPVSIYLVNGIKLQGQIESFDQFVILLKNTVSQMVKHAISTVVPSRPVS DYKDDDDK* |
| Hfq Δ 70-102-3xFLAG | MAKGQSLQDPFLNALRRERVPVSIYLVNGIKLQGQIESFDQFVILLKNTVSQMVKHAISTVVPSRPVS DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK* |

Figure 42 : Délétion du domaine C-terminal de la protéine Hfq

Séquences de la protéine Hfq sauvage ainsi que des différentes délétions réalisées au cours de cette expérimentation. Les séquences en vert et en bleu correspondant aux domaines N-terminal et C-terminal de la protéine respectivement et les séquences en rouges correspondent à l'épitope FLAG introduit dans certaines d'entre elles (voir ci-dessous).

Le résultat de ces dosages a montré que l'effet de la délétion du domaine C-terminal n'impactait pas de la même façon l'expression des différents gènes rapporteurs (Figure 43 A). En effet, une grande différence est observable entre la souche rapportrice *chiP* régulé par ChiX et les souches rapportrices *yifK* et *sodB* régulés respectivement par GcvB et RyhB. Les différentes délétions d'Hfq ont un impact très important dans la régulation de *chiP*. La délétion Hfq Δ 72-98 affecte plus fortement la régulation de *chiP* que la délétion complète du domaine C-terminal faisant passer l'activité β -galactosidase de 75 unités de Miller en présence de l'allèle sauvage d'*hfq* à 1500 (facteur 20) et 700 (facteur 9) unités de Miller avec les allèles *hfq* Δ 72-98 et *hfq* Δ 72-102 respectivement. Malgré cela, cet effet reste relatif par rapport à l'impact de la délétion d'Hfq qui entraîne une augmentation de l'activité d'un facteur 150 passant à plus de 11000 unités de Miller. Les effets sont beaucoup plus faibles avec les rapporteurs *yifK::lacZ* et *sodB::lacZ*. Dans le cas de *yifK*, les délétions du domaine C-terminal d'Hfq entraînent une augmentation de l'activité du rapporteur de 120 unités de Miller à 260 et 200, soit un facteur 2 et 1.5 pour les allèles *hfq* Δ 72-98 et *hfq* Δ 72-102 respectivement. Finalement, avec l'ARNm *sodB*, l'activité passe de 70 à 260 unités de Miller avec l'allèle *hfq* Δ 72-98 et à 330 unités de Miller avec l'allèle *hfq* Δ 72-102, soit une augmentation d'un facteur 3.5 et 4.5 respectivement.

Résultats



D'après les résultats de ces dosages, il semble que le domaine C-terminal peut jouer un rôle dans la régulation des ARNm par les petits ARN régulateurs. Cependant, le rôle du domaine C-terminal dans ce type de régulation semble difficile à identifier. Une partie des résultats obtenus pourrait être expliquée par une altération de la capacité de la protéine à former des hexamères d'Hfq fonctionnelle. Il y a toutefois, un résultat qui nous a

Résultats

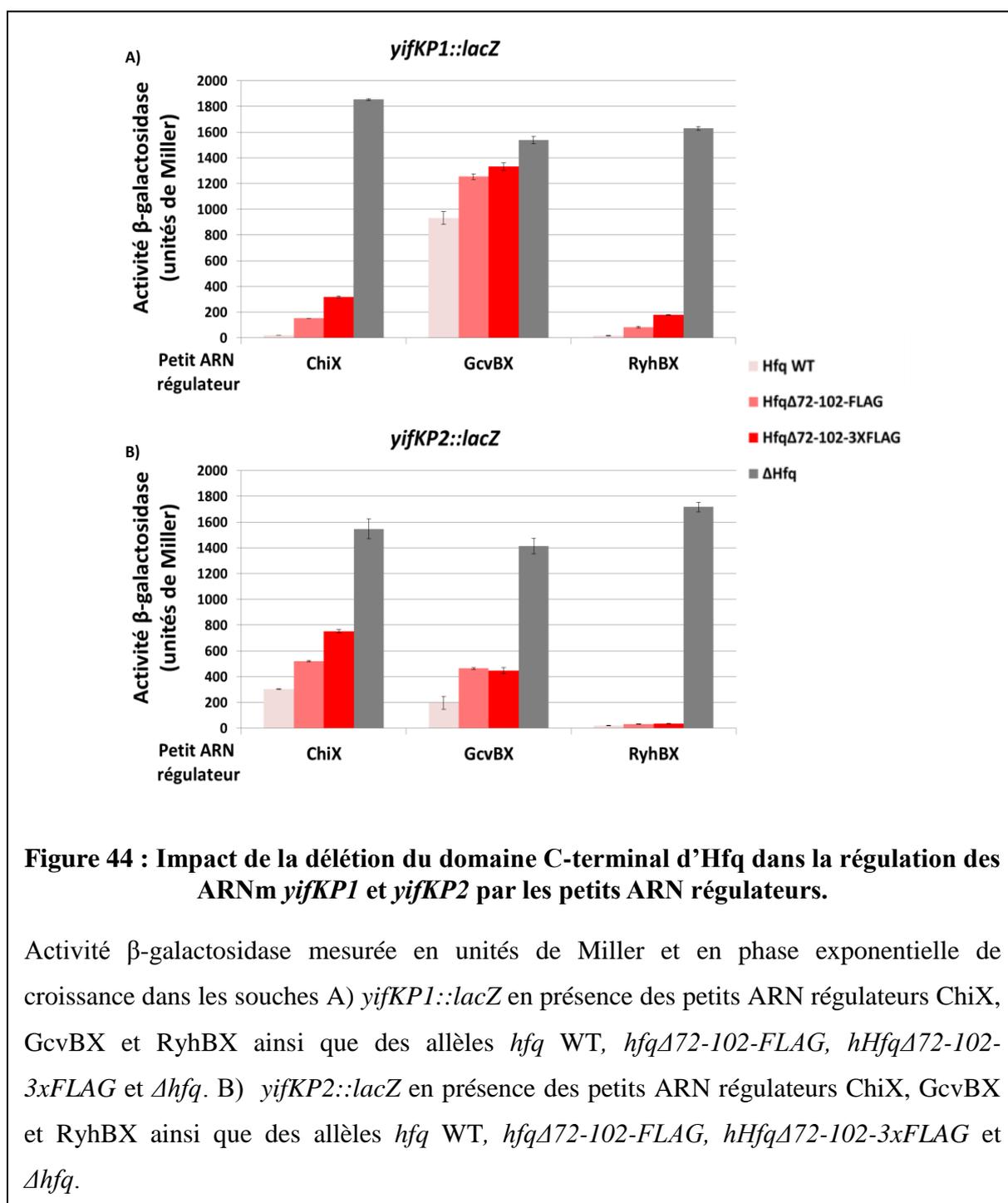
particulièrement interpellés. Nous avons observé que la régulation de *chiP* par ChiX est extrêmement perturbée par la délétion du domaine C-terminal mais cet effet est encore plus marqué dans les cas où les 4 derniers acides aminés de la protéine ont été conservés. Cet impact est-il dû à la présence d'une extension C-terminale inhabituelle ou dû au fait que cette petite extension soit particulièrement chargée pouvant entraîner une modification de la capacité de la protéine à lier les ARN? Pour répondre à cette question, j'ai construit deux allèles d'*hfq* dans lequel j'ai remplacé le domaine C-terminal de la protéine par une ou trois séquence FLAG (3xFLAG) formant ainsi une extension de 8 ou 22 acides aminés en suivant le protocole de recombinaison λ -red (Figure 42). Ces constructions ont été combinées avec les mêmes rapporteurs par transduction pour déterminer leurs impacts sur l'expression de ces derniers.

Les résultats du dosage de l'activité β -galactosidase nous montrent que seule la régulation de l'ARNm *chiP* est altérée en présence l'extension due à l'épitope 3xFLAG (Figure 43 B). En effet, la présence de l'épitope FLAG entraine une activité équivalente à celle obtenue dans la souche sans épitope ajouté. Par contre, la présence de l'épitope 3xFLAG entraine une augmentation de l'activité d'un facteur de 2.5x passant de 700 à 1500 unités de Miller (Figure 43 B). Avec les autres rapporteurs *yifK* et *sodB*, la présence d'une extension plus ou moins grande ne change pas leurs activités (Figure 43 B). Ceci semble indiquer que la régulation de ces ARNm se fasse de façon différente de celle de *chiP*.

Afin de compléter au mieux cette étude, nous avons introduit ces différents allèles d'*hfq* par transduction dans les souches *yifKP1::lacZ* et *yifKP2::lacZ* en présence des petits ARN régulateurs ChiX, GcvBX et RyhBX. Les dosages de l'activité β -galactosidase ont été réalisés dans ces différentes souches (Figure 44 A et B). Dans la totalité des cas, il semble que la délétion du domaine C-terminal induise une augmentation de l'activité β -galactosidase dans l'ensemble des souches (Figure 44 A et B). Par contre, suivant les souches, la présence de l'épitope 3xFLAG semble induire des effets variables sur la régulation des ARNm rapporteurs. Dans le cas du rapporteur *yifKP1*, la présence de l'épitope 3xFLAG par rapport à l'épitope FLAG provoque une augmentation d'un facteur 2 de son l'expression en présence des petits ARN ChiX et RyhBX passant ainsi de 150 à 310 unités de Miller et 80 à 180 unités de Miller respectivement (Figure 44 A). Avec GcvBX, l'activité est très proche de celle observée en présence de la délétion de la protéine Hfq (Figure 44 A). Avec le rapporteur *yifKP2*, seule la régulation par RyhBX n'est pas altérée en présence des allèles *hfq* Δ 70-102-

Résultats

FLAG et *hfqΔ70-102-3xFLAG* (Figure 44 B). La présence de ces allèles diminue la capacité de ChiX à réguler de *yifKP2* entraînant une augmentation de l'activité du rapporteur qui passe de 300 à 520 et 750 unités de Miller respectivement (Figure 44 B). La régulation de d'ARNm *yifKP2* par GcvBX est également altérée mais aucune différence n'est observable entre la présence du simple ou du triple épitopes FLAG faisant passer l'activité de 200 à 450 unités de Miller.



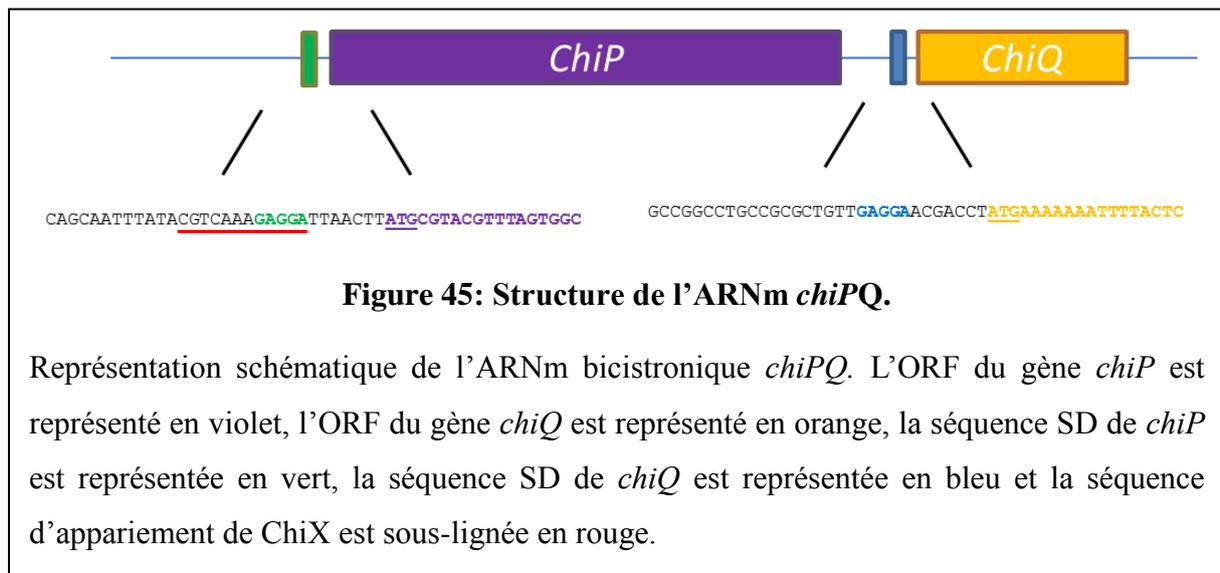
Résultats

L'ensemble de ces résultats indique que la délétion du domaine C-terminal de la protéine Hfq impacte la régulation de tous les ARNm rapporteurs testés, avec des effets plus ou moins importants. Ainsi, la délétion du domaine C-terminal complet, a un effet sur la régulation de tous les ARNm rapporteurs. Ceci peut s'expliquer par le rôle de ce domaine dans la structuration de la protéine. L'absence du domaine pourrait entraîner une diminution de la quantité de la protéine sous forme fonctionnelle et donc diminuer sa capacité à médier la régulation des ARNm par les petits ARN régulateurs. Par contre, la présence d'une séquence courte et chargée (EETE) ou de l'épitope 3xFLAG en lieu et place de la séquence du domaine C-terminal altère très fortement la régulation de l'ARNm *chiP* ainsi que celle de *yifKP1* alors que cela n'a que peu ou pas d'effet sur la régulation des ARNm *sodB*, *yifK* et *yifKP2*. La présence de ces épitopes semble également altérer la capacité de GcvBX de réguler l'ARNm *yifKP2*. Les ARNm *chiP* et *yifKP1* ainsi que le petit ARN GcvBX ont un le même motif polyU permettant à l'ARN de se lier à la protéine Hfq alors que les ARN restants ont, eux, un site de fixation à Hfq de motifs (AAN)*n* ou A/U riche. Il est donc possible que les effets que nous observons dans ces cas soient dus à une même cause. L'absence d'impact sur la régulation des autres ARNm pourrait indiquer que l'effet observé est lié à un défaut dans la fixation de l'ARNm sur la protéine. Il est donc possible de supposer que la présence d'une queue non canonique à la place du domaine C-terminal de la protéine entrave la fixation de l'ARNm sur la face proximale de la protéine.

2. Polarité transcriptionnelle dans la régulation par ChiX de l'opéron *chiPQ*

2.1) Introduction

Comme nous l'avons vu précédemment (Cf : ChiX et le chitosucres 4.3.3.3.), le petit ARN ChiX régule négativement la traduction de l'ARNm codant l'opéron bicistronique *chiPQ*. Cette régulation se fait par l'appariement de ChiX au niveau de la région 5'UTR de l'ARNm et plus précisément au niveau de la séquence SD de *chiP*. Cette liaison empêche la fixation des ribosomes à l'ARNm et entraîne l'inhibition de la traduction de *chiP* (Figure 45). Bien que les différentes études réalisées aient permis de comprendre la régulation de *chiP* par ChiX, il n'en est pas de même pour le second cistron de l'opéron : *chiQ* [305,409]. En effet, les différentes expériences montrent que lorsque ChiX inhibe la traduction de *chiP*, il inhibe également la traduction de *chiQ*. Or ce dernier, bien que présent sur le même ARNm que *chiP*, possède toutes les séquences nécessaires pour être traduit indépendamment de *chiP* (Figure 45). De plus, les différentes analyses de séquences de *chiQ* et de ses régions en amont et en aval n'ont pas permis d'identifier un site de fixation de ChiX permettant d'expliquer ce phénomène.



L'étude réalisée et exposée dans cet article présente un mécanisme de régulation inédit dans la régulation d'un ARNm par un petit ARN régulateur : un phénomène de polarité Rho-dépendante induite par la fixation de ChiX dans la région 5'UTR de l'ARNm *chiPQ*.

2.2) Article 2 : A role for Rho-dependent polarity in gene regulation by a non-coding small RNA

Lionello Bossi, Annie Schwartz, Benoit Guillemardet, Marc Boudvillain et Nara Figueroa-Bossi.

Publié en 2012 dans *Genes and Development*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Volume 26 (16), pp.1864-1873

A role for Rho-dependent polarity in gene regulation by a noncoding small RNA

Lionello Bossi,¹ Annie Schwartz,² Benoit Guillemardet,¹ Marc Boudvillain,² and Nara Figueroa-Bossi^{1,3}

¹Centre de Génétique Moléculaire, CNRS UPR3404, Gif-sur-Yvette 91198, France, affilié à l'Université Paris Sud XI, Orsay 91400, France; ²Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR4301, Orléans 45071, France, affilié à l'Université d'Orléans, Orléans 45100, France

Gene regulation by bacterial *trans*-encoded small RNAs (sRNAs) is generally regarded as a post-transcriptional process bearing exclusively on the translation and/or the stability of target messenger RNA (mRNA). The work presented here revealed the existence of a transcriptional component in the regulation of a bicistronic operon—the *chiPQ* locus—by the ChiX sRNA in *Salmonella*. By studying the mechanism by which ChiX, upon pairing near the 5' end of the transcript, represses the distal gene in the operon, we discovered that the action of the sRNA induces Rho-dependent transcription termination within the *chiP* cistron. Apparently, by inhibiting *chiP* mRNA translation cotranscriptionally, ChiX uncouples translation from transcription, causing the nascent mRNA to become susceptible to Rho action. A Rho utilization (*rut*) site was identified *in vivo* through mutational analysis, and the termination pattern was characterized *in vitro* with a purified system. Remarkably, Rho activity at this site was found to be completely dependent on the function of the NusG protein both *in vivo* and *in vitro*. The recognition that *trans*-encoded sRNA act cotranscriptionally unveils a hitherto neglected aspect of sRNA function in bacteria.

[*Keywords*: noncoding small RNA; Rho-dependent termination; *rut*; NusG; ChiP]

Supplemental material is available for this article.

Received May 1, 2012; revised version accepted June 29, 2012.

Small noncoding RNAs make up a large family of ubiquitous regulators controlling a wide range of mechanisms in all living cells. In higher eukaryotes, microRNAs participate in processes related to development, aging, and disease. In prokaryotes, small RNAs (sRNAs) regulate mechanisms that promote adaptation to environmental changes and stress conditions. The largest class of sRNA regulators acts by base-pairing with sequences in the 5' untranslated region (UTR) or within the first few codons of the target messenger RNA (mRNA) (Vogel 2009; Gottesman and Storz 2011). In many bacterial species, pairing is stimulated by the Hfq protein, which acts as a docking platform to facilitate the encounter of sRNAs and cognate mRNAs (Brennan and Link 2007; Vogel and Luisi 2011). Most commonly, formation of the sRNA:mRNA duplex occludes the ribosome-binding site, inhibiting translation initiation (Storz et al. 2004; Vogel 2009; Gottesman and Storz 2011). No longer protected by ribosomes, the mRNA becomes vulnerable to the activity of the degradosome (Carpousis 2007; Dreyfus 2009). Although not essential for regulation in most systems, mRNA degradation is thought to confer robustness to the process and to make it irreversible (Morita et al. 2006).

In competing with the ribosome for mRNA binding, sRNAs might be expected to perturb the coupling of transcription and translation.

In bacteria, translating ribosomes closely follow the transcribing RNA polymerase throughout the elongation cycle (Proshkin et al. 2010). Conditions that uncouple the two processes—e.g., nonsense mutations or severe amino acid starvation—make the transcription elongation complex (EC) prone to pausing and premature termination (Adhya and Gottesman 1978; Platt 1986; Richardson 1991; Proshkin et al. 2010). A central player in this chain of events is the transcription termination factor Rho. A ring-shaped RNA–DNA helicase, Rho is thought to bind to nascent RNA and thread the RNA through its central canal in a 5'-to-3' direction until it reaches a pausing EC, where it dissociates the RNA from template DNA (Nudler and Gottesman 2002; Richardson 2002; Banerjee et al. 2006; Boudvillain et al. 2010; Peters et al. 2011). A recent variation of this model incorporates the finding that Rho travels with the EC from the beginning of the transcription cycle and can bind RNA polymerase in the absence of RNA (Mooney et al. 2009a; Epshtein et al. 2010). A panoply of auxiliary factors can transiently associate with the EC and affect its processivity and susceptibility to Rho action. One such factor is NusG, a protein conserved in the three domains of life (Werner 2012) that binds Rho through its C-terminal domain and

³Corresponding author

E-mail figueroa@cgm.cnrs-gif.fr

Article is online at <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.195412.112>.

stimulates termination at a subset of sites (Sullivan and Gottesman 1992; Burns et al. 1999). NusG can also bind ribosomal protein S10 (NusE); this interaction, mutually exclusive with the Rho interaction, provides a physical framework for the coupling of transcription and translation (Burmann et al. 2010).

Rho function requires specific RNA sequences named Rho utilization (*rut*) sites, characterized by a high cytosine/low guanosine content and relatively little secondary structure (Ciampi 2006; Peters et al. 2011). Besides being located at the end of genes or intergenic regions, *rut* sites can be found within protein-coding regions. These intragenic sites are normally hidden by translating ribosomes but become exposed and available for Rho binding if translation is inhibited. The resulting intragenic termination is responsible for the long-known polar effects of nonsense mutations in polycistronic operons. Thought to be mostly relevant for cell economy (Richardson 1991), Rho-dependent polarity has seldom been associated with translational regulatory mechanisms. The recent finding that the magnesium-sensing *mgtA* riboswitch in *Salmonella* exerts its function by governing the accessibility of a nearby *rut* site sets a precedent for a novel type of Rho-mediated regulation (Hollands et al. 2012).

The present study was aimed at elucidating the mechanism by which a sRNA, ChiX, down-regulates the distal portion of the bicistronic *chiPQ* operon of *Salmonella* by pairing at a unique site near the 5' end of the transcript (Figuroa-Bossi et al. 2009). A search for mutations re-

lieving the long-range repression yielded Rho factor mutants. Characterization of these isolates allowed us to infer that ChiX down-regulates *chiQ* "at a distance" by inducing premature Rho-dependent transcription termination within the early portion of the *chiPQ* operon. Mutational studies identified the *chiP* sequences responsible for Rho-dependent effects and revealed a requirement for NusG protein in the termination event. Overall, these findings add a novel twist that might have interesting implications for sRNA regulation.

Results

Rho-dependent polarity in the chiPQ operon

In *Salmonella* and *Escherichia coli*, the *chiPQ* operon encodes a porin (ChiP) involved in the uptake of chitin-derived di- and trisaccharides (chitobiose and chitotriose) and a putative lipoprotein (ChiQ) of unknown function (Figuroa-Bossi et al. 2009; Overgaard et al. 2009). The two cistrons are separated by a 49-nucleotide (nt) intergenic region that includes a Shine-Dalgarno motif at the canonical distance from *chiQ*-initiating AUG. Under noninducing growth conditions (i.e., absence of chitooligosaccharides), constitutively made, Hfq-dependent ChiX sRNA prevents ChiP synthesis by pairing with a sequence in the 5' UTR of the transcript (Figuroa-Bossi et al. 2009). Intriguingly, ChiX down-regulates *chiQ* at the same time even though no sequence where ChiX could pair is present at the *chiP*-*chiQ* boundary (Fig. 1A,B). As a result, ChiX

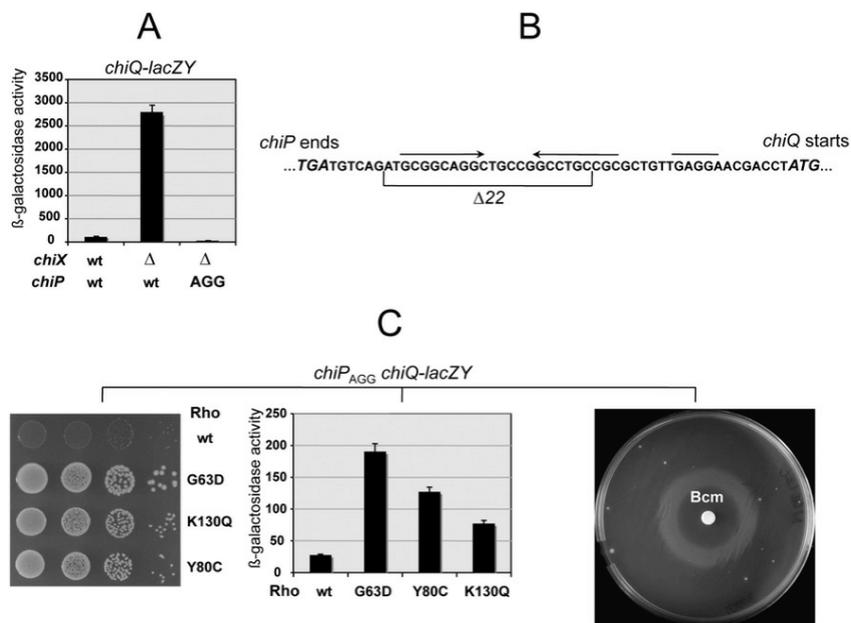


Figure 1. (A) Effect of *chiX* and *rho* mutations on *chiQ-lacZY* expression. ChiX sRNA down-regulates expression of a *chiQ-lacZY* fusion by pairing with a sequence upstream of the *chiP* gene (Figuroa-Bossi et al. 2009). Mutating the *chiP* initiation codon (from AUG to AGG) silences *chiQ-lacZY* expression regardless of the *chiX* allele (A) in spite of the fact that the intergenic region between *chiP* and *chiQ* (B) contains a Shine-Dalgarno motif for independent *chiQ* translation (overlined in B). As a result, a strain carrying *chiP_{AGG} chiQ-lacZY* is unable to grow on lactose as the sole carbon source (Lac⁻ phenotype). (C) Mutations in the *rho* gene relieve *chiQ-lacZY* silencing to various degrees (middle) and restore growth on lactose (left). (Right) A similar effect is obtained by exposing cells to Rho inhibitor Bcm. In the latter test, wild-type *rho* bacteria carrying *chiP_{AGG} chiQ-lacZY* were spread onto a minimal lactose plate, and a filter paper disc wet with 3 μ L of a 50 mg/mL Bicyclomycin (Bcm) solution was applied in the center of the plate. Diffusion of

the drug generated a concentration gradient. After a 2-d incubation, a ring of growth was observed in the region of the plate where the Bcm concentration was low enough not to inhibit growth but sufficiently high to interfere with Rho activity. Strains used were MA10608 (*rho*^{wt}), MA10633 (*rho* G63D), MA10634 (*rho* K130Q), and MA10769 (*rho* Y80C). For the complete genotypes, see Supplemental Table S1.

Résultats

Bossi et al.

activity renders a strain carrying a *chiQ-lacZY* fusion phenotypically Lac⁻. This offered the opportunity to gather insight into the mechanism responsible for the long-range *chiQ* repression through isolation of Lac⁺ derivatives. Previous experiments predicted that the Lac⁺ selection would yield a high background of *chiX* and *hfq* deletions/mutations. To avoid this, we made the assumption that the expression of *chiQ* would also be lost if *chiP* translation was blocked in a ChiX-independent manner. Mutating the *chiP* start codon from AUG to AGG was tested. The resulting strain was indeed Lac⁻, and this phenotype did not change upon deletion of the *chiX* gene (Fig. 1A). We then proceeded to select spontaneous mutants capable of using lactose as their sole carbon source. Mutants fell into two classes: one arising from mutations genetically linked to the *chiQ-lacZ* locus, and the other carrying changes elsewhere. Three linked mutations were found to be deletions removing portions of the *chiP* coding sequence. The mutant with the highest LacZ activity lacked the segment between nucleotides 242 and 932 of the *chiP* mRNA; the other two deletions removed segments 265–393 and 595–1203. The clue for explaining the phenotype of these mutants came from the analysis of unlinked Lac⁺ mutations. Isolates from this class were found to carry changes in the gene for transcription termination factor Rho (Fig. 1C). This suggested that when *chiP* translation is blocked, Rho prevents RNA polymerase from reaching *chiQ*, possibly acting at more than one site within *chiP* (see below). Consistent with

this interpretation, the Lac⁺ phenotype could be reproduced by exposing *rho*⁺ cells to sublethal concentrations of Rho inhibitor Bicyclomycin (Bcm) (Fig. 1C).

Rho mutants included alleles G63D, R66C, K130Q, and S312I. We then tested the *rho-111* mutation isolated in *Salmonella* in the early 1980s as a polarity suppressor (Housley and Whitfield 1982). This allele was also found to confer a Lac⁺ phenotype. Our sequence analysis showed that *rho-111* corresponds to a Y80C change in the protein. Alleles G63D, Y80C, and K130Q were used for further study. The first two alleles affect the primary RNA-binding site (Gly 63 is part of "RNP1" domain [Gly 61–Phe 62–Gly 63–Phe 64]) (Martinez et al. 1996a,b; Chalissery et al. 2007); K130Q is in a region of Rho where no mutants have been described. The mutation affects a residue on the external surface of the hexamer, not far from residues proposed to contact NusG (Supplemental Fig. S1). The three Rho alleles differ in the extent to which they relieve polarity in *chiPQ* (Fig. 1C).

ChiX activity induces Rho-dependent polarity

We next examined the effects of *rho* mutations in strains in which the *chiP*-initiating AUG is unaltered and ChiX is therefore solely responsible for the inhibition of *chiP* mRNA translation. As shown in Figure 2A, the introduction of Rho allele G63D into a strain carrying a *chiQ-lacZ* fusion leads to a significant increase in *lacZ* expression levels. No such effect is observed in a strain in which the

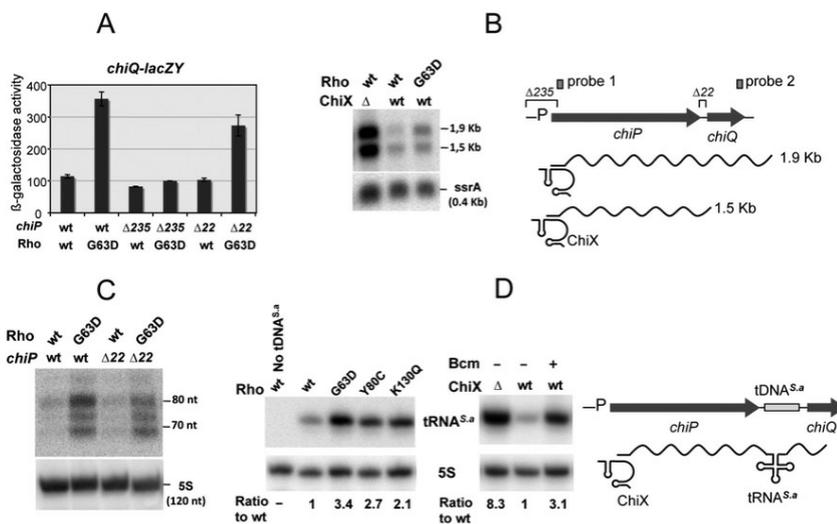


Figure 2. ChiX sRNA-induced transcriptional polarity and its relief by *rho* mutations. (A) Effect of *rho* G63D on the expression of a *chiQ-lacZ* fusion. Stimulation of *lacZ* expression by *rho* G63D requires a functional *chiP* promoter and is independent of sequences in the intercistronic region between *chiP* and *chiQ*. Strains used were (from left to right) MA9655, MA9860, MA10235, MA10240, MA10277, and MA10295. (B) *chiPQ* transcription profile in strains carrying temperature-sensitive RNase E allele *rne-3071* (Figueroa-Bossi et al. 2009). Exponentially growing cells were incubated for 15 min at 43°C prior to RNA extraction. RNA was separated on a 1.3% agarose-formaldehyde gel and probed with a ³²P-labeled DNA oligonucleotide complementary to a sequence near the 5' end of *chiPQ* mRNA (pp977; "probe 1" in the diagram). Strains used were (from left to right) MA9826,

MA9816, and MA9886. (C) Transcription in the distal portion of the *chiPQ* operon. RNA turnover products from the 3' end of the *chiPQ* mRNA are quantified by Northern blot hybridization. RNA was extracted from exponentially growing cultures of strains MA3409 (*chiP*^{wt}, *rho*^{wt}), MA9870 (*chiP*^{wt}, *rho* G63D), MA10274 (*chiP*Δ22, *rho*^{wt}), and MA10293 (*chiP*Δ22, *rho* G63D); fractionated in a polyacrylamide gel, and probed with a ³²P-labeled oligonucleotide complementary to a sequence near the 3' end of the *chiPQ* transcript (ppA83; "probe 2" in the diagram). (D) Effect of *rho* mutations or Bcm treatment on the synthesis of a *S. aureus* tRNA inserted in the intercistronic spacer of *chiPQ* mRNA. Bcm was used at a final concentration of 10 μg/mL. Total RNA extracted from stationary cultures was processed for Northern blotting as in C. The blot was hybridized to an oligonucleotide complementary to tRNA^{S,a} (ppJ62). RNA bands were quantified by PhosphorImaging using the ImageQuant program; 5S was used for normalization. Strains used were MA3409 (wild-type: lacks tDNA^{S,a}), MA11115 (*rho*^{wt}), MA11150 (*chiP*^{wt}, *rho* G63D), MA11168 (*chiP*^{wt}, *rho* Y80C), and MA11169 (*chiP*^{wt}, *rho* K130Q) (left panel); and MA11123 (*chiP*^{wt} Δ*chiX*) and MA11115 (*rho*^{wt}) without and with Bcm (right panel).

chiP segment between -175 and $+60$ is deleted (*chiP* $\Delta 235$), indicating that the increase in *lac* expression in the *rho* mutant results from transcription originating at the *chiP* promoter. To obtain more direct evidence for the relief of transcriptional polarity, RNA from the distal portion of the *chiPQ* operon was subjected to Northern analysis. Our previous work showed that ChiX pairing causes rapid decay of the *chiPQ* transcript through a pathway initiated by RNase E (Figueroa-Bossi et al. 2009). Since the full-length *chiPQ* RNA is undetectable in *rne* wild-type cells, this analysis was performed by either detecting full length *chiPQ* RNA in strains carrying a temperature-sensitive *rne* allele (Fig. 2B) or measuring RNA processing intermediates from the 3' end of the operon with a distal probe (Fig. 2C). The results from both approaches concurred in showing larger amounts of transcripts to reach the end of the operon in cells carrying Rho G63D as compared with the wild type (Fig. 2B,C). Quantification of the bands corresponding to the readthrough transcripts shows the increase to be on the order of threefold to fivefold. This parallels the results from the β -galactosidase determinations in Figure 2A. The smaller extent of this variation, compared with that measured in the *chiP* translation initiation mutant (sixfold) (Fig. 1C), can be ascribed to the higher basal level of *chiQ* expression in the *chiP*⁺ *chiX*⁺ *rho*⁺ background (a likely indication that ChiX does not totally block *chiP* mRNA translation). Overall, it is apparent that even in the presence of *rne* and *rho* mutations, *chiPQ* RNA levels remain much lower than those measured in the Δ *chiX* strain (Fig. 2B). The eightfold difference in the intensities of the full-length bands in Figure 2B might reflect the activity of an RNase E-independent decay pathway in *chiX* wild-type cells. Alternatively, uncoupling transcription and translation in the *chiP* gene might lead to a generalized decline of transcriptional efficiency (e.g., stalling and/or backtracking of polymerase) that is only moderately suppressed by the *rho* mutation.

The intercistronic region between *chiP* and *chiQ* encodes a palindromic C/G-rich sequence (Fig. 1B) that is responsible for the presence of a shorter mRNA species in Northern blots (the 1.5-kb band in Fig. 2B). In the early stages of this study, we considered that this sequence might contribute to the polarity effects. A 22-base-pair (bp) deletion removing the palindrome ($\Delta 22$) (Fig. 1B) was included in the above analysis. Results showed that $\Delta 22$ does not increase *chiQ-lacZY* expression levels (Fig. 2A) or the amount of *chiQ* 3' end RNA (Fig. 2C). On the contrary, the deletion appears to lower *chiQ-lacZY* expression in the *rho* G63D background slightly but reproducibly, suggesting that the putative secondary structure somehow exerts a positive role on *chiQ* translation. To date, the function of this structure and the origin of the 1.5-kb band—whether a stalled transcript or a processing intermediate—remain elusive and were not investigated further in this study.

To circumvent the problem inherent to the degradation of the untranslated mRNA, we resorted to the use of an exogenous tRNA as a transcriptional reporter. Previous work showed that tRNAs are rapidly and correctly

excised from foreign RNA sequences and stably accumulate (Lopez et al. 1994; Espeli et al. 2001). A DNA sequence encoding a putative tRNA from *Staphylococcus aureus* was inserted in place of the *chiPQ* intercistronic region, and tRNA^{S.a} production was measured by Northern blot hybridization. The results in Figure 2D show that ChiX activity represses tRNA^{S.a} significantly and that *rho* mutations or inhibition by Bcm relieve this effect. Altogether, the above results suggest that ChiX action on the nascent mRNA induces Rho-dependent transcription termination within the *chiP* portion of the *chiPQ* operon.

Profiling the *chiP* polarity gradient by stop codon scanning

To map the presumptive sites of Rho-dependent transcription termination, tandem UAA stop codons were introduced at several positions in the chromosomal *chiP* gene, and *chiQ-lacZ* expression was measured in the resulting strains. The analysis was performed in a Δ *chiX* background to ensure that *chiP* translation would initiate normally. Results showed the polarity of the nonsense codons to inversely correlate with their distance from the initiating AUG (Fig. 3A). It is apparent that the Rho involvement is confined to the promoter-proximal half of the *chiP* gene: Stimulation of *lacZ* expression by Rho G63D declines from more than fivefold when translation stops before codon 63 to <20% for a stop at position 256. A significant part of this variation occurs within the interval between codons 63 and 108, corresponding to the $+275$ to $+410$ segment of *chiP* mRNA (Fig. 3B), suggesting the presence of a Rho-dependent polarity site within this segment.

A functional *rut* site in the early portion of the *chiP* gene

Examination of the sequence in the presumptive termination interval detected only a minor C>G skew centered around an 8-nt pyrimidine-only track (CCUUUCUC) (Fig. 3B, in green). To determine whether this element played a role in polarity, the octamer sequence was randomized by recombineering using PCR-amplified fragments carrying any of the 4 bp at each of the eight positions (see the Materials and Methods). This work was performed in a strain harboring the *chiPQ-lacZ* reporter so that mutant colonies could be directly screened on lactose indicator plates. The vast majority of recombinants were found to express *lacZ* at higher levels than the parental strain. In most instances, the increase conferred a Lac⁺ growth phenotype (Fig. 4).

Thus, these data strongly suggested that the CCUUUCUC octamer is part of a *rut* site required for Rho binding to the nascent mRNA. Two out of 100 colonies that were analyzed, isolates #29 and #37, were indistinguishable from the parental strain. This could occur if the mutagenic procedure had regenerated a functional *rut* site. Sequence analysis showed that these two isolates harbor the sequence CACUCCUA (#29) and UCCUUC (#37), thus corroborating the importance of the C>G skew in a *rut* sequence. Also consistent with this role of the C>G

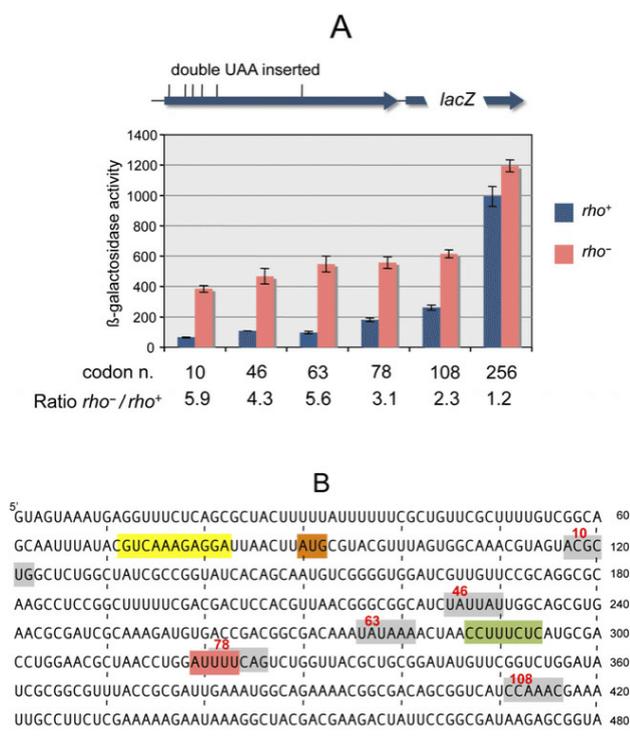


Figure 3. Polarity of tandem UAA codons in the *chiP* gene. The sequence UAAUAA was inserted in place of tandem sense codons at different positions of the *chiP* gene in the chromosome of a strain carrying *chiQ-lacZ*. (A) Effect of *rho* mutation on the polarity gradient. Loss of *lacZ* stimulation by *rho* G63D in the interval between UAA-63 and UAA-108 (from 5.6-fold to 2.3-fold) suggests the presence of a polarity site within this interval. Strains used were MA10802 (UAA-10), MA10960 (UAA-46), MA10961 (UAA-63), MA11046 (UAA-78), MA11047 (UAA-108), and MA10445 (UAA-256). (B) Nucleotide sequence of the 5' portion of the *chiPQ* mRNA. The ChiX pairing sequence and *chiP*-initiating AUG are boxed in yellow and orange, respectively. Gray boxes denote the positions of the double UAA codons. An octameric *rut* site element and the sequences found at the 3' ends of in vitro terminated transcripts (see the text) are boxed in green and red, respectively.

skew is the intermediate phenotype of mutants #6 and #8 in Figure 4. Similar sequence features are found at the corresponding position of the *chiP* gene from *E. coli* and of other members of the *Enterobacteriaceae* family. In these organisms, the C>G skew is conserved and, overall, considerably more pronounced than in *Salmonella* (Fig. 4C; Supplemental Fig. S3). Clearly, induction of Rho-dependent polarity appears to be a conserved feature of the mechanism by which ChiX sRNA down-regulates the *chiPQ* operon.

It is intriguing to notice that allowing *chiP* translation to proceed up to codon 63, which is only 8 nt upstream of the CU-rich octamer, does not interfere at all with the ability of Rho to function at the *rut* site (Fig. 3A). This could imply that the downstream edge of the ribosome stalling at the UAA codon does not extend enough to hamper Rho entry and action on the mRNA. Alterna-

tively, Rho might bind to the *rut* site within the time interval between the release of the ribosome and the arrival of the next ribosome. Clearly, the latter scenario would seem more plausible if Rho were already associated with the EC at the time of ribosomal release (Mooney et al. 2009a; Epshtein et al. 2010).

The data in Figure 4B show that the presence of the Rho G63D mutation still causes *chiQ-lacZY* expression to increase in all of the *rut* mutants. These findings are consistent with various lines of evidence suggesting the presence of additional polarity sites elsewhere in the sequence. Among these data are the detection of residual Rho-dependent polarity in the interval between codons 108 and 256 (Fig. 3A), the increase in *chiQ-lacZY* expression in a *chiP* deletion mutant lacking a segment downstream from the *rut* site (between base pairs 595 and 1203) (see above), and the termination patterns from the in vitro transcription study described below.

NusG requirement for Rho-dependent termination at the *chiP rut* site in vitro

We next examined whether *chiP* would be similarly susceptible to Rho-dependent termination in vitro. We performed in vitro transcription experiments with *E. coli* RNA polymerase and a 600-bp DNA template containing the initial portion of the *chiP* gene fused to the pT7A1 promoter (Rabhi et al. 2011). These experiments showed the purified Rho factor to induce transcription termination in the *rut* region in the presence of the NusG protein (Fig. 5A, gray star). Neither Rho nor NusG caused any detectable termination at this site when present alone (Fig. 5A). Sequence analysis of the terminated transcript found its 3' ends to fall within a 5-nt window located downstream from the *rut* octamer, between +319 and +323 (boxed in red in Fig. 3B; see also Supplemental Fig. S2). The experiments in Figure 5A detect two additional Rho-dependent termination sites in the interval between +450 and +500. These are not as strong or as dependent on NusG as the proximal site (Fig. 5A). Interestingly, the use of longer templates shows that, in the presence of NusG, collective termination activity in the promoter-proximal half of *chiP* is strong enough to completely prevent downstream transcription (Fig. 5B; data not shown). This strong termination activity is strictly Rho-dependent and can be totally inhibited by the Rho-specific inhibitor Bcm (Fig. 5, Bcm lanes).

NusG requirement for the ChiX-induced polarity in vivo

The findings from the in vitro study prompted us to examine whether NusG played any role in *chiP* polarity in vivo. Initial attempts to construct a *nusG* deletion replacing this gene with a *cat* cassette proved unsuccessful. Whenever chloramphenicol-resistant recombinants were obtained, they were found to contain a chromosomal duplication of the *nusG* region, suggesting that the deletion of *nusG* is a lethal event in *Salmonella*. Since the lethality of *nusG* mutations in *E. coli* was previously ascribed to the derepression of toxic prophage gene

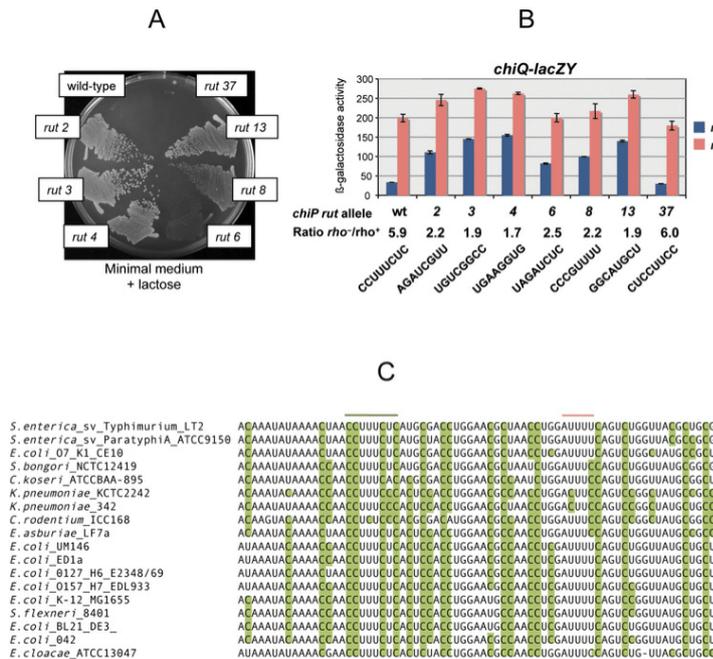


Figure 4. Mutational analysis of the *chiP rut* site. An octameric CCUUUCUC sequence, in the polarity interval identified by the UAA scanning analysis (see the text), was randomly mutagenized as described in the text in a strain carrying *chiQ-lacZ*. Most of the clones obtained expressed *lacZ* at higher levels than the parent strain, consistent with the role of the C-rich octamer in the polarity effects. (A) Growth phenotype of representative mutants on a minimal (NCE) lactose plate. (B) Effects of *rut* site changes on *chiQ-lacZ* expression in wild-type and *rho* G63D mutant backgrounds. The strains used in this experiment are listed in Supplemental Table S1. (C) Sequence alignment of the *chiP rut* region from members of the *Enterobacteriaceae* family. Cytosine residues are highlighted in green.

products (Cardinale et al. 2008), the above experiment was repeated in a strain cured for all four major prophages of *Salmonella* strain LT2 (Lemire et al. 2011). However, we were still unable to isolate the deletion mutant. We therefore changed our strategy and proceeded to isolate point mutations that might not completely inactivate the protein and still affect *chiP* polarity. A DNA fragment spanning the *nusG* gene and an adjacent *cat* cassette for selection was amplified by PCR under error-prone conditions and introduced by recombining in the chromosome of a strain carrying the *chiP* initiator codon mutation and the *chiQ-lacZ* fusion. Recombinant clones were selected on LB plates supplemented with chloramphenicol and X-gal. The occurrence of rare blue-colored colonies suggested that these clones carried *nusG* mutations that stimulated transcriptional readthrough. Upon verifying that the mutations conferring the blue color were transductionally linked to the CmR marker, some representative mutants were subjected to DNA sequence analysis. This confirmed the presence of mutations in the *nusG* gene, all located within the portion of the gene encoding the C-terminal domain of the protein. One mutant carried a -1 frameshift mutation that resulted in multiple amino acid substitutions in the C-terminal sequence (DFSQVEKA to TSVRLKRNRNRS, starting at position 174; this allele is referred to as *nusG* 174fs). Additional mutants contained changes F141S, F144I, and V162D. The effects of these three alleles on readthrough transcription in the *chiP* gene were assessed independently using the *lacZ* and *S. aureus* tRNA reporter systems. The results of both types of measurements showed that, like the *rho* mutations, the *nusG* mutations relieve transcriptional polarity in *chiPQ* (Fig. 6). Note, the experiment in Figure 6B was performed in the background of the *chiP*_{ACG} mutant, where polarity is the strongest. This accounts for

the stronger effects of the *nusG* mutations compared with the *rho* mutations in Figure 2D, where polarity results uniquely from the activity of ChiX. Overall, these data corroborate the in vitro study confirming the NusG requirement for transcription termination at the *chiP rut* site in vivo.

Attempts to construct strains carrying *nusG* and *rho* mutations combined suggested that most of the combinations were incompatible. In particular, we were unable to combine *rho* allele Y80C with any of the *nusG* mutations, or *nusG* allele V162D with any of the *rho* mutations. In contrast, strains carrying *rho* G63D or K130K together with either *nusG* F141S or F144I proved viable and grew at rates comparable with the *nusG* single mutants (which typically grow more slowly than the *rho* mutants). Interestingly, these double mutants expressed the *chiQ-lacZ* fusion at higher levels than the corresponding single mutants. The *rho* G63D *nusG* F141S combination (the one with the highest activity) exhibited a 40% increase over the value measured in the *rho* G63D single mutant.

Discussion

In the present study, we showed that the activity of a regulatory sRNA induces Rho-dependent transcriptional polarity in the target gene. While *cis*-encoded sRNAs have long been known to promote factor-independent termination or anti-termination (Brantl 2007), to our knowledge, this is the first report of a *trans*-encoded sRNA triggering termination through the Rho/NusG pathway. In retrospect, it seems that these findings might have been predictable given the analogy between the mode of action of the sRNAs and conditions known to elicit transcriptional polarity. By inhibiting translation initiation, the sRNA

Résultats

Bossi et al.

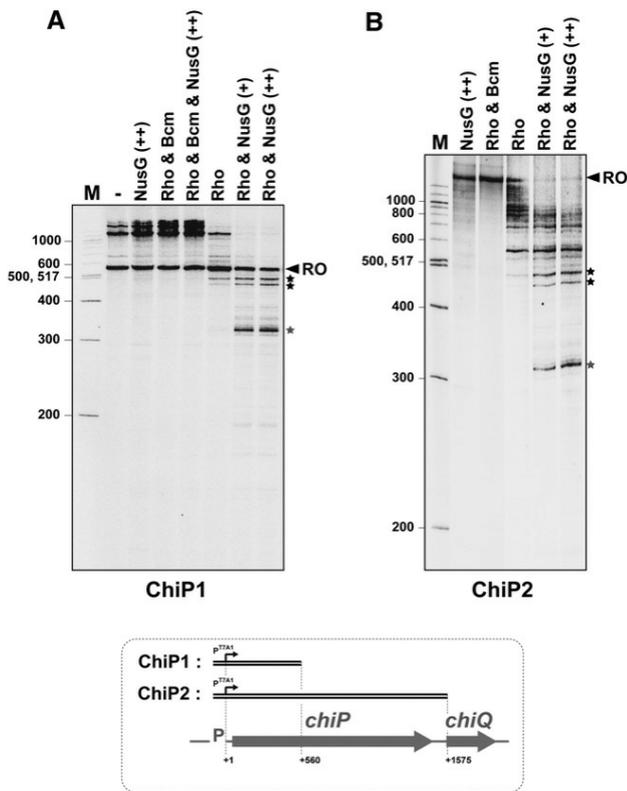


Figure 5. Effect of Rho and NusG on in vitro transcription of DNA templates containing the upstream section (ChiP1 template) or the entirety (ChiP2 template) of the *chiP* gene fused to the T7A1 promoter. Runoff (RO) transcripts are 560 and 1575 nt long for transcriptions with ChiP1 (A) and ChiP2 (B), respectively. Longer transcripts presumably result from RNA polymerase continuing transcription after reaching the end of a DNA template and “switching” to another template molecule (Nudler et al. 1996; Rabhi et al. 2011). The concentrations of Rho hexamers and Bcm were 70 nM and 150 μ M, respectively. The concentration of NusG was 70 nM (+ lanes) or 140 nM (++) lanes).

allows the Rho protein to gain access to *rut* sites in the mRNA. A direct implication is that ChiX sRNA must act cotranscriptionally, presumably binding the mRNA target as soon as it emerges from the EC. The Rho recruitment makes good biological sense, as it would not be convenient for the cell economy to continuously make the full-length *chiPQ* mRNA under conditions where the mRNA will not be translated due to ChiX activity. Furthermore, the mechanism provides a solution for coordinating the expression of the two genes in the operon. This raises the possibility that a similar mechanism operates at other sRNA-controlled loci. A number of sRNA targets in *E. coli* and *Salmonella* are part of polycistronic transcripts. We notice that in many cases, cistrons lying downstream from the primary target are coregulated with the latter (Massé et al. 2005; Sharma et al. 2011). It seems possible that Rho-dependent polarity may contribute to some of these effects. We are currently testing this hypothesis on a few selected systems.

Rho-dependent transcription termination at the *rut* site identified in this study was found to be completely dependent on the NusG protein in an in vitro transcription system. Furthermore, *nusG* mutations promoted readthrough transcription like *rho* mutations, indicating that the NusG requirement for termination exists in vivo as well. All of the *nusG* mutations isolated in this study affect the portion of the protein thought to interact with Rho (Mooney et al. 2009b; Chalissery et al. 2011). Previous studies showed that the influence of NusG on Rho-dependent termination varies extensively among *rut* sites in vivo and/or in vitro (Sullivan and Gottesman 1992; Burns et al. 1999). The basis for such variability remains incompletely understood. The isolation of *chiP rut* variants that lose the *nusG* dependence and their characterization in vivo and in vitro should shed further light on this aspect.

The Rho involvement in regulation by *trans*-encoded Hfq-dependent sRNA evokes a link with the recent findings that Hfq protein from *E. coli* can bind Rho and interfere with its activity (Rabhi et al. 2011). Hfq was shown to compete with NusG in promoting anti-termination at several terminators, including the prototypical

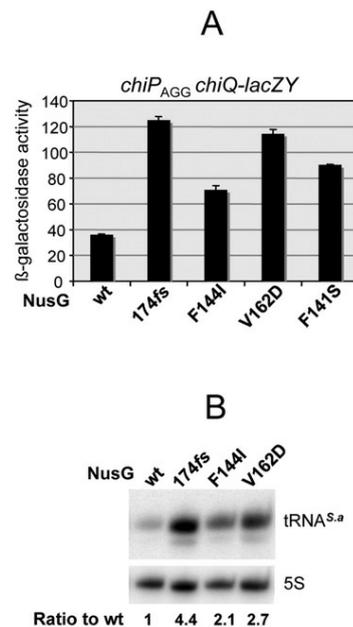


Figure 6. Mutations in *nusG* gene relieve *chiP* polarity. Mutants were obtained by combining random PCR mutagenesis and chromosomal recombineering as described in the text. (A) Effect of *nusG* mutations on the expression of *chiQ-lacZ* in a *chiP_{AGG}* mutant background. Strains used were MA11167 (*nusG^{wt}*), MA11158 (*nusG* 174fs), MA11159 (*nusG* F144I), MA11161 (*nusG* V162D), and MA11162 (*nusG* F141S). (B) Effect of *nusG* mutations on the synthesis of *S. aureus* tRNA (see the legend for Fig. 2D). Total RNA extracted from stationary cultures was processed for Northern blotting as in Figure 2D. The blot was hybridized to an oligonucleotide complementary to tRNA^{S.a} (ppJ62). Strains used were MA11170 (*nusG^{wt}*), MA11171 (*nusG* 174fs), MA11172 (*nusG* 144I), and MA11173 (*nusG* V162D).

tR1 terminator of phage λ in vitro. Hfq also caused anti-termination in vivo, although this effect was only observed when Rho activity was partially inhibited with Bcm (Rabhi et al. 2011). In our system, Hfq clearly does not prevent termination when the Rho factor is fully functional (Fig. 2). However, in a way somewhat reminiscent of the in vivo data from the above study, we found that Hfq contributes to polarity suppression in the *rho* mutants. In particular, Rho allele K130Q loses the ability to relieve *chiP* polarity completely in an *hfq* deletion background (Supplemental Fig. S3). This effect does not depend on Hfq binding to the *chiP* mRNA leader region or to an A-rich stretch immediately 5' to the *rut* site (data not shown). However, the effect appears to be specific to the *chiPQ* system, as it is not observed at a different Rho-dependent polarity site in the *hisG* gene of *Salmonella* (Supplemental Fig. S4; Ciampi and Roth 1988).

Currently, it is unclear whether the anti-terminator function of Hfq is exerted by the hexameric form of the protein or by the Hfq monomer. Intriguingly, a recent study (Argaman et al. 2012) proposed that the Hfq hexamer–monomer equilibrium can be affected by specific physiological conditions in the cell. In particular, the investigators showed the RelA protein to stimulate Hfq multimerization in vitro. Since RelA is specifically synthesized in response to amino acid starvation and these conditions also favor premature Rho-dependent termination, one may speculate that the Hfq monomer antagonizes Rho function and that RelA would counteract the anti-terminator by promoting Hfq hexamer formation. The study of Hfq mutants specifically affected in hexamer assembly might help clarify this issue.

Materials and methods

Strains and growth conditions

Strains used in this study were all derived from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain MA3409, a strain LT2 derivative cured for the Gifsy-1 prophage (Figueroa-Bossi et al. 1997). The genotypes of strains used are listed in Supplemental Table S1. Bacteria were cultured at 37°C in liquid medium or in medium solidified by the addition of 1.5% Difco agar. LB broth (Bertani 2004) was used as complex medium. Carbon-free medium (NCE) (Maloy and Roth 1983) supplemented with 0.2% glycerol or 0.2% lactose was used as minimal medium. Antibiotics (Sigma-Aldrich) were included at the following final concentrations: 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ chloramphenicol, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ kanamycin monosulphate, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sodium ampicillin, 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ spectinomycin dihydrochloride, and 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ tetracycline hydrochloride. LB plates containing 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal; from Sigma) were used to monitor *lacZ* expression in bacterial colonies. Liquid cultures were grown in New Brunswick gyratory shakers, and growth was monitored by measuring the optical density at 600 nm with a Shimadzu UV-mini 1240 spectrophotometer.

Enzymes and chemicals

T4 polynucleotide kinase and Taq DNA polymerase were from New England Biolabs, Pfu-Turbo DNA polymerase was from

Stratagene, T4 DNA ligase was from USB, and σ -saturated *E. coli* RNA polymerase was from Epicentre. DNA oligonucleotides were obtained from Sigma-Aldrich. Acrylamide-bisacrylamide and other electrophoresis reagents were from Bio-Rad or AMRESCO. Agarose was from Invitrogen. Hybond-N⁺ membranes and the hybridization buffer used for Northern blot analysis were from GE Healthcare and Applied Biosystems-Ambion, respectively. The rNTPs were from Promega, and the ³²P-NTPs were from PerkinElmer or Hartmann Analytic. Rho and NusG proteins were overexpressed and purified as described previously (Rabhi et al. 2011). Bcm was a generous gift from Max Gottesman (Columbia University, New York).

Genetic techniques and chromosomal recombineering

Generalized transduction was performed using the high-frequency transducing mutant of phage P22, HT 105/1 *int-201* (Schmieger 1972), as described (Lemire et al. 2011). Chromosomal engineering (recombineering) was carried out by the λ *red* recombination method (Datsenko and Wanner 2000; Murphy et al. 2000; Yu et al. 2000) implemented as in Datsenko and Wanner (2000). Donor DNA fragments were generated by PCR using plasmid DNA, chromosomal DNA, or DNA oligonucleotides as templates. DNA oligonucleotides used as primers for PCR amplification are listed in Supplemental Table S2. Amplified fragments were electroporated into appropriate strains harboring the conditionally replicating plasmid pKD46, which carries the λ *red* operon under the control of the P^{BAD} promoter (Datsenko and Wanner 2000). Bacteria carrying pKD46 were grown at 30°C in the presence of ampicillin and exposed to arabinose (10 mM) for 3 h prior to preparation of electrocompetent cells. Electroporation was carried out using a Bio-Rad MicroPulser under the conditions specified by the manufacturer. Recombinant colonies were selected on LB plates containing the appropriate antibiotic. Constructs were verified by PCR and DNA sequence analysis (performed by GATC Co.).

'Scarless' DNA recombineering

Scarless modification of chromosomal DNA sequences at the single-base-pair level was achieved with a two-step recombineering procedure adapted from Karlinsey (2007). The procedure involves (1) inserting a *tetAR* module (produced by PCR) at the chromosomal site to be modified and (2) replacement of the *tetAR* module by a DNA fragment carrying the desired changed through positive selection of tetracycline-sensitive recombinants (Bochner et al. 1980). Typically, the DNA fragment in the second step was also obtained by PCR using oligonucleotides with complementary sequences at their 3' ends priming DNA synthesis on each other ("reciprocal priming") (Supplemental Table S3).

Isolation and identification of rho mutants

Aliquots (0.1 mL) from overnight cultures of strain MA9679 (*chiP*_{AGG} *chiQ*::*lacZY*) were spread on NCE plates containing lactose as the sole carbon source. A number of Lac⁺ colonies were visible after a 2-d incubation period. Cells from the largest colonies were found to contain different-sized deletions in the *chiP* gene. Cells from smaller colonies carried mutations not linked to *chiPQ*. To characterize the latter class, a phage P22 lysate made on a pool of random Tn5-TPOP insertions in the *Salmonella* chromosome (Figueroa-Bossi et al. 2006) was used to transduce some of these isolates selecting tetracycline-resistance on lactose indicator plates. This allowed the identification of insertions genetically linked to the Lac⁺ mutations. Inverse

PCR (Hartl and Ochman 1996) revealed the Tn5-TPOP insertion sites to be in proximity to the *rho* gene. DNA sequence analysis confirmed that the Lac⁺ phenotype from the small colony class results from *rho* gene mutations.

chiP *rut* site mutagenesis

An 87-bp DNA fragment with a randomized 8-bp sequence corresponding to the core portion of the *chiP rut* region was obtained by annealing oligonucleotides ppI83 and ppI18 (Supplemental Table S3) and performing PCR amplification. The fragment was introduced into a strain harboring a *tetAR* insertion at the *rut* site (*chiP135::tetAR*) and expressing λ *red* recombination functions (strain MA10974). Tetracycline-sensitive recombinants were selected as above. DNA sequence analysis of individual clones showed that each of them carries a mutagenized variant of the octameric *rut* core sequence. Presence of the *chiQ::lacZY* fusion in the MA10974 background allowed it to visualize the phenotype of the recombinant clones directly on lactose indicator plates.

nusG mutagenesis

A *cat* gene cassette was introduced in the *Salmonella* chromosome at the 3' side of the *nusG* gene. To avoid perturbing the expression of the adjacent *rplK* gene (coding for 50S ribosomal protein L11), the DNA insert contained only the *cat* ORF (including the Shine-Dalgarno motif) positioned 20 bp downstream from the end of the *nusG* coding sequence (thus expressed from the *nusG* promoter). A 1618-bp DNA fragment spanning the *nusG-cat* module was amplified by PCR under error-prone conditions (with primers ppK01 and ppK05) and introduced into strain MA11116 (*chiP_{AGG} chiQ::lacZY/pKD46*). Cm^R recombinants were selected on plates containing X-gal. Rare blue colonies were identified. Transductional crosses showed that the blue color results from mutations linked to the *cat* marker. DNA sequence analyses confirmed these mutations to lie within the *nusG* gene.

RNA extraction and Northern analysis

RNA was prepared by the acid-hot-phenol method from exponentially growing cells (OD₆₀₀ of 0.35) as previously described (Bossi and Figueroa-Bossi 2007). RNA was fractionated on an 8% polyacrylamide-8 M urea gel and transferred to Hybond-N⁺ membranes. Blots were hybridized to DNA oligonucleotides (Supplemental Table S2) labeled at the 5' ends with T4 polynucleotide kinase. Hybridization patterns were analyzed by PhosphorImaging, and, when appropriate, RNA bands were quantified using the ImageQuant or ImageJ programs.

In vitro transcription

DNA templates for in vitro transcription experiments were prepared by standard PCR procedures using genomic DNA from *Salmonella* and appropriate synthetic primers (Eurogentec). Standard transcription termination experiments were performed as described previously (Rabhi et al. 2011). Briefly, mixtures (18 μ L) containing DNA template (5 nM final concentration), *E. coli* RNAP (22.5 nM), Rho (0 or 70 nM), SUPERase-In (0.5U/ μ L; Ambion), and NusG (0–210 nM) in transcription buffer (40 mM Tris-HCl at pH 8.0, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1.5 mM DTT) were preincubated for 10 min at 37°C. Then, 2 μ L of transcription initiation mix (2 mM ATP, GTP, and CTP, 0.2 mM UTP, 2.5 μ Ci/ μ L of ³²P- α -UTP, 250 μ g/mL rifampicin in transcription buffer) was added before incubation for 20 min at 37°C. Transcription reactions were stopped with 4 μ L of EDTA (0.5M), 6 μ L

of tRNA (0.25 mg/mL), and 80 μ L of sodium acetate (0.42 M) before ethanol precipitation at –20°C. Reaction pellets were dissolved in denaturing loading buffer (95% formamide, 5 mM EDTA) and analyzed by denaturing 6% (ChiP1 template) or 4.5% (ChiP2 template) polyacrylamide gel electrophoresis.

β -Galactosidase assays

β -Galactosidase activity was measured in toluene-permeabilized cells as described by Miller (1992) and is expressed in Miller units throughout this work. Unless specified otherwise, measurements were performed on cultures grown overnight in LB medium (OD₆₀₀ \approx 3).

Acknowledgments

We thank Fabienne Chevance and Kelly Hughes for advice on scarless DNA recombineering. Some of the major findings from this work were presented at the 2011 Meeting on Molecular Genetics of Bacteria and Phages, University of Wisconsin at Madison. This work was supported by a grant from the French National Research Agency (ANR-BLAN07-1_187785) to L.B.

References

- Adhya S, Gottesman M. 1978. Control of transcription termination. *Annu Rev Biochem* **47**: 967–996.
- Argaman L, Elgrably-Weiss M, Hershko T, Vogel J, Altuvia S. 2012. RelA protein stimulates the activity of RyhB small RNA by acting on RNA-binding protein Hfq. *Proc Natl Acad Sci* **109**: 4621–4626.
- Banerjee S, Chalissery J, Bandey I, Sen R. 2006. Rho-dependent transcription termination: More questions than answers. *J Microbiol* **44**: 11–22.
- Bertani G. 2004. Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. *J Bacteriol* **186**: 595–600.
- Bochner BR, Huang HC, Schieven GL, Ames BN. 1980. Positive selection for loss of tetracycline resistance. *J Bacteriol* **143**: 926–933.
- Bossi L, Figueroa-Bossi N. 2007. A small RNA downregulates LamB maltoporin in *Salmonella*. *Mol Microbiol* **65**: 799–810.
- Boudvillain M, Nollmann M, Margeat E. 2010. Keeping up to speed with the transcription termination factor Rho motor. *Transcription* **1**: 70–75.
- Brantl S. 2007. Regulatory mechanisms employed by cis-encoded antisense RNAs. *Curr Opin Microbiol* **10**: 102–109.
- Brennan RG, Link TM. 2007. Hfq structure, function and ligand binding. *Curr Opin Microbiol* **10**: 125–133.
- Burmann BM, Schweimer K, Luo X, Wahl MC, Stitt BL, Gottesman ME, Rosch P. 2010. A NusE:NusG complex links transcription and translation. *Science* **328**: 501–504.
- Burns CM, Nowatzke WL, Richardson JP. 1999. Activation of Rho-dependent transcription termination by NusG. Dependence on terminator location and acceleration of RNA release. *J Biol Chem* **274**: 5245–5251.
- Cardinale CJ, Washburn RS, Tadigotla VR, Brown LM, Gottesman ME, Nudler E. 2008. Termination factor Rho and its cofactors NusA and NusG silence foreign DNA in *E. coli*. *Science* **320**: 935–938.
- Carpousis AJ. 2007. The RNA degradosome of *Escherichia coli*: An mRNA-degrading machine assembled on RNase E. *Annu Rev Microbiol* **61**: 71–87.
- Chalissery J, Banerjee S, Bandey I, Sen R. 2007. Transcription termination defective mutants of Rho: Role of different functions of Rho in releasing RNA from the elongation complex. *J Mol Biol* **371**: 855–872.

- Chalissery J, Muteeb G, Kalarickal NC, Mohan S, Jisha V, Sen R. 2011. Interaction surface of the transcription terminator Rho required to form a complex with the C-terminal domain of the antiterminator NusG. *J Mol Biol* **405**: 49–64.
- Ciampi MS. 2006. Rho-dependent terminators and transcription termination. *Microbiology* **152**: 2515–2528.
- Ciampi MS, Roth JR. 1988. Polarity effects in the *hisG* gene of *Salmonella* require a site within the coding sequence. *Genetics* **118**: 193–202.
- Datsenko KA, Wanner BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci* **97**: 6640–6645.
- Dreyfus M. 2009. Killer and protective ribosomes. *Prog Mol Biol Transl Sci* **85**: 423–466.
- Epshtein V, Dutta D, Wade J, Nudler E. 2010. An allosteric mechanism of Rho-dependent transcription termination. *Nature* **463**: 245–249.
- Espeli O, Moulin L, Boccard F. 2001. Transcription attenuation associated with bacterial repetitive extragenic BIME elements. *J Mol Biol* **314**: 375–386.
- Figueroa-Bossi N, Coissac E, Netter P, Bossi L. 1997. Unsuspected prophage-like elements in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **25**: 161–173.
- Figueroa-Bossi N, Lemire S, Malorid D, Balbontín R, Casadesús J, Bossi L. 2006. Loss of Hfq activates the σ^E -dependent envelope stress response in *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* **62**: 838–852.
- Figueroa-Bossi N, Valentini M, Malleret L, Fiorini F, Bossi L. 2009. Caught at its own game: Regulatory small RNA inactivated by an inducible transcript mimicking its target. *Genes Dev* **23**: 2004–2015.
- Gottesman S, Storz G. 2011. Bacterial small RNA regulators: Versatile roles and rapidly evolving variations. *Cold Spring Harb Perspect Biol* pii: a003798. doi: 10.1101/cshperspect.a003798.
- Hartl DL, Ochman H. 1996. Inverse polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol* **58**: 293–301.
- Hollands K, Proshkin S, Sklyarova S, Epshtein V, Mironov A, Nudler E, Groisman EA. 2012. Riboswitch control of Rho-dependent transcription termination. *Proc Natl Acad Sci* **109**: 5376–5381.
- Housley PR, Whitfield HJ. 1982. Transcription termination factor rho from wild type and *rho-111* strains of *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* **257**: 2569–2577.
- Karlinsey JE. 2007. λ -Red genetic engineering in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Methods Enzymol* **421**: 199–209.
- Lemire S, Figueroa-Bossi N, Bossi L. 2011. Bacteriophage cross-talk: Coordination of prophage induction by *trans*-acting antirepressors. *PLoS Genet* **7**: e1002149. doi: 10.1371/journal.pgen.1002149.
- Lopez PJ, Iost I, Dreyfus M. 1994. The use of a tRNA as a transcriptional reporter: The T7 late promoter is extremely efficient in *Escherichia coli* but its transcripts are poorly expressed. *Nucleic Acids Res* **22**: 1186–1193.
- Maloy SR, Roth JR. 1983. Regulation of proline utilization in *Salmonella typhimurium*: Characterization of put:Mu d(Ap, lac) operon fusions. *J Bacteriol* **154**: 561–568.
- Martinez A, Burns CM, Richardson JP. 1996a. Residues in the RNP1-like sequence motif of Rho protein are involved in RNA-binding affinity and discrimination. *J Mol Biol* **257**: 909–918.
- Martinez A, Opperman T, Richardson JP. 1996b. Mutational analysis and secondary structure model of the RNP1-like sequence motif of transcription termination factor Rho. *J Mol Biol* **257**: 895–908.
- Massé E, Vanderpool CK, Gottesman S. 2005. Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**: 6962–6971.
- Miller JH. 1992. *A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Mooney RA, Davis SE, Peters JM, Rowland JL, Ansari AZ, Landick R. 2009a. Regulator trafficking on bacterial transcription units in vivo. *Mol Cell* **33**: 97–108.
- Mooney RA, Schweimer K, Rosch P, Gottesman M, Landick R. 2009b. Two structurally independent domains of *E. coli* NusG create regulatory plasticity via distinct interactions with RNA polymerase and regulators. *J Mol Biol* **391**: 341–358.
- Morita T, Mochizuki Y, Aiba H. 2006. Translational repression is sufficient for gene silencing by bacterial small noncoding RNAs in the absence of mRNA destruction. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 4858–4863.
- Murphy KC, Campellone KG, Poteete AR. 2000. PCR-mediated gene replacement in *Escherichia coli*. *Gene* **246**: 321–330.
- Nudler E, Gottesman ME. 2002. Transcription termination and anti-termination in *E. coli*. *Genes Cells* **7**: 755–768.
- Nudler E, Avetisova E, Markovtsov V, Goldfarb A. 1996. Transcription processivity: Protein-DNA interactions holding together the elongation complex. *Science* **273**: 211–217.
- Overgaard M, Johansen J, Moller-Jensen J, Valentin-Hansen P. 2009. Switching off small RNA regulation with trap-mRNA. *Mol Microbiol* **73**: 790–800.
- Peters JM, Vangeloff AD, Landick R. 2011. Bacterial transcription terminators: The RNA 3'-end chronicles. *J Mol Biol* **412**: 793–813.
- Platt T. 1986. Transcription termination and the regulation of gene expression. *Annu Rev Biochem* **55**: 339–372.
- Proshkin S, Rahmouni AR, Mironov A, Nudler E. 2010. Cooperation between translating ribosomes and RNA polymerase in transcription elongation. *Science* **328**: 504–508.
- Rabhi M, Espeli O, Schwartz A, Cayrol B, Rahmouni AR, Arluison V, Boudvillain M. 2011. The Sm-like RNA chaperone Hfq mediates transcription antitermination at Rho-dependent terminators. *EMBO J* **30**: 2805–2816.
- Richardson JP. 1991. Preventing the synthesis of unused transcripts by Rho factor. *Cell* **64**: 1047–1049.
- Richardson JP. 2002. Rho-dependent termination and ATPases in transcript termination. *Biochim Biophys Acta* **1577**: 251–260.
- Schmieger H. 1972. Phage P22-mutants with increased or decreased transduction abilities. *Mol Gen Genet* **119**: 75–88.
- Sharma CM, Papenfort K, Pernitzsch SR, Mollenkopf HJ, Hinton JC, Vogel J. 2011. Pervasive post-transcriptional control of genes involved in amino acid metabolism by the Hfq-dependent GcvB small RNA. *Mol Microbiol* **81**: 1144–1165.
- Storz G, Opdyke JA, Zhang A. 2004. Controlling mRNA stability and translation with small, noncoding RNAs. *Curr Opin Microbiol* **7**: 140–144.
- Sullivan SL, Gottesman ME. 1992. Requirement for *E. coli* NusG protein in factor-dependent transcription termination. *Cell* **68**: 989–994.
- Vogel J. 2009. A rough guide to the non-coding RNA world of *Salmonella*. *Mol Microbiol* **71**: 1–11.
- Vogel J, Luisi BF. 2011. Hfq and its constellation of RNA. *Nat Rev Microbiol* **9**: 578–589.
- Werner F. 2012. A nexus for gene expression-molecular mechanisms of Spt5 and NusG in the three domains of life. *J Mol Biol* **417**: 13–27.
- Yu D, Ellis HM, Lee EC, Jenkins NA, Copeland NG, Court DL. 2000. An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* **97**: 5978–5983.

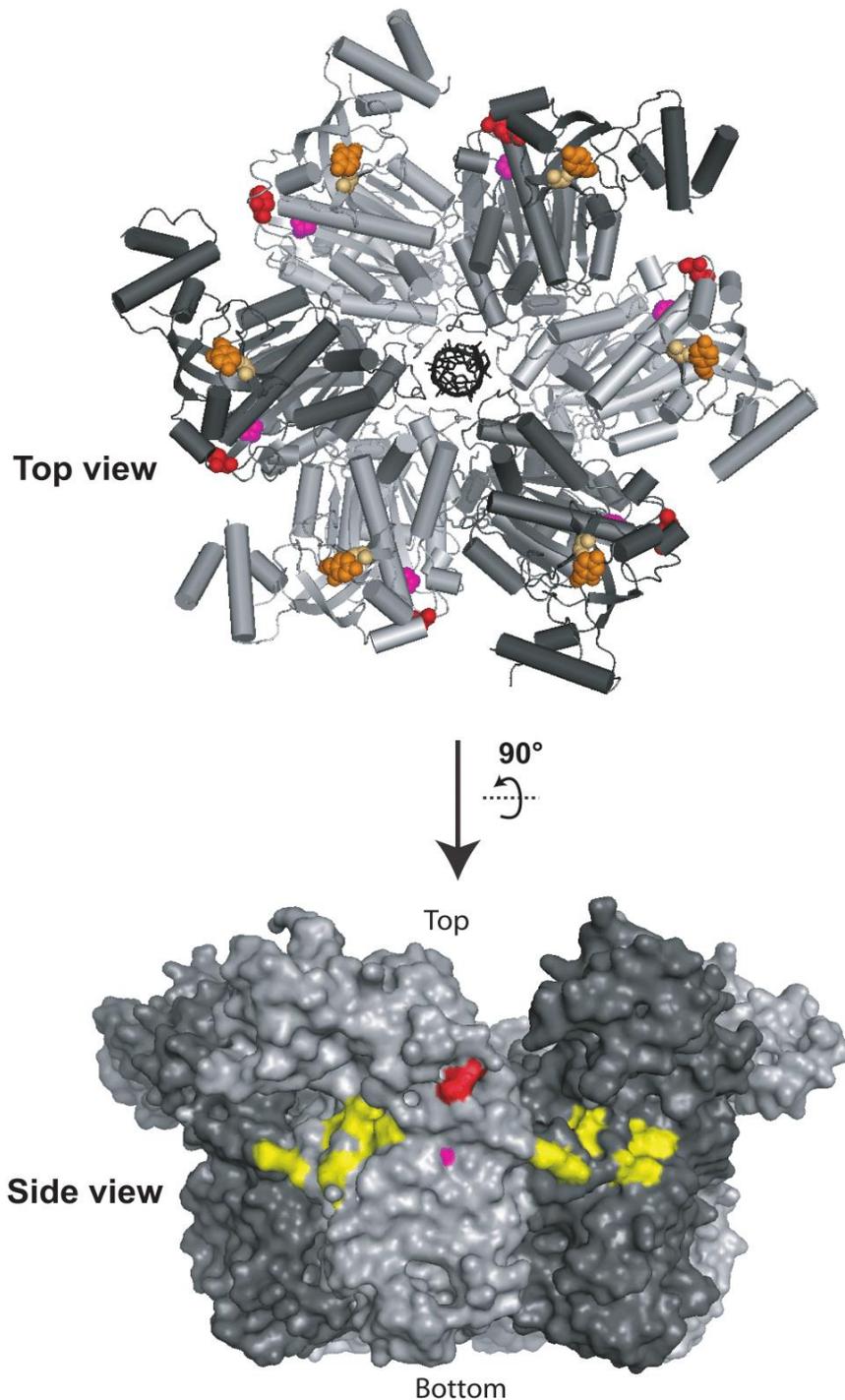
A role for Rho-dependent polarity in gene regulation by a non-coding small RNA

Lionello Bossi¹, Annie Schwartz², Benoit Guillemardet¹, Marc Boudvillain²
and Nara Figueroa-Bossi^{1,3}

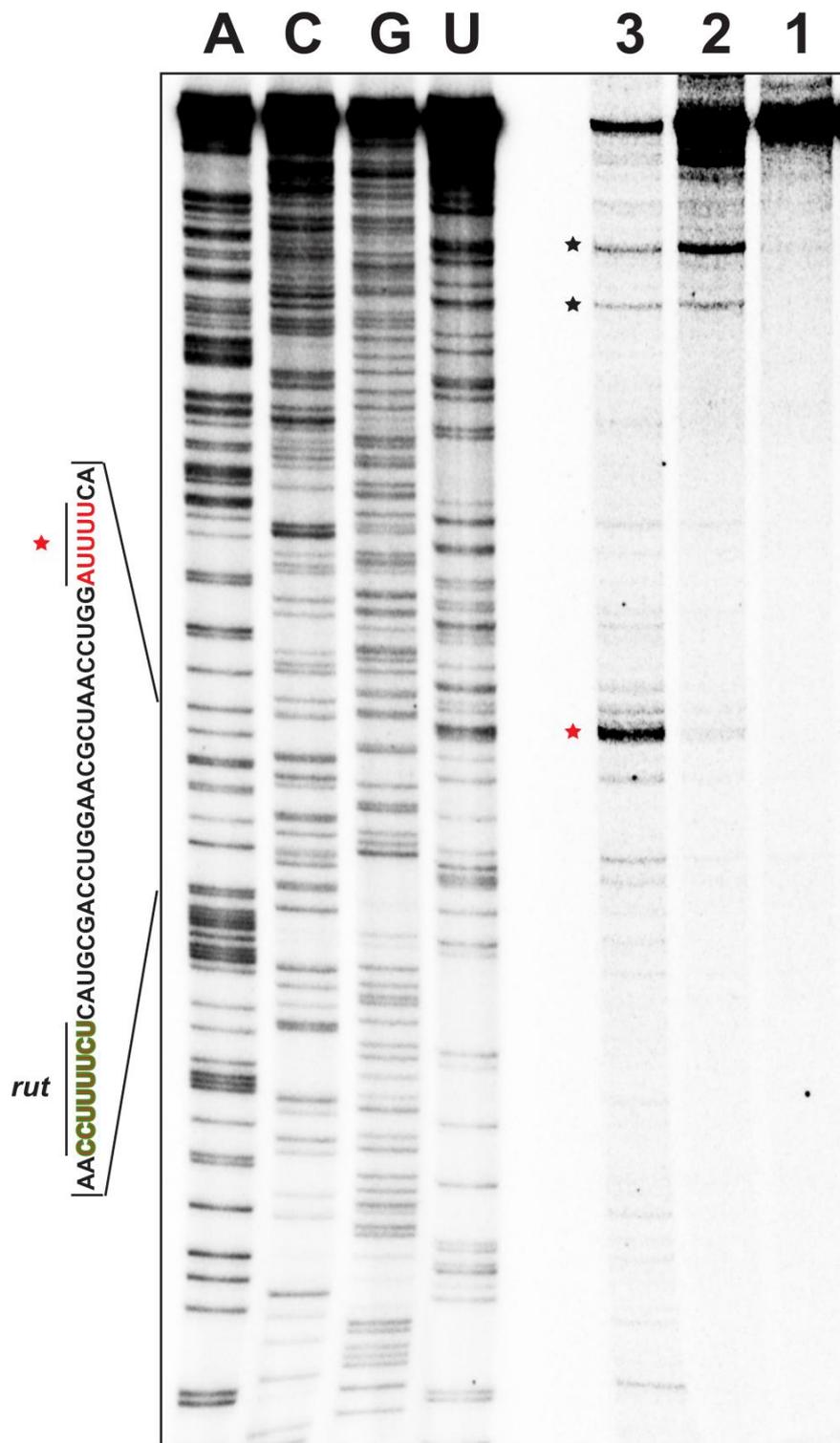
¹*Centre de Génétique Moléculaire, CNRS UPR3404, Gif-sur-Yvette, affilié à
l'Université Paris Sud XI, Orsay, France and*

²*Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR4301, Orléans, affilié à l'Université
d'Orléans, France*

SUPPLEMENTAL MATERIAL

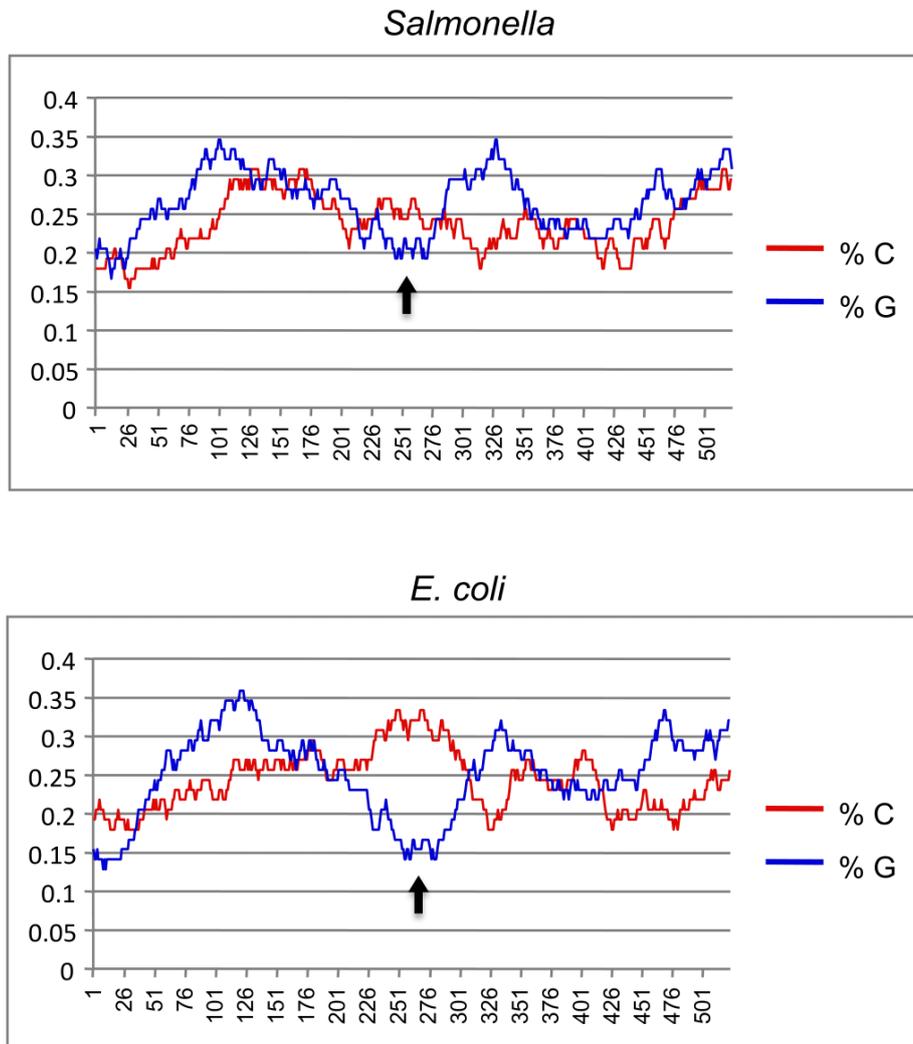


Supplemental figure 1S: Structure of the Rho hexamer from *E. coli* (PDB# 3ICE). Residues Gly 63 and Tyr80 are shown as light and dark orange spheres, respectively. Residues Lys130 and Ser312 are shown in red and magenta, respectively. Residues composing the putative interaction surface for NusG (Chalissery et al., 2011, *J. Mol. Biol.* 405, 49-64) are shown in yellow for two adjacent subunits. The rU₆ ligand bound to the secondary binding site in the central canal of the hexamer is shown in black stick representation. There is no rU₆ cofactor in the crown-like, primary binding site of structure #3ICE, consistent with the preference of this site for C-rich oligomers (Thomsen and Berger, 2009, *Cell* 139, 523-534).



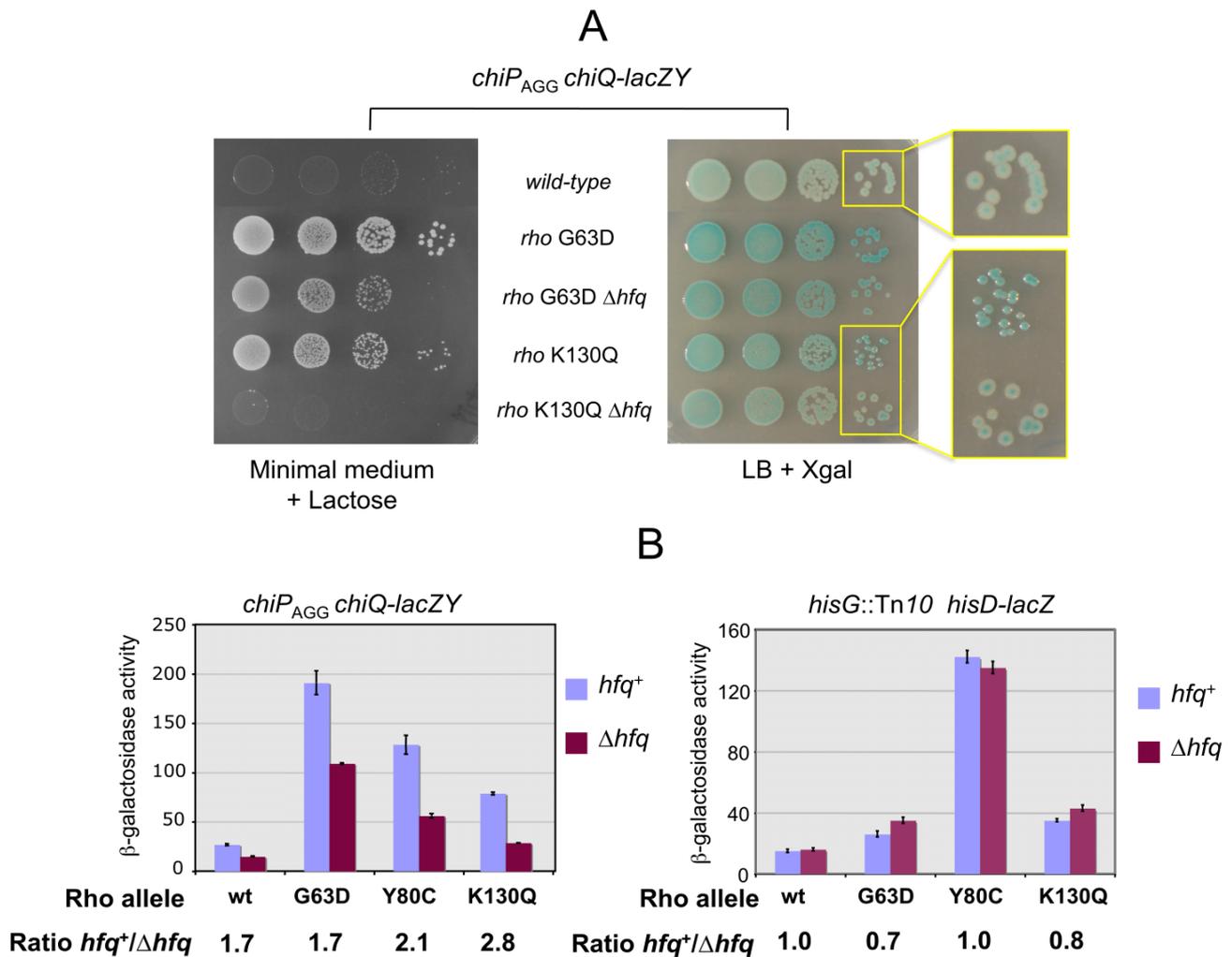
Supplemental figure 2S: Identification of termination sites by phosphorothioate sequencing. The sequencing pattern was obtained by iodine-directed cleavage of ^{32}P -end labeled RNA transcripts containing α -phosphorothioate nucleotide analogs (αsA , αsC , αsG , or αsU) at random positions. Transcripts were generated by *in vitro* transcription of a modified ChiP1 DNA template that contained a promoter for T7 RNA polymerase instead of the T7A1 promoter. Preparation of the transcripts and generation of the iodine-cleavage ladders were performed as described in Schwartz et al., 2003, *EMBO J.* 22, 3385-3394. Transcription mixtures contained Rho (lane 2) or Rho and NusG (lane 3). Intensities and contrasts for the sequencing and transcription parts of the gel (separated by an empty lane) were adjusted independently.

Résultats



Supplemental Figure S3. Cytosine / Guanine frequencies in the initial portion of *chiPQ* mRNA from *Salmonella* and *E.coli*. The C>G bubble (arrow) corresponds to the *rut* site identified in this study. Base frequencies were calculated with the Emboss Freak program (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/freak>) with stepping value = 1, averaging window = 78, and outputs exported to Microsoft Excel for graphic representation.

Résultats



Supplemental Figure S4. Effect of *hfq* deletion on polarity suppression. The extent by which *rho* mutations stimulate expression of a *chiQ-lacZY* fusion in the absence of *chiP* translation (*chiP_{AGG}*) is markedly reduced in a *hfq* deleted background (A and left panel of B). In the *rho* K130Q mutant, this effect causes the loss of the Lac⁺ growth phenotype (A, left panel). Intriguingly, the *hfq* deletion also suppresses the small/glossy colony morphology of the *rho* K130Q mutant (A, right panel). In contrast, the *hfq* deletion has no significant effect on the ability of *rho* mutations to relieve polarity in the *hisG* gene of the histidine operon (B, right panel). [Transposon Tn10 insertions in the early portion of *hisG* are polar on *hisD* expression because transcription originating from inside the transposon terminates prematurely at a Rho-dependent site within *hisG* (Ciampi and Roth, 1988, *Genetics* 118, 193-202)]. Note also the variable efficiency with which different *rho* alleles relieve polarity in the two systems.

Résultats

Table S1. *Salmonella* strains used in this work

| Strain ^a | Genotype ^b | Source or reference ^c |
|---------------------|--|----------------------------------|
| TT7333 | <i>hisG9424::Tn10 rho-111</i> (Y80C) | Ref 1 in footnote |
| TT7334 | <i>hisG9424::Tn10</i> | Ref 1 in footnote |
| MA3398 | <i>zfh-8157::Tn10dTc</i> | Ref 2 in footnote |
| MA3409 | wild-type | Ref 2 in footnote |
| MA7455 | wild-type / pKD46 | Ref 3 in footnote |
| MA8933 | Δ [<i>chiX-ybaP</i>]::cat | Ref 4 in footnote |
| MA9130 | <i>chiP91::aph</i> | Ref 4 in footnote |
| MA9655 | <i>chiQ::lacZY</i> (formerly <i>chiQ92::pCE40[lac]</i>) | Ref 4 in footnote |
| MA9679 | <i>chiP_{AGG} chiP91::scar chiQ::lacZY</i> | |
| MA9703 | <i>chiP132::tetAR</i> / pKD46 | |
| MA9779 | <i>chiP_{AGG} chiP91::scar chiQ::lacZY rhIB^{wt}-Tpop rho-S312I</i> | |
| MA9816 | <i>rluC^{wt}-cat rne-3071</i> (ts) (formerly [<i>rluC-rne</i>]IG::cat <i>rne-3071</i>) | Ref 4 in footnote |
| MA9826 | Δ [<i>chiX-ybaP</i>]::scar <i>rluC^{wt}-cat rne-3071</i> (ts) | |
| MA9850 | <i>chiQ::lacZY rhIB^{wt}-Tpop rho-K130Q</i> | |
| MA9859 | <i>chiQ::lacZY rhIB^{wt}-Tpop rho-R66C</i> | |
| MA9860 | <i>chiQ::lacZY rhIB^{wt}-Tpop rho-G63D</i> | |
| MA9870 | <i>rhIB^{wt}-Tpop rho-G63D</i> | |
| MA9886 | <i>rhIB^{wt}-Tpop rho-G63D rluC^{wt}-cat rne-3071</i> (ts) | |
| MA9942 | <i>chiP133::tetAR</i> / pKD46 | |
| MA10235 | <i>chiP-Δ235::scar chiQ::lacZY</i> | |
| MA10240 | <i>chiP-Δ235::scar chiQ::lacZY rhIB^{wt}-Tpop rho-G63D</i> | |
| MA10274 | <i>chiP-Δ22</i> | |
| MA10277 | <i>chiP-Δ22 chiQ::lacZY</i> | |
| MA10293 | <i>chiP-Δ22 rhIB^{wt}-Tpop rho-G63D</i> | |
| MA10295 | <i>chiP-Δ22 rhIB^{wt}-Tpop rho-G63D chiQ::lacZY</i> | |
| MA10417 | <i>chiP139::tetAR chiQ::lacZY</i> / pKD46 | |
| MA10445 | <i>chiP_{UAA-256} chiQ::lacZY Δ[<i>chiX-ybaP</i>]::cat</i> | |
| MA10608 | <i>chiP_{AGG} chiQ::lacZY</i> | |
| MA10633 | <i>chiP_{AGG} chiQ::lacZY rhIB^{wt}-Tpop rho-K130Q</i> | |
| MA10634 | <i>chiP_{AGG} chiQ::lacZY rhIB^{wt}-Tpop rho-G63D</i> | |
| MA10662 | <i>chiP_{AGG} chiQ::lacZY rhIB^{wt}-Tpop rho-K130Q Δhfq::cat</i> | |
| MA10663 | <i>chiP_{AGG} chiQ::lacZY rhIB^{wt}-Tpop rho-G63D Δhfq::cat</i> | |
| MA10769 | <i>chiP_{AGG} chiQ::lacZY rhIB^{wt}-Tpop rho-Y80C</i> | |
| MA10778 | <i>chiP_{AGG} chiQ::lacZY rhIB^{wt}-Tpop rho-Y80C Δhfq::cat</i> | |
| MA10790 | <i>chiP134::tetAR</i> / pKD46 | |
| MA10802 | <i>chiP_{UAA-10} Δ[<i>chiX-ybaP</i>]::cat chiQ::lacZY</i> | |
| MA10855 | <i>hisG9424::Tn10-aadA hisD9953::MudJ</i> | |
| MA10856 | <i>hisG9424::Tn10-aadA hisD9953::MudJ rhIB^{wt}-Tpop rho-Y80C</i> | |
| MA10858 | <i>hisG9424::Tn10-aadA hisD9953::MudJ rhIB^{wt}-Tpop rho-K130Q</i> | |
| MA10859 | <i>hisG9424::Tn10-aadA hisD9953::MudJ rhIB^{wt}-Tpop rho-G63D</i> | |
| MA10862 | <i>hisG9424::Tn10-aadA hisD9953::MudJ hfq::cat</i> | |
| MA10863 | <i>hisG9424::Tn10-aadA hisD9953::MudJ rhIB^{wt}-Tpop rho-Y80C Δhfq::cat</i> | |
| MA10865 | <i>hisG9424::Tn10-aadA hisD9953::MudJ rhIB^{wt}-Tpop rho-K130Q Δhfq::cat</i> | |
| MA10866 | <i>hisG9424::Tn10-aadA hisD9953::MudJ rhIB^{wt}-Tpop rho-G63D Δhfq::cat</i> | |
| MA10937 | <i>chiP135::tetAR chiQ::lacZY</i> / pKD46 | |
| MA10938 | <i>chiP136::tetAR chiQ::lacZY</i> / pKD46 | |
| MA10951 | <i>chiP_{UAA-46} chiQ::lacZY</i> | |
| MA10952 | <i>chiP_{UAA-63} chiQ::lacZY</i> | |
| MA10960 | <i>chiP_{UAA-46} chiQ::lacZY Δ[<i>chiX-ybaP</i>]::cat</i> | |
| MA10961 | <i>chiP_{UAA-63} chiQ::lacZY Δ[<i>chiX-ybaP</i>]::cat</i> | |
| MA10974 | <i>chiP136::tetAR chiQ::lacZY Δ[<i>chiX-ybaP</i>]::cat</i> / pKD46 | |
| MA11015 | <i>chiP137::tetAR chiQ::lacZY Δ[<i>chiX-ybaP</i>]::cat</i> / pKD46 | |

Résultats

Table S1. *continued*

| Strain ^a | Genotype ^b | Source or reference ^c |
|---------------------|--|----------------------------------|
| MA11016 | <i>chiP</i> ₁₃₈ :: <i>tetAR</i> <i>chiQ</i> :: <i>lacZY</i> Δ[<i>chiX-ybaP</i>]::cat / pKD46 | |
| MA11026 | <i>chiP</i> rut-2 <i>chiQ</i> :: <i>lacZY</i> | |
| MA11027 | <i>chiP</i> rut-3 <i>chiQ</i> :: <i>lacZY</i> | |
| MA11028 | <i>chiP</i> rut-4 <i>chiQ</i> :: <i>lacZY</i> | |
| MA11029 | <i>chiP</i> rut-6 <i>chiQ</i> :: <i>lacZY</i> | |
| MA11030 | <i>chiP</i> rut-8 <i>chiQ</i> :: <i>lacZY</i> | |
| MA11031 | <i>chiP</i> rut-13 <i>chiQ</i> :: <i>lacZY</i> | |
| MA11046 | <i>chiP</i> _{UAA-78} <i>chiQ</i> :: <i>lacZY</i> Δ[<i>chiX-ybaP</i>]::cat | |
| MA11047 | <i>chiP</i> _{UAA-108} <i>chiQ</i> :: <i>lacZY</i> Δ[<i>chiX-ybaP</i>]::cat | |
| MA11065 | <i>chiP</i> rut-37 <i>chiQ</i> :: <i>lacZY</i> | |
| MA11101 | <i>chiP</i> _{UAA-63} <i>chiQ</i> :: <i>lacZY</i> <i>rhIB</i> ^{wt} -Tpop <i>rho</i> -G63D | |
| MA11102 | <i>chiP</i> rut-2 <i>chiQ</i> :: <i>lacZY</i> <i>rhIB</i> ^{wt} -Tpop <i>rho</i> -G63D | |
| MA11103 | <i>chiP</i> rut-3 <i>chiQ</i> :: <i>lacZY</i> <i>rhIB</i> ^{wt} -Tpop <i>rho</i> -G63D | |
| MA11104 | <i>chiP</i> rut-4 <i>chiQ</i> :: <i>lacZY</i> <i>rhIB</i> ^{wt} -Tpop <i>rho</i> -G63D | |
| MA11105 | <i>chiP</i> rut-6 <i>chiQ</i> :: <i>lacZY</i> <i>rhIB</i> ^{wt} -Tpop <i>rho</i> -G63D | |
| MA11106 | <i>chiP</i> rut-8 <i>chiQ</i> :: <i>lacZY</i> <i>rhIB</i> ^{wt} -Tpop <i>rho</i> -G63D | |
| MA11107 | <i>chiP</i> rut-13 <i>chiQ</i> :: <i>lacZY</i> <i>rhIB</i> ^{wt} -Tpop <i>rho</i> -G63D | |
| MA11108 | <i>chiP</i> rut-37 <i>chiQ</i> :: <i>lacZY</i> <i>rhIB</i> ^{wt} -Tpop <i>rho</i> -G63D | |
| MA11111 | <i>nusG</i> ^{wt} -cat | |
| MA11115 | <i>chiPQ</i> ::tDNA ^{S,a} | |
| MA11116 | <i>chiP</i> _{AGG} <i>chiQ</i> :: <i>lacZY</i> / pKD46 | |
| MA11123 | <i>chiPQ</i> ::tDNA ^{S,a} Δ[<i>chiX-ybaP</i>]::cat | |
| MA11150 | <i>chiPQ</i> ::tDNA ^{S,a} <i>rhIB</i> ^{wt} -Tpop <i>rho</i> -G63D | |
| MA11158 | <i>chiP</i> _{AGG} <i>chiQ</i> :: <i>lacZY</i> <i>nusG</i> -174fs-cat | |
| MA11159 | <i>chiP</i> _{AGG} <i>chiQ</i> :: <i>lacZY</i> <i>nusG</i> -F144I-cat | |
| MA11161 | <i>chiP</i> _{AGG} <i>chiQ</i> :: <i>lacZY</i> <i>nusG</i> -V162D-cat | |
| MA11162 | <i>chiP</i> _{AGG} <i>chiQ</i> :: <i>lacZY</i> <i>nusG</i> -F141S-cat | |
| MA11167 | <i>chiP</i> _{AGG} <i>chiQ</i> :: <i>lacZY</i> <i>nusG</i> ^{wt} -cat | |
| MA11168 | <i>chiPQ</i> ::tDNA ^{S,a} <i>rhIB</i> ^{wt} -Tpop <i>rho</i> -Y80C | |
| MA11169 | <i>chiPQ</i> ::tDNA ^{S,a} <i>rhIB</i> ^{wt} -Tpop <i>rho</i> -K130Q | |
| MA11170 | <i>chiPQ</i> ::tDNA ^{S,a} <i>nusG</i> ^{wt} -cat | |
| MA11171 | <i>chiPQ</i> ::tDNA ^{S,a} <i>nusG</i> -174fs-cat | |
| MA11172 | <i>chiPQ</i> ::tDNA ^{S,a} <i>nusG</i> -F144I-cat | |
| MA11173 | <i>chiPQ</i> ::tDNA ^{S,a} <i>nusG</i> -V162D-cat | |
| MA11174 | <i>chiPQ</i> ::tDNA ^{S,a} <i>nusG</i> -F141S-cat | |

^a All strains are derived from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain MA3409. The latter is an LT2 derivative cured for the Gifsy-1 prophage (Figueroa-Bossi et al. 1997).

^b The term “scar” denotes the DNA sequence left following excision of the antibiotic-resistance cassette. Complementary information on gene nomenclature and allele numbering can be found in supplementary Tables 3S and 4S.

^c Where not specified, the source of the strain is this work. References:

1. Ciampi et al., 1982, *PNAS USA* **79**: 5016-5020.
2. Figueroa-Bossi et al., 1997, *Mol Microbiol* **25**: 161-173.
3. Figueroa-Bossi et al., 2006, *Mol Microbiol* **62**: 838-852.
4. Figueroa-Bossi et al., 2009, *Genes Dev* **23**: 2004-2015.

Résultats

Table S2. DNA oligonucleotides uses in this work

| name | Sequence (5'-3') ^a |
|-------|--|
| pp813 | GCGGAGGCTAGGGAGAGAGG |
| pp972 | CCCACCAGCAGTCGAATGTA |
| pp977 | CTGTGATACCGGCGATAGCCAGAGCCAGCGTACTACGTTT |
| ppA83 | AGGGTTTTATTGCACGTTATTATGACTGCGAATTTCTGCCAGAC |
| ppA85 | ATAGATGCCGCCCGTTAACGTGGAGTCGTGCGAAAAAGCCGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTT |
| ppB10 | ACACTACCATCGGCGCTACG |
| ppB68 | TGCCAATAATAGATGCCGCCCGTTAACGTGGAGTCGTGCGA |
| ppC23 | TTTGTGCGCAGCAATTTATACGTCAAAGAGGATTAAGTTAGGCGTACGTTTAGTGGCAAACGT |
| ppC29 | AAGAGGATTAAGTTATGCGTACGTTTAGTGGCAAACGTAGTTAAGACCCACTTTTCACATT |
| ppC30 | TAATAGATGCCGCCCGTTAACGTGGAGTCGTGCGAAAAAGCCGCTAAGCACTTGTCTCCTG |
| ppD13 | ATTATTAATCTAAATGTTATAAGCGTCAGGTCAACAGGAGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTT |
| ppD14 | AACGTACGCATAAGTTAATCCTCTTTGACGTATAAATTGCCCATGGTCCATATGAATATC |
| ppD42 | ATTTATCGTTATTGCGCCATTCACTATTTTCTGATGTCAGTTAAGACCCACTTTTCACATT |
| ppD43 | TTTCATAGGTCGTTCTCAACAGCGCGGCAGGCCGCGCAGCCTAAGCACTTGTCTCCTG |
| ppD55 | ATTTATCGTTATTGCGCCATTCACTATTTTCTGATGTCAG |
| ppF23 | TGAGTAAATTTTTTTCATAGGTCGTTCTCAACAGCGCGCTGACATCAGAAAATAGTGA |
| ppG02 | TTTGGTCAGTCCGAAGGCTATGTCGATCAATATTTTCGCGATTAAGACCCACTTTTCACATT |
| ppG03 | CGTAGAACTGGTAACTGGTGGTGAACGGATTGCCGCCTAAATCTAAGCACTTGTCTCCTG |
| ppG04 | TTTGGTCAGTCCGAAGGCTATGTCGATCAATATTTTCGCGAAGGCCAGCTAATAATTTGAT |
| ppG05 | GTAGAACTGGTAACTGGTGGTGAACGGATTGCCGCCTAAATCAAATTATTAGCTGGCCTT |
| ppH25 | TTGTGCGCAGCAATTTATACGTCAAAGAGGATTAAGTTAGGCGTACGTTTAGTGGCAAAC |
| ppH26 | ATAGATGCCGCCCGTTAACGTGGAG |
| ppH28 | AAAGAGGATTAAGTTATGCGTACGTTTAGTGGCAAACGTAGTTAATAAC |
| ppH29 | GACATTGCTGTGATACCGGCGATAGCCAGAGCCAGTTATTAAGTTACGTTTGGCACTAAAC |
| ppi15 | CCACCCGACATTGCTGTGATACCGGCGATAGCCAGAGCCAGCTAAGCACTTGTCTCCTG |
| ppi33 | ATATGATCAATTCAAGGCCGAATAAGAAGGCTGGCTCTGCACCTTGCCGTAGAAGAACAG |
| ppi34 | TAACATCATTGGTGACGAAATAACTAAGCACTTGTCTCCTTTGGCTGTGAGCAATTATG |
| ppi74 | CTCCGGCTTTTTCGACGACTCCACGTTAACGGGCGGCATCTTAAGACCCACTTTTCACATT |
| ppi75 | CGCCGTCGGTCACATCTTTGCGATCGCGTTCACGCTGCCACTAAGCACTTGTCTCCTG |
| ppi76 | GCGTGAACGCGATCGCAAAGATGTGACCGACGGCGACAAATTAAGACCCACTTTTCACATT |
| ppi77 | AAATCCAGGTTAGCGTTCAGGTCGCATGAGAAAGGTTAGTCTAAGCACTTGTCTCCTG |
| ppi81 | CTCCGGCTTTTTCGACGACTCCACGTTAACGGGCGGCATCTAATAATGGCAGCGTGAA |
| ppi82 | ATATTTGTCGCCGTCGGTCACATCTTTGCGATCGCGTTCACGCTGCCATTATTAGATGCCG |
| ppi83 | AGCGTGAACGCGATCGCAAAGATGTGACCGACGGCGACAAATAATAA |
| ppi84 | AATCCAGGTTAGCGTTCAGGTCGCATGAGAAAGGTTAGTTTATTATTTGTCGCCGTCGGTCACA |
| ppJ08 | AAACTAACCTTTCTCATGCGACCTGGAACGCTAACCTGGATTAAGACCCACTTTTCACATT |
| ppJ09 | CCGCGATATCCAGACCGAACATATCCGCGAGCGTAACCAGACTAAGCACTTGTCTCCTG |

Résultats

Table S2, continued

| name | Sequence (5'-3') ^a |
|-------|---|
| ppJ10 | ACTAACCTTTCATGCGACCTGGAACGCTAACCTGGATTAATAATCTGGTTACG |
| ppJ11 | CCGCGATATCCAGACCGAACATATCCGCAGCGTAACCAGATTATTAATCCAGG |
| ppJ18 | AATCCAGGTTAGCGTTCAGGTCGCATNNNNNNNTTAGTTTATTATTTGTCGCCGTCGGTCACA |
| ppJ21 | TTACCGCGATTGAAATGGCAGAAAACGGCGACAGCGGTCATTAAGACCCACTTTCACATT |
| ppJ22 | AGTCTTCGTCGTAGCCTTTATTCTTTTTCGAGAAGGCAATTTCTAAGCACTTGTCTCCTG |
| ppJ23 | TTTACCGCGATTGAAATGGCAGAAAACGGCGACAGCGGTCATTAATAA |
| ppJ24 | CTTCGTCGTAGCCTTTATTCTTTTTCGAGAAGGCAATTTCTTATTAATGACCGCTGTCGCCG |
| ppJ62 | ATAGGAGTCGAACCCATAACCTCTTGATCCGTAGTCAAAC |
| ppJ63 | AATTTATCGTTATTGCGCCATTCACTATTTTCTGATGTCAGTCCTCGGCACCATTTTAGC |
| ppJ64 | TTTTCATAGGTCGTTCTCAACAGCGCGGAGGCCGCGCAAGCTGAGCTACTTCCCGTT |
| ppJ92 | CCCGGTAGAGCTGGACTTCAGTCAGGTTGAGAAAGCGTAACAGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGGA |
| ppJ93 | AATTCGCGCCCTATGCAACGATTAGATCGCTGCTTTTTTATGTCGCCCGCCCTGCCA |
| ppK01 | GCGCTGGCCGTAGTAATTCT |
| ppK05 | CCTCGAATTGGGTAGTATCG |

Résultats

Table S3. Relevant alleles constructed by DNA recombineering

| Constructs made by standard procedure | | | | |
|---|--|-------------------------|---------------|---------|
| Allele description | template | Primer pair | cassette | excised |
| <i>chiP</i> AUG to AGG ^a | MA9130 | ppC23 / ppA85 | <i>aph</i> | yes |
| Δ <i>chiP</i> promoter (Δ 235) | pKD3 | ppD13 / ppD14 | <i>cat</i> | yes |
| <i>cat</i> near <i>nusG</i> | pKD3 | ppJ92 / ppJ93 | <i>cat</i> | no |
| Constructs made by “scarless” procedure | | | | |
| Allele description | Step 1 | Step 2 | | |
| | <i>tetAR</i> amplified with primers ^b | template | Primer pair | |
| <i>chiP</i> AUG to AGG ^a | ppC29 / ppC30 | Reciprocal priming | ppH25 / ppH26 | |
| Δ <i>chiPQ</i> intercistron reg (Δ 22) | ppD42 / ppD43 | Reciprocal priming | ppF23 / ppD55 | |
| <i>chiPQ</i> ::tDNA ^{S.aureus} | ppD42 / ppD43 | <i>S. aureus</i> RN4220 | ppJ63 / ppJ64 | |
| <i>chiP</i> UAA, codons 10, 11 | ppC29 / ppl15 | Reciprocal priming | ppH28 / ppH29 | |
| <i>chiP</i> UAA, codons 46, 47 | ppl74 / ppl75 | Reciprocal priming | ppl81 / ppl82 | |
| <i>chiP</i> UAA, codons 63, 64 | ppl76 / ppl77 | Reciprocal priming | ppl83 / ppl84 | |
| <i>chiP</i> UAA, codons 78, 79 | ppJ08 / ppJ09 | Reciprocal priming | ppJ10 / ppJ11 | |
| <i>chiP</i> UAA, codons 108, 109 | ppJ21 / ppJ22 | Reciprocal priming | ppJ23 / ppJ24 | |
| <i>chiP</i> UAA, codons 256, 257 | ppG02 / ppG03 | Reciprocal priming | ppG04 / ppG05 | |
| <i>rut</i> site mutagenesis | ppl76 / ppl77 | Reciprocal priming | ppl83 / ppJ18 | |

^a Replacement of *chiP* initiation codon with AGG was carried out twice. Initially, this mutant was derived from strain MA9130 (*chiP91*::*aph*) which harbors the *aph* gene from plasmid pKD13 (Datsenko and Wanner, 2000, *PNAS, USA* **97**: 6640-6645) inserted at the 9th codon position of *chiP* gene (Figuroa-Bossi et al., 2009, *Genes Dev* **23**: 2004-2015). A DNA segment spanning *aph* and the adjacent *chiP* translation initiation region was amplified with primers ppC23 (carrying the AUG to AGG change) and ppA85 (on the opposite site of *aph*). The amplified fragment was introduced in a strain expressing λ *red* functions and Kn^R recombinants inheriting the AGG change identified by DNA sequencing. Excision of the *aph* cassette yielded a strain with the 75 bp “scar” sequence replacing the segment between bp 27 and 99 of the *chiP* coding sequence. A derivative of this strain (MA9679: *chiP*_{AGG} *chiP91*::scar *chiQ*::*lacZY*) was used for the selection of the *rho* mutants described in this work. Later in the study, a new version of the *chiP* AGG mutant, with the remainder of the *chiP* sequence unaltered, was constructed by the two-step scarless recombineering protocol described in Materials and methods.

^b The *tetAR* module was routinely amplified from the chromosome of strain MA3398 (Figuroa-Bossi et al., 1997, *Mol Microbiol* **25**: 161-173).

2.3) Conclusion et perspectives

Cette étude nous a permis d'identifier un nouveau mécanisme dans la régulation d'un ARNm par un petit ARN régulateur. La liaison de ChiX sur l'ARNm polycistronique *chiPQ*, au niveau de la séquence SD de *chiP*, empêche les ribosomes d'initier la traduction de ce gène. Cette action entraîne un découplage de la transcription et de la traduction de l'ARNm. Ce découplage permet au facteur de terminaison de la transcription Rho d'interagir avec un site *rut* cryptique présent dans la séquence de *chiP*, ordinairement masqué par les ribosomes. Aidé du facteur NusG, Rho initie une terminaison prématurée de la transcription de l'ARNm à l'intérieur de la séquence codante de *chiP*.

Les différents travaux que nous avons réalisés au cours de cette étude nous ont ouvert la voie sur différents projets en rapport avec ce dernier.

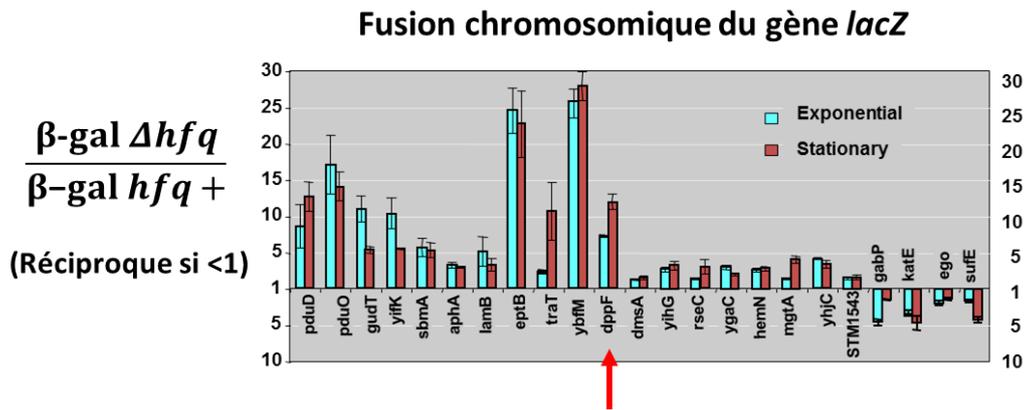
- La découverte de ce nouveau mécanisme de régulation d'un ARNm, plus particulièrement polycistronique, par un petit ARN régulateur et faisant intervenir le terminateur Rho nous a conduit à considérer que d'autres opérons réprimés par un petit ARN régulateur auraient pu être soumis à ce même type de régulation. Nous avons testé cette hypothèse sur l'opéron *dppABCDF*, réprimé par le petit ARN GcvB (décrit plus bas).
- L'ensemble des constructions et expérimentations réalisées au cours de cette étude nous a permis de caractériser ce site de terminaison Rho-dépendant et d'identifier les différents acteurs nécessaires afin d'initier cette terminaison. En utilisant ce site comme modèle, nous avons essayé de mieux caractériser la terminaison Rho-dépendante de façon générale.

3. La répression de l'opéron *dppABCDF* de *S. Typhimurium* par GcvB implique-t-elle un mécanisme de polarité Rho-dépendant ?

3.1) L'opéron *dppABCDF*

Lors d'études réalisées précédemment dans le laboratoire sur l'impact de la délétion de la protéine Hfq sur l'expression de différents gènes chez *S. Typhimurium*, de nombreux gènes ont été isolés dont l'expression variait en présence ou en absence d'Hfq. Parmi ces différents gènes, il a pu être mis en évidence le gène *dppF* (Figure 46 A). Ce dernier fait partie intégrante de l'opéron *dppABCDF* (Figure 46 B). Cet opéron, constitué de 5 gènes, code différentes protéines permettant le transport des di et tripeptides du milieu extérieur vers le milieu intérieur [462]. Les études réalisées sur cet opéron ont montré que *dppA*, premier gène de l'opéron, est régulé par le petit ARN régulateur : GcvB [195]. Celui-ci se lie à l'ARNm polycistronique *dppABCDF*, dans la région 5'UTR, juste en amont de la séquence de SD de *dppA*. La liaison du petit ARN régulateur à l'ARNm bloque la fixation des ribosomes et entraîne l'inhibition de la traduction de *dppA* [285]. De façon intéressante, l'étude de Chao et al a montré que GcvB provoque une baisse coordonnée de tous les gènes de l'opéron [463]. Le mécanisme responsable de cet effet "à distance" n'ayant pas été identifié, nous avons émis l'hypothèse que cette baisse pourrait résulter d'une polarité transcriptionnelle provoquée par l'inhibition de la traduction du premier gène de l'opéron. Nous avons donc examiné la séquence de *dppA* en recherchant la présence d'un ou de plusieurs sites *rut* potentiels. Cette analyse a identifié un tel site potentiel (Figure 46 C). Les analogies avec la répression de l'opéron *chiPQ* par le petit ARN ChiX suggéraient donc que l'opéron *dppABCDF* présentait une régulation similaire par le petit ARN GcvB

A)



B)



C)

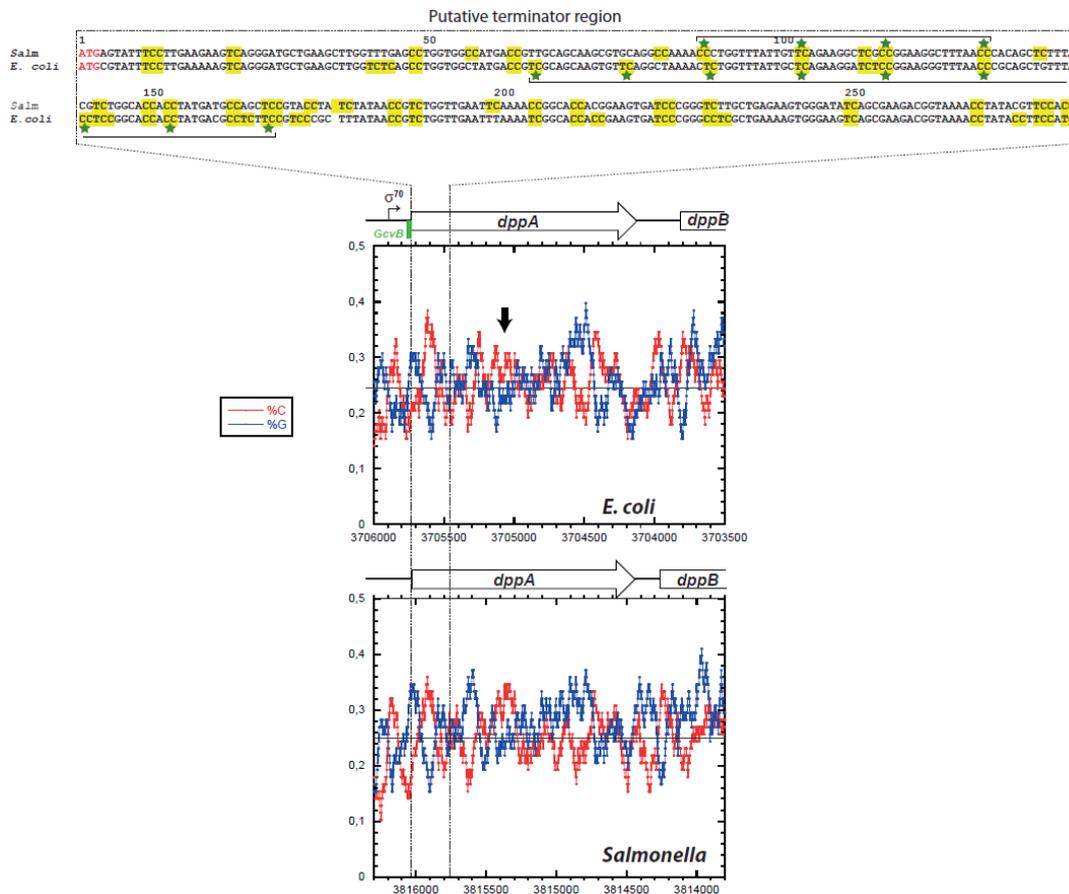


Figure 46 : Présentation de l'opéron *dppABCDF*.

A) Représentation graphique de l'impact de la délétion d'Hfq sur l'expression d'un ensemble de gènes en phase stationnaire et exponentielle de croissance. B) Représentation schématique de l'opéron *dppABCDF*. Chaque gène de l'opéron est représenté par une couleur différente. Le site de liaison de GcvB à *dppA* est représenté en rouge et le site *rut* cryptique putatif de *dppA* est représenté en vert. C) Représentation graphique du %C (en

Résultats

rouge) et %G (en bleu) en fonction de la séquence nucléotidique de *dppA*. Les sites *rut* potentiel sont ainsi représentés par une bulle où le taux de C est supérieur à celui de G. La séquence mise en avant correspond au site *rut* potentiel présentant le plus fort ratio C : G présent au début du gène *dppA*. Chaque séquence surlignée en jaune correspond à un site qui aurait le potentiel d'interagir avec une des sous-unités du facteur Rho. Les groupes de sites marqués d'une étoile verte correspondent au site *rut* potentiel. La flèche noire indique un second site *rut* potentiel dont le ratio de C : G est plus faible.

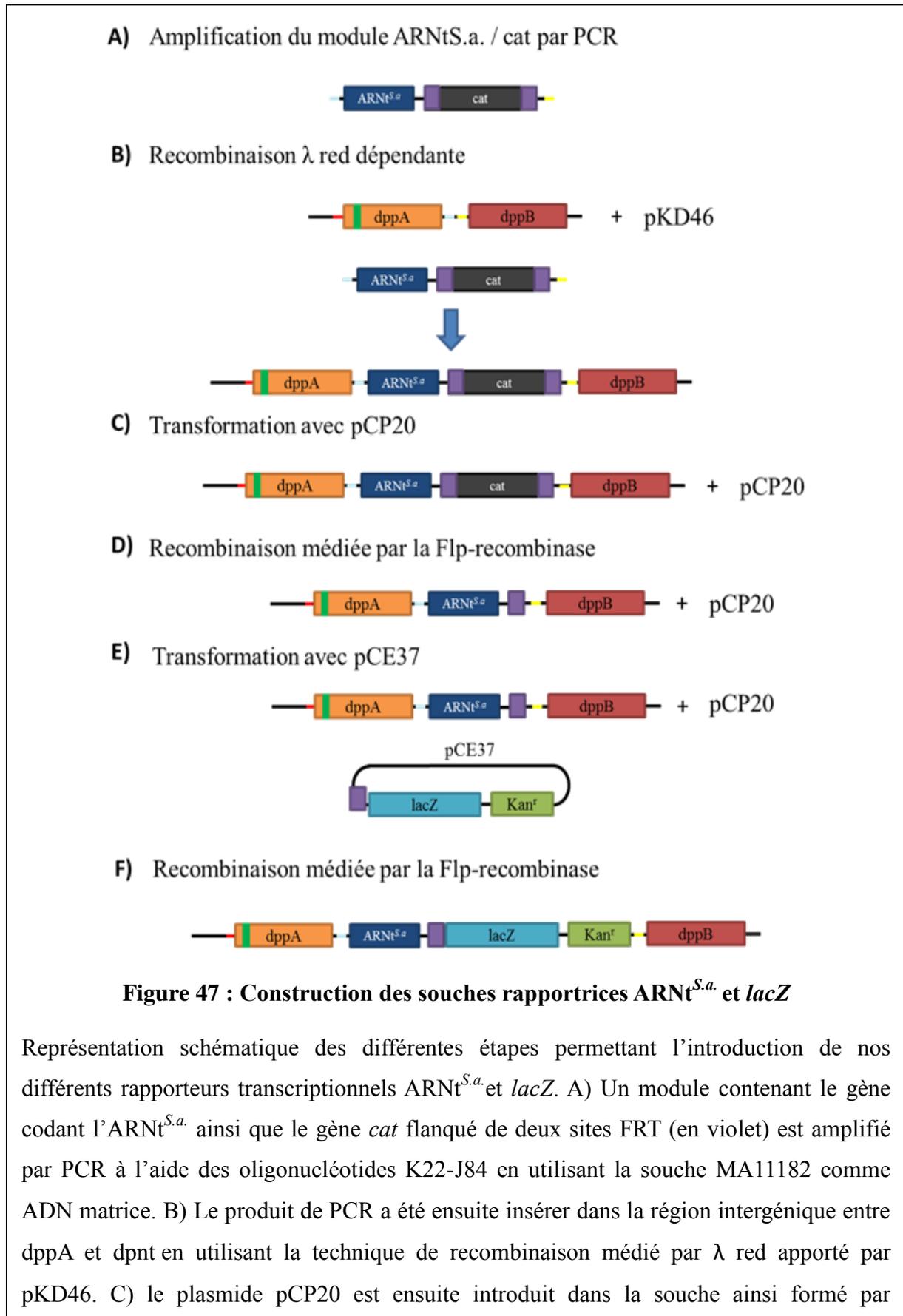
3.2) Approches expérimentales mises en œuvre pour tester l'hypothèse.

J'ai voulu vérifier l'existence d'une possible régulation par GcvB faisant intervenir une terminaison prématurée de la transcription au niveau de *dppA* ou de la région entre *dppA* et *dpnt*. Tout d'abord, j'ai construit différentes souches dans lesquels j'ai introduit un gène codant un ARNt de *S. aureus* dans la région intergénique entre les gènes *dppA* et *dpnt* (Figure 47 A et B). En effet, si le(s) site(s) ruts putatifs pouvaient effectivement agir en tant que tel(s), la fixation de GcvB pourrait induire une terminaison prématurée Rho-dépendante de la transcription et résultant dans une faible expression des rapporteurs. Afin d'être le plus complets dans notre étude, les rapporteurs ont été insérés dans trois souches différentes. La première souche est une souche sauvage pour *dppA* (*dppA* WT). La seconde est une souche où le site *rut* putatif de *dppA* a été éliminé (*dppA* Δ *rut*). La dernière est une souche où le codon initiateur AUG de *dppA* a été muté en AGG (*dppA*_{AGG}). Cette souche permet de mimer et d'amplifier les effets de la fixation de GcvB sur *dppA* en inhibant la traduction de ce dernier. Ces différentes constructions ont été combinées par transduction avec une délétion du gène *gcvB* pour les souches *dppA* WT et *dppA* Δ *rut* et avec le mutant Y80C du facteur Rho dans le cas de la souche *dppA*_{AGG}.

Ces différents contextes génétiques devraient permettre d'explorer la régulation de l'opéron *dppABCD* par GcvB pour déterminer si elle entraîne une terminaison prématurée de la transcription Rho-dépendante. Selon cette hypothèse, l'expression de notre rapporteur doit augmenter en absence GcvB dans la souche *dppA* WT alors que dans ce même contexte, la souche *dppA* Δ *rut* devrait avoir une expression équivalente de l'ARNt^{S.a.}. Dans la souche *dppA*_{AGG}, l'activité des rapporteurs doit fortement augmenter en présence de l'allèle mutant de Rho. L'analyse de l'expression de notre ARNt^{S.a.} rapporteur dans les différents contextes

Résultats

génétiques a été réalisée par des expériences de Northern blot (Figure 48 A). Les résultats de



Résultats

transformation. D) Le gène *cat* est excisé par recombinaison des sites FRT par la Flp-recombinase présente sur pCP20. E) Le plasmide pCE37 est introduit dans la souche par transformation. F) Le plasmide pCE37 est insérer dans la souche par recombinaison entre le site FRT présent dans la région intergènique *dppAB* et le site FRT présent sur le plasmide pCE37 grâce à la Flp-recombinase présent sur pCP20.

ces derniers montrent que dans les souches *dppA* *WT* et *dppA* Δ *rut*, la délétion du petit ARN régulateur GcvB induit une augmentation de l'expression de l'ARNt^{S.a.} rapporteur. Par contre, dans la souche *dppA*_{AGG} où nous avons mimé l'effet de la fixation de GcvB, l'expression de notre rapporteur est très faible et ne montre que peu de différence d'expression en présence de l'allèle de *rho* *WT* ou Y80C par rapport à ce que nous pouvions attendre.

Ces résultats ne sont pas concordants avec ceux que nous pouvions attendre de ces expériences. En effet, seule la souche *dppA* *WT* présente un résultat conforme à ceux que nous attendions. A l'inverse, les deux autres souches ont des résultats différents de notre hypothèse. Nous nous sommes alors demandés si notre rapporteur était suffisamment sensible pour voir les effets que nous supposions. En effet, lorsque nous avons utilisé l'ARNt^{S.a.} comme rapporteur dans nos expériences précédentes, l'expression de l'ARNm *chiPQ* était très forte. Or, dans ce cas, l'opéron *dppABCDF* est beaucoup moins exprimé dans la cellule et cette faible expression conjuguée à un rapporteur peu sensible pourrait expliquer pourquoi nous ne voyons aucun effet dans la souche *dppA*_{AGG}. Nous avons donc utilisé un rapporteur transcriptionnel plus sensible : le gène *lacZ*.

À partir des souches obtenues précédemment, j'ai construit les souches avec le rapporteur *lacZ* en suivant les étapes indiquées dans la Figure 47 C-F. Ces souches ont ensuite été combinées par transduction avec le mutant Y80C du facteur Rho. L'étude des résultats du dosage de l'activité β -galactosidase montre une augmentation de l'expression, quel que soit le contexte génétique dans lequel il est étudié, en présence de l'allèle du mutant *rho* Y80C par rapport aux souches où l'allèle de *rho* est sauvage (Figure 48 B). En effet, l'activité mesurée pour la souche où *dppA* est sauvage augmente d'un facteur 3.5 en présence du mutant de Rho passant de 32 à 114 unités de Miller. Elle augmente également d'un facteur 3 dans la souche *dppA* Δ *rut* (39 à 109 unités de Miller) et d'un facteur 5 dans la souche *dppA*_{AGG} (8 à 42 unités de Miller) dans les mêmes conditions. Ces résultats semblent aller à l'encontre de l'idée originelle puisque la souche *dppA* Δ *rut* est autant affectée par le mutant Rho Y80C que la souche sauvage.

Résultats

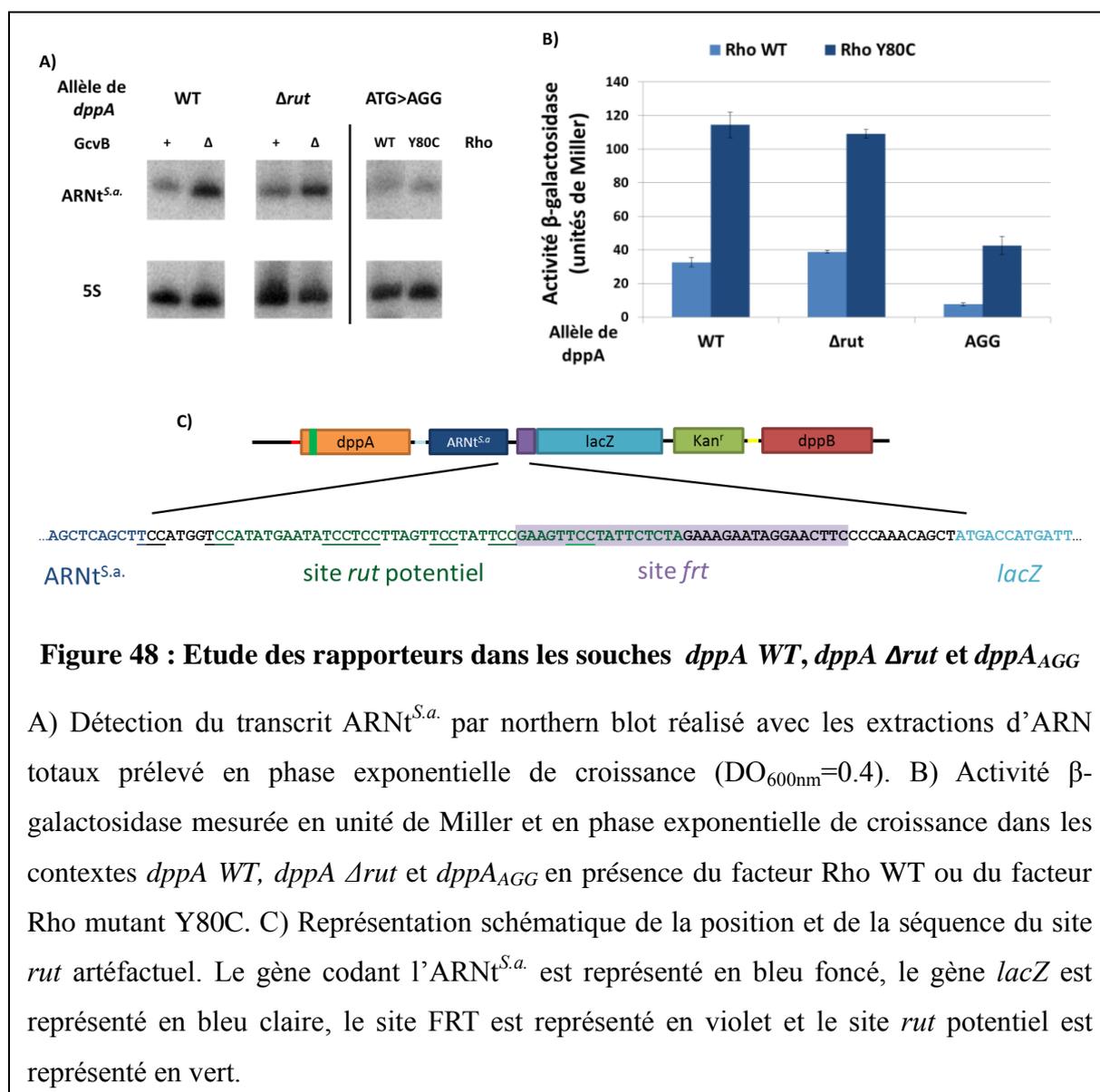


Figure 48 : Etude des rapporteurs dans les souches *dppA* WT, *dppA* Δrut et *dppA* AGG

A) Détection du transcrite ARNt^{S.a.} par northern blot réalisé avec les extractions d'ARN totaux prélevé en phase exponentielle de croissance ($DO_{600nm}=0.4$). B) Activité β -galactosidase mesurée en unité de Miller et en phase exponentielle de croissance dans les contextes *dppA* WT, *dppA* Δrut et *dppA* AGG en présence du facteur Rho WT ou du facteur Rho mutant Y80C. C) Représentation schématique de la position et de la séquence du site *rut* artificiel. Le gène codant l'ARNt^{S.a.} est représenté en bleu foncé, le gène *lacZ* est représenté en bleu claire, le site FRT est représenté en violet et le site *rut* potentiel est représenté en vert.

Ces résultats, comme ceux obtenus précédemment, sont en désaccord avec l'hypothèse de départ. Il existe de nombreuses incohérences entre les résultats obtenus à partir de nos différents rapporteurs surtout dans la souche *dppA* AGG. En effet, dans cette souche, nos rapporteurs présentent des résultats opposés. Dans le cas du rapporteur ARNt, aucune différence n'est observable entre les allèles sauvages et mutants du facteur Rho. Alors qu'à l'inverse, le gène rapporteur *lacZ* présente une augmentation de son expression d'un facteur 5 en présence du mutant Y80C de Rho. De plus, l'ensemble des résultats des dosages de l'activité β -galactosidase dans les différentes souches montre un effet du mutant Rho dans l'expression du rapporteur relativement fort. Ceci semble indiquer qu'il existe un site *rut* en amont des gènes *lacZ*, mais qui ne correspond pas au site *rut* potentiel que nous avons identifié. A l'inverse, les résultats, lors de l'analyse de l'ARNt^{S.a.}, ne nous ont pas permis de

Résultats

confirmer la présence de site *rut* au sein de *dppA*. Cela semble donc impliquer que ce site *rut* pourrait se trouver entre le gène codant l'ARNt^{S.a.} et *lacZ*.

Afin de confirmer cela, nous avons analysé les séquences nucléotides des constructions. Nous avons identifié un site *rut* potentiel présent effectivement entre le gène codant l'ARNt^{S.a.} et le gène *lacZ* et plus précisément, sa séquence englobe la fin du gène codant l'ARNt^{S.a.} jusqu'à la moitié du site FRT (Figure 48 C). Nous nous sommes alors demandé d'où pouvait provenir ce site. L'étude de la séquence de ce site *rut* potentiel nous a permis de remonter à ses origines. Sa présence en amont de ce site indique que le site *rut* était présent dans notre séquence avant l'insertion des gènes *lacZ* et donc de pCE37. Effectivement, en analysant les séquences de nos différentes constructions, nous nous sommes rendu compte que le site *rut* était déjà présent dans le module ARNt^{S.a.} / *cat*. Plus précisément, les origines du site *rut* potentiel proviendraient de séquences provenant de l'ARNt^{S.a.} (TCCATGGT) et du plasmide pKD3 (CCATATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTCTA dont la partie soulignée correspond au début du site FRT) ayant servi à construire le module [464].

Les résultats que nous avons obtenus au cours de nos expériences nous permettent de conclure que le site *rut* potentiel que nous avons identifié au sein de *dppA* n'est pas un site *rut* réel. Il semble cependant exister au moins un autre site *rut* potentiel au milieu de la séquence de *dppA* bien que la bulle %C : %G soit plus faible (Figure 46 C). L'ensemble des données acquises ne nous permet pas de valider ou d'infirmer notre hypothèse de départ. Ainsi, le mécanisme permettant au petit ARN régulateur GcvB de réguler l'ensemble de l'opéron *dppABCDF* de manière coordonnée reste encore inconnu.

4. Participation du facteur Rho dans la régulation de l'expression de l'opéron *pgaABCD* d'*Escherichia coli*.

4.1) Introduction

En collaboration avec l'équipe de Marc Boudvillain à Orléans, des recherches ayant pour but d'identifier d'autres exemples de régulation des gènes pouvant impliquer des petits ARN et la participation potentielle du facteur Rho ont été poursuivies. Une publication réalisée en 2012 par le laboratoire de R. Landick étudiait, entre autres, l'étendue de la terminaison Rho-dépendante au niveau global dans la cellule [465]. Plus précisément, ils ont utilisé la Bicyclomycine pour identifier des sites potentiels pouvant correspondre à des sites de terminaison Rho-dépendants, cet antibiotique étant connu comme étant un inhibiteur du facteur Rho. Ce travail a permis d'établir une liste de sites sensibles à la Bicyclomycine où on observe une terminaison putative dans la souche non traitée par rapport à la souche exposée à l'antibiotique. Parmi ces sites, il y avait la région 5'-UTR de l'opéron *pgaABCD*. Or, une publication apparue au cours de la même année avait suggéré la présence, dans cette même région, de la séquence cible d'un petit ARN régulateur, McaS [466]. Ce dernier travail, issu du laboratoire de G. Storz, montrait la capacité de McaS d'activer l'expression de l'opéron *pgaABCD*, lorsque McaS était surexprimé à partir d'un plasmide. En examinant de près la séquence proposée comme cible de McaS par Thomason *et al*, nous nous sommes aperçus que cette dernière se trouvait à l'intérieure d'un site *rut* putatif [466]. Cela nous a conduits à émettre l'hypothèse que le petit ARN McaS aurait pu activer l'expression de *pgaA* en rentrant en compétition avec Rho. Parmi les premières expériences effectuées pour vérifier cette hypothèse, l'une d'elles a été la construction et l'analyse d'une souche dans laquelle la séquence cible putative de McaS avait été déletée. Les résultats de cette expérience ont clairement montré que McaS était encore capable d'activer l'expression de *pgaA* lorsqu'il était surexprimé dans cette souche. Ceci nous a permis de conclure que la régulation positive par McaS de la séquence identifié par Thomason *et al* n'était pas impliquée dans le mécanisme d'action du petit ARN McaS [466]. En effet, les résultats obtenus avec d'autres souches indiquaient que l'activation de l'expression de l'opéron *pgaABCD* par le petit ARN McaS résultait d'une interaction de ce dernier avec la protéine CsrA qui, elle, avait déjà été

Résultats

identifiée comme régulateur négatif de *pgaABCD*[182]. Alors que notre travail était en cours, une deuxième publication du laboratoire de G. Storz confirmait nos résultats [467]. Cependant, notre travail sur ce système nous a permis de découvrir un nouveau mécanisme de régulation basé sur une interaction fonctionnelle entre CsrA et Rho.

L'étude qui a été réalisée par la suite et présentée dans cet article montre que la régulation de l'opéron *pgaABCD* est bien due à un phénomène de terminaison transcriptionnelle Rho-dépendant comme il a été suggéré.

4.2) Article 3 : RNA remodeling by bacterial global regulator CsrA promotes Rho-dependent transcription termination

Nara Figueroa-Bossi, Annie Schwartz, Benoit Guillemardet, François D'Heygère, Lionello Bossi et Marc Boudvillain.

Publié en 2014 dans *Genes and Development*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Volume 28 (11), pp. 1239- 1251

RNA remodeling by bacterial global regulator CsrA promotes Rho-dependent transcription termination

Nara Figueroa-Bossi,¹ Annie Schwartz,² Benoit Guillemardet,¹ François D'Heygère,² Lionello Bossi,^{1,3} and Marc Boudvillain^{2,3}

¹CNRS UPR3404, Centre de Génétique Moléculaire, Gif-sur-Yvette 91198, France, affilié à l'Université Paris Sud XI, Orsay 91405, France; ²CNRS UPR4301, Centre de Biophysique Moléculaire, Orléans 45071, France, affilié à l'Université d'Orléans, Orléans 45100, France

RNA-binding protein CsrA is a key regulator of a variety of cellular processes in bacteria, including carbon and stationary phase metabolism, biofilm formation, quorum sensing, and virulence gene expression in pathogens. CsrA binds to bipartite sequence elements at or near the ribosome loading site in messenger RNA (mRNA), most often inhibiting translation initiation. Here we describe an alternative novel mechanism through which CsrA achieves negative regulation. We show that CsrA binding to the upstream portion of the 5' untranslated region of *Escherichia coli* *pgaA* mRNA—encoding a polysaccharide adhesin export protein—unfolds a secondary structure that sequesters an entry site for transcription termination factor Rho, resulting in the premature stop of transcription. These findings establish a new paradigm for bacterial gene regulation in which remodeling of the nascent transcript by a regulatory protein promotes Rho-dependent transcription attenuation.

[Keywords: CsrA; Rho factor; transcription attenuation; bacterial gene regulation]

Supplemental material is available for this article.

Received February 17, 2014; revised version accepted April 18, 2014.

Bacterial adaptation to changing environments relies on the ability of the bacterial cell to coordinately regulate groups of genes in response to chemical and/or physical signals. A variety of transcriptional and post-transcriptional mechanisms, often interconnected, underlie these global responses. One such mechanism involves a small (61-amino-acid) protein, named CsrA, acting as a post-transcriptional regulator. Originally discovered as a repressor of glycogen biosynthesis in *Escherichia coli* (Romeo et al. 1993), CsrA was subsequently found to regulate other growth phase-dependent processes such as biofilm formation and quorum sensing in *E. coli* and *Vibrio cholerae* (Jackson et al. 2002; Lenz et al. 2005; Wang et al. 2005; Yakhnin et al. 2011) and host invasion in *Salmonella* (Altier et al. 2000; Lawhon et al. 2003; Martinez et al. 2011). The CsrA structural homologs RsmA/RsmE perform similar functions in *Pseudomonas* and *Erwinia* species, where they participate in the regulation of secondary metabolism (Chatterjee et al. 1995; Cui et al. 1995; Pessi et al. 2001; Lapouge et al. 2007). In all of these systems, CsrA and its homologs act as translational repressors; they interact with messenger RNA (mRNA) se-

quences overlapping ribosome-binding sites and thus block translation initiation by occluding these sites (for reviews, see Babitzke and Romeo 2007; Lapouge et al. 2008; Romeo et al. 2013). Occasionally, CsrA can also act as a positive regulator, protecting mRNA against degradation by RNase E (Yakhnin et al. 2013) or remodeling translation initiation regions in ways that stimulate ribosome binding (Patterson-Fortin et al. 2013; Sterzenbach et al. 2013).

A central aspect in CsrA biology is in the mechanism that regulates CsrA activity. This occurs as a result of the production of two small RNAs, CsrB and CsrC, which contain several CsrA-binding sites and sequester the protein by molecular mimicry (Babitzke and Romeo 2007; Lapouge et al. 2008; Romeo et al. 2013). The *csrB* and *csrC* genes are under the control of the BarA/UvrY (SirA) two-component signal transduction system and are transcriptionally activated in the presence of short chain carboxylic acids and other products of carbon metabolism (Takeuchi et al. 2009; Chavez et al. 2010). In addition, CsrA indirectly activates *csrB* and *csrC* transcription via the BarA/UvrY

³Corresponding authors
E-mail bossi@cgm.cnrs-gif.fr
E-mail marc.boudvillain@cnrs-orleans.fr
Article is online at <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.240192.114>.

© 2014 Figueroa-Bossi et al. This article is distributed exclusively by Cold Spring Harbor Laboratory Press for the first six months after the full-issue publication date (see <http://genesdev.cshlp.org/site/misc/terms.xhtml>). After six months, it is available under a Creative Commons License (Attribution-NonCommercial 4.0 International), as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

(SirA) system by an unknown mechanism. Combined with the ability of CsrA to feedback-inhibit translation of its own mRNA (Gudapaty et al. 2001; Suzuki et al. 2002), this provides an additional homeostatic loop that likely allows CsrA activity to be finely adjusted at all times (Romeo et al. 2013). Two novel mechanisms modulating CsrA activity/availability were unveiled recently. In one system, McaS, a regulatory small RNA known to function via classical Hfq-dependent RNA pairing, was found to bind CsrA and relieve repression of some CsrA targets (Jorgensen et al. 2013). In another system, not a small RNA, but rather the 5' leader region of fimbrial mRNA cooperates with CsrB and CsrC in titrating CsrA, preventing CsrA-mediated activation of a second hierarchically controlled fimbrial mRNA (Sterzenbach et al. 2013).

CsrA binds short RNA sequences containing a centrally positioned GGA motif that is essential for recognition (Dubey et al. 2005). The high conservation of this motif in Shine-Dalgarno sequences accounts for the predominant role of CsrA as a repressor of translation initiation. Since the functional form of CsrA is a homodimer, tandem binding sites are generally required for a productive interaction (Schubert et al. 2007; Mercante et al. 2009), with the protein bridging GGA sites anywhere between 10 and 63 nucleotides (nt) apart (Mercante et al. 2009). Some regulated genes have multiple CsrA-binding sites in their control regions. This is the case for the *pgaABCD* operon of *E. coli*, which encodes proteins needed for the synthesis and export of a polysaccharide adhesin involved in biofilm formation (Itoh et al. 2008). Work from the Romeo and Babitzke laboratories (Wang et al. 2005) identified six CsrA-binding sites in the 234-nt 5' untranslated region (UTR) of *pgaABCD* mRNA and provided *in vitro* and *in vivo* evidence that two distal sites, which cover the Shine-Dalgarno sequence and the initiating AUG, are required for translational repression by CsrA. The roles of the other CsrA-binding sites or the reasons for their redundancy have remained elusive.

We became interested in the regulation of the *pgaABCD* locus while data-mining for links between small RNA activity and Rho-dependent transcription termination. This search, prompted by recent findings in our laboratories (Bossi et al. 2012), was made possible by the publication of a high-resolution map of Rho-dependent termination sites in the *E. coli* genome (Peters et al. 2012). Peters et al. (2012) used global RNA-profiling techniques to compare RNA from bacteria treated with the Rho inhibitor bicyclomycin (BCM) or left untreated and, by aligning the two sets of data, were able to identify transcripts specifically terminated by Rho. One of the "BCM significant transcripts" (BSTs) was from the *pgaA* leader region. We noticed that the putative termination site was near the proposed target sequence for the small regulatory RNA McaS, previously shown to activate *pgaA* expression (Thomason et al. 2012). This raised the intriguing possibility that McaS could act by preventing Rho from binding to the RNA. While our subsequent work invalidated this hypothesis, it led us to discover that CsrA modulates the activity of the terminator. CsrA binding to the upstream portion of the *pgaA* 5' UTR prevents the formation of a secondary structure that

otherwise sequesters the *rut* (rho utilization) sequence. Once exposed, the *rut* sequence is recognized by Rho factor, which terminates transcription. This is an entirely new role for CsrA protein and, to the best of our knowledge, is the first example of a regulatory protein that acts by modulating the accessibility of an RNA sequence to the binding of Rho factor.

Results

A Rho-dependent terminator in the pgaA leader region

The study by Peters et al. (2012) tentatively mapped a Rho termination site at position +55 of the *pgaA* 5' UTR. Upon examining the sequence of the region, we detected the presence of a large C>G-rich "bubble," a hallmark of Rho-dependent terminators (Alifano et al. 1991), spanning the interval between +50 and +130 (Fig. 1A). In particular, the sequence contains two sets of four regularly spaced YC dimers (Fig. 1B), either of which could allow a Rho hexamer to anchor the RNA through four contiguous subunits (Boudvillain et al. 2013). The ensemble would then constitute two superimposed (differently phased) *rut* sites. From their position, one would predict transcription to actually terminate around +200, ~150 nt downstream from the site identified by Peters et al. (2012) (Supplemental Fig. S1). This discrepancy is likely ascribable to the trimming of Rho-terminated transcripts by 3'-5' exonuclease activity *in vivo* (Peters et al. 2012).

The *rut* sequence lies immediately downstream from the 5'-proximal pair of CsrA-binding sites (Fig. 1B) and includes one of the proposed target sites for the small RNA McaS (see above; Supplemental Fig. S2). Analysis of the entire *pgaA* leader sequence by the Mfold algorithm (Zuker 2003) predicted that the segment between +61 and +107 adopts a discontinuous, "hairpin-like" secondary structure (two double-stranded regions separated by a single-stranded bubble), with the CsrA sites on the left (L) arm of the structure, and the 5' half of the putative *rut* sequence on the right (R) arm (Fig. 1C; Supplemental Fig. S2).

As a first step in this study, we sought to ascertain the presence of a Rho-dependent terminator in the 5' UTR of *pgaA* by *in vitro* transcription. We prepared a DNA template containing the 5' UTR and the proximal portion of the *pgaA* coding sequence fused to the strong promoter T7A1 (Fig. 2A). Transcription of this DNA template in the presence of purified Rho resulted in the formation of short transcripts (Fig. 2B, "term" bands) consistent with RNA release occurring in the distal portion of the 5' UTR, downstream from the sequence encoding the putative *rut* motif (Fig. 2A; Supplemental Fig. S3). This Rho-mediated transcription termination event, however, was dependent on ionic strength and was nearly abolished in the presence of 150 mM KCl (Fig. 2C, lane 4). The inhibitory effect of high KCl concentrations on Rho-dependent termination is not unprecedented (Zou and Richardson 1991) and may reflect suboptimal terminator features at high ionic strength due to, for instance, stabilization of competing RNA structures. Consistent with this idea, termination in the 5' UTR of *pgaA* was restored in the presence of NusG

Résultats

Figueroa-Bossi et al.

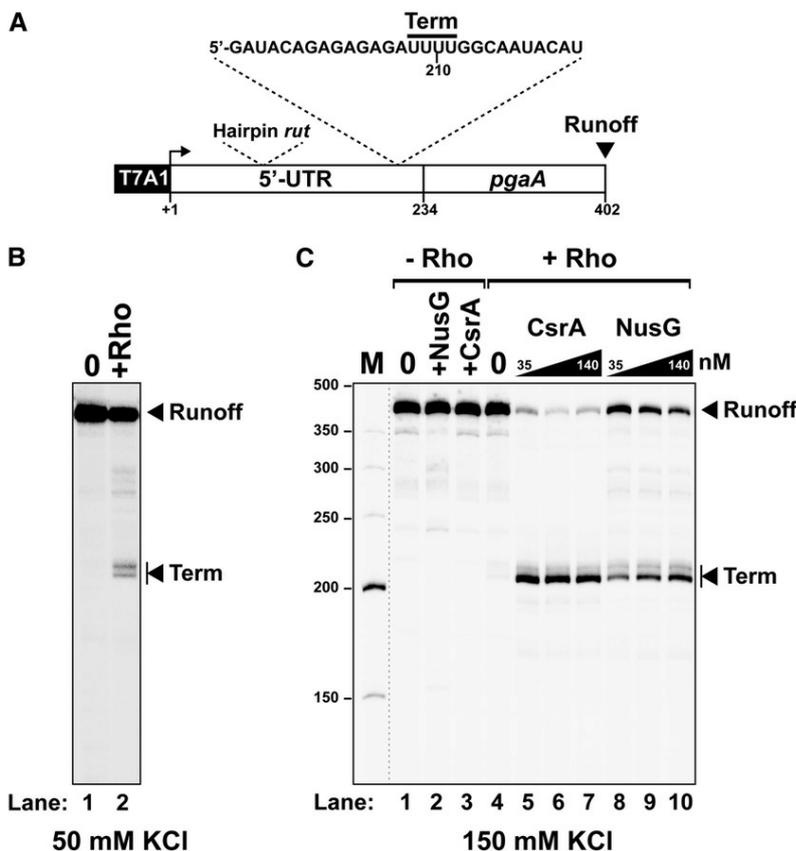


Figure 2. In vitro transcription termination at the Rho-dependent *pgaA* terminator. (A) Schematic representation of the DNA template used for the in vitro transcriptions. Key transcript features are also depicted above the template regions. (B,C) Representative gels show the formation of truncated transcripts resulting from Rho-dependent termination at the *pgaA* site under "low-salt" (50 mM KCl) transcription conditions (B) or after activation by the CsrA and NusG proteins under "high-salt" (150 mM KCl) conditions (C).

two unmarked deletion derivatives: one lacking the sequence corresponding to the left arm of the hairpin structure (segment 61–81), hereafter referred to as the ΔL deletion, and the other, lacking the right arm (segment 82–107), named ΔR . ΔL removes both 5'-proximal CsrA-binding sites, while ΔR removes approximately the 5' moiety of the *rut* region (Fig. 1B,C), including the presumptive McaS target sequence (Thomason et al. 2012), and was expected to inactivate the termination site. The effects of these alterations on *pgaA-lacZY* expression were analyzed in wild-type and various mutant backgrounds.

As shown in Figure 3A, the ΔR and ΔL deletions have opposite effects on the basal level of expression of the *pgaA-lacZY* fusion. ΔL causes the already low β -galactosidase activity to drop to nearly undetectable levels, whereas ΔR results in an ~ 10 -fold increase. LacZ activity is also increased in the presence of the *rho* and *nusG* mutations (12-fold and twofold, respectively), and this effect is amplified in the ΔL mutant (~ 60 -fold and fivefold). In contrast, the *rho* and *nusG* mutations have no significant effect on *pgaA-lacZY* expression in the ΔR mutant (Fig. 3A). These findings provide in vivo evidence for the involvement of Rho-dependent termination in *pgaA* regulation and tentatively identify the segment missing in the ΔR deletion as the site required for Rho action.

Deleting the *csrA* gene causes a much larger increase in β -galactosidase activity than either the ΔR or *rho* mutations (Fig. 3B, note the different scale). This is not surprising, as

transcripts that escape termination can be expected to remain subjected to translational repression by CsrA (Wang et al. 2005). Furthermore, CsrA down-regulates NhaR, a transcriptional activator of *pgaA* in *E. coli*, by binding to sites within its 5' UTR and inhibiting translation (Pannuri et al. 2012). Although *Salmonella* lacks the *pgaABCD* operon, it carries a close ortholog of the *nhaR* gene. Thus, removal of CsrA will have the additional effect of indirectly activating *pgaA* transcription (see below). Interestingly, the data in Figure 3B show that most of the "activating" effects of the $\Delta csrA$ allele are abolished in the ΔL variant. This epistasis can be interpreted to indicate that the sequence of the left arm of the putative hairpin works as a *cis*-acting anti-terminator element when not bound to CsrA.

In parallel with the above study, we tested our initial hypothesis that McaS might up-regulate *pgaA* by competing with Rho for binding to the *rut* site (see above). Results showed that the ΔR deletion, while removing the presumptive McaS target site (Supplemental Fig. S2), does not abolish the ability of McaS to up-regulate *pgaA-lacZY* (Supplemental Fig. S4). In contrast, up-regulation is lost in a $\Delta L \Delta csrA$ double mutant in spite of the fact that the McaS target sequence is still present in the mRNA (Supplemental Fig. S4). Thus, these data invalidate our hypothesis and suggest that McaS effects depend somehow on the presence of CsrA. In agreement with this conclusion, a report published while this study was under way showed CsrA

Résultats

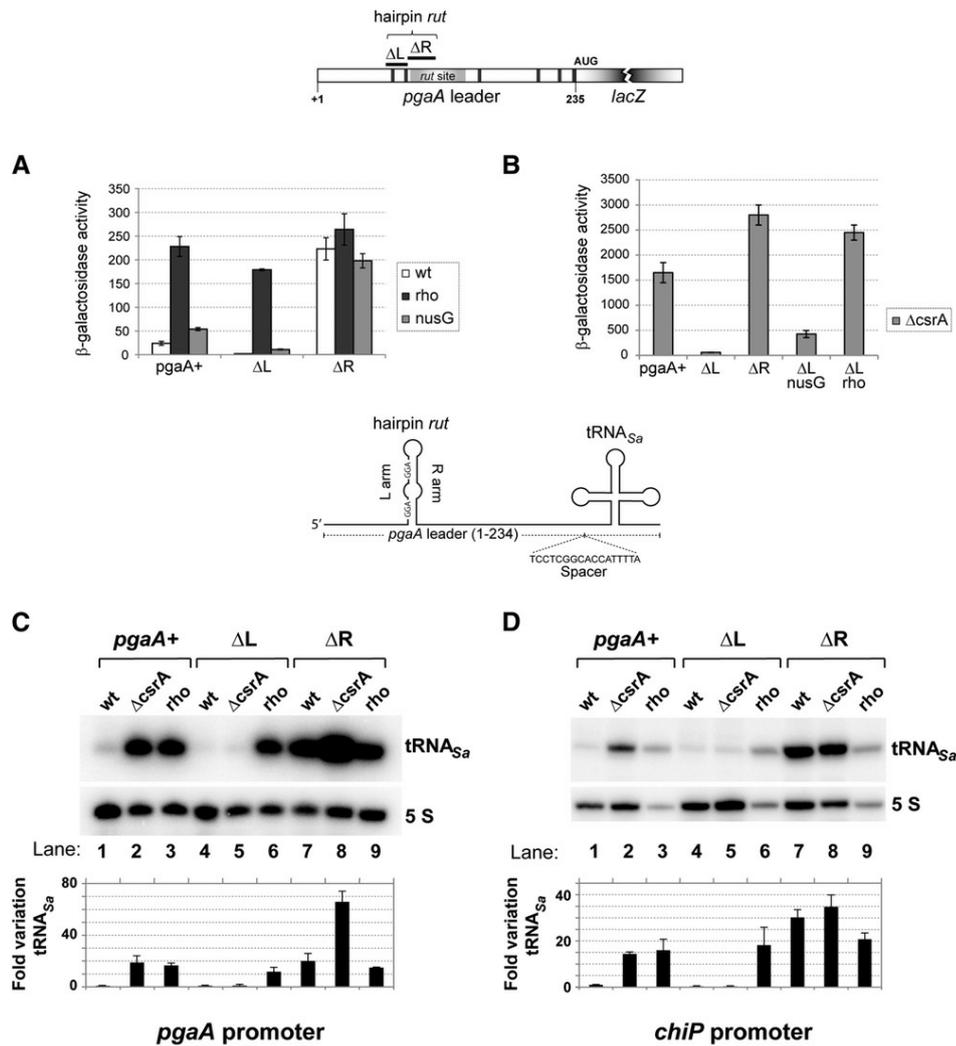


Figure 3. Effects of *cis*- and *trans*-acting mutations on expression of *pgaA*-reporter gene fusions. (A) Strains carrying the wild-type *pgaA-lacZ* fusion or its derivative, ΔL (Δ61–81, removing the two 5'-proximal CsrA-binding sites) or ΔR (Δ82–107, removing the upstream half of the *rut* site), alone or in combination with relevant unlinked mutations were assayed for β-galactosidase activity. Results show that impairing Rho-dependent termination by *rho* or *nusG* mutations (Rho Y80C and NusG 174fs) leads to increased *pgaA-lacZ* expression. The *pgaA* ΔR allele is epistatic to the *rho* and *nusG* mutations. This is what was expected if ΔR inactivates the *rut* site. (B) Effect of deleting the *csrA* gene. Removal of CsrA causes a generalized increase of *pgaA-lacZ* expression except in the *pgaA* ΔL derivative, suggesting that the sequence spanning the two upstream-most CsrA-binding sites (the L region) antagonizes termination in the absence of CsrA. (C,D) A 132-base-pair (bp) fragment encompassing a tRNA gene from *Staphylococcus aureus* was inserted at position +235 of *pgaA* in the context of the natural *pgaA* promoter (C) or in a construct in which the *pgaA* promoter is replaced by the *chiP* promoter (D). A 17-bp spacer separates the *pgaA* sequence from the beginning of the mature tRNA_{Sa} coding sequence. (C,D, lanes 2,3) Northern blot analysis shows that the *rho* Y80C mutation and the Δ*csrA* deletion cause tRNA_{Sa} levels to increase regardless of the promoter. ΔL prevents tRNA_{Sa} expression in the Δ*csrA* strains (C,D, lane 5) but not in the *rho* mutant (C,D, lane 6), confirming that the L sequence antagonizes termination when not bound to CsrA. (C,D, lane 7) ΔR stimulates tRNA_{Sa} production. Δ*csrA* further amplifies this increase in the *pgaA* promoter context (C, lane 8) but not in the *chiP* promoter context (D, lane 8). The latter finding was taken as an indication that CsrA exerts a separate inhibitory effect on the *pgaA* promoter (see the text). The tRNA_{Sa} signals were quantified by phosphorimaging and normalized to 5S ribosomal RNA, and the results were divided by the value measured in the wild-type strain. The bars represent the means from three (C) or two (D) independent experiments, including those shown above the histograms. Error bars denote standard deviation.

protein, and not *pgaA* RNA, to be the primary target of McaS interaction (Jorgensen et al. 2013).

To analyze the transcriptional component of *pgaA* regulation separately from CsrA-mediated translational repression, the *lacZ* coding portion of the *pgaA-lacZY*

fusions was replaced by a heterologous tRNA gene (tRNA_{Sa}) serving as a transcriptional reporter (Bossi et al. 2012). In the new fusion, the distal CsrA-binding site (overlapping the *pgaA*-initiating AUG codon) (Fig. 1B) was eliminated. Northern blot detection of the tRNA_{Sa} confirmed that

impairing Rho function by mutation or by the ΔR deletion causes a significant increase of readthrough transcription across the *pgaA* leader region, thus corroborating the Rho involvement (Fig. 3C). A sharp increase in tRNA_{Sa} levels is also observed in wild-type and ΔR backgrounds upon removal of the *csrA* gene (Fig. 3C). Two mechanisms could contribute to this increase: (1) relief of CsrA-induced transcription termination and (2) stimulation of *pgaA* transcription initiation by the derepressed NhaR activator (see above; Pannuri et al. 2012). The greater magnitude of the increase in the wild-type construct relative to the ΔR mutant (~20-fold and approximately threefold, respectively) suggests that CsrA-induced transcription termination is the primary cause of the shutoff of tRNA_{Sa} expression. To verify this conclusion, we sought to dissociate the promoter effects from the effects within the leader. To this end, new constructs were made with the *pgaA* leader sequence fused to a different promoter (the *chiP* promoter) (see the Materials and Methods), and the tRNA_{Sa} quantification analysis was repeated with the new strains. As shown in Figure 3D, removal of CsrA still causes tRNA_{Sa} levels to increase in the *pgaA*⁺ strain (cf. lanes 1 and 2). This provides compelling evidence that CsrA represses tRNA_{Sa} synthesis by inducing transcription termination within the *pgaA* leader. The pattern from the $\Delta L \Delta csrA$ double mutant in lane 5 of Figure 3D is consistent with this interpretation. As already observed with the corresponding *lacZ* fusion (Fig. 3A), this construct is locked in an OFF configuration, suggesting that the L arm sequence (Fig. 1C) stimulates readthrough transcription in the absence of CsrA. CsrA binding to this sequence could then be required to counter this effect and thus promote termination.

The data in Figure 3D also show that replacing the *pgaA* promoter with the *chiP* promoter abolishes the further increase of tRNA_{Sa} induced by $\Delta csrA$ in the ΔR strain (Fig. 3, cf. C [lanes 7,8] and D [lanes 7,8]). This confirms that CsrA also affects the activity of the *pgaA* promoter. To verify the NhaR involvement in these effects, an additional construct was made in which the *nhaR* 5' UTR is replaced by the *lacUV5* promoter and the short 5' UTR of *lacZ*. In the NhaR constitutive background, $\Delta csrA$ no longer caused tRNA_{Sa} expression to further increase in the ΔR variant (Supplemental Fig. S5), confirming that this effect results from the relief of *nhaR* repression by CsrA (Pannuri et al. 2012).

Structure-dependent regulation of the *pgaA* terminator

Altogether, the above data point to a key role of RNA structure shown in Figure 1C in the regulation of termination. One alternative possibility was considered in which CsrA regulated translation of a putative leader peptide initiating at nucleotide 78 of the 5' UTR. However, a mutation of the initiating AUG had no effect on *pgaA* expression (Supplemental Fig. S6, see legend for details). The hairpin-like conformation incorporates the 5' half of the *rut* sequence (Fig. 1C). One might expect that RNA folding will limit the accessibility of the sequence to Rho factor. CsrA binding to the L arm of the hairpin would expose the *rut* site and make it fully available for termination. This model

predicts that L arm mutations in the CsrA-binding sites will have opposite effects on *pgaA* regulation depending on whether they increase or decrease the stability of the structure. We proceeded to test the prediction by constructing double- and triple-base replacement mutants (depicted in Fig. 4A). These changes were introduced directly in the chromosome of a strain carrying the *pgaA-lacZY* fusion. The resulting strains were characterized by β -galactosidase assays (described below) and served as a source of template DNA for in vitro analyses. As part of the latter work, RNA transcripts from the upstream portion of the *pgaA* leader (interval +1 to +137) were used to measure CsrA-binding affinity by gel shift assay. This analysis offered an unforeseen yet convincing confirmation for the existence of a postulated secondary structure. We found that some of the *pgaA* leader mutations markedly affected RNA mobility in native gels (Fig. 4B). In particular, mutations predicted to destabilize the hairpin caused a sharp decrease in mobility. The effects could be readily rationalized considering that folding increases the compactness of the molecule, allowing it to migrate faster in the gel. Overall, the migration patterns (Fig. 4B) correlate remarkably well with the structural and free energy predictions from the Mfold program, suggesting that RNA mobility can be used to infer the presence/absence of such structure. For example, the data in Figure 4B indicate that under the conditions of the experiment, wild-type RNA adopts a folded configuration in spite of the imperfect nature of the hairpin structure.

The gel shift experiments provided insight as to the primary and secondary structural elements that contribute to CsrA binding. This analysis showed that the *d1* variant binds CsrA better than wild-type RNA in spite of being altered in the second CsrA-binding site (Fig. 4C). Apparently, reducing the stability of the upper portion of the hairpin structure is more important for CsrA binding than full conformity to the consensus sequence. Consistent with this conclusion, variant *s3*, which is unaffected in the CsrA-binding sites but is predicted to form a more stable hairpin, bound CsrA poorly. In contrast, primary sequence determinants appear critical in the bottom portion of the structure, as inferred from the finding that mutation *d2* nearly completely abolishes binding (Fig. 4C). Combined with the greater effect of mutation *s2* relative to mutation *s1* (note also dominance in the double mutant), these findings suggest that the CsrA-RNA interaction nucleates at the first CsrA-binding site in the bottom portion of the hairpin.

The effects of these changes on the in vivo regulation of the *pgaA-lacZY* fusion were quantified by measuring β -galactosidase activity. This analysis showed that the destabilizing changes lower *pgaA-lacZ* expression in both the *csrA*⁺ (Fig. 4D) and $\Delta csrA$ (Fig. 4E) backgrounds, as predicted if they relieve the CsrA requirement for termination. In contrast, changes that tighten the double-stranded regions of the hairpin show the opposite trend, increasing readthrough transcription. Finding that mutant *s3* is partially deattenuated in the *csrA*⁺ strain (Fig. 4D) despite its sequence changes lying outside the CsrA recognition sequence is consistent with the behavior of this mutant in the gel shift assay and reiterates the

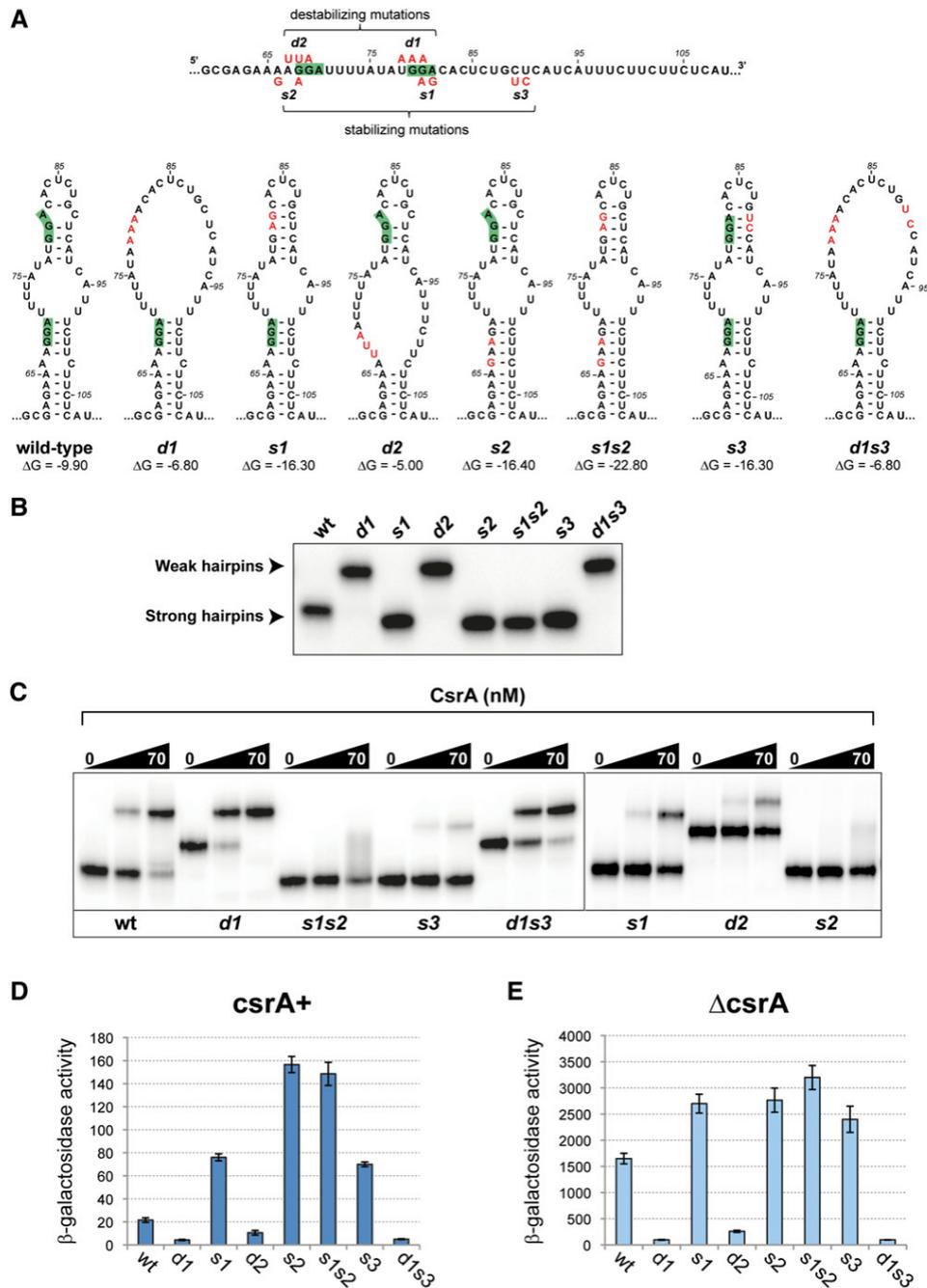


Figure 4. *pgaA* RNA hairpin mutants and their CsrA-binding properties. (A) Diagram showing the positions of the double- and triple-base changes introduced near the CsrA-binding sites in the upstream portion of the *pgaA* 5' UTR and the predicted effects of these changes on the RNA secondary structure. Drawings reproduce the outputs from the Mfold program (Zuker 2003). (B) Effect of hairpin mutations on RNA mobility in native gels. Changes predicted to increase RNA folding in A cause RNA to migrate faster in the gel, while changes predicted to decrease folding cause reduced electrophoretic mobility. (C) Gel retardation assay with purified CsrA. The sequence changes in the bottom portion of the RNA hairpin lower CsrA-binding affinity regardless of their effects on secondary structure. In contrast, the behavior of mutant *d1*, which binds CsrA better than wild-type RNA, suggests that secondary structure determinants are more important than primary structure determinants in the upper portion of the RNA hairpin. (D,E) Effect of RNA conformational changes on *pgaA-lacZ* expression. Strains carrying the *lacZ* fusion derivatives of *pgaA* hairpin mutants were assayed for β -galactosidase activity in *csrA*⁺ (D) and Δ *csrA* (E) backgrounds. Results show that mutations destabilizing the RNA structure inhibit *lacZ* expression regardless of the *csrA* allele. Apparently, these changes improve the accessibility of the *rut* site, rendering CsrA action dispensable. In contrast, stabilizing mutations promote anti-termination. The *s2* and *s1s2* variants show the highest levels of readthrough transcription in *csrA*⁺ but not in Δ *csrA*. This can be rationalized considering that *s2* and *s1s2* abolish CsrA binding completely, whereas all other variants have residual CsrA-binding affinity.

importance of single strandedness for CsrA binding. Also consistent with the reduced CsrA binding to the *s2* versus the *s1* leader (Fig. 4C) is the higher level of readthrough transcription in mutant *s2* relative to *s1* (Fig. 4D), which again suggests that the CsrA interaction with the bottom part of the hairpin initiates melting of the structure. Altogether, the results from this analysis suggest that the hairpin-like secondary structure formed by the 61- to 107-nt sequence is programmed to have borderline stability to facilitate the CsrA interaction and the rapid switch to the open conformation following CsrA binding.

To complement the above study, a representative from either side of the stability spectrum (*d1* and *s1s2*) was analyzed in the in vitro transcription system. The DNA templates that were used cover the entirety of the *pgaA* 5' UTR and extend a further 100 base pairs (bp) into the *lacZ* gene (Fig. 5A). Experiments performed under high-salt conditions (150 mM KCl) (Fig. 5B) confirmed that CsrA is needed to activate Rho-dependent termination at the wild-type *pgaA* sequence (Fig. 5B, cf. lanes 2 and 3). Remarkably consistent with the in vivo data, the CsrA requirement is completely relieved in the *d1* template (Fig. 5B, lanes 6,7), whereas CsrA loses the capability to activate Rho-dependent termination in the *s1s2* template (Fig. 5B, lanes 10,11). Similar observations were made under "low-salt" transcription conditions (50 mM KCl), with the predicted exception that CsrA was no longer needed to activate termination with the wild-type construct (Supplemental Fig. S7). These results confirm that the degree of stability of the hairpin motif ($\Delta G_{WT} = 9.9$ kcal/mol) is a critical factor for the control of the Rho-dependent *pgaA* terminator by CsrA.

Intriguingly, in vitro activation of the *pgaA* terminator by NusG appears to be affected by hairpin stability as well (Fig. 5C, cf. lanes 3, 6, and 9). NusG only slightly activates termination at the main sites with the "strong" *s1s2* hairpin construct (Fig. 5C, lane 9) while strongly activating termination at both the main sites and promoter-proximal sites with the "weak" *d1* hairpin construct (Fig. 5C, lane 6, note that band signals for short transcripts are inherently weaker due to fewer internal incorporations of [α - 32 P]-U residues). Again, the wild-type template shows an intermediate behavior, with both CsrA and NusG needed to activate promoter-proximal termination sites (Fig. 5B, lane 4). These data suggest that NusG somehow allows Rho to bypass the requirement for a fully single-stranded *rut* sequence even though the combined actions of both CsrA and NusG produce maximal termination efficiency (Fig. 5, cf. B [lanes 4,8,12] and C [lanes 3,6, 9]). The NusG involvement is consistent with the in vivo data showing a moderate but reproducible increase of transcriptional readthrough at the *pgaA* 5' UTR terminator in a *nusG* mutant (Fig. 3A,B) and with the significant overlap in the 3' end patterns of *pgaA* transcripts obtained from BCM-treated wild-type *E. coli* and a *nusG* mutant, as detected on tiling arrays (Peters et al. 2012).

Discussion

The classical mechanism for regulating gene expression through the activity of transcription termination factor

Rho involves the action of proteins that render the transcription elongation complex refractory to termination (anti-termination). Thus, the classical scenario (e.g., phage λ 's N protein) has termination as the default setting and anti-termination as the active step; furthermore, the regulatory target is RNA polymerase rather than Rho itself. The work described here uncovered an alternative mechanism for Rho-mediated gene regulation. In this mechanism, the active step consists of inducing termination at a *rut* site that is normally held invisible to Rho because it is part of a secondary structure. Termination results from the action of a protein, CsrA, that, upon binding to the 5' arm of the structure, exposes the *rut* sequence, making it available for Rho binding (Fig. 6). The mechanism relies on the exquisite fine-tuning of an RNA secondary structure: stable enough to hold the *rut* site hidden from Rho but sufficiently unstable to allow nucleation of the CsrA-RNA complex and the opening of the structure following CsrA binding. Also important to consider is that in order to induce Rho-dependent termination, CsrA must be able to bind the RNA while the latter is being synthesized and before RNA polymerase escapes the termination "window." Presumably, the fact that the secondary structure has not yet formed at this stage can favor the interaction. This might suggest that the 5'-proximal CsrA-binding site (the base of the hairpin stem) is the "seed" sequence. The greater effect of changes in this region on termination and CsrA binding further supports this conclusion. The extent to which other features in the region might contribute to CsrA binding and Rho-dependent termination remains to be explored. Elongation rates and interaction with RNA-binding proteins are viewed as major factors affecting cotranscriptional RNA folding (Pan and Sosnick 2006). The important role played in this study by elongation factor NusG—a protein thought to inhibit transcriptional pausing (Artsimovitch and Landick 2000) and have some RNA-binding capability (Steiner et al. 2002)—further supports the idea that cotranscriptional folding is a key component in the functioning of the *pgaA* attenuator structure.

Besides inducing Rho-dependent termination in the *pgaA* leader region, CsrA represses *pgaA* mRNA translation by binding to a pair of sites near the initiating AUG codon (Wang et al. 2005). The sequence layout is such that translational repression can operate only on transcripts that escape CsrA-induced termination. This raises the question of the biological role of such a redundancy, particularly since our data suggest that *pgaA* attenuation is sufficient to completely shut off *pgaA* mRNA synthesis. Perhaps the two forms of regulation target separate classes of molecules: attenuation mainly directed to nascent RNAs, and translational repression acting on transcripts that are already made at the time of the regulatory switching. This would ensure the rapidity and efficacy of *pgaA* silencing under conditions prompting bacteria to switch from the sessile to the planktonic lifestyle. Alternatively, the two-level regulation might be designed to do just the opposite; that is, make the transition more gradual. RNA footprint data from the initial analysis of the CsrA:*pgaA* mRNA interaction (Wang et al. 2005) suggest that CsrA binds the translation regulatory sites

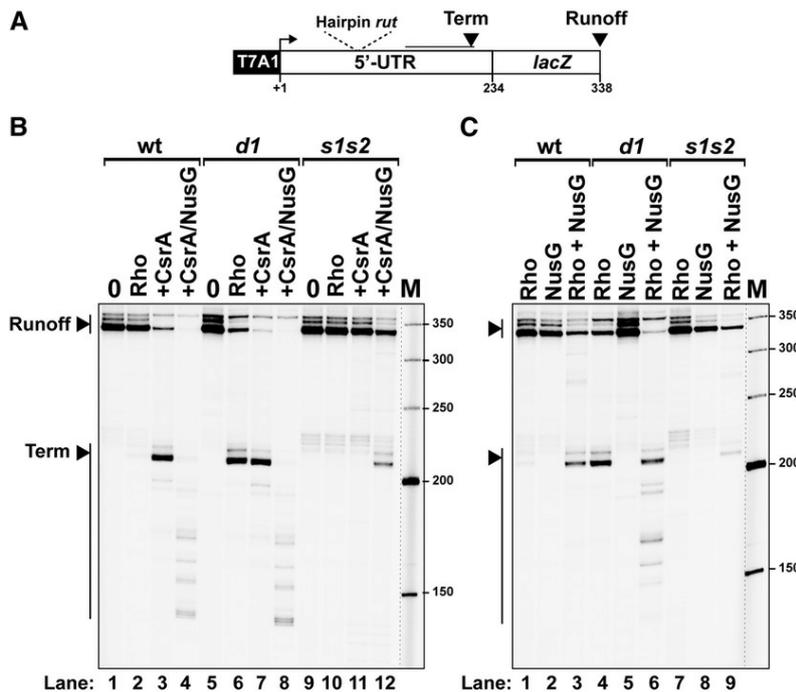


Figure 5. Effect of representative *pgaA* hairpin mutations (*d1* and *s1s2*) on the functioning of the Rho termination site in vitro. (A) Schematic representation of the DNA template used. (B,C) Representative gels show the activation of the terminator variants by CsrA (B) or NusG (C). Results show that *pgaA* hairpin mutation *d1*, expected to favor melting of the secondary structure (Fig. 4B), relieves the requirement of CsrA for in vitro termination by Rho. In contrast, the *s1s2* variant abolishes termination, and CsrA cannot restore it. Thus, these data closely parallel the results from the in vivo analysis (Fig. 4D). B (lanes 4,8,12) also shows that CsrA and NusG act synergistically to stimulate Rho-dependent termination.

with greater affinity than the 5'-proximal sites. Thus, one might envision that *pgaA* translational repression would start early on during a transition and that complete shutoff will occur only after CsrA has sufficiently accumulated.

A further possibility is that the double regulatory layer could have evolved to allow independent sensing of different environmental cues. For example, one could imagine that some physical stimuli or ligands could directly influence the ability of the *pgaA* terminator to switch from the closed to the open configuration so as to induce termination under conditions in which CsrA is still limiting. In other words, the *pgaA* terminator could have the properties of a bona fide riboswitch. A precedent for this type of dual regulation was recently set by the demonstration that the molybdenum cofactor-sensing riboswitch of the *moaA* gene of *E. coli* includes binding sites for CsrA, which activates *moaA* expression post-transcriptionally (Patterson-Fortin et al. 2013). Other recent findings have linked riboswitch function to Rho activity. In the *mgtA* and *ribB* genes, RNA conformational changes induced by the binding of Mg²⁺ and flavin mononucleotide, respectively, modulate the activity of Rho-dependent transcription terminators upstream of the structural portions of the genes (Hollands et al. 2012). A "conditional" Rho-dependent terminator is also found in the *chiPQ* operon; here, however, the terminator is embedded within a translated region and becomes active following the inhibition of *chiP* mRNA translation by a regulatory small RNA (Bossi et al. 2012). The present study provides the first example of a Rho-dependent terminator activated by a protein-induced RNA conformational rearrangement.

One might predict that other genes in the CsrA network will be found to be regulated by a mechanism similar to that described here. A survey of transcriptomic data in the literature reveals some overlaps between the lists of RNAs

copurified with CsrA in *E. coli* (Edwards et al. 2011) and transcripts found extended at their 3' ends in BCM-treated cells (Peters et al. 2012). However, our inspection and Mfold analysis of the sequences in the 5' regions of the shared RNAs failed to detect features reminiscent of the *pgaA* hairpin motif described here. The possibility remains that CsrA and Rho regulatory circuits are interconnected in a more elaborate way not immediately apparent through the above analysis. Moreover, it should be noted that *pgaA* is absent from the list of CsrA-bound transcripts (Edwards et al. 2011), suggesting that the list still has to be completed. Finally, the general nature and robustness of the attenuation mechanism described here suggest that structural remodeling of Rho-dependent signals may well occur in response to RNA binding by other regulatory proteins.

In terms of regulatory responses, transcription termination and anti-termination can be equated to repression and activation of initiation, respectively. A theory of gene regulation elaborated by Savageau in the late 1970s (Savageau 1977) and 1980s (Savageau 1989) posits that genes for which a high level of expression is most frequently required (high demand) will tend to be controlled in a positive manner (by activators or anti-terminators), whereas genes whose products are only required in specific instances (low demand) will be mainly controlled by negative regulatory elements (repressors or proterminators) (Savageau 1977). The theory interpreted classical patterns of gene regulation in *E. coli*, phage λ, and yeast. However, the lack of examples of regulatory proteins acting as transcription proterminators left the picture somewhat incomplete (Savageau 1989). The demonstration, presented here, that CsrA can perform such function allows completing the symmetry. Furthermore, since the requirement

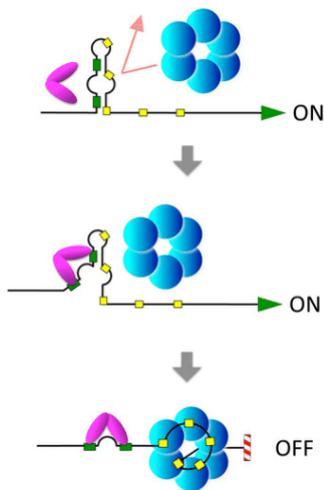


Figure 6. Model for CsrA-induced Rho-dependent transcription attenuation in the *pgaA* leader region. The initial portion of the *pgaA* 5' UTR folds into an imperfect hairpin-like structure that incorporates two CsrA-binding sites in the left arm (green boxes) and part of a Rho-binding site (*rut*) in the right arm (row of yellow boxes). The structure renders the *rut* site inaccessible to Rho but is sufficiently unstable to allow nucleation of a CsrA:RNA complex (presumably starting at the base of the hairpin). Thus, when CsrA is limiting, transcription reads through the terminator and proceeds into *pgaABCD* structural genes, whereas, in the presence of CsrA, formation of the CsrA:RNA complex unfolds the structure, exposing the *rut* site and causing premature transcription termination.

for the *pgaABCD* gene products may well represent a relatively infrequent (“low demand”) event in the lifestyle of most *E. coli* strains, our findings lend further support for Savageau’s model (Savageau 1989).

Materials and methods

Bacterial strains and culture conditions

Strains used in this study were all derived from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain MA3409, a derivative of strain LT2 cured for the Gifsy-1 prophage (Figuroa-Bossi et al. 1997). The genotypes of strains used are listed in Supplemental Table S1. Bacteria were cultured at 37°C in liquid LB broth (Bertani 2004) or LB broth solidified by the addition of 1.5% Difco agar. Antibiotics (Sigma-Aldrich) were included at the following final concentrations: 10 µg/mL chloramphenicol, 50 µg/mL kanamycin monosulphate, 100 µg/mL sodium ampicillin, 80 µg/mL spectinomycin dihydrochloride, and 25 µg/mL tetracycline hydrochloride. LB plates containing 40 µg/mL 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside (X-gal; from Sigma) or MacConkey agar plates containing 1% lactose (Macconkey 1905) were used to monitor *lacZ* expression in bacterial colonies. Liquid cultures were grown in New Brunswick gyratory shakers, and growth was monitored by measuring the optical density at 600 nm with a Shimadzu UV mini 1240 spectrophotometer.

Enzymes and chemicals

T4 polynucleotide kinase, T4 DNA ligase, Taq DNA polymerase, and restriction enzymes were purchased from New England

Biolabs. Pfu-Turbo DNA polymerase was from Stratagene. Sigma-saturated RNA polymerase from *E. coli* was obtained from Epicentre. DNA oligonucleotides were custom-synthesized by Sigma-Aldrich, Eurogentec, or Eurofins MWG/Operon. Most chemicals were purchased from Sigma-Aldrich. Acrylamide-bisacrylamide and other electrophoresis reagents were from Bio-Rad and Amresco. Agarose was from Invitrogen. Hybond-N⁺ membranes and hybridization buffer used for Northern blot analysis were from GE Healthcare and Applied Biosystems-Ambion, respectively. The rNTPs were from Promega, and the ³²P-NTPs were from PerkinElmer or Hartmann Analytic. ³²P-labeled nucleic acids were detected by phosphorimaging using ImageQuant software.

Genetic techniques

Generalized transduction was performed using the high-frequency transducing mutant of phage P22, HT 105/1 *int-201* (Schmieger 1972), as described (Lemire et al. 2011). Chromosomal engineering (recombineering) was carried out by the λ *red* recombination method (Datsenko and Wanner 2000; Murphy et al. 2000; Yu et al. 2000), implemented as in Datsenko and Wanner (2000). “Scarless” recombineering was performed as described (Bossi et al. 2012). Donor DNA fragments were generated by PCR using plasmid DNA, chromosomal DNA, or DNA oligonucleotides as templates. Amplified fragments were electroporated into appropriate strains harboring the conditionally replicating plasmid pKD46, which carries the λ *red* operon under the control of the P^{BAD} promoter (Datsenko and Wanner 2000). Bacteria carrying pKD46 were grown at 30°C in the presence of ampicillin and exposed to 10 mM arabinose for 3 h prior to preparation of electrocompetent cells. Electroporation was carried out using a Bio-Rad MicroPulser under the conditions specified by the manufacturer. Recombinant colonies were selected on LB plates containing the appropriate antibiotic. Constructs were verified by PCR and DNA sequence analysis (performed by GATC Company). The complete list of primers used in this study are in Supplemental Table S2, and details on the construction of several alleles are in Supplemental Table S3.

Construction of relevant alleles

pgaA-lacZY Two constructs were made that convert a chromosomal *chiP-lacZY* gene fusion (Figuroa-Bossi et al. 2009) into a *pgaA-lacYZ* fusion. In the first construct, a DNA fragment spanning the portion of the *pgaABCD* operon from –124 to +234 (amplified from *E. coli* strain MG1655 with primers ppL56 and ppL59) (Supplemental Table S2) was used to replace the region between –253 and +89 of the *chiP* gene (spanning the transcription regulatory region and the 5' UTR) (Plumbridge et al. 2014). This yielded strain MA11469. In the second construct, the exchanged segment covers only the 5' UTR of *chiP* (from +1 to +89), replaced by the *pgaA* segment from +1 to +234 (amplified with primers ppL57 and ppL59); thus, the fusion is transcribed from the *chiP* promoter (strain MA11470). In both constructs, the *lacZ*-initiating AUG falls at the exact same position normally occupied by *pgaA* AUG. Derivatives of MA11469 and/or MA11470 used in this study include strains carrying (1) tRNA_{sa} gene fusions in place of *lacZ*, (2) deletions in relevant portions of the *pgaA* 5' UTR (Δ L and Δ R), and (3) point mutations affecting the hairpin structure in the 5' UTR (see below).

pgaA hairpin mutants Short DNA fragments (typically ~100 bp) containing the desired mutations were obtained by annealing suitably designed, partially complementary DNA oligonucleotides and filling in the single-stranded regions by PCR under standard

amplification conditions (“reciprocal priming”). DNA fragments were introduced into a strain MA11469 derivative, a *tetRA* insertion in the *pgaA* leader (Supplemental Tables S1, S3), and tetracycline-sensitive recombinants were selected for resistance to fusaric acid (Bochner et al. 1980).

$\Delta csrA::cat$ A deletion removing nearly the entirety of the *Salmonella csrA* coding sequence (167 out of 183 bp) was obtained by replacing this region with the FRT-*cat*-FRT module of plasmid pKD3 (Datsenko and Wanner 2000), amplified with primers ppM17 and ppM18 (Supplemental Table S2). As previously reported (Altier et al. 2000), we found the *csrA* deletion to severely affect growth. A deletion of *glgCAP* operon, reported to suppress this growth defect (Timmermans and Van Melderen 2009), failed to restore normal growth. However, suppressors of the growth defect arose spontaneously at high frequency (Altier et al. 2000). Introduction of the *pgaA-lacZ* fusion in four independent fast-growing isolates showed all four of them to express high levels of β -galactosidase activity. However, when the $\Delta csrA::cat$ allele was replaced by wild-type *csrA*, *pgaA-lacZ* expression returned to normally repressed levels in all four strains, indicating that the defect in *pgaA* regulation is entirely ascribable to the loss of CsrA activity. One of the $\Delta csrA::cat$ *sup* strains (MA11529) was used throughout this study.

$\Delta[nhaA-nhaR']::aph^P^{lac-nhaR}$ A DNA fragment carrying the *aph* (KanR) gene and a *lacUV5* promoter was amplified from plasmid pNFB20, with primers ppP23 and ppP24 (Supplemental Table S2) used to replace the region encompassing the *nhaA* gene and the 5' UTR of the adjacent *nhaR* gene in the *Salmonella* chromosome by λ *red* recombination (Supplemental Table S3). In the strain obtained (MA11914), the *nhaR* gene is expressed from the *lacUV5* promoter and is no longer sensitive to translational repression by CsrA (Pannuri et al. 2012). Plasmid pNFB20 is an oriR6K plasmid carrying the *aph* gene and *lacUV5* side by side in parallel orientation.

Construction of plasmid pBR-*mcaS*

Recombinant plasmid pBR-*mcaS*, which carries the *mcaS* gene under the control of the *lac* promoter, was constructed by cloning a DNA fragment amplified from *E. coli* strain MG1655 (with primers ppL67 and ppL68) into plasmid pBR-plac (Guillier and Gottesman 2006) as described by Thomason et al. (2012).

Measurement of β -galactosidase activity

β -Galactosidase activity was assayed in toluene-permeabilized cells as described (Miller 1992) and is expressed in Miller units throughout this study. Typically, measurements were performed on duplicate or triplicate cultures grown in late exponential phase ($OD_{600} \approx 0.7$). All experiments included parental or reference strains as normalization controls. Standard deviations were generally <5% of the mean.

RNA extraction and Northern analysis

RNA was prepared by the acid hot phenol method from exponentially growing cells (OD_{600} of 0.35) as previously described (Bossi and Figueroa-Bossi 2007). RNA was fractionated on an 8% polyacrylamide/8 M urea gel and transferred to Hybond-N⁺ membranes. Blots were hybridized to DNA oligonucleotides ppJ62 and ppB10, complementary to *Staphylococcus aureus* tRNA^{Arg} and *Salmonella* 5S ribosomal RNA, respectively (Supplemental Table S2), labeled at the 5' ends with T4 polynucleotide kinase. Hybridization patterns were analyzed by phos-

phorimaging, and RNA bands were quantified using the ImageQuant program.

Preparation of proteins

Plasmid pEt28b-CsrA, encoding CsrA fused to a C-terminal His6 tag, was obtained by inserting phosphorylated oligonucleotides CsrA1 to CsrA3 (annealed to complementary oligonucleotides CsrA4 to CsrA6) (Supplemental Table S2) between the NcoI and XhoI sites of plasmid pET28b (EMD Millipore) in a “one-pot” ligation reaction. CsrA protein was overexpressed in BL21(DE3):pEt28b-CsrA and purified by affinity chromatography on HisPur cobalt resin (Thermo Scientific) following a protocol similar to that previously described (Liu and Romeo 1997). Recombinant Rho and NusG proteins were overexpressed and purified as described previously (Rabhi et al. 2011). Concentrations of active oligomeric forms (Rho hexamers, CsrA dimers, and NusG monomers) are indicated throughout the article.

In vitro transcription termination experiments

DNA templates were prepared by standard PCR amplification of genomic DNA using forward primer *pgaA1*, which contains the sequence of the T7A1 promoter fused to the 31-nt upstream segment of the *pgaA* leader sequence, and reverse primer *pgaA2* (Fig. 2A) or *pgaA6* (Fig. 5A). Standard transcription termination experiments were performed as described previously (Rabhi et al. 2011), with minor modifications. Briefly, 18- μ L mixtures containing the DNA templates (5 nM final concentration), 20 nM RNA polymerase, 0 or 70 nM Rho, 0.2 U/ μ L SUPERase-In (Ambion), 0 or 70 nM CsrA (unless indicated otherwise), and 0 or 140 nM NusG (unless indicated otherwise) in transcription buffer (40 mM Tris-HCl at pH 8.0, 50 or 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1.5 mM DTT) were preincubated for 10 min at 37°C. Next, 2 μ L of transcription initiation mix (2 mM ATP, GTP, and CTP; 0.2 mM UTP; 2.5 μ Ci/ μ L [a-³²P]-UTP; 250 μ g/mL rifampicin in transcription buffer) was added before incubation for 20 min at 37°C. Transcription reactions were stopped with 4 μ L of 0.5 M EDTA and 2 μ L of 0.25 mg/mL tRNA before extraction with a 5:24:1 phenol:chloroform:isoamyl alcohol mix and precipitation with ethanol. Reaction pellets were dissolved in denaturing loading buffer (95% formamide, 15 mM EDTA) and analyzed by denaturing 6% polyacrylamide gel electrophoresis. RNA release at the *pgaA* terminator was also monitored in single-round “chase” transcription experiments with bead-affixed transcription elongation complexes, as detailed in the Supplemental Material.

Electrophoretic mobility assays

RNA transcripts corresponding to the 1–137 region of the *pgaA* leader (including wild-type or mutant hairpin variants) were prepared by standard in vitro transcription with T7 RNA polymerase and PCR-generated DNA templates. Transcripts were purified by denaturing PAGE and stored at –20°C in ME buffer (10 mM MOPS at pH 6.5, 1 mM EDTA). Transcripts were dephosphorylated in small batches (~10 pmol) with alkaline phosphatase (Roche Applied Science) before being labeled with [³²P]-g-ATP and T4 polynucleotide kinase and subsequently purified by 7% denaturing PAGE. Concentrations of transcripts were determined from their absorptions at 260 nm using a Nanodrop spectrophotometer. For electrophoretic mobility assays, the ³²P-labeled transcripts (0.1 nM final concentration) were incubated for 20 min at 30°C in EMSA buffer (40 mM Tris-HCl at pH 8.0, 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.2 mM DTT, 50 μ g/mL BSA, 30 μ g/mL tRNA, 2% glycerol) in the presence or absence of CsrA protein (final concentrations are

indicated in the figures). The mixtures were then mixed with Ficoll-400 (4%, final concentration) and analyzed by 6% native PAGE. Gels were run at 10 V/cm for 5 h at 19°C.

Acknowledgments

We thank Damien Le Minoux for help in strain construction during the late stages of this work, and Emilie Soares for the preparation of materials used in *in vitro* experiments. We are grateful to Maude Guillier (IBPC, CNRS, Paris) for the gift of plasmid pBR-*plac*. This work was supported by CNRS core funding and grants from the French Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-BSV3-0005-01 to N.F.-B., and ANR-13-BSV3-0005-02 to M.B.).

References

Alifano P, Rivellini F, Limauro D, Bruni CB, Carlomagno MS. 1991. A consensus motif common to all Rho-dependent prokaryotic transcription terminators. *Cell* **64**: 553–563.

Altier C, Suyemoto M, Lawhon SD. 2000. Regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion genes by *csrA*. *Infect Immun* **68**: 6790–6797.

Artsimovitch I, Landick R. 2000. Pausing by bacterial RNA polymerase is mediated by mechanistically distinct classes of signals. *Proc Natl Acad Sci* **97**: 7090–7095.

Babitzke P, Romeo T. 2007. CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. *Curr Opin Microbiol* **10**: 156–163.

Bertani G. 2004. Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. *J Bacteriol* **186**: 595–600.

Bochner BR, Huang HC, Schieven GL, Ames BN. 1980. Positive selection for loss of tetracycline resistance. *J Bacteriol* **143**: 926–933.

Bossi L, Figueroa-Bossi N. 2007. A small RNA downregulates LamB maltoporin in *Salmonella*. *Mol Microbiol* **65**: 799–810.

Bossi L, Schwartz A, Guillemardet B, Boudvillain M, Figueroa-Bossi N. 2012. A role for Rho-dependent polarity in gene regulation by a noncoding small RNA. *Genes Dev* **26**: 1864–1873.

Boudvillain M, Figueroa-Bossi N, Bossi L. 2013. Terminator still moving forward: expanding roles for Rho factor. *Curr Opin Microbiol* **16**: 118–124.

Burns CM, Richardson JP. 1995. NusG is required to overcome a kinetic limitation to Rho function at an intragenic terminator. *Proc Natl Acad Sci* **92**: 4738–4742.

Chalissery J, Banerjee S, Bandey I, Sen R. 2007. Transcription termination defective mutants of Rho: role of different functions of Rho in releasing RNA from the elongation complex. *J Mol Biol* **371**: 855–872.

Chatterjee A, Cui Y, Liu Y, Dumenyo CK, Chatterjee AK. 1995. Inactivation of *rsmA* leads to overproduction of extracellular pectinases, cellulases, and proteases in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in the absence of the starvation/cell density-sensing signal, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone. *Appl Environ Microbiol* **61**: 1959–1967.

Chavez RG, Alvarez AF, Romeo T, Georgellis D. 2010. The physiological stimulus for the BarA sensor kinase. *J Bacteriol* **192**: 2009–2012.

Cui Y, Chatterjee A, Liu Y, Dumenyo CK, Chatterjee AK. 1995. Identification of a global repressor gene, *rsmA*, of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* that controls extracellular enzymes, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone, and pathogenicity in soft-rotting *Erwinia* spp. *J Bacteriol* **177**: 5108–5115.

Datsenko KA, Wanner BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci* **97**: 6640–6645.

Dubey AK, Baker CS, Romeo T, Babitzke P. 2005. RNA sequence and secondary structure participate in high-affinity CsrA–RNA interaction. *RNA* **11**: 1579–1587.

Edwards AN, Patterson-Fortin LM, Vakulskas CA, Mercante JW, Potrykus K, Vinella D, Camacho MI, Fields JA, Thompson SA, Georgellis D, et al. 2011. Circuitry linking the Csr and stringent response global regulatory systems. *Mol Microbiol* **80**: 1561–1580.

Figueroa-Bossi N, Coissac E, Netter P, Bossi L. 1997. Unsuspected prophage-like elements in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **25**: 161–173.

Figueroa-Bossi N, Valentini M, Malleret L, Fiorini F, Bossi L. 2009. Caught at its own game: regulatory small RNA inactivated by an inducible transcript mimicking its target. *Genes Dev* **23**: 2004–2015.

Gudapaty S, Suzuki K, Wang X, Babitzke P, Romeo T. 2001. Regulatory interactions of Csr components: the RNA binding protein CsrA activates *csrB* transcription in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**: 6017–6027.

Guillier M, Gottesman S. 2006. Remodelling of the *Escherichia coli* outer membrane by two small regulatory RNAs. *Mol Microbiol* **59**: 231–247.

Hollands K, Proshkin S, Sklyarova S, Epshtein V, Mironov A, Nudler E, Groisman EA. 2012. Riboswitch control of Rho-dependent transcription termination. *Proc Natl Acad Sci* **109**: 5376–5381.

Itoh Y, Rice JD, Goller C, Pannuri A, Taylor J, Meisner J, Beveridge TJ, Preston JF 3rd, Romeo T. 2008. Roles of *pgaABCD* genes in synthesis, modification, and export of the *Escherichia coli* biofilm adhesin poly-β-1,6-N-acetyl-D-glucosamine. *J Bacteriol* **190**: 3670–3680.

Jackson DW, Suzuki K, Oakford L, Simecka JW, Hart ME, Romeo T. 2002. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**: 290–301.

Jorgensen MG, Thomason MK, Havelund J, Valentin-Hansen P, Storz G. 2013. Dual function of the McaS small RNA in controlling biofilm formation. *Genes Dev* **27**: 1132–1145.

Lapouge K, Sineva E, Lindell M, Starke K, Baker CS, Babitzke P, Haas D. 2007. Mechanism of *hcnA* mRNA recognition in the Gac/Rsm signal transduction pathway of *Pseudomonas fluorescens*. *Mol Microbiol* **66**: 341–356.

Lapouge K, Schubert M, Allain FH, Haas D. 2008. Gac/Rsm signal transduction pathway of γ-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Mol Microbiol* **67**: 241–253.

Lawhon SD, Frye JG, Suyemoto M, Porwollik S, McClelland M, Altier C. 2003. Global regulation by CsrA in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **48**: 1633–1645.

Lemire S, Figueroa-Bossi N, Bossi L. 2011. Bacteriophage cross-talk: coordination of prophage induction by *trans*-acting antirepressors. *PLoS Genet* **7**: e1002149.

Lenz DH, Miller MB, Zhu J, Kulkarni RV, Bassler BL. 2005. CsrA and three redundant small RNAs regulate quorum sensing in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* **58**: 1186–1202.

Liu MY, Romeo T. 1997. The global regulator CsrA of *Escherichia coli* is a specific mRNA-binding protein. *J Bacteriol* **179**: 4639–4642.

Maconkey A. 1905. Lactose-fermenting bacteria in faeces. *J Hyg (Lond)* **5**: 333–379.

Martinez LC, Yakhnin H, Camacho MI, Georgellis D, Babitzke P, Puente JL, Bustamante VH. 2011. Integration of a complex regulatory cascade involving the SirA/BarA and Csr global regulatory systems that controls expression of the *Salmonella* SPI-1 and SPI-2 virulence regulons through HilD. *Mol Microbiol* **80**: 1637–1656.

- Mercante J, Edwards AN, Dubey AK, Babitzke P, Romeo T. 2009. Molecular geometry of CsrA (RsmA) binding to RNA and its implications for regulated expression. *J Mol Biol* **392**: 511–528.
- Miller JH. 1992. *A short course in bacterial genetics. a laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Mooney RA, Schweimer K, Rosch P, Gottesman M, Landick R. 2009. Two structurally independent domains of *E. coli* NusG create regulatory plasticity via distinct interactions with RNA polymerase and regulators. *J Mol Biol* **391**: 341–358.
- Murphy KC, Campellone KG, Poteete AR. 2000. PCR-mediated gene replacement in *Escherichia coli*. *Gene* **246**: 321–330.
- Pan T, Sosnick T. 2006. RNA folding during transcription. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **35**: 161–175.
- Pannuri A, Yakhnin H, Vakulskas CA, Edwards AN, Babitzke P, Romeo T. 2012. Translational repression of NhaR, a novel pathway for multi-tier regulation of biofilm circuitry by CsrA. *J Bacteriol* **194**: 79–89.
- Patterson-Fortin LM, Vakulskas CA, Yakhnin H, Babitzke P, Romeo T. 2013. Dual posttranscriptional regulation via a co-factor-responsive mRNA leader. *J Mol Biol* **425**: 3662–3677.
- Pessi G, Williams F, Hindle Z, Heurlier K, Holden MT, Camara M, Haas D, Williams P. 2001. The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and N-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **183**: 6676–6683.
- Peters JM, Mooney RA, Grass JA, Jessen ED, Tran F, Landick R. 2012. Rho and NusG suppress pervasive antisense transcription in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **26**: 2621–2633.
- Plumbridge J, Bossi L, Oberto J, Wade JT, Figueroa-Bossi N. 2014. Interplay of transcriptional and small RNA-dependent control mechanisms regulates chitosugar uptake in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Mol Microbiol* doi: 10.1111/mmi.12573.
- Rabhi M, Espeli O, Schwartz A, Cayrol B, Rahmouni AR, Arluison V, Boudvillain M. 2011. The Sm-like RNA chaperone Hfq mediates transcription antitermination at Rho-dependent terminators. *EMBO J* **30**: 2805–2816.
- Romeo T, Gong M, Liu MY, Brun-Zinkernagel AM. 1993. Identification and molecular characterization of *csrA*, a pleiotropic gene from *Escherichia coli* that affects glycogen biosynthesis, gluconeogenesis, cell size, and surface properties. *J Bacteriol* **175**: 4744–4755.
- Romeo T, Vakulskas CA, Babitzke P. 2013. Post-transcriptional regulation on a global scale: form and function of Csr/Rsm systems. *Environ Microbiol* **15**: 313–324.
- Savageau MA. 1977. Design of molecular control mechanisms and the demand for gene expression. *Proc Natl Acad Sci* **74**: 5647–5651.
- Savageau MA. 1989. Are there rules governing patterns of gene regulation? In *Theoretical biology—epigenetic and evolutionary order from complex systems* (ed. Goodwin BC, Saunders PT), pp. 42–66. Edinburgh University Press, Edinburgh.
- Schmieger H. 1972. Phage P22-mutants with increased or decreased transduction abilities. *Mol Gen Genet* **119**: 75–88.
- Schubert M, Lapouge K, Duss O, Oberstrass FC, Jelesarov I, Haas D, Allain FH. 2007. Molecular basis of messenger RNA recognition by the specific bacterial repressing clamp RsmA/CsrA. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 807–813.
- Steiner T, Kaiser JT, Marinkovic S, Huber R, Wahl MC. 2002. Crystal structures of transcription factor NusG in light of its nucleic acid- and protein-binding activities. *EMBO J* **21**: 4641–4653.
- Sterzenbach T, Nguyen KT, Nuccio SP, Winter MG, Vakulskas CA, Clegg S, Romeo T, Baumler AJ. 2013. A novel CsrA titration mechanism regulates fimbrial gene expression in *Salmonella typhimurium*. *EMBO J* **32**: 2872–2883.
- Suzuki K, Wang X, Weillbacher T, Pernestig AK, Melefors O, Georgellis D, Babitzke P, Romeo T. 2002. Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**: 5130–5140.
- Takeuchi K, Kiefer P, Reimann C, Keel C, Dubuis C, Rolli J, Vorholt JA, Haas D. 2009. Small RNA-dependent expression of secondary metabolism is controlled by Krebs cycle function in *Pseudomonas fluorescens*. *J Biol Chem* **284**: 34976–34985.
- Thomason MK, Fontaine F, De Lay N, Storz G. 2012. A small RNA that regulates motility and biofilm formation in response to changes in nutrient availability in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **84**: 17–35.
- Timmermans J, Van Melderen L. 2009. Conditional essentiality of the *csrA* gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **191**: 1722–1724.
- Wang X, Dubey AK, Suzuki K, Baker CS, Babitzke P, Romeo T. 2005. CsrA post-transcriptionally represses *pgaABCD*, responsible for synthesis of a biofilm polysaccharide adhesin of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **56**: 1648–1663.
- Yakhnin H, Baker CS, Berezin I, Evangelista MA, Rassin A, Romeo T, Babitzke P. 2011. CsrA represses translation of *sdiA*, which encodes the N-acylhomoserine-L-lactone receptor of *Escherichia coli*, by binding exclusively within the coding region of *sdiA* mRNA. *J Bacteriol* **193**: 6162–6170.
- Yakhnin AV, Baker CS, Vakulskas CA, Yakhnin H, Berezin I, Romeo T, Babitzke P. 2013. CsrA activates *flhDC* expression by protecting *flhDC* mRNA from RNase E-mediated cleavage. *Mol Microbiol* **87**: 851–866.
- Yu D, Ellis HM, Lee EC, Jenkins NA, Copeland NG, Court DL. 2000. An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* **97**: 5978–5983.
- Zou LL, Richardson JP. 1991. Enhancement of transcription termination factor *rho* activity with potassium glutamate. *J Biol Chem* **266**: 10201–10209.
- Zuker M. 2003. Mfold Web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* **31**: 3406–3415.

RNA remodeling by bacterial global regulator CsrA promotes Rho-dependent transcription termination

Nara Figueroa-Bossi¹, Annie Schwartz², Benoit Guillemardet¹, François D'Heygère²,
Lionello Bossi^{1,3} and Marc Boudvillain^{2,3}

¹Centre de Génétique Moléculaire, CNRS UPR3404, Gif-sur-Yvette 91198, France, affilié à l'Université Paris Sud XI, Orsay 91405, France; ²Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR4301, Orléans 45071, France, affilié à l'Université d'Orléans, Orléans 45100, France

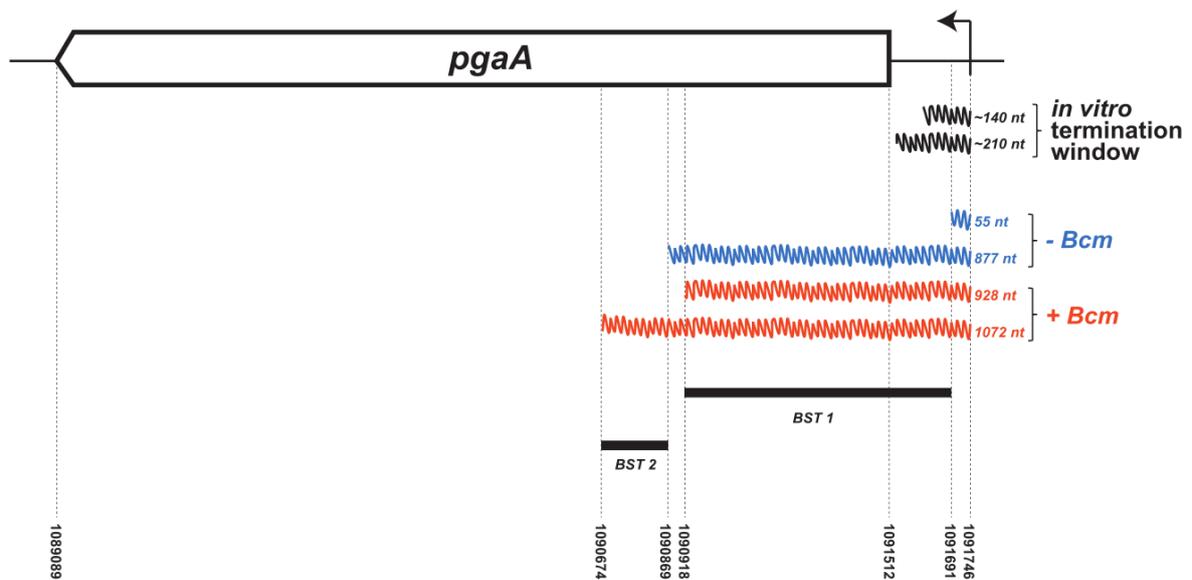
³Corresponding authors

Email bossi@cgm.cnrs-gif.fr

Email marc.boudvillain@cnrs-orleans.fr

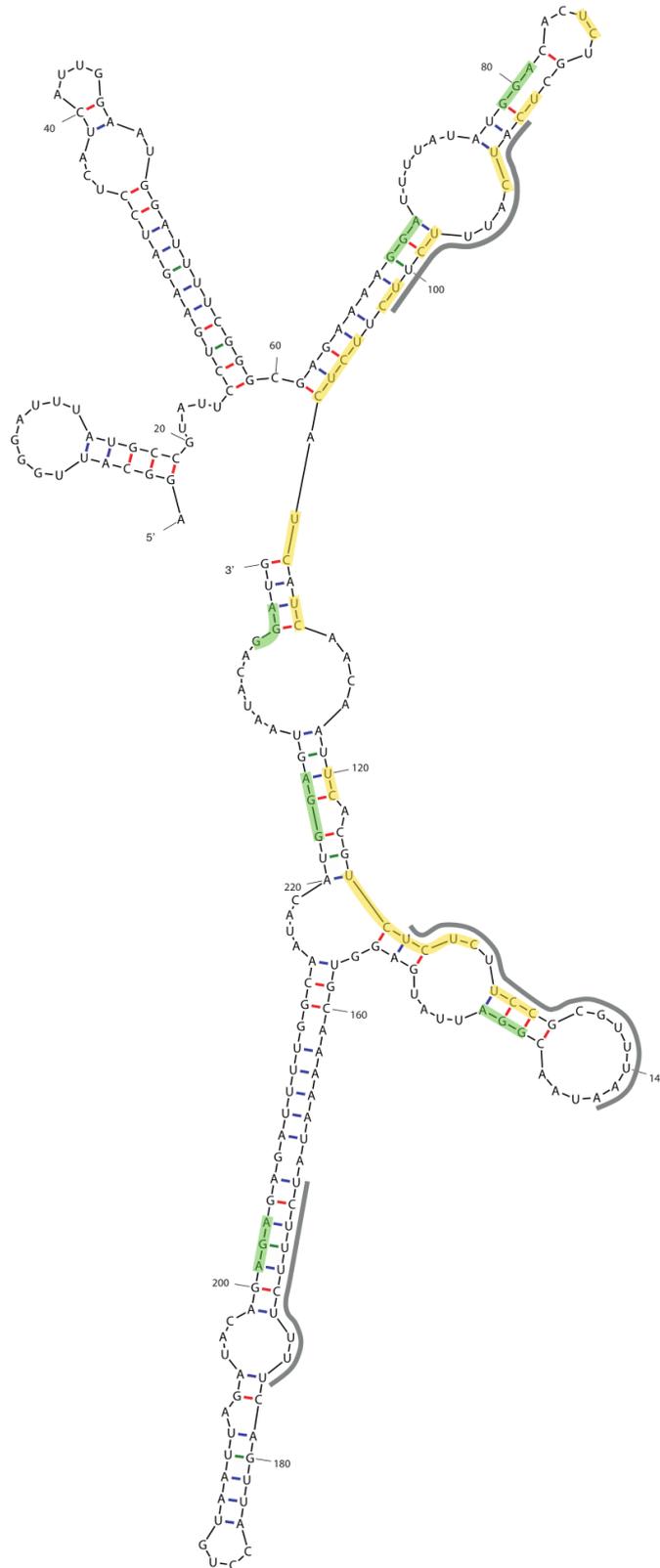
SUPPLEMENTAL MATERIAL

Résultats

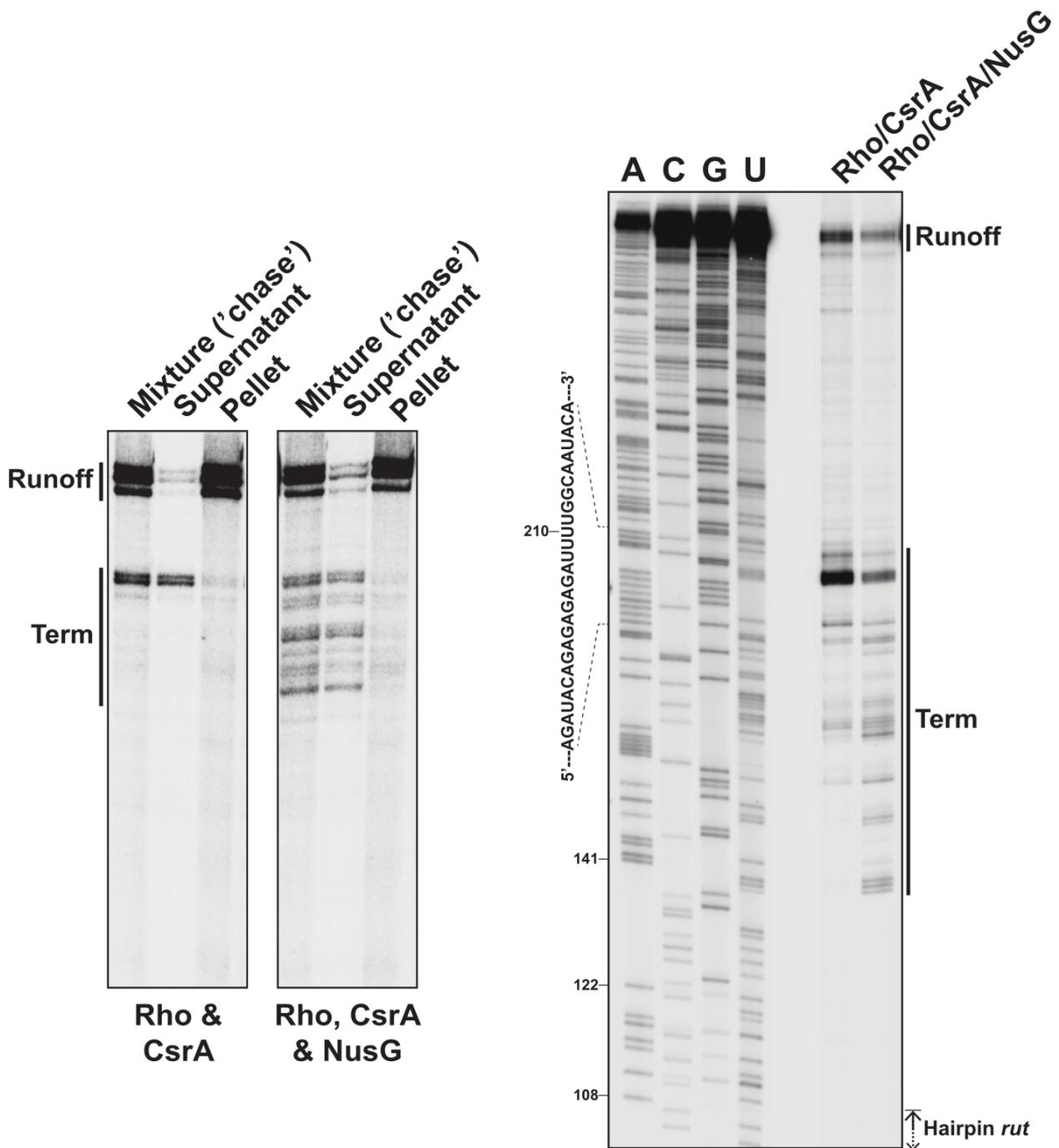


Supplemental Figure S1. Scale diagram of the *pgaA* gene and transcripts formed *in vivo* in absence (-Bcm, in blue) or presence (+Bcm, in red) of the Rho-inhibiting drug bicyclomycin (Peters et al. 2012). The shortest and longest *pgaA* transcripts released *in vitro* upon the action of Rho (termination window, in black) are also depicted for comparison (see text and Supplemental Figure S3 for details). Black lines delineate Bicyclomycin Significant Transcript (BST) regions as defined in Peters et al. 2012. Note that the *pgaABCD* operon is located on the minus strand of the *E. coli* genome.

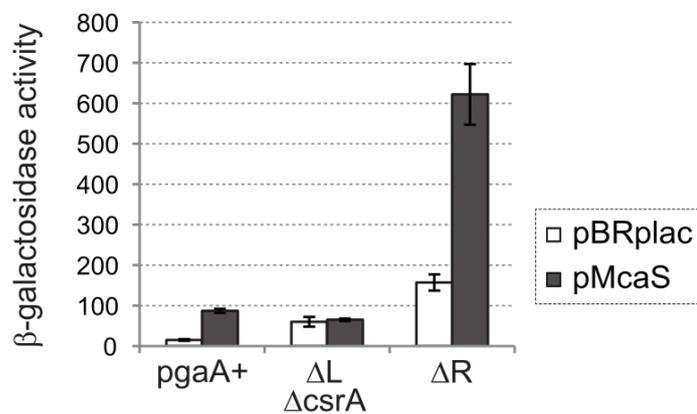
Résultats



Supplemental Figure S2. Secondary structure of the *pgaA* leader mRNA as predicted by the *Mfold* algorithm (Zuker 2003). Components of the putative *rut* site and CsrA binding sites are highlighted in yellow and green, respectively. The presumptive McaS target sites are indicated by grey lines. The positions of the CsrA binding sites (core motifs) and McaS target sites are from (Wang et al. 2005; Thomason et al. 2012), respectively. We retrieved this *pgaA* leader sequence in more than fifty *E. coli* genomes (100% identity) from GenBank, suggesting that CsrA control of the Rho-dependent *pgaA* terminator is well conserved in this species. Intriguingly, we also found the *pgaA* leader (and *pgaA* gene) in the genome of *Shigella flexneri* strain 5 str. 8401 but not in other *Shigella* genomes. However, the sequence of the hairpin *rut* motif (positions 61-107)- or a structure with an equivalent role - could not be found upstream of *pgaA* genes in other Proteobacteria.

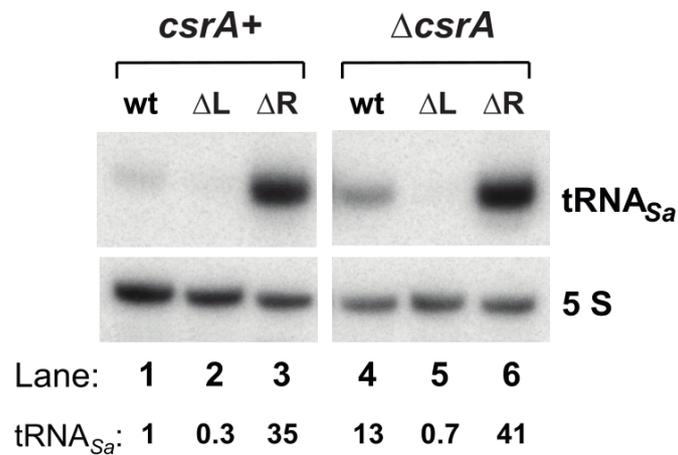


Supplemental Figure S3: Rho triggers *in vitro* transcription termination within the 5'-UTR of *pgaABCD* in the presence of CsrA and NusG. (*Left*) Single-round transcriptions with bead-affixed transcription complexes containing biotinylated 5'UTR-*pgaA* templates (Fig. 2A) (see Supplemental Methods for details). The ³²P-labeled complexes, halted at +17 (by privation of CTP from the initiation mixture), were immobilized and purified on streptavidin-coated, magnetic beads (Ademeads-300, Ademtech) before incubation with rNTPs and protein cofactors (indicated below gels). The supernatant and bead (pellet) fractions were then separated on a Magrack (GE-healthcare). The presence of the Rho-dependent transcripts in supernatants confirms that they stem from termination rather than transcriptional pausing or arrest. (*Right*) Identification of the main termination sites using phosphorothioate sequencing. Experiments were performed as described (Bossi et al. 2012). Note that in presence of Rho and CsrA, NusG shifts the start of the termination window towards promoter-proximal sites under both “chase” (left) and “standard” (right) transcription conditions.



Supplemental Figure S4: Overexpressing the *mcaS* gene. McaS activates *pgaA-lacZ* expression in the ΔR variant even though the latter lacks the presumptive McaS target site. Thus, the presumptive McaS target site is not needed for activation. Failure of McaS to activate *pgaA-lacZ* expression in the $\Delta L \Delta csrA$ strain is consistent with the finding that McaS acts by targeting CsrA (Jorgensen et al. 2013).

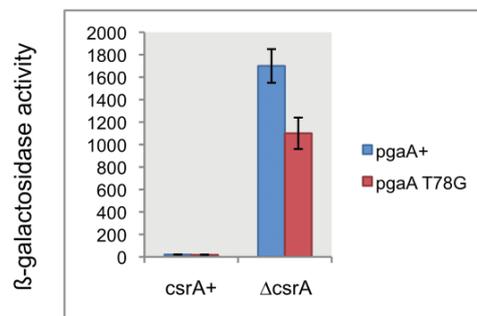
Résultats



Supplemental Figure S5: Northern blot quantification of tRNA_{Sa} in strains expressing a constitutive (CsrA-irresponsive) *nhaR* gene. The $\Delta csrA$ deletion causes over a 10-fold increase in tRNA_{Sa} transcription in the *pgaA*⁺ strain (lanes 1 and 4) but has no significant effect in the ΔR leader variant (lanes 3 and 6). This shows that relieving CsrA-mediated repression of NhaR abolishes all of the effects of $\Delta csrA$ on the *pgaA* promoter (see text). tRNA_{Sa} counts were quantified by phosphorimaging, normalized to the 5S RNA and the values obtained divided by the value of lane 1.

Résultats

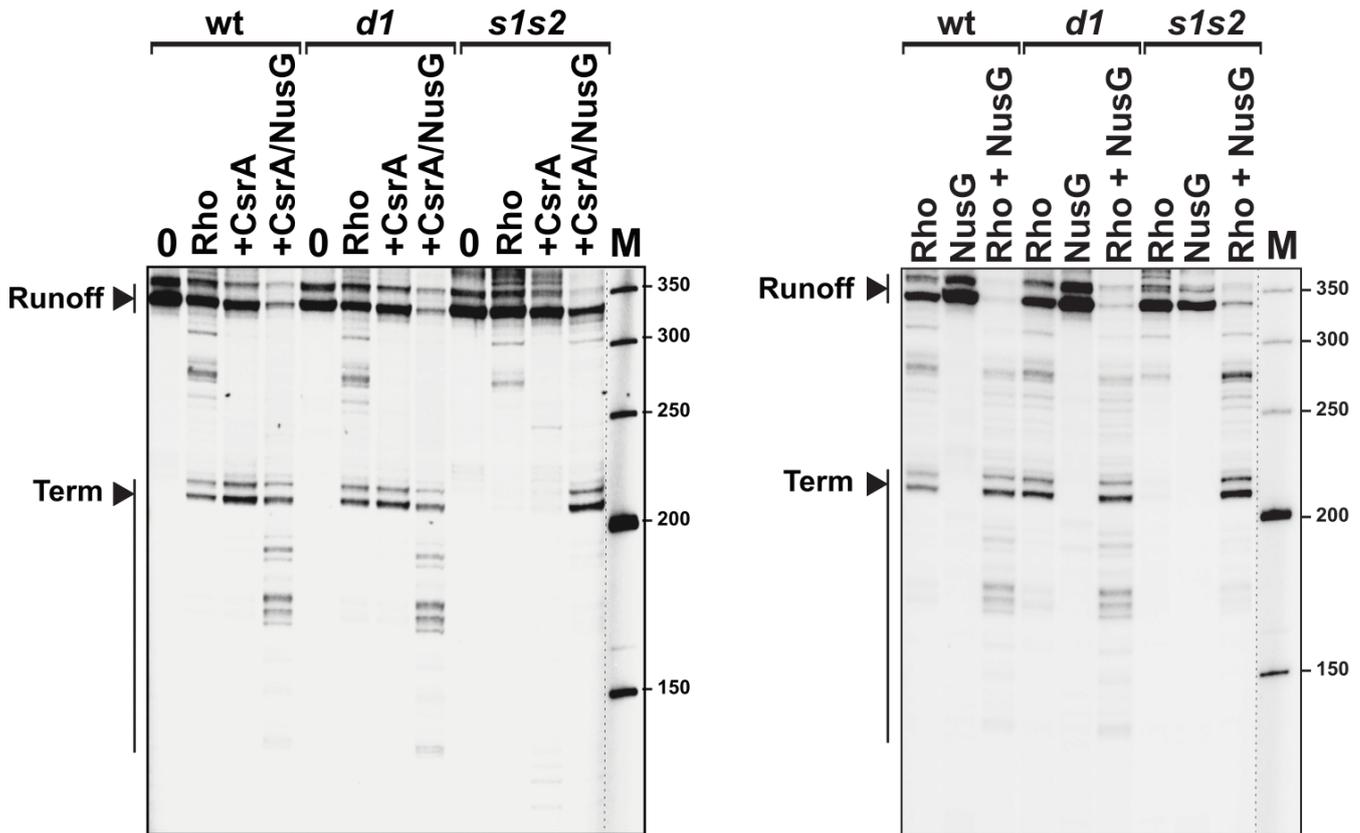
...AAAAGGAUUUUUAUAUGGACACUCUGCUCAUCAUUUCUUCUUCUCAUCAUCAACAUAUCACGUCUCUCUCCGCGUUUAAUAA...
70 80 90 100 110 120 130 140
stop



Supplemental Figure S6. Testing an alternative model for CsrA-induced Rho-dependent termination in the *pgaA* leader. The *pgaA* leader region includes a 60 nt open reading frame (orf) that spans the entirety of the *rut* site (YC repeats in yellow) and is preceded by a Shine-Dalgarno (SD) motif (green box at 68-70). The positions of the putative SD and initiation codon coincide with the 5'-proximal CsrA binding sites (green boxes). One might envision that a ribosome translating this putative leader peptide would prevent Rho from binding to the RNA and thus allow RNA polymerase to read through the termination signal. CsrA binding to the 5'-proximal sites, by blocking translation, would abolish this effect and promote Rho-dependent termination. This model predicts that preventing translation of the 60-nt orf should have the same effect as the ΔL deletion (see text), that is, cause termination to become constitutive in a $\Delta csrA$ background. Results above show that inactivating translation of the leader peptide (by a U to G change in the central base of the initiation codon) causes only a 35% decrease of *pgaA-lacZ* expression, much less than the ~ 30 -fold decrease observed when termination is constitutive (Fig. 3A). Thus these results fail to meet the prediction and invalidate the model. The slight decrease in *pgaA-lacZ* expression in the U78G mutant can be ascribed to the slight effect of the mutation on the stability of the *pgaA* leader hairpin conformation (see text).

Résultats

50 mM KCl



Supplemental Figure S7. Stability of the *pgaA* hairpin modulates Rho-dependent termination. Standard *in vitro* transcription experiments were performed with the wild-type, *d1*, and *s1s2* DNA templates (Fig. 5A) in the presence of 50 mM KCl. Rho-dependent termination with the wild-type construct no longer requires CsrA or NusG, suggesting that the wild-type *pgaA* hairpin does not fold properly under these “low-salt” transcription conditions. Note that Rho-dependent bands in the 250-300 nt region stem from intragenic *lacZ* terminators that are inhibited at higher KCl concentrations (Zou and Richardson, 1991). Termination at the upstream *lacZ* terminator (~270 nt) is increased in the presence of NusG (Burns and Richardson, 1995), although it appears to be inhibited by CsrA.

Résultats

Supplemental Table S1. Relevant strains used in this work

| Strain ^a | Genotype ^b | Source or reference |
|---------------------|--|------------------------------|
| MA3398 | <i>zfh-8157::Tn10dTc</i> | (Figueroa-Bossi et al. 1997) |
| MA3409 | wild-type | (Figueroa-Bossi et al. 1997) |
| MA9132 | <i>chiP-lacZY aph</i> | (Figueroa-Bossi et al. 2009) |
| MA9848 | <i>rhIB^{wt}-Tpop rho(Y80C)</i> | (Bossi et al. 2012) |
| MA11115 | <i>chiP::tDNA_{Sa}</i> | (Bossi et al. 2012) |
| MA11158 | <i>chiP_{AGG} chiQ::lacZY nusG-174fs-cat</i> | (Bossi et al. 2012) |
| MA11182 | <i>chiP::tDNA_{Sa} cat</i> | (Bossi et al. 2012) |
| MA11436 | <i>chiP78::tetRA chiP-lacZY aph / pKD46</i> | this work |
| MA11469 | <i>pgaA1-lacZY aph</i> | this work |
| MA11470 | <i>chiP-pgaA2-lacZY aph</i> | this work |
| MA11484 | <i>pgaA1-lacZY aph rhIB^{wt}-Tpop rho(Y80C)</i> | this work |
| MA11485 | <i>pgaA1-lacZY aph rhIB^{wt}-Tpop rho^{wt}</i> | this work |
| MA11529 | <i>ΔcsrA::cat sup2</i> | this work |
| MA11540 | <i>pgaA1-lacZY aph ΔcsrA::cat sup2</i> | this work |
| MA11591 | <i>pgaA1(T78G)-lacZY aph</i> | this work |
| MA11592 | <i>pgaA1(ΔL)-lacZY aph</i> | this work |
| MA11593 | <i>pgaA1(ΔR)-lacZY aph</i> | this work |
| MA11595 | <i>pgaA1(ΔL)-lacZY aph rhIB^{wt}-Tpop rho^{wt}</i> | this work |
| MA11596 | <i>pgaA1(ΔL)-lacZY aph rhIB^{wt}-Tpop rho(Y80C)</i> | this work |
| MA11597 | <i>pgaA1(T78G)-lacZY aph ΔcsrA::cat sup2</i> | this work |
| MA11598 | <i>pgaA1(ΔL)-lacZY aph ΔcsrA::cat sup2</i> | this work |
| MA11599 | <i>pgaA1(ΔR)-lacZY aph ΔcsrA::cat sup2</i> | this work |
| MA11607 | <i>pgaA1::tetRA-lacZY aph / pKD46</i> | this work |
| MA11624 | <i>pgaA1(ΔR)-lacZY aph rhIB^{wt}-Tpop rho^{wt}</i> | this work |
| MA11625 | <i>pgaA1(ΔR)-lacZY aph rhIB^{wt}-Tpop rho(Y80C)</i> | this work |
| MA11725 | <i>pgaA1-lacZY aph nusG^{wt}-cat</i> | this work |
| MA11726 | <i>pgaA1-lacZY aph nusG(174fs)-cat</i> | this work |
| MA11727 | <i>pgaA1(ΔL)-lacZY aph nusG^{wt}-cat</i> | this work |
| MA11728 | <i>pgaA1(ΔL)-lacZY aph nusG(174fs)-cat</i> | this work |
| MA11729 | <i>pgaA1(ΔR)-lacZY aph nusG^{wt}-cat</i> | this work |
| MA11730 | <i>pgaA1(ΔR)-lacZY aph nusG(174fs)-cat</i> | this work |
| MA11737 | <i>pgaA1(ΔL)-lacZY aph ΔcsrA::cat sup2 rhIB^{wt}-Tpop rho(Y80C)</i> | this work |
| MA11743 | <i>pgaA1-tDNA_{Sa} cat</i> | this work |
| MA11744 | <i>pgaA1(ΔL)-tDNA_{Sa} cat</i> | this work |
| MA11745 | <i>pgaA1(ΔR)-tDNA_{Sa} cat</i> | this work |
| MA11754 | <i>pgaA1-tDNA_{Sa} cat ΔcsrA::scar sup2</i> | this work |
| MA11755 | <i>pgaA1(ΔL)-tDNA_{Sa} cat ΔcsrA::scar sup2</i> | this work |
| MA11756 | <i>pgaA1(ΔR)-tDNA_{Sa} cat ΔcsrA::scar sup2</i> | this work |
| MA11757 | <i>pgaA1-tDNA_{Sa} cat rhIB^{wt}-Tpop rho(Y80C)</i> | this work |
| MA11758 | <i>pgaA1(ΔL)-tDNA_{Sa} cat rhIB^{wt}-Tpop rho(Y80C)</i> | this work |
| MA11759 | <i>pgaA1(ΔR)-tDNA_{Sa} cat rhIB^{wt}-Tpop rho(Y80C)</i> | this work |
| MA11772 | <i>pgaA1-tDNA_{Sa} cat ΔcsrA::scar sup2 rhIB^{wt}-Tpop rho(Y80C)</i> | this work |

Résultats

Supplemental Table S1. Relevant strains used in this work (continued)

| Strain ^a | Genotype ^b | Source or reference |
|---------------------|---|---------------------|
| MA11773 | <i>pgaA1</i> (ΔL)- <i>tDNA</i> _{Sa} <i>cat</i> Δ <i>csrA</i> :: <i>scar sup2 rhIB</i> ^{wt} -Tpop <i>rho</i> (Y80C) | this work |
| MA11774 | <i>pgaA1</i> (ΔR)- <i>tDNA</i> _{Sa} <i>cat</i> Δ <i>csrA</i> :: <i>scar sup2 rhIB</i> ^{wt} -Tpop <i>rho</i> (Y80C) | this work |
| MA11850 | <i>pgaA1</i> (d1)- <i>lacZY aph</i> | this work |
| MA11851 | <i>pgaA1</i> (s1)- <i>lacZY aph</i> | this work |
| MA11852 | <i>pgaA1</i> (s2)- <i>lacZY aph</i> | this work |
| MA11853 | <i>pgaA1</i> (s1s2)]- <i>lacZY aph</i> | this work |
| MA11854 | <i>pgaA1</i> (d2)- <i>lacZY aph</i> | this work |
| MA11857 | <i>pgaA1</i> (d1)]- <i>lacZY aph</i> Δ <i>csrA</i> :: <i>cat sup2</i> | this work |
| MA11858 | <i>pgaA1</i> (s1)- <i>lacZY aph</i> | this work |
| MA11859 | <i>pgaA1</i> (s2)- <i>lacZY aph</i> Δ <i>csrA</i> :: <i>cat sup2</i> | this work |
| MA11860 | <i>pgaA1</i> (s1s2)]- <i>lacZY aph</i> Δ <i>csrA</i> :: <i>cat sup2</i> | this work |
| MA11861 | <i>pgaA1</i> (d2)- <i>lacZY aph</i> Δ <i>csrA</i> :: <i>cat sup2</i> | this work |
| MA11878 | <i>pgaA1</i> (s3)- <i>lacZY aph</i> | this work |
| MA11879 | <i>pgaA1</i> (d1s3)- <i>lacZY aph</i> | this work |
| MA11885 | <i>pgaA1</i> (s3)- <i>lacZY aph</i> Δ <i>csrA</i> :: <i>cat sup2</i> | this work |
| MA11886 | <i>pgaA1</i> (d1s3)- <i>lacZY aph</i> Δ <i>csrA</i> :: <i>cat sup2</i> | this work |
| MA11914 | Δ[<i>nhaA-nhaR</i>]:: <i>aph P</i> ^{lac} - <i>nhaR</i> | this work |
| MA11922 | <i>pgaA1-tDNA</i> _{Sa} <i>cat</i> Δ[<i>nhaA-nhaR</i>]:: <i>aph P</i> ^{lac} - <i>nhaR</i> | this work |
| MA11923 | <i>pgaA1</i> (ΔL)- <i>tDNA</i> _{Sa} <i>cat</i> Δ[<i>nhaA-nhaR</i>]:: <i>aph P</i> ^{lac} - <i>nhaR</i> | this work |
| MA11924 | <i>pgaA1</i> (ΔR)- <i>tDNA</i> _{Sa} <i>cat</i> Δ[<i>nhaA-nhaR</i>]:: <i>aph P</i> ^{lac} - <i>nhaR</i> | this work |
| MA11925 | <i>pgaA1-tDNA</i> _{Sa} <i>cat</i> Δ[<i>nhaA-nhaR</i>]:: <i>aph P</i> ^{lac} - <i>nhaR</i> Δ <i>csrA</i> :: <i>scar sup2</i> | this work |
| MA11926 | <i>pgaA1</i> (ΔL)- <i>tDNA</i> _{Sa} <i>cat</i> Δ[<i>nhaA-nhaR</i>]:: <i>aph P</i> ^{lac} - <i>nhaR</i> Δ <i>csrA</i> :: <i>scar sup2</i> | this work |
| MA11927 | <i>pgaA1</i> (ΔR)- <i>tDNA</i> _{Sa} <i>cat</i> Δ[<i>nhaA-nhaR</i>]:: <i>aph P</i> ^{lac} - <i>nhaR</i> Δ <i>csrA</i> :: <i>scar sup2</i> | this work |
| MA11943 | <i>chiP-pgaA2-tDNA</i> _{Sa} <i>cat</i> | this work |
| MA11944 | <i>chiP-pgaA2</i> (ΔL)- <i>tDNA</i> _{Sa} <i>cat</i> | this work |
| MA11945 | <i>chiP-pgaA2</i> (ΔR)- <i>tDNA</i> _{Sa} <i>cat</i> | this work |
| MA11984 | <i>chiP-pgaA2-tDNA</i> _{Sa} <i>cat</i> Δ <i>csrA</i> :: <i>scar sup2</i> | this work |
| MA11985 | <i>chiP-pgaA2</i> (ΔL)- <i>tDNA</i> _{Sa} <i>cat</i> Δ <i>csrA</i> :: <i>scar sup2</i> | this work |
| MA11986 | <i>chiP-pgaA2</i> (ΔR)- <i>tDNA</i> _{Sa} <i>cat</i> Δ <i>csrA</i> :: <i>scar sup2</i> | this work |
| MA11994 | <i>chiP-pgaA2-tDNA</i> _{Sa} <i>cat rhIB</i> ^{wt} -Tpop <i>rho</i> (Y80C) | this work |
| MA11995 | <i>chiP-pgaA2</i> (ΔL)- <i>tDNA</i> _{Sa} <i>cat rhIB</i> ^{wt} -Tpop <i>rho</i> (Y80C) | this work |
| MA11996 | <i>chiP-pgaA2</i> (ΔR)- <i>tDNA</i> _{Sa} <i>cat rhIB</i> ^{wt} -Tpop <i>rho</i> (Y80C) | this work |

^a All strains are derived from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain MA3409 (Figueroa-Bossi et al., 1997).

^b Allele *pgaA1* replaces the promoter and 5' UTR of the *chiP* gene by the promoter and 5' UTR of *pgaA*. Allele *pgaA2* replaces the 5' UTR of *chiP* by the 5' UTR of *pgaA* (see Materials and Methods and Supplemental Table S3 for details). ΔL and ΔR denote deletions of segments [61-81] and [82-107] of *pgaA* 5' UTR, respectively. The term "scar" denotes the DNA sequence left following Flp-mediated excision of antibiotic-resistance cassettes introduced by the procedure of Datsenko and Wanner (Datsenko and Wanner, 2000). Additional details on relevant alleles in this table can be found in Supplemental Table S3.

Résultats

Supplemental Table S2. DNA oligonucleotides used in this work

| name | Sequence (5'-3') ^a |
|-------|---|
| ppB10 | ACACTACCATCGGCGCTACG |
| ppC34 | TTTAAGGACATTCAGCACGCTTTGGCAGGCCTCTATCTTCTGTGTAGGCTGGAGCTGCTT |
| ppJ62 | ATAGGAGTCGAACCCATAACCTCTTGATCCGTAGTCAAAC |
| ppL44 | TCGCTGTTTCGCTTTTGTCCGACGCAATTTATACGTCAAAGTTAAGACCCACTTTTACATT |
| ppL45 | ACGGATCCTACGTTTGGCACTAAACGTACGCATAAGTTAATCCTAAGCACTTGTCTCCTG |
| ppL56 | TTCTCTGCATTTCTAAGTCGATTCTCTTTTTTGGCAGGCGTTAGGAATAACAATTAATCCGT |
| ppL57 | AGAAAGAGATTGATAATTCGCATCGCGAAAAATAGTCTATTTAACAGGCATTGGGATTTATGC |
| ppL59 | AGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATCCGTAATTCTGCTACTTGAATACATCCTGT |
| ppM17 | TTTGGCGTTATATGATGGATAATGCCGGGATACAGAGAGACCATGGTCCATATGAATATC |
| ppM18 | GAAAAGTGAGACGCGAAAACCTTAGTAACTGGACTGCTGGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTT |
| ppM62 | TCCTCATCATTGGAATGGATTTTCGGGCGAGAAAAGGATTTTAAGACCCACTTTTACATT |
| ppM63 | TGAATTGTTGATGATGAGAAGAAGAAATGATGAGCAGAGTGTCTAAGCACTTGTCTCCTG |
| ppM64 | TCATCATTGGAATGGATTTTCGGGCGAGAAAAGGATTTTATAGGGACACTCTGCTCATCATTTTC |
| ppM65 | GACGTGAATTGTTGATGATGAGAAGAAGAAATGATGAGCAGAGTGTCCCT |
| ppM66 | TATTCCTGAAGATCCTCATCATTGGAATGGATTTTCGGGCCACTCTGCTCATCATTTTC |
| ppM67 | ACGTGAATTGTTGATGATGAGAAGAAGAAATGATGAGCAGAGTGGCCCG |
| ppM68 | TCATCATTGGAATGGATTTTCGGGCGAGAAAAGGATTTTATATGGAATCATCAACAATTCACGTC |
| ppM69 | TAATCCGTTATTAACGCGGAAGAGAGACGTGAATTGTTGATGATTCCAT |
| ppN49 | GATACAGAGAGAGATTTTGGCAATACATGGAGTAATACAGGTCCTCGGCACCATTTTAGC |
| ppN92 | TGAATTGTTGATGATGAGAAGAAGAAATGATGAGCAGAGTG |
| ppN93 | AGATCCTCATCATTGGAATGGATTTTCGGGCGAGAAAAGGATTTTATAAAAACACTCTGCTCATCATTTTC TTCTTCTC |
| ppN94 | AATTGTTGATGATGAGAAGAAGAAATGATGAGCAGAGTGCCATATAAAAATTAATTTCTCGCCCGAAAAT CCATTCC |
| ppN95 | CTGAAGATCCTCATCATTGGAATGGATTTTCGGGCGAGAAAAGGATTTTATATGAGCACTCTGCTCATC |
| ppN96 | GAATTGTTGATGATGAGAAGAAGAAATGATGAGCAGAGTGCTCATATAAAAATC |
| ppN97 | CTGAAGATCCTCATCATTGGAATGGATTTTCGGGCGAGAAAGAGATTTTATATGGACACTCTGCTCATC |
| ppN98 | GAATTGTTGATGATGAGAAGAAGAAATGATGAGCAGAGTGTCCATATAAAAATC |
| ppN99 | TGAAGATCCTCATCATTGGAATGGATTTTCGGGCGAGAAAGAGATTTTATATGAGCACTCTGCTCATC |
| ppO09 | CTGAAGATCCTCATCATTGGAATGGATTTTCGGGCGAGAAAAGGATTTTATATGGACACTCTGTCCATC |
| ppO10 | GAATTGTTGATGATGAGAAGAAGAAATGATGGACAGAGTGTCCATATAAAAATC |
| ppO11 | CTGAAGATCCTCATCATTGGAATGGATTTTCGGGCGAGAAAAGGATTTTATAAAAACACTCTGTCCATC |
| ppO12 | GAATTGTTGATGATGAGAAGAAGAAATGATGGACAGAGTGTTTTATAAAAATC |
| ppP23 | TCATCATATATAATCTAATTTTAACGATGAGTCAGGCGAGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG |

Résultats

Supplemental Table S2. DNA oligonucleotides used in this work (continued)

| name | Sequence (5'-3') ^a |
|-------|---|
| ppP24 | AAATAATAAAGATGGTTGTAGTTAATATGAGACATGCTCATAGCTGTTTCCTGTGTGTCCA |
| Csra1 | CATGCTGATTCTGACTCGTCGAGTTGGTGAGACCCTCATGATTGGGGATGAGGTCACCGTGACAGTTT TAGG |
| Csra2 | GGTAAAGGGCAACCAGGTACGTATTGGCGTAAATGCCCGAAGGAAGTTTCTGTTCCACCGTGAAGAGA TCTA |
| Csra3 | CCAGCGTATCCAGGCTGAAAAATCCCAGCAGTCCAGTTACC |
| Csra4 | CCTTTACCCCTAAACTGTCACGGTGACCTCATCCCCAATCATGAGGGTCTCACCAACTCGACGAGTC AGAATCAG |
| Csra5 | GGTGAACAGAAACTTCCTTCGGGGCATTACGCCAATACGTACCTGGTTGC |
| Csra6 | TCGAGGTAAGTGGACTGCTGGGATTTTTCAGCCTGGATACGCTGGTAGATCTCTTCAC |
| pgaA1 | GTCTAACCTATAGGATACTTACAGCCAGGCATTGGGATTTATGCCGTATTCCTGAAG |
| pgaA2 | CCATGACAAAGCTGGCTGAGTATTACCC |
| pgaA3 | GTCTAACCTATAGGATACTTACAGCCAGGTATTGGGATTTATGCCGTATTCCTGAAG |
| pgaA4 | CGAAATTAATACGACTCACTATAGGGTATTGGGATTTATGCCGTATTCCTGAAG |
| pgaA5 | CGCGGAAGAGAGACGTGAATTG |
| pgaA6 | GGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGG |

^a Changes from the wild-type sequence are in red.

Résultats

Supplemental Table S3. Relevant alleles constructed by λ *red* recombineering

| Primer pair | Template ^a | Allele | Description |
|---------------|-----------------------|---|---|
| ppL44 / ppL45 | MA3398 | <i>chiP78::tetRA</i> | <i>tetRA</i> insertion in <i>chiP</i> 5' UTR (+78 > < +81) |
| ppL56 / ppL59 | MG1655 | <i>pgaA1</i> | <i>pgaA</i> fragment (from -124 to +234) replaces <i>chiP</i> segment (from -253 to +89) |
| ppL57 / ppL59 | MG1655 | <i>chiP-pgaA2</i> | <i>pgaA</i> fragment (from +1 to +234) replaces <i>chiP</i> segment (from +1 to +89) |
| ppM17 / ppM18 | pKD3 | Δ <i>csrA::cat</i> | FRT- <i>cat</i> -FRT replaces <i>csrA</i> (167 bp segment) |
| ppM62 / ppM63 | MA3398 | Δ <i>chiP::[pgaA72::tetRA]</i> | <i>tetRA</i> insertion in <i>pgaA</i> 5' UTR (+72 > < +81) |
| ppM64 / ppM65 | self | Δ <i>chiP::[pgaA(T78G)]</i> | T to G change at position +78 of <i>pgaA</i> 5' UTR |
| ppM66 / ppM67 | self | Δ <i>chiP::[pgaA(Δ61-81)]</i> | Deletion of <i>pgaA</i> 5' UTR segment (+61 to +81) |
| ppM68 / ppM69 | self | Δ <i>chiP::[pgaA(Δ82-107)]</i> | Deletion of <i>pgaA</i> 5' UTR segment (+82 to +107) |
| ppN49/ ppC34 | MA1118 2 | Δ <i>chiP::[pgaA]-tDNA^{Sa} cat</i> | Insertion of <i>tDNA^{Sa} cat</i> module at position +234 of <i>pgaA</i> 5' UTR |
| ppN92 / ppN93 | self | Δ <i>chiP::[pgaA(d1)]</i> | <i>pgaA</i> 5' UTR triple mutant U78A G79A G80A |
| ppN95 / ppN96 | self | Δ <i>chiP::[pgaA(s1)]</i> | <i>pgaA</i> 5' UTR double mutant G80A A81G |
| ppN97 / ppN98 | self | Δ <i>chiP::[pgaA(s2)]</i> | <i>pgaA</i> 5' UTR double mutant A66G G68A |
| ppN99 / ppN96 | self | Δ <i>chiP::[pgaA(s1s2)]</i> | <i>pgaA</i> 5' UTR quadruple mutant A66G G68A G80A A81G |
| ppN94 / ppN89 | self | Δ <i>chiP::[pgaA(d2)]</i> | <i>pgaA</i> 5' UTR triple mutant A67U G68U G69A |
| ppO09 / ppO10 | self | Δ <i>chiP::[pgaA(s3)]</i> | <i>pgaA</i> 5' UTR double mutant C89U U90C |
| ppO11 / ppO12 | self | Δ <i>chiP::[pgaA(d1s3)]</i> | <i>pgaA</i> 5' UTR quintuple mutant U78A G79A G80A C89U U90C |
| ppP23 / ppP24 | pNFB20 | Δ [<i>nhaA-nhaR</i>]:: <i>aph</i> <i>P^{lac}-nhaR</i> | <i>aph P^{lac}</i> module replaces segment spanning <i>nhaA</i> and 5' UTR of <i>nhaR</i> |

^a Template DNA was from bacteria (“MA” and “MG” numbers), plasmids (pKD3, pNFB20) or from primers annealing to each other (“self”). Further details on strains and primers are given in Supplemental Tables S1 and S2.

Supplemental References

- Artsimovitch I, Henkin TM. 2009. In vitro approaches to analysis of transcription termination. *Methods* **47**: 37-43.
- Bossi L, Schwartz A, Guillemardet B, Boudvillain M, Figueroa-Bossi N. 2012. A role for Rho-dependent polarity in gene regulation by a noncoding small RNA. *Genes Dev* **26**: 1864-1873.
- Datsenko KA, Wanner BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6640-6645.
- Figueroa-Bossi N, Coissac E, Netter P, Bossi L. 1997. Unsuspected prophage-like elements in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **25**: 161-173.
- Figueroa-Bossi N, Valentini M, Malleret L, Fiorini F, Bossi L. 2009. Caught at its own game: regulatory small RNA inactivated by an inducible transcript mimicking its target. *Genes Dev* **23**: 2004-2015.
- Peters JM, Mooney RA, Grass JA, Jessen ED, Tran F, Landick R. 2012. Rho and NusG suppress pervasive antisense transcription in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **26**: 2621-2633.
- Thomason MK, Fontaine F, De Lay N, Storz G. 2012. A small RNA that regulates motility and biofilm formation in response to changes in nutrient availability in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **84**: 17-35.
- Wang X, Dubey AK, Suzuki K, Baker CS, Babitzke P, Romeo T. 2005. CsrA post-transcriptionally represses pgaABCD, responsible for synthesis of a biofilm polysaccharide adhesin of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **56**: 1648-1663.
- Zuker M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* **31**: 3406-3415.

5. Caractérisation de la terminaison

Rho-dépendante

5.1) La régulation de l'opéron *chiPQ* par le petit ARN ChiX comme modèle pour la caractérisation de la terminaison Rho-dépendante NusG-dépendante.

La découverte du phénomène de polarité induite par la liaison du petit ARN ChiX sur l'ARNm *chiPQ*, a permis d'identifier le site *rut* responsable de cet effet et les partenaires protéiques jouant un rôle majeur dans ce phénomène. Les expériences de terminaison de la transcription *in vitro* ont montré qu'au niveau de ce site, chez *Salmonella*, le facteur de terminaison Rho nécessite la collaboration du facteur NusG (protéine essentielle) pour terminer la transcription [306]. De façon intéressante, ceci n'est pas le cas avec le gène *chiP* d'*E. coli*, où la terminaison Rho-dépendante au même site *rut*, est observé *in vitro*, sans ajout de la protéine NusG purifiée. La caractérisation génétique et fonctionnelle du site *rut* cryptique de *chiP* a permis de mieux définir les motifs de séquence jouant un rôle plus ou moins important dans l'initiation du processus de terminaison de la transcription Rho-dépendant. Il a pu ainsi être identifié une séquence cœur du site *rut* semblant essentielle pour l'initiation de ce processus

Du fait que ce site *rut* avait été particulièrement bien caractérisé, nous avons décidé de l'utiliser en tant que modèle, pour étudier des questions sur la terminaison Rho-dépendante. En particulier, les relations entre Rho et NusG au niveau du gène *chiP* chez *Salmonella*, où la terminaison semble dépendre de la présence de deux protéines. Différents rapports dans la littérature ont proposé que Rho pourrait être associé directement à l'ARN polymérase, depuis le début de la transcription [142,468]. De ce fait, Rho pourrait surveiller le couplage transcription / traduction à tout moment et intervenir là où il peut se lier à l'ARN au niveau d'un site *rut*. Cette idée est soutenue par l'observation de sites *ruts* cryptiques généralement localisés au début des gènes. À l'inverse, il a été proposé que le facteur NusG se lie de manière maximale au complexe d'élongation entre 500 et 1000 nucléotides après le début de la transcription [468].

5.1.1) La position du site *rut* au sein de la séquence de l'ARNm *chiPQ* influence-t-elle la terminaison de la transcription Rho-dépendante NusG-dépendante ?

Ces données semblent donc suggérer que la terminaison Rho-dépendante NusG-dépendante a besoin d'une certaine distance entre le site d'initiation de la transcription et le site *rut* pour être fonctionnelle. Notamment parce que le facteur NusG semble avoir besoin d'une certaine longueur d'ARN pour pouvoir se lier au complexe d'élongation de la transcription [468]. Le site *rut* cryptique de *chiP* débute à 271 nucléotides après le +1 de transcription et permet la terminaison Rho-dépendante NusG-dépendante [306]. Nous avons donc voulu savoir jusqu'à quel point nous pouvions rapprocher le site *rut* du site d'initiation de la transcription sans altérer la terminaison de la transcription et en gardant toujours la dépendance de NusG. En d'autres termes, quelle est la distance minimale entre le +1 de transcription et le site *rut* pour que ce dernier reste fonctionnel ? Pour ce faire, j'ai réalisé cette étude dans une souche portant une fusion rapportrice au niveau du second cistron de l'opéron *chiPQ*, *chiQ::lacZ*, ainsi que l'allèle *chiP_{AGG}* dont le codon initiateur AUG de *chiP* est muté en AGG inhibant ainsi la traduction de l'ARNm. Ceci a pour conséquence de rendre le site *rut* de la souche actif de façon constitutive, ce qui entraîne un faible niveau d'activité de la β -galactosidase.

A partir de cette souche, j'ai construit 4 souches portant des délétions de la région 5' UTR de *chiP*, qui introduisent un rapprochement et une délétion partielle ou totale du site *rut* par rapport au site d'initiation de la transcription. Deux de ces délétions rapprochent le site *rut* du +1 de transcription respectivement à 89 nt pour la délétion *chiP Δ 181* et 5 nt pour la délétion *chiP Δ 266* (Figure 49 A). La délétion *chiP Δ 282* supprime en partie le site *rut* en plaçant le cœur de ce dernier au niveau de la base +5 (Figure 49 A). La délétion *chiP Δ 290* élimine, quant à elle, le cœur du site *rut* en éliminant 290 nt à partir du +5 de transcription (Figure 32 A). Ces délétions ont été réalisées sur le chromosome de *Salmonella* en utilisant le protocole de recombinaison sans cicatrice (Figure 49 B). Ces différentes constructions devraient permettre de définir la distance minimale entre le site *rut* et le site d'initiation de la transcription. Comme décrit ci-dessus, dans le contexte *chiP_{AGG}*, la terminaison prématurée Rho-dépendante induite par le site *rut* se traduit par une faible activité du rapporteur (Figure 50 B). Cette activité est dépendante du bon fonctionnement des facteurs Rho et NusG. En présence d'allèle mutant de ces derniers, la terminaison qu'ils induisent est moins efficace et

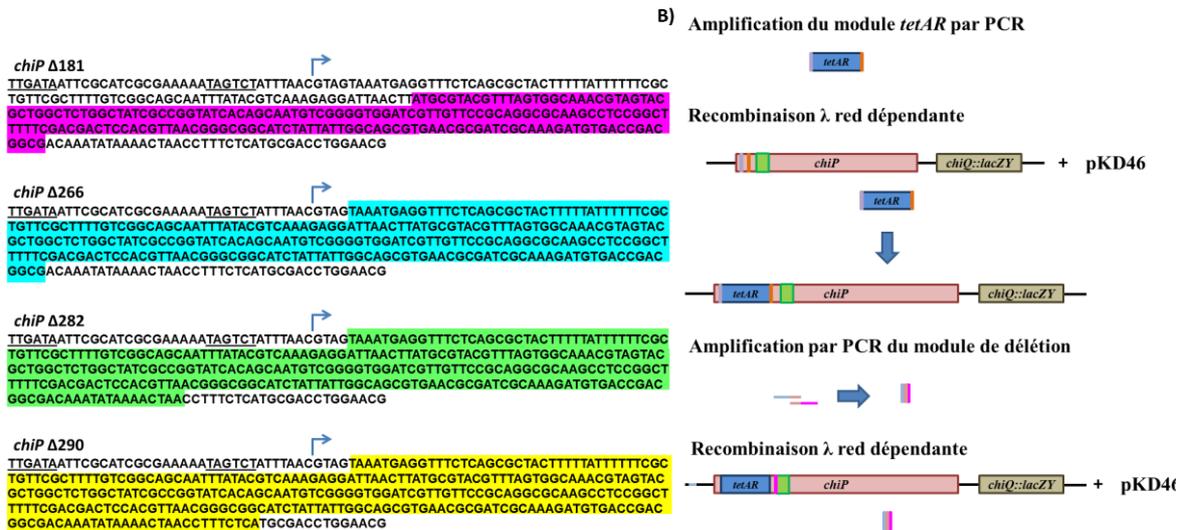


Figure 49 : Constructions des différentes délétions du gène *chiP*.

A) Représentation des différentes délétions du gène *chiP*. Les séquences soulignées correspondant aux boîtes -35 et -10 du promoteur de *chiPQ*, la flèche représente le +1 de transcription et les séquences surlignées en couleurs représentent les différentes délétions : 181nt (violette), 266nt (cyan), 282nt (vert) et 290nt (jaune). B) Représentation schématique du protocole de recombinaison sans cicatrice permettant de réaliser les différentes délétions du gène *chiP*. Le gène *chiP* est représenté en rouge claire, le site *rut* en vert et la fusion rapportrice *chiQ::lacZY* en marron. Le gène *tetAR* (en bleu) est amplifié par PCR à partir de la souche MA3397 à l'aide du couple d'oligonucléotides ppI74-ppI75. Ces oligonucléotides possèdent du côté 5' une séquence homologue à celle présente sur *chiP* qui est ici représenté en violet et en orange. Le produit de PCR est ensuite insérer dans le gène *chiP* au niveau des régions homologues en utilisant la technique de recombinaison médié par λ red apporté par pKD46. Les délétions sont réalisés à partir de produit de PCR réalisé à partir de couple d'oligonucléotides complémentaire entre eux du côté 3' et homologue à la région de *chiP* à déléter. Comme précédemment, le produit de PCR est insérer dans le gène *chiP* par recombinaison homologue en utilisant la technique de recombinaison médié par λ red. Les recombinants sensibles à la tétracycline sont sélectionnés sur milieu Bochner permettant une sélection positive des bactéries sensible à la tétracycline.

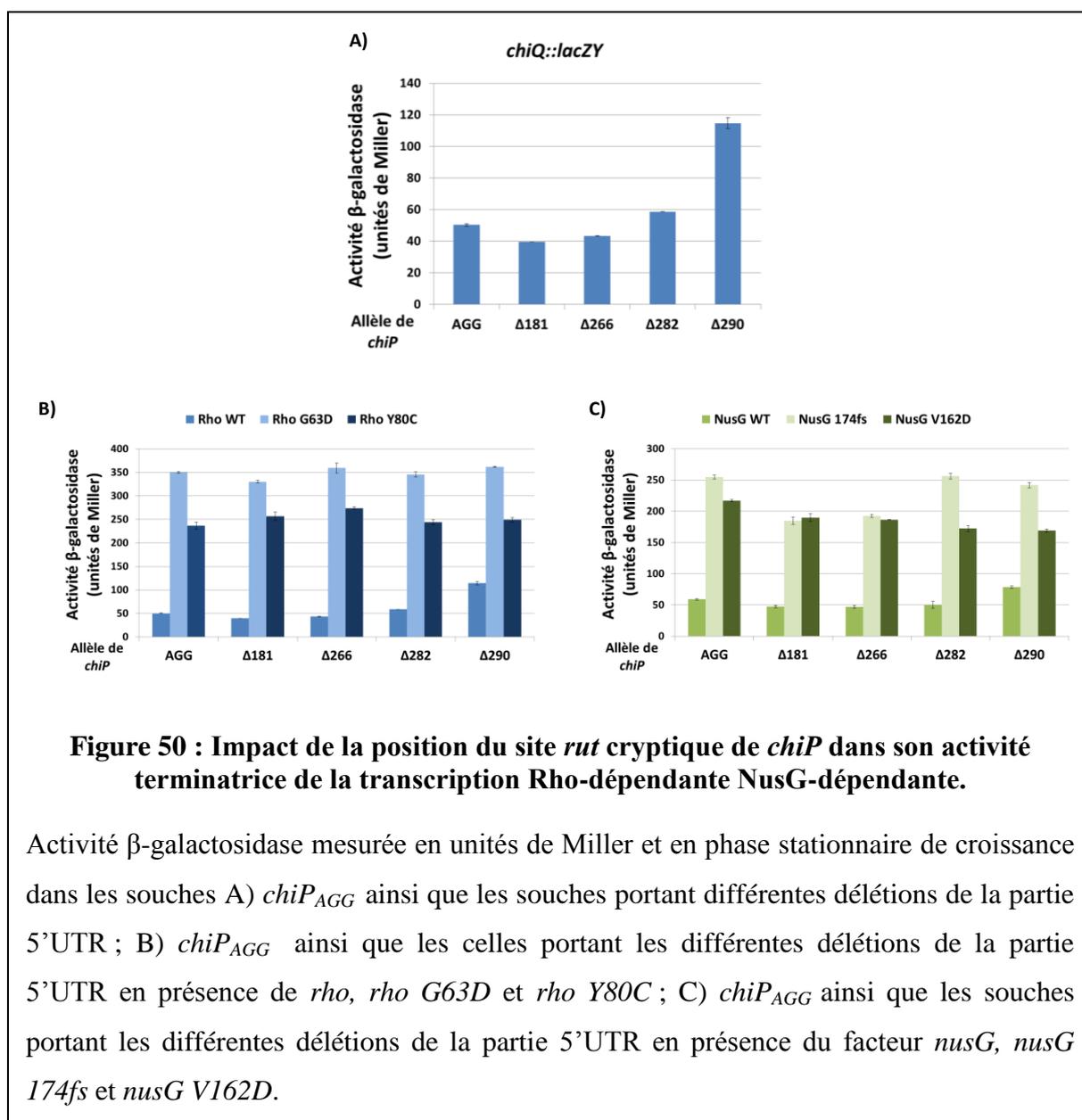
Résultats

entraîne ainsi une augmentation de l'activité du rapporteur (Figure 50 B et C). Dans les différents contextes, j'ai rapproché, voir éliminé, le site *rut* du +1 de transcription. Il est attendu qu'à partir d'une certaine distance du +1, la terminaison prématurée soit abolie, et que de ce fait, l'activité β -galactosidase soit plus élevée que celle observée avec la souche *chiP_{AGG}*. Par ailleurs l'étude des allèles mutants du facteur Rho et NusG dans ces différents contextes permettra de déterminer si leur participation/efficacité au niveau de la terminaison est également impactée par la distance entre le site *rut* et le site d'initiation de la transcription.

J'ai réalisé le dosage de l'activité de la fusion rapportrice *chiQ::lacZ* dans les différents contextes afin de savoir si les diverses délétions étaient affectées dans la terminaison prématurée Rho-dépendante. Dans un premier temps, nous avons voulu savoir si les différentes délétions impactaient l'expression du rapporteur dans le contexte Rho et NusG sauvages. Les résultats de ces essais montrent que, dans ce contexte, seule la souche *chiP Δ 290* contenant la délétion du site *rut* cœur augmente l'expression du rapporteur d'un facteur 2 (114 unités de Miller) par rapport aux autres constructions (\approx 50 unités de Miller) (Figure 50 A). Ce résultat préliminaire semble nous indiquer que le site *rut* reste fonctionnel même accolé au +1 de transcription dans un contexte *rho* et *nusG* sauvages. Par la suite, nous avons voulu savoir si la terminaison de la transcription induite par ce site *rut* cryptique restait toujours dépendante des facteurs Rho et NusG dans les différents contextes.

Les sites *rut* permettent la liaison du facteur Rho à l'ARNm pour initier la terminaison de la transcription. Nous avons donc voulu vérifier que les résultats observés précédemment dépendaient de l'action du facteur Rho. Pour ce faire, j'ai donc combiné par transduction les différentes délétions avec les différents mutants du facteur Rho [306]. En présence des allèles mutants l'activité du rapporteur devrait augmenter, là où le site *rut* est fonctionnel. J'ai donc analysé son expression dans ces différentes souches (Figure 50 B). Les résultats indiquent une augmentation de l'activité β -galactosidase en présence des mutants du facteur Rho indépendamment du contexte génétique (330 unité de Miller pour le mutant G63D de Rho et 250 unités de Miller pour le mutant Y80C). Ce résultat suggère que même lorsque le cœur du site *rut* est supprimé, la terminaison de la transcription pourrait avoir lieu.

Résultats



Le site *rut* cryptique de *chiP* étudié ici permet au facteur Rho d'initier une terminaison prématurée de la transcription dépendante également du facteur NusG. De la même façon que précédemment, nous avons voulu savoir si les différentes délétions affectaient ou pas la dépendance au facteur NusG. Ainsi, j'ai combiné par transduction les différentes délétions avec différents mutants du facteur NusG isolés précédemment au laboratoire [306]. Puis j'ai réalisé les dosages de l'activité β-galactosidase dans ces différents contextes (Figure 50 C). Ces résultats montrent une augmentation de l'expression du rapporteur en présence des mutants *nusG* dans tous les cas, comme pour le facteur Rho précédemment. Ici aussi, la délétion du cœur du site *rut* ne semble pas impacter la terminaison de la transcription, qui reste donc, Rho-dépendante et NusG-dépendante. Donc, il ne semblerait n'y avoir aucune réelle

Résultats

différence entre les différentes constructions. La construction *chiP* Δ 290 présente une délétion du cœur du site *rut* cryptique. Cette délétion aurait dû entraîner une plus forte augmentation de l'expression du rapporteur en présence des facteurs Rho et NusG sauvages. Les expériences de terminaison de la transcription *in vitro* réalisées précédemment ont clairement montré que le site *rut* cryptique de *chiP* identifié est fonctionnel. Pourtant la délétion du cœur de ce site *rut* ne montre pas un grand impact sur l'expression ; l'ensemble de ces observations suggère qu'il y aurait d'autres sites de terminaison entre le site *rut* sélectionné pour ces études et le rapporteur *chiQ::lacZY*. Le site *rut* cryptique de *chiP* est séparé du gène *chiQ* par environ 1000nt (Figure 51 A). Il est fort possible donc, qu'il existe, dans cet intervalle, d'autres sites *rut* cryptiques, NusG-dépendants.

5.1.2) La terminaison Rho-dépendante NusG-dépendante du site *rut* de *chiP* est fonctionnelle même accolée au +5 de transcription.

Pour contourner le problème de sites en aval des constructions de départ, j'ai reconstruit les souches portant les différentes délétions dans un contexte où les 1045nt, entre le site *rut* cryptique de *chiP* et la fin de ce gène, ont été supprimés ; l'allèle *chiP* Δ 1045 est montré dans la Figure 51 A. Des dosages de l'activité β -galactosidases ont ensuite été réalisés dans ces nouvelles souches dans des contextes sauvages pour Rho et NusG avec la même fusion rapportrice *chiQ::lacZ*, pour étudier l'impact du rapprochement du site *rut* au site +1 de transcription (Figure 51 B). Les résultats montrent que l'activité β -galactosidase ne change pas, même lorsque le site *rut* est accolé au +1 de transcription, restant à 300 unités de Miller. A contrario, lorsque la délétion commence à toucher à l'intégrité du site *rut*, ce dernier perd une grande partie de son activité entraînant une forte augmentation du rapporteur d'un facteur 7 (Figure 51 B). L'effet est encore plus fort avec dans la souche *chiP* Δ 290 où le cœur du site *rut* a été supprimé puisque dans ce cas, l'activité passe à 4000 unités de Miller (Figure 51 B). Il semble donc que dans ces nouvelles conditions, il est possible d'évaluer les effets réels de ces déplacements du site *rut* le long de l'ARN.

Résultats

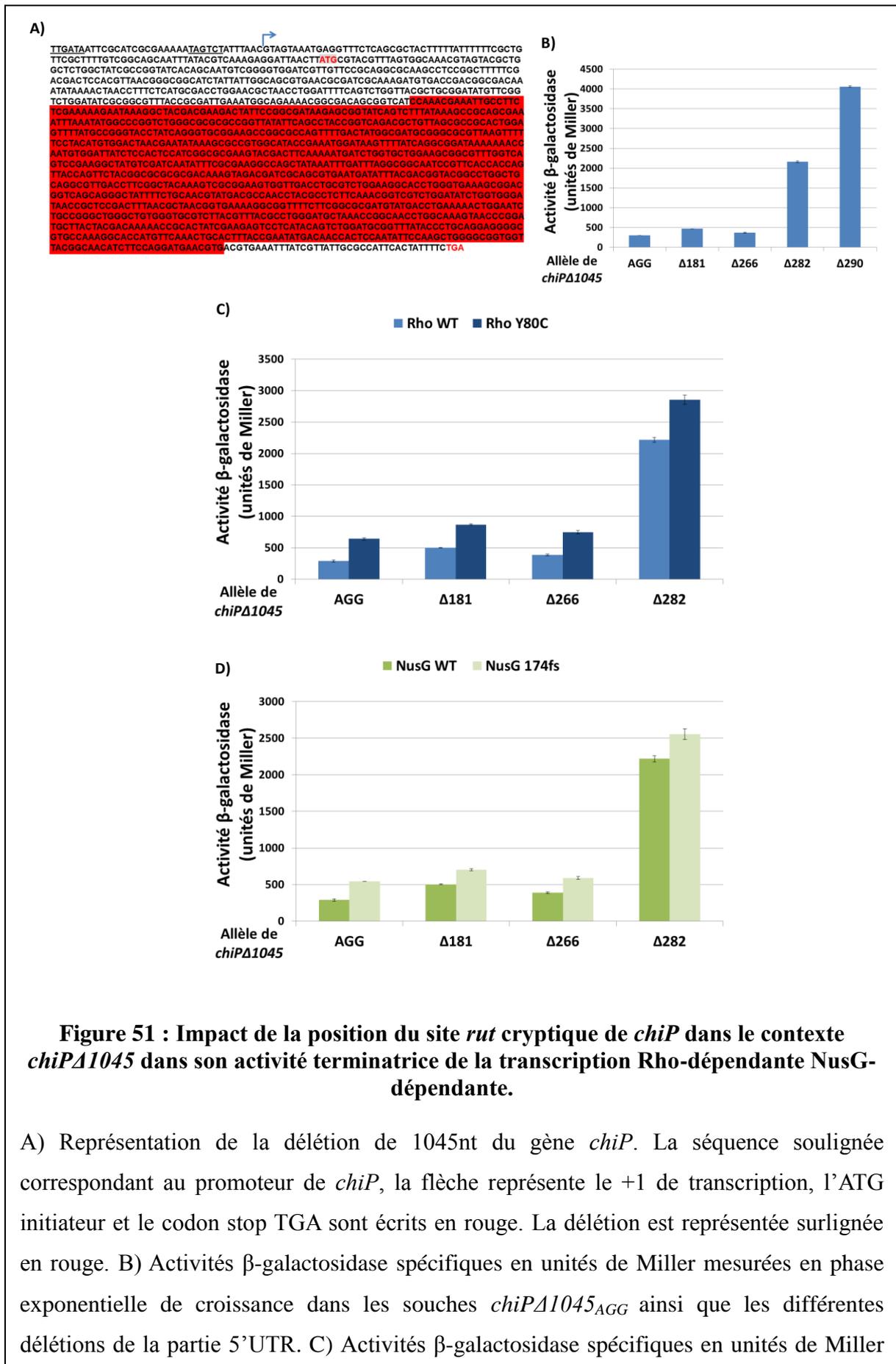


Figure 51 : Impact de la position du site *rut* cryptique de *chiP* dans le contexte *chiPΔ1045* dans son activité terminatrice de la transcription Rho-dépendante NusG-dépendante.

A) Représentation de la délétion de 1045nt du gène *chiP*. La séquence soulignée correspondant au promoteur de *chiP*, la flèche représente le +1 de transcription, l'ATG initiateur et le codon stop TGA sont écrits en rouge. La délétion est représentée surlignée en rouge. B) Activités β-galactosidase spécifiques en unités de Miller mesurées en phase exponentielle de croissance dans les souches *chiPΔ1045*_{AGG} ainsi que les différentes délétions de la partie 5'UTR. C) Activités β-galactosidase spécifiques en unités de Miller

Résultats

présence du facteur Rho WT, Rho G63D et Rho Y80C. D) *chiPΔ1045_{AGG}* ainsi que les différentes délétions de la partie 5'UTR en présence du facteur NusG WT, NusG 174fs et NusG V162D.

Afin de déterminer si les effets observés sont dus à la terminaison prématurée de la transcription, j'ai combiné par transduction les différentes délétions avec le mutant Y80C du facteur Rho et réalisé les dosages de l'activité β -galactosidase dans ces différents contextes (Figure 51 C). Les résultats montrent une augmentation d'un facteur deux par rapport à Rho sauvage, que ce soit dans la souche où le site *rut* est à sa position naturelle ou rapprochée du +1 de transcription. Par contre, dans la souche *chiPΔ282* où le début du site *rut* est éliminé et le cœur du site accolé au +1 de transcription, l'effet de la mutation Rho est beaucoup plus faible. Ces résultats confirment que les effets que nous avons observés précédemment sont bien dus à un phénomène de terminaison prématurée de la transcription Rho-dépendante. En effet, lorsque le site *rut* est altéré, la terminaison de la transcription diminue drastiquement entraînant une forte augmentation de l'expression du rapporteur. De plus, il semble que, dans ce cas, ce phénomène ne soit pas dépendant du facteur Rho, puisque la présence du mutant Y80C de Rho n'entraîne pas une augmentation importante de l'expression du rapporteur.

Nous avons donc voulu savoir, si dans ces contextes, la terminaison Rho-dépendante que nous observions était toujours dépendante du facteur NusG. L'allèle *nusG 174fs* a été introduit par transduction dans les différentes souches et les dosages de l'activité du rapporteur ont été réalisés (Figure 51 D). Les résultats montrent des effets similaires à ce que nous avons observé avec le facteur Rho Y80C, bien que l'effet semble moins important. Ces résultats semblent montrer que la terminaison Rho-dépendante initiée au niveau du site *rut* cryptique de *chiP* pourrait avoir lieu même lorsque le site *rut* est placé au niveau du +5 de transcription.

Il ne semble pas y avoir une exigence de distance minimale entre l'extrémité 5' de l'ARN et le site *rut*, pour que Rho et NusG puissent agir ensemble et promouvoir la terminaison de la transcription. Il est possible que ces protéines soient déjà présentes et associés au complexe d'élongation, tout au début du processus de transcription de l'ARNm. Des études approfondies sont nécessaires afin d'établir si cela est le cas ici. Nos résultats permettent également de définir, pour la première fois et assez précisément, que les bornes du site *rut* doivent être conservées pour maintenir sa capacité à lier le facteur Rho à l'ARNm. Les

résultats de ce travail permettent entre autres, d'envisager l'utilisation d'un site *rut* bactérien bien caractérisé dans des systèmes chromosomiques appropriés à l'étude de différents mécanismes impliquant le facteur de terminaison Rho.

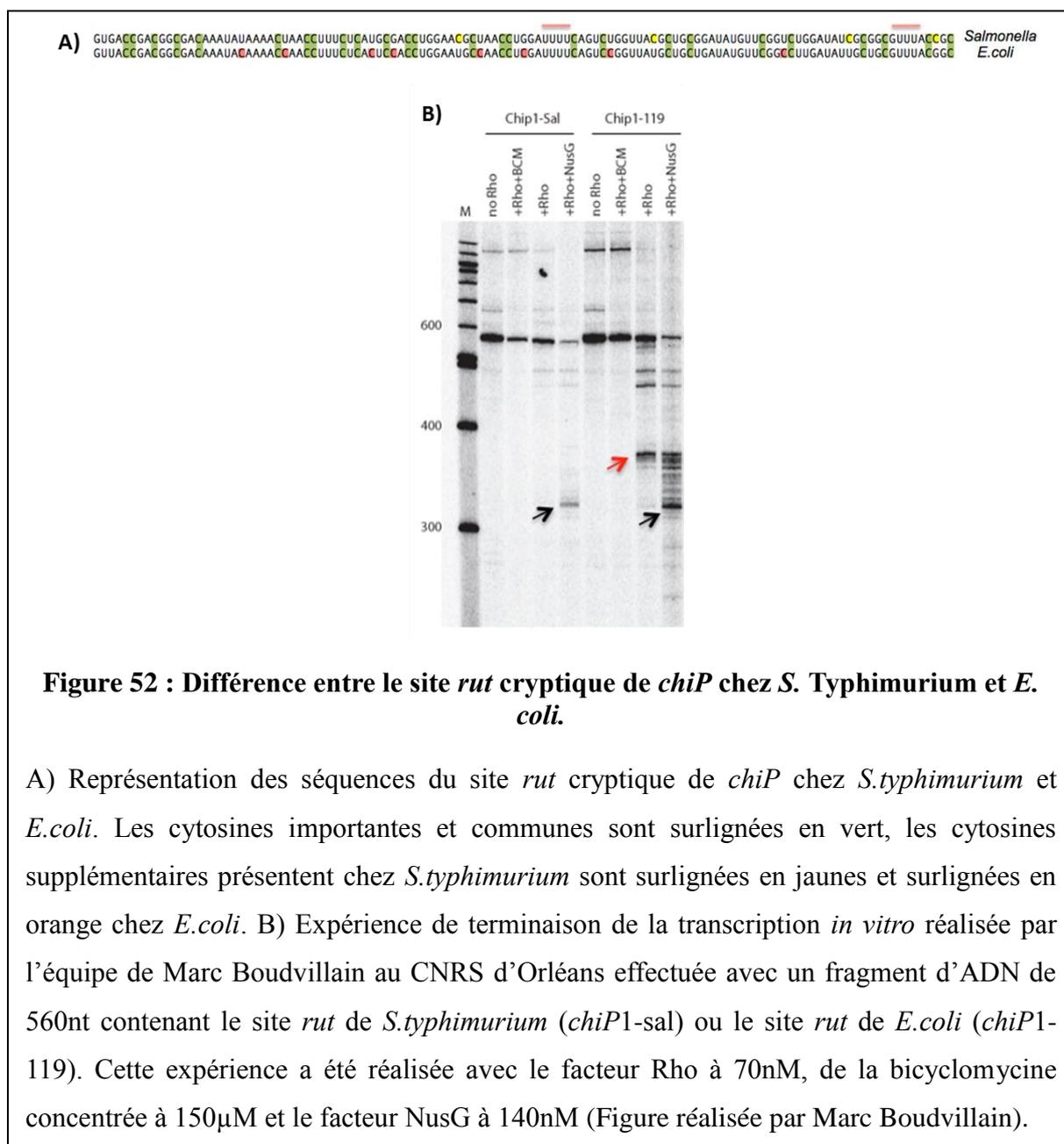
5.2) Etude de la différence d'activité entre le site *rut* cryptique de *chiP* chez *S. Typhimurium* et *E. coli*.

Afin de compléter notre étude sur le site *rut* cryptique de *chiP*, nous avons réalisé une étude *in vivo*, similaire sur le gène *chiP* d'*E. coli* afin d'examiner les possibles différences dans le mécanisme de régulation de l'expression de l'opéron *chiPQ* par le petit ARN ChiX chez cette bactérie. Ces expérimentations nous ont permis de montrer des différences entre le site *rut* cryptique de *chiP* dans ces deux espèces confirmant les observations effectuées *in vitro*. Les variations de séquences entre ces derniers induisent des différences dans la terminaison prématurée de la transcription (Figure 52 A). En effet, chez *S. Typhimurium*, l'équipe de Marc Boudvillain, notre collaborateur, a pu montrer que la terminaison prématurée de la transcription induite par la fixation du petit ARN ChiX de l'opéron *chiPQ* nécessite deux facteurs protéiques *in vitro* : le facteur Rho et le facteur NusG. Cependant, lors de l'étude *in vitro* chez *E. coli*, il est clairement apparu que la terminaison prématurée de la transcription pouvait se faire de façon NusG-indépendante bien que la présence de ce dernier permette une meilleure terminaison de la transcription (Figure 52 B). Il a semblé donc important de déterminer quelles étaient les caractéristiques de la séquence du site *rut* chez *E. coli* responsables de cette différence concernant la participation de NusG dans la terminaison Rho-dépendante de la transcription dans *chiP*.

Afin de parvenir à identifier ces éléments de séquences, nous avons utilisé l'opéron *chiPQ* de *S. Typhimurium* comme point de départ de notre étude. Chez *Salmonella*, nous avons remplacé des séquences de tailles variables du site *rut* dans *chiP* par les mêmes séquences provenant de chez *E. coli*. Deux substitutions ont été effectuées et par la suite comparées au site *rut* de *S. typhimurium* sauvage, à l'aide du rapporteur *lacZ* inséré dans *chiQ*. Les substitutions ont été réalisées dans une souche dont le codon initiateur AUG a été remplacé par le codon AGG afin de maximiser le niveau de terminaison prématurée de la transcription. Ces dernières ont été réalisées en suivant le protocole de recombinaison sans cicatrice. La première substitution correspond à un remplacement de 40nt autour du site *rut* cœur appelé *chiP_{AGG} rut_{EC40}* (Figure 53 A). En effet, ce dernier présente une séquence identique entre les deux espèces, mais les régions proches en amont et en aval du cœur du site

Résultats

possèdent un plus grand nombre de cytosines dans ses séquences chez *E.coli* que chez *S. Typhimurium*. La seconde substitution est un remplacement de 119nt permettant l'échange de l'intégralité du site *rut* que nous avons appelé *chiP_{AGG rutEC119}* (Figure 53 A). Ceci afin de confirmer que les caractéristiques observées dans la terminaison prématurée de la transcription chez *E.coli* (NusG-indépendante) soit bien dues à la séquence du site *rut* et non à un contexte génétique favorable chez cette même espèce par rapport à *S. Typhimurium*.



Par la suite, j'ai transféré les allèles mutants de Rho dans ces souches par transduction [306]. Dans un premier temps, j'ai analysé l'effet des mutants du facteur Rho dans les différents contextes (Figure 53 B). Les résultats du dosage de l'activité rapporteur montrent

Résultats

un effet des mutants du facteur Rho similaire, quel que soit le contexte génétique étudié. En effet, nous pouvons observer qu'en présence d'un facteur Rho sauvage, les activités β -galactosidases mesurées montrent que le site *rut* d'*E. coli* même partiel est plus efficace à initier la terminaison de la transcription par rapport au site de *Salmonella* (Figure 53 B). En effet, l'activité mesurée du rapporteur avec le site *rut* de *S. Typhimurium* est de 50 unités de Miller. Cette activité décroît à 41 unités de Miller avec dans la souche *chiP_{AGG} rutEC40* et atteint 18 unités de Miller dans la souche *chiP_{AGG} rutEC119*. Ces résultats sont conformes à ceux observés précédemment, autrement dit, le site *rut* d'*E.coli* est plus efficace à initier la terminaison de la transcription que celui de *S. Typhimurium*. En présence des mutants du facteur Rho, l'activité β -galactosidase augmente de manière équivalente, d'un facteur 5 et 6 dans les différents contextes (Figure 53 B). Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que le facteur Rho est indispensable, quel que soit le contexte pour initier la terminaison prématurée et donc que l'altération de son activité terminatrice engendre un effet similaire dans les différentes souches. Ceci semble donc conforme à ce qui a été observé lors des expériences de terminaison de la transcription *in vitro* en présence de la bicyclomycine, molécule inhibitrice de Rho (Figure 52 B).

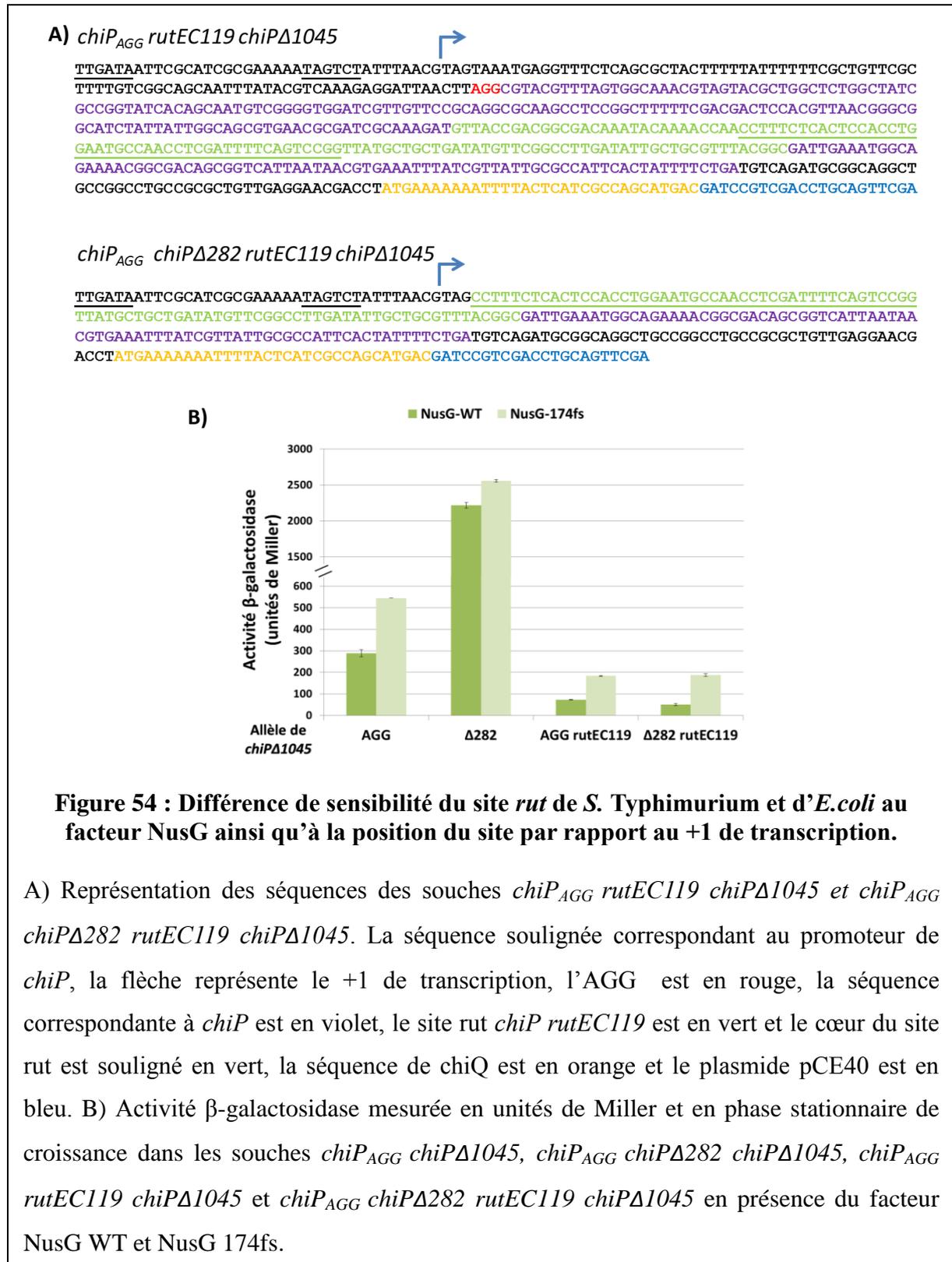
Résultats

A) Représentation des séquences des souches *chiP_{AGG}*, *chiP rutEC40* et *chiP rutEC119*. La séquence soulignée correspondant au promoteur de *chiP*, la flèche indique le +1 de transcription, l'AGG est en rouge, le cœur du site *rut* est représenté surligné en noir et les sites de remplacement correspondant à *chiP rutEC40* et *chiP rutEC119* sont représentés en bleu et vert respectivement. Les différences entre les constructions sont marquées par un dièse dans les alignements et le nucléotide correspondant au site *rut* d'*E.coli* est représenté en rouge. B) Activité β -galactosidase mesurée en unités de Miller et en phase stationnaire de croissance dans les souches *chiP_{AGG}* ainsi que les différents remplacements du site *rut* en présence du facteur Rho WT, Rho G63D et Rho Y80C. C) Activité β -galactosidase mesurée en unités de Miller et en phase stationnaire de croissance dans les souches *chiP_{AGG}* ainsi que les différents remplacements du site *rut* en présence du facteur NusG WT, NusG 174fs et NusG V162D.

Il a été souhaitable d'étudier les effets des mutants du facteur NusG sur la terminaison Rho-dépendante dans ces différents contextes (Figure 53 A). En effet, nous savons que ce facteur est indispensable pour obtenir une terminaison prématurée de la transcription chez *S. Typhimurium*, mais qu'il n'est pas nécessaire chez *E.coli*. Nous pouvons supposer que les effets des mutants du facteur NusG auront de plus importantes conséquences sur le site *rut* de *S.typhimurium* que sur ceux proches de celui d'*E.coli*. Nous avons examiné l'activité β -galactosidase chez les souches portant les différents allèles de *chiP* en présence de mutations NusG (Figure 53 C). Les mutants du facteur NusG dans la souche *chiP_{AGG}*, ayant le site *rut* de *S. Typhimurium*, entraîne une augmentation de l'expression du rapporteur d'un facteur 5, passant d'une activité de 51 unités de Miller pour l'allèle *nusG* à 254 et 216 unités de Miller pour les allèles *nusG 174fs* et *nusG V162D* respectivement (Figure 53 C). Ces effets sont plus faibles dans la souche *chiP_{AGG} rutEC40* où la présence de ces mêmes mutants de NusG entraîne une augmentation de l'expression du rapporteur d'un facteur 3. En effet, l'activité du rapporteur mesurée passe de 35 unités de Miller avec NusG WT à 110 et 101 unités de Miller en présence des allèles *nusG 174fs* et *nusG V162D* respectivement (Figure 53 C). Dans la souche *chiP_{AGG} rutEC119*, l'augmentation de l'expression du rapporteur n'est plus que d'un facteur 2 en présence des mutants de NusG. L'activité mesurée passe de 22 unités de Miller avec *nusG* à 47 et 54 unités de Miller en ce qui concerne les mutants *nusG 174fs* et *nusG V162D*. Ces résultats montrent que les différents contextes n'ont pas la même sensibilité au facteur NusG. En effet, comme nous nous y attendions, la souche ayant le site *rut* de *S.*

Résultats

S. Typhimurium est beaucoup plus sensible aux mutants de NusG que les souches ayant le site *rut* partiel (*rutEC40*) ou total (*rutEC119*) d'*E. coli* (Figure 53 C). Ces résultats, comme précédemment, corrént avec les expériences *in vitro* de terminaison de la transcription.



Résultats

Au vu des résultats obtenus précédemment, nous avons voulu savoir si l'absence des autres sites *rut* cryptiques présents dans les 1045nt entre le site *rut*EC119 et notre rapporteur impactait sur nos résultats. Pour ce faire, j'ai, dans un premier temps, introduit la délétion de 1045nt dans la souche *chiP*_{AGG} *rut*EC119 puis j'ai réalisé la délétion des 282nt en amont du site *rut* afin de la rapprocher du +1 de transcription (Figure 54 A). Ensuite, j'ai combiné par transduction nos différentes constructions avec le facteur NusG 174fs et réalisé les dosages de l'activité β -galactosidase dans ces différents contextes (Figure 54 B). Le résultat de ces dosages montre que le site *rut* d'*E. coli*, dans ce contexte, est toujours très actif même accolé au +1 de transcription. En effet, alors que le site *rut* de *Salmonella* perd une grande partie de son activité dans le contexte *chiP* Δ 1045 *chiP* Δ 282, ce qui se traduit par une augmentation de l'activité du rapporteur de 300 à plus de 2000 unités de Miller, ce n'est pas le cas pour le site *rut* d'*E. coli* (Figure 54 B). Dans ce même contexte, ce dernier reste très actif puisque l'activité du rapporteur varie légèrement (de 70 à 50 unités de Miller). Par contre, comme précédemment, le facteur NusG a un impact sur le fonctionnement du site *rut* d'*E. coli* puisque en présence de la mutation *nusG* 174fs, l'activité du rapporteur, quel que soit le contexte, augmente d'un facteur 2.5-3 passant à environ 180 unités de Miller (Figure 54 B).

L'ensemble de nos résultats semble indiquer que dans un contexte génétique identique, le site *rut* de *chiP* d'*E. coli* est plus efficace à initier la terminaison prématurée de la transcription que celui de *S. Typhimurium*. De plus, comme il avait été observé lors des expériences *in vitro* de terminaison de la transcription, cette dernière ne nécessite que peu le facteur NusG pour s'initier à contrario de ce qui est observé chez *S. Typhimurium*. Ce résultat montre que, comme il avait été pressenti, plus la séquence site *rut* de *chiP* se rapproche de celle du site de *E. coli*, plus l'initiation de la terminaison est efficace et moins elle est dépendante du facteur NusG. De plus, dans le contexte *chiP* Δ 1045, à la différence du site *rut* cryptique de *S. typhimurium*, le site *rut* d'*E. coli* reste très efficace même lorsque le cœur du site *rut* est accolé au +5 de transcription. Une des principales différences entre le site *rut* de *chiP* d'*E. coli* et celui de *S. Typhimurium* est une quantité plus importante de cytosine dans la région entourant le cœur du site dans la séquence d'*E. coli*. Or ce sont ces mêmes cytosines qui interagissent avec le site primaire d'interaction de Rho permettant à la protéine de se lier au site *rut*. Il est alors envisageable que Rho interagisse plus aisément avec le site *rut* d'*E. coli* et que cette liaison soit plus forte que dans le cas de *S. Typhimurium*. Cette interaction, plus stable, permettrait à Rho d'initier la terminaison de la transcription sans avoir besoin du facteur NusG.

Discussion

1. Étude de la régulation des ARNm par les petits ARN régulateurs : Rôle des sites de fixation d'Hfq

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la régulation des ARNm par les petits ARN régulateurs au moyen de la protéine Hfq. De nombreux points de la régulation ont été et sont encore étudiés depuis de nombreuses années. Le nombre croissant de petits ARN régulateurs découverts au sein des différentes souches bactériennes ainsi que leur rôle clé dans de la régulation de nombreux réseaux de gènes en font un atout majeur pour la compréhension des réseaux métaboliques bactériens [469]. La grande majorité des études portant sur cette thématique cherche encore à identifier et caractériser les rôles des petits ARN régulateurs dans des réseaux métaboliques précis. Cependant, il existe un nombre limité d'étude cherchant à comprendre comment un petit ARN régulateur reconnaît et interagit avec sa cible par l'intermédiaire de la protéine Hfq. Une de ces études a particulièrement retenu notre attention et semblait indiquer que seule la région d'appariement jouait un rôle dans la régulation entre les petits ARN régulateurs et leurs ARNm cibles [470]. Des études réalisées sur la protéine Hfq ont montré que cette dernière possédait deux faces distinctes d'interactions avec les ARN : une face distale ayant une forte affinité avec les ARN possédant un motif (AAN)_n et une face proximale ayant une forte affinité pour les ARN polyU [7]. Cette complémentarité des sites de fixation à la protéine se retrouve régulièrement dans les différents couples d'ARNm / petits ARN régulateurs comme *rpoS* / DsrA, *chiP* / ChiX, *yifK* / GcvB, *sodB* / RyhB [10,32,265,409]. La majorité des modèles expliquant ces régulations présupposent que les différents ARN se fixent de manière complémentaire sur la protéine Hfq [7,256,357,471].

Au cours de la thèse, nous avons cherché à améliorer la compréhension des interactions entre Hfq et les différents ARN, notamment en étudiant le site de fixation de la protéine à ces derniers. Pour ce faire, nous sommes partis de couples ARNm / petit régulateurs connus et documentés. Nous avions des certitudes ou de fortes suppositions concernant la position et la nature des sites de fixation de la protéine Hfq à ces ARN [32,265,409]. Au cours d'une étude préliminaire, nous avons réalisé un certain nombre d'ARNm chimères dans lesquels nous avons interverti les séquences d'appariement entre les différents ARNm. Ces nouveaux ARNm ne sont peu ou pas reconnus par les petits ARN régulateurs cognats sauf lorsque ces

Discussion

derniers possèdent un site de fixation à Hfq complémentaire à celui qui est présent sur l'ARNm. La construction de petits ARN régulateurs sur le même principe a montré un résultat similaire. Finalement, les ARNm chimères non régulés par les petits ARN régulateurs conventionnels arrivent à être régulés par des petits ARN chimères ayant à la fois une séquence d'appariement et un site de fixation à la protéine Hfq complémentaire. Ces différentes analyses ont été confirmées en partie lors de nos expériences d'interactions *in vitro*. En effet, lors de ces expériences, nous n'avons pu obtenir la formation de complexe ternaire ARNm / Hfq / petits ARN régulateurs qu'en présence de tous les attributs requis : site d'appariement ARN / ARN et site de fixation à Hfq complémentaire. Ces différentes conclusions ont été également obtenues dans une étude réalisée en parallèle par une autre équipe [472].

Bien que nous ayons montré que la nature des sites de fixation de la protéine Hfq soit importante pour obtenir une régulation optimale des ARNm, il n'en reste pas moins que cette dernière ne semble pas essentielle pour autant aux vues des différents résultats que nous avons pu obtenir avec les souches dérivées de l'ARNm *yifK* ayant la séquence d'appariement de l'ARNm *chiP*. En effet, dans ces souches, le petit ARN régulateur ChiX inhibe la traduction de l'ARNm cible, quelle que soit la séquence du site de fixation à Hfq. Pourtant, cette régulation est moins efficace lorsque les sites de fixations des ARN sont incompatibles. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que ChiX est le petit ARN régulateur ayant le plus d'affinité pour la protéine Hfq. Il est donc fortement probable que, dans la cellule, une grande quantité de protéine Hfq sous forme hexamérique se retrouve donc liée au petit ARN ChiX. Ce dernier, protégé par Hfq, pourrait interagir avec les ARNm cibles sans que ces derniers interagissent eux même avec la protéine Hfq. En effet, les expériences réalisées avec les souches *yifKP* dont le site de fixation à Hfq est de même nature que celui de ChiX (ayant un motif (AAN)_n) sont régulées de manière équivalente aux mêmes souches dont le site de fixation à Hfq a été supprimé

Un autre cas particulier est celui du petit ARN régulateur RyhB et de ses dérivés. Ces derniers sont capables d'induire une très forte régulation des ARNm cibles, quelle que soit la nature du site de fixation de ceux-ci. Pourtant, nous avons pu confirmer que RyhB interagit avec la face proximale de la protéine Hfq par des expériences de mutagenèse de la protéine où des mutations sur cette face entraînaient une diminution de la quantité du petit ARN régulateur. Or, dans les expériences avec le rapporteur traductionnel *lacZ*, l'inhibition de la traduction de ce dernier est aussi efficace dans les souches portants *yifKP1* présentant un site

Discussion

de fixation à Hfq de type polyU que dans les souches portant *yifKP2* ayant un site au motif (AAN)₃. L'ensemble de nos résultats dans cette étude semble nous suggérer que les résultats que nous obtenons dans ces constructions seraient dus à un fort différentiel d'expression entre nos petits ARN régulateurs et les ARNm cibles. En effet, *yifK* est faiblement exprimé dans la cellule alors que RyhB, au contraire, est beaucoup plus fortement exprimé. Ces différences d'expressions pourraient induire un si fort ratio petit ARN / ARNm que, même en présence de site d'Hfq incompatible, nous obtenions une très forte régulation de l'ARNm. De plus, la faible régulation de l'ARNm *chiP* par RyhBX peut s'expliquer par le même mécanisme. En effet, l'expression de *chiP* est beaucoup plus forte que celle de *yifK* diminuant d'autant le ratio petit ARN / ARNm.

Nous nous sommes également intéressés, au cours de cette étude, au rôle du domaine C-terminal de la protéine Hfq dans la régulation des ARNm par les petits ARN régulateurs. La fonction de ce domaine de la protéine Hfq reste encore nimbée d'un certain mystère. Les différentes études réalisées ont montré que ce domaine jouerait un rôle dans la régulation des ARNm par les petits ARN régulateurs, notamment dans les interactions intramoléculaires [461,473]. Il a également été montré qu'il jouait un rôle dans la localisation cellulaire de la protéine [460]. Nos résultats confirment en partie ce qui avait pu être montré précédemment. En effet, en présence de la délétion totale du domaine C-terminal de la protéine Hfq, nous observons une diminution de la régulation de nos ARNm rapporteurs cibles par leurs petits ARN régulateurs respectifs. De façon surprenante, la majorité des effets de cette délétion est relativement faible sur ces régulations.

En plus d'analyser les effets de la délétion du domaine C-terminal, nous avons également voulu savoir si le remplacement de ce domaine par des différents épitopes FLAG impacterait nos régulations. Les analyses réalisées dans ces contextes nous ont clairement montré que, dans la majorité des cas, la présence d'une séquence en C-terminal autre que celle qui est présente nativement impactait plus ou moins fortement la capacité des ARNm à être régulés par les petits ARN régulateurs. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'en présence d'une nouvelle queue C-terminal, nous pouvons créer un encombrement empêchant la fixation correcte de nos ARN sur la protéine et ainsi modifier la régulation de ces derniers.

2. Étude de la terminaison prématurée Rho-dépendante.

Lors de la seconde partie de ces travaux réalisés au cours de la thèse, nous avons pu identifier et décrire un nouveau mécanisme d'action des petits ARN régulateurs dans la régulation des ARNm : un phénomène de polarité Rho-dépendant [306]. En effet, lors de la régulation de l'ARNm *chiPQ* par le petit ARN ChiX, ce dernier s'apparie à l'ARNm au niveau de la séquence SD de *chiP* provoquant ainsi l'inhibition de sa traduction. Cette inhibition est due à l'incapacité des ribosomes à se lier à l'ARNm. Cette liaison entre les deux ARN entraînent un découplage de la transcription / traduction laissant l'ARNm en cours de synthèse libre de tout ribosome. Cela permet à la protéine Rho de se lier à un site *rut* cryptique présent dans la séquence codante de l'ARNm *chiP* et d'entraîner une terminaison prématurée de la transcription de l'ARNm *chiPQ* Rho-dépendante NusG-dépendante. Ce mécanisme permet à la fois de contrôler l'expression de l'ensemble des gènes présents sur un même opéron en stoppant sa synthèse prématurée, mais permet également à la cellule de réaliser une forte économie d'énergie en évitant de synthétiser l'ensemble de l'opéron aussi bien au niveau de la transcription que de la traduction. Ce nouveau type de régulation des ARNm par les petits ARN régulateurs, au moment de sa découverte, était un cas particulier. Nous avons donc voulu savoir si nous étions capables de trouver un autre exemple de régulation similaire. Pour ce faire et en s'appuyant sur la littérature ainsi que les données présentes au laboratoire, nous avons sélectionné un autre opéron qui semblaient répondre à nos différents critères : l'opéron *dppABCD* régulé par le petit ARN GcvB.

Les différentes expériences que nous avons réalisées sur cette régulation ne nous ont donné aucun résultat probant pouvant confirmer ou infirmer notre hypothèse. Pire, la mise en place de nos différents rapporteurs dans la région intergénique entre *dppA* et *dpnt* a conduit à la formation d'un site *rut* artificiel. Ce site *rut*, présent en amont de nos constructions a perturbé le bon déroulement de nos expérimentations en induisant des terminaisons de la transcription Rho-dépendante en amont du rapporteur transcriptionnel *lacZ*. Lors de nos analyses complémentaires, nous avons pu identifier les origines de ce site *rut* qui remonte à la construction préliminaire à ces expériences. En effet, ce site *rut* est présent au sein de la séquence du plasmide pKD3, et plus précisément au cœur du premier site FRT du module FRT-*cat*-FRT. Ce module ayant servi de matrice à la construction de notre système

Discussion

rapporteur, nous avons involontairement biaisé les résultats que nous avons obtenus lors de cette étude.

Les résultats obtenus ne nous ont pas permis d'infirmer ou de confirmer notre hypothèse de départ. En effet, nos résultats ne semblent pas indiquer la présence d'un site *rut* fonctionnel au sein de *dppA*. Pourtant, comme il a été montré, l'expression de l'ensemble de l'opéron *dppABCDF* est réprimée par la fixation de GcvB [463]. Le phénomène à l'origine de cette régulation reste donc à identifier et le mécanisme de polarité reste une explication valable pour cette régulation. Il reste donc à rechercher, sur les différents gènes de l'opéron, les sites *rut* potentiels pouvant conduire à ce type de régulation. De plus, Il existe au sein de la cellule encore un grand nombre d'opérons régulés par des petits ARN régulateurs. Parmi ces derniers, il a été montré que la régulation de l'opéron *galETKM* par le petit ARN régulateur Spot 42 chez *E.coli* est liée à un phénomène de polarité transcriptionnel [474]. En effet, la liaison du petit ARN Spot 42 dans la région intergénique entre *galT* et *galK* au niveau de la séquence SD de *galK* entraîne l'inhibition de la traduction de ce dernier, mais également une terminaison prématurée de la transcription Rho-dépendante inhibant également l'expression de *galM*. Dans ce cas, nous pouvons observer que la régulation de l'opéron *galETKM* affecte principalement les deux derniers gènes de l'opéron laissant les gènes *galE* et *galT* exprimés normalement par la cellule. Il semble donc que le phénomène de polarité lié à la régulation d'un ARNm par un petit ARN régulateur que nous avons découvert ne soit pas un cas unique, mais que nous pouvons certainement le retrouver dans la régulation d'un grand nombre d'opérons.

En parallèle de cette étude, nous avons également étudié la régulation de l'opéron *pgaABCD*. Les données obtenues sur cet opéron nous laissaient supposer que le petit ARN McaS se liait à la région 5'UTR de l'ARNm au niveau d'un site *rut* putatif. Or les différentes expériences que nous avons réalisées sur la régulation de cet opéron nous ont montré que ce dernier n'était pas directement régulé par le petit ARN McaS, mais par la protéine CsrA. CsrA est une protéine régulatrice faisant partie des régulateurs globaux impactant l'expression d'un grand nombre de gènes liés au métabolisme du glucose. Malgré cela, les études qui ont été réalisées ont montré que la régulation de l'opéron *pgaABCD* par la protéine régulatrice CsrA était bien liée à un phénomène d'atténuation de la transcription [475]. Le site *rut* putatif se trouve au sein d'une structure en tige-boucle dans la région 5'UTR de l'opéron *pgaABCD*. Ce site est normalement inactif puisqu'il est prisonnier de la structure en tige-boucle et par conséquent, n'est pas accessible à la protéine Rho. Cette structure en tige-boucle présente

deux sites de fixation de la protéine CsrA permettant à cette dernière de s'y lier. La fixation de CsrA sur cette structure modifie la conformation de la région 5'UTR conduisant à la libération du site *rut* et permettant ainsi au facteur Rho de se lier à ce dernier. Cette liaison entraîne une terminaison prématurée de la transcription Rho-dépendante de l'opéron *pgaABCD*.

3. Caractérisation de la terminaison Rho-dépendante

Lors de la découverte du site *rut* cryptique au sein de la séquence codante du gène *chiP* de l'opéron *chiPQ*, nous avons pu établir que la terminaison liée à ce site était Rho-dépendante ainsi que NusG-dépendante [306]. Au cours de la thèse, nous avons voulu mieux comprendre les caractéristiques des sites *rut* responsables de la terminaison Rho-dépendante. Notre modèle présentait plusieurs points intéressants pour réaliser cette analyse. En effet, nous avons pu, au cours de la thèse, définir sa taille ainsi qu'identifier la séquence minimale requise au bon fonctionnement de ce dernier, c'est-à-dire le site *rut* cœur. De plus, lors d'analyse *in vitro* chez *E.coli*, nous avons pu noter une grande différence dans la terminaison prématurée de l'opéron *chiPQ* induite par le petit ARN ChiX. La terminaison chez *S. Typhimurium* de ce même opéron nécessite la présence de deux facteurs protéiques que sont Rho et NusG alors que, chez *E.coli*, seule la protéine Rho est essentielle à la terminaison Rho-dépendante. Au cours de l'étude, nous avons utilisé ce modèle pour étudier le site *rut* sous deux angles différents. Nous avons voulu définir la distance minimale entre le +1 de transcription et la position du site *rut* pour le recrutement des protéines Rho et NusG ainsi que comprendre les différences entre le site *rut* de *S. Typhimurium* et celui d'*E.coli*.

Lorsque nous avons voulu déterminer la distance minimale nécessaire au bon fonctionnement du site *rut*, il nous a paru évident qu'un problème était présent dans nos constructions. En effet, lors des différentes délétions visant à rapprocher le site *rut* du +1 de transcriptions, nous avons observé une terminaison Rho-dépendante NusG-dépendante quand bien même nous délétions le site *rut* cœur. Cela implique qu'il existe, entre le site *rut* cryptique et la fin du gène *chiP*, un ou plusieurs sites *rut* qui altèrent les résultats de notre analyse. Nous avons donc réalisé une délétion de cette région afin de continuer nos analyses.

Discussion

Dans ce contexte, le site *rut* reste fonctionnel même accolé au +1 de transcription. À l'inverse, lorsque la séquence de ce dernier commence à être supprimé, le site *rut* perd fortement sa capacité à induire une terminaison Rho-dépendante. Ces résultats nous suggèrent qu'il n'existe donc pas de distance minimale et que le facteur Rho ne nécessite pas un long transcrit pour pouvoir se lier à l'ARNm en cours de synthèse. Cela concorde avec l'hypothèse suggérant que Rho est constamment lié à l'ARN polymérase même avant l'initiation de la synthèse de l'ARNm [476]. Cela permettrait à Rho de lier directement le site *rut* de l'ARNm en cours de synthèse à sa sortie du complexe d'élongation transcriptionnel. Ceci pourrait être confirmé ou infirmé par des expériences de terminaison de la transcription *in vitro* en utilisant nos différentes constructions comme matrice.

Lors de cette étude, nous avons également comparé le site *rut* cryptique identifié dans la séquence de l'ARNm *chiP* chez *S. Typhimurium* et *E.coli*. En comparant les séquences de ces sites, il nous est apparu que le site d'*E.coli* possède un taux de C/G supérieur au site de *S. Typhimurium*. Lors de nos expériences, nous avons remplacé la totalité ou une partie du site *rut* de *S. Typhimurium* par celui d'*E.coli*. Ceci nous a permis d'observer qu'en fonction de nos différents remplacements, nous obtenons une gamme d'efficacité et de sensibilité variables. Plus le site *rut* se rapproche de celui d'*E.coli* est plus la terminaison Rho-dépendante est efficace et moins il est dépendant de la protéine NusG. De plus, à l'inverse de ce que nous avons observé chez *S. Typhimurium*, le site *rut* cœur d'*E.coli* est suffisant pour initier une terminaison Rho-dépendante efficace même accolée au +1 de transcription. Il semble donc que le taux de C/G joue un rôle beaucoup plus important que simplement définir le site *rut*. Il semble jouer un rôle dans l'efficacité de la terminaison. Ceci pourrait s'expliquer facilement en considérant qu'un meilleur taux de C/G permet une reconnaissance du site *rut* plus optimal par Rho. De plus, ce recrutement plus efficace pourrait conduire à diminuer le rôle du facteur NusG dans le processus de terminaison de la transcription.

Matériels et Méthodes

1. Matériel

1.1) Conditions de cultures

Toutes les souches utilisées lors de cette thèse sont dérivées de *Salmonella enterina* serovar Typhimurium. La liste des souches utilisée est compilée dans l'annexe 1 par thématique. Les bactéries ont été cultivées dans du milieu LB broth solidifié par addition de 1.5 % d'agar Difco au besoin [477]. Dans certaines conditions, le milieu LB a été agrémenté avec 0.02 % d'arabinose. Les antibiotiques utilisés ont été ajoutés aux concentrations finales suivantes : Chloramphénicol, $10\mu\text{ g.mL}^{-1}$; monosulfate de Kanamycine, $50\mu\text{ g.mL}^{-1}$; Ampicilline sodique, $75\mu\text{ g.mL}^{-1}$; Spectinomycine disodique, $80\mu\text{ g.mL}^{-1}$; et Tétracycline hydrosodique, $25\mu\text{ g.mL}^{-1}$. Les boîtes LB X-gal contiennent $40\mu\text{g.mL}^{-1}$ de 5-bromo -4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (Sigma-Aldrich) et les boîtes MacConkey agar contenant 1 % de lactose ont été utilisés pour contrôler l'expression du gène *lacZ* dans les colonies bactériennes [478]. Les cultures liquides ont poussé dans un agitateur tournant et la croissance a été contrôlée par une mesure de la densité optique à 600nm.

1.2) Plasmides et ADN matrices

Le plasmide utilisé comme matrice pour amplifier le gène *cat* apportant la résistance au chloramphénicol lors des PCR pour la recombinaison médiée par λ -Red est pKD3 [464]. Le plasmide pCP20, contenant la Flp recombinase a été utilisé au besoin pour enlever des cassettes de résistance aux antibiotiques entourés de site FRT ou pour permettre l'intégration du plasmide pCE37 [479]. Ce dernier a été utilisé pour créer des fusions chromosomiques de *lacZ* avec nos gènes d'intérêts [454]. L'ADN chromosomique de la souche MA3397 a été utilisé comme matrice pour amplifier le module *tetAR* dans la première étape du protocole de recombinaison sans cicatrice [480].

1.3) Constructions de souches

1.3.1) Étude de la régulation des ARNm par les petits ARN régulateurs :

Rôle des sites de fixation d'Hfq

1.3.1.1) Constructions des ARNm chimères

Les ARNm chimères ont été réalisés en suivant le protocole de recombinaison sans cicatrice et leurs structures sont représentées dans l'annexe 1. Le module *tetAR* a été amplifié à partir de la souche MA3397 avec les couples d'oligonucléotides L44-L45 et G44-G45 puis insérer dans les souches 10115 et 10280 contenant respectivement *chiP::lacZ* et *yifK::lacZ*. Par la suite, le module *tetAR* a été remplacé par recombinaison avec le produit de PCR obtenues avec les couples d'oligonucléotides L36-L37, L38-L39, L40-L41, R32-R33 et R35-R36 pour produire respectivement les souches MA11437 (*chiPK*), MA11438 (*chiPA*), MA11439 (*chiPB*), BG295 (*yifKB*) et BG297 (*yifKN*).

1.3.1.2) Constructions des petits ARN régulateurs chimères

Les petits ARN régulateurs chimères ont été réalisés en suivant le protocole de recombinaison sans cicatrice et leurs structures sont représentées dans l'annexe 2. Les chimères dérivées de ChiX et GcvB ont été construites à partir de la souche MA7455. Les chimères dérivées de RyhB ont été construites dans la souche MA11665. Le module *tetAR* a été amplifié à partir de la souche MA3397 par PCR et introduit dans la souche MA7455 pour les couples d'oligonucléotides K86-K87, K88-K89 et dans la souche MA11665 pour le couple d'oligonucléotides K90-K91. Par la suite, le module *tetAR* a été remplacé par recombinaison avec le produit de PCR obtenues avec les couples d'oligonucléotides L01-L02, L05-L06-M31-M32, L09-L10, N24-N25 et N22-N23 pour produire respectivement les souches MA11399 (ChiXG), MA11400 (ChiXR), MA11619 (GcvBX), MA11398 (GcvBB) MA11689 (RyhBX) et MA11682 (RyhBB).

1.3.1.3) Modifications des sites de fixation d'Hfq des souches yifKP1 et yifKP2

Les ARNm *yifKP4* et *yifKP5* ont été réalisés en inversant respectivement le site de fixation des ARNm *yifKP1* et *yifKP2* en suivant le protocole de recombinaison sans cicatrice 2.4.2. Le module *tetAR* a été amplifié à partir de la souche MA3397 avec les couples d'oligonucléotides O66-O67 et O69-O82 puis insérée dans les souches BG233 et BG253 contenant respectivement *yifKP1::lacZ* et *yifKP2::lacZ*. Le module a été remplacé par

Matériels et Méthodes

recombinaison dans ces souches avec les produits de PCR obtenus avec les couples d'oligonucléotides O71-O72 et O73-O74 pour produire respectivement les souches BG236 (*yifKP4*) et BG255 (*yifKP5*).

1.3.1.4) Délétions du domaine C-terminal d'Hfq.

Les délétions du domaine C-terminal de la protéine Hfq $\Delta 70-98$ et $\Delta 70-102$ ont été réalisés suivant le protocole recombinaison λ -red. Le gène *cat* a été amplifié par PCR à l'aide des couples d'oligonucléotides K27-H80 à partir de la souche 10714 et K28-H80 à partir du plasmide pKD3 respectivement. Ces produits de PCR ont été insérés dans la souche MA7455 pour former les souches MA11226 (*hfq $\Delta 70-98$ -cat*) et MA11244 (*hfq $\Delta 70-102$ -cat*).

1.3.1.5) Remplacement du domaine C-terminal d'Hfq par une séquence FLAG.

Les remplacements du domaine C-terminal de la protéine Hfq par une séquence FLAG simple ou 3xFLAG ont été réalisés suivant le protocole recombinaison λ -red. Le gène codant l'épitope FLAG-*cat* et celui l'épitope 3xFLAG-*cat* ont été amplifiés par PCR à partir de la souche 11231 et à l'aide des couples d'oligonucléotides U80-U82 et U81-U82 respectivement. Ces produits de PCR ont été insérés dans la souche BG435 contenant le rapporteur *yifKP1* ainsi que le petit ARN régulateur RyhBX pour former les souches BG620 (*yifKP1::lacZ RyhBX $\Delta fur \Delta ChiX \Delta IsrE hfq\Delta 72-102$ -FLAG-cat*) et BG621 (*yifKP1::lacZ RyhBX $\Delta fur \Delta ChiX \Delta IsrE hfq\Delta 72-102$ -3xFLAG-cat*).

1.3.2) La répression de l'opéron *dppABCDF* de *S. Typhimurium* par GcvB implique-t-elle un mécanisme de polarité Rho-dépendant ?

1.3.2.1) Constructions du rapporteur ARNt^{S.a}

L'ajout des rapporteurs ARNt^{S.a} dans la région intergénique entre *dppA* et *dpnt* a été réalisé suivant le protocole recombinaison λ -red. Le module ARNt^{S.a}/*cat* a été amplifié par PCR à partir de la souche MA11812 et à l'aide des couples d'oligonucléotides K22-J84. Le produit de PCR a été introduit dans les souches MA7455, MA11407 et MA11408 afin de former les souches MA11251 (*dppAB::tDNA^{sa}-cat*), MA11411 (*dppA_{AGG} dppAB::tDNA^{sa}-cat*) et MA11412 (*dppA Δrut dppAB::tDNA^{sa}-cat*).

Matériels et Méthodes

1.3.2.2) Introduction du rapporteur lacZ dans les souches *dppAB::tDNA^{sa}-cat*

Le rapporteur lacZ a été introduit dans les souches MA11251, MA11411 et MA11412 en suivant le protocole : Génération de fusion lacZ dans un site spécifique. Dans un premier temps, les souches ont été transformées avec le plasmide pCP20 et mis dans les conditions pour obtenir l'expression de la FLP-recombinase. Les souches recombinantes, sélectionnées pour leur sensibilité au chloramphénicol, ont été les souches MA11478 (*dppAB::tDNA^{sa}-FRT*), MA11479 (*dppA_{AGG} dppAB::tDNA^{sa}-FRT*) et MA11480 (*dppA Δ rut dppAB::tDNA^{sa}-FRT*). La seconde étape a été l'introduction du plasmide pCE37 contenant le rapporteur lacZ dans ces souches en utilisant le protocole : Préparation et transformation de cellules électrocompétentes pour plasmide. Les souches recombinantes ont été sélectionnées sur milieu LB additionnée de kanamycine pour former les souches MA11481 (*dppAB::tDNA^{sa}-lacZ*), MA11482 (*dppA_{AGG} dppAB::tDNA^{sa}-lacZ*) et MA11483 (*dppA Δ rut dppAB::tDNA^{sa}-lacZ*).

1.3.3) Caractérisation de la terminaison Rho-dépendante

1.3.3.1) Constructions des délétions de la région 5' -UTR de *chiP*

Les différentes délétions de la région 5' -UTR de *chiP* visant à approcher ou supprimer le site *rut* de *chiP* du +1 de transcription du gène ont été réalisées en suivant le protocole de recombinaison sans cicatrice. Le module *tetAR* a été amplifié à partir de la souche MA3397 avec le couple d'oligonucléotides I74-I75 et insérer dans la souche MA10253 contenant la fusion rapportrice *chiQ::lacZ*. Le module a été remplacé par recombinaison dans la souche MA10937 avec les produits de PCR obtenus avec les couples d'oligonucléotides L32-L33, L30- L31, M52-M53 et M54-M55 pour produire respectivement les souches MA11410 (*chiP Δ 181*), MA11409 (*chiP Δ 266*), MA11552 (*chiP Δ 282*) et MA11553 (*chiP Δ 290*).

1.3.3.2) Délétion de 1045nt au sein du gène *chiP*

La délétion de 1045nt a été effectuée entre le site *rut* de *chiP* et la fin du gène en suivant le protocole de recombinaison sans cicatrice. Le module *tetAR* a été amplifié à partir de la souche MA3397 avec le couple d'oligonucléotides O37-O38 et insérer dans la souche BG221. Par la suite, le module *tetAR* a été remplacé par recombinaison avec le produit

Matériels et Méthodes

de PCR obtenu avec le couple d'oligonucléotides J23-J49 qui a été inséré dans la souche MA11126. La souche ainsi formée porte le numéro MA11144.

1.3.3.3) Remplacement du site *rut* cryptique de *S. Typhimurium* de *chiP* par celui d'*E.coli*.

Les différents remplacements du site *rut* cryptique de *S. Typhimurium* de *chiP* par celui d'*E.coli* ont été réalisés en suivant le protocole de recombinaison sans cicatrice. Le module *tetAR* a été amplifié à partir de la souche MA3397 avec le couple d'oligonucléotides I76-I77 et insérer dans la souche MA11116. Cette souche est caractérisée par une fusion rapportrice *chiQ::lacZ* ainsi que par l'allèle *chiP_{AGG}* inhibant la traduction de *chiP*. Par la suite, le module *tetAR* a été remplacé par recombinaison avec le produit de PCR obtenues avec les couples d'oligonucléotides L28-L29 et K18-K19 pour produire respectivement les souches MA11429 (*chiP rutEC40*) et MA11224 (*chiP rutEC119*).

1.3.3.4) Construction de la souche *chiPΔ282 rutEC119 chiQ::lacZ*

La délétion de 282nt entre le +1 de transcription de *chiP* et le site *rutEC119* a été réalisée en suivant le protocole de recombinaison sans cicatrice. Le module *tetAR* a été amplifié à partir de la souche MA3397 avec le couple d'oligonucléotides C29-I15 et insérer dans la souche MA11711. Cette souche est caractérisée par une fusion rapportrice *chiQ::lacZ* ainsi que par la présence de l'allèle *rutEC119* du gène *chiP*. Par la suite, le module *tetAR* a été remplacé par recombinaison avec le produit de PCR obtenu avec le couple d'oligonucléotides N47-N48 pour produire la souche MA11720 (*chiPΔ282 rutEc119 chiQ::lacZ*).

1.3.3.5) Délétion de 1045nt au sein dans le contexte *chiP rutEC119*

La délétion de 1045nt a été effectuée entre le site *rut* de *chiP rutEC119* et la fin du gène en suivant le protocole de recombinaison sans cicatrice. Le module *tetAR* a été amplifié à partir de la souche MA3397 avec le couple d'oligonucléotides J76-J78 et insérer dans les souches MA11711 et MA11738. Par la suite, les modules *tetAR* ont été remplacés par recombinaison avec le produit de PCR obtenues avec le couple d'oligonucléotides J23-J49 pour produire les souches MA11807 (*chiP_{AGG} rutEC119 chiPΔ1045 chiQ::lacZ*) et MA11808 (*chiPΔ282 rutEC119 chiPΔ1045 chiQ::lacZ*).

2. Techniques génétiques

2.1) Transduction généralisée

P22 est un bactériophage tempéré qui infecte *Salmonella* en se liant à l'antigène O, faisant partie des lipopolysaccharides de la membrane externe. Après l'infection, le chromosome de P22 se circularise par recombinaison entre les parties terminales redondantes de chaque extrémité de l'ADN phagique. Durant la phase lytique, le génome circulaire de P22 réalise plusieurs cycles de réplifications θ (tetha) puis effectue ensuite des réplifications en cercle roulant. Ce type de réplification produit de longs concatémères d'ADN doubles brins de P22. Ces concatémères sont empaquetés dans la tête du phage par un mécanisme dit « tête pleine » : le remplissage est initié à une séquence spécifique de l'ADN nommé site *pac*, puis une nucléase induit une découpe du concatémère tous les 48Kb [481]. Étant donné que la taille du génome de P22 est seulement de 44Kb, cela permet la redondance des extrémités terminales du phage P22. Cet ADN double brin linéaire est empaqueté dans une nouvelle particule virale. Quand la cellule entre en lyse, elle relâche entre 50-100 nouveaux phages. Ils existent des séquences dans le chromosome de *Salmonella* qui sont homologues aux sites *pac* de P22. Quand le phage infecte la bactérie, la nucléase de P22 coupe occasionnellement un de ses sites chromosomiques et empaquète un fragment de 48Kb de l'ADN chromosomique dans la tête d'un phage P22. Cette particule virale P22 transporte un fragment d'ADN chromosomique (particule transductible) et peut injecter cet ADN dans un nouvel hôte. L'ADN peut ensuite recombiner dans le chromosome par recombinaison homologue. Afin d'augmenter l'efficacité de ce processus, la majorité des laboratoires utilisant la transduction par P22 utilise la souche P22 HT105/1 int -201, un mutant de P22 très utile pour réaliser la transduction généralisée [482]. Ce phage a une forte fréquence de transduction (FT) à cause d'une nucléase ayant une spécificité amoindrie pour les sites *pac*. Environ 50 % des têtes des P22 transportent des fragments aléatoires transductibles d'ADN chromosomique. La mutation *int* empêche la formation de phage lysogène stable.

2.1.1) Préparation du lysat transducteur

P22 est utilisé comme outils de transductions, mais pour ce faire, un lysat transducteur doit être réalisé pour pouvoir faire les transductions. La souche à transduire est mise en culture jusqu'en phase exponentielle de croissance puis 500 μ L de cette culture sont ajoutés à 2.5mL de milieu LB phagique. La culture est poursuivie sur la nuit à 37°C sous agitations. Le

Matériels et Méthodes

matin, les bactéries sont éliminées par une centrifugation de 6min à 4000g et le surnageant est stérilisé avec 300 μ L de chloroforme.

Milieu LB phagique : 1X milieu LB, 0.02 % glucose, 2 % E50X, 10^{E8} P22/mL

E50X: 40mM MgSO₄, 0.52M Acide citrique, 3,7M KH₂PO₄, 1M NaNH₄HPO₄, 0.3 % chloroforme

2.1.2) Protocole de transduction

Les lysats de P22 sont utilisés dilués au 1:50, mélangés avec une aliquote venant d'une culture de nuit de la souche bactérienne réceptrice à un ratio de 1:2, ce mélange est incubé 30min à 37°C avant d'être mis sur milieu sélectif. Les colonies transductantes sont purifiées par deux passages séquentiels sur milieu sélectif. La non-contamination par le phage des transductants est vérifiée par un striage sur boîtes Evans Blue Uranine [483].

2.2) Ingénierie du chromosome

2.2.1) Préparation et transformation de cellules électrocompétentes

Une culture de bactérie voulant être rendue électrocompétente est mise en culture jusqu'en phase exponentielle de croissance dans 3mL de milieu LB. 2mL de cette culture est prélevé puis le milieu est retiré par centrifugation pendant 2.5min à 14kg et à une température de 4°C. Les bactéries sont ensuite lavées trois fois avec 1,8mL de glycérol 10 % froid. À la fin des lavages, le culot est repris dans 50 μ L de glycérol 10 % froid. Le plasmide voulu est ajouté aux bactéries électrocompétentes. Ces dernières sont ensuite immédiatement électroporées au moyen d'un MicroPulser™ Electroporator (Bio-rad) en suivant le protocole du fabricant. Les bactéries ainsi traitées sont aussitôt diluées dans 1mL de milieu SOCS et mises à récupérer à 30 ou 37°C suivant le plasmide pendant 1H. Ensuite, elles sont étalées sur boîtes contenant l'antibiotique approprié.

Milieu SOCS : 50 % milieu stock 2X, 50 % milieu sels 2X

Milieu Stock 2X : 4 % de bactotryptone, 1 % d'extrait de levure, 0.7 % de glucose

Milieu Sels 2X : 20mM NaCl, 5mM KCl, 20mM MgCl₂, 20mM MgSO₄

2.2.2) Méthode de recombinaison médiée par λ Red.

L'ingénierie du chromosome est réalisée par la méthode de recombinaison médiée par λ Red en accord avec le protocole de Datsenko et Wanner [464]. Le fragment d'ADN donneur est généré par PCR en utilisant soit un plasmide ou soit une matrice d'ADN chromosomique.

Matériels et Méthodes

Les oligonucléotides utilisés comme amorce dans cette étude sont présentés dans l'annexe 2. Les fragments d'ADN amplifiés sont électroporés dans la souche appropriée portant le plasmide à réplication conditionnelle pKD46, qui possède l'opéron λ Red sous le contrôle du promoteur NTAD [464]. Les bactéries ayant pKD46 ont été cultivées à 30°C en présence d'ampicilline et mises en présence d'arabinose (0.02 %) pendant 3H avant de les préparer suivant le protocole d'électrocompétence λ -red. Les colonies recombinantes sont sélectionnées sur milieu LB additionné de l'antibiotique adapté. Les constructions sont ensuite vérifiées par PCR et/ou par séquençage de l'ADN.

2.2.2.1) Préparation et transformation de cellule électrocompétente λ -red

La préparation de cellule électrocompétente λ -red se réalise à partir d'une culture bactérienne ayant poussé toute la nuit dans du LB additionnée de 0.01 % d'ampicilline à 30°C. Le matin, les bactéries sont mises en culture diluée au 1:100 jusqu'en phase exponentielle de croissance dans 35mL de milieu LB additionnée de 0.02 % d'arabinose et de 0.01 % d'ampicilline à 30°C. La totalité de la culture est centrifugée à 4°C pendant 5min à 7500rpm. Les bactéries sont lavées par trois lavages avec un volume successif de 35mL, 17.5mL et 9mL de glycérol 10 % froid dans les mêmes conditions de centrifugation. Le culot est finalement repris dans 120 μ L de glycérol 10 % froid. 5 μ L de produit de PCR préalablement purifié est ajouté à 50 μ L de bactéries électrocompétentes λ -red. Les bactéries sont ensuite immédiatement électroporées au moyen d'un MicroPulser™ Electroporator (Bio-rad) en suivant le protocole du fabricant. Les bactéries ainsi traitées sont aussitôt diluées dans 1mL de milieu SOCS et mises à récupérer à 30 ou 37°C suivant les besoins pendant 1H. Ensuite, elles sont étalées sur boîtes adaptées.

2.2.3) Variation sur la technique de recombinaison λ Red

2.2.3.1) Recombinaison sans cicatrice

La modification sans cicatrice des séquences de l'ADN chromosomique au niveau d'une paire de base a été obtenue à partir du protocole de recombinaison en deux étapes [484]. La procédure demande : 1) Insérer le module *tetAR*, produit par PCR, au niveau du site chromosomique a modifié et 2) Remplacer le module *tetAR* par un fragment d'ADN apportant le changement escompté en utilisant une sélection positive des recombinants sensible à la tétracycline sur milieu Bochner [485]. Précisément, le fragment d'ADN de la seconde étape a

été obtenu par PCR en utilisant des amorces contenant une complémentarité du côté 3' entre elles permettant d'initier la synthèse d'un fragment d'ADN.

Milieu Bochner-Maloy : 5g.L⁻¹ Bacto tryptone, 5g.L⁻¹ Yeast Extracts, 170mM NaCl, 7mM NaH₂PO₄, 50mg.L⁻¹ chlorotetracycline, 0.1mM ZnCl₂, 12mg.L⁻¹ Acide Fusarique.

2.2.4) Génération de fusion *lacZ* dans un site spécifique

Lors des constructions utilisant les plasmides pKD3, pKD4 et pKD13, la cassette de résistance à l'antibiotique est entourée de sites FRT en orientation directe qui permettent de l'éliminer par recombinaison entre ces deux sites en présence de la FLP-recombinase. Celle-ci est amenée par transformation avec le plasmide pCP20 [479]. Il est alors possible d'intégrer les plasmides pCE36, pCE37 ou pCE40 dans le site FRT unique restant pour générer des fusions *lacZ* chromosomiques.

Les souches dérivées des plasmides mentionnés ci-dessus sont rendues électrocompétentes suivant le protocole 2.2.1 et transformées avec le plasmide pCP20. Les cellules transformantes sont étalées sur milieu LB additionné d'ampicilline et placé à 30°C. Les colonies sont ensuite repiquées sur milieu LB additionné d'ampicilline et milieu LB additionné de chloramphénicol et placé à 30°C. Les transformants sensible au chloramphénicol sont sélectionnés et rendus électrocompétentes suivant le protocole 2.2.1 et transformé avec le plasmide pCE37. Les cellules transformantes sont étalées sur milieu LB additionné de kanamycine et placé à 37°C.

3. Techniques Biochimiques

3.1) Dosage de l'activité β -galactosidase

Pour les mesures en phase exponentielle de croissance, une culture de nuit est diluée au 1:100 et remise en culture jusqu'à une $DO_{600nm} \approx 0.4$. À ce moment, 1mL de culture est prélevé, centrifugé 1min à 14Kg et le culot est repris dans 1mL de tampon NTS. En phase stationnaire de croissance, les mesures sont réalisées à partir d'une culture de nuit dont 1mL est prélevé et préparé comme expliqué précédemment. 100 μ L de bactéries en NTS (Vb) sont prélevés et placés dans un tube en verre contenant 900 μ L de tampon Z. À ce mélange est ajouté 50 μ L de SDS 0.1 % et 100 μ L de chloroforme puis les tubes sont vortexés pendant 10 secondes. Les tubes sont placés dans un bain-marie à 28°C pendant 5 minutes. Le dosage commence par l'ajout de 0.2mL d'*ortho*-Nitrophénol - β -galactoside (ONPG) frais à 4mg.mL⁻¹. Le temps zéro (t₀) de chaque tube est enregistré. Après une coloration jaune suffisante, la réaction est stoppée par l'ajout de 0.5mL d'une solution 1M de Na₂CO₃ et le temps final (t_f) est noté. Les bactéries sont retirées par centrifugation et le surnageant est utilisé pour lire la DO à 420nm.

L'activité β -galactosidase est calculée comme suit :
$$\frac{1000 \times DO_{420nm}}{(t_f - t_0) \times V_b \times DO_{600nm}} [486].$$

Tampon NTS 10X pH7.4 : 1.4M NaCl, 27mM KCl, 80mM Na₂HPO₄, 20mM KH₂PO₄

Tampon Z : 60mM Na₂HPO₄, 40mM NaH₂PO₄, 10mM KCl, 1mM MgSO₄, 50mM β -mercaptoéthanol.

4. Techniques de Biologie Moléculaire

4.1) Extraction d'ARN

Les ARN totaux sont extraits en phase exponentielle de croissance suivant la méthode dite du phénol chaud adapté du protocole de [487]. 2mL d'une culture de nuit ou 4mL d'une culture bactérienne en phase exponentielle de croissance ($DO_{600nm} = 0.35$) sont centrifugés et le culot est repris dans 600 μ L de tampon REB. Les bactéries sont mélangées à 600 μ L de phénol acide chauffé à 65°C et mélangé 5min à 1700rpm et 65°C dans un thermomixer (Eppendorf) puis placé 5min dans la glace. Le tube est ensuite centrifugé 3min à 14kg et le surnageant est placé dans 550 μ L de tampon PCI. Ce mix est mélangé 3min à 1700rpm puis incubé 3min dans la glace. Il est à nouveau centrifugé 3min à 14kg et le surnageant est

Matériels et Méthodes

mélangé à 500µL de chloroforme pendant 2min à 1700rpm. Le mix est incubé 3min dans la glace puis centrifugées 3min à 14kg. Le surnageant est mélangé à 1/10 de son volume d'acide acétique 3M pH4.8 puis 2.5 volumes d'éthanol 95 % froid est incorporé au mix. Après une incubation d'une nuit à -20°C, les ARN sont centrifugés à 14kg pendant 15min à 4°C. Le culot est séché 10min à l'aide d'un speedvac (Eppendorf) puis repris dans 15µL d'eau pure. Les ARN totaux sont finalement quantifiés à l'aide du NanoDrop 2000 (ThermoFisher).

Tampon REB : 20mM Acétate de Sodium pH5.0 et 10 % Saccharose.

Tampon PCI : 50 % Phénol, 48 % chloroforme et 2 % Acide isoamylique.

4.2) Analyse des ARN par Northern Blot.

Les ARNs totaux sont analysés par la technique de Northern Blot en conditions dénaturantes. L'étude des petits ARN régulateurs, de l'ARNt^{S.aureus} et des ARNm-mini se fait à l'aide de gel de polyacrylamides et celle des ARNm se fait à l'aide de gel d'agarose. L'analyse des petits ARN se fait dans un gel de polyacrylamide 8 % – Urée 8M dans un tampon TBE 1X. 10mg d'ARN totaux sont mélangés à un ratio 2 : 1 avec du bleu ARN III puis chauffé 3' à 55°C avant d'être chargé sur gel. La migration est réalisée à 380V dans du tampon TBE 1X pendant un temps adapté à la taille des ARN. Les ARN sont ensuite transférés sur une membrane Hybond-N+ (Amersham) dans des conditions semi-sec à l'aide du TransBlot SD (Bio-Rad). Ce transfert s'effectue dans du tampon TBE 0.5X pendant 1H avec à une intensité adaptée. L'analyse des ARNm se fait à l'aide d'un gel d'agarose 1.3 % – Formaldéhyde 2.2M dans du tampon MOPS 1X. 10mg d'ARN totaux sont mélangés à un ratio 1 : 2 avec du bleu ARN II puis chauffé 3' à 55°C avant d'être chargé sur gel. Le transfert de ces ARN se fait sur une membrane Hybond-N+ en utilisant une machine de transfert sous vide (Boekel/Appligene) à l'aide de tampon SSC 10X pendant 1H. Les ARN sont ensuite crosslinkés à la membrane par des radiations UV en utilisant le Stratalinker 2400 (Stratagene) en suivant les recommandations du constructeur. Les membranes sont placées dans un tube à hybrider, préhybridés 30min dans le tampon d'hybridation des oligonucléotides (Ambion) à 45-50 °C dans un four à hybrider () et finalement hybridés avec des oligonucléotides radiomarqués (Tableau 2) dans ce même tampon en suivant le protocole fournit par Ambion. Après une nuit à hybrider, la membrane est ensuite lavée avec 30mL de tampon de lavage et cette étape est répétée quatre fois. La membrane est mise en contact avec un écran amplificateur de signal dans l'obscurité puis après une exposition suffisante, cet écran est

Matériels et Méthodes

révélé à l'aide du phosphoimager Storm (GE Healthcare). Les ARN sont ensuite quantifiés à l'aide du logiciel ImagQuant.

Tampon TBE 10X : 0.9M Tris, 0.9M Acide Borique, 20mM EDTA

Tampon MOPS 10X : 0.2M MOPS pH 7.0, 80mM d'acétate de sodium, 10mM EDTA pH8.0

Tampon SSC 20X : 3M NaCl, 0.3M Citrate de Sodium

Tampon de lavage : 2X SSC, 0.5 % SDS

Tampon de charge Blue ARN II : 71 % Formamide, 7 % Formaldéhyde, 7 % MOPS 10X, 15 % Blue ADN II.

4.3) Radiomarquage des oligonucléotides.

Les oligonucléotides déphosphorylés sont radiomarqués à leur extrémité 5' en présence de 10U de T4 polynucléotide Kinase (New England Biolabs) et 30 μ Ci de [γ -³²P] -ATP (3 000 mCi.mmol⁻¹, amersham) pendant 1H à 37°C dans 10 μ L. Après marquage, 40 μ L d'eau est rajouté au mix et le tout est centrifugé dans des colonnes chromatographiques Micro-Bio Spin 6 (Bio-Rad) afin d'éliminer les nucléotides radioactifs non incorporés.

4.4) Transcription et radiomarquage *in vitro* d'ARN.

Les matrices pour les transcriptions *in vitro* sont réalisées à partir de produit de PCR utilisant des amorces ajoutant le promoteur de la T7 polymérase en amont de la séquence à transcrire. Les amorces utilisées sont listées dans la Tableau et . Les produits de PCR sont ensuite dosés au nanodrop. 500mM d'ADN matrice est rajouté au mix de transcription ou au mix de transcription radioactif pour un volume final de 20 μ L. Ce dernier est incubé, 3H30 à 37°C puis 20 μ L de Blue ARN III est ajoutée, et le tout est mis à incuber 3min à 65°C. Le mélange de transcription est purifié sur gel de polyacrylamide 8 % - 8M Urée dans des conditions dénaturantes à 380V pendant un temps adaptés. L'ARN synthétisé non radioactif est observé sur gel à l'aide de la technique de l'UV Shadowing [488]. Cette technique consiste à placer le gel de polyacrylamide entre une plaque de chromatographie sur couche mince préparée préalablement pour être fluorescente aux UV et une lampe UV à 360nm de longueur d'onde. Les ARN présents dans le gel vont absorber une partie des UV émis par la lampe et ainsi former une ombre sur la plaque CCM. Les ARN radioactifs sont quant à eux révélés en exposant la membrane à un écran amplificateur de signal pendant 2min puis en révélant cet écran au phosphoimager. Les ARN ainsi identifiés sont découpés du gel et la bande est placée dans 650 μ L tampons d'éluion et le tout est mis à incuber 1H à 65°C à

Matériels et Méthodes

1000rpm au thermomixer. Le tube est centrifugé et le surnageant est mélangé à 600µL de Phénol acide, mélanger 1min à 1700rpm puis centrifugé 5min à 14kg. Le surnageant est ensuite mélangé à 550µL de tampon PCI, mélangé 1min à 1700rpm et centrifugé 5min à 14kg. Le surnageant est ensuite placé dans 500µL de chloroforme, à nouveau mélangé 1min à 1700rpm et centrifugé 5min à 14kg. Enfin le surnageant est mélangé à 1/10 de son volume d'acide acétique 3M pH4.8 puis 2.5 volumes d'éthanol 95 % froid est incorporé au mix. Après une incubation d'une nuit à -20°C, les ARN sont centrifugés à 14kg pendant 15min à 4°C. Le culot est séché 10min à l'aide d'un speedvac (Eppendorf) puis repris dans 15µL d'eau pure. Les ARN totaux sont finalement quantifiés à l'aide du NanoDrop 2000 (ThermoFisher).

Mix de transcription : 1X Tampon T7 polymérase, 1mM ATP, 1mM CTP, 1mM GTP, 1mM UTP, 5mM DTT, XU T7 polymérase (ThermoFisher).

Mix de transcription radioactif : 1X Tampon T7 polymérase, 1mM ATP, 1mM CTP, 1mM GTP, 0.1mM UTP, 0.05 mM UTP^{α-32P} (3 000 mCi.mmol⁻¹), 5mM DTT, 20U T7 polymérase (ThermoFisher).

Tampon Elution : 0.5M Acétate de Sodium pH5.0, 1mM EDTA, 0.2 % SDS

4.5) Expérience d'interaction ARN : ARN *in vitro* en retard sur gel

Les ARN sont, dans un premier temps, dénaturés à 85°C pendant 2min puis placés à incuber 10min à température et 10min dans la glace afin de refaire leurs repliements. Dans de l'analyse des interactions ARN : Hfq, 1µL d'ARN transcrit *in vitro* et radiomarqué replié à une concentration de 2.5nM est mélangé à 8µL de tampon d'interaction GOD puis 1µL d'eau ou 1µL de protéine Hfq à concentration variable est ajouté au mix. Lors de l'analyse des interactions ARN : ARN, le même protocole de préparation des ARN est utilisé, mais les ARN transcrits *in vitro* sont à 10nM de concentration. Le mélange ARN : eau, ARN : ARN, ARN : Hfq est ensuite mis à incuber 20min à 30°C puis 5µL de Ficoll 12 % est ajouté au mélange comme tampon de charge. L'ensemble est ensuite chargé très délicatement dans un gel de polyacrylamide 6 % en condition native dans du TBE 1X. Les échantillons migrent pendant 2H30 à 200V et à 4°C dans du TBE 1X. Le gel est ensuite séché à 75°C pendant 30min sur un papier Wattman dans un sécheur de gel. Le gel séché est entouré de film safran puis mis en contact avec un écran amplificateur de signal dans l'obscurité. Après une exposition suffisante, cet écran est révélé à l'aide du phosphoimager Storm (GE Healthcare) et les ARN sont ensuite quantifiés à l'aide du logiciel ImagQuant.

Tampon d'interaction GOD : 25 % Tampon EMSA 5X, 0.2µg ARNt de levure (Ambion)

Tampon EMSA 5X : 200mM Tris-HCl pH8.0, 0.75M KCl, 25mM MgCl₂, 1mM DTT, 10 % Glycérol, 0.25 % BSA

4.6) Expérience d'interaction ARN : Hfq : ARN *in vitro* en retard sur gel

Les ARN sont, dans un premier temps, dénaturés à 85°C pendant 2min puis placés à 10°C pendant 10min à température et 10min dans la glace afin de refaire leurs repliements. 1µL d'ARN transcrit *in vitro* radiomarké à 10nM est ajouté à 5.5µL de tampon d'interaction GOD auquel on rajoute 1µL d'eau ou 1µL de protéine Hfq à 0.5µM. Ce mélange est mis à 10°C pendant 5min à 30°C pour former le complexe ARN : Hfq puis 1µL d'eau ou 1µL du second ARN non marqué est ajouté à des concentrations croissantes. Le mélange ARN : Hfq : ARN est ensuite mis à 10°C pendant 20min à 30°C puis 5µL de Ficoll 12 % est ajoutés au mélange comme tampon de charge. L'ensemble est ensuite chargé très délicatement dans un gel de polyacrylamide 6 % en condition native dans du TBE 1X. Les échantillons migrent pendant 2H30 à 200V et à 4°C dans du TBE 1X. Le gel est ensuite séché à 75°C pendant 30min sur un papier Wattman dans un sécheur de gel. Le gel séché est entouré de film safran puis mis en contact avec un écran amplificateur de signal dans l'obscurité. Après une exposition suffisante, cet écran est révélé à l'aide du phosphoimager Storm (GE Healthcare) et les ARN sont ensuite quantifiés à l'aide du logiciel ImagQuant.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. Hellman LM, Fried MG: **Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions.** *Nature Protocols* 2007, **2**:1849-1861.
2. Faner MA, Feig AL: **Identifying and characterizing Hfq-RNA interactions.** *Methods* 2013, **63**:144-159.
3. Prevost K, Salvail H, Desnoyers G, Jacques J-F, Phaneuf E, Masse E: **The small RNA RyhB activates the translation of shiA mRNA encoding a permease of shikimate, a compound involved in siderophore synthesis.** *Molecular Microbiology* 2007, **64**:1260-1273.
4. Ruff EF, Record MT, Jr., Artsimovitch I: **Initial events in bacterial transcription initiation.** *Biomolecules* 2015, **5**:1035-1062.
5. Oglesby-Sherrouse AG, Murphy ER: **Iron-responsive bacterial small RNAs: variations on a theme.** *Metallomics* 2013, **5**:276-286.
6. Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA: **RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea.** *Nature* 2012, **482**:331-338.
7. Sauer E: **Structure and RNA-binding properties of the bacterial LSm protein Hfq.** *Rna Biology* 2013, **10**:610-618.
8. Banerjee S, Chalissery J, Bandey I, Sen RJ: **Rho-dependent transcription termination: More questions than answers.** *Journal of Microbiology* 2006, **44**:11-22.
9. Georg J, Hess WR: **cis-Antisense RNA, Another Level of Gene Regulation in Bacteria.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2011, **75**:286-300.
10. Soper TJ, Woodson SA: **The rpoS mRNA leader recruits Hfq to facilitate annealing with DsrA sRNA.** *Rna-a Publication of the Rna Society* 2008, **14**:1907-1917.
11. Lee E-J, Groisman EA: **An antisense RNA that governs the expression kinetics of a multifunctional virulence gene.** *Molecular Microbiology* 2010, **76**:1020-1033.
12. Vogel J: **A rough guide to the non-coding RNA world of Salmonella.** *Molecular Microbiology* 2009, **71**:1-11.
13. Skordalakes E, Berger JM: **Structural insights into RNA-dependent ring closure and ATPase activation by the Rho termination factor.** *Cell* 2006, **127**:553-564.
14. Thomsen ND, Berger JM: **Running in Reverse: The Structural Basis for Translocation Polarity in Hexameric Helicases.** *Cell* 2009, **139**:523-534.
15. Lenz DH, Miller MB, Zhu J, Kulkarni RV, Bassler BL: **CsrA and three redundant small RNAs regulate quorum sensing in Vibrio cholerae.** *Molecular Microbiology* 2005, **58**:1186-1202.
16. Mohanty BK, Maples VF, Kushner SR: **The Sm-like protein Hfq regulates polyadenylation dependent mRNA decay in Escherichia coli.** *Molecular Microbiology* 2004, **54**:905-920.
17. Baker CS, Morozov I, Suzuki K, Romeo T, Babitzke P: **CsrA regulates glycogen biosynthesis by preventing translation of glgC in Escherichia coli.** *Molecular Microbiology* 2002, **44**:1599-1610.
18. Murakami KS: **X-ray Crystal Structure of Escherichia coli RNA Polymerase sigma(70) Holoenzyme.** *Journal of Biological Chemistry* 2013, **288**:9126-9134.
19. Yamamoto H, Qin Y, Achenbach J, Li CM, Kijek J, Spahn CMT, Nierhaus KH: **EF-G and EF4: translocation and back-translocation on the bacterial ribosome.** *Nature Reviews Microbiology* 2014, **12**:89-100.
20. Gocheva V, Le Gall A, Boudvillain M, Margeat E, Nollmann M: **Direct observation of the translocation mechanism of transcription termination factor Rho.** *Nucleic Acids Research* 2015, **43**:2367-2377.
21. Sauter C, Basquin J, Suck D: **Sm-like proteins in Eubacteria: the crystal structure of the Hfq protein from Escherichia coli.** *Nucleic Acids Research* 2003, **31**:4091-4098.

BIBLIOGRAPHIE

22. Giuliodori AM, Di Pietro F, Marzi S, Masquida B, Wagner R, Romby P, Gualerzi CO, Pon CL: **The cspA mRNA Is a Thermosensor that Modulates Translation of the Cold-Shock Protein CspA.** *Molecular Cell* 2010, **37**:21-33.
23. Caron M-P, Bastet L, Lussier A, Simoneau-Roy M, Masse E, Lafontaine DA: **Dual-acting riboswitch control of translation initiation and mRNA decay.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012, **109**:E3444-E3453.
24. Ishihama A: **Prokaryotic genome regulation: a revolutionary paradigm.** *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2012, **88**:485-508.
25. Gogol EP, Seifried SE, Vonhippel PH: **Structure and assembly of the Escherichia coli transcription termination factor rho and its interaction with RNA. I. Cryoelectron microscopic studies.** *Journal of Molecular Biology* 1991, **221**:1127-1138.
26. Skordalakes E, Berger JM: **Structure of the Rho transcription terminator: Mechanism of mRNA recognition and helicase loading.** *Cell* 2003, **114**:135-146.
27. Patel SS: **Structural Biology Steps in the right direction.** *Nature* 2009, **462**:581-583.
28. Figueroa-Bossi N, Valentini M, Malleret L, Fiorini F, Bossi L: **Caught at its own game: regulatory small RNA inactivated by an inducible transcript mimicking its target.** *Genes Dev* 2009, **23**:2004-2015.
29. Storz G, Vogel J, Wassarman KM: **Regulation by small RNAs in bacteria: Expanding frontiers.** *Molecular Cell* 2011, **43**:880-891.
30. Wang W, Wang L, Zou Y, Zhang J, Gong Q, Wu J, Shi Y: **Cooperation of Escherichia coli Hfq hexamers in DsrA binding.** *Genes & Development* 2011, **25**:2106-2117.
31. Wang W, Wang L, Wu J, Gong Q, Shi Y: **Hfq-bridged ternary complex is important for translation activation of rpoS by DsrA.** *Nucleic Acids Research* 2013, **41**:5938-5948.
32. Yang Q, Figueroa-Bossi N, Bossi L: **Translation Enhancing ACA Motifs and Their Silencing by a Bacterial Small Regulatory RNA.** *Plos Genetics* 2014, **10**:e1004026.
33. Holmqvist E, Wright PR, Li L, Bischler T, Barquist L, Reinhardt R, Backofen R, Vogel J: **Global RNA recognition patterns of post-transcriptional regulators Hfq and CsrA revealed by UV crosslinking in vivo.** *EMBO J* 2016, **35**:991-1011.
34. Geissmann TA, Touati D: **Hfq, a new chaperoning role: binding to messenger RNA determines access for small RNA regulator.** *Embo Journal* 2004, **23**:396-405.
35. Balbontín R, Villagra N, Pardos de la Gándara M, Mora G, Figueroa-Bossi N, Bossi L: **Expression of Iron, the salmochelin siderophore receptor, requires mRNA activation by RyhB small RNA homologues.** *Mol Microbiol* 2016, **100**:139-155.
36. Jacob F, Monod J: **Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins.** *Journal of Molecular Biology* 1961, **3**:318-356.
37. Ebright RH: **RNA polymerase: Structural similarities between bacterial RNA polymerase and eukaryotic RNA polymerase II.** *Journal of Molecular Biology* 2000, **304**:687-698.
38. Darst SA, Polyakov A, Richter C, Zhang G: **Structural studies of Escherichia coli RNA polymerase.** *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 1998, **63**:269-276.
39. Osterberg S, del Peso-Santos T, Shingler V: **Regulation of Alternative Sigma Factor Use.** *Annual Review of Microbiology, Vol 65* 2011, **65**:37-55.
40. Paget MS: **Bacterial Sigma Factors and Anti-Sigma Factors: Structure, Function and Distribution.** *Biomolecules* 2015, **5**:1245-1265.
41. Jishage M, Iwata A, Ueda S, Ishihama A: **Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in Escherichia coli: Intracellular levels of four species of sigma**

BIBLIOGRAPHIE

- subunit under various growth conditions. *Journal of Bacteriology* 1996, **178**:5447-5451.**
42. Pribnow D: **Nucleotide sequence of an RNA polymerase binding site at an early T7 promoter.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1975, **72**:784-788.
43. Schaller H, Gray C, Herrmann K: **Nucleotide sequence of an RNA polymerase binding site from the DNA of bacteriophage fd.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1975, **72**:737-741.
44. Hawley DK, McClure WR: **Mechanism of activation of transcription initiation from the lambda PRM promoter.** *Journal of Molecular Biology* 1982, **157**:493-525.
45. Saecker RM, Record MT, deHaseth PL: **Mechanism of Bacterial Transcription Initiation: RNA Polymerase - Promoter Binding, Isomerization to Initiation-Competent Open Complexes, and Initiation of RNA Synthesis.** *Journal of Molecular Biology* 2011, **412**:754-771.
46. Mooney RA, Artsimovitch I, Landick R: **Information processing by RNA polymerase: Recognition of regulatory signals during RNA chain elongation.** *Journal of Bacteriology* 1998, **180**:3265-3275.
47. Proshkin S, Rahmouni AR, Mironov A, Nudler E: **Cooperation Between Translating Ribosomes and RNA Polymerase in Transcription Elongation.** *Science* 2010, **328**:504-508.
48. Peters JM, Vangeloff AD, Landick R: **Bacterial Transcription Terminators: The RNA 3'-End Chronicles.** *Journal of Molecular Biology* 2011, **412**:793-813.
49. Brennan CA, Dombroski AJ, Platt T: **Transcription termination factor rho is an RNA-DNA helicase.** *Cell* 1987, **48**:945-952.
50. Guerin M, Robichon N, Geiselman J, Rahmouni AR: **A simple polypyrimidine repeat acts as an artificial Rho-dependent terminator in vivo and in vitro.** *Nucleic Acids Research* 1998, **26**:4895-4900.
51. Galluppi GR, Richardson JP: **ATP-induced changes in the binding of RNA synthesis termination protein rho to RNA.** *Journal of Molecular Biology* 1980, **138**:513-539.
52. Morgan WD, Bear DG, Vonhippel PH: **Rho-dependent termination of transcription. I. Identification and characterization of termination sites for transcription from the bacteriophage lambda PR promoter.** *Journal of Biological Chemistry* 1983, **258**:9553-9564.
53. Zhu AQ, von Hippel PH: **Rho-dependent termination within the trp t' terminator. I. Effects of rho loading and template sequence.** *Biochemistry* 1998, **37**:11202-11214.
54. Alifano P, Rivellini F, Limauro D, Bruni CB, Carlomagno MS: **A consensus motif common to all rho-dependent prokaryotic transcription terminators.** *Cell* 1991, **64**:553-563.
55. Richardson JP: **Rho-dependent termination and ATPases in transcript termination.** *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression* 2002, **1577**:251-260.
56. Ciampi MS: **Rho-dependent terminators and transcription termination.** *Microbiology-Sgm* 2006, **152**:2515-2528.
57. Richardson LV, Richardson JP: **Rho-dependent termination of transcription is governed primarily by the upstream Rho utilization (rut) sequences of a terminator.** *Journal of Biological Chemistry* 1996, **271**:21597-21603.
58. Modrak D, Richardson JP: **The RNA-Binding Domain of Transcription Termination Factor Rho: Isolation, Characterization, and Determination of Sequence Limits.** *Biochemistry* 1994, **33**:8292-8299.

BIBLIOGRAPHIE

59. Wei RR, Richardson JP: **Identification of an RNA-binding site in the ATP binding domain of Escherichia coli Rho by H₂O₂/Fe-EDTA cleavage protection studies.** *Journal of Biological Chemistry* 2001, **276**:28380-28387.
60. Stitt BL, Xu YM: **Sequential hydrolysis of ATP molecules bound in interacting catalytic sites of Escherichia coli transcription termination protein Rho.** *Journal of Biological Chemistry* 1998, **273**:26477-26486.
61. Boudvillain M, Figueroa-Bossi N, Bossi L: **Terminator still moving forward: expanding roles for Rho factor.** *Current Opinion in Microbiology* 2013, **16**:118-124.
62. Studemann A, Noirclerc-Savoie M, Klauck E, Becker G, Schneider D, Hengge R: **Sequential recognition of two distinct sites in sigma(S) by the proteolytic targeting factor RssB and ClpX.** *Embo Journal* 2003, **22**:4111-4120.
63. Perez-Rueda E, Collado-Vides J: **The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in Escherichia coli K-12.** *Nucleic Acids Research* 2000, **28**:1838-1847.
64. Ebright RH: **Transcription activation at class-i cap-dependent promoters.** *Molecular Microbiology* 1993, **8**:797-802.
65. Nickels BE, Dove SL, Murakami KS, Darst SA, Hochschild A: **Protein-protein and protein-DNA interactions of sigma(70) region 4 involved in transcription activation by lambda cl.** *Journal of Molecular Biology* 2002, **324**:17-34.
66. Brown NL, Stoyanov JV, Kidd SP, Hobman JL: **The MerR family of transcriptional regulators.** *Fems Microbiology Reviews* 2003, **27**:145-163.
67. Quinones M, Kimsey HH, Ross W, Gourse RL, Waldor MK: **LexA represses CTX Phi transcription by blocking access of the alpha C-terminal domain of RNA polymerase to promoter DNA.** *Journal of Biological Chemistry* 2006, **281**:39407-39412.
68. Roy S, Semsey S, Liu MF, Gussin GN, Adhya S: **GaIR represses gaIP1 by inhibiting the rate-determining open complex formation through RNA polymerase contact: A GaIR negative control mutant.** *Journal of Molecular Biology* 2004, **344**:609-618.
69. Naville M, Gautheret D: **Premature terminator analysis sheds light on a hidden world of bacterial transcriptional attenuation.** *Genome Biology* 2010, **11**:R97.
70. Lee F, Yanofsky C: **Transcription termination at trp operon attenuators of escherichia-coli and salmonella-typhimurium - RNA secondary structure and regulation of termination.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1977, **74**:4365-4369.
71. Yanofsky C: **Transcription attenuation: Once viewed as a novel regulatory strategy.** *Journal of Bacteriology* 2000, **182**:1-8.
72. Searles LL, Wessler SR, Calvo JM: **Transcription attenuation is the major mechanism by which the leu operon of salmonella-typhimurium is controlled.** *Journal of Molecular Biology* 1983, **163**:377-394.
73. Yanofsky C: **Attenuation in the control of expression of bacterial operons.** *Nature* 1981, **289**:751-758.
74. Chan CL, Landick R: **The salmonella-typhimurium his operon leader region contains an rna hairpin-dependent transcription pause site - mechanistic implications of the effect on pausing of altered rna hairpins.** *Journal of Biological Chemistry* 1989, **264**:20796-20804.
75. Roberts JW: **Termination factor for RNA synthesis.** *Nature* 1969, **224**:1168-1174.
76. Morgan EA, Ikemura T, Nomura M: **Identification of spacer transfer-RNA genes in individual ribosomal-RNA transcription units of escherichia-coli.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1977, **74**:2710-2714.

BIBLIOGRAPHIE

77. Morgan EA: **Antitermination mechanisms in rRNA operons of Escherichia coli.** *Journal of Bacteriology* 1986, **168**:1-5.
78. Bremer H, Dennis PP: *Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate: Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*; 1987.
79. Morgan EA: **Insertions of Tn10 into an E. coli ribosomal RNA operon are incompletely polar.** *Cell* 1980, **21**:257-265.
80. Brewster JM, Morgan EA: **Tn9 and IS1 inserts in a ribosomal ribonucleic acid operon of Escherichia coli are incompletely polar.** *Journal of Bacteriology* 1981, **148**:897-903.
81. Keppel F, Georgopoulos CP, Eisen H: **Host interference with expression of lambda n gene product.** *Biochimie* 1974, **56**:1505-1509.
82. Downing WL, Sullivan SL, Gottesman ME, Dennis PP: **Sequence and transcriptional pattern of the essential escherichia-coli sece-nusg operon.** *Journal of Bacteriology* 1990, **172**:1621-1627.
83. Friedman DI, Jolly CT, Mural RJ: **Interference with expression of n gene function of phage lambda in a mutant of escherichia-coli.** *Virology* 1973, **51**:216-226.
84. Vogel U, Jensen KF: **NusA is required for ribosomal antitermination and for modulation of the transcription elongation rate of both antiterminated RNA and mRNA.** *Journal of Biological Chemistry* 1997, **272**:12265-12271.
85. Squires CL, Greenblatt J, Li J, Condon C: **Ribosomal-RNA antitermination invitro - requirement for nus factors and one or more unidentified cellular-components.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993, **90**:970-974.
86. Torres M, Condon C, Balada JM, Squires C, Squires CL: **Ribosomal protein S4 is a transcription factor with properties remarkably similar to NusA, a protein involved in both non-ribosomal and ribosomal RNA antitermination.** *Embo Journal* 2001, **20**:3811-3820.
87. Berg KL, Squires C, Squires CL: **Ribosomal-rna operon anti-termination - function of leader and spacer region box-b-box-a sequences and their conservation in diverse microorganisms.** *Journal of Molecular Biology* 1989, **209**:345-358.
88. Nodwell JR, Greenblatt J: **Recognition of boxa antiterminator RNA by the escherichia-coli antitermination factors nusB and ribosomal-protein s10.** *Cell* 1993, **72**:261-268.
89. Albrechtsen B, Squires CL, Li S, Squires C: **Antitermination of characterized transcriptional terminators by the Escherichia coli rrnG leader region.** *Journal of Molecular Biology* 1990, **213**:123-134.
90. Condon C, Squires C, Squires CL: **Control of ribosomal-rna transcription in escherichia-coli.** *Microbiological Reviews* 1995, **59**:623-645.
91. Morgan WD, Bear DG, Singer VL, Vonhippel PH: **Site specificity of rho-dependent termination of transcription from the lambda pr promoter.** *Federation Proceedings* 1981, **40**:1765-1765.
92. D'Heygere F, Rabhi M, Boudvillain M: **Phylectic distribution and conservation of the bacterial transcription termination factor Rho.** *Microbiology-Sgm* 2013, **159**:1423-1436.
93. Das A, Court D, Adhya S: **Isolation and characterization of conditional lethal mutants of escherichia-coli defective in transcription termination factor rho.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1976, **73**:1959-1963.

BIBLIOGRAPHIE

94. Housley PR, Leavitt AD, Whitfield HJ: **Genetic-analysis of a temperature-sensitive salmonella-typhimurium rho mutant with an altered rho-associated polycytidylate-dependent adenosine-triphosphatase activity.** *Journal of Bacteriology* 1981, **147**:13-24.
95. Quirk PG, Dunkley EA, Lee P, Krulwich TA: **Identification of a putative bacillus-subtilis-rho gene.** *Journal of Bacteriology* 1993, **175**:647-654.
96. Washburn RS, Marra A, Bryant AP, Rosenberg M, Gentry DR: **rho is not essential for viability or virulence in Staphylococcus aureus.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2001, **45**:1099-1103.
97. Oda T, Takanami M: **Observations on structure of termination factor rho and its attachment to DNA.** *Journal of Molecular Biology* 1972, **71**:799-802.
98. Yu X, Horiguchi T, Shigesada K, Egelman EH: **Three-dimensional reconstruction of transcription termination factor rho: Orientation of the N-terminal domain and visualization of an RNA-binding site.** *Journal of Molecular Biology* 2000, **299**:1279-1287.
99. Pinkham JL, Platt T: **The nucleotide-sequence of the rho-gene of escherichia-coli k-12.** *Nucleic Acids Research* 1983, **11**:3531-3545.
100. Dolan JW, Marshall NF, Richardson JP: **Transcription termination factor rho has three distinct structural domains.** *Journal of Biological Chemistry* 1990, **265**:5747-5754.
101. Bear DG, Andrews CL, Singer JD, Morgan WD, Grant RA, Vonhippel PH, Platt T: **Escherichia coli transcription termination factor rho has a two-domain structure in its activated form.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1985, **82**:1911-1915.
102. Geiselmann J, Yager TD, Vonhippel PH: **Functional interactions of ligand cofactors with escherichia-coli transcription termination factor-rho .2. Binding of rna.** *Protein Science* 1992, **1**:861-873.
103. Richardson LV, Richardson JP: **Cytosine nucleoside inhibition of the ATPase of Escherichia coli termination factor rho: evidence for a base specific interaction between rho and RNA.** *Nucleic Acids Research* 1992, **20**:5383-5387.
104. Lowery C, Richardson JP: **Characterization of the nucleoside triphosphate phosphohydrolase (ATPase) activity of RNA synthesi termination factor p. I. Enzymatic properties and effects of inhibitors. .** *Journal of Biological Chemistry* 1977, **252**:1375-1380.
105. Richardson JP, Conaway R: **Ribonucleic acid release activity of transcription termination protein rho is dependent on the hydrolysis of nucleoside triphosphates.** *Biochemistry* 1980, **19**:4293-4299.
106. Dombroski AJ, Platt T: **Structure of rho-factor - an rna-binding domain and a separate region with strong similarity to proven atp-binding domains.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988, **85**:2538-2542.
107. Allison TJ, Wood TC, Briercheck DM, Rastinejad F, Richardson JP, Rule GS: **Crystal structure of the RNA-binding domain from transcription termination factor rho.** *Nature Structural Biology* 1998, **5**:352-356.
108. Richardson JP: **Structural organization of transcription termination factor Rho.** *Journal of Biological Chemistry* 1996, **271**:1251-1254.
109. Miwa Y, Horiguchi T, Shigesada K: **Structural and functional dissections of transcription termination factor-rho by random mutagenesis.** *Journal of Molecular Biology* 1995, **254**:815-837.

BIBLIOGRAPHIE

110. Bogden CE, Fass D, Bergman N, Nichols MD, Berger JM: **The structural basis for terminator recognition by the Rho transcription termination factor.** *Molecular Cell* 1999, **3**:487-493.
111. Murzin AG: **OB(oligonucleotide oligosaccharide binding)-fold - common structural and functional solution for nonhomologous sequences.** *Embo Journal* 1993, **12**:861-867.
112. Wang Y, Vonhippel PH: **Escherichia-coli transcription termination factor-rho .2. Binding of oligonucleotide cofactors.** *Journal of Biological Chemistry* 1993, **268**:13947-13955.
113. Wu AM, Christie GE, Platt T: **Tandem termination sites in the tryptophan operon of escherichia-coli.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 1981, **78**:2913-2917.
114. Calva E, Burgess RR: **Characterization of a rho-dependent termination site within the cro gene of bacteriophage-lambda.** *Journal of Biological Chemistry* 1980, **255**:1017-1022.
115. Faus I, Richardson JP: **Structural and functional properties of the segments of λ cro mRNA that interact with transcription termination factor Rho.** *Journal of Molecular Biology* 1990, **212**:53-66.
116. Richardson JP: **Activation of rho protein ATPase requires simultaneous interaction at two kinds of nucleic acid-binding sites.** *Journal of Biological Chemistry* 1982, **257**:5760-5766.
117. Chen X, Stitt BL: **The binding of C-10 oligomers to Escherichia coli transcription termination factor Rho.** *Journal of Biological Chemistry* 2004, **279**:16301-16310.
118. Bear DG, Hicks PS, Escudero KW, Andrews CL, McSwiggen JA, Vonhippel PH: **Interactions of escherichia-coli transcription termination factor-rho with rna .2. Electron-microscopy and nuclease protection experiments.** *Journal of Molecular Biology* 1988, **199**:623-635.
119. Beckmann JS, Daniel V, Tichauer Y, Littauer UZ: **Bindinb of termination factor-rho to DNA.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1971, **43**:806-813.
120. Briercheck DM, Allison TJ, Richardson JP, Ellena JF, Wood TC, Rule GS: **H-1, N-15 and C-13 resonance assignments and secondary structure determination of the RNA-binding domain of E-coli rho protein.** *Journal of Biomolecular Nmr* 1996, **8**:429-444.
121. Xu Y, Kohn H, Widger WR: **Mutations in the Rho transcription termination factor that affect RNA tracking.** *Journal of Biological Chemistry* 2002, **277**:30023-30030.
122. Zhu AQ, von Hippel PH: **Rho-dependent termination within the trp t' terminator. II. Effects of kinetic competition and rho processivity.** *Biochemistry* 1998, **37**:11215-11222.
123. Hart CM, Roberts JW: **Deletion analysis of the lambda tr1 termination region - effect of sequences near the transcript release sites, and the minimum length of rho-dependent transcripts.** *Journal of Molecular Biology* 1994, **237**:255-265.
124. Graham JE: **Sequence-specific Rho-RNA interactions in transcription termination.** *Nucleic Acids Research* 2004, **32**:3093-3100.
125. Zalatan F, Platt T: **Effects of decreased cytosine content on rho-interaction with the rho-dependent terminator trp t' in escherichia-coli.** *Journal of Biological Chemistry* 1992, **267**:19082-19088.
126. Lau LF, Roberts JW, Wu R: **RNA-polymerase pausing and transcript release at the lambda-tr1 terminator in-vitro.** *Journal of Biological Chemistry* 1983, **258**:9391-9397.

BIBLIOGRAPHIE

127. Jin DJ, Burgess RR, Richardson JP, Gross CA: **Termination efficiency at rho-dependent terminators depends on kinetic coupling between RNA polymerase and rho.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992, **89**:1453-1457.
128. Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ: **Distantly related sequences in the alpha-subunits and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold.** *Embo Journal* 1982, **1**:945-951.
129. Abrahams JP, Leslie AGW, Lutter R, Walker JE: **Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria.** *Nature* 1994, **370**:621-628.
130. Story RM, Weber IT, Steitz TA: **The structure of the escherichia-coli reca protein monomer and polymer.** *Nature* 1992, **355**:318-325.
131. Cox MM: **Motoring along with the bacterial RecA protein.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2007, **8**:127-138.
132. Patel SS, Picha KM: **Structure and function of hexameric helicases.** *Annual Review of Biochemistry* 2000, **69**:651-697.
133. Thomsen ND, Berger JM: **Structural frameworks for considering microbial protein- and nucleic acid-dependent motor ATPases.** *Molecular Microbiology* 2008, **69**:1071-1090.
134. Walstrom KM, Dozono JM, vonHippel PH: **Kinetics of the RNA-DNA helicase activity of Escherichia coli transcription termination factor rho .2. Processivity, ATP consumption, and RNA binding.** *Biochemistry* 1997, **36**:7993-8004.
135. Harinarayanan R, Gowrishankar J: **Host factor titration by chromosomal R-loops as a mechanism for runaway plasmid replication in transcription termination-defective mutants of Escherichia coli.** *Journal of Molecular Biology* 2003, **332**:31-46.
136. Schwartz A, Margeat E, Rahmouni AR, Boudvillain M: **Transcription termination factor rho can displace streptavidin from biotinylated RNA.** *Journal of Biological Chemistry* 2007, **282**:31469-31476.
137. Steinmetz EJ, Platt T: **Evidence supporting a tethered tracking model for helicase activity of escherichia-coli rho-factor.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994, **91**:1401-1405.
138. Zheng CH, Friedman DI: **Reduced rho-dependent transcription termination permits nusA-independent growth of escherichia-coli.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994, **91**:7543-7547.
139. Pasman Z, von Hippel PH: **Regulation of Rho-dependent transcription termination by NusG is specific to the Escherichia coli elongation complex.** *Biochemistry* 2000, **39**:5573-5585.
140. Walmacq C, Rahmouni AR, Boudvillain M: **Influence of substrate composition on the helicase activity of transcription termination factor Rho: Reduced processivity of unwinding of RNA-DNA Rho hexamers during hybrid regions.** *Journal of Molecular Biology* 2004, **342**:403-420.
141. Yarnell WS, Roberts JW: **Mechanism of intrinsic transcription termination and antitermination.** *Science* 1999, **284**:611-615.
142. Epshtein V, Dutta D, Wade J, Nudler E: **An allosteric mechanism of Rho-dependent transcription termination.** *Nature* 2010, **463**:245-U136.
143. Koonin EV: **Comparative genomics, minimal gene-sets and the last universal common ancestor.** *Nature Reviews Microbiology* 2003, **1**:127-136.

BIBLIOGRAPHIE

144. Selinger DW, Saxena RM, Cheung KJ, Church GM, Rosenow C: **Global RNA half-life analysis in Escherichia coli reveals positional patterns of transcript degradation.** *Genome Research* 2003, **13**:216-223.
145. Palade GE: **A small particulate component of the cytoplasm.** *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 1955, **1**:59-68.
146. Yun HS, Hong J, Lim HC: **Regulation of ribosome synthesis in Escherichia coli: Effects of temperature and dilution rate changes.** *Biotechnology and Bioengineering* 1996, **52**:615-624.
147. Bremer H, Dennis P: **Feedback control of ribosome function in Escherichia coli.** *Biochimie* 2008, **90**:493-499.
148. Parker J: **Errors and alternatives in reading the universal genetic-code.** *Microbiological Reviews* 1989, **53**:273-298.
149. Dennis PP, Ehrenberg M, Bremer H: **Control of rRNA synthesis in Escherichia coli: a systems biology approach.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2004, **68**:639-668.
150. Traub P, Nomura M: **Structure and function of e coli ribosomes .V. Reconstitution of functionally active 30S ribosomal particles from RNA and proteins.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1968, **59**:777-784.
151. Nomura M, Mizushima S, Ozaki M, Traub P, Lowry CV: **Structure and function of ribosomes and their molecular components.** *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 1969, **34**:49-61.
152. Yonath A, Tesche B, Lorenz S, Mussig J, Erdmann VA, Wittmann HG: **Several crystal forms of the Bacillus stearothermophilus 50 S ribosomal particles.** *Febs Letters* 1983, **154**:15-20.
153. Clemons WM, May JLC, Wimberly BT, McCutcheon JP, Capel MS, Ramakrishnan V: **Structure of a bacterial 30S ribosomal subunit at 5.5 angstrom resolution.** *Nature* 1999, **400**:833-840.
154. Ban N, Nissen P, Hansen J, Moore PB, Steitz TA: **The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 angstrom resolution.** *Science* 2000, **289**:905-920.
155. Condon C, Philips J, Fu ZY, Squires C, Squires CL: **Comparison of the expression of the 7 ribosomal-rna operons in escherichia-coli.** *Embo Journal* 1992, **11**:4175-4185.
156. Bachmann BJ: **Linkage map of Escherichia coli K-12, edition 8.** *Microbiological Reviews* 1990, **54**:130-197.
157. Gourse RL, Takebe Y, Sharrock RA, Nomura M: **Feedback-regulation of ribosomal-rna and transfer-rna synthesis and accumulation of free ribosomes after conditional expression of ribosomal-rna genes.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1985, **82**:1069-1073.
158. Nomura M, Gourse R, Baughman G: **Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal components.** *Annual Review of Biochemistry* 1984, **53**:75-117.
159. Qin Y, Polacek N, Vesper O, Staub E, Einfeldt E, Wilson DN, Nierhaus KH: **The highly conserved LepA is a ribosomal elongation factor that back-translocates the ribosome.** *Cell* 2006, **127**:721-733.
160. Achenbach J, Nierhaus KH: **The mechanics of ribosomal translocation.** *Biochimie* 2015, **114**:80-89.
161. Crick FH: **On protein synthesis.** *Symposia of the Society for Experimental Biology* 1958, **12**:138-163.

BIBLIOGRAPHIE

162. Hoagland MB, Stephenson ML, Scott JF, Hecht LI, Zamecnik PC: **Soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis.** *Journal of Biological Chemistry* 1958, **231**:241-257.
163. Kim SH, Suddath FL, Quigley GJ, McPherson A, Sussman JL, Wang AHJ, Seeman NC, Rich A: **3-dimensional tertiary structure of yeast phenylalanine transfer-RNA.** *Science* 1974, **185**:435-440.
164. Suddath FL, Quigley GJ, McPherson A, Sneden D, Kim JJ, Kim SH, Rich A: **3-Dimensional structure of yeast phenylalanine transfer-rna at 3.0a resolution.** *Nature* 1974, **248**:20-24.
165. Robertus JD, Ladner JE, Finch JT, Rhodes D, Brown RS, Clark BFC, Klug A: **Structure of yeast phenylalanine transfer-RNA at 3 A resolution.** *Nature* 1974, **250**:546-551.
166. Rogers MJ, Soll D: **Discrimination between glutamyl-transfer RNA-synthetase and seryl-transfer RNA-synthetase involves nucleotides in the acceptor helix of transfer-RNA.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988, **85**:6627-6631.
167. Hohn MJ, Park H-S, O'Donoghue P, Schnitzbauer M, Soll D: **Emergence of the universal genetic code imprinted in an RNA record.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, **103**:18095-18100.
168. Laursen BS, Sorensen HP, Mortensen KK, Sperling-Petersen HU: **Initiation of protein synthesis in bacteria.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2005, **69**:101-123.
169. Voorhees RM, Ramakrishnan V: **Structural Basis of the Translational Elongation Cycle.** *Annual Review of Biochemistry, Vol 82* 2013, **82**:203-236.
170. Tuite MF, Stansfield I: **Termination of protein-synthesis.** *Molecular Biology Reports* 1994, **19**:171-181.
171. Melnikov S, Ben-Shem A, de Loubresse NG, Jenner L, Yusupova G, Yusupov M: **One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes.** *Nature Structural & Molecular Biology* 2012, **19**:560-567.
172. Shine J, Dalgarno L: **Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes.** *Nature* 1975, **254**:34-38.
173. Giglione C, Boularot A, Meinnel T: **Protein N-terminal methionine excision.** *Cellular and Molecular Life Sciences* 2004, **61**:1455-1474.
174. Yusupova G, Jenner L, Rees B, Moras D, Yusupov M: **Structural basis for messenger RNA movement on the ribosome.** *Nature* 2006, **444**:391-394.
175. Ramakrishnan V: **Ribosome structure and the mechanism of translation.** *Cell* 2002, **108**:557-572.
176. Schmeing TM, Voorhees RM, Kelley AC, Gao Y-G, Murphy FVIV, Weir JR, Ramakrishnan V: **The Crystal Structure of the Ribosome Bound to EF-Tu and Aminoacyl-tRNA.** *Science* 2009, **326**:688-694.
177. Zaher HS, Green R: **Quality control by the ribosome following peptide bond formation.** *Nature* 2009, **457**:161-166.
178. Schmeing TM, Ramakrishnan V: **What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation.** *Nature* 2009, **461**:1234-1242.
179. Morita T, Maki K, Aiba H: **RNase E-based ribonucleoprotein complexes: mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs.** *Genes & Development* 2005, **19**:2176-2186.
180. Romeo T, Gong M, Liu MY, Brunzinkernagel AM: **Identification and molecular characterization of csra, a pleiotropic gene from escherichia-coli that affects glycogen biosynthesis, gluconeogenesis, cell-size, and surface-properties.** *Journal of Bacteriology* 1993, **175**:4744-4755.

BIBLIOGRAPHIE

181. Lucchetti-Miganeh C, Burrowes E, Baysse C, Ermel G: **The post-transcriptional regulator CsrA plays a central role in the adaptation of bacterial pathogens to different stages of infection in animal hosts.** *Microbiology-Sgm* 2008, **154**:16-29.
182. Wang X, Dubey AK, Suzuki K, Baker CS, Babitzke P, Romeo T: **CsrA post-transcriptionally represses pgaABCD, responsible for synthesis of a biofilm polysaccharide adhesin of Escherichia coli.** *Molecular Microbiology* 2005, **56**:1648-1663.
183. Liu MY, Gui GJ, Wei BD, Preston JF, Oakford L, Yuksel U, Giedroc DP, Romeo T: **The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in Escherichia coli.** *Journal of Biological Chemistry* 1997, **272**:17502-17510.
184. Weilbacher T, Suzuki K, Dubey AK, Wang X, Gudapaty S, Morozov I, Baker CS, Georgellis D, Babitzke P, Romeo T: **A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of Escherichia coli.** *Molecular Microbiology* 2003, **48**:657-670.
185. Gutierrez P, Li Y, Osborne MJ, Pomerantseva E, Liu Q, Gehring K: **Solution structure of the carbon storage regulator protein CsrA from Escherichia coli.** *Journal of Bacteriology* 2005, **187**:3496-3501.
186. Dubey AK, Baker CS, Romeo T, Babitzke P: **RNA sequence and secondary structure participate in high-affinity CsrA-RNA interaction.** *Rna-a Publication of the Rna Society* 2005, **11**:1579-1587.
187. Mercante J, Edwards AN, Dubey AK, Babitzke P, Romeo T: **Molecular Geometry of CsrA (RsmA) Binding to RNA and Its Implications for Regulated Expression.** *Journal of Molecular Biology* 2009, **392**:511-528.
188. Stougaard P, Molin S, Nordstrom K: **RNAs involved in copy-number control and incompatibility of plasmid R1.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 1981, **78**:6008-6012.
189. Tomizawa J, Itoh T, Selzer G, Som T: **Inhibition of cole1 RNA primer formation by a plasmid-specified small RNA.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 1981, **78**:1421-1425.
190. Simons RW, Kleckner N: **Translational control of is10 transposition.** *Cell* 1983, **34**:683-691.
191. Krinke L, Wulff DL: **Oop RNA, produced from multicopy plasmids, inhibits lambda-cii gene-expression through an rnaase-III-dependent mechanism.** *Genes & Development* 1987, **1**:1005-1013.
192. Mizuno T, Chou MY, Inouye M: **A unique mechanism regulating gene-expression - translational inhibition by a complementary rna transcript (micRNA).** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 1984, **81**:1966-1970.
193. Andersen J, Forst SA, Zhao K, Inouye M, Delihias N: **The function of micF RNA. micF RNA is a major factor in the thermal regulation of OmpF protein in Escherichia coli.** *Journal of Biological Chemistry* 1989, **264**:17961-17970.
194. Altuvia S, WeinsteinFischer D, Zhang AX, Postow L, Storz G: **A small, stable RNA induced by oxidative stress: Role as a pleiotropic regulator and antimutator.** *Cell* 1997, **90**:43-53.
195. Urbanowski ML, Stauffer LT, Stauffer GV: **The gcvB gene encodes a small untranslated RNA involved in expression of the dipeptide and oligopeptide transport systems in Escherichia coli.** *Molecular Microbiology* 2000, **37**:856-868.

BIBLIOGRAPHIE

196. Sledjeski D, Gottesman S: **Small RNA acts as an antisilencer of the h-ns-silenced rcsA gene of escherichia-coli.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995, **92**:2003-2007.
197. Wassarman KM, Repoila F, Rosenow C, Storz G, Gottesman S: **Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays.** *Genes & Development* 2001, **15**:1637-1651.
198. Argaman L, Hershberg R, Vogel J, Bejerano G, Wagner EGH, Margalit H, Altuvia S: **Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of Escherichia coli.** *Current Biology* 2001, **11**:941-950.
199. Rivas E, Klein RJ, Jones TA, Eddy SR: **Computational identification of noncoding RNAs in E-coli by comparative genomics.** *Current Biology* 2001, **11**:1369-1373.
200. Li W, Ying X, Lu Q, Chen L: **Predicting sRNAs and their targets in bacteria.** *Genomics, proteomics & bioinformatics* 2012, **10**:276-284.
201. Siezen RJ, Wilson G, Todt T: **Prokaryotic whole-transcriptome analysis: deep sequencing and tiling arrays.** *Microbial Biotechnology* 2010, **3**:125-130.
202. Repoila F, Darfeuille F: **Small regulatory non-coding RNAs in bacteria: physiology and mechanistic aspects.** *Biology of the Cell* 2009, **101**:117-131.
203. Vogel J, Pappenfort K: **Small non-coding RNAs and the bacterial outer membrane.** *Current Opinion in Microbiology* 2006, **9**:605-611.
204. Waters LS, Storz G: **Regulatory RNAs in Bacteria.** *Cell* 2009, **136**:615-628.
205. Hoe C-H, Raabe CA, Rozhdestvensky TS, Tang T-H: **Bacterial sRNAs: Regulation in stress.** *International Journal of Medical Microbiology* 2013, **303**:217-229.
206. Marraffini LA, Sontheimer EJ: **CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea.** *Nature Reviews Genetics* 2010, **11**:181-190.
207. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A: **Nucleotide-sequence of the iap gene, responsible for alkaline-phosphatase isozyme conversion in escherichia-coli, and identification of the gene-product.** *Journal of Bacteriology* 1987, **169**:5429-5433.
208. Sorek R, Kunin V, Hugenholtz P: **CRISPR - a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea.** *Nature Reviews Microbiology* 2008, **6**:181-186.
209. Jansen R, van Embden JDA, Gaastra W, Schouls LM: **Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes.** *Molecular Microbiology* 2002, **43**:1565-1575.
210. Brouns SJJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJH, Snijders APL, Dickman MJ, Makarova KS, Koonin EV, van der Oost J: **Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes.** *Science* 2008, **321**:960-964.
211. Carte J, Wang R, Li H, Terns RM, Terns MP: **Cas6 is an endoribonuclease that generates guide RNAs for invader defense in prokaryotes.** *Genes & Development* 2008, **22**:3489-3496.
212. Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, Nelson KE: **A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes.** *Plos Computational Biology* 2005, **1**:474-483.
213. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P: **CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes.** *Science* 2007, **315**:1709-1712.
214. Marraffini LA, Sontheimer EJ: **CRISPR Interference Limits Horizontal Gene Transfer in Staphylococci by Targeting DNA.** *Science* 2008, **322**:1843-1845.
215. Marraffini LA, Sontheimer EJ: **Invasive DNA, Chopped and in the CRISPR.** *Structure* 2009, **17**:786-788.

BIBLIOGRAPHIE

216. Tyson GW, Banfield JF: **Rapidly evolving CRISPRs implicated in acquired resistance of microorganisms to viruses.** *Environmental Microbiology* 2008, **10**:200-207.
217. Mojica FJM, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, Almendros C: **Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system.** *Microbiology-Sgm* 2009, **155**:733-740.
218. Shah SA, Erdmann S, Mojica FJM, Garrett RA: **Protospacer recognition motifs: Mixed identities and functional diversity.** *Rna Biology* 2013, **10**:891-899.
219. Breaker RR: **Prospects for Riboswitch Discovery and Analysis.** *Molecular Cell* 2011, **43**:867-879.
220. Green NJ, Grundy FJ, Henkin TM: **The T box mechanism: tRNA as a regulatory molecule.** *Febs Letters* 2010, **584**:318-324.
221. Schumann W: **Thermosensory Stems in Eubacteria.** *Sensing in Nature* 2012, **739**:1-16.
222. Mironov AS, Gusarov I, Rafikov R, Lopez LE, Shatalin K, Kreneva RA, Perumov DA, Nudler E: **Sensing small molecules by nascent RNA: A mechanism to control transcription in bacteria.** *Cell* 2002, **111**:747-756.
223. Mandal M, Lee M, Barrick JE, Weinberg Z, Emilsson GM, Ruzzo WL, Breaker RR: **A glycine-dependent riboswitch that uses cooperative binding to control gene expression.** *Science* 2004, **306**:275-279.
224. Tucker BJ, Breaker RR: **Riboswitches as versatile gene control elements.** *Current Opinion in Structural Biology* 2005, **15**:342-348.
225. Breaker RR: **Riboswitches and the RNA world.** *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2012, **4**.
226. Henkin TM: **Riboswitch RNAs: using RNA to sense cellular metabolism.** *Genes & Development* 2008, **22**:3383-3390.
227. Barrick JE, Breaker RR: **The distributions, mechanisms, and structures of metabolite-binding riboswitches.** *Genome Biology* 2007, **8**.
228. Narberhaus F: **Translational control of bacterial heat shock and virulence genes by temperature-sensing mRNAs.** *Rna Biology* 2010, **7**:84-89.
229. Jiang WN, Hou Y, Inouye M: **CspA, the major cold-shock protein of Escherichia coli, is an RNA chaperone.** *Journal of Biological Chemistry* 1997, **272**:196-202.
230. Babitzke P, Baker CS, Romeo T: **Regulation of Translation Initiation by RNA Binding Proteins.** *Annual Review of Microbiology* 2009, **63**:27-44.
231. Brantl S: **Regulatory mechanisms employed by cis-encoded antisense RNAs.** *Current Opinion in Microbiology* 2007, **10**:102-109.
232. Gerhart J: **From feedback inhibition to allostery: the enduring example of aspartate transcarbamoylase.** *Febs Journal* 2014, **281**:612-620.
233. Babitzke P, Romeo T: **CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins.** *Current Opinion in Microbiology* 2007, **10**:156-163.
234. Wassarman KM: **6S RNA: a small RNA regulator of transcription.** *Current Opinion in Microbiology* 2007, **10**:164-168.
235. Timmermans J, Van Melderen L: **Post-transcriptional global regulation by CsrA in bacteria.** *Cellular and Molecular Life Sciences* 2010, **67**:2897-2908.
236. Suzuki K, Babitzke P, Kushner SR, Romeo T: **Identification of a novel regulatory protein (CsrD) that targets the global regulatory RNAs CsrB and CsrC for degradation by RNase E.** *Genes & Development* 2006, **20**:2605-2617.
237. Fozo EM, Hemm MR, Storz G: **Small Toxic Proteins and the Antisense RNAs That Repress Them.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2008, **72**:579-589.

BIBLIOGRAPHIE

238. Wagner EGH, Flardh K: **Antisense RNAs everywhere?** *Trends in Genetics* 2002, **18**:223-226.
239. Alix E, Blanc-Potard A-B: **MgtC: a key player in intramacrophage survival.** *Trends in Microbiology* 2007, **15**:252-256.
240. Opdyke JA, Kang JG, Storz G: **GadY, a small-RNA regulator of acid response genes in Escherichia coli.** *Journal of Bacteriology* 2004, **186**:6698-6705.
241. Opdyke JA, Fozo EM, Hemm MR, Storz G: **RNase III Participates in GadY-Dependent Cleavage of the gadX-gadW mRNA.** *Journal of Molecular Biology* 2011, **406**:29-43.
242. Papenfort K, Vogel J: **Regulatory RNA in Bacterial Pathogens.** *Cell Host & Microbe* 2010, **8**:116-127.
243. Vogel J, Luisi BF: **Hfq and its constellation of RNA.** *Nature Reviews Microbiology* 2011, **9**:578-589.
244. Wagner EGH: **Cycling of RNAs on Hfq.** *Rna Biology* 2013, **10**:619-626.
245. Balbontin R, Fiorini F, Figueroa-Bossi N, Casadesus J, Bossi L: **Recognition of heptameric seed sequence underlies multi-target regulation by RybB small RNA in Salmonella enterica.** *Molecular Microbiology* 2010, **78**:380-394.
246. Kawamoto H, Koide Y, Morita T, Aiba H: **Base-pairing requirement for RNA silencing by a bacterial small RNA and acceleration of duplex formation by Hfq.** *Molecular Microbiology* 2006, **61**:1013-1022.
247. Lalaouna D, Simoneau-Roy M, Lafontaine D, Masse E: **Regulatory RNAs and target mRNA decay in prokaryotes.** *Biochimica Et Biophysica Acta- Gene Regulatory Mechanisms* 2013, **1829**:742-747.
248. Guillier M, Gottesman S: **The 5' end of two redundant sRNAs is involved in the regulation of multiple targets, including their own regulator.** *Nucleic Acids Research* 2008, **36**:6781-6794.
249. Bouvier M, Sharma CM, Mika F, Nierhaus KH, Vogel J: **Small RNA Binding to 5' mRNA Coding Region Inhibits Translational Initiation.** *Molecular Cell* 2008, **32**:827-837.
250. Sharma CM, Darfeuille F, Plantinga TH, Vogel J: **Small RNA regulates multiple ABC transporter mRNAs by targeting C/A-rich elements inside and upstream of ribosome-binding sites.** *Genes & Development* 2007, **21**:2804-2817.
251. Coornaert A, Chiaruttini C, Springer M, Guillier M: **Post-Transcriptional Control of the Escherichia coli PhoQ-PhoP Two-Component System by Multiple sRNAs Involves a Novel Pairing Region of GcvB.** *Plos Genetics* 2013, **9**.
252. Brescia CC, Mikulecky PJ, Feig AL, Sledjeski DD: **Identification of the Hfq-binding site on DsrA RNA: Hfq binds without altering DsrA secondary structure.** *Rna-a Publication of the Rna Society* 2003, **9**:33-43.
253. Peng Y, Soper TJ, Woodson SA: **Positional Effects of AAN Motifs in rpoS Regulation by sRNAs and Hfq.** *Journal of Molecular Biology* 2014, **426**:275-285.
254. Sledjeski DD, Gupta A, Gottesman S: **The small RNA, DsrA, is essential for the low temperature expression of RpoS during exponential growth in Escherichia coli.** *Embo Journal* 1996, **15**:3993-4000.
255. Morita T, Mochizuki Y, Aiba H: **Translational repression is sufficient for gene silencing by bacterial small noncoding RNAs in the absence of mRNA destruction.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, **103**:4858-4863.
256. De Lay N, Schu DJ, Gottesman S: **Bacterial Small RNA-based Negative Regulation: Hfq and Its Accomplices.** *Journal of Biological Chemistry* 2013, **288**:7996-8003.

BIBLIOGRAPHIE

257. Masse E, Escorcia FE, Gottesman S: **Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in Escherichia coli.** *Genes & Development* 2003, **17**:2374-2383.
258. Pfeiffer V, Papenfort K, Lucchini S, Hinton JCD, Vogel J: **Coding sequence targeting by MicC RNA reveals bacterial mRNA silencing downstream of translational initiation.** *Nature Structural & Molecular Biology* 2009, **16**:840-846.
259. Bandyra KJ, Said N, Pfeiffer V, Gorna MW, Vogel J, Luisi BF: **The Seed Region of a Small RNA Drives the Controlled Destruction of the Target mRNA by the Endoribonuclease RNase E.** *Molecular Cell* 2012, **47**:943-953.
260. Froehlich KS, Vogel J: **Activation of gene expression by small RNA.** *Current Opinion in Microbiology* 2009, **12**:674-682.
261. Papenfort K, Sun Y, Miyakoshi M, Vanderpool CK, Vogel J: **Small RNA-Mediated Activation of Sugar Phosphatase mRNA Regulates Glucose Homeostasis.** *Cell* 2013, **153**:426-437.
262. Andrews SC, Robinson AK, Rodriguez-Quinones F: **Bacterial iron homeostasis.** *Fems Microbiology Reviews* 2003, **27**:215-237.
263. Cornelis P, Wei Q, Andrews SC, Vinckx T: **Iron homeostasis and management of oxidative stress response in bacteria.** *Metallomics* 2011, **3**:540-549.
264. Hantke K: **Iron and metal regulation in bacteria.** *Current Opinion in Microbiology* 2001, **4**:172-177.
265. Masse E, Gottesman S: **A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in Escherichia coli.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, **99**:4620-4625.
266. Lee J-W, Helmann JD: **Functional specialization within the Fur family of metalloregulators.** *Biometals* 2007, **20**:485-499.
267. Stojiljkovic I, Hantke K: **Functional domains of the escherichia-coli ferric uptake regulator protein (FUR).** *Molecular & General Genetics* 1995, **247**:199-205.
268. Coy M, Neilands JB: **Structural dynamics and functional domains of the fur protein.** *Biochemistry* 1991, **30**:8201-8210.
269. Bagg A, Neilands JB: **Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron(II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in Escherichia coli.** *Biochemistry* 1987, **26**:5471-5477.
270. Escolar L, Perez-Martin J, De Lorenzo V: **Opening the iron box: Transcriptional metalloregulation by the fur protein.** *Journal of Bacteriology* 1999, **181**:6223-6229.
271. Lavrarr JL, McIntosh MA: **Architecture of a Fur binding site: a comparative analysis.** *Journal of Bacteriology* 2003, **185**:2194-2202.
272. Osman D, Cavet JS: **Metal Sensing in Salmonella: Implications for Pathogenesis.** *Advances in Microbial Physiology, Vol 58* 2011, **58**:175-232.
273. Gruer MJ, Guest JR: **2 genetically-distinct and differentially-regulated aconitases (acna and acnb) in escherichia-coli.** *Microbiology-Uk* 1994, **140**:2531-2541.
274. Dubrac S, Touati D: **Fur positive regulation of iron superoxide dismutase in Escherichia coli: Functional analysis of the sodB promoter.** *Journal of Bacteriology* 2000, **182**:3802-3808.
275. Vassinova N, Kozyrev D: **A method for direct cloning of Fur-regulated genes: identification of seven new Fur-regulated loci in Escherichia coli.** *Microbiology-Uk* 2000, **146**:3171-3182.
276. Ellermeier JR, Slauch JM: **Fur regulates expression of the Salmonella pathogenicity island 1 type III secretion system through HilD.** *Journal of Bacteriology* 2008, **190**:476-486.

BIBLIOGRAPHIE

277. Padalon-Brauch G, Hershberg R, Elgrably-Weiss M, Baruch K, Rosenshine I, Margalit H, Altuvia S: **Small RNAs encoded within genetic islands of Salmonella typhimurium show host-induced expression and role in virulence.** *Nucleic Acids Research* 2008, **36**:1913-1927.
278. Masse E, Salvail H, Desnoyers G, Arguin M: **Small RNAs controlling iron metabolism.** *Current Opinion in Microbiology* 2007, **10**:140-145.
279. Masse E, Vanderpool CK, Gottesman S: **Effect of RyhB small RNA on global iron use in Escherichia coli.** *Journal of Bacteriology* 2005, **187**:6962-6971.
280. Prevost K, Desnoyers G, Jacques J-F, Lavoie F, Masse E: **Small RNA-induced mRNA degradation achieved through both translation block and activated cleavage.** *Genes & Development* 2011, **25**:385-396.
281. Desnoyers G, Morissette A, Prevost K, Masse E: **Small RNA-induced differential degradation of the polycistronic mRNA iscRSUA.** *Embo Journal* 2009, **28**:1551-1561.
282. Vecerek B, Moll I, Blaesi U: **Control of Fur synthesis by the non-coding RNA RyhB and iron-responsive decoding.** *Embo Journal* 2007, **26**:965-975.
283. Pulvermacher SC, Stauffer LT, Stauffer GV: **The Small RNA GcvB Regulates sstT mRNA Expression in Escherichia coli.** *Journal of Bacteriology* 2009, **191**:238-248.
284. Urban JH, Vogel J: **Translational control and target recognition by Escherichia coli small RNAs in vivo.** *Nucleic Acids Research* 2007, **35**:1018-1037.
285. Pulvermacher SC, Stauffer LT, Stauffer GV: **Role of the Escherichia coli Hfq protein in GcvB regulation of oppA and dppA mRNAs.** *Microbiology-Sgm* 2009, **155**:115-123.
286. Sharma CM, Papenfort K, Pernitzsch SR, Mollenkopf H-J, Hinton JCD, Vogel J: **Pervasive post-transcriptional control of genes involved in amino acid metabolism by the Hfq-dependent GcvB small RNA.** *Molecular Microbiology* 2011, **81**:1144-1165.
287. Lee HJ, Gottesman S: **sRNA roles in regulating transcriptional regulators: Lrp and SoxS regulation by sRNAs.** *Nucleic Acids Res* 2016, **44**:6907-6923.
288. Heil G, Stauffer LT, Stauffer GV: **Glycine binds the transcriptional accessory protein GcvR to disrupt a GcvA/GcvR interaction and allow GcvA-mediated activation of the Escherichia coli gcvTHP operon.** *Microbiology-Sgm* 2002, **148**:2203-2214.
289. Ghrist AC, Stauffer GV: **Characterization of the escherichia-coli gcvr gene encoding a negative regulator of gcv expression.** *Journal of Bacteriology* 1995, **177**:4980-4984.
290. Tani TH, Khodursky A, Blumenthal RM, Brown PO, Matthews RG: **Adaptation to famine: A family of stationary-phase genes revealed by microarray analysis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, **99**:13471-13476.
291. Ettema TJG, Brinkman AB, Tani TH, Rafferty JB, van der Oost J: **A novel ligand-binding domain involved in regulation of amino acid metabolism in prokaryotes.** *Journal of Biological Chemistry* 2002, **277**:37464-37468.
292. Calvo JM, Matthews RG: **The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in escherichia-coli.** *Microbiological Reviews* 1994, **58**:466-490.
293. Pulvermacher SC, Stauffer LT, Stauffer GV: **Role of the sRNA GcvB in regulation of cycA in Escherichia coli.** *Microbiology-Sgm* 2009, **155**:106-114.
294. Pulvermacher SC, Stauffer LT, Stauffer GV: **The role of the small regulatory RNA GcvB in GcvB/mRNA posttranscriptional regulation of oppA and dppA in Escherichia coli.** *Fems Microbiology Letters* 2008, **281**:42-50.

BIBLIOGRAPHIE

295. Stauffer LT, Stauffer GV: **The Escherichia coli GcvB sRNA Uses Genetic Redundancy to Control cycA Expression.** *ISRN microbiology* 2012, **2012**:636273-636273.
296. Boehm A, Vogel J: **The csgD mRNA as a hub for signal integration via multiple small RNAs.** *Molecular Microbiology* 2012, **84**:1-5.
297. Rohmer L, Hocquet D, Miller SI: **Are pathogenic bacteria just looking for food? Metabolism and microbial pathogenesis.** *Trends in Microbiology* 2011, **19**:341-348.
298. Tharanathan RN, Kittur FS: **Chitin - The undisputed biomolecule of great potential.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2003, **43**:61-87.
299. Francetic O, Badaut C, Rimsky S, Pugsley AP: **The ChiA (YheB) protein of Escherichia coli K-12 is an endochitinase whose gene is negatively controlled by the nucleoid-structuring protein H-NS.** *Molecular Microbiology* 2000, **35**:1506-1517.
300. Larsen T, Petersen BO, Storgaard BG, Duus JO, Palcic MM, Leisner JJ: **Characterization of a novel Salmonella Typhimurium chitinase which hydrolyzes chitin, chitooligosaccharides and an N-acetyllactosamine conjugate.** *Glycobiology* 2011, **21**:426-436.
301. Keyhani NO, Roseman S: **Wild-type Escherichia coli grows on the chitin disaccharide, N,N'-diacetylchitobiose, by expressing the cel operon.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, **94**:14367-14371.
302. Plumbridge J, Pellegrini O: **Expression of the chitobiose operon of Escherichia coli is regulated by three transcription factors: NagC, ChbR and CAP.** *Molecular Microbiology* 2004, **52**:437-449.
303. Rasmussen AA, Johansen J, Nielsen JS, Overgaard M, Kallipolitis B, Valentin-Hansen P: **A conserved small RNA promotes silencing of the outer membrane protein YbfM.** *Molecular Microbiology* 2009, **72**:566-577.
304. Plumbridge J, Bossi L, Oberto J, Wade JT, Figueroa-Bossi N: **Interplay of transcriptional and small RNA-dependent control mechanisms regulates chitosugar uptake in Escherichia coli and Salmonella.** *Molecular Microbiology* 2014, **92**:648-658.
305. Overgaard M, Johansen J, Moller-Jensen J, Valentin-Hansen P: **Switching off small RNA regulation with trap-mRNA.** *Molecular Microbiology* 2009, **73**:790-800.
306. Bossi L, Schwartz A, Guillemardet B, Boudvillain M, Figueroa-Bossi N: **A role for Rho-dependent polarity in gene regulation by a noncoding small RNA.** *Genes & Development* 2012, **26**:1864-1873.
307. Franze MT, Eoyang L, August JT: **Factor fraction required for the synthesis of bacteriophage Qbeta-RNA.** *Nature* 1968, **219**:588-590.
308. Franze de Fernandez MT, Hayward WS, August JT: **Bacterial proteins required for replication of phage Q ribonucleic acid. Purification and properties of host factor I, a ribonucleic acid-binding protein.** *The Journal of biological chemistry* 1972, **247**:824-831.
309. Kamen R, Weissman C, Romer W, Kondo M: **Reconstitution of Q replicase lacking subunit with protein-synthesis-interference factor I.** *European Journal of Biochemistry* 1972, **31**:44-51.
310. Su Q, Schuppli D, Tsui HCT, Winkler ME, Weber H: **Strongly reduced phage Q beta replication, but normal phage MS2 replication in an Escherichia coli K12 mutant with inactivated Q beta host factor (hfq) gene.** *Virology* 1997, **227**:211-214.

BIBLIOGRAPHIE

311. Tsui HCT, Leung HCE, Winkler ME: **Characterization of broadly pleiotropic phenotypes caused by an hfq insertion mutation in escherichia-coli-K-12.** *Molecular Microbiology* 1994, **13**:35-49.
312. Chao Y, Vogel J: **The role of Hfq in bacterial pathogens.** *Current Opinion in Microbiology* 2010, **13**:24-33.
313. Loewen PC, Hu B, Strutinsky J, Sparling R: **Regulation in the rpoS regulon of Escherichia coli.** *Canadian Journal of Microbiology* 1998, **44**:707-717.
314. Figueroa-Bossi N, Lemire S, Maloriol D, Balbontin R, Casadesus J, Bossi L: **Loss of Hfq activates the sigma(E)-dependent envelope stress response in Salmonella enterica.** *Molecular Microbiology* 2006, **62**:838-852.
315. Sun XG, Zhulin I, Wartell RM: **Predicted structure and phyletic distribution of the RNA-binding protein Hfq.** *Nucleic Acids Research* 2002, **30**:3662-3671.
316. Brantl S, Brueckner R: **Small regulatory RNAs from low-GC Gram-positive bacteria.** *Rna Biology* 2014, **11**:443-456.
317. Durand S, Tomasini A, Braun F, Condon C, Romby P: **sRNA and mRNA turnover in Gram-positive bacteria.** *Fems Microbiology Reviews* 2015, **39**:316-330.
318. Rochat T, Bouloc P, Yang Q, Bossi L, Figueroa-Bossi N: **Lack of interchangeability of Hfq-like proteins.** *Biochimie* 2012, **94**:1554-1559.
319. Caillet J, Gracia C, Fontaine F, Hajnsdorf E: **Clostridium difficile Hfq can replace Escherichia coli Hfq for most of its function.** *Rna-a Publication of the Rna Society* 2014, **20**:1567-1578.
320. Tsui HCT, Feng G, Winkler ME: **Transcription of the mutL repair, miaA tRNA modification, hfq pleiotropic regulator, and hflA region protease genes of Escherichia coli K-12 from clustered E sigma(32)-specific promoters during heat shock.** *Journal of Bacteriology* 1996, **178**:5719-5731.
321. Tsui HCT, Feng G, Winkler ME: **Negative regulation of mutS and mutH repair gene expression by the Hfq and RpoS global regulators of Escherichia coli K-12.** *Journal of Bacteriology* 1997, **179**:7476-7487.
322. Vecerek B, Moll I, Blasi U: **Translational autocontrol of the Escherichia coli hfq RNA chaperone gene.** *Rna-a Publication of the Rna Society* 2005, **11**:976-984.
323. Baker CS, Eoery LA, Yakhnin H, Mercante J, Romeo T, Babitzke P: **CsrA inhibits translation initiation of Escherichia coli hfq by binding to a single site overlapping the Shine-Dalgarno sequence.** *Journal of Bacteriology* 2007, **189**:5472-5481.
324. Kajitani M, Kato A, Wada A, Inokuchi Y, Ishihama A: **Regulation of the escherichia-coli hfq gene encoding the host factor for phage q-beta.** *Journal of Bacteriology* 1994, **176**:531-534.
325. Schumacher MA, Pearson RF, Moller T, Valentin-Hansen P, Brennan RG: **Structures of the pleiotropic translational regulator Hfq and an Hfq-RNA complex: a bacterial Sm-like protein.** *Embo Journal* 2002, **21**:3546-3556.
326. Zhang AX, Wassarman KM, Ortega J, Steven AC, Storz G: **The Sm-like Hfq protein increases OxyS RNA interaction with target mRNAs.** *Molecular Cell* 2002, **9**:11-22.
327. Moller T, Franch T, Hojrup P, Keene DR, Bachinger HP, Brennan RG, Valentin-Hansen P: **Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction.** *Molecular Cell* 2002, **9**:23-30.
328. Seraphin B: **SM and SM-like Proteins Belong To A Large Family - Identification Of Proteins Of The U6 as well as the U1, U2, U4 and U5 SNRNPS.** *Embo Journal* 1995, **14**:2089-2098.

BIBLIOGRAPHIE

329. Arluison V, Derreumaux P, Allemand F, Folichon M, Hajnsdorf E, Regnier P: **Structural modelling of the Sm-like protein Hfq from Escherichia coli.** *Journal of Molecular Biology* 2002, **320**:705-712.
330. Kambach C, Walke S, Young R, Avis JM, de la Fortelle E, Raker VA, Luhrmann R, Li J, Nagai K: **Crystal structures of two Sm protein complexes and their implications for the assembly of the spliceosomal snRNPs.** *Cell* 1999, **96**:375-387.
331. Zhou L, Hang J, Zhou Y, Wan R, Lu G, Yin P, Yan C, Shi Y: **Crystal structures of the Lsm complex bound to the 3' end sequence of U6 small nuclear RNA.** *Nature* 2014, **506**:116-120.
332. Golisz A, Sikorski PJ, Kruszka K, Kufel J: **Arabidopsis thaliana LSM proteins function in mRNA splicing and degradation.** *Nucleic Acids Research* 2013, **41**:6232-6249.
333. Wilusz CJ, Wilusz J: **Eukaryotic Lsm proteins: lessons from bacteria.** *Nature Structural & Molecular Biology* 2005, **12**:1031-1036.
334. Nikulin A, Stolboushkina E, Perederina A, Vassilieva I, Blaesi U, Moll I, Kachalova G, Yokoyama S, Vassilyev D, Garber M, et al.: **Structure of Pseudomonas aeruginosa Hfq protein.** *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 2005, **61**:141-146.
335. Baba S, Someya T, Kawai G, Nakamura K, Kumasaka T: **Expression, crystallization and preliminary crystallographic analysis of RNA-binding protein Hfq (YmaH) from Bacillus subtilis in complex with an RNA aptamer.** *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications* 2010, **66**:563-566.
336. Someya T, Baba S, Fujimoto M, Kawai G, Kumasaka T, Nakamura K: **Crystal structure of Hfq from Bacillus subtilis in complex with SELEX-derived RNA aptamer: insight into RNA-binding properties of bacterial Hfq.** *Nucleic Acids Research* 2012, **40**:1856-1867.
337. Robinson KE, Orans J, Kovach AR, Link TM, Brennan RG: **Mapping Hfq-RNA interaction surfaces using tryptophan fluorescence quenching.** *Nucleic Acids Research* 2014, **42**:2736-2749.
338. Yonekura K, Watanabe M, Kageyama Y, Hirata K, Yamamoto M, Maki-Yonekura S: **Post-Transcriptional Regulator Hfq Binds Catalase HPII: Crystal Structure of the Complex.** *Plos One* 2013, **8**:e78216.
339. Sauer E, Weichenrieder O: **Structural basis for RNA 3'-end recognition by Hfq.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011, **108**:13065-13070.
340. Moskaleva O, Melnik B, Gabdulkhakov A, Garber M, Nikonov S, Stolboushkina E, Nikulin A: **The structures of mutant forms of Hfq from Pseudomonas aeruginosa reveal the importance of the conserved His57 for the protein hexamer organization.** *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications* 2010, **66**:760-764.
341. Beich-Frandsen M, Vecerek B, Sjoblom B, Blasi U, Djinovic-Carugo K: **Structural analysis of full-length Hfq from Escherichia coli.** *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications* 2011, **67**:536-540.
342. Schulz EC, Barabas O: **Structure of an Escherichia coli Hfq:RNA complex at 0.97 angstrom resolution.** *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology Communications* 2014, **70**:1492-1497.
343. Brennan RG, Link TM: **Hfq structure, function and ligand binding.** *Current Opinion in Microbiology* 2007, **10**:125-133.

BIBLIOGRAPHIE

344. Moll I, Afonyushkin T, Vytvytska O, Kaberdin VR, Blasi U: **Coincident Hfq binding and RNase E cleavage sites on mRNA and small regulatory RNAs.** *Rna-a Publication of the Rna Society* 2003, **9**:1308-1314.
345. Udekwu KI, Darfeuille F, Vogel J, Reimegard J, Holmqvist E, Wagner EGH: **Hfq-dependent regulation of OmpA synthesis is mediated by an antisense RNA.** *Genes & Development* 2005, **19**:2355-2366.
346. Link TM, Valentin-Hansen P, Brennan RG: **Structure of Escherichia coli Hfq bound to polyriboadenylate RNA.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009, **106**:19286-19291.
347. Sun XG, Wartell RM: **Escherichia coli Hfq binds A(18) and DsrA domain II with similar 2 : 1 Hfq(6)/RNA stoichiometry using different surface sites.** *Biochemistry* 2006, **45**:4875-4887.
348. Moll I, Leitsch D, Steinhauser T, Blasi U: **RNA chaperone activity of the Sm-like Hfq protein.** *Embo Reports* 2003, **4**:284-289.
349. Zhang A, Schu DJ, Tjaden BC, Storz G, Gottesman S: **Mutations in Interaction Surfaces Differentially Impact E. coli Hfq Association with Small RNAs and Their mRNA Targets.** *Journal of Molecular Biology* 2013, **425**:3678-3697.
350. Sonnleitner E, Napetschnig J, Afonyushkin T, Ecker K, Vecerek B, Moll I, Kaberdin VR, Blasi U: **Functional effects of variants of the RNA chaperone Hfq.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004, **323**:1017-1023.
351. Dehaseth PL, Uhlenbeck OC: **Interaction of escherichia-coli host factor protein with oligoriboadenylates.** *Biochemistry* 1980, **19**:6138-6146.
352. Lorenz C, Gesell T, Zimmermann B, Schoeberl U, Bilusic I, Rajkowitsch L, Waldsich C, von Haeseler A, Schroeder R: **Genomic SELEX for Hfq-binding RNAs identifies genomic aptamers predominantly in antisense transcripts.** *Nucleic Acids Research* 2010, **38**:3794-3808.
353. Soper T, Mandin P, Majdalani N, Gottesman S, Woodson SA: **Positive regulation by small RNAs and the role of Hfq.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010, **107**:9602-9607.
354. Wang L, Wang W, Li F, Zhang J, Wu J, Gong Q, Shi Y: **Structural insights into the recognition of the internal A-rich linker from OxyS sRNA by Escherichia coli Hfq.** *Nucleic Acids Research* 2015, **43**:2400-2411.
355. Horstmann N, Orans J, Valentin-Hansen P, Shelburne SA, III, Brennan RG: **Structural mechanism of Staphylococcus aureus Hfq binding to an RNA A-tract.** *Nucleic Acids Research* 2012, **40**:11023-11035.
356. Sauer E, Schmidt S, Weichenrieder O: **Small RNA binding to the lateral surface of Hfq hexamers and structural rearrangements upon mRNA target recognition.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012, **109**:9396-9401.
357. Panja S, Schu DJ, Woodson SA: **Conserved arginines on the rim of Hfq catalyze base pair formation and exchange.** *Nucleic Acids Research* 2013, **41**:7536-7546.
358. Dimastrogiovanni D, Foerhlich KS, Bandyra KJ, Bruce HA, Hohensee S, Vogel J, Luisi BF: **Recognition of the small regulatory RNA RydC by the bacterial Hfq protein.** *Elife* 2014, **3**.
359. Panja S, Santiago-Frangos A, Schu DJ, Gottesman S, Woodson SA: **Acidic Residues in the Hfq Chaperone Increase the Selectivity of sRNA Binding and Annealing.** *Journal of Molecular Biology* 2015, **427**:3491-3500.
360. Zheng A, Panja S, Woodson SA: **Arginine Patch Predicts the RNA Annealing Activity of Hfq from Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria.** *J Mol Biol* 2016, **428**:2259-2264.

BIBLIOGRAPHIE

361. Rabhi M, Espeli O, Schwartz A, Cayrol B, Rahmouni AR, Arluison V, Boudvillain M: **The Sm-like RNA chaperone Hfq mediates transcription antitermination at Rho-dependent terminators.** *Embo Journal* 2011, **30**:2805-2816.
362. Folichon M, Arluison V, Pellegrini O, Huntzinger E, Regnier P, Hajnsdorf E: **The poly(A) binding protein Hfq protects RNA from RNase E and exoribonucleolytic degradation.** *Nucleic Acids Research* 2003, **31**:7302-7310.
363. Zhang AX, Altuvia S, Tiwari A, Argaman L, Hengge-Aronis R, Storz G: **The OxyS regulatory RNA represses rpoS translation and binds the Hfq (HF-I) protein.** *Embo Journal* 1998, **17**:6061-6068.
364. Andrade JM, Pobre V, Matos AM, Arraiano CM: **The crucial role of PNPase in the degradation of small RNAs that are not associated with Hfq.** *Rna-a Publication of the Rna Society* 2012, **18**:844-855.
365. Folichon M, Allemand F, Regnier P, Hajnsdorf E: **Stimulation of poly(A) synthesis by Escherichia coli poly(A) polymerase I is correlated with Hfq binding to poly(A) tails.** *Febs Journal* 2005, **272**:454-463.
366. Hajnsdorf E, Regnier P: **Host factor Hfq of Escherichia coli stimulates elongation of poly(A) tails by poly(A) polymerase I.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000, **97**:1501-1505.
367. Regnier P, Hajnsdorf E: **The interplay of Hfq, poly(A) polymerase I and exoribonucleases at the 3 ends of RNAs resulting from Rho-independent termination: A tentative model.** *Rna Biology* 2013, **10**:602-609.
368. Butland G, Peregrin-Alvarez JM, Li J, Yang WH, Yang XC, Canadien V, Starostine A, Richards D, Beattie B, Krogan N, et al.: **Interaction network containing conserved and essential protein complexes in Escherichia coli.** *Nature* 2005, **433**:531-537.
369. De Lay N, Gottesman S: **Role of polynucleotide phosphorylase in sRNA function in Escherichia coli.** *Rna-a Publication of the Rna Society* 2011, **17**:1172-1189.
370. Ikeda Y, Yagi M, Morita T, Aiba H: **Hfq binding at RhlB-recognition region of RNase E is crucial for the rapid degradation of target mRNAs mediated by sRNAs in Escherichia coli.** *Molecular Microbiology* 2011, **79**:419-432.
371. Herschlag D: **RNA chaperones and the rna folding problem.** *Journal of Biological Chemistry* 1995, **270**:20871-20874.
372. Tsuchihashi Z, Brown PO: **DNA strand exchange and selective DNA annealing promoted by the human-immunodeficiency-virus type-1 nucleocapsid protein.** *Journal of Virology* 1994, **68**:5863-5870.
373. Barrera I, Schuppli D, Sogo JM, Weber H: **Different mechanisms of recognition of bacteriophage q-beta plus and minus-strand rnas by q-beta replicase.** *Journal of Molecular Biology* 1993, **232**:512-521.
374. Arluison V, Hohng S, Roy R, Pellegrini O, Regnier P, Ha T: **Spectroscopic observation of RNA chaperone activities of Hfq in post-transcriptional regulation by a small non-coding RNA.** *Nucleic Acids Research* 2007, **35**:999-1006.
375. Seaver LC, Imlay JA: **Are respiratory enzymes the primary sources of intracellular hydrogen peroxide?** *Journal of Biological Chemistry* 2004, **279**:48742-48750.
376. Siegele DA, Hu JC, Walter WA, Gross CA: **Altered promoter recognition by mutant forms of the sigma-70 subunit of escherichia-coli RNA-polymerase.** *Journal of Molecular Biology* 1989, **206**:591-603.
377. Hengge-Aronis R: **Back to log phase: sigma(s) as a global regulator in the osmotic control of gene expression in Escherichia coli.** *Molecular Microbiology* 1996, **21**:887-893.
378. Majdalani N, Cunning C, Sledjeski D, Elliott T, Gottesman S: **DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its**

BIBLIOGRAPHIE

- action as an antisilencer of transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, **95**:12462-12467.**
379. Majdalani N, Hernandez D, Gottesman S: **Regulation and mode of action of the second small RNA activator of RpoS translation, RprA.** *Molecular Microbiology* 2002, **46**:813-826.
380. Lease RA, Belfort M: **A trans-acting RNA as a control switch in Escherichia coli: DsrA modulates function by forming alternative structures.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000, **97**:9919-9924.
381. Brown L, Elliott T: **Mutations that increase expression of the rpoS gene and decrease its dependence on hfq function in Salmonella typhimurium.** *Journal of Bacteriology* 1997, **179**:656-662.
382. Sledjeski DD, Whitman C, Zhang AX: **Hfq is necessary for regulation by the untranslated RNA DsrA.** *Journal of Bacteriology* 2001, **183**:1997-2005.
383. Lease RA, Woodson SA: **Cycling of the Sm-like protein Hfq on the DsrA small regulatory RNA.** *Journal of Molecular Biology* 2004, **344**:1211-1223.
384. Ribeiro EdA, Jr., Beich-Frandsen M, Konarev PV, Shang W, Vecerek B, Kontaxis G, Haemmerle H, Peterlik H, Svergun DI, Blaesi U, et al.: **Structural flexibility of RNA as molecular basis for Hfq chaperone function.** *Nucleic Acids Research* 2012, **40**:8072-8084.
385. Soper TJ, Doxzen K, Woodson SA: **Major role for mRNA binding and restructuring in sRNA recruitment by Hfq.** *Rna-a Publication of the Rna Society* 2011, **17**:1544-1550.
386. Weichenrieder O: **RNA binding by Hfq and ring-forming (L)Sm proteins A trade-off between optimal sequence readout and RNA backbone conformation.** *Rna Biology* 2014, **11**:537-549.
387. Haemmerle H, Vecerek B, Resch A, Blaesi U: **Duplex formation between the sRNA DsrA and rpoS mRNA is not sufficient for efficient RpoS synthesis at low temperature.** *Rna Biology* 2013, **10**:1834-1841.
388. Muffler A, Fischer D, HenggeAronis R: **The RNA-binding protein HF-I, known as a host factor for phage Q beta RNA replication, is essential for rpoS translation in Escherichia coli.** *Genes & Development* 1996, **10**:1143-1151.
389. Fang FC, Libby SJ, Buchmeier NA, Loewen PC, Switala J, Harwood J, Guiney DG: **The alternative sigma-factor katf (rpos) regulates salmonella virulence.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992, **89**:11978-11982.
390. Robertson GT, Roop RM: **The Brucella abortus host factor I (HF-I) protein contributes to stress resistance during stationary phase and is a major determinant of virulence in mice.** *Molecular Microbiology* 1999, **34**:690-700.
391. Ding YP, Davis BM, Waldor MK: **Hfq is essential for Vibrio cholerae virulence and downregulates sigma(E) expression.** *Molecular Microbiology* 2004, **53**:345-354.
392. Bardill JP, Hammer BK: **Non-coding sRNAs regulate virulence in the bacterial pathogen Vibrio cholerae.** *Rna Biology* 2012, **9**:392-401.
393. Christiansen JK, Larsen MH, Ingmer H, Sogaard-Andersen L, Kallipolitis BH: **The RNA-binding protein Hfq of Listeria monocytogenes: Role in stress tolerance and virulence.** *Journal of Bacteriology* 2004, **186**:3355-3362.
394. McNealy TL, Forsbach-Birk V, Shi CW, Marre R: **The Hfq homolog in Legionella pneumophila demonstrates regulation by LetA and RpoS and interacts with the global regulator CsrA.** *Journal of Bacteriology* 2005, **187**:1527-1532.

BIBLIOGRAPHIE

395. Kim S, Hwang H, Kim K-P, Yoon H, Kang D-H, Ryu S: **hfq Plays Important Roles in Virulence and Stress Adaptation in Cronobacter sakazakii ATCC 29544.** *Infection and Immunity* 2015, **83**:2089-2098.
396. Yang G, Wang L, Wang Y, Li P, Zhu J, Qiu S, Hao R, Wu Z, Li W, Song H: **hfq regulates acid tolerance and virulence by responding to acid stress in Shigella flexneri.** *Research in Microbiology* 2015, **166**:476-485.
397. Geng J, Song Y, Yang L, Feng Y, Qiu Y, Li G, Guo J, Bi Y, Qu Y, Wang W, et al.: **Involvement of the Post-Transcriptional Regulator Hfq in Yersinia pestis Virulence.** *Plos One* 2009, **4**:e6213.
398. Liu Y, Wu N, Dong J, Gao Y, Zhang X, Mu C, Shao N, Yang G: **Hfq Is a Global Regulator That Controls the Pathogenicity of Staphylococcus aureus.** *Plos One* 2010, **5**:e13069.
399. Feliciano JR, Grilo AM, Guerreiro SI, Sousa SA, Leitão JH: **Hfq: a multifaceted RNA chaperone involved in virulence.** *Future Microbiol* 2016, **11**:137-151.
400. Geinguenaud F, Calandrini V, Teixeira J, Mayer C, Liquier J, Lavelle C, Arluison V: **Conformational transition of DNA bound to Hfq probed by infrared spectroscopy.** *Physical Chemistry Chemical Physics* 2011, **13**:1222-1229.
401. Takada A, Wachi M, Kaidow A, Takamura M, Nagai K: **DNA binding properties of the hfq gene product of Escherichia coli.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997, **236**:576-579.
402. Azam TA, Hiraga S, Ishihama A: **Two types of localization of the DNA-binding proteins within the Escherichia coli nucleoid.** *Genes to Cells* 2000, **5**:613-626.
403. Diestra E, Cayrol B, Arluison V, Risco C: **Cellular Electron Microscopy Imaging Reveals the Localization of the Hfq Protein Close to the Bacterial Membrane.** *Plos One* 2009, **4**:e8301.
404. Cech GM, Pakula B, Kamrowska D, Wegrzyn G, Arluison V, Szalewska-Palasz A: **Hfq protein deficiency in Escherichia coli affects ColE1-like but not lambda plasmid DNA replication.** *Plasmid* 2014, **73**:10-15.
405. Le Derout J, Boni IV, Regnier P, Hajnsdorf E: **Hfq affects mRNA levels independently of degradation.** *Bmc Molecular Biology* 2010, **11**.
406. Ross JA, Trussler RS, Black MD, McLellan CR, Haniford DB: **Tn5 transposition in Escherichia coli is repressed by Hfq and activated by over-expression of the small non-coding RNA SgrS.** *Mobile DNA* 2014, **5**.
407. Haniford DB, Ellis MJ: **Transposons Tn10 and Tn5.** *Microbiology spectrum* 2015, **3**:MDNA3-0002-2014.
408. Ellis MJ, Trussler RS, Haniford DB: **Hfq binds directly to the ribosome- binding site of IS10 transposase mRNA to inhibit translation.** *Molecular Microbiology* 2015, **96**:633-650.
409. Figueroa-Bossi N, Valentini M, Malleret L, Fiorini F, Bossi L: **Caught at its own game: regulatory small RNA inactivated by an inducible transcript mimicking its target (vol 23, pg 2004, 2009).** *Genes & Development* 2010, **24**:734-734.
410. Vogel J, Luisi BF: **Hfq and its constellation of RNA.** *Nat Rev Microbiol* 2011, **9**:578-589.
411. Geissmann TA, Touati D: **Hfq, a new chaperoning role: binding to messenger RNA determines access for small RNA regulator.** *Embo J* 2004, **23**:396-405.
412. Moller T, Franch T, Hojrup P, Keene DR, Bachinger HP, Brennan RG, Valentin-Hansen P: **Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction.** *Mol Cell* 2002, **9**:23-30.
413. Panja S, Woodson SA: **Hfq proximity and orientation controls RNA annealing.** *Nucleic Acids Res* 2012, **40**:8690-8697.

BIBLIOGRAPHIE

414. Soper TJ, Woodson SA: **The rpoS mRNA leader recruits Hfq to facilitate annealing with DsrA sRNA.** *RNA* 2008, **14**:1907-1917.
415. Zhang A, Wassarman KM, Ortega J, Steven AC, Storz G: **The Sm-like Hfq protein increases OxyS RNA interaction with target mRNAs.** *Mol Cell* 2002, **9**:11-22.
416. Folichon M, Arluison V, Pellegrini O, Huntzinger E, Regnier P, Hajsnsdorf E: **The poly(A) binding protein Hfq protects RNA from RNase E and exoribonucleolytic degradation.** *Nucleic Acids Res* 2003, **31**:7302-7310.
417. Moll I, Afonyushkin T, Vytvytska O, Kaberdin VR, Bläsi U: **Coincident Hfq binding and RNase E cleavage sites on mRNA and small regulatory RNAs.** *RNA* 2003, **9**:1308-1314.
418. Schu DJ, Zhang A, Gottesman S, Storz G: **Alternative Hfq-sRNA interaction modes dictate alternative mRNA recognition.** *EMBO J* 2015, **34**:2557-2573.
419. Desnoyers G, Masse E: **Noncanonical repression of translation initiation through small RNA recruitment of the RNA chaperone Hfq.** *Genes Dev* 2012, **26**:726-739.
420. Salvail H, Caron MP, Belanger J, Masse E: **Antagonistic functions between the RNA chaperone Hfq and an sRNA regulate sensitivity to the antibiotic colicin.** *EMBO J* 2013, **32**:2764-2778.
421. Brennan RG, Link TM: **Hfq structure, function and ligand binding.** *Curr Opin Microbiol* 2007, **10**:125-133.
422. Sauer E: **Structure and RNA-binding properties of the bacterial LSm protein Hfq.** *RNA Biol* 2013, **10**:610-618.
423. Link TM, Valentin-Hansen P, Brennan RG: **Structure of Escherichia coli Hfq bound to polyriboadenylate RNA.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**:19292-19297.
424. Mikulecky PJ, Kaw MK, Brescia CC, Takach JC, Sledjeski DD, Feig AL: **Escherichia coli Hfq has distinct interaction surfaces for DsrA, rpoS and poly(A) RNAs.** *Nat Struct Mol Biol* 2004, **11**:1206-1214.
425. Otaka H, Ishikawa H, Morita T, Aiba H: **PolyU tail of rho-independent terminator of bacterial small RNAs is essential for Hfq action.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**:13059-13064.
426. Sauer E, Weichenrieder O: **Structural basis for RNA 3'-end recognition by Hfq.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**:13065-13070.
427. Schumacher MA, Pearson RF, Moller T, Valentin-Hansen P, Brennan RG: **Structures of the pleiotropic translational regulator Hfq and an Hfq-RNA complex: a bacterial Sm-like protein.** *Embo J* 2002, **21**:3546-3556.
428. Robinson KE, Orans J, Kovach AR, Link TM, Brennan RG: **Mapping Hfq-RNA interaction surfaces using tryptophan fluorescence quenching.** *Nucleic Acids Res* 2014, **42**:2736-2749.
429. Soper T, Mandin P, Majdalani N, Gottesman S, Woodson SA: **Positive regulation by small RNAs and the role of Hfq.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**:9602-9607.
430. Dimastrogiovanni D, Frohlich KS, Bandyra KJ, Bruce HA, Hohensee S, Vogel J, Luisi BF: **Recognition of the small regulatory RNA RydC by the bacterial Hfq protein.** *Elife* 2014, **3**:doi: 10.7554/eLife.05375.
431. Panja S, Schu DJ, Woodson SA: **Conserved arginines on the rim of Hfq catalyze base pair formation and exchange.** *Nucleic Acids Res* 2013, **41**:7536-7546.
432. Sauer E, Schmidt S, Weichenrieder O: **Small RNA binding to the lateral surface of Hfq hexamers and structural rearrangements upon mRNA target recognition.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, **109**:9396-9401.
433. Zheng A, Panja S, Woodson SA: **Arginine Patch Predicts the RNA Annealing Activity of Hfq from Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria.** *J Mol Biol* 2016.

BIBLIOGRAPHIE

434. Zhang A, Schu DJ, Tjaden BC, Storz G, Gottesman S: **Mutations in interaction surfaces differentially impact E. coli Hfq association with small RNAs and their mRNA targets.** *J Mol Biol* 2013, **425**:3678-3697.
435. Yang Q, Figueroa-Bossi N, Bossi L: **Translation enhancing ACA motifs and their silencing by a bacterial small regulatory RNA.** *PLoS Genet* 2014, **10**:e1004026.
436. Sharma CM, Papenfort K, Pernitzsch SR, Mollenkopf HJ, Hinton JC, Vogel J: **Pervasive post-transcriptional control of genes involved in amino acid metabolism by the Hfq-dependent GcvB small RNA.** *Mol Microbiol* 2011, **81**:1144-1165.
437. Balbontín R, Villagra N, Pardos de la Gandara M, Mora G, Figueroa-Bossi N, Bossi L: **Expression of Iron, the Salmochelin siderophore receptor, requires mRNA activation by RyhB small RNA homologues.** *Mol Microbiol* 2016, **100**:139-155.
438. Plumbridge J, Bossi L, Oberto J, Wade JT, Figueroa-Bossi N: **Interplay of transcriptional and small RNA-dependent control mechanisms regulates chitosugar uptake in Escherichia coli and Salmonella.** *Mol Microbiol* 2014, **92**:648-658.
439. Massé E, Escorcia FE, Gottesman S: **Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in Escherichia coli.** *Genes Dev* 2003, **17**:2374-2383.
440. Fender A, Elf J, Hampel K, Zimmermann B, Wagner EG: **RNAs actively cycle on the Sm-like protein Hfq.** *Genes Dev* 2010, **24**:2621-2626.
441. Hussein R, Lim HN: **Disruption of small RNA signaling caused by competition for Hfq.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**:1110-1115.
442. Moon K, Gottesman S: **Competition among Hfq-binding small RNAs in Escherichia coli.** *Mol Microbiol* 2011.
443. Rochat T, Delumeau O, Figueroa-Bossi N, Noirot P, Bossi L, Dervyn E, Bouloc P: **Tracking the Elusive Function of Bacillus subtilis Hfq.** *PLoS One* 2015, **10**:e0124977.
444. Lilleengen K: **Typing of Salmonella typhimurium by means of bacteriophage.** *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 1948, **77**:2-125.
445. Figueroa-Bossi N, Coissac E, Netter P, Bossi L: **Unsuspected prophage-like elements in Salmonella typhimurium.** *Mol Microbiol* 1997, **25**:161-173.
446. Bertani G: **Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems.** *J Bacteriol* 2004, **186**:595-600.
447. Maloy SR, Roth JR: **Regulation of proline utilization in Salmonella typhimurium: characterization of put::Mu d(Ap, lac) operon fusions.** *J Bacteriol* 1983, **154**:561-568.
448. Macconkey A: **Lactose-Fermenting Bacteria in Faeces.** *J Hyg (Lond)* 1905, **5**:333-379.
449. Schmieger H: **Phage P22-mutants with increased or decreased transduction abilities.** *Mol Gen Genet* 1972, **119**:75-88.
450. Lemire S, Figueroa-Bossi N, Bossi L: **Bacteriophage crosstalk: coordination of prophage induction by trans-acting antirepressors.** *PLoS Genet* 2011, **7**:e1002149.
451. Datsenko KA, Wanner BL: **One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:6640-6645.
452. Murphy KC, Campellone KG, Poteete AR: **PCR-mediated gene replacement in Escherichia coli.** *Gene* 2000, **246**:321-330.
453. Yu D, Ellis HM, Lee EC, Jenkins NA, Copeland NG, Court DL: **An efficient recombination system for chromosome engineering in Escherichia coli.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:5978-5983.

BIBLIOGRAPHIE

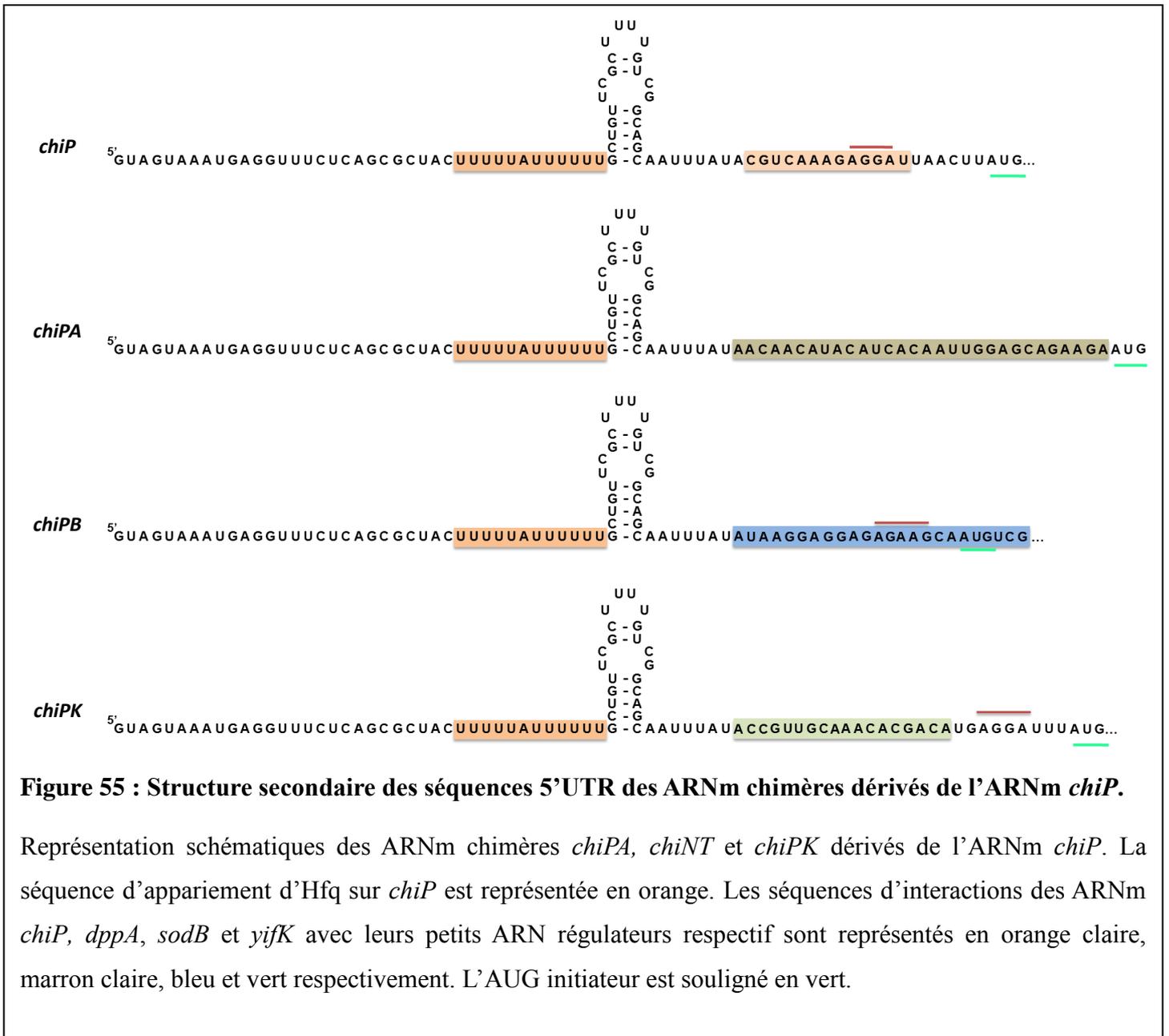
454. Ellermeier CD, Janakiraman A, Slauch JM: **Construction of targeted single copy lac fusions using lambda Red and FLP-mediated site-specific recombination in bacteria.** *Gene* 2002, **290**:153-161.
455. Figueroa-Bossi N, Bossi L: **Recombineering applications for the mutational analysis of bacterial RNA-binding proteins and their sites of action.** *Methods Mol Biol* 2015, **1259**:103-116.
456. Miller JH: *A Short Course in Bacterial Genetics. A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria.* Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1992.
457. Figueroa N, Wills N, Bossi L: **Common sequence determinants of the response of a prokaryotic promoter to DNA bending and supercoiling.** *Embo J* 1991, **10**:941-949.
458. Morita T MK, Aiba H.: **Detection of sRNA–mRNA Interactions by Electrophoretic Mobility Shift Assay.** In *Bacterial Regulatory RNA.* Edited by Keiler KC: Humana Press; 2012:235-244. vol 905.]
459. Olsen AS, Moller-Jensen J, Brennan RG, Valentin-Hansen P: **C-terminally truncated derivatives of Escherichia coli Hfq are proficient in riboregulation.** *Journal of molecular biology* 2010, **404**:173-182.
460. Fortas E, Piccirilli F, Malabirade A, Militello V, Trepout S, Marco S, Taghbalout A, Arluison V: **New insight into the structure and function of Hfq C-terminus.** *Bioscience Reports* 2015, **35**.
461. Beich-Frandsen M, Vecerek B, Konarev PV, Sjoebloom B, Kloiber K, Haemmerle H, Rajkowitsch L, Miles AJ, Kontaxis G, Wallace BA, et al.: **Structural insights into the dynamics and function of the C-terminus of the E-coli RNA chaperone Hfq.** *Nucleic Acids Research* 2011, **39**:4900-4915.
462. Abouhamad WN, Manson MD: **The dipeptide permease of Escherichia coli closely resembles other bacterial transport systems and shows growth-phase-dependent expression.** *Molecular Microbiology* 1994, **14**:1077-1092.
463. Chao Y, Papenfort K, Reinhardt R, Sharma CM, Vogel J: **An atlas of Hfq-bound transcripts reveals 3' UTRs as a genomic reservoir of regulatory small RNAs.** *Embo Journal* 2012, **31**:4005-4019.
464. Datsenko KA, Wanner BL: **One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000, **97**:6640-6645.
465. Peters JM, Mooney RA, Grass JA, Jessen ED, Tran F, Landick R: **Rho and NusG suppress pervasive antisense transcription in Escherichia coli.** *Genes & Development* 2012, **26**:2621-2633.
466. Thomason MK, Fontaine F, De Lay N, Storz G: **A small RNA that regulates motility and biofilm formation in response to changes in nutrient availability in Escherichia coli.** *Molecular Microbiology* 2012, **84**:17-35.
467. Jorgensen MG, Thomason MK, Havelund J, Valentin-Hansen P, Storz G: **Dual function of the McaS small RNA in controlling biofilm formation.** *Genes & Development* 2013, **27**:1132-1145.
468. Mooney RA, Davis SE, Peters JM, Rowland JL, Ansari AZ, Landick R: **Regulator Trafficking on Bacterial Transcription Units In Vivo.** *Molecular Cell* 2009, **33**:97-108.
469. Azhikina TL, Ignatov DV, Salina EG, Fursov MV, Kaprelyants AS: **Role of Small Noncoding RNAs in Bacterial Metabolism.** *Biochemistry-Moscow* 2015, **80**:1633-1646.

BIBLIOGRAPHIE

470. Papenfort K, Bouvier M, Mika F, Sharma CM, Vogel J: **Evidence for an autonomous 5' target recognition domain in an Hfq-associated small RNA.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010, **107**:20435-20440.
471. Murina VN, Nikulin AD: **Bacterial Small Regulatory RNAs and Hfq Protein.** *Biochemistry-Moscow* 2015, **80**:1647-1654.
472. Schu DJ, Zhang A, Gottesman S, Storz G: **Alternative Hfq-sRNA interaction modes dictate alternative mRNA recognition.** *Embo Journal* 2015, **34**:2557-2573.
473. Vecerek B, Rajkowitsch L, Sonnleitner E, Schroeder R, Blaes U: **The C-terminal domain of Escherichia coli Hfq is required for regulation.** *Nucleic Acids Research* 2008, **36**:133-143.
474. Wang X, Ji SC, Jeon HJ, Lee Y, Lim HM: **Two-level inhibition of galK expression by Spot 42: Degradation of mRNA mK2 and enhanced transcription termination before the galK gene.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2015, **112**:7581-7586.
475. Figueroa-Bossi N, Schwartz A, Guillemardet B, D'Heygere F, Bossi L, Boudvillain M: **RNA remodeling by bacterial global regulator CsrA promotes Rho-dependent transcription termination.** *Genes & Development* 2014, **28**:1239-1251.
476. Dutta D, Shatalin K, Epshtein V, Gottesman ME, Nudler E: **Linking RNA Polymerase Backtracking to Genome Instability in E. coli.** *Cell* 2011, **146**:533-543.
477. Bertani G: **Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems.** *Journal of Bacteriology* 2004, **186**:595-600.
478. MacConkey A: **Lactose-fermenting bacteria in faeces.** *Journal of Hygiene* 1905, **5**:333-379.
479. Cherepanov PP, Wackernagel W: **Gene disruption in escherichia-coli - tcr and km(r) cassettes with the option of flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant.** *Gene* 1995, **158**:9-14.
480. Figueroa-Bossi N, Coissac E, Netter P, Bossi L: **Unsuspected prophage-like elements in Salmonella typhimurium.** *Molecular Microbiology* 1997, **25**:161-173.
481. Casjens S, Hayden M: **Analysis in vivo of the bacteriophage-p22 headful nuclease.** *Journal of Molecular Biology* 1988, **199**:467-474.
482. Schmiede H: **Phage P22-mutants with increased or decreased transduction abilities.** *Molecular and General Genetics* 1972, **119**:75-&.
483. BR B: **Curing bacterial cells of lysogenic viruses by using UCB indicator plates.** Edited by: Biotechniques; 1984:234-240. vol 2.]
484. Karlinsey JE: **lambda-red genetic engineering in Salmonella enterica serovar typhimurium.** *Advanced Bacterial Genetics: Use of Transposons and Phage for Genomic Engineering* 2007, **421**:199-209.
485. Bochner BR, Huang HC, Schieven GL, Ames BN: **Positive selection for loss of tetracycline resistance.** *Journal of Bacteriology* 1980, **143**:926-933.
486. H. MJ: *A Short Course in Bacterial Genetics. A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria:* Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1992.
487. Figueroa N, Wills N, Bossi L: **Common sequence determinants of the response of a prokaryotic promoter to DNA bending and supercoiling.** *Embo Journal* 1991, **10**:941-949.
488. Herrera RE, Shaw PE: **UV shadowing provides a simple means to quantify nucleic acid transferred to hybridization membranes.** *Nucleic Acids Research* 1989, **17**:8892-8892.

ANNEXES

1. Annexe 1 : Structure des ARNm chimères



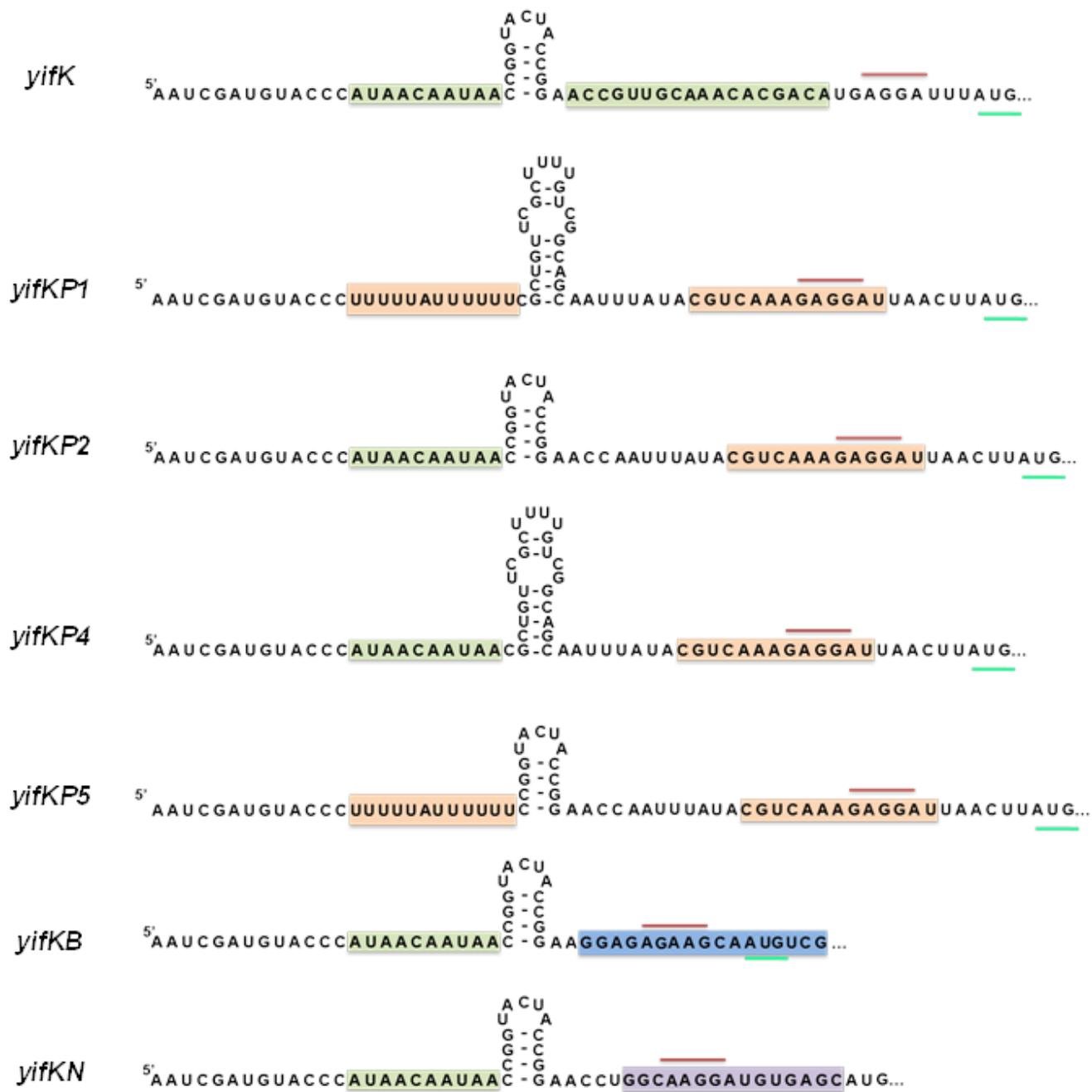
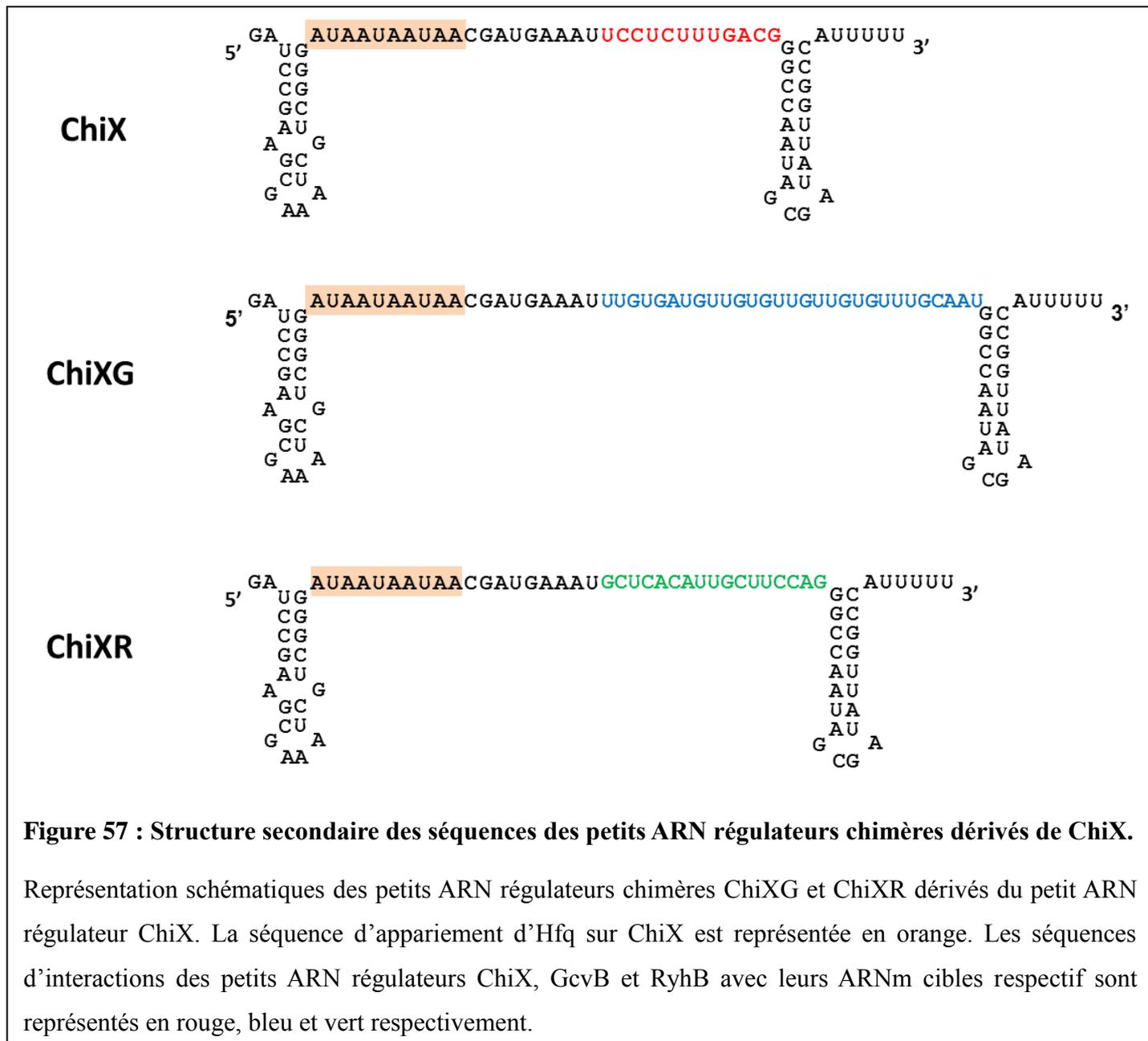


Figure 56 : Structure secondaire des séquences 5'UTR des ARNm chimères dérivés de l'ARNm *yifK*.

Représentation schématiques des ARNm chimères *yifKP1*, *yifKP2*, *yifKP4*, *yifKP5*, *yifKB* et *yifKN* dérivés de l'ARNm *yifK*. Les séquences d'appariements d'Hfq sur *yifK* et *chiP* sont représentées en vert et en orange respectivement. Les séquences d'interactions des ARNm *yifK*, *chiP*, *sodB* et *iroN* avec leurs petits ARN régulateurs respectif sont représentés en vert, orange claire, bleu et violet respectivement. L'AUG initiateur est souligné en vert.

2. Annexe 2 : Structure des petits ARN régulateurs chimériques.



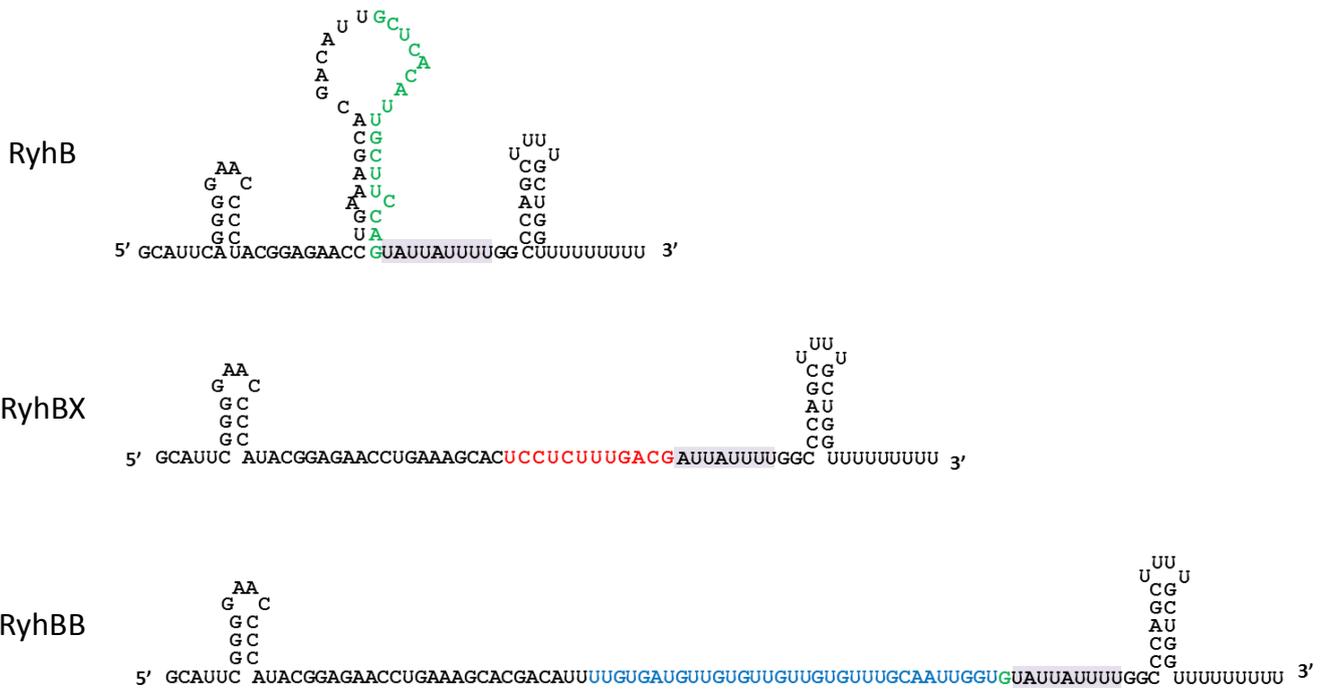


Figure 59 : Structure secondaire des séquences des petits ARN régulateurs chimères dérivés de RyhB.

Représentation schématiques des petits ARN régulateurs chimères RyhBX et RyhBB dérivés du petit ARN régulateur RyhB. La séquence d'appariement d'Hfq sur ChiX est représentée en violet. Les séquences d'interactions des petits ARN régulateurs RyhB, ChiX et GcvB avec leurs ARNm cibles respectif sont représentés en vert, rouge et bleu respectivement.

3. Annexe 3 : Liste des souches et leurs génotypes par thématique

| Étude de la régulation des ARNm par les petits ARN régulateurs : Rôle des sites de fixation d'Hfq sur les ARNs et du domaine C-terminal d'Hfq. | | |
|--|--|---------------------|
| Souche | Génotype | Source ou référence |
| MA3397 | sbcE21 zfh-8157::Tn10dTc | [480] |
| MA3409 | Gifsy-1[-] | [480] |
| MA7455 | Gifsy-1[-] / pKD46 | [314] |
| MA8020 | Gifsy-1[-] <i>yifK87::MudK</i> | [314] |
| MA8933 | Gifsy-1[-] Δ [<i>chiX-ybaP</i>]::cat | [28] |
| MA9132 | Gifsy-1[-] <i>chiP::lacZ</i> | [28] |
| MA9184 | Gifsy-1[-] <i>chiP::lacZ</i> Δ [<i>chiX-ybaP</i>]::cat | [28] |
| MA9980 | Gifsy-1[-] Δ <i>fur::tetAR</i> | [35] |
| MA10115 | Gifsy-1[-] <i>chiP::lacZ</i> / pKD46 | |
| MA10163 | Gifsy-1[-] Δ <i>ryhB2::spec</i> | [35] |
| MA10171 | Gifsy-1[-] Δ <i>ryhB1::cat</i> Δ <i>ryhB2::spec</i> Δ <i>fur::tetAR</i> | [35] |
| MA10241 | Gifsy-1[-] Δ <i>GcvB::cat</i> | [32] |
| MA10242 | Gifsy-1[-] Δ <i>GcvB::spec</i> | [32] |
| MA10377 | Gifsy-1[-] <i>yifK87::MudK</i> Δ <i>GcvB::cat</i> | [32] |
| MA10559 | Gifsy-1[-] <i>yifK::tetAR</i> <i>yifK87::MudK</i> / pKD46 | |
| MA10631 | Gifsy-1[-] <i>chiP_{AGG}}</i> <i>chiQ::pCE40</i> Δ <i>hfq::cat</i> | |
| MA10714 | Gifsy-1[-] <i>Hfq-cat</i> | |
| MA10894 | Gifsy-1[-] <i>sodB::lacZ</i> Δ <i>ryhB1::cat</i> Δ <i>ryhB2::spec</i> Δ <i>fur::tetAR</i> | |
| MA11226 | Gifsy-1[-] <i>hfq</i> Δ 70-102- <i>cat</i> | |
| MA11231 | Gifsy-1[-] <i>hfq</i> -3xFLAG- <i>cat</i> | |
| MA11244 | Gifsy-1[-] <i>hfq</i> Δ 70-98- <i>cat</i> | |
| MA11398 | Gifsy-1[-] <i>gcvBB</i> | |
| MA11399 | Gifsy-1[-] <i>ChiXG</i> | |
| MA11400 | Gifsy-1[-] <i>ChiXR</i> | |
| MA11436 | Gifsy-1[-] <i>chiP::tetAR</i> <i>chiP::lacZ</i> / pKD46 | [475] |

| | | |
|---------|--|--|
| MA11437 | Gifsy-1[-] <i>chiPK::lacZ</i> | |
| MA11438 | Gifsy-1[-] <i>chiPA::lacZ</i> | |
| MA11439 | Gifsy-1[-] <i>chiPB::lacZ</i> | |
| MA11448 | Gifsy-1[-] <i>chiPK::lacZ ChiXG</i> | |
| MA11449 | Gifsy-1[-] <i>chiPA::lacZ ChiXG</i> | |
| MA11451 | Gifsy-1[-] <i>chiPB::lacZ Δfur::tetAR</i> | |
| MA11452 | Gifsy-1[-] <i>sodB::lacZ ChiXR Δfur::tetAR</i> | |
| MA11453 | Gifsy-1[-] <i>sodB::lacZ gcvBB Δfur::tetAR</i> | |
| MA11454 | Gifsy-1[-] <i>chiPB::lacZ ChiXR</i> | |
| MA11456 | Gifsy-1[-] <i>chiPK::lacZ ΔGcvB::cat</i> | |
| MA11457 | Gifsy-1[-] <i>chiPA::lacZ ΔGcvB::cat</i> | |
| MA11458 | Gifsy-1[-] <i>chiPK::lacZ ChiXG ΔGcvB::cat</i> | |
| MA11459 | Gifsy-1[-] <i>chiPA::lacZ ChiXG ΔGcvB::cat</i> | |
| MA11612 | Gifsy-1[-] <i>chiPB::lacZ Δfur::tetAR ΔryhB1::cat</i> | |
| MA11615 | Gifsy-1[-] <i>chiPB::lacZ ChiXR ΔryhB1::cat Δfur::tetAR</i> | |
| MA11619 | Gifsy-1[-] <i>gcvBX</i> | |
| MA11665 | Gifsy-1[-] <i>ΔryhB2::spec /pKD46</i> | |
| MA11666 | Gifsy-1[-] <i>ΔryhB2::spec ryhB::tetAR /pKD46</i> | |
| MA11682 | Gifsy-1[-] <i>ΔryhB2::spec ryhBB</i> | |
| MA11685 | Gifsy-1[-] <i>ryhBB ΔryhB2::spec Δfur::tetAR</i> | |
| MA11686 | Gifsy-1[-] <i>ryhBB ΔryhB2::spec Δfur::tetAR yifK87::MudK</i> | |
| MA11689 | Gifsy-1[-] <i>ryhBX ΔryhB2::spec</i> | |
| MA11694 | Gifsy-1[-] <i>ryhBX ΔryhB2::spec Δfur::tetAR</i> | |
| MA11695 | Gifsy-1[-] <i>yifK87::MudK ΔryhB2::spec ryhBB Δfur::tetAR ΔGcvB::cat</i> | |
| MA11707 | Gifsy-1[-] <i>sodB::lacZ ΔryhB2::spec Δfur::tetAR</i> | |
| MA11844 | Gifsy-1[-] <i>dppA::lacZ</i> | |
| MA11846 | Gifsy-1[-] <i>dppA::lacZ ΔgcvB::cat</i> | |
| MA11948 | Gifsy-1[-] <i>chiX::tetAR</i> | |
| BG115 | Gifsy-1[-] <i>sodB::lacZ ChiXR ΔryhB1::cat Δfur::tetAR</i> | |
| BG116 | Gifsy-1[-] <i>sodB::lacZ gcvBB ΔryhB1::cat Δfur::tetAR</i> | |
| BG117 | Gifsy-1[-] <i>chiPB::lacZ ChiXR ΔryhB1::cat</i> | |
| BG145 | Gifsy-1[-] <i>chiPK::lacZ Δ[chiX-ybaP]::cat</i> | |
| BG146 | Gifsy-1[-] <i>chiPK::lacZ Δ[chiX-ybaP]::cat ΔGcvB::spec</i> | |

| | | |
|-------|---|--|
| BG148 | Gfsy-1[-] <i>chiPA::lacZ Δ[chiX-ybaP]::cat</i> | |
| BG149 | Gfsy-1[-] <i>chiPA::lacZ Δ[chiX-ybaP]::cat ΔGcvB::spec</i> | |
| BG153 | Gfsy-1[-] <i>chiPB::lacZ ChiXR Δfur::tetAR</i> | |
| BG170 | Gfsy-1[-] <i>chiPB::lacZ Δ[chiX-ybaP]::cat</i> | |
| BG171 | Gfsy-1[-] <i>chiP::lacZ gcvBX</i> | |
| BG172 | Gfsy-1[-] <i>yifK87::MudK ChiXG</i> | |
| BG173 | Gfsy-1[-] <i>chiP::lacZ gcvBX Δ[chiX-ybaP]::cat</i> | |
| BG174 | Gfsy-1[-] <i>yifK87::MudK ChiXG ΔGcvB::cat</i> | |
| BG181 | Gfsy-1[-] <i>chiPB::lacZ ΔryhB2::spec Δfur::tetAR</i> | |
| BG183 | Gfsy-1[-] <i>chiPB::lacZ Δfur::tetAR ΔryhB1::cat ΔryhB2::spec</i> | |
| BG185 | Gfsy-1[-] <i>chiPB::lacZ ChiXR Δfur::tetAR ΔryhB1::cat ΔryhB2::spec</i> | |
| BG186 | Gfsy-1[-] <i>sodB::lacZ gcvBB ΔryhB1::cat ΔryhB2::spec Δfur::tetAR</i> | |
| BG187 | Gfsy-1[-] <i>sodB::lacZ ChiXR ΔryhB1::cat ΔryhB2::spec Δfur::tetAR</i> | |
| BG188 | Gfsy-1[-] <i>sodB::lacZ ΔryhB2::spec Δfur::tetAR</i> | |
| BG192 | Gfsy-1[-] <i>dppA::lacZ ChiXG</i> | |
| BG193 | Gfsy-1[-] <i>dppA::lacZ ryhBB ΔryhB2::spec Δfur::tetAR</i> | |
| BG194 | Gfsy-1[-] <i>dppA::lacZ ChiXG ΔgcvB::cat</i> | |
| BG195 | Gfsy-1[-] <i>dppA::lacZ ryhBB ΔryhB2::spec Δfur::tetAR ΔgcvB::cat</i> | |
| BG211 | Gfsy-1[-] <i>gcvBX Δ[chiX-ybaP]::cat</i> | |
| BG212 | Gfsy-1[-] <i>ΔryhB2::spec ryhBX Δfur::tetAR Δ[chiX-ybaP]::cat</i> | |
| BG220 | Gfsy-1[-] <i>yifKP1::lacZ</i> | |
| BG233 | Gfsy-1[-] <i>yifKP1::lacZ / pKD46</i> | |
| BG234 | Gfsy-1[-] <i>yifKP1::lacZ yifKP1 ::tetAR / pKD46</i> | |
| BG236 | Gfsy-1[-] <i>yifKP4::lacZ</i> | |
| BG237 | Gfsy-1[-] <i>yifKP2 ::lacZ</i> | |
| BG248 | Gfsy-1[-] <i>yifKP4::lacZ Δ[chiX-ybaP]::cat</i> | |
| BG249 | Gfsy-1[-] <i>yifKP4::lacZ gcvBX Δ[chiX-ybaP]::cat</i> | |
| BG253 | Gfsy-1[-] <i>yifKP2::lacZ / pKD46</i> | |
| BG254 | Gfsy-1[-] <i>yifKP2::lacZ yifKP2::tetAR / pKD46</i> | |
| BG255 | Gfsy-1[-] <i>yifKP5::lacZ</i> | |
| BG258 | Gfsy-1[-] <i>yifKP5::lacZ Δ[chiX-ybaP]::cat</i> | |
| BG259 | Gfsy-1[-] <i>yifKP5::lacZ gcvBX Δ[chiX-ybaP]::cat</i> | |
| BG270 | Gfsy-1[-] <i>yifKP4::lacZ ryhBX ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Δ[chiX-ybaP]::scar</i> | |

| | | |
|-------|--|--|
| BG271 | Gifsy-1[-] <i>yifKP5::lacZ ryhBX ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Δ[chiX-ybaP]::scar</i> | |
| BG275 | Gifsy-1[-] <i>chiP::lacZ ryhBX ΔryhB2::spec Δfur::tetAR</i> | |
| BG295 | Gifsy-1[-] <i>yifKB::lacZ</i> | |
| BG353 | Gifsy-1[-] <i>yifKB::lacZ Δfur::tetAR</i> | |
| BG357 | Gifsy-1[-] <i>yifKB::lacZ Δfur::tetAR ΔryhB2::spec</i> | |
| BG435 | Gifsy-1[-] <i>yifKP1::lacZ ryhBX ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Δ[chiX-ybaP]::scar</i> | |
| BG452 | Gifsy-1[-] <i>yifKP2::lacZ ryhBX ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Δ[chiX-ybaP]::scar</i> | |
| BG618 | Gifsy-1[-] <i>YifKP1::lacZ gcvBX Δ[chiX-ybaP]::scar</i> | |
| BG619 | Gifsy-1[-] <i>YifKP2::lacZ gcvBX Δ[chiX-ybaP]::scar</i> | |
| BG620 | Gifsy-1[-] <i>yifKP1::lacZ ryhBX ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Δ[chiX-ybaP]::scar hfqΔ70-102-FLAG-cat</i> | |
| BG621 | Gifsy-1[-] <i>yifKP1::lacZ ryhBX ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Δ[chiX-ybaP]::scar hfqΔ70-102-3xFLAG-cat</i> | |
| BG622 | Gifsy-1[-] <i>yifKP2::lacZ ryhBX ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Δ[chiX-ybaP]::scar hfqΔ70-102-FLAG-cat</i> | |
| BG623 | Gifsy-1[-] <i>yifKP2::lacZ ryhBX ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Δ[chiX-ybaP]::scar hfqΔ70-102-3xFLAG-cat</i> | |
| BG648 | Gifsy-1[-] <i>yifKP1::lacZ hfqΔ70-102-FLAG-cat</i> | |
| BG649 | Gifsy-1[-] <i>yifKP1::lacZ hfqΔ70-102-3xFLAG-cat</i> | |
| BG650 | Gifsy-1[-] <i>yifKP2::lacZ hfqΔ70-102-FLAG-cat</i> | |
| BG651 | Gifsy-1[-] <i>YifKP2::lacZ hfqΔ70-102-3xFLAG-cat</i> | |
| BG652 | Gifsy-1[-] <i>yifKP1::lacZ GcvBX Δ[chiX-ybaP]::scar hfqΔ70-102-FLAG-cat</i> | |
| BG653 | Gifsy-1[-] <i>yifKP1::lacZ GcvBX Δ[chiX-ybaP]::scar hfqΔ70-102-3xFLAG-cat</i> | |
| BG654 | Gifsy-1[-] <i>yifKP2::lacZ GcvBX Δ[chiX-ybaP]::scar hfqΔ70-102-FLAG-cat</i> | |
| BG655 | Gifsy-1[-] <i>yifKP2::lacZ GcvBX Δ[chiX-ybaP]::scar hfqΔ70-102-3xFLAG-cat</i> | |
| BG657 | Gifsy-1[-] <i>chiP::lacZ Δhfq::cat</i> | |
| BG662 | Gifsy-1[-] <i>chiP::lacZ hfqΔ70-102-cat</i> | |
| BG663 | Gifsy-1[-] <i>chiP::lacZ hfqΔ70-98-cat</i> | |
| BG664 | Gifsy-1[-] <i>chiP::lacZ hfqΔ70-102-FLAG-cat</i> | |
| BG665 | Gifsy-1[-] <i>chiP::lacZ hfqΔ70-102-3xFLAG-cat</i> | |
| BG667 | Gifsy-1[-] <i>yifK87::MudK Δhfq::cat</i> | |
| BG672 | Gifsy-1[-] <i>yifK87::MudK hfqΔ70-102-cat</i> | |
| BG673 | Gifsy-1[-] <i>yifK87::MudK hfqΔ70-98-cat</i> | |
| BG674 | Gifsy-1[-] <i>yifK87::MudK hfqΔ70-102-FLAG-cat</i> | |
| BG675 | Gifsy-1[-] <i>yifK87::MudK hfqΔ70-102-3xFLAG-cat</i> | |

| | | |
|-------|---|--|
| BG677 | Gifsy-1[-] <i>sodB::lacZ ΔryhB2::spec Δfur::tetAR Δhfq::cat</i> | |
| BG682 | Gifsy-1[-] <i>sodB::lacZ ΔryhB2::spec Δfur::tetAR hfqΔ70-102-cat</i> | |
| BG683 | Gifsy-1[-] <i>sodB::lacZ ΔryhB2::spec Δfur::tetAR hfqΔ70-98-cat</i> | |
| BG684 | Gifsy-1[-] <i>sodB::lacZ ΔryhB2::spec Δfur::tetAR hfqΔ70-102-FLAG-cat</i> | |
| BG685 | Gifsy-1[-] <i>sodB::lacZ ΔryhB2::spec Δfur::tetAR hfqΔ70-102-3xFLAG-cat</i> | |
| YQ058 | Gifsy-1[-] <i>yifK::tetAR (G44-G45) yifK87::MudK 143</i> | |
| YQ352 | Gifsy-1[-] <i>gcvB::tetAR</i> | |
| YQ361 | Gifsy-1[-] <i>sodB::lacZ ChiXR</i> | |
| YQ362 | Gifsy-1[-] <i>sodB::lacZ gcvBB</i> | |

| La répression de l'opéron <i>dppABCDF</i> de <i>S. Typhimurium</i> par <i>GcvB</i> implique-t-elle un mécanisme de polarité Rho-dépendant ? | | |
|---|--|---------------------|
| Souche | Génotype | Source ou référence |
| MA3397 | <i>sbcE21 zfh-8157::Tn10dTc</i> | [480] |
| MA7455 | Gifsy-1[-] | [314] |
| MA9848 | Gifsy-1[-] <i>hisG9648::Tn5 rhIB^{WT}-Tpop rho-Y80C</i> | [306] |
| MA10241 | Gifsy-1[-] <i>ΔGcvB::cat</i> | [32] |
| MA11182 | Gifsy-1[-] <i>chiP::tDNA^{sa}-cat</i> | [306] |
| MA11251 | Gifsy-1[-] <i>dppAB::tDNA^{sa}-cat</i> | |
| MA11407 | Gifsy-1[-] <i>dppA::tetAR(L18-19) dppAB::tDNA^{sa}-cat / pKD46</i> | |
| MA11408 | Gifsy-1[-] <i>dppA::tetAR(L22-L23) dppAB::tDNA^{sa}-cat / pKD46</i> | |
| MA11411 | Gifsy-1[-] <i>dppA_{AGG} dppAB::tDNA^{sa}-cat</i> | |
| MA11412 | Gifsy-1[-] <i>dppAΔrut dppAB::tDNA^{sa}-cat</i> | |
| MA11481 | Gifsy-1[-] <i>dppAB::tDNA^{sa}-lacZ</i> | |
| MA11482 | Gifsy-1[-] <i>dppA_{AGG} dppAB::tDNA^{sa}-lacZ</i> | |
| MA11483 | Gifsy-1[-] <i>dppAΔrut dppAB::tDNA^{sa}-lacZ</i> | |
| MA11490 | Gifsy-1[-] <i>dppAB::tDNA^{sa}-lacZ rhIB^{WT}-Tpop rho-Y80C</i> | |
| MA11491 | Gifsy-1[-] <i>dppAB::tDNA^{sa}-lacZ rhIB^{WT}-Tpop rho^{WT}</i> | |
| MA11492 | Gifsy-1[-] <i>dppA_{AGG} dppAB::tDNA^{sa}-lacZ rhIB^{WT}-Tpop rho-Y80C</i> | |
| MA11493 | Gifsy-1[-] <i>dppA_{AGG} dppAB::tDNA^{sa}-lacZ rhIB^{WT}-Tpop rho^{WT}</i> | |
| MA11494 | Gifsy-1[-] <i>dppAΔrut dppAB::tDNA^{sa}-lacZ rhIB^{WT}-Tpop rho-Y80C</i> | |
| MA11495 | Gifsy-1[-] <i>dppAΔrut dppAB::tDNA^{sa}-lacZ rhIB^{WT}-Tpop rho^{WT}</i> | |

| | | |
|---------|---|--|
| MA11499 | Gifsy-1[-] <i>dppAB::tDNA^{sa}-lacZ rhIB^{WT}-Tpop rho^{-WT} ΔGcvB::cat</i> | |
| MA11503 | Gifsy-1[-] <i>dppAΔrut dppAB::tDNA^{sa}-lacZ rhIB^{WT}-Tpop rho^{WT} ΔGcvB::cat</i> | |

| Caractérisation de la terminaison Rho-dépendante | | |
|--|--|---------------------|
| Souche | Génotype | Source ou référence |
| MA3409 | Gifsy-1[-] | [480] |
| MA7455 | Gifsy-1[-] /pKD46 | [314] |
| MA9655 | Gifsy-1[-] <i>chiQ::lacZ</i> | [28] |
| MA9848 | Gifsy-1[-] <i>hisG9648::Tn5 rhIB^{WT}-Tpop Rho-Y80C</i> | [306] |
| MA9860 | Gifsy-1[-] <i>chiQ::lacZ rhIB^{WT}-Tpop Rho-G63D</i> | [306] |
| MA10580 | Gifsy-1[-] <i>DEL[chiP]29-30::Tn10dTc chiQ::lacZ</i> | |
| MA10608 | Gifsy-1[-] <i>chiP_{AGG} chiQ::lacZ</i> | [306] |
| MA10634 | Gifsy-1[-] <i>chiP_{AGG} chiQ::lacZ rhIB^{WT}-Tpop Rho-G63D</i> | [306] |
| MA10769 | Gifsy-1[-] <i>chiP_{AGG} chiQ::lacZ rhIB^{WT}-Tpop Rho-Y80C</i> | [306] |
| MA10937 | Gifsy-1[-] <i>chiP::tetAR chiQ::lacZ / pKD46</i> | [306] |
| MA11116 | Gifsy-1[-] <i>chiP_{AGG} chiQ::lacZ</i> | [306] |
| MA11126 | Gifsy-1[-] <i>chiP_{AGG} chiP::tetAR chiQ::lacZ / pKD46</i> | |
| MA11144 | Gifsy-1[-] <i>chiP_{AGG} chiPΔ1045 chiQ::lacZ</i> | |
| MA11158 | Gifsy-1[-] <i>chiP_{AGG} chiQ::lacZ NusG-174fs-cat</i> | [306] |
| MA11161 | Gifsy-1[-] <i>chiP_{AGG} chiQ::lacZ nusG6-cat</i> | [306] |
| MA11206 | Gifsy-1[-] <i>chiP_{AGG} tetAR I76-D18 chiQ::lacZ / pKD46</i> | |
| MA11224 | Gifsy-1[-] <i>chiP_{AGG} rutEc119 chiQ::lacZ</i> | |
| MA11262 | Gifsy-1[-] <i>chiP_{AGG}rutEc119 chiQ::lacZ rhIB^{WT}-Tpop Rho-Y80C</i> | |
| MA11264 | Gifsy-1[-] <i>chiP_{AGG}rutEc119 chiQ::lacZ IG[rhIB-trxA]::Tn5-Tpop Rho-G63D</i> | |
| MA11265 | Gifsy-1[-] <i>chiP_{AGG}rutEc119 chiQ::lacZ NusG-174fs -cat</i> | |
| MA11267 | Gifsy-1[-] <i>chiP_{AGG}rutEc119 chiQ::lacZ NusG-V162D -cat</i> | |
| MA11278 | Gifsy-1[-] <i>chiP_{AGG}rutEc119 chiQ::lacZ NusG^{-WT} -cat</i> | |
| MA11409 | Gifsy-1[-] <i>chiPΔ266 chiQ::lacZ / pKD46</i> | |
| MA11410 | Gifsy-1[-] <i>chiPΔ181 chiQ::lacZ / pKD46</i> | |
| MA11413 | Gifsy-1[-] <i>chiPΔ266 chiQ::lacZ rhIB^{WT}-Tpop Rho-Y80C</i> | |
| MA11414 | Gifsy-1[-] <i>chiPΔ266 chiQ::lacZ rhIB^{WT}-Tpop Rho^{-WT}</i> | |
| MA11415 | Gifsy-1[-] <i>chiPΔ266 chiQ::lacZ rhIB^{WT}-Tpop Rho-G63D</i> | |

| | | |
|---------|---|--|
| MA11416 | Gifsy-1[-] <i>chiP</i> Δ 266 <i>chiQ::lacZ NusG-174fs -cat</i> | |
| MA11417 | Gifsy-1[-] <i>chiP</i> Δ 266 <i>chiQ::lacZ NusG-V162D -cat</i> | |
| MA11418 | Gifsy-1[-] <i>chiP</i> Δ 266 <i>chiQ::lacZ NusG^{WT} -cat</i> | |
| MA11419 | Gifsy-1[-] <i>chiP</i> Δ 181 <i>chiQ::lacZ rhIB^{WT}-Tpop Rho-Y80C</i> | |
| MA11420 | Gifsy-1[-] <i>chiP</i> Δ 181 <i>chiQ::lacZ rhIB^{WT}-Tpop Rho-^{WT}</i> | |
| MA11421 | Gifsy-1[-] <i>chiP</i> Δ 181 <i>chiQ::lacZ rhIB^{WT}-Tpop Rho-G63D</i> | |
| MA11422 | Gifsy-1[-] <i>chiP</i> Δ 181 <i>chiQ::lacZ NusG-174fs -cat</i> | |
| MA11423 | Gifsy-1[-] <i>chiP</i> Δ 181 <i>chiQ::lacZ NusG-V162D -cat</i> | |
| MA11424 | Gifsy-1[-] <i>chiP</i> Δ 181 <i>chiQ::lacZ NusG^{WT} -cat</i> | |
| MA11429 | Gifsy-1[-] <i>chiP_{AGG} rutEC40 chiQ::lacZ</i> | |
| MA11430 | Gifsy-1[-] <i>chiP_{AGG} rutEC40 chiQ::lacZ rhIB^{WT}-Tpop Rho-Y80C</i> | |
| MA11431 | Gifsy-1[-] <i>chiP_{AGG} rutEC40 chiQ::lacZ rhIB^{WT}-Tpop Rho^{WT}</i> | |
| MA11432 | Gifsy-1[-] <i>chiP_{AGG} rutEC40 chiQ::lacZ rhIB^{WT}-Tpop Rho-G63D</i> | |
| MA11433 | Gifsy-1[-] <i>chiP_{AGG} rutEC40 chiQ::lacZ NusG-174fs -cat</i> | |
| MA11434 | Gifsy-1[-] <i>chiP_{AGG} rutEC40 chiQ::lacZ NusG-V162D -cat</i> | |
| MA11435 | Gifsy-1[-] <i>chiP_{AGG} rutEC40 chiQ::lacZ nusG^{WT} -cat</i> | |
| MA11442 | Gifsy-1[-] <i>chiP_{AGG} chiP::tetAR (176-77) chiQ::lacZ / pKD46</i> | |
| MA11552 | Gifsy-1[-] <i>chiP</i> Δ 282 <i>chiQ::lacZ</i> | |
| MA11553 | Gifsy-1[-] <i>chiP</i> Δ 290 <i>chiQ::lacZ</i> | |
| MA11574 | Gifsy-1[-] <i>chiP</i> Δ 282 <i>chiQ::lacZ rhIB^{WT}-Tpop Rho-^{WT}</i> | |
| MA11575 | Gifsy-1[-] <i>chiP</i> Δ 282 <i>chiQ::lacZ rhIB^{WT}-Tpop Rho-Y80C</i> | |
| MA11576 | Gifsy-1[-] <i>chiP</i> Δ 282 <i>chiQ::lacZ rhIB^{WT}-Tpop Rho-G63D</i> | |
| MA11577 | Gifsy-1[-] <i>chiP</i> Δ 282 <i>chiQ::lacZ NusG^{WT} -cat</i> | |
| MA11578 | Gifsy-1[-] <i>chiP</i> Δ 282 <i>chiQ::lacZ NusG-174fs -cat</i> | |
| MA11579 | Gifsy-1[-] <i>chiP</i> Δ 282 <i>chiQ::lacZ NusG-V162D -cat</i> | |
| MA11580 | Gifsy-1[-] <i>chiP</i> Δ 290 <i>chiQ::lacZ rhIB^{WT}-Tpop Rho-^{WT}</i> | |
| MA11581 | Gifsy-1[-] <i>chiP</i> Δ 290 <i>chiQ::lacZ rhIB^{WT}-Tpop Rho-Y80C</i> | |
| MA11582 | Gifsy-1[-] <i>chiP</i> Δ 290 <i>chiQ::lacZ rhIB^{WT}-Tpop Rho-G63D</i> | |
| MA11583 | Gifsy-1[-] <i>chiP</i> Δ 290 <i>chiQ::lacZ NusG^{WT} -cat</i> | |
| MA11584 | Gifsy-1[-] <i>chiP</i> Δ 290 <i>chiQ::lacZ NusG-174fs -cat</i> | |
| MA11585 | Gifsy-1[-] <i>chiP</i> Δ 290 <i>chiQ::lacZ NusG-V162D -cat</i> | |
| MA11710 | Gifsy-1[-] <i>chiP_{AGG} chiP</i> Δ 1045 <i>chiQ::lacZ / pKD46</i> | |
| MA11711 | Gifsy-1[-] <i>chiP_{AGG} rutEc119 chiQ::lacZ / pKD46</i> | |

| | | |
|---------|---|--|
| MA11712 | Gifsy-1[-] <i>chiP29-15::tetAR chiPΔ1045 chiQ::lacZ</i> / pKD46 | |
| MA11713 | Gifsy-1[-] <i>chiP_{AGG} chiP::tetAR(C29-I15) rutEc119 chiQ::lacZ</i> / pKD46 | |
| MA11718 | Gifsy-1[-] <i>chiPΔ282 chiPΔ1045 chiQ::lacZ</i> | |
| MA11718 | Gifsy-1[-] <i>chiPΔ266 chiPΔ1045 chiQ::lacZ</i> | |
| MA11719 | Gifsy-1[-] <i>chiPΔ290 chiPΔ1045 chiQ::lacZ</i> | |
| MA11720 | Gifsy-1[-] <i>chiPΔ282 rutEc119 chiQ::lacZ</i> | |
| MA11738 | Gifsy-1[-] <i>chiPΔ282 rutEc119 chiQ::lacZ</i> / pKD46 | |
| MA11767 | Gifsy-1[-] <i>chiP_{AGG} rutEc119 chiP::tetAR (J76-J78) chiQ::lacZ</i> / pKD46 | |
| MA11768 | Gifsy-1[-] <i>chiPΔ282 rutEc119 chiP::tetAR (J76-J78) chiQ::lacZ</i> / pKD46 | |
| MA11807 | Gifsy-1[-] <i>chiP_{AGG} rutEc119 chiPΔ1045 chiQ::lacZ</i> | |
| MA11808 | Gifsy-1[-] <i>chiPΔ282 rutEc119 chiPΔ1045 chiQ::lacZ</i> | |
| MA11828 | Gifsy-1[-] <i>chiPΔ266 chiPΔ1045 chiQ::lacZ</i> | |
| MA11829 | Gifsy-1[-] <i>chiPΔ181 chiPΔ1045 chiQ::lacZ</i> | |
| MA11830 | Gifsy-1[-] <i>chiP_{AGG} chiPΔ1045 chiQ::lacZ NusG-174fs-cat</i> | |
| MA11830 | Gifsy-1[-] <i>chiP_{AGG} chiPΔ1045 chiQ::lacZ NusG-174fs-cat</i> | |
| MA11831 | Gifsy-1[-] <i>chiPΔ282 chiPΔ1045 chiQ::lacZ NusG-174fs-cat</i> | |
| MA11831 | Gifsy-1[-] <i>chiPΔ282chiPΔ1045 chiQ::lacZ NusG-174fs-cat</i> | |
| MA11833 | Gifsy-1[-] <i>chiP_{AGG} rutEc119 chiPΔ1045 chiQ::lacZ NusG-174fs-cat</i> | |
| MA11834 | Gifsy-1[-] <i>chiPΔ282 rutEc119 chiPΔ1045 chiQ::lacZ NusG-174fs-cat</i> | |
| MA11835 | Gifsy-1[-] <i>chiPΔ266 chiPΔ1045 chiQ::lacZ NusG-174fs-cat</i> | |
| MA11836 | Gifsy-1[-] <i>chiPΔ181 chiPΔ1045 chiQ::lacZ NusG-174fs-cat</i> | |
| MA11837 | Gifsy-1[-] <i>chiP_{AGG} chiPΔ1045 chiQ::lacZ rhIB^{WT}-Tpop Rho-Y80C</i> | |
| MA11838 | Gifsy-1[-] <i>chiPΔ282chiPΔ1045 chiQ::lacZ rhIB^{WT}-Tpop Rho-Y80C</i> | |
| MA11842 | Gifsy-1[-] <i>chiPΔ266 chiPΔ1045 chiQ::lacZ rhIB^{WT}-Tpop Rho-Y80C</i> | |
| MA11843 | Gifsy-1[-] <i>chiPΔ181 chiPΔ1045 chiQ::lacZ rhIB^{WT}-Tpop Rho-Y80C</i> | |

4. Annexe 4 : Liste des oligonucléotides par thématique

| Etude de la régulation des ARNm par les petits ARN régulateurs : Rôle des sites de fixation d'Hfq sur les ARNs et du domaine C-terminal d'Hfq. | |
|--|--|
| pp841 | GACTTGCCCTCCATCCGTTG |
| pp934 | TTCCCAGTCACGACGTTGTA |
| pp965 | CTGCGGGTGTGCATAACGTTG |
| pp967 | CCCGGACTATGGCATTGATT |
| pp972 | CCCACCAGCAGTCGAATGTA |
| ppB10 | ACACTACCATCGGCGCTACG |
| ppC19 | ATGAAATTAATACGACTCACTATAGGATCCGAAGCGAAAGCGTCGGGATAAT |
| ppC20 | AAAAAATGGCCAATATCGCTATTGGCCCGTCAAAGAGGAATTTTC |
| ppE17 | TGCTTTCAGGTTCTCCGTAGGGGTTCCCTGAATGCAAGG |
| ppE97 | GCCTCGTCCTGCAGTTCATT |
| ppF19 | TGCTCGGTAAAGCTCAAAT |
| ppF20 | CGCAAACCTGGCTACGATGAA |
| ppF31 | CACGGGTCGGTAGTAGTCAA |
| ppF45 | CGTGGTGC GTTCAATACGTA |
| ppF62 | CGCCCATTTAGCGTACT |
| ppF79 | CGCCCGGTAGTGATCTTATT |
| ppF80 | CGGTTAGCGTGGCGTATCA |
| ppG44 | AATCGATGTACCCATAACAATAACCGGTACTACCGGAACCTTAAGACCCACTTTTACATT |
| ppG45 | ACGCTGTAGCTCCGGTTTTTCTCTGCCATAAATCCTCATCTAAGCACTTGTCTCCTG |
| ppH80 | ATTATCCGACGCCCCCGACATGGATAAACAGCGGTGAAGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTT |
| ppJ01 | GAAATTAATACGACTCACTATAGGACTTCTGAGCCGGAACG |
| ppJ03 | AGACAGGGTAAATGTACAGGAAGTG |
| ppK27 | TTCTACTGTTGTCCCGTCTCGCCCGGTTTCCCATCACAGCAGCGAAGAGACTGAATAAGTTCCCA |
| ppK28 | TTCTACTGTTGTCCCGTCTCGCCCGGTTTCCCATCACAGCTAAGTTCATGGTCCATATGAATATC |
| ppK90 | ATTCAGGGGAACCCCTACGGAGAACCTGAAAGCACGACATTAAGACCCACTTTTACATT |
| ppK91 | AAACCCAAAAAAGCCAGCAAAAGCTGGCCAAAATAATACTAAGCACTTGTCTCCTG |
| ppL01 | GATCCGAAGCGAAAGCGTCCGGATAATAATAACGATGAAATTGTGATGTTGTGTTGTTGTTGTTGC |
| ppL02 | AAATATTGAAATAAAAAAATGGCCAATATCGCTATTGGCCATTGCAAACACAACAACATCAC |
| ppL05 | GATCCGAAGCGAAAGCGTCCGGATAATAATAACGATGAAATGACATTGCTCACATTGCTTCCAGG |
| ppL06 | AAATATTGAAATAAAAAAATGGCCAATATCGCTATTGGCCCTGGAAGCAATGTGAGCAATG |
| ppL09 | TTTATCGGAATGCGTGTCTGATGGGCTTTTGGCTTACGGGACATTGCTCACATTGCTTCCAGTG |
| ppL10 | AAAAGGGTAGTCTCGCTACCGTGGTCTGAATCGCAGACCACTGGAAGCAATGTGAGCAATG |
| ppL11 | CATCGTTATTATTATCCCGACGCTTTCGCTTCGGATC |
| ppL13 | CCCATCAGAACACGCATTCCGATAAAACTTTTCGTTCCGGCTCA |
| ppL36 | TTATTTTTTCGCTGTTTCGCTTTTGTCCGACGCAATTTATACCGTTGCAAACACGACATGAGG |
| ppL37 | CAGGTCGACGGATCCTACGTTTGCCACTAAACGTACGCATAAATCCTCATGTGCTGTTTGAACGG |
| ppL38 | TTATTTTTTCGCTGTTTCGCTTTTGTCCGACGCAATTTATAACAACATACATCACAATTGGAGCAG |
| ppL39 | CAGGTCGACGGATCCTACGTTTGCCACTAAACGTACGCATTCTTCTGCTCCAATTGTGATGTATG |

| | |
|-------|---|
| ppL40 | TTTATTTTTTCGCTGTTTCGCTTTTGTCCGAGCAATTTATATAAGGAGAGAAGCAATGTCTAC |
| ppL41 | AACTGCAGGTCGACGGATCCTACGTTTGCCACTAAACGTAGACATTGCTTCTCTCC |
| ppL44 | TCGCTGTTTCGCTTTTGTCCGAGCAATTTATACGTCAAAGTTAAGACCCACTTTCACATT |
| ppL45 | ACGGATCCTACGTTTGCCACTAAACGTACGCATAAGTTAATCCTAAGCACTTGTCTCCTG |
| ppM31 | TTTATCGGAATGCGTGTCTGATGGGCTTTTGGCTTACGGTTGTGACCTCTTTGACGAATTGGTC |
| ppM32 | AAAAGGGTAGTCTCGCTACCGTGGTCTGAATCGCAGACCAATTCGTCAAAGAGGTCAC |
| ppN22 | CTTGCAATTCAGGGGAACCCCTACGGAGAACCTGAAAGCACTTGTGATGTTGTGTTGTTGTTG |
| ppN23 | AAACCCAAAAAAAAGCCAGCAAAAAGCTGGCCAAAATAATACCAATTGCAAACACAACAACATC |
| ppN24 | CTTGCAATTCAGGGGAACCCCTACGGAGAACCTGAAAGCACTCCTCTTTGACG |
| ppN25 | AAACCCAAAAAAAAGCCAGCAAAAAGCTGGCCAAAATAATCGTCAAAGAGGAGTGCTTTCAGG |
| ppN81 | CCCACCAGCAGTCGAATGTA |
| ppO66 | TTTAAGAAAATATTCGCAACAATCGATGTACCCTTTTTATTTTTTAAGACCCACTTTCACATT |
| ppO67 | ATCCTCTTTGACGTATAAATTGCTGCCGACAAAAGCGAACAGCGCTAAGCACTTGTCTCCTG |
| ppO69 | TTTAAGAAAATATTCGCAACAATCGATGTACCATAACAATAAGACCCACTTTCACATTTA |
| ppO71 | CATTTGCCATTTGTCCAAATTTAAGAAAATATTCGCAACAATCGATGTACCCT |
| ppO72 | TCTTTGACGTATAAATTGCTGCCGACAAAAGCGAACAGCGTTATTGTTATTAGGGTACATCGATTGTTGCG |
| ppO73 | GTCCAAATTTAAGAAAATATTCGCAACAATCGATGTACCCTTTTTATTTTTTCCGGTACTACCGGAACCC |
| ppO74 | AATCCTCTTTGACGTATAAATTGGGTTCCGGTAGTACCGG |
| ppO82 | TTAATCCTCTTTGACGTATAAATTGGGTTCCGGTAGTACCGGCTAAGCACTTGTCTCCTG |
| ppP45 | GGTAATACGACTCACTATAGGGAATCGATGTACCATAACAATAACCG |
| ppP48 | GGTAATACGACTCACTATAGGGAATCGATGTACCCTTTTTATTTTTTCG |
| ppP71 | CTCCGGTTTTTCTCTGCCAT |
| ppQ63 | GGTAATACGACTCACTATAGGGTAGTAAATGAGGTTTCTCAGCGCTAC |
| ppQ64 | CGCATAAGTTAATCCTCTTTGACGTAT |
| ppQ65 | CGCATAAATCCTCATGTCGTGTTTGCA |
| ppR32 | AACAATCGATGTACCATAACAATAACCGGTAACCTACCAGGAGAGAAGCAATGTCCGAG |
| ppR33 | TATGACGAGCTTCCAGCCCAGCTGTAGCTCCGGTTTTTCTCCGACATTGCTTCTCTCC |
| ppR35 | AATCGATGTACCATAACAATAACCGGTAACCTACCAGGAACTGGCAAGGATGTGAGCATGG |
| ppR36 | AGCTTCCAGCCCAGCTGTAGCTCCGGTTTTTCTCTGCCATGCTCACATCCTTGCCAGG |
| ppU01 | CGTCTGAGTCGCGGCTATATC |
| ppU80 | ATTTCTACTGTTGTCCCGTCTCGCCCGGTTTCCCATCACAGCGACTACAAAGATGACGACGAT |
| ppU81 | ATTTCTACTGTTGTCCCGTCTCGCCCGGTTTCCCATCACAGCGACTACAAAGACCATGACGG |
| ppU82 | ACCGGTAATCACCTGCATTG |

La régulation de l'opéron dppABCD de *S. Typhimurium* par GcvB est-elle due à un phénomène de polarité transcriptionnel Rho-dépendant ?

| | |
|-------|--|
| pp934 | TTCCCAGTCACGACGTTGTA |
| ppJ84 | AATACCTCGCTCACCCGCCATGATCATCACCGGATCGCCGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTT |
| ppK09 | CGGAATCCCCACCTCTCACT |
| ppK13 | GGCCAGGTTGTGATGCATG |
| ppK22 | AACATCACTTGGAAAACGTCTCTGTGAATAATTAAGAGTCTCCGGCACCATTTAGC |
| ppL18 | CAAAGGGCAAACAACATACATACAATTGGAGCAGAAGATTAAGACCCACTTTCACATT |
| ppL19 | TCAAACCAAGCTTCAGCATCCCTGACTTCTCAAGGAAATACTAAGCACTTGTCTCCTG |
| ppL20 | TTTGCAAAGGGCAAACAACATACATACAATTGGAGCAGAAGAAGGAGTATTTT |

| | |
|-------|--|
| ppL21 | AAACCAAGCTTCAGCATCCCTGACTTCTTCAAGGAAATACTCCTTCTTCTGCTCC |
| ppL22 | AAAACCCTGGTTTATTGTTTCAGAAGGCTCGCCGGAAGGCTTTAAGACCCACTTTACATT |
| ppL23 | TATCCCACTTCTCAGCAAGACCCGGGATCACTTCCGTGGTGCCTAAGCACTTGTCTCCTG |
| ppL24 | AAAACCCTGGTTTATTGTTTCAGAAGGCTCGCCGGAAGGCTTTGGCACCACGGAAG |
| ppL25 | ATATCCCACTTCTCAGCAAGACCCGGGATCACTTCCGTGGTGCCAAAGCCTTCC |
| ppL47 | CACCGTGTGATCGTCGACCT |
| ppO37 | TTTTTAAATTAATTGAATAACGGGAAGTAGCTCAGCTTCTTAAGACCCACTTTACATT |
| ppO38 | GACGTTGTAACGACGGCCAGTGAATCCGTAATCATGGTCATCTAAGCACTTGTCTCCTG |
| ppO75 | ATTAGGCAAACATCACTTCGAAAACGTCTCTGTGCAATAAGGATTAACCTATGACC |
| ppO76 | GTTGTAACGACGGCCAGTGAATCCGTAATCATGGTCATAAGTTAATCCTTATTCGACAG |

La régulation de l'opéron *chiPQ* par le petit ARN ChiX comme modèle pour la caractérisation de la terminaison Rho-dépendante NusG-dépendante.

| | |
|-------|---|
| pp934 | TTCCAGTCACGACGTTGTA |
| pp972 | CCCACCAGCAGTCGAATGTA |
| ppC29 | AAGAGGATTAACCTTATGCGTACGTTTAGTGCAAACGTAGTTAAGACCCACTTTACATT |
| ppD18 | GTTTGGATGACCGCTGTGCGCGTTTTCTGCCATTTCAATCCTAAGCACTTGTCTCCTG |
| ppD89 | GTCTGACCGGTAGGCTGAAT |
| ppI15 | CCACCCCGACATTGCTGTGATACCGGCGATAGCCAGAGCCAGCTAAGCACTTGTCTCCTG |
| ppI74 | CTCCGGCTTTTTCGACGACTCCACGTTAACGGGCGGCATCTTAAGACCCACTTTACATT |
| ppI75 | CGCCGTCGGTCACATCTTTGCGATCGCGTTCACGCTGCCACTAAGCACTTGTCTCCTG |
| ppI76 | GCGTGAACGCGATCGCAAAGATGTGACCGACGGCGACAAATTAAGACCCACTTTACATT |
| ppI77 | AAATCCAGGTTAGCGTTCAGGTCGCATGAGAAAGGTTAGTCTAAGCACTTGTCTCCTG |
| ppJ23 | TTTACCGGATTGAAATGGCAGAAAACGGCGACAGCGGTCATTAATAA |
| ppJ49 | TCAGAAAATAGTGAATGGCGCAATAACGATAAATTTACGTTATTAATGACCGCTGTGCGCCG |
| ppJ76 | TTTTATCAGGCGGATAAAAAACCAATGTGGATTATCTCCTTAAGACCCACTTTACATT |
| ppJ78 | CACCAGATCATTTTTGAAGTCGTACTTCGCGCCGATGGAGCTAAGCACTTGTCTCCTG |
| ppK18 | CGGCATCTATTATTGGCAGCGTGAACGCGATCGCAAAGATGTTACCGACGGCGACAAATA |
| ppK19 | GTTTGGATGACCGCTGTGCGCGTTTTCTGCCATTTCAATCGCCGTAACGCAGCAATATC |
| ppL28 | GTGAACGCGATCGCAAAGATGTGACCGACGGCGACAAATACAAAACCAACCTTTCTCACTCCACC |
| ppL29 | CCAGACCGAACATATCCGCAGCGTAACCAGACTGAAAATCGAGGTTGGCATTCCAGGTGGAGTGAGAA AGGTTGG |
| ppL30 | ATTGATAATTCGCATCGCGAAAAATAGTCTATTTAACGTAGACAAATATAAACTAACCTTTCTC |
| ppL31 | AAAATCCAGGTTAGCGTTCAGGTCGCATGAGAAAGGTTAGTTTTATATTTGTCTACG |
| ppL32 | TTTTGTGCGCAGCAATTTATACGTCAAAGAGGATTAACCTTACAAATATAAACTAACCTTTCTC |
| ppL33 | AAAATCCAGGTTAGCGTTCAGGTCGCATGAGAAAGGTTAGTTTTATATTTGTAAG |
| ppM52 | TTGATAATTCGCATCGCGAAAAATAGTCTATTTAACGTAGCCTTTCTCATGCGACCTGG |
| ppM53 | CTGAAAATCCAGGTTAGCGTTCAGGTCGCATGAGAAAGGCTACG |
| ppM54 | TTGATAATTCGCATCGCGAAAAATAGTCTATTTAACGTAGATGCGACCTGGAACGC |
| ppM55 | TAACCAGACTGAAAATCCAGGTTAGCGTTCAGGTCGCATCTACG |
| ppN47 | TTGATAATTCGCATCGCGAAAAATAGTCTATTTAACGTAGCCTTTCTCACTCCACCT |
| ppN48 | CTGAAAATCGAGGTTGGCATTCCAGGTGGAGTGAGAAAGGCTACG |

Liste des sondes utilisé lors des analyses par Northern Blot

| Nom | Séquence (5' → 3') | Cible |
|-------|--|--------------------|
| ppB10 | ACACTACCATCGGCGCTACG | ARNr 5S |
| ppB68 | TGCCAATAATAGATGCCGCCCGTTAACGTGGAGTCGTCGA | ARNm <i>ChiPQ</i> |
| ppE17 | TGCTTTCAGGTTCTCCGTAGGGGTTCCCCTGAATGCAAGG | Petit ARN RyhB |
| ppL11 | CATCGTTATTATTATCCCGACGCTTTCGCTTCGGATC | Petit ARN ChiX |
| ppL13 | CCCATCAGAACACGCATTCCGATAAACTTTTCGTTCCGGCTCA | Petit ARN GcvB |
| ppV54 | GGTTCGGTAGTACCGGTTATTGTTATGGGTACATCGATT | ARNm <i>yifKP2</i> |
| ppV55 | TTTGACGTATAAATTGCTGCCGACAAAAGCGAACAGCGAAAAAATAAAAA | ARNm <i>yifKP1</i> |

Titre : Rôle de la protéine chaperonne Hfq dans la réponse des ARN messagers à la régulation par les petits ARN.

Mots clés : *Salmonella*, Hfq, petit ARN, ARNm, Polarité Transcriptionnelle, Rho.

Résumé : Parmi les régulateurs nucléiques, les petits ARN régulateurs sont un moyen rapide d'adaptation. On les retrouve dans tous les domaines du vivant. Chez les bactéries, l'action d'un grand nombre d'entre eux dépend de la protéine chaperonne d'ARN Hfq. Leur mode d'action consiste à d'apparier directement à l'ARNm cible par complémentarité imparfaite de séquence. Il en résulte une régulation positive ou négative, de la traduction et/ou de la stabilité de l'ARNm cible.

Au cours de la première partie cette thèse, nous avons essayé de caractériser la régulation des ARNm par les petits ARN régulateurs. Pour ce faire, nous avons étudiés les différents composants de cette régulation et nous avons pu montrer que les ARN (message et régulateur) devaient se fixer aux surfaces opposées (proximale et distale) de la protéine Hfq afin

d'obtenir une régulation optimale des ARNm par les petits ARN régulateurs.

Lors de la seconde partie de la thèse, nous avons pu identifier un nouveau type de régulation des ARNm par les petits ARN régulateurs : la polarité transcriptionnelle. Nous avons pu montrer que la fixation du petit ARN ChiX sur la région 5'UTR de l'ARNm *chiPQ* entrainer l'inhibition de la traduction de *chiP* mais également une terminaison prématurée rho-dépendante de la transcription de l'ARNm.

Nous avons par la suite cherché à savoir si ce type de régulation pouvait se retrouver dans la régulation d'autre ARNm comme l'opéron *dppABCDF* et l'opéron *pgaABCD*. En parallèle de ces études, nous avons également essayé de caractérisé la terminaison Rho-dépendante entre *S. Typhimurium* et *E.coli* au sein de l'ARNm *chiPQ*.

Title : Anatomy of target mRNA recognition by small regulatory RNAs: the role of Hfq

Keywords : *Salmonella*, Hfq, small RNA, mRNA, Transcriptional polarity, Rho.

Abstract : Among the nucleic regulators, small regulatory RNAs are a quick way to adapt. They are found in all areas of life. In bacteria, the action of a large number of them depends on the chaperone protein of Hfq RNA. Their mode of action consists of matching directly to the target mRNA by imperfect complementary sequence. This results in a positive or negative control, translation and/or stability of the target mRNA.

During the first part of this thesis, we have tried to characterize the regulation of mRNA by small regulatory RNAs. To do this, we studied the different components of this regulation and we have shown that RNA (message and regulator) should attach to opposite surfaces (proximal and distal) of the Hfq protein to achieve optimal regulation of

mRNA by small regulatory RNAs.

In the second part of the thesis, we identified a new type of mRNA regulation by small RNA regulators: transcriptional polarity. We could show that the fixing of small RNA ChiX on the 5'UTR region of the mRNA *chiPQ* cause inhibition of translation of *chiP* but also a Rho-dependent premature termination of mRNA transcription.

We subsequently investigated whether this type of regulation could be in the control of other mRNAs as *dppABCDF*'s operon and *pgaABCD*'s operon. In parallel with these studies, we have also tried characterized Rho-dependent termination between *S. Typhimurium* and *E. coli* in mRNA *chiPQ*.

Titre : Rôle de la protéine chaperonne Hfq dans la réponse des ARN messagers à la régulation par les petits ARN.

Mots clés : *Salmonella*, Hfq, petit ARN, ARNm, Polarité Transcriptionnelle, Rho.

Résumé : Parmi les régulateurs nucléiques, les petits ARN régulateurs sont un moyen rapide d'adaptation. On les retrouve dans tous les domaines du vivant. Chez les bactéries, l'action d'un grand nombre d'entre eux dépend de la protéine chaperonne d'ARN Hfq. Leur mode d'action consiste à s'apparier directement à l'ARNm cible par complémentarité imparfaite de séquence. Il en résulte une régulation positive ou négative, de la traduction et/ou de la stabilité de l'ARNm cible.

Au cours de la première partie cette thèse, nous avons essayé de caractériser la régulation des ARNm par les petits ARN régulateurs. Pour ce faire, nous avons étudiés les différents composants de cette régulation et nous avons pu montrer que les ARN (message et régulateur) devaient se fixer aux surfaces opposées (proximale et distale) de la protéine Hfq afin

d'obtenir une régulation optimale des ARNm par les petits ARN régulateurs.

Lors de la seconde partie de la thèse, nous avons pu identifier un nouveau type de régulation des ARNm par les petits ARN régulateurs : la polarité transcriptionnelle. Nous avons pu montrer que la fixation du petit ARN ChiX sur la région 5'UTR de l'ARNm *chiPQ* entrainer l'inhibition de la traduction de *chiP* mais également une terminaison prématurée rho-dépendante de la transcription de l'ARNm.

Nous avons par la suite cherché à savoir si ce type de régulation pouvait se retrouver dans la régulation d'autre ARNm comme l'opéron *dppABCDF* et l'opéron *pgaABCD*. En parallèle de ces études, nous avons également essayé de caractérisé la terminaison Rho-dépendante entre *S. Typhimurium* et *E.coli* au sein de l'ARNm *chiPQ*.

Title : Anatomy of target mRNA recognition by small regulatory RNAs: the role of Hfq

Keywords : *Salmonella*, Hfq, small RNA, mRNA, Transcriptional polarity, Rho.

Abstract : Among the nucleic regulators, small regulatory RNAs are a quick way to adapt. They are found in all areas of life. In bacteria, the action of a large number of them depends on the chaperone protein of Hfq RNA. Their mode of action consists of matching directly to the target mRNA by imperfect complementary sequence. This results in a positive or negative control, translation and/or stability of the target mRNA.

During the first part of this thesis, we have tried to characterize the regulation of mRNA by small regulatory RNAs. To do this, we studied the different components of this regulation and we have shown that RNA (message and regulator) should attach to opposite surfaces (proximal and distal) of the Hfq protein to achieve optimal regulation of

mRNA by small regulatory RNAs.

In the second part of the thesis, we identified a new type of mRNA regulation by small RNA regulators: transcriptional polarity. We could show that the fixing of small RNA ChiX on the 5'UTR region of the mRNA *chiPQ* cause inhibition of translation of *chiP* but also a Rho-dependent premature termination of mRNA transcription.

We subsequently investigated whether this type of regulation could be in the control of other mRNAs as *dppABCDF*'s operon and *pgaABCD*'s operon. In parallel with these studies, we have also tried characterized Rho-dependent termination between *S. Typhimurium* and *E. coli* in mRNA *chiPQ*.