



THÈSE

en vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

délivré par

l'Université Toulouse III – Paul Sabatier

discipline MICROBIOLOGIE ET GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRES

présentée et soutenue par

Soraya AIT-BARA

Caractérisation de la RNase E et du dégradosome d'ARN de la bactérie marine adaptée au froid *Pseudoalteromonas haloplanktis*

soutenue le vendredi 19 novembre 2010 devant la commission d'examen :

JURY

Claude GUTIERREZ	Professeur, Université Toulouse III.	<i>président du jury</i>
Hilde DE REUSE	Chef de laboratoire, Institut Pasteur, Paris.	<i>rapporteur</i>
Ciarán CONDON	Directeur de recherche, CNRS, Paris.	<i>rapporteur</i>
Marc DREYFUS	Directeur de recherche, CNRS, Paris.	<i>examineur</i>
Ben LUISI	Professeur, Université de Cambridge, Angleterre.	<i>examineur</i>
Agamemnon CARPOUSIS	Directeur de recherche, CNRS, Toulouse.	<i>directeur de thèse</i>

École doctorale : Biologie-Santé-Biotechnologies de Toulouse.

Unité de recherche : Laboratoire de Microbiologie et de Génétique Moléculaires, UMR 5100 CNRS.

À mes parents

Remerciements

Tout d'abord, je remercie les membres du jury de l'intérêt porté à ma thèse : Hilde de Reuse et Ciarán Condon pour avoir accepté de rapporter ma thèse, Ben Luisi et Marc Dreyfus pour en avoir été les examinateurs. Je remercie également Claude Gutierrez pour avoir présidé ce jury mais aussi pour m'avoir encouragé, depuis le M1, à continuer dans cette voie de recherche. Merci à tous ces membres pour leur présence et leurs encouragements.

Je remercie ensuite mon directeur de thèse Agamemnon J Carpousis. Merci AJ de m'avoir accueilli dans ton équipe. Merci pour la confiance que tu m'as témoignée ces années et pour m'avoir permis de travailler dans un cadre scientifique très enrichissant avec beaucoup de liberté. Merci pour ta rigueur, ton savoir scientifique, ton écoute et ta droiture. Merci aussi pour toutes nos discussions sur notre très chère RNase E que ce soit celle d'*E.coli* ou celle de *P.haloplanktis*.

Je remercie également les membres de l'équipe Carpousis, à commencer par Leonora Poljak avec qui j'ai agréablement partagé le bureau pendant ma thèse. Merci Léo pour ta grande gentillesse et ta disponibilité. Merci de m'avoir appris en M2R les différentes techniques de biologie moléculaire utilisées par l'équipe pour travailler sur la RNase E et pour les discussions en thèse sur mes travaux. Je remercie également Béatrice Clouet d'Orval, pour ces années de conseils, de soutien et de discussions. Je remercie aussi Catherine Turlan, pour les discussions nombreuses et les questions pertinentes autour de la RNase E depuis son arrivée dans l'équipe. Merci aux « carpousettes » de l'équipe pour tous les moments de rigolade que l'on a eu ! Merci à Kounthéa Phok et Dana Rinaldi et dernièrement arrivée Marie Bouvier. Kounthéa, merci pour les matches de rugby que j'ai appréciés même étant supportrice de l'OM ! Je te dis bonne chance pour ta thèse et accroche toi, c'est bientôt la fin ! Dana, merci pour ta grande gentillesse et ton soutien. Merci à toutes les deux pour votre amitié, votre gaieté et votre bonne humeur ainsi que pour les moments que l'on a partagé et que l'on partagera encore dans le futur. Marie, merci pour tes encouragements. Encore merci à toute l'équipe pour ces années de soutien et d'encouragement, vous allez tous énormément me manquer !

Merci à Vanessa Khemici pour toutes nos discussions sur les protéines du dégradosome d'ARN que l'on aime tant ! Ton retour en post-doctorat dans l'équipe a été pour moi très bénéfique et très enrichissant. Merci pour tes précieux conseils, ton soutien et ta gentillesse.

Je remercie Yves Quentin pour notre collaboration sur l'analyse bio-informatique de RhlB et les arbres phylogénétiques. J'ai beaucoup appris de ce domaine d'expertise que je ne connaissais pas. Ensuite, je remercie mon premier encadrant de stage de M1 Jean-Yves Bouet avec qui j'ai énormément appris et Dave Lane de m'avoir accueilli dans l'équipe. Je remercie également les enseignants des équipes pédagogiques de Microbiologie et de Génétique avec qui j'ai travaillé pendant mon Monitorat et pendant mon poste d'ATER. Entre autres Marie-Pierre Castanié pour mes débuts en Monitorat, Franck Pasta et Bernard Martin pour m'avoir facilité les horaires des TP. Je tiens à remercier ensuite les membres des autres équipes avec qui j'ai particulièrement apprécié discuter : Pierre Genevaux, Anne Sarcos, Paticia Bordes ; mes camarades déjà Docteurs où ceux qui le seront bientôt, Sabrina, Elsa et Cécile. Bonne chance à toutes les trois.

Un énorme merci à Danka, Luu, Trang, Laurence et Thuy, pour tous les milieux commandés et la vaisselle nettoyée, pour les rires et leur extrême gentillesse et serviabilité. Je tiens à remercier également tous les services de l'IBCG : merci à Lilia, Michèle, Jocelyne du service informatique, David de la reprographie pour les posters, Vincent, Gérard et François du technik.

Je remercie ensuite tous les membres du LMGM et du LBME avec qui j'ai échangé des phrases et des sourires que ce soit dans les couloirs, les escaliers ou à la cafétéria du rez-de-chaussée.

Viennent ensuite les amis, qui m'ont eux aussi encouragée tout au long de cette thèse. A commencer par Sylvain Faucoulanche qui a fait le déplacement de Paris pour ma soutenance ! Merci Sylvain pour ton amitié, pour nos discussions et pour toutes nos sorties avant ton départ

pour Paris ainsi qu'après pour notre visite du Mont St-Michel ! Une grande pensée à Olivier Baron qui nous a quittés brutalement et qui nous manque terriblement. Merci Olivier pour tes conseils que ce soit pour la thèse où autres, comme lors de ce fameux jeudi 24 avril ! Merci aussi à Samer Sakr pour ses encouragements et surtout pour son amitié. Je remercie aussi Camille Baron pour toutes les soirées couture et cuisine qui m'ont permis de bien me détendre et de m'amuser. Merci à Lionel Rechinat pour son amitié mais aussi pour les dessins réalisés sur Cédric et moi. Je remercie toutes les personnes que j'ai rencontrées par le biais de l'AMESAT, association qui regroupe des doctorants de différents horizons : Annique Smeding et Jean-Charles Quinton, Elodie Urlacher et Stéphanie Netto. Merci à tous pour toutes ces randonnées dans les Pyrénées (choisies par Michel Garcia que je remercie aussi) qui vont me manquer et pour toutes les autres activités de détente. Merci pour toutes les soirées jeux et les repas que l'on a partagés. Ce fut de bons moments mémorables ! Je remercie aussi Danka et Serge Pauly pour leur soutien et leur amitié. Danka, ton cassoulet va me manquer !

Je remercie maintenant ma famille. Merci à Micheline, Nancy et Stéphane d'avoir été là pour m'encourager. Ensuite, je ne trouverai jamais les mots pour remercier mes parents, mon grand frère et ma petite sœur. Merci infiniment pour toutes ces années d'encouragements et de soutien à tous les niveaux ! Ce que je suis aujourd'hui, c'est à vous que je le dois.

Enfin, je termine ces remerciements par Cédric Bouhours. Merci pour la thèse, pour le logiciel de recherche de motifs répétés et pour ta présence, ta patience et ton soutien. Un grand merci Cédric pour TOUT !

Nothing in biology makes sense except in the light of evolution
(Theodosius Dobzhansky, 1973)

Résumé

La dégradation des ARNm est l'un des processus biologiques essentiels qui implique chez les bactéries, l'intervention d'un complexe multiprotéique appelé « dégradosome d'ARN ». Chez *E.coli*, la formation de ce complexe nécessite l'endoribonucléase essentielle « RNase E », qui porte dans sa région non conservée, des îlots de 15 à 40 acides aminés appelés « microdomaines ». Ces microdomaines sont responsables des interactions entre la RNase E et trois protéines : l'hélicase à ARN RhlB, l'enzyme de la glycolyse émolase et l'exoribonucléase PNPase. Chez d'autres bactéries, plusieurs dégradosomes d'ARN assemblés sur la RNase E ont été identifiés et ils présentent une composition protéique différente du dégradosome d'*E.coli*. Il y a ainsi une plasticité des interactions RNase E-protéines qui serait due à la divergence de la séquence des microdomaines et leur évolution. Cependant, au début de ce travail de thèse, seuls les microdomaines de la RNase E d'*E.coli* ont été caractérisés.

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit se sont focalisés sur la bactérie marine adaptée au froid et relativement distante d'*E.coli*, *Pseudoalteromonas haloplanktis*, pour caractériser le dégradosome d'ARN et les microdomaines responsables des interactions RNase E-protéines. Le dégradosome d'ARN adapté au froid de *P.haloplanktis* est composé de la RNase E, de l'exoribonucléase PNPase et de l'hélicase à ARN RhlB. Chez *E.coli*, la RNase E de *P.haloplanktis* est capable de restaurer la viabilité d'*E.coli* dépourvue de RNase E sans conférer un avantage de croissance à *E.coli* à basse température. De plus, la RNase E de *P.haloplanktis* est capable d'interagir avec la protéine RhlB d'*E.coli*. Les microdomaines d'interaction entre la RNase E et les protéines RhlB et PNPase ont été caractérisés ce qui a permis de mieux comprendre la conservation de ces deux types d'interaction retrouvés au sein du dégradosome d'ARN d'*E.coli*, malgré la distance évolutive séparant *P.haloplanktis* et *E.coli*. L'interaction RNase E-PNPase de *P.haloplanktis* implique un microdomaine de séquence non conservée en comparaison avec celui de l'interaction RNase E-PNPase d'*E.coli*. Ceci suggère une conservation structurale de l'interaction RNase E-PNPase. Quant à l'interaction RNase E-RhlB, le microdomaine d'interaction présente des acides aminés conservés et similaires au microdomaine d'interaction RNase E-RhlB d'*E.coli*. L'analyse de ces microdomaines est élargie de manière *in silico* à d'autres RNase E des γ -protéobactéries pour avoir une vue d'ensemble de leur distribution. Enfin, une étude phylogénétique de la protéine RhlB a été initiée dans le but de voir une corrélation potentielle entre la présence du microdomaine de fixation de RhlB et la présence de RhlB chez les γ -protéobactéries.

Abstract

RNA degradation is an essential biological process which implies in bacteria a multienzyme complex called RNA « degradosome ». In *E. coli*, this complex contains the RNase E, the DEAD-box RNA helicase RhlB, the glycolytic enzyme enolase and the exoribonuclease PNPase. The C-terminal natively unstructured region of the RNase E serves as the scaffold for binding other components of the RNA degradosome. In this region, microdomains from 15 to 40 amino acids are necessary for protein-protein interactions with other components of the RNA degradosome. In other bacteria, several RNase E-based complexes have been identified but the composition of the associated proteins is variable. Thus, there is a plasticity of the RNase E-protein interactions that would be due to the sequence divergence of the microdomains and their evolution. However, at the beginning of this work, only the microdomains of the RNase E of *E. coli* have been characterized.

In this work, the RNA degradosome of the marine bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* distantly related to *E. coli*, has been characterized. The RNase E of *P. haloplanktis* associates with RhlB and PNPase but not enolase. In *E. coli*, the RNase E of *P. haloplanktis* can restore the viability of *E. coli* lacking RNase E without conferring a growth advantage to *E. coli* at low temperature. In addition, the RNase E of *P. haloplanktis* can make a heterologous interaction only with RhlB of *E. coli*. Microdomains corresponding to the RNase E binding sites for RhlB and PNPase were mapped. The sequence of the RhlB binding site of the RNase E of *P. haloplanktis* is related to the sequence of the RhlB binding site of the RNase E of *E. coli*. For the PNPase binding site of the RNase E of *P. haloplanktis*, the sequence is not conserved compared to the PNPase binding site of the RNase E of *E. coli*. The characterization of these two microdomains in the RNase E of *P. haloplanktis* shows the conservation of these interactions found in the RNA degradosome of *E. coli* over a large evolutionary distance separating *P. haloplanktis* and *E. coli*. This suggests that the structural motif of these interactions is conserved. The analysis of these microdomains is expanded *in silico* to others RNase E of the γ -proteobacteria, to have an overview of their distribution. A phylogenetic study of the protein RhlB was initiated to see a potential correlation between the presence of microdomain binding site of RhlB and the presence of RhlB in γ -proteobacteria.

Table des matières

PARTIE 1 : INTRODUCTION	1
I. Le dégradosome d'ARN d'<i>E.coli</i>	7
I.1. Présentation.....	7
I.1.1. Découverte du dégradosome d'ARN	7
I.1.2. Organisation du dégradosome d'ARN	8
I.1.3. Composants mineurs du dégradosome d'ARN	8
I.2. Composants majeurs du dégradosome d'ARN	9
I.2.1. La RNase E	9
I.2.1.1. <i>Structure primaire</i>	9
I.2.1.2. <i>Structure de la RNase E</i>	10
I.2.1.3. <i>Fonction de la RNase E</i>	12
I.2.1.4. <i>La famille des RNase E/G</i>	18
I.2.2. La PNPase	22
I.2.2.1. <i>La famille des RNase PH</i>	22
I.2.2.2. <i>La PNPase : conservation, séquence et structure</i>	22
I.2.2.3. <i>Fonction de la PNPase</i>	25
I.2.3. L'hélicase RhlB	26
I.2.3.1. <i>La famille des hélicases à boîte DEAD</i>	26
I.2.3.2. <i>Les cinq hélicases à boîte DEAD d'<i>E.coli</i></i>	26
I.2.3.3. <i>Les hélicases à boîte DEAD chez d'autres bactéries</i>	27
I.2.3.4. <i>La protéine RhlB</i>	29
I.2.4. L'énolase.....	33
I.2.4.1. <i>Famille et structure</i>	33
I.2.4.2. <i>Fonction de l'énolase au sein du dégradosome d'ARN</i>	34
I.3. Fonction du dégradosome d'ARN	34
I.3.1. Dégradation des ARNm	34
I.3.1.1. <i>Dégradation globale des ARNm d'<i>E.coli</i></i>	34
I.3.1.2. <i>Dégradation des ARNm dépourvus de ribosomes</i>	35
I.3.1.3. <i>Dégradation de substrats « difficiles »</i>	35
I.3.2. Dégradation des ARN stables	36
II. Interactions médiées par la RNase E au sein du dégradosome d'ARN.....	37
II.1. La région C-terminale de la RNase E	37
II.2. Interactions médiées par les microdomaines	40
II.2.1. Interaction RNase E-membrane.....	40
II.2.2. Interaction RNase E-ARN	43
II.2.3. Interaction RNase E-RhlB	45
II.2.4. Interaction RNase E-énolase.....	46

II.2.5. Interaction RNase E-PNPase	47
II.3. Autres interactions RNase E-protéines.....	50
II.3.1. Formes alternatives du dégradosome d'ARN.....	50
II.3.1.1. Un dégradosome d'ARN « du froid ».....	50
II.3.1.2. Un dégradosome d'ARN « du stress »	51
II.3.1.3. Un dégradosome d'ARN « régulé » pour « réguler »	51
II.3.2. Autres interactions : RNase E-protéines	52
II.4. La RNase E est une « Hub protein »	53
II.5. Synopsis.....	55
III. Dégradosomes d'ARN identifiés chez d'autres bactéries.....	57
III.1. Les dégradosomes identifiés	57
III.1.1. Chez les γ -protéobactéries	57
III.1.2. Chez les α -protéobactéries	59
III.1.3. Chez les bactéries à Gram positif	60
III.2. Plasticité des interactions RNase E-protéines	61
III.3. Objectifs de thèse	62
PARTIE 2 : RESULTATS.....	65
I. Identification du dégradosome d'ARN de <i>P.haloplanktis</i>	67
I.1. La bactérie <i>P.haloplanktis</i>	67
I.1.1. Caractéristiques.....	67
I.1.2. Acteurs de la dégradation chez <i>P.haloplanktis</i>	68
I.2. La RNase E de <i>P.haloplanktis</i>	69
I.2.1. Analyse de la structure primaire	69
I.2.2. Production d'anticorps anti-RNase E de <i>P.haloplanktis</i>	72
I.2.3. Sensibilité de la RNase E de <i>P.haloplanktis</i> à la protéolyse.....	73
I.3. Identification du dégradosome d'ARN.....	76
I.3.1. Clonage et immunopurification de la RNase E de <i>P.haloplanktis</i>	76
I.3.2. Immunopurification et spectroscopie de masse	77
I.3.3. Construction de variants de la RNase E de <i>P.haloplanktis</i>	78
I.4. Tests de complémentation chez <i>E.coli</i>	80
I.4.1. Expression de la RNase E sous ses propres signaux d'expression	80
I.4.2. Expression de la RNase E de <i>P.haloplanktis</i> sous les signaux d'expression de la RNase E d' <i>E.coli</i>	82
I.4.3. Croissance d' <i>E.coli</i> à basse température	83
I.5. Caractérisation des interactions RNase E-protéines	86
I.5.1. Immunopurifications chez <i>E.coli</i>	86
I.5.2. Caractérisation de l'interaction RNase E-RhlB	88
I.5.3. Interaction RNase E-PNPase de <i>P.haloplanktis</i>	90
I.6. Discussion.....	97

II. Distribution des microdomaines chez les γ-protéobactéries.....	101
II.1. Objectifs et méthodologie.....	101
II.2. Recherche des microdomaines par MEME.....	104
II.2.1. Cas du motif A.....	104
II.2.2. Cas de l'AR2.....	106
II.2.3. Cas du site de fixation de l'énolase et la PNPase.....	107
II.2.4. Cas du site de fixation de RhlB.....	109
II.2.5. Résumé de l'analyse MEME.....	112
II.3. Au-delà des γ -protéobactéries.....	112
II.4. Discussion.....	114
III. Distribution & phylogénie de la protéine RhlB.....	115
III.1. Objectifs.....	115
III.2. Les orthologues de RhlB chez les γ -protéobactéries.....	116
III.3. Phylogénie de RhlB chez les γ -protéobactéries.....	118
III.3.1. Une histidine, critère d'identification de RhlB ?.....	118
III.3.2. RhlB forme un groupe distinct.....	118
III.4. Discussion.....	122
 PARTIE 3 : CONCLUSION & PERSPECTIVES.....	 125
 PARTIE 4 : MATÉRIELS & MÉTHODES.....	 133

Table des légendes

Figure 1 : Schéma simplifié de la dégradation des ARNm chez les trois royaumes de la vie.....	4
Figure 2 : Structure primaire de la RNase E d' <i>E.coli</i>	10
Figure 3 : Structure résolue de la région N-terminale de la RNase E.	11
Figure 4 : La RNase E au centre du métabolisme de l'ARN d' <i>E.coli</i>	13
Figure 5 : Principale voie de dégradation des ARNm chez <i>E.coli</i>	14
Figure 6 : Structure cristallisée d'interaction RNase E/ARN et modèle d'action de la RNase E.....	16
Figure 7 : Structures secondaires présentes dans la région 5'UTR du messenger <i>rne</i> codant pour la RNase E.	17
Figure 8 : Distribution des RNase E/G, RNase J et RNase Y chez les bactéries et les archées.	19
Figure 9 : Classification des protéines de la famille des RNase E/G.	20
Figure 10 : Structure et organisation de la PNPase, RNase PH et exosomes d'archées et d'eucaryotes.....	24
Figure 11 : Les cinq hélicases à boîte DEAD d' <i>E.coli</i> et leurs fonctions.	27
Figure 12 : Répartition des orthologues des hélicases à boîtes DEAD d' <i>E.coli</i> chez les bactéries.....	28
Figure 13 : Modèle de coopération entre RhlB, la RNase E et la PNPase.	30
Figure 14 : Modèle de la structure de RhlB d' <i>E.coli</i> en présence d'ARN et d'ATP.....	31
Figure 15 : Rôle et structure résolue de l'énolase d' <i>E.coli</i>	33
Figure 16 : Analyse de la région C-terminale de la RNase E d' <i>E.coli</i>	39
Figure 17 : Séquence, structure et conservation du motif A responsable de l'interaction RNase E-membrane. ...	41
Figure 18 : Organisation de la RNase E et du dégradosome d'ARN en filaments d'hélices.	43
Figure 19 : Morceau d'alignement de séquence des RNase E des bactéries proches d' <i>E.coli</i>	46
Figure 20 : Structure de l'interaction RNase E-énolase et conservation du microdomaine chez la RNase E.	47
Figure 21 : Structure d'interaction RNase E-PNPase.....	49
Figure 22 : Ensemble des interactions RNase E-protéines reportées.	54
Figure 23 : Dégradosome d'ARN canonique et alternatifs d' <i>E.coli</i>	56
Figure 24 : Arbre phylogénétique basé sur les similarités de séquence de la RNase E.....	63
Figure 25 : La bactérie <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> TAC125.	67
Figure 26 : Structures primaires et analyses PONDR® des RNase E de <i>P.haloplanktis</i> (A) et d' <i>E.coli</i> (B).....	70
Figure 27 : Analyse des deux sites de fixation de l'ARN chez la RNase E de <i>P.haloplanktis</i>	71
Figure 28 : Surexpression, purification et immunodétection de la RNase E de <i>P.haloplanktis</i>	73
Figure 29 : Sensibilité de la RNase E de <i>P.haloplanktis</i> à la protéolyse.....	74
Figure 30 : Spécificité des protéases de <i>P.haloplanktis</i>	75
Figure 31 : Stabilité de la RNase E-FLAG chez <i>P.haloplanktis</i> dans les extraits préparés.	76
Figure 32 : Identification du dégradosome d'ARN de <i>P.haloplanktis</i>	77
Figure 33 : Immunopurifications des variants de la RNase E de <i>P.haloplanktis</i>	79
Figure 34 : Procédure de remplacement de plasmide et tests de complémentation.	81
Figure 35 : Expression de la RNase E de <i>P.haloplanktis</i> chez <i>E.coli</i>	82
Figure 36 : Expression de la RNase E de <i>P.haloplanktis</i> chez <i>E.coli</i> et tests de complémentation.	84
Figure 37 : Défaut de croissance de certaines souches AC à basse température.....	85
Figure 38 : Défaut de croissance à 15 °C de la souche SVK409.....	86
Figure 39 : La RNase E de <i>P.haloplanktis</i> exprimée chez <i>E.coli</i> interagit avec RhlB d' <i>E.coli</i>	88
Figure 40 : Identification du site de fixation de RhlB chez la RNase E de <i>P.haloplanktis</i>	89
Figure 41 : Interaction RNase E/PNPase de <i>P.haloplanktis</i>	91
Figure 42 : Immunopurification du variant RNase EΔ76 FLAG chez <i>E.coli</i>	92
Figure 43 : Motifs répétés présents à l'extrémité de la région C-terminale de la RNase E de <i>P.haloplanktis</i>	93
Figure 44 : Interaction entre le CTH de la RNase E de <i>P.haloplanktis</i> et la PNPase de <i>P.haloplanktis</i>	95
Figure 45 : Surexpression et purification de la PNPase de <i>P.haloplanktis</i> exprimée chez <i>E.coli</i>	96
Figure 46 : Co-purification des peptides CTH.	96
Figure 47 : Conservation des microdomaines chez les homologues de la RNase E.	100
Figure 48 : Arbre phylogénétique des γ -protéobactéries.....	103
Figure 49 : Principe du programme MEME (Multiple Em for Motif Elicitation).....	104
Figure 50 : Alignement du motif A obtenu par le programme MEME.	105
Figure 51 : Alignement de motifs AR2 et riches en arginines détectés par MEME.....	107
Figure 52 : Résultats MEME pour les microdomaines de fixation de l'énolase et de la PNPase.	108
Figure 53 : Analyse MEME et prédiction de structure pour le site d'interaction de RhlB.....	110
Figure 54 : Vue d'ensemble de la répartition des microdomaines chez les γ -protéobactéries.	111
Figure 55 : Exemple de microdomaines trouvés par MEME chez les α -protéobactéries.	113
Figure 56 : Présence d'orthologues putatifs de RhlB et de l'histidine chez les γ -protéobactéries.	117
Figure 57 : Arbre phylogénétique des orthologues des hélicases à boîte DEAD d' <i>E.coli</i>	120

Figure 58 : Répartition des orthologues de RhlB chez les γ -protéobactéries. En page suivante.	120
Figure 59 : Arbre phylogénétique de la protéine RhlB.	122
Figure 60 : Répartition des orthologues de RhlB chez les bactéries et les archées.	147
Tableau 1 : Les RNase E/G caractérisées.....	21
Tableau 2 : Les orthologues des composants du dégradosome d'ARN d' <i>E.coli</i> chez <i>P.haloplanktis</i>	69
Tableau 3 : Les orthologues des hélicases à boîte DEAD d' <i>E.coli</i>	118
Tableau 4 : Plasmides & souches utilisés.....	136

Abréviations

5' OH	Extrémité 3' hydroxyle
5' P	Extrémité 5' monophosphate
5'UTR	Région 5' non traduite (5' UnTranslated Region)
α-MG	α -méthylglucoside 6-phosphate
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ARNnc	Acide Ribonucléique non codant
ARNr	Acide Ribonucléique ribosomal
ARNt	Acide Ribonucléique de transfert
AR2	Arginine Rich 2
AR-RBD	Arginine Rich-RNA Binding Domain
ATP	Adénosine triphosphate
EDTA	Éthylènediamine tétra-acétique
cAMP-CAP	cyclic Adenosine monophosphate-Catabolic Activator Protein
G6P	Glucose 6 phosphate
GFP	Green fluorescent protein
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
kDa	Kilo Dalton
MEME	Multiple Em for Motif Elicitation
MTS	Membrane Targeting Sequence
Nt	Nucléotide
NTP	Nucléotide triphosphate
PAP I	Poly (A) polymérase I
Pb	Paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PPK	Polyphosphate kinase
PONDR®	Predictors of Natural Disordered Regions
PTS	Phosphotransferase system
RISP	Regions of Increased Structural Propensity
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis

1

INTRODUCTION

Préambule

La dégradation des ARNm est l'un des processus biologiques essentiels à la cellule. Elle est cruciale pour la régulation de l'expression des gènes, mais aussi, pour le remodelage efficace du set de gènes à exprimer afin de s'adapter rapidement aux variations des conditions environnementales. La dégradation des ARNm implique l'intervention de remarquables protéines comme en témoigne l'étymologie de leur nom qui proviendrait du grec ancien *prôtos* signifiant *premier, essentiel*. La seconde théorie où le mot protéine ferait référence au dieu grec Protée changeant de forme à volonté, reflète l'importance « divine » de ces protéines pour la cellule. Dans la dégradation des ARNm, ces protéines « acteurs de la dégradation », sont des ribonucléases (RNases) qui clivent l'ARN en interne (endoribonucléases), ou le « grignotent » soit de l'extrémité 3' vers l'extrémité 5' (exoribonucléases 3'), soit de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' (exoribonucléases 5'). Les acteurs de la dégradation sont également des « hélicases à ARN » capables de dérouler des structures secondaires d'ARN, afin de faciliter leur dégradation. À ces RNases et hélicases, viennent se rajouter d'autres protéines qui ont également un rôle important dans la dégradation des ARN.

L'une des découvertes majeures en biologie de la cellule, est que la plupart des processus essentiels comme la réplication de l'ADN, la synthèse protéique et la division cellulaire, nécessite l'association réversible de protéines en complexe (en présence ou en absence d'acides nucléiques) pour former des machineries enzymatiques hautement performantes. À titre d'exemple, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, pas moins de 800 complexes protéiques différents sont présents dans la cellule (Gavin *et al.*, 2006). Ces complexes vont de 2 à 25 protéines et leur association peut être transitoire. L'association des protéines en complexe permet de faciliter la coopération et la coordination des activités individuelles de chaque protéine, pour avoir une activité efficace du complexe (l'union fait la force !). Dans le cas de la dégradation des ARNm, les protéines acteurs de la dégradation, s'associent aussi en complexe et forment une machinerie enzymatique efficace et élaborée. Ceci doit conférer un avantage efficace et important pour la cellule puisque ces complexes de dégradation sont présents chez les trois royaumes de la vie.

Chez les eucaryotes, les chloroplastes et les mitochondries, la machinerie de dégradation des ARN est appelée exosome (Mitchell *et al.*, 1997, Baginsky & Grussem, 2001, Dziembowski *et al.*, 2003, Lykke-Andersen *et al.*, 2009, Schmid & Jensen, 2008). Elle est conservée, hautement organisée et intervient également dans d'autres processus du métabolisme de l'ARN comme la maturation des ribosomes ou le contrôle qualité des ARN (Gavin *et al.*, 2006, Mitchell *et al.*, 1997, Schmid & Jensen, 2008). La dégradation des ARNm peut se faire dans le sens 3' vers 5' dans le noyau et le cytoplasme par l'action de l'exosome ou de 5' vers 3' par intervention de l'exoribonucléase XrnI (**figure 1A**).

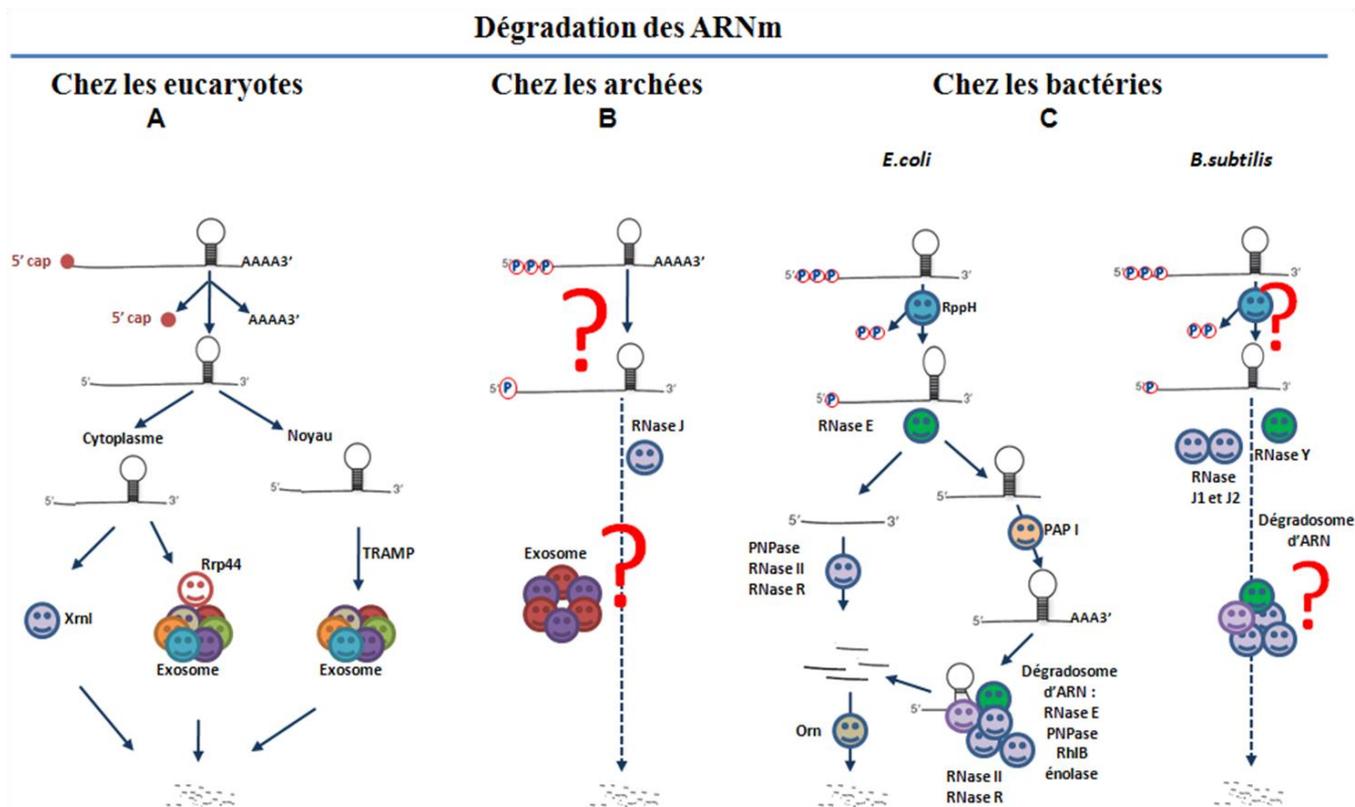


Figure 1 : Schéma simplifié de la dégradation des ARNm chez les trois royaumes de la vie.

(A) Chez les eucaryotes, les ARNm dépossédés de leur coiffe ou de leur queue poly(A) en 5' ou 3' respectivement, sont dégradés dans le cytoplasme dans le sens 5' vers 3' par l'exoribonucléase XrnI. Ils peuvent être aussi dégradés par l'exosome dans le sens 3' vers 5'. Dans le noyau, la dégradation des ARNm est rare et concerne les ARNm aberrants, dégradés par l'exosome après adénylation par le complexe TRAMP (Lykke-Andersen *et al.*, 2009, Schmid & Jensen, 2008). **(B)** Chez les archées, l'exoribonucléase 5' RNase J et un exosome-like ont été caractérisés (Clouet-d'Orval *et al.*, 2010, Evgenieva-Hackenberg *et al.*, 2003). Cependant, l'implication d'autres facteurs reste inconnue (?). **(C)** Chez les bactéries, il existe deux modèles actuels de dégradation des ARNm. Chez *E.coli*, les ARNm 5' triphosphate sont convertis en 5' monophosphate par la protéine récemment découverte RppH. Les messagers en 5' monophosphate sont clivés endonucléolytiquement par la RNase E. Les messagers sans structures secondaires sont dégradés par les exoribonucléases PNPase, RNase II et RNase R. Les messagers possédant des structures secondaires sont polyadénylés par l'enzyme PAP I puis déroulés par l'hélicase à ARN RhlB ou dégradés par la RNase R, puis dégradés par la PNPase et/ou RNase II et RNase R. L'action de l'hélicase RhlB et la PNPase se fait avec la coopération de la RNase E au sein du dégradosome d'ARN (Carpousis, 2007). Chez *B.subtilis*, l'endoribonucléase (RNase Y) et les exoribonucléases 5' (RNase J1/J2) ont été récemment identifiées et la présence d'un dégradosome d'ARN composé de la RNase Y, RNase J1 et J2, l'énolase, PNPase et la phosphofructokinase, a été reportée (Commichau *et al.*, 2009, Mathy *et al.*, 2007, Shahbadian *et al.*, 2009). Cependant, les voies de dégradation et l'implication d'autres facteurs restent inconnues (?).

Les archées sont des microorganismes procaryotes phylogénétiquement distincts des bactéries et des eucaryotes. Cependant, ils sont proches des bactéries et des eucaryotes d'après certains critères comme la morphologie ou la machinerie de traduction et de transcription respectivement. Néanmoins, ils possèdent des critères qui leur sont propres comme la composition de la membrane plasmique et de la paroi cellulaire (Evguenieva-Hackenberg & Klug, 2009). En ce qui concerne la dégradation de l'ARN, il existe chez la plupart des archées, un « exosome-like complexe » ressemblant à celui des eucaryotes comme chez *Sulfolobus solfataricus* (Evguenieva-Hackenberg *et al.*, 2003, Evguenieva-Hackenberg & Klug, 2009, Koonin *et al.*, 2001). Cependant, il existe aussi chez la plupart des archées, une exoribonucléase 5' bactérienne appelée RNase J, qui a été récemment caractérisée chez *Pyrococcus abyssi* et *Thermococcus kodokaraensis* (Clouet-d'Orval *et al.*, 2010, Even *et al.*, 2005). Il semblerait ainsi que même dans le cas de la dégradation des ARNm, les archées ressemblent aux eucaryotes mais aussi aux bactéries (**figure 1B**).

Chez les bactéries, la machinerie de dégradation des ARNm, qui a fait l'objet de ma thèse, est appelée dégradosome d'ARN. Elle a été identifiée pour la première fois chez la γ -protéobactérie à Gram négatif *Escherichia coli*, puis d'autres « dégradosome-like » ont été découverts par la suite chez les protéobactéries et les bactéries à Gram positif (Carpousis *et al.*, 1994, Marcaida *et al.*, 2006). Actuellement, il existe deux modèles de dégradation des ARNm (**figure 1C**). Chez *E.coli*, la dégradation des ARNm se fait dans le sens 3' vers 5' après clivages endonucléolytiques médiés par l'endoribonucléase RNase E, par des exoribonucléases seules comme la RNase II ou la RNase R, ou en complexe comme la PNPase. En effet, la PNPase fait partie du dégradosome d'ARN aux côtés de la RNase E, de l'hélicase à ARN RhlB et de l'enzyme de la glycolyse émolase. Le second modèle émergent de dégradation des ARN est celui de la bactérie à Gram positif *Bacillus subtilis*, où la dégradation des ARN fait intervenir de nouvelles ribonucléases découvertes récemment et absentes chez *E.coli* (Mathy *et al.*, 2007, Shahbadian *et al.*, 2009). De plus, la présence potentielle d'un dégradosome d'ARN a été récemment reportée (Commichau *et al.*, 2009).

Le dégradosome d'ARN d'*E.coli* est le dégradosome d'ARN le plus caractérisé. Son assemblage dépend de la région C-terminale de la RNase E qui sert de « plateforme » à la formation du complexe (Carpousis *et al.*, 1994, Vanzo *et al.*, 1998). Chez d'autres dégradosomes d'ARN assemblés sur la RNase E et identifiés chez d'autres bactéries à l'exception de *B.subtilis*, les interactions entre la RNase E et les protéines partenaires diffèrent de celles retrouvées au sein du dégradosome d'ARN d'*E.coli*. C'est le cas de *Pseudomonas syringae* où l'on retrouve une interaction entre la RNase E et l'exoribonucléase RNase R (Purusharth *et al.*, 2005). Un autre exemple est celui du dégradosome d'ARN de *Rhodobacter capsulatus* qui contient une interaction entre la RNase E et le facteur Rho de terminaison de la transcription (Jager *et al.*, 2001). Ainsi, il y a une remarquable diversité du dégradosome d'ARN chez les bactéries et une plasticité dans les interactions RNase E-protéines. La plupart des dégradosomes d'ARN sont assemblés sur les régions non conservées des RNase E. Par conséquent, il y aurait une corrélation entre la variabilité des partenaires protéiques et la

variabilité en séquence de la région non conservée de la RNase E. La RNase E porte dans sa région non conservée de petits îlots de 15 à 40 acides aminés appelés « microdomaines » (Marcaida et al., 2006). Ces microdomaines sont responsables des interactions entre la RNase E et ses partenaires protéiques au sein du dégradosome d'ARN. La diversité du dégradosome d'ARN chez les bactéries serait due à l'évolution des microdomaines de la région non conservée de la RNase E, qui rendrait le dégradosome d'ARN flexible pour s'adapter efficacement aux variations des conditions environnementales (Marcaida et al., 2006). Cependant, très peu de microdomaines ont été caractérisés à ce jour et la question d'une corrélation entre évolution des microdomaines et adaptation à la niche écologique reste ouverte. Mes travaux de recherche de thèse se sont focalisés sur cette problématique, en caractérisant la RNase E et le dégradosome d'ARN d'une bactérie adaptée au froid *Pseudoalteromonas haloplanktis*.

I. Le dégradosome d'ARN d'*E.coli*

I.1. Présentation

I.1.1. Découverte du dégradosome d'ARN

Le dégradosome d'ARN d'*E.coli* a été mis en évidence dans deux laboratoires différents (Carpousis et al., 1994, Py *et al.*, 1994). Le premier laboratoire travaillait sur la protéine RNase E, une endoribonucléase extrêmement sensible à la protéolyse qui intervient dans la maturation de l'ARN ribosomal 5S (Carpousis et al., 1994). La mise au point d'un protocole de purification en conditions natives de cette protéine a permis de voir la présence de plusieurs polypeptides dans la fraction de purification contenant la RNase E. Certains de ces polypeptides correspondent aux produits de protéolyse de la RNase E tandis que d'autres interagissent avec la RNase E (Carpousis et al., 1994). C'est le cas des polypeptides de 85, 50 et 48 kDa identifiés comme étant la polynucléotide phosphorylase (PNPase), l'hélicase à ARN RhlB et l'enzyme de la glycolyse émolase respectivement (Carpousis et al., 1994, Py *et al.*, 1996).

Le second laboratoire qui a observé une interaction entre la RNase E et la PNPase, s'intéressait à la recherche de facteurs ayant une activité de liaison à l'ARN au niveau des structures secondaires en 3' (Py et al., 1994). Ces dernières ralentissent la dégradation de l'ARN par les exoribonucléases comme la PNPase. Lors de la purification de ce facteur, Higgins et ses collaborateurs ont observé la présence de la PNPase dans les fractions de purification. Ils ont ensuite observé par des expériences d'immunoprécipitations réalisées en utilisant des anticorps anti-PNPase sur un extrait cellulaire d'*E.coli*, que la PNPase interagissait avec la RNase E (Py et al., 1994).

Ainsi, deux ribonucléases importantes du métabolisme de l'ARN d'*E.coli*, la RNase E et la PNPase, se retrouvent au sein d'un complexe multiprotéique. À ces deux protéines, viennent s'ajouter deux autres protéines : RhlB et l'émolase. RhlB permet au sein du dégradosome d'ARN, de dérouler les structures secondaires d'ARNm de manière ATP dépendante, pour faciliter leur dégradation par la PNPase (Py et al., 1996). Quant au rôle de l'émolase au sein du complexe, il reste inconnu.

I.1.2. Organisation du dégradosome d'ARN

Plusieurs travaux ont permis de conforter l'existence du dégradosome d'ARN chez *E.coli* par d'autres méthodes biochimiques. C'est le cas de la co-purification de la RNase E fusionnée en N-terminal à une étiquette FLAG (Miczak *et al.*, 1996) ou le cas de la RNase E fusionnée avec une étiquette histidine (Blum *et al.*, 1997). Puis, plusieurs travaux ont été réalisés afin de caractériser les interactions protéines-protéines au sein du dégradosome d'ARN pour comprendre son organisation. Les travaux de Vanzo *et al.*, 1998 ont permis de montrer par les méthodes d'immunoprécipitations et de doubles hybrides de la levure, que l'organisation en complexe du dégradosome d'ARN dépend de la région C-terminale de la RNase E. En effet, cette région de la protéine sert de « plateforme d'assemblage » qui fait de la RNase E, le centre des interactions protéines-protéines du dégradosome d'ARN. D'autres expériences biochimiques et biophysiques *in vitro* ont caractérisé plus en détail ces interactions RNase E-protéines (Callaghan *et al.*, 2004, Coburn *et al.*, 1999).

I.1.3. Composants mineurs du dégradosome d'ARN

Dans les fractions protéiques des purifications ou d'immunoprécipitations, la RNase E, la PNPase, RhlB et l'énolase sont présentes en quantités majoritaires par rapport à d'autres polypeptides de différents poids moléculaires présents minoritairement (Carpousis *et al.*, 1994, Py *et al.*, 1996). Ces composants mineurs du complexe ont été identifiés comme étant les protéines DnaK, GroEL et la polyphosphate kinase (Blum *et al.*, 1997, Miczak *et al.*, 1996, Vanzo *et al.*, 1998). Pour la protéine DnaK, elle est co-purifiée avec la RNase E sauvage et le mutant thermosensible *rne-3071* - mutant portant la mutation F68L, qui rend l'activité de la RNase E thermosensible (McDowall *et al.*, 1993) - portant l'épitope FLAG. Dans Vanzo *et al.*, 1998, DnaK est également immunoprécipitée avec la RNase E et le mutant RNase E Δ 10, délété de la région acide de la RNase E allant de 844 à 1045 acides aminés. Pour la protéine GroEL, elle est retrouvée dans la fraction du mutant *rne-3071* uniquement (Miczak *et al.*, 1996). DnaK et GroEL, sont deux chaperones moléculaires qui aident au repliement et à l'assemblage correct des protéines chez *E.coli*. La présence de ces protéines dans le dégradosome d'ARN pourrait être due à leur fonction d'aide à l'assemblage des protéines ainsi que des complexes multiprotéiques. Pour GroEL, son interaction particulière avec le mutant *rne-3071* pourrait être due à un repliement anormal de ce mutant. On peut aussi envisager un autre rôle de GroEL où cette protéine aurait une relation fonctionnelle avec la RNase E car dans une souche mutante pour *groEL*, la maturation de l'ARN 5S effectuée par la RNase E, est entravée (Sohlberg *et al.*, 1993).

En ce qui concerne la polyphosphate kinase (PPK), sa présence observée au sein du dégradosome d'ARN suggère un rôle dans la dégradation de l'ARN chez *E.coli* (Blum *et al.*, 1997). Cette enzyme qui polymérise de manière réversible le phosphate γ de l'ATP pour former des chaînes de polyphosphates inorganiques, a été co-purifiée avec la RNase E étiquetée histidine (Blum *et al.*,

1997). De plus, la PPK est capable de lier l'ARN et aurait un rôle dans la dégradation du messenger codant pour la protéine membranaire OmpA, puisqu'un mutant *ppk* augmente la stabilité du messenger (Blum et al., 1997). Toutes ces observations ont poussé les auteurs de ces travaux à proposer un modèle où la PPK permettrait de moduler la dégradation des ARN, inhibée par la présence de chaînes de polyphosphates. En dégradant ces chaînes de polyphosphates en présence d'ADP, la PPK permettrait de régénérer l'ATP nécessaire à l'hélicase RhlB du dégradosome d'ARN (Blum et al., 1997, Py et al., 1996).

Une autre protéine appelée poly(A) polymérase I ou PAP I, est également capable d'interagir *in vitro* avec la RNase E (Raynal & Carpousis, 1999). De plus, cette protéine a été observée par immunodétection dans les préparations du dégradosome d'ARN ainsi que son activité (Raynal & Carpousis, 1999, Raynal *et al.*, 1996). La PAP I est responsable de la polyadénylation en 3', de plus de 90 % des messagers d'*E.coli* en phase exponentielle et elle est nécessaire *in vivo* comme le dégradosome d'ARN, pour dégrader les ARN contenant des structures secondaires (Khemici & Carpousis, 2004, Mohanty & Kushner, 2006). Récemment, il a été montré pour la première fois que la PAP I interagirait *in vivo* avec la RNase E (Carabetta *et al.*, 2010). En effet, lors d'immunoprécipitations de la PAP I étiquetée GFP exprimée chez *E.coli*, les auteurs ont observé la présence de la RNase E et des protéines du dégradosome d'ARN ainsi que d'autres protéines impliquées dans le métabolisme de l'ARN comme la RNase R ou encore les deux hélicases à ARN SrmB et HrpA (Carabetta *et al.*, 2010). La présence de la RNase R et HrpA est observée à l'entrée de la phase stationnaire d'*E.coli*. Ainsi, l'ensemble de ces interactions mentionnées suggère un rôle inconnu de l'interaction RNase E-PAP I.

En résumé, plusieurs interactions entre la RNase E et les protéines GroEL, DnaK, la PPK ou encore la PAP I ont été observées *in vitro* et/ou *in vivo* chez *E.coli*. Cependant, la signification de ces interactions et leurs implications au sein du dégradosome d'ARN restent inconnues à ce jour, à défaut d'expériences plus concluantes.

I.2. Composants majeurs du dégradosome d'ARN

I.2.1. La RNase E

I.2.1.1. Structure primaire

La RNase E d'*E.coli* est une grosse protéine de 1061 acides aminés composée de plusieurs domaines fonctionnels. Elle est divisée en deux parties distinctes par leurs fonctions et leurs structures : une moitié N-terminale et une moitié C-terminale. La moitié N-terminale s'étend de 1 à 529 acides

aminés et porte l'activité endonucléolytique de clivage de l'ARN et un domaine de fixation à l'ARN appelé S1 (Bycroft *et al.*, 1997). Quant à la région C-terminale de 530 à 1061 acides aminés, elle ne possède pas d'activité catalytique. Cependant, elle porte les sites d'interactions RNase E-protéines mais aussi deux sites de fixation de l'ARN appelés AR-RBD (Arginine Rich-RNA Binding Domain) et AR2 (Arginine Rich 2), et un site d'ancrage à la membrane MTS (Membrane Targeting Sequence) (**figure 2**) (Carpousis *et al.*, 1994, Khemici *et al.*, 2008, Leroy *et al.*, 2002, McDowall & Cohen, 1996, Py *et al.*, 1996). Ces sites d'interactions médiés par la RNase E seront détaillés plus tard dans la partie II.

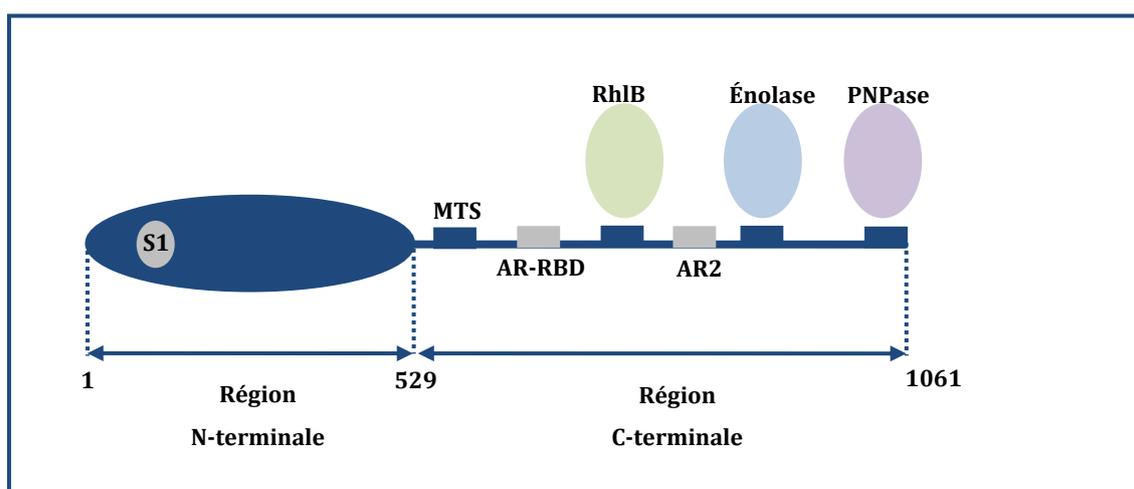


Figure 2 : Structure primaire de la RNase E d'*E.coli*.

La RNase E possède une région N-terminale portant le domaine S1 de fixation à l'ARN. La région C-terminale porte les sites d'interaction de la PNPase, RhIB et l'énolase. Cette région porte également deux sites de fixation de l'ARN : l'AR-RBD et l'AR2 ainsi que le site MTS d'ancrage de la RNase E à la membrane.

1.2.1.2. Structure de la RNase E

La région N-terminale de la RNase E est structurée tandis que la région C-terminale l'est très peu (Callaghan *et al.*, 2004, Callaghan *et al.*, 2005a). La résolution de la structure de la région N-terminale a montré que celle-ci forme deux domaines globulaires « large » et « small » (**figure 3**) (Callaghan *et al.*, 2005a). Le domaine « large » (1 à 400 acides aminés) contient quatre sous-domaines : le premier est structurellement apparenté à la famille de l'endoribonucléase RNase H, mais ne contient pas de site actif de l'enzyme qui intervient dans le clivage des duplex d'ARN ou les hybrides ARN/ADN (Worrall & Luisi, 2007). Le second sous-domaine est le domaine S1 de liaison à l'ARN (acides aminés 36 à 118) originalement identifié chez la protéine ribosomale S1 et largement conservé et répandu chez les protéines liant l'ARN (Bycroft *et al.*, 1997). Ce domaine S1 est nécessaire pour les clivages endonucléolytiques médiés par la RNase E (Diwa *et al.*, 2002). Le troisième sous-domaine allant de 119 à 215 acides aminés est appelé « 5'senseur » et intervient dans la

reconnaissance de l'extrémité 5' de l'ARN lié. Enfin, le dernier sous-domaine contenant les résidus 280 à 400, est structuralement similaire à celui de la protéine DNase I (**figure 3A**). Quant au domaine « small », il s'étend de 415 à 529 acides aminés et il est impliqué dans la formation de l'interface de contact entre les protomères. En effet, la partie N-terminale de la RNase E forme un homotetramère organisé en dimère de dimère (**figure 3B**) (Callaghan et al., 2005a). Chaque dimère de RNase E est formé par l'association de deux sous-domaines ressemblant à la DNase I. Cette organisation en homotetramère est nécessaire pour l'activité catalytique de la RNase E (Callaghan *et al.*, 2003). La structure de la RNase E a été résolue sous sa forme « apo » (sans liaison à l'ARN) et a révélé que la structure quaternaire serait flexible (Koslover *et al.*, 2008). Au niveau de l'homotetramère de RNase E, se trouvent deux ions, le premier est un ion de magnésium présent lors de la cristallisation de la protéine et se trouve à proximité du squelette de l'ARN et du site catalytique (Callaghan et al., 2005a). Le second, est présent entre les domaines « large » et « small » de la RNase E où se trouve un « zinc linker » qui coordine un ion de zinc grâce à la présence de paire de cystéines conservées (Callaghan et al., 2005a) (**figure 3B**). Cet ion se trouve à l'interface entre deux dimères de RNase E et aide à leur organisation. Ceci expliquerait pourquoi la mutation de ces cystéines abolit la structure de l'homotetramère (Callaghan *et al.*, 2005b). La délétion de ce « linker » laisse toutefois les cellules viables même si la croissance est fortement ralentie, ce qui souligne l'importance de cette région pour la fitness de la cellule (Caruthers *et al.*, 2006).

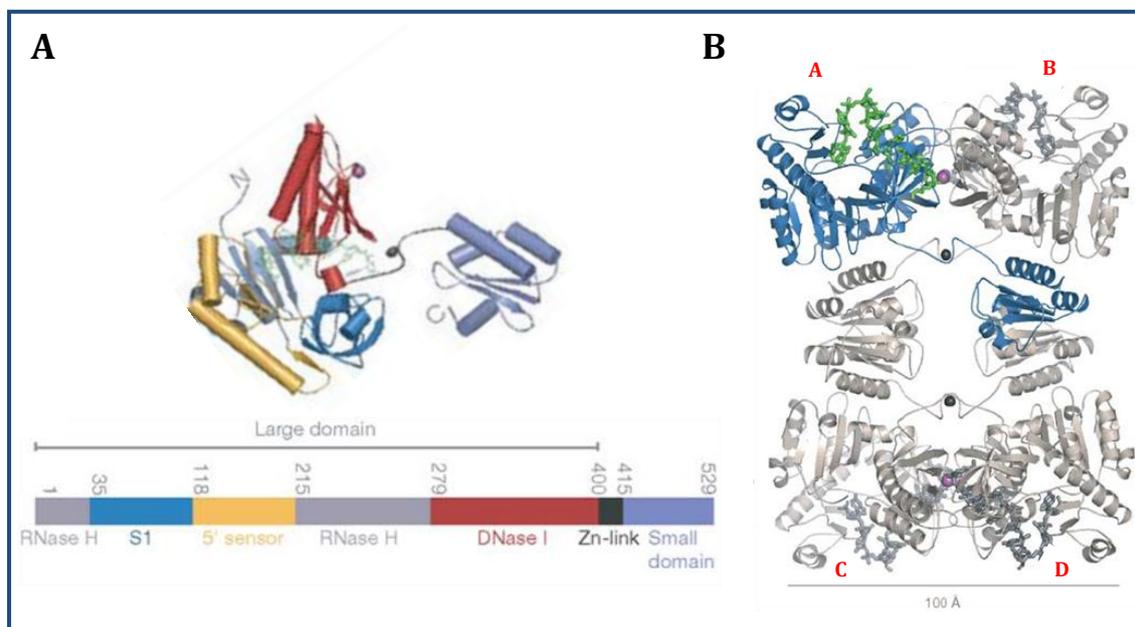


Figure 3 : Structure résolue de la région N-terminale de la RNase E.

(A) Organisation et structure des différents sous-domaines présents dans la région N-terminale de la RNase E. (B) La région N-terminale de la RNase E forme un homotetramère composé de quatre protomères : A, B, C et D. Le protomère A est en bleu et lie une molécule d'ARN en vert. Les trois autres protomères sont en beige et l'ARN en gris. Les boules en gris foncé et magenta représentent le zinc et le magnésium respectivement. Figure provenant de (Callaghan et al., 2005a).

I.2.1.3. Fonction de la RNase E

Bref historique

La RNase E d'*E.coli* est une endoribonucléase essentielle spécifique des ARN simples brins. Elle fut originalement découverte comme étant responsable de la maturation de l'ARNr 5S à partir de son précurseur l'ARNr 9S (Ghora & Apirion, 1978, Misra & Apirion, 1979). Puis, plusieurs études ont montré que la RNase E intervenait également dans la dégradation des ARNm. En effet, en étudiant la maturation du gène 32 du bactériophage T4, il a été observé que le niveau du transcrit précurseur restait fortement élevé dans une souche portant un mutant thermosensible de la RNase E (Mudd *et al.*, 1988). Ensuite, dans la même souche utilisée, ce sont plusieurs ARNm du bactériophage T4 qui sont stabilisés, suggérant un rôle direct de la RNase E dans leur dégradation (Mudd *et al.*, 1990a). Enfin, il s'est avéré que la RNase E est impliquée également dans la dégradation des ARNm d'*E.coli* (Mudd *et al.*, 1990b).

Rôle de la RNase E

Depuis ces travaux, la RNase E a été extensivement étudiée pour comprendre son rôle et son mécanisme d'action. En plus de la dégradation des ARNm, la RNase E intervient également dans d'autres processus du métabolisme de l'ARN comme la dégradation des ARNm polycistroniques ainsi que dans la dégradation des ARNm médiée par des petits ARN non codants (ARNnc) (Morita *et al.*, 2005, Pfeiffer *et al.*, 2009). C'est le cas de l'action du petit ARN SgrS (et de RhyB en cas de carence en fer) qui aboutit à un couplage entre blocage de l'initiation de la traduction et dégradation du messenger cible comme conséquence du blocage (Masse *et al.*, 2003, Morita *et al.*, 2005). Un nouveau mode d'action des petits ARN a été récemment identifié où les ARNm cibles sont dégradés par la déstabilisation endonucléolytique directe en recrutant la RNase E (Pfeiffer *et al.*, 2009). Ce mode d'action par les petits ARNnc fait un remarquable parallèle avec le mécanisme d'ARN interférence chez les eucaryotes (Condon, 2007).

La RNase E est aussi importante pour la régulation du nombre de copies du plasmide ColE1 et ses dérivés, en clivant en 5' le petit ARN de 108 nt appelé RNA I, répresseur de la réplication de ces plasmides (Kaberdin *et al.*, 1996, McDowall *et al.*, 1994). En ce qui concerne la maturation des ARN, la RNase E est importante pour la maturation des ARNt (Li & Deutscher, 2002b), des ARN polycistroniques, du petit ARN 6S qui cible l'ARN polymérase liée au facteur sigma pour réguler son activité (Kim & Lee, 2004), de l'ARNtm qui cible les polypeptides tronqués à la dégradation (Lin-Chao *et al.*, 1999) et du composant catalytique M1 de la ribonucléase RNase P et qui intervient dans la maturation de la terminaison 5' des ARNt (Lundberg & Altman, 1995). Aujourd'hui, on pense que la RNase E est l'endoribonucléase majeure d'*E.coli* impliquée dans la plupart des processus biologiques impliquant l'ARN. Toutes ces nombreuses fonctions biologiques caractérisées dont certaines sont cruciales pour la cellule, placent la RNase E au centre du métabolisme de l'ARN d'*E.coli* (**figure 4**). Ceci est probablement la raison qui la rend essentielle pour la viabilité d'*E.coli* et qui expliquerait le

fait que la fonction qui la rendrait essentielle (si elle existe), reste inconnue même après plus d'une vingtaine d'années d'études.

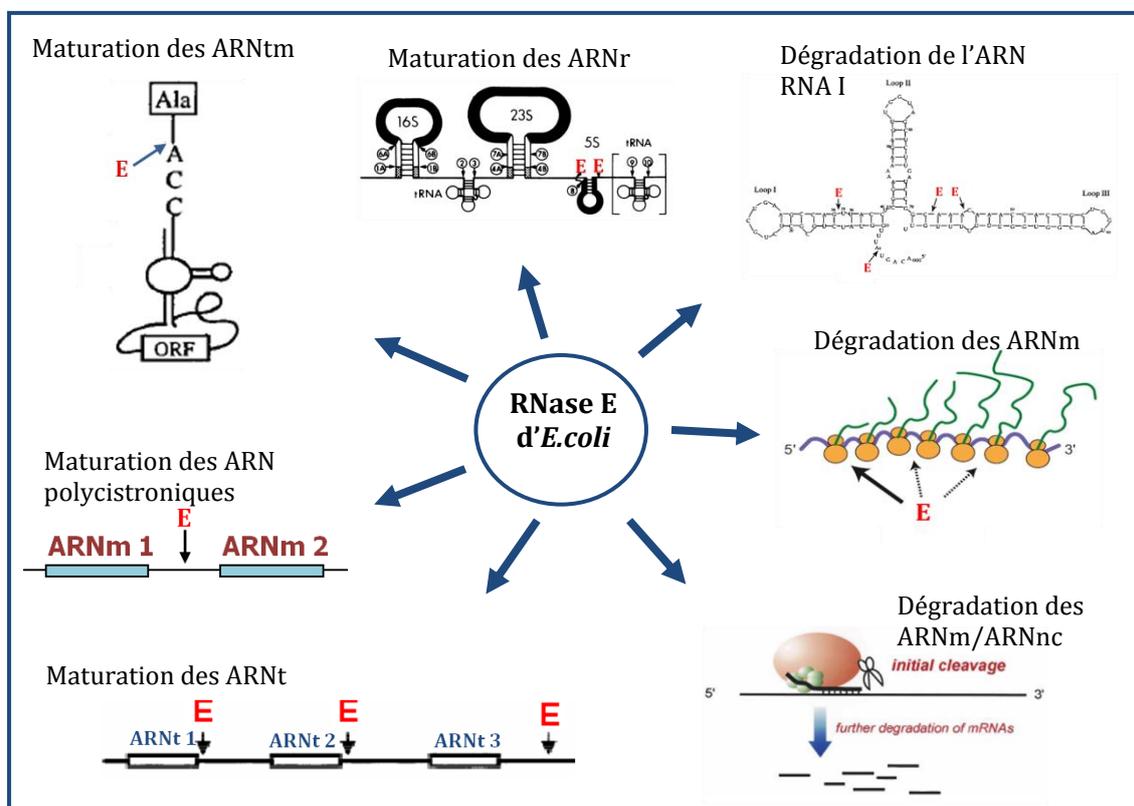


Figure 4 : La RNase E au centre du métabolisme de l'ARN d'*E.coli*.

La RNase E est impliquée dans les principales fonctions biologiques du métabolisme de l'ARN chez *E.coli*. 'E' montre les clivages endonucléolytiques médiés par la RNase E sur l'ARN.

Un exemple de rôles importants de la RNase E d'*E.coli* est qu'elle intervient dans la voie principale de dégradation des ARNm qui nécessite l'action combinée entre endoribonucléases et exoribonucléases. En fait, la RNase E initie les clivages endonucléolytiques d'une grande majorité d'ARNm pour générer des fragments d'ARN (Carpousis *et al.*, 2009). Ces fragments sont ensuite dégradés en 3' par des exoribonucléases comme la PNPase, la RNase R ou la RNase II, avec l'aide de protéines accessoires comme l'hélicase à ARN RhIB et la poly(A) polymérase PAP. Les quelques oligonucléotides générés qui ne peuvent pas être dégradés efficacement par les exoribonucléases sont dégradés par une oligoribonucléase essentielle Orn (Ghosh & Deutscher, 1999) (**figure 5**). Il est important de noter ici qu'il existerait des voies alternatives de dégradation des ARNm chez *E.coli*. La RNase E d'*E.coli* est certes essentielle à la cellule, mais n'est pas la seule endoribonucléase (présence de la RNase G, RNase III et la RNase P) et sa délétion ralentit seulement la dégradation, au lieu de la bloquer totalement (Lee *et al.*, 2002, Ono & Kuwano, 1979). De plus, les études de transcriptomes ont montré l'existence de transcrits qui ne semblent pas être affectés par l'inactivation de la RNase E (Lee *et al.*, 2002).

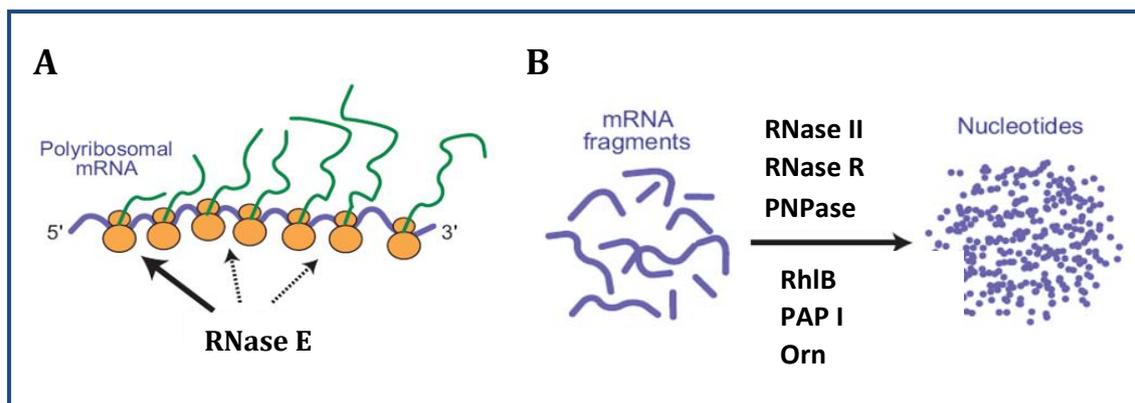


Figure 5 : Principale voie de dégradation des ARNm chez *E.coli*.

(A) Le polysome en cours de traduction est clivé par la RNase E à plusieurs endroits, essentiellement en 5' mais aussi en interne. La flèche noire indique l'endroit du clivage par la RNase E le plus fréquent contrairement aux flèches en pointillés. (B) Les fragments générés par la RNase E, sont ensuite dégradés en oligonucléotides grâce à l'intervention des exoribonucléases : RNase II, RNase R et la PNPase, aidées par les protéines RhIB et PAP I. L'oligoribonucléase Orn dégrade les fragments de quelques nucléotides générés par les exoribonucléases en nucléotides. Figure provenant de Carpousis *et al.*, 2009.

Mécanisme de clivage médié par la RNase E sur les ARN

Plusieurs études biochimiques se sont intéressées au mécanisme de clivages endonucléolytiques de la RNase E sur des substrats comme l'ARNm *rpsT*, codant pour la protéine S20. Il a été montré que la RNase E a une forte affinité pour les ARN possédant une extrémité 5' monophosphate, à l'inverse des ARN en 5' triphosphate ou en 5' OH (Feng *et al.*, 2002, Jiang & Belasco, 2004, Mackie, 1998). Cependant chez *E.coli*, les ARN en cours de synthèse sont stabilisés par la présence en 5', de groupements triphosphates issus de l'initiation de la transcription, qui permettent de protéger le transcrit de la dégradation. Une pyrophosphohydrolase d'ARN récemment découverte appelée Rpp H, modifie les ARN 5' triphosphate en 5' monophosphate grâce à son activité pyrophosphatase (Celesnik *et al.*, 2007, Deana *et al.*, 2008). Cette étape de déphosphorylation est ainsi l'étape limitante de l'action de la RNase E sur les ARNm en 5' monophosphate (Deana *et al.*, 2008). La RNase E préfère les substrats en 5' monophosphate simple brin accessibles, sans structures secondaires, car l'utilisation d'un oligonucléotide complémentaire à l'extrémité 5' monophosphate, inhibe l'activité de la RNase E (Mackie, 1998). De plus, ces ARN en 5' monophosphate augmentent significativement l'activité de clivage par la RNase E même si le site de clivage se trouve à une centaine de nucléotides plus loin. Ceci fait de la RNase E une enzyme dont l'activité dépend du 5' monophosphate de l'ARN (Mackie, 1998). La RNase E scannerait l'ARN à la recherche de sites de clivages de manière directionnelle de 3' vers 5' et de manière distributive (Feng *et al.*, 2002, Jourdan & McDowall, 2008). Le clivage endonucléolytique se fait spécifiquement et préférentiellement au niveau de régions riches en A/U en générant des ARN 5' monophosphorylés et 3' hydroxyles (Babitzke & Kushner, 1991, Ehretsmann *et al.*, 1992, Lin-Chao *et al.*, 1994, McDowall *et al.*, 1994, Misra & Apirion, 1979).

La structure résolue de la RNase E en présence d'un ARN 5' monophosphate a permis de comprendre les raisons de l'affinité de la RNase E pour ces ARN (Callaghan et al., 2005a). L'ARN 5' monophosphate se lie au niveau de la poche 5' senseur comme il a été précédemment suggéré (Mackie, 1998), au niveau des acides aminés allant de 118 à 215 de la RNase E. Plus exactement, le groupement monophosphate interagit par des interactions hydrogènes avec les acides aminés T170 et R169 (**figure 6A**). Un groupement 5'OH ne pourrait pas effectuer ces interactions hydrogènes tandis qu'un groupement triphosphate serait trop encombrant (Callaghan et al., 2005a). Cependant jusqu'à ce jour, ces études cristallographiques ainsi que les études biochimiques, ne permettent pas de comprendre comment l'activité endonucléolytique de la RNase E est stimulée par l'ARN 5' monophosphate. Le modèle « mouse-trap » proposé par l'équipe de Ben Luisi suggère que l'engagement de l'ARN 5' monophosphate dans la poche 5' senseur, induirait un changement de conformation de la RNase E au niveau du domaine S1 pour former le site catalytique de l'enzyme (**figure 6B**) (Callaghan et al., 2005a). Il y aurait ainsi suivant ce modèle, une activation allostérique de l'enzyme par l'ARN 5' monophosphate. Ce modèle est conforté par plusieurs travaux réalisés récemment (Callaghan et al., 2003, Grossmann *et al.*, 2008, Koslover et al., 2008). Un autre modèle d'activation « multimérique » de la famille des RNase E/G par l'ARN en 5' monophosphate a été proposé. Le 5' monophosphate accélère dans ce modèle, le clivage de l'ARN en augmentant l'efficacité catalytique de clivage, au lieu d'augmenter l'affinité de liaison de l'ARN (Jiang & Belasco, 2004). De plus, dans ce modèle, un état multimérique des RNase E/G serait nécessaire pour avoir une activation de l'activité catalytique. Il peut y avoir une activation en cis par l'ARN 5' monophosphate sur la même sous-unité de RNase E/G, ou activation en trans d'une sous-unité lorsque l'ARN 5' monophosphate se fixe à la sous-unité adjacente (Jiang & Belasco, 2004). Il existe un autre modèle de stimulation de la RNase E qui dérive du modèle « 5' tethering » proposé auparavant par l'équipe de Georges Mackie (Jourdan & McDowall, 2008). Ce modèle revisité est proposé d'après les résultats obtenus sur le mode d'action de la RNase G d'*E.coli*, une endoribonucléase paralogue de la RNase E, dont l'activité est également dépendante de l'extrémité 5' de l'ARN. Dans ce modèle, le 5' monophosphate n'induit pas de changement de conformation du domaine S1, mais sa perception augmente significativement l'affinité de la RNase G pour la liaison à l'ARN et sa dégradation (Jourdan & McDowall, 2008).

Dans ces modèles proposés, l'extrémité 5' monophosphate joue un rôle important dans l'initiation de la dégradation de l'ARN par la RNase E. Chez *B.subtilis*, trois ribonucléases caractérisées récemment : les RNase J1, RNase J2 et RNase Y, sont également sensibles, comme la RNase E d'*E.coli*, aux extrémités 5' monophosphate (de la Sierra-Gallay *et al.*, 2008, Even et al., 2005, Mathy et al., 2007, Shahbadian et al., 2009). La RNase J1 possède une poche de liaison au 5' monophosphate qui ne peut contenir de groupement triphosphate (de la Sierra-Gallay et al., 2008). Par conséquent, la préférence de l'extrémité 5' monophosphate semble être un mécanisme commun à ces RNases. La notion qui semble émerger de l'ensemble de ces travaux est que la « fin (5') justifie les

moyens » dans la dégradation des ARN chez les bactéries (Schoenberg, 2007). Au-delà des bactéries, la préférence de l'extrémité 5' monophosphate est également retrouvée chez les eucaryotes et les archées comme c'est le cas pour les protéines Rrp44 de la levure et la RNase J de *P.abysssi*, respectivement (Clouet-d'Orval et al., 2010, Schaeffer *et al.*, 2009). Ceci souligne l'importance de cette préférence dans la dégradation de l'ARN.

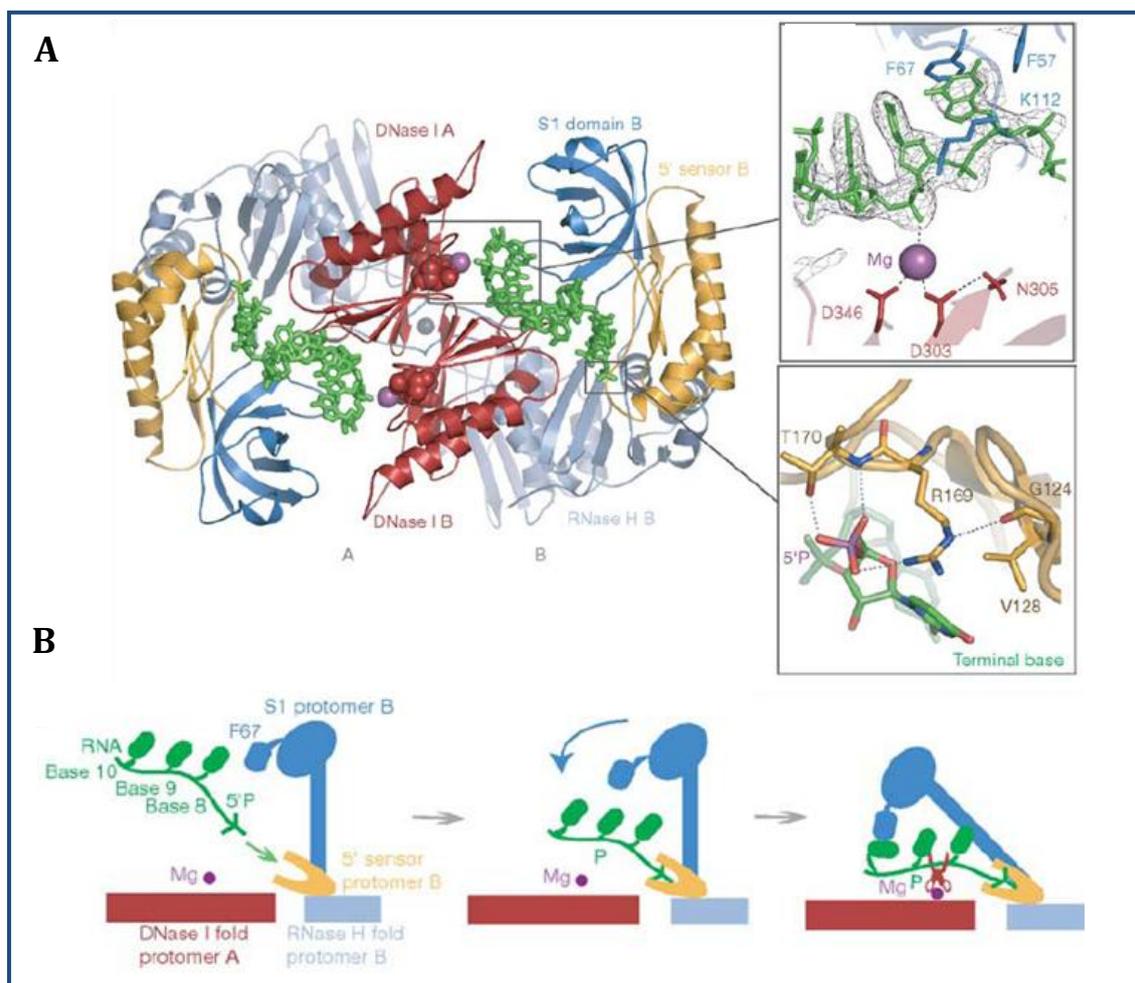


Figure 6 : Structure cristallisée d'interaction RNase E/ARN et modèle d'action de la RNase E. **(A)** Structure d'un dimère de RNase E où les domaines S1(en bleu), RNase H (en gris), DNase I (en rouge) et 5'senseur (en jaune) de chaque monomère de RNase E (A et B) interagit avec l'ARN (en vert). Agrandissement du site catalytique proposé de la RNase E. L'ion Mg (en magenta) interagit avec l'ARN (en vert) et avec les acides aminés Asp346 et Asp303 du domaine DNase I (en rouge). Agrandissement de l'interaction de l'ARN (en vert) avec le domaine 5'senseur (en jaune) au niveau des résidus importants pour l'interaction. L'extrémité 5' monophosphate de l'ARN interagit par des interactions hydrogènes avec les acides aminés T170 et R169. Figure provenant de Callaghan et al, 2005. **(B)** Le modèle « mouse-trap » où l'ARN s'introduit dans la poche 5'senseur (en jaune). Ceci induit un changement de conformation qui fait rabattre le domaine S1 (en bleu) sur l'ARN et induit le clivage au niveau du site catalytique (ciseau). (Callaghan et al., 2005a).

Autorégulation de la RNase E

Chez *E.coli* un mécanisme homéostatique régule finement la quantité de RNase E dans la cellule, de manière à avoir environ 1000 copies par cellule (Jain & Belasco, 1995, Kido *et al.*, 1996). Lorsque la RNase E est surexprimée ou sous exprimée, la croissance cellulaire est ralentie (Apirion, 1978, Claverie-Martin *et al.*, 1991, Jain *et al.*, 2002). En fait, il est nécessaire d'avoir au moins 10 à 20 % de RNase E dans la cellule, pour avoir une croissance cellulaire normale d'*E.coli* (Jain *et al.*, 2002). La RNase E est exprimée à partir de trois promoteurs, mais un seul parmi eux est très efficace (p1) (Ow *et al.*, 2002). Le mécanisme de régulation nécessite des clivages endonucléolytiques médiés par la RNase E sur son propre messenger, au niveau de la région 5'UTR (UnTranslated Region) produit à partir du promoteur p1 (Jain & Belasco, 1995, Mudd & Higgins, 1993, Schuck *et al.*, 2009). L'activité de la région N-terminale de la RNase E est nécessaire pour cette autorégulation mais pas suffisante puisque la région C-terminale augmente significativement la capacité de la RNase E à réguler sa synthèse (Jiang *et al.*, 2000). La région 5'UTR de 361 nt, forme des structures secondaires de plusieurs tiges-boucles qui sont conservées, malgré la divergence de séquence, chez les bactéries proches d'*E.coli* (voir **figure 7A**) (Diwa *et al.*, 2000). Récemment, il a été montré que la RNase E (1 à 498 aa) se lie directement à la partie supérieure de la tige boucle hp2 (Schuck *et al.*, 2009). Ceci renforce le modèle proposé précédemment où la RNase E interagirait avec la tige boucle hp2 pour reconnaître son messenger et effectuer des clivages endonucléolytiques plus loin dans la séquence (Diwa *et al.*, 2000, Diwa & Belasco, 2002) (**figure 7B**).

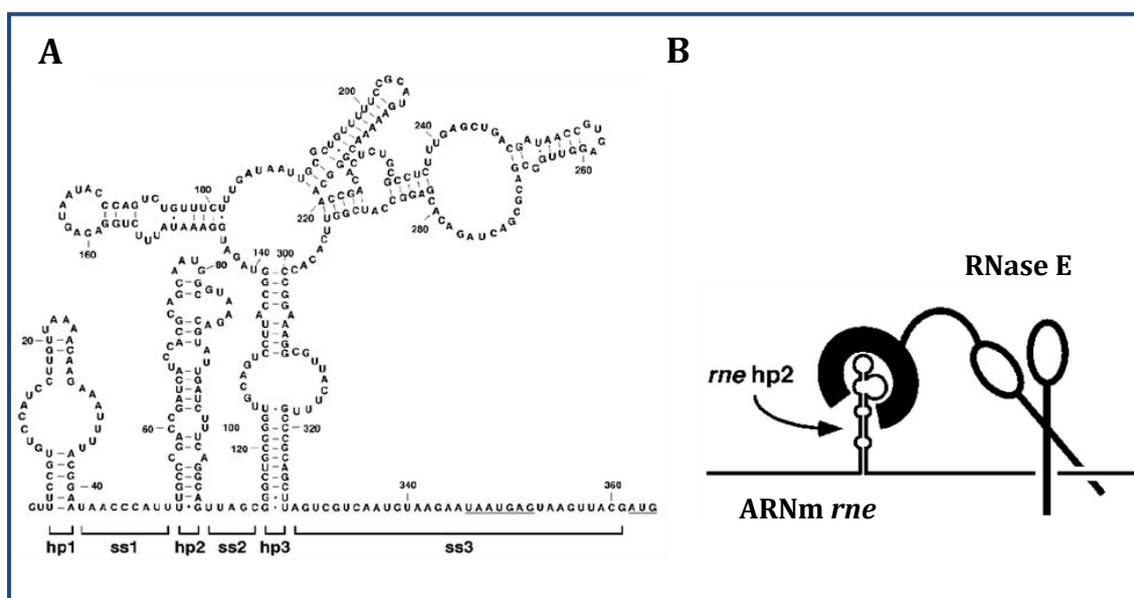


Figure 7 : Structures secondaires présentes dans la région 5'UTR du messenger *rne* codant pour la RNase E.

(A) La région 5'UTR contient trois tiges boucles imparfaites appelées hp 1, 2 et 3 ainsi que trois régions simples brins appelées ss 1, 2 et 3 pour single-stranded spacer. Les deux régions soulignées représentent la séquence Shine-Dalgarno et le codon d'initiation de la traduction respectivement. Diwa *et al.*, 2002. **(B)** Modèle d'action de la RNase E sur son propre messenger. Diwa *et al.*, 2002.

I.2.1.4. La famille des RNase E/G

Chez *E.coli*, il existe une protéine de 487 acides aminés appelée RNase G (anciennement CafA) de séquence similaire à la région N-terminale catalytique de la RNase E mais dépourvue de région C-terminale (McDowall et al., 1993). La RNase G est une protéine non essentielle qui intervient dans la maturation de l'ARN 16S en coopération avec la RNase E et qui est nécessaire pour la dégradation normale de plusieurs transcrits dont le transcrit codant pour l'énolase (Lee et al., 2002, Li *et al.*, 1999b). Chez d'autres bactéries, de nombreuses protéines présentent des similarités de séquence avec la région N-terminale catalytique des RNase E et RNase G d'*E.coli* (Condon & Putzer, 2002). Toutes ces protéines sont regroupées dans la famille définie par la RNase E et RNase G et appelée RNase E/G (Carpousis, 2002). Les régions similaires à la région N-terminale catalytique de la RNase E d'*E.coli*, sont phylogénétiquement conservées tandis que la région non catalytique est fortement variable (Kaberdin *et al.*, 1998, Lee & Cohen, 2003).

Distribution et phylogénie des RNase E/G

La famille des RNase E/G est assez bien répandue chez les bactéries. Elle est présente chez les *Protéobactéries*, chez les *Actinobactéries* et les *Firmicutes*, chez quelques *Cyanobactéries* et chloroplastes de certaines plantes (Commichau et al., 2009, Condon & Putzer, 2002, Lee & Cohen, 2003, Schein *et al.*, 2008, Shahbadian et al., 2009). Chez les protéobactéries et plus exactement les γ et β -protéobactéries, la RNase E et la RNase G co-existent chez une même bactérie, ce qui suggère la duplication d'un gène ancien pour donner ces deux protéines qui ont par la suite, fonctionnellement divergé au cours de l'évolution (Condon & Putzer, 2002). Il est possible également que la présence de ces deux protéines paralogues au sein d'une même cellule, soit le résultat de l'endosymbiose entre une ancienne actinobactérie et une ancienne clostridie (Lake, 2009). En dehors des γ et β -protéobactéries, on retrouve un seul gène codant pour une RNase E de taille plus courte (comme chez les cyanobactéries) ou plus longue (comme chez les actinobactéries) que la RNase E d'*E.coli* (Kaberdin et al., 1998, Lee & Cohen, 2003). Quoi qu'il en soit, il a été montré qu'un arbre phylogénétique basé sur les similarités de séquences des RNase E, est similaire à un arbre phylogénétique généré à partir de l'ARN 16S, ce qui suggère fortement que la RNase E est une protéine ancienne (Lee & Cohen, 2003). Cependant, même si elle semble être ancienne et qu'elle soit essentielle chez *E.coli*, la RNase E est absente chez de nombreuses bactéries et chez les archées. Chez les bactéries, la RNase E est absente surtout chez les bactéries à Gram positif et à fort pourcentage en G+C comme *B.subtilis* ou *Staphylococcus aureus* et aussi chez certaines protéobactéries comme *Helicobacter pylori* (Condon & Putzer, 2002, Shahbadian et al., 2009). Chez *B.subtilis*, l'activité de clivage endonucléolytique similaire à la RNase E détectée auparavant, est due à l'activité de la protéine essentielle RNase J1 et de sa paralogue RNase J2 (Even et al., 2005). Cependant, leur délétion augmentait à peine la demi-vie des transcrits ce qui a suggéré que ces deux enzymes n'ont pas un rôle principal dans l'initiation

globale de la dégradation des ARN chez *B.subtilis* (Even et al., 2005). Aujourd'hui, ce rôle est attribué à l'endoribonucléase essentielle RNase Y découverte récemment (Shahbadian et al., 2009).

En ce qui concerne les archées, des RNase E/G putatives ayant des similarités de séquences avec la RNase E d'*E.coli* ont été mentionnées (Lee & Cohen, 2003) mais la seule protéine étudiée, FAU-1 de l'hyperthermophile *Pyrococcus furiosus* qui présente 25 % de similarité de séquence à la région N-terminale de la RNase E d'*E.coli*, possède uniquement une activité de liaison à l'ARN et aucune activité ribonucléase (Kanai et al., 2003). De plus, comme il a été suggéré par Even et al., 2005 et montré par notre équipe, la plupart des génomes des Euryarchées, sous branche des archées, ont une ribonucléase similaire à la ribonucléase ancienne RNase J (Clouet-d'Orval et al., 2010).

En résumé, la **figure 8** montre la distribution des RNase E/G, RNase J et RNase Y chez les bactéries et les archées. Il existe peu de bactéries où l'on retrouve à la fois ces trois RNases (Shahbadian et al., 2009).

	RNase		
	E/G	J	Y
<i>Archaea</i>			
Crenarchaeota	NO	NO	NO
Euryarchaeota	NO	30/36	NO
Nanoarchaeota	NO	1/1	NO
<i>Bacteria</i>			
Actinobacteria	76/85	85/85	14/85
Bacteroidetes	58/60	2/60	57/60
Chlamydiae	13/13	NO	1/13
Cyanobacteria	34/37	34/37	NO
<i>Firmicutes</i>			
<i>Bacillales</i>	28/82	79/82	81/82
<i>Clostridia</i>	19/82	79/82	82/82
<i>Lactobacillales</i>	NO	81/82	81/82
Mollicutes	NO	36/36	24/36
<i>Proteobacteria</i>			
<i>Alpha</i>	57/144	104/144	NO
<i>Beta</i>	91/91	NO	NO
<i>Delta</i>	33/33	25/33	25/33
<i>Epsilon</i>	NO	36/38	34/38
<i>Gamma</i>	318/326	10/326	NO
Spirochaetales	NO	NO	32/33

Figure 8 : Distribution des RNase E/G, RNase J et RNase Y chez les bactéries et les archées.

Les boîtes en noir indiquent la présence de l'enzyme chez tous les représentants du groupe. Les boîtes en gris la présence de l'enzyme chez quelques représentants du groupe. Les boîtes en blanc, l'absence de l'enzyme chez le groupe. Figure provenant de Shahbadian et al, 2009.

Classification des RNase E/G

Lee and Cohen 2003 ont proposé de classer les protéines de la famille des RNase E/G d'après des alignements de séquence obtenus par les méthodes bio-informatiques, en quatre types selon la position de la région catalytique putative phylogénétiquement conservée et la présence/absence de régions auxiliaires qui permettraient l'assemblage d'un dégradosome d'ARN (**figure 9**) (Lee & Cohen, 2003) :

- Les RNase E de type I portent leur domaine catalytique dans la région N-terminale de la protéine et la région qui serait responsable de l'assemblage d'un dégradosome d'ARN en C-terminale. Un exemple de RNase E de type I est la RNase E d'*E.coli*.
- Les RNase E de type II ressemblent aux RNase E de type I. Toutefois, il y a une insertion de 60 à 180 acides aminés dans la région N-terminale catalytique et la région C-terminale est généralement plus courte. Le rôle de ces insertions riches en arginines, prolines qui interrompent le domaine S1, reste inconnu. On retrouve dans ce type II, les RNase E des α -protéobactéries *Rhodobacter capsulatus* ou de *Caulobacter crescentus*.
- Chez les RNase E de type III, le domaine catalytique conservé se situe au centre de la séquence primaire de la protéine et les régions non essentielles sont de part et d'autre de ce domaine. On retrouve dans cette catégorie, la RNase E de l'actinobactérie *Streptomyces coelicolor*.
- Le type IV regroupe toutes les RNase E/G qui ressemblent à la RNase G d'*E.coli*. Ces RNase E/G sont courtes car elles possèdent une extension de la région catalytique de 0 à 90 acides aminés. Il est difficile dans ce cas de distinguer la RNase E de la RNase G.

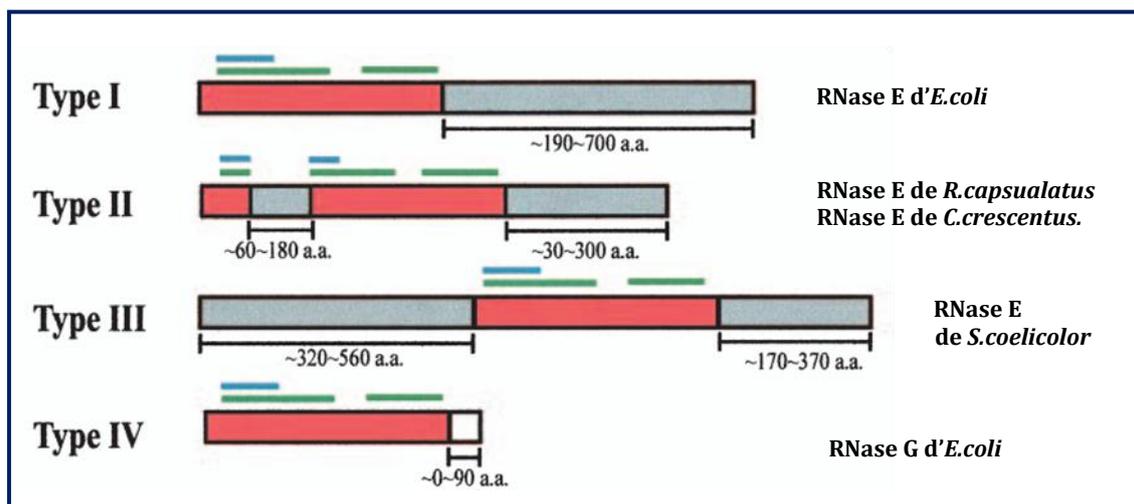


Figure 9 : Classification des protéines de la famille des RNase E/G.

En rouge, le domaine catalytique phylogénétiquement conservé des RNase E/G. En gris, la région auxiliaire qui pourrait intervenir dans l'assemblage d'un dégradosome d'ARN. Les traits verts et bleus représentent la localisation du domaine S1 et les régions HSR (High Similarity Region) respectivement. Pour chaque type de RNase E/G, un exemple est donné à droite de la figure. Figure provenant de Lee and Cohen, 2003.

Les RNase E/G caractérisées

Plusieurs RNase E/G d'autres bactéries ont été caractérisées afin de voir si les mécanismes intervenants dans le métabolisme de l'ARN sont communs à *E.coli* (voir le **tableau 1**). Certaines de ces RNase E/G caractérisées et testées pour leur activité, sont capables de compléter un mutant *rne* thermosensible d'*E.coli* et d'effectuer des clivages endonucléolytiques similaires à ceux médiés par la RNase E d'*E.coli*. Ceci suggère la conservation de la fonction de ces RNase E/G au cours de l'évolution, due à la conservation du domaine catalytique, malgré la variabilité en taille et de la structure primaire de ces RNase E/G. C'est le cas de la RNase E eucaryote de la plante *Arabidopsis thaliana* présente dans le chloroplaste. Cette RNase E est nécessaire pour le développement du chloroplaste et la croissance autotrophique de la plante (Mudd *et al.*, 2008). Cette RNase E a été classée parmi les RNase E de type II du fait de la présence d'une insertion dans le domaine catalytique (Schein *et al.*, 2008). Cependant, l'analyse de la structure primaire de la RNase E, montre la présence d'une extension N-terminale absente chez les RNase E de type II. De plus, cette RNase E possède en début de séquence, une séquence « chloroplast TP » (Transit Peptide) qui permet de cibler la RNase E vers le chloroplaste. D'autres RNase E de plantes comme celle du riz et de la tomate auraient également cette séquence TP (Schein *et al.*, 2008). Par conséquent, les RNase E des plantes formeraient un cinquième type de RNase E/G.

Organismes	RNase E/G	Taille (aa)	Type	Références
<i>Streptomyces coelicolor</i>	RNase E	1340	III	(Lee & Cohen, 2003)
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	RNase E	1216	I	(Yang <i>et al.</i> , 2008)
<i>Vibrio angustum</i>	RNase E	1094	I	(Erce <i>et al.</i> , 2009)
<i>Corynebacterim glutamicum</i> NCgl2281	RNase E	1021	III	(Maeda <i>et al.</i> , 2009)
<i>Pseudomonas syringae</i> Lz4W	RNase E	1128 *	I	(Purusharth <i>et al.</i> , 2005)
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	RNase E	869*	II	(Jager <i>et al.</i> , 2001)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	RNase E	953	V	(Mudd <i>et al.</i> , 2008) (Schein <i>et al.</i> , 2008)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	RNase E	953	III	(Kovacs <i>et al.</i> , 2005)
<i>Mycobacterium bovis</i>	RNase E	953	III	et (Zeller <i>et al.</i> , 2007)
<i>Synechocystis sp</i> PCC 6803	RNase E	674	I	(Horie <i>et al.</i> , 2007) (Kaberdin <i>et al.</i> , 1998)
<i>Aquifex aeolicus</i>	RNase G	458	IV	(Kaberdin & Bizebard, 2005)

Tableau 1 : Les RNase E/G caractérisées.

* La séquence des RNase E *P.syringae* LzW4 et *R.capsulatus* n'est pas disponible car le génome de ces deux bactéries n'a pas encore été séquencé. À la place, les tailles des RNase E de *P.syringae* pv *tomato* DC3000 et de *Rhodobacter sphaeroides* sont indiquées. Les séquences de ces deux RNase E ont été également utilisées dans la partie résultats pour les alignements de séquence et recherche de microdomaines.

I.2.2. La PNPase

I.2.2.1. La famille des RNase PH

La polynucléotide phosphorylase ou PNPase est l'un des composants majeurs du dégradosome d'ARN. C'est une protéine de 711 acides aminés codée par le gène *pnp* (Régnier *et al.*, 1987). La PNPase appartient à la grande famille des RNase PH qui regroupe toutes les exoribonucléases qui ressemblent à la RNase PH, enzyme d'*E.coli* essentielle pour la maturation des ARNt (Deutscher *et al.*, 1988). Elle contient le domaine « PH » pour « Phosphorolyse » qui permet la dégradation des ARN par un mécanisme phosphorolytique qui utilise une molécule de phosphate inorganique selon la réaction : $ARN_n + Pi = ARN_{n-1} + NDP$. De même, la PNPase qui est l'une des exoribonucléases 3' majeures d'*E.coli*, dégrade de manière processive l'ARN simple brin selon ce mécanisme. Cependant, en excès de nucléotide diphosphate et en présence d'ions Mg^{2+} , la PNPase peut catalyser la réaction inverse et rajouter des nucléotides aux ARN (Jarrige *et al.*, 2002, Mohanty & Kushner, 2000). C'est ce qui a valu le prix Nobel à Severo Ochoa en 1959, qui venait de découvrir la première enzyme capable de synthétiser l'ARN (Grunberg-Manago *et al.*, 1955).

Il existe chez *E.coli*, une autre grande famille d'exoribonucléases 3' qui se distingue de la famille des RNase PH par un mécanisme hydrolytique de dégradation des ARN. En effet, ces exoribonucléases utilisent une molécule d'eau dans la réaction de dégradation de l'ARN au lieu d'une molécule de phosphate. C'est le cas des RNase II et RNase R dont les homologues sont retrouvés également chez les trois royaumes de la vie et au sein de l'exosome (Arraiano *et al.*, 2010, Worrall & Luisi, 2007). Chez la bactérie *P.syringae*, le dégradosome d'ARN est dépourvu de PNPase et l'activité exoribonucléase observée est médiée par la RNase R (Purusharth *et al.*, 2005). On distingue de ce fait, le dégradosome d'ARN de *P.syringae* d'activité hydrolytique du dégradosome d'ARN d'*E.coli* contenant la PNPase et d'activité phosphorolytique. Récemment, la RNase R a été observée pour la première fois dans les fractions d'immunoprécipitations de cultures d'*E.coli* en phase stationnaire, exprimant la protéine PAP I étiquetée GFP (Carabetta *et al.*, 2010). La signification de cette observation reste inconnue.

I.2.2.2. La PNPase : conservation, séquence et structure

La PNPase est une protéine universellement conservée retrouvée chez les bactéries et les eucaryotes (Leszczyniecka *et al.*, 2002, Piwowarski *et al.*, 2003, Zuo & Deutscher, 2001). Chez ces

derniers, elle serait localisée dans les mitochondries où elle aurait été acquise par endosymbiose. Chez les mammifères, la PNPase est curieusement présente au niveau de l'espace inter membranaire mitochondrial où il n'y aurait pas d'ARN (Piwowarski et al., 2003). En revanche, elle est absente chez la levure, les trypanosomes et chez les archées (Baginsky & Gruissem, 2001, Leszczyniecka et al., 2002, Sarkar & Fisher, 2006).

L'analyse de la structure primaire de la PNPase a révélé la présence de cinq domaines (**figure 10A**) (Symmons *et al.*, 2000). Deux domaines de liaison à l'ARN : le motif S1 présent également chez la RNase E et le motif KH pour K-homology domain (Grishin, 2001). Le troisième domaine est le domaine appelé « all- α -helical domain », région moins conservée, mais présente chez les homologues de la PNPase (Leszczyniecka *et al.*, 2004, Symmons et al., 2000). Les deux domaines restants sont deux « RNase PH-like domain » dont l'un aurait été acquis par duplication au cours de l'évolution (Leszczyniecka et al., 2004, Symmons et al., 2000). Une version de PNPase tronquée appelé « PNPase core » et dépourvue des deux domaines de liaison à l'ARN, a moins d'affinité pour l'ARN mais possède toujours l'activité phosphorolytique (Nurmohamed *et al.*, 2009, Stickney *et al.*, 2005).

Les structures résolues de la « PNPase core » de *Streptomyces antibioticus* et celle d'*E.coli*, ont montré que la PNPase s'organise en anneau de trois protomères où chaque protomère contient deux « RNase PH-like domain » dont un seul est actif (**figure 10B**) (Nurmohamed et al., 2009, Shi *et al.*, 2008, Symmons et al., 2000). Cette organisation est différente de celle de la RNase PH qui sous sa forme active s'organise en anneau de six sous-unités du domaine PH (Ishii *et al.*, 2003). De manière similaire à la RNase PH, l'exosome des archées et eucaryotes, s'organise en anneau de 6 sous-unités qui dérivent du domaine PH (**figure 10B**) (Lykke-Andersen et al., 2009). Chez les archées, les sous-unités sont appelées Rrp41 et 42, chez les eucaryotes, Rrp 41, 42, 45, 46, 43 et Mtr4 (Rrp pour rRNA processing) (Schmid & Jensen, 2008) (**figure 10B**). L'analyse phylogénétique des deux enzymes RNase PH et de la PNPase ont montré que le domaine PH est plus proche du second domaine catalytique de la PNPase, que les deux domaines PH de la PNPase entre eux. Ceci suggère que ces deux enzymes auraient co-évolué à partir d'un ancêtre commun (Leszczyniecka et al., 2004). Cet ancêtre aurait aussi évolué pour donner les enzymes présentes chez l'exosome d'archées (Rrp41 et 42) et celui des eucaryotes (protéines Rrp41, 42, 43, 45, 46 et Mtr3) (Lorentzen *et al.*, 2005, Lykke-Andersen et al., 2009). Il y a ainsi, une ressemblance structurale entre la PNPase/RNase PH et l'exosome d'archées/eucaryotes qui serait expliquée phylogénétiquement. Cependant, ces exosomes n'ont aucune activité phosphorolytique et l'activité hydrolytique reportée de ces complexes est due au recrutement des enzymes hydrolytiques Rrp6 et Rrp44 apparentées à la RNase II (Lykke-Andersen et al., 2009).

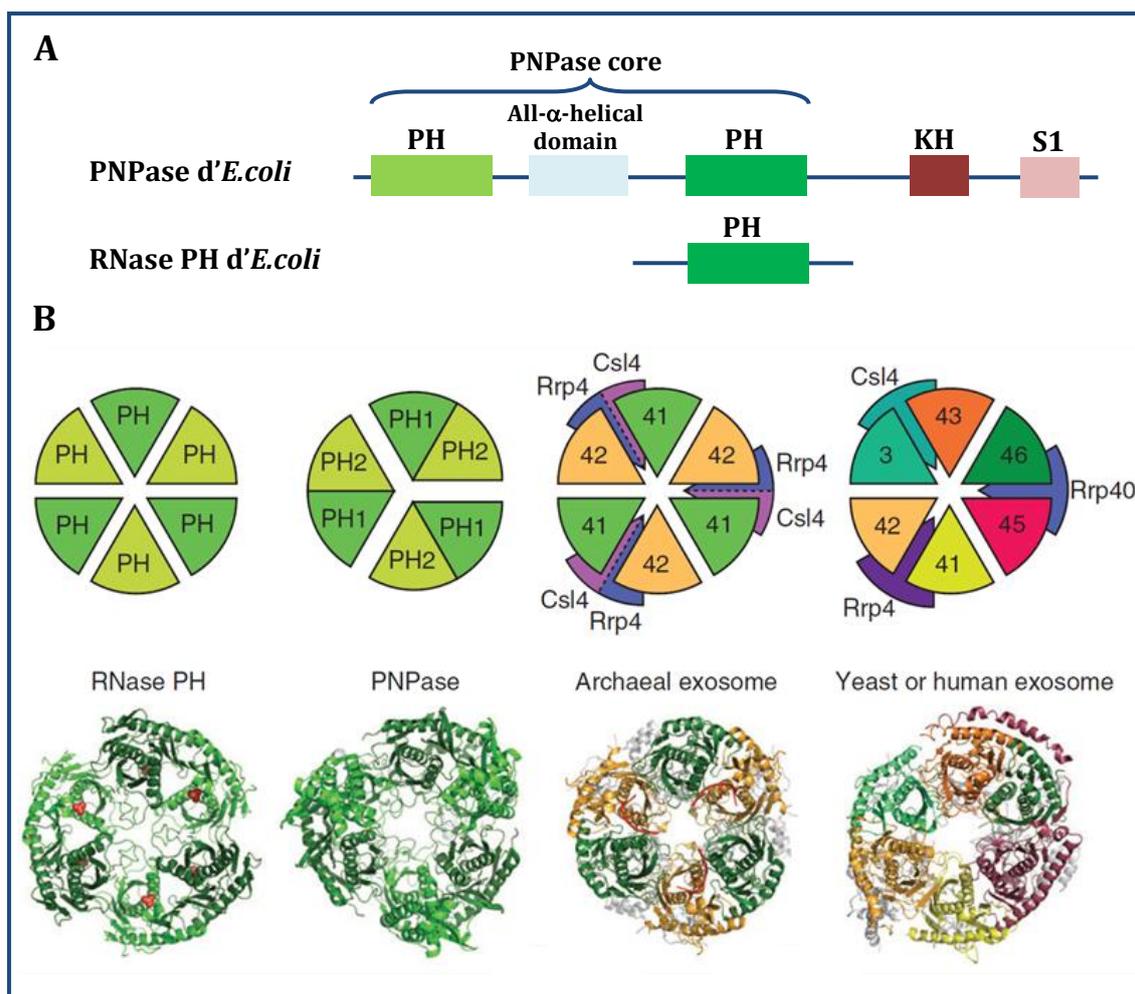


Figure 10 : Structure et organisation de la PNPase, RNase PH et exosomes d'archées et d'eucaryotes.

(A) Structure primaire des protéines PNPase et RNase PH d'*E.coli*. **(B)** Haut : Schéma de l'organisation des différentes sous-unités de la RNase PH, la PNPase et l'exosome des archées et humain ou de levure. En vert clair et foncé les domaines PH présent chez la PNPase et la RNase PH. Les protéines Rrp41 et 42 de l'exosome d'archées, et les protéines Rrp41, 42, 43, 45, 46, et Mtr3 (3) dérivent du domaine PH. Les protéines Rrp4, Csl4 et Rrp40 sont recrutées par l'exosome, appelés « cap » car elles permettent de stabiliser le complexe. Figure adaptée de Symmons et al., 2000. Bas : Structures cristallisées de la RNase PH, la PNPase et de l'exosome d'archées et d'eucaryotes. Figure provenant de Lykke-Andersen et al., 2009.

La structure résolue de la PNPase d'*E.coli* en présence d'ARN a permis de proposer un modèle du mode d'action de la PNPase pour dégrader les ARN. Les données obtenues suggèrent que l'ARN simple brin s'introduit dans le canal formé par l'anneau des trois protomères de PNPase, vers le site catalytique (Nurmohamed et al., 2009, Shi et al., 2008). Dans le canal, des acides aminés conservés sont essentiels pour établir les interactions avec l'ARN (Shi et al., 2008). La liaison de l'ARN au centre du canal induirait un changement de conformation avec l'aide des régions voisines et permettrait d'engouffrer l'ARN vers le site catalytique. Il semblerait que le même processus soit similaire chez les eucaryotes (Bonneau *et al.*, 2009, Nurmohamed et al., 2009).

I.2.2.3. Fonction de la PNPase

La PNPase est une protéine d'*E.coli* qui possède plusieurs fonctions dans le métabolisme de l'ARN. Elle intervient dans la maturation des ARNt (Li & Deutscher, 2002a, Mohanty & Kushner, 2010) et également dans le contrôle qualité des ARN stables comme les ARNr étant donné que des fragments ARNr s'accumulent en absence de PNPase (Cheng & Deutscher, 2003). La PNPase intervient aussi dans la régulation de l'expression des petits ARN non codants qui contrôlent l'expression de protéines membranaires (Andrade & Arraiano, 2008). La PNPase est impliquée dans la pathogénicité de certaines bactéries comme le processus d'invasion des tissus par *Salmonella enterica* (Clements *et al.*, 2002) ou la sécrétion de facteur de virulence par *Yersinia pseudotuberculosis* (Yang *et al.*, 2008). Chez *E.coli*, la PNPase est non essentielle, cependant, elle est nécessaire pour la croissance à basse température (Zangrossi *et al.*, 2000). En fait, la PNPase est une « cold shock protein » c'est-à-dire, une protéine dont l'expression est induite par le froid. La PNPase est nécessaire pour la phase d'adaptation d'*E.coli* après un choc au froid. La quantité de PNPase dans la cellule augmente par une régulation post-transcriptionnelle (Zangrossi *et al.*, 2000).

En ce qui concerne la dégradation des ARNm, la PNPase est l'une des exoribonucléases majeures d'*E.coli*. Chez un mutant *pnp*, la demi-vie des ARNm augmente de deux fois (Bernstein *et al.*, 2004). Les délétions individuelles de la PNPase, RNase R et RNase II sont viables ainsi que le double mutant RNase R et RNase II. Cependant, les doubles délétions PNPase/RNase II et PNPase/RNase R sont létales (Cheng & Deutscher, 2003). Ceci indique que la perte de la PNPase ne peut être complétée par aucune autre exoribonucléase seule alors que la PNPase seule est capable de compléter les fonctions des deux autres. Au sein du dégradosome d'ARN, on retrouve seulement 10 à 20 % de PNPase (Liou *et al.*, 2001). Un rôle caractérisé de la PNPase au sein du dégradosome d'ARN en coopération avec la RNase E et RhlB, est la dégradation des ARNm « difficiles » comme les ARNm polycistroniques, qui possèdent des séquences répétées appelées REP (Repetitive Extragenic Palindrome) présentes dans la région non codante. Ces séquences REP forment des structures secondaires stables qui bloquent l'activité de la PNPase (Coburn *et al.*, 1999, Khemici *et al.*, 2004, Py *et al.*, 1996). C'est le cas de l'ARN polycistronique *malE-malF* où la PNPase seule est capable de le dégrader jusqu'à un intermédiaire de dégradation appelé RSR (REP-Stabilized RNA). Cependant, lorsque cet ARN *malE-malF* est incubé en présence du dégradosome d'ARN et d'ATP, cet ARN et l'intermédiaire RSR sont entièrement dégradés. Le même résultat est obtenu chez un mutant où la RNase E a été inactivée et lorsque de l'ATP- γ S non hydrolysable a été utilisé (Py *et al.*, 1996). De plus, lorsque la fraction du dégradosome d'ARN est incubée en présence d'anticorps anti-RhlB purifiés par affinité, la dégradation des REP est arrêtée au niveau des RSR (Py *et al.*, 1996). De ce fait, l'ensemble de ces résultats montre que la PNPase nécessite l'action de RhlB en présence d'ATP, pour la dégradation des ARNm « difficiles » possédant les séquences REP en interagissant fonctionnellement avec la RNase E et la RhlB.

I.2.3. L'hélicase RhlB

I.2.3.1. La famille des hélicases à boîte DEAD

RhlB est une protéine de 421 acides aminés codée par le gène *rhlb* qui est différent du gène *rhlb* codant pour une enzyme impliquée dans la synthèse des rhamnolipides (composés glycolipidiques) et présentes chez les *Pseudomonas* et les *Burkholderias* (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010). RhlB appartient à la famille des hélicases à ARN/ADN qui déroulent les structures secondaires des acides nucléiques, en séparant les doubles brins et en utilisant l'énergie de liaison et d'hydrolyse de l'ATP (Schmid & Linder, 1992). Ces hélicases à ARN/ADN représentent une vaste famille de protéines retrouvée chez les trois royaumes de la vie et interviennent dans tous les processus biologiques impliquant les ARN/ADN. Elles ont été classées en trois superfamilles et deux familles, selon l'occurrence et les caractéristiques des motifs conservés présents dans la séquence primaire (Gorbalenya & Koonin, 1993). Parmi ces motifs conservés, figurent les motifs Walker A et B retrouvés chez plusieurs NTPases (Walker *et al.*, 1982). La superfamille 1 (SF1) et la SF2, regroupent les hélicases à ADN/ARN qui seraient actives sous forme de monomères ou de dimères. Les SF3, SF4 et SF5 contiennent des hélicases essentiellement hexamériques avec moins de motifs conservés et sont principalement d'origines bactérienne ou virale (Cordin *et al.*, 2006).

Dans la superfamille SF2, se trouvent les familles appelées « à boîte DExD/H », selon les acides aminés strictement conservés (DEAD, DEAH, DExH et DExD) présents dans le motif II. Ce motif II est aussi appelé Walker B, impliqué dans la liaison avec l'ATP et son hydrolyse (Gorbalenya & Koonin, 1993). La famille à boîte DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp), dont fait partie RhlB, est la plus large famille de la SF2. Cette famille d'hélicases à boîte DEAD intervient dans la plupart des processus impliquant l'ARN et contient dans la structure primaire, neuf motifs hautement conservés (Cordin *et al.*, 2006). Ces motifs interviennent tous dans la liaison à l'ATP, à l'ARN et/ou dans les interactions interdomaines des protéines à boîtes DEAD. Ces hélicases d'ARN à boîte DEAD sont non processives et ont une activité ATPase dépendante de l'ARN et une activité hélicase dépendante de l'ATP. Elles ont la capacité de dérouler de courtes structures d'ARN (duplex d'ARN) contre l'hydrolyse de nucléosides triphosphates (Cordin *et al.*, 2006).

I.2.3.2. Les cinq hélicases à boîte DEAD d'*E.coli*

Chez *E.coli*, il existe cinq hélicases à boîte DEAD : RhlB, RhlE, SrmB, CsdA (anciennement Dead) et DbpA. Elles sont toutes non essentielles, contrairement à la levure où la plupart des 26 hélicases à boîte DEAD sont essentielles (Iost & Dreyfus, 2006). Les cinq hélicases à boîte DEAD d'*E.coli* sont dispensables, car l'inactivation de plusieurs d'entre elles à la fois, voir des cinq en même temps n'est pas létal (Iost & Dreyfus, 2006, Jagessar & Jain, 2010). Pour RhlB, RhlE et DbpA, aucun phénotype n'est observé lorsque leurs gènes sont délétés individuellement. Pour CsdA et SrmB, la

délétion de leurs gènes conduit à un défaut de croissance observé uniquement à basse température (Charollais *et al.*, 2004, Charollais *et al.*, 2003). Ces hélicases à boîte DEAD interviennent toutes dans le métabolisme de l'ARN (Chandran *et al.*, 2007, Charollais *et al.*, 2004, Jain, 2008, Peil *et al.*, 2008, Sharpe Elles *et al.*, 2009, Trubetskoy *et al.*, 2009, Worrall *et al.*, 2008b) et sont très proches entre elles de par leur « core » commun d'environ 350 acides aminés, contenant les neuf motifs conservés caractéristiques des hélicases à boîte DEAD (**figure 11**).

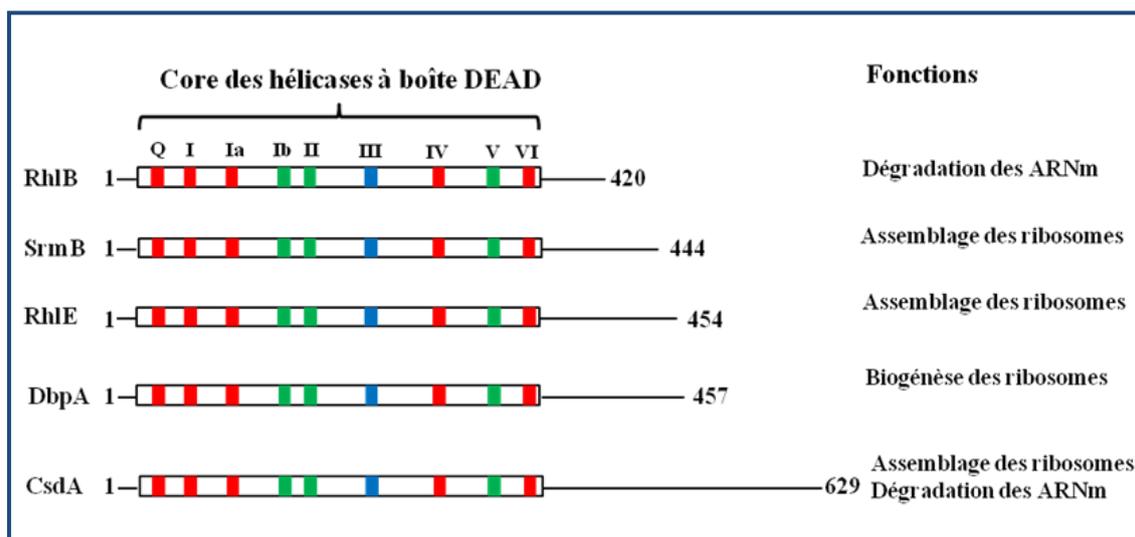


Figure 11 : Les cinq hélicases à boîte DEAD d'*E.coli* et leurs fonctions.

Les cinq hélicases à boîte DEAD possèdent en commun un « core » d'environ 350 acides aminés contenant neuf motifs fortement conservés (de Q à IV). Les motifs en rouge interviendraient dans la liaison de l'ATP et son hydrolyse. Les motifs en vert interviennent dans la liaison à l'ARN et le motif en bleu est impliqué dans l'induction par l'ATP, du changement de conformation. Pour chaque protéine, la ou les fonctions sont indiquées sur le côté droit de la figure. Figure adaptée d'Iost & Dreyfus, 2006.

I.2.3.3. Les hélicases à boîte DEAD chez d'autres bactéries

La seule étude qui s'est intéressée à la répartition des hélicases à boîte DEAD d'*E.coli*, chez d'autres bactéries est celle réalisée par Iost & Dreyfus, 2006. Ils ont utilisé les outils bio-informatiques pour rechercher les orthologues des hélicases à boîte DEAD d'*E.coli* en tenant compte du core commun conservé. Lorsque les séquences des hélicases à boîte DEAD d'*E.coli* sont soumises l'une contre l'autre au programme BLAST, les scores obtenus vont de 182 à 275 bits, du fait de la présence des 9 motifs conservés. Par conséquent, pour identifier les orthologues possibles pour une hélicase à boîte DEAD d'*E.coli* donnée, Iost & Dreyfus, considèrent uniquement les scores des BLAST obtenus supérieurs à 275 bits. Ils retiennent ainsi uniquement les candidats dont l'homologie à une hélicase à boîte DEAD est supérieure à l'homologie entre deux hélicases à boîte DEAD d'*E.coli*. Les résultats de cette analyse montrent que pour les deux protéines RhIB et SrmB, elles seraient essentiellement présentes chez les γ -protéobactéries et très peu chez les δ -protéobactéries (**figure 12**). Chez les γ -

protéobactéries, elles seraient moins conservées chez les *Xanthomonas* et les *Pseudomonas*. Pour CsdA et RhlE, elles auraient une plus grande distribution phylogénétique et seraient présentes en dehors des Protéobactéries, chez les Cyanobactéries, les Actinobactéries, jusqu'aux Firmicutes. RhlE est retrouvée chez les β -protéobactéries, δ -protéobactéries et ϵ -protéobactéries. Quant à DbpA, elle serait présente chez toutes les protéobactéries à l'exception des β -protéobactéries et γ -protéobactéries groupe des *Pasteurellales*. Pour les autres ordres, il est difficile de la détecter. Pour augmenter la détection de DbpA, les auteurs de ces travaux ont effectué la même approche, en utilisant l'extrémité C-terminale de DbpA (119 acides aminés) connue pour lier l'hélice 92 de l'ARN 23S (Diges & Uhlenbeck, 2001). Le résultat montre qu'il est plus efficace de rechercher DbpA par son extension C-terminale que son core conservé (figure 12).

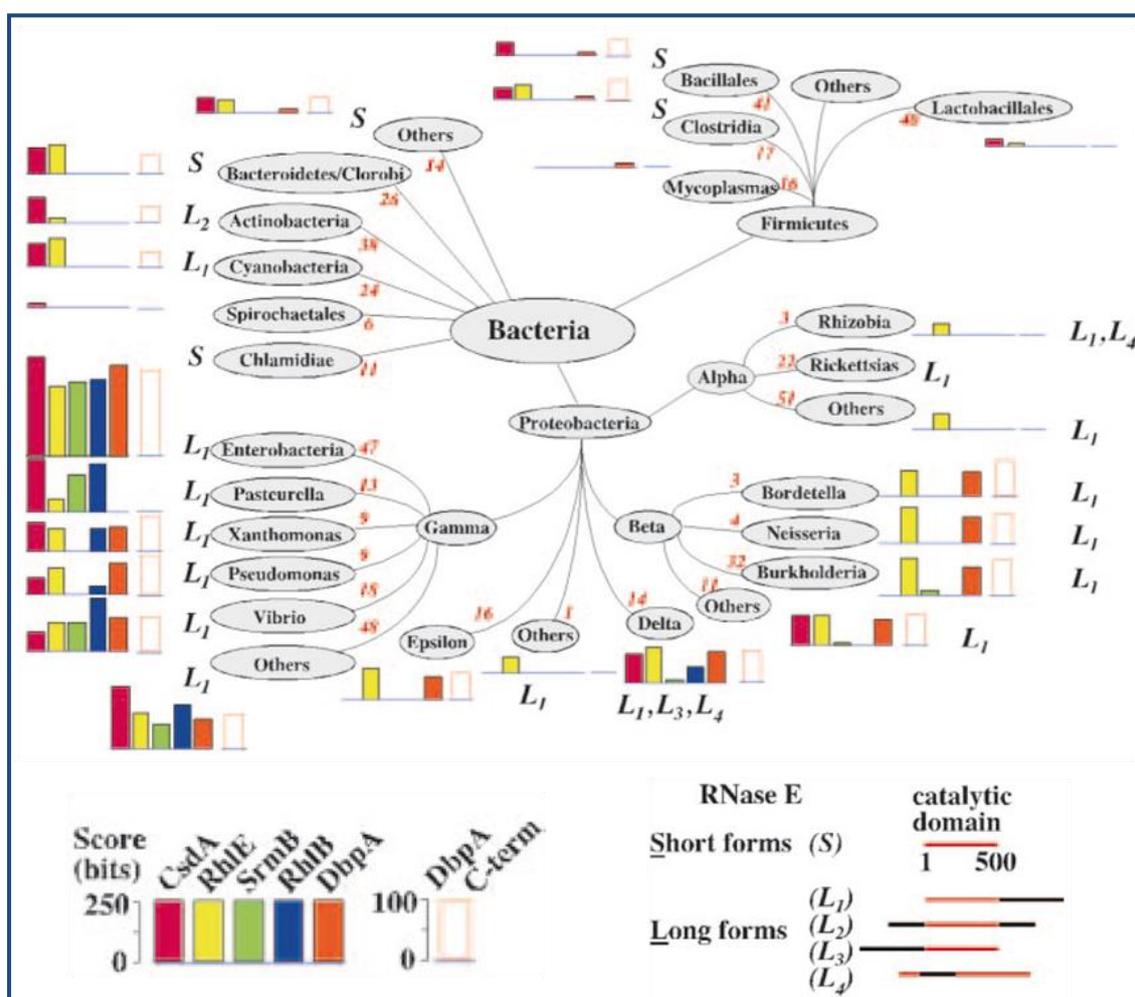


Figure 12 : Répartition des orthologues des hélicases à boîtes DEAD d'*E.coli* chez les bactéries.

La recherche des orthologues des cinq hélicases à boîte DEAD d'*E.coli* chez d'autres bactéries, est effectuée en utilisant le programme BLAST-P et les génomes microbiens annotés (543 au temps de l'analyse). Les chiffres en rouges représentent le nombre de séquences dans la base de données. Un code couleur est utilisé pour chaque hélicase. S, forme courte de RNase E dépourvue de C-terminale. L, la forme longue. L1, L2, L3 et L4, différentes formes longues d'après la position du domaine catalytique de la RNase E. Figure provenant de Iost & Dreyfus, 2006.

En résumé, cette étude a permis de voir une différente répartition des orthologues de chaque hélicase à boîte DEAD chez de nombreuses bactéries et a montré l'absence d'orthologues des hélicases à boîte DEAD d'*E.coli* chez de nombreuses bactéries ainsi que chez les eucaryotes. Ce qui est important pour la cellule dans ce cas, ce sont les interactions spécifiques médiées par ces protéines avec d'autres partenaires comme c'est le cas de RhlB qui interagit avec la RNase E. Même si RhlB est retrouvée essentiellement chez les γ -protéobactéries, la RNase E est plus largement distribuée sous ses différentes formes S, L1, L2, L3 et L4 (**figure 12**). L'interaction RNase E-hélicase à boîte DEAD est conservée chez les *Pseudomonadales* où la RNase E de la bactérie psychrophile *P.syringae* LzW4, interagit avec l'hélicase RhlE (Purusharth et al., 2005). De même pour l' α -protéobactéries *Rhodobacter capsulatus*, où aucun orthologue de RhlB n'a été détecté, la RNase E interagit avec deux hélicases à boîte DEAD non caractérisées (Jager et al., 2001).

1.2.3.4. La protéine RhlB

Activités biochimiques de RhlB

La protéine RhlB possède *in vitro*, deux activités biochimiques : une activité ATPase dépendante de l'ARN et une activité hélicase dépendante de l'ATP (Chandran et al., 2007, Vanzo et al., 1998). L'activité ATPase de RhlB fut observée pour la première fois lors de la caractérisation du dégradosome d'ARN (Py et al., 1996) où il a été montré que cette activité ATPase est inhibée lors de l'utilisation d'anticorps anti-RhlB purifiés par affinité. Cependant, celle-ci ne possède aucune activité ATPase lorsqu'elle est hautement purifiée, excepté lorsqu'elle est mise en présence de la RNase E (Vanzo et al., 1998). De ce fait, l'activité ATPase de RhlB est dépendante de la RNase E, faisant de RhlB la seule hélicase à boîte DEAD d'*E.coli* à avoir besoin d'un partenaire protéique pour stimuler son activité ATPase (Chandran et al., 2007, Vanzo et al., 1998). Plus exactement, un peptide de la RNase E appelée RneHC2 allant de 628 à 843 acides aminés, est capable de stimuler l'activité ATPase de RhlB (Vanzo et al., 1998). Deux autres peptides RNase E (694-790) et RNase E (696-762) sont également capables de stimuler l'activité ATPase de RhlB (Khemici et al., 2004, Worrall et al., 2008b). Cependant, le mécanisme de stimulation de l'activité ATPase médié par la RNase E reste à ce jour inconnu.

En ce qui concerne l'activité hélicase de RhlB, celle-ci est capable *in vitro* de dérouler de courts duplex d'ARN avec une préférence pour les duplex ayant une extension simple brin en 5' (Chandran et al., 2007). Le déroulement de ces duplex se fait de manière dépendante de l'ATP et du peptide RNase E (628-846). Un autre peptide, RNase E (694-790) (appelé aussi RneHBS pour Helicase Binding Site) est également capable de stimuler l'activité hélicase de RhlB plus fortement que le peptide RneHC2 (Khemici et al., 2004). Toutefois, l'efficacité de déroulement du duplex d'ARN est moins importante (Chandran et al., 2007). La différence entre les peptides RNase E (628-843) et RNase E (694-790) est que ce dernier est dépourvu des deux régions de fixation de l'ARN présents

dans la région C-terminale de la RNase E : l'AR-RBD et l'AR2 (Chandran et al., 2007). Il semblerait ainsi que ces deux régions d'interaction à l'ARN soient importantes pour augmenter l'activité hélicase de RhlB. D'après l'ensemble des résultats cités ci-dessus, Chandran et al, ont proposé un modèle d'action de RhlB où il y a un déroulement séquentiel de l'ARN. RhlB coopère avec les deux régions de fixation de l'ARN présentes chez la RNase E pour dégrader les ARN structurés (**figure 13**).

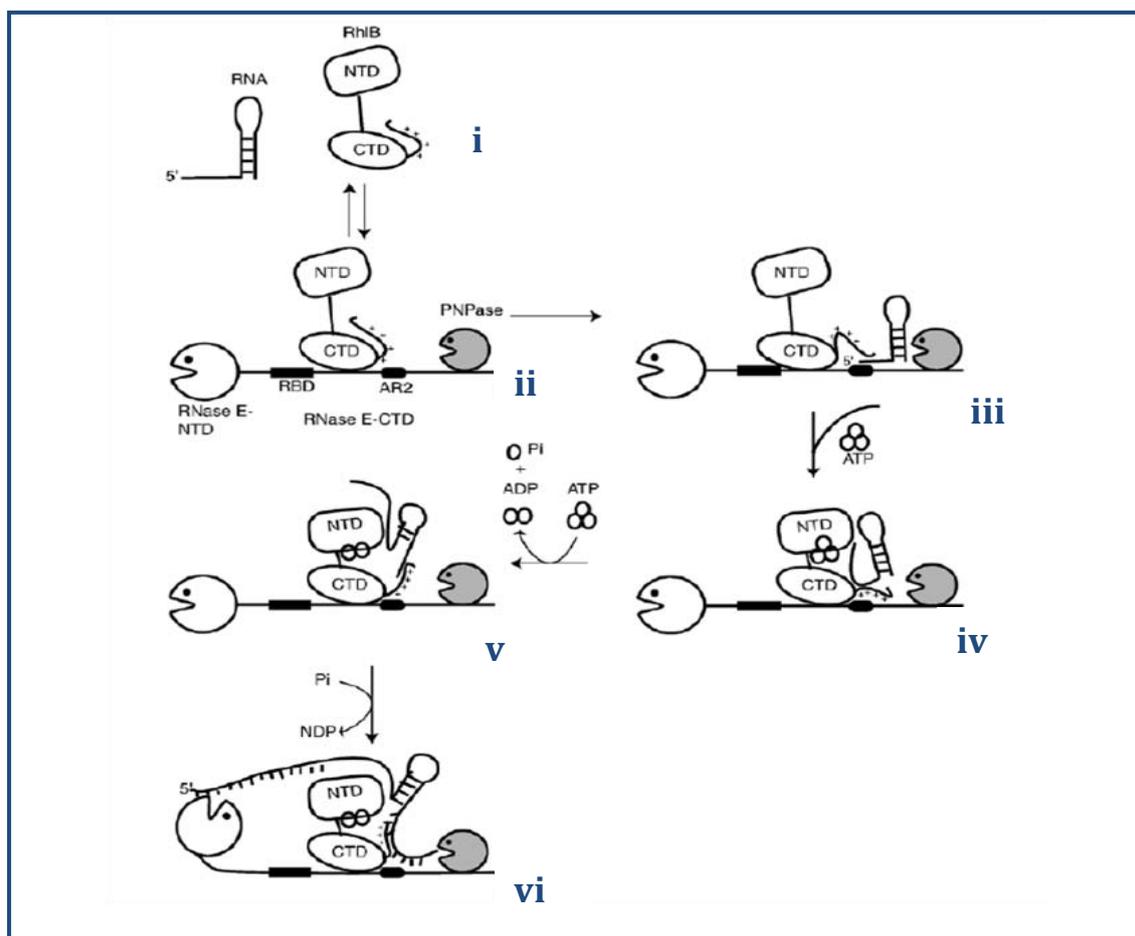


Figure 13 : Modèle de coopération entre RhlB, la RNase E et la PNPase.

(i) Le domaine C-terminal de RhlB interagit avec la RNase E entre les deux sites de fixation de l'ARN (AR-RBD et l'AR2). **(ii)** La PNPase est déjà engagée au sein de dégradosome. L'ARN (ici en tige-boucle) peut se lier à la RNase E dans cette étape ou à l'étape **(iii)** après la fixation de RhlB. **(iv)** Fixation de l'ATP sur RhlB pourrait induire l'exposition de la surface du domaine C-terminal afin d'interagir avec l'ARN et le stabiliser. **(v)** Hydrolyse de l'ATP et déroulement de l'ARN. **(vi)** L'ARN déroulé est ensuite dégradé par la PNPase ou clivé internement par la RNase E. Figure provenant de Chandran et al., 2007.

Structure de RhlB

La structure de RhlB n'a pas encore été résolue, mais un modèle de structure du complexe formé par RhlB, l'ARN et l'ATP a été généré en se basant sur la structure résolue de l'hélicase à boîte DEAD Vasa de la *Drosophila* (Chandran et al., 2007, **figure 14A**). Comme la protéine Vasa, RhlB est constituée de deux domaines N-terminal et C-terminal « RecA-like » qui ressemblent à celui de la

protéine RecA impliquée dans les processus de réparation de l'ADN. Chaque domaine RecA-like est constitué de cinq feuillets β entourés de cinq hélices α . L'ATP se fixe dans la poche formée par les deux domaines RecA-like. Quant à l'ARN, le site se trouve à l'interface de ces deux domaines (Chandran et al., 2007, **figure 14A**).

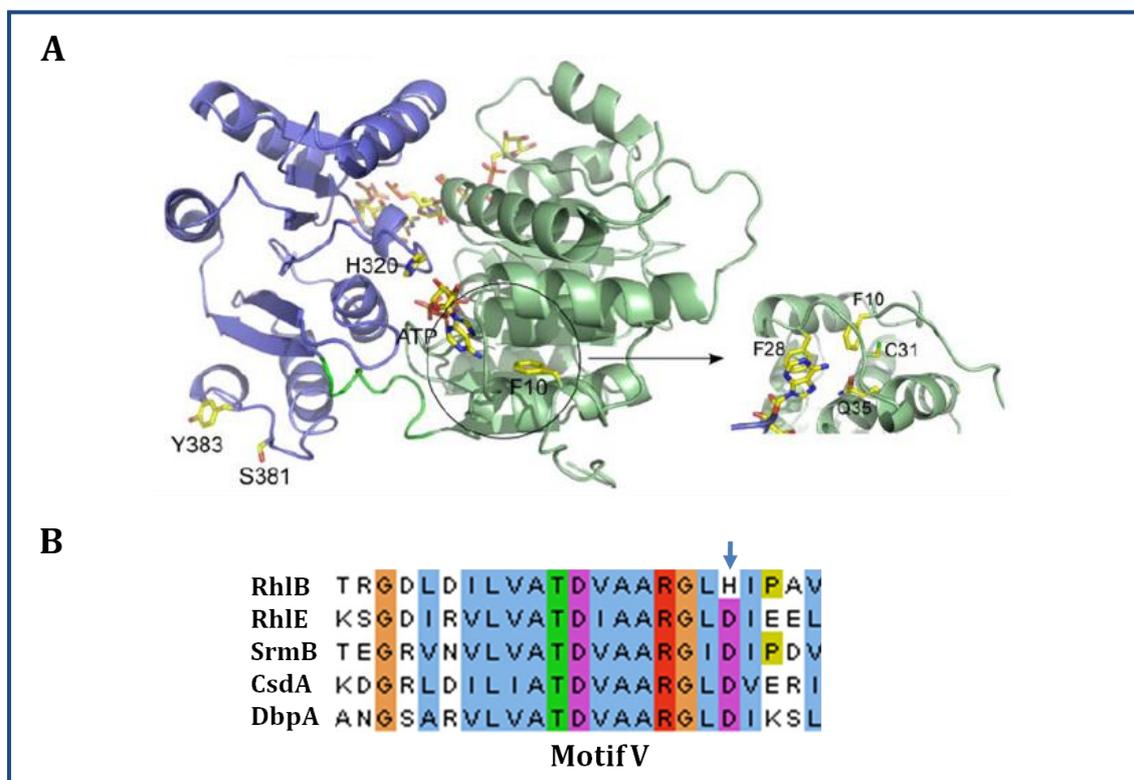


Figure 14 : Modèle de la structure de RhlB d'*E.coli* en présence d'ARN et d'ATP.

(A) La protéine RhlB contient deux domaines : N-terminal (en vert) et C-terminal (en bleu). L'ARN est représenté en vert à l'interface inférieure des deux domaines. Figure provenant de (Worrall et al., 2008b). **(B)** Morceau d'alignement de séquences obtenu par ClustalW, des cinq hélices à boîte DEAD d'*E.coli* au niveau du motif V. La flèche indique l'histidine 320 (H) de RhlB qui est remplacée par un acide aspartique (D) chez les quatre autres hélices.

Une différence très intéressante entre les protéines RhlB et Vasa est la présence d'un résidu histidine (H320) à la fin du motif V de la protéine RhlB, qui est remplacé par un acide aspartique (D554) chez la protéine Vasa et également chez les quatre hélices à boîte DEAD d'*E.coli* (Chandran et al., 2007) (**figure 14B**). De plus, cette histidine est conservée chez les homologues de RhlB des bactéries proches d'*E.coli* (Chandran et al., 2007). Nous verrons dans la partie résultats, que cette histidine est conservée chez tous les orthologues putatifs de RhlB. Chez la protéine Vasa, le motif V semble être le seul motif qui interagit à la fois avec la région de liaison à l'ARN (liaison interdomaines) et l'ATP, par le groupe carboxyle de l'acide aminé D554, qui interagit par des liaisons hydrogènes avec le groupe 3'OH du ribose de l'ATP (Sengoku *et al.*, 2006). La substitution D554A réduit de 50 % l'activité ATPase de la protéine Vasa montrant l'importance de l'interaction entre ce

résidu et l'ATP (Sengoku et al., 2006). Selon le modèle généré de RhlB, le motif V qui contient l'histidine est à l'interface des domaines N-terminal et C-terminal, pointe vers la région de fixation de l'ARN et est en contact avec l'ATP (Worrall et al., 2008b). La chaîne de l'histidine est orientée de manière à favoriser l'interaction polaire entre l'imidazole de l'histidine et le ribose. Des variants ont été construits où les acides aminés His ou Asp ont été échangés de RhlB (H320D), de RhlE (D310H) et de SrmB (D313H) d'*E.coli* (Worrall et al., 2008b). Pour RhlE et SrmB, les substitutions D310H et D313H sont neutres tandis que pour le variant RhlB (H320D), aucune activité ATPase n'a été détectée, même en présence du peptide RNase E (696-762) (Worrall et al., 2008b). Ceci montre que la présence d'une histidine ou acide aspartique dans le motif V chez RhlE et SrmB, n'a aucun effet sur l'activité ATPase, tandis que pour RhlB, la présence de l'histidine est cruciale pour l'activité ATPase. Étant donné que la stimulation de l'activité ATPase nécessite la présence de la RNase E, l'histidine pourrait être responsable de l'activation de l'hélicase par le peptide RNase E (694-768).

Rôle de RhlB

Depuis l'identification de RhlB au sein du dégradosome d'ARN, plusieurs études ont été menées pour comprendre son rôle au sein de ce complexe. RhlB interviendrait dans deux voies de dégradation des ARNm en interagissant fonctionnellement avec la RNase E et la PNPase. Une voie relativement récente, qui implique la RNase E et une voie bien étudiée qui implique la PNPase. Pour la première voie, ce sont les travaux de Khemici et al, 2005, qui ont montré que RhlB est importante pour la dégradation des ARNm dépourvus de ribosomes. En effet, la délétion du gène codant pour RhlB conduit à l'augmentation significative de la stabilité de ces messagers (Khemici *et al.*, 2005). En fait, RhlB faciliterait l'inactivation par la RNase E de ces messagers de manière indépendante de la PNPase. Dans la seconde voie, RhlB est impliquée dans la dégradation des ARNm possédant des séquences REP mentionnées précédemment, en coopération fonctionnelle avec la RNase E et la PNPase.

RhlB est capable de manière indépendante de la RNase E, d'interagir *in vitro* et *in vivo* avec la PNPase (Liou *et al.*, 2002). Plus exactement, RhlB interagirait avec la PNPase par son domaine C-terminal, et permettrait à la PNPase de dégrader des ARN possédant des structures secondaires (Liou et al., 2002). Il y aurait ainsi dans la cellule une voie de dégradation impliquant des complexes dynamiques formés par RhlB et la PNPase en plus du dégradosome d'ARN, afin de dégrader des ARN structurés. Cependant, cette interaction RhlB-PNPase est faible et d'autres travaux sont nécessaires pour pouvoir comprendre si cette interaction est significative.

Des analyses du dégradosome d'ARN par les puces à ADN (Microarray) ont montré que RhlB est nécessaire pour avoir une dégradation normale des ARNm (Bernstein *et al.*, 2004). De plus, RhlB est la seule protéine du dégradosome d'ARN qui affecte les transcrits codant pour des protéines impliquées dans le stockage du fer et régulées par le répresseur Fur (Bernstein et al., 2004). RhlB pourrait intervenir dans la dégradation du messenger *fur* ou dans la régulation posttranscriptionnelle des gènes ciblés par le répresseur Fur et par le petit ARN non codant RhyB (Bernstein et al., 2004).

I.2.4. L'énolase

I.2.4.1. Famille et structure

L'énolase d'*E.coli* est une protéine universellement conservée de 432 acides aminés codée par le gène *eno*. Elle intervient dans l'avant-dernière étape de la glycolyse en catalysant de manière réversible, la transformation du 2-phospho-D-glycérate en phosphoénol pyruvate (**figure 15A**). L'énolase est une protéine abondante dans la cellule qui appartient à la superfamille du même nom, où l'on trouve des enzymes qui interviennent dans la catalyse d'intermédiaires de réactions similaires (Gulick *et al.*, 2000).

La structure de l'énolase d'*E.coli* a été résolue et montre qu'elle s'organise en homodimère (**figure 15B**) (Kuhnel & Luisi, 2001). Chaque protomère est constitué de deux domaines : un petit domaine N-terminal et un grand domaine C-terminal. Le site catalytique se trouve dans le domaine C-terminal et l'activité de l'enzyme est dépendante de la présence de deux ions Mg^{2+} . Dans le domaine N-terminal, est présent un motif structural similaire à celui de la PNPase de *Streptomyces antibioticus* impliqué dans la liaison à l'ARN. Il n'est pas clair si ce motif chez l'énolase, possède le même rôle chez la PNPase, d'autant que l'énolase d'*E.coli*, comme celle de la levure, lie très faiblement l'ARN (Kuhnel & Luisi, 2001). Ceci pourrait avoir un lien avec le rôle et la présence de l'énolase au sein du dégradosome.

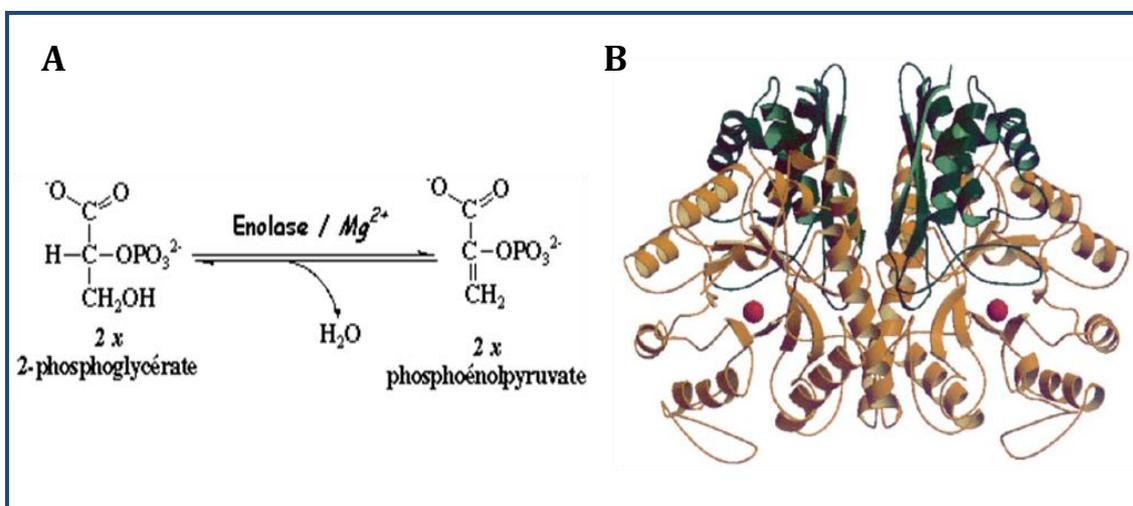


Figure 15 : Rôle et structure résolue de l'énolase d'*E.coli*.

(A) Réaction réversible de transformation du 2-phospho-D-glycérate en phosphoénol pyruvate par l'énolase, en présence de Mg^{2+} . **(B)** L'énolase s'organise en dimère. En vert le domaine N-terminal et en jaune orangé, le domaine C-terminal. Les deux boules rouges représentent les ions Mg^{2+} . Figure provenant de Kuhnel & Luisi, 2001.

I.2.4.2. Fonction de l'énolase au sein du dégradosome d'ARN

L'énolase est l'une des protéines majeures du dégradosome d'ARN d'*E.coli* de par son interaction avec la RNase E. Toutefois, son rôle au sein de ce complexe reste inconnu jusqu'à ce jour. D'ailleurs, seulement 5 à 10% d'énolase de la cellule est retrouvée dans le dégradosome d'ARN (Py et al., 1996). Aussi, il a été montré que le dégradosome d'ARN minimal, mais fonctionnel capable de dégrader l'ARN est dépourvu d'énolase (Coburn et al., 1999). Ainsi, l'énolase semble être dispensable du dégradosome d'ARN. Plusieurs hypothèses quant à sa fonction ont été proposées. L'énolase pourrait régénérer l'ATP et le fournir directement à l'hélicase RhlB dont la fonction en dépend, ou encore relier les voies du métabolisme énergétique à la voie de dégradation des ARNm. Cette dernière hypothèse est renforcée par le fait qu'il a été montré par des expériences de puces à ADN, comparant une souche sauvage d'*E.coli* à une souche délétée du gène *eno*, que l'énolase affecterait la dégradation de certains transcrits spécifiques qui codent pour des régulateurs impliqués dans l'assimilation et l'utilisation des différentes sources de carbone (Bernstein et al., 2004). De plus, l'énolase est essentielle pour avoir une dégradation normale des ARNm d'*E.coli* (Bernstein et al., 2004). Un premier rôle physiologique de l'énolase a été découvert où elle est nécessaire pour la dégradation rapide du messenger *ptsG* qui code pour le transporteur majeur du glucose, lors de l'accumulation du glucose 6-phosphate (Morita *et al.*, 2004, Morita et al., 2005). Cette dégradation rapide du *ptsG* permet d'arrêter le transport du glucose dans la cellule. Ainsi, en plus de sa fonction principale dans la glycolyse, l'énolase de par sa présence au sein du dégradosome d'ARN et son intervention dans la dégradation rapide du messenger *ptsG*, serait une protéine « moonlighting » : une protéine qui a au moins une fonction indépendante de sa fonction principale (Jeffery, 1999, Shahbadian et al., 2009). De plus, il a été reporté récemment que l'énolase ferait partie du potentiel dégradosome d'ARN de *B.subtilisi* (Commichau et al., 2009, Lehnik-Habrink *et al.*, 2010).

I.3. Fonction du dégradosome d'ARN

Le dégradosome d'ARN est assemblé sur une région non essentielle de la RNase E ce qui suggère que le dégradosome serait non essentiel à la cellule. Cependant, plusieurs expériences ont montré l'importance de la région C-terminale pour la fitness de la cellule (Briegel *et al.*, 2006, Kido et al., 1996, Leroy et al., 2002) et plusieurs rôles du dégradosome d'ARN ont été reportés.

I.3.1. Dégradation des ARNm

I.3.1.1. Dégradation globale des ARNm d'*E.coli*

Plusieurs études ont été effectuées chez *E.coli* pour mettre en évidence le rôle du dégradosome d'ARN dans la dégradation des ARNm. Un mutant caractérisé de la RNase E appelé *rne131*, dépourvu des derniers 477 acides aminés de la RNase E, stabilise la dégradation chimique et fonctionnelle des ARNm (Lopez *et al.*, 1999). De plus, ce mutant est incapable de dégrader individuellement, des ARNm connus pour être dégradés par la RNase E, comme le messenger *thrS* qui code pour la thréonyl tRNA synthétase. Cependant, cet effet pourrait être dû à la perte de la région RBD présent dans la région C-terminale, ou bien à l'absence du dégradosome d'ARN. Par ailleurs, Ow *et al.*, 2000 ont montré que l'absence du RBD et de la région d'assemblage du dégradosome d'ARN a un effet dramatique de ralentissement de dégradation des ARNm. Une autre étude plus globale qui a utilisé les puces à ADN, a montré que le dégradosome d'ARN est nécessaire pour avoir un profil normal de dégradation des transcrits (Bernstein *et al.*, 2004).

I.3.1.2. Dégradation des ARNm dépourvus de ribosomes

Un autre rôle attribué au dégradosome d'ARN est la dégradation de transcrits dépourvus de ribosomes qui s'accumulent dans la cellule. Ces transcrits sont produits par le promoteur et l'ARN polymérase du bactériophage T7 et celle-ci est huit fois plus rapide que celle d'*E.coli*. Par conséquent, un découplage entre la transcription et la traduction entraîne l'accumulation des messagers T7-*lacZ* dépourvus de ribosomes qui sont particulièrement sensibles à la dégradation par la RNase E (Iost & Dreyfus, 1995). Ce système « T7-*lacZ* » représente un modèle *in vivo* d'étude de la dégradation de ces transcrits et permet de voir par exemple le phénotype de variants de RNase E présentant des délétions dans la région C-terminale non essentielle. La région RBD ainsi que les sites de fixation de RhlB et de l'énolase, sont nécessaires pour avoir une dégradation efficace de ces ARN dépourvus de ribosomes (Leroy *et al.*, 2002). La protéine RhlB est également importante, car la délétion du gène *rhlb* conduit à l'augmentation significative de la stabilité de ces messagers (Khemici *et al.*, 2005). De manière inexplicable à ce jour, la délétion de la région acide juste en amont du site de fixation de la PNPase, rendrait la RNase E tronquée plus active dans la dégradation de ces ARN (Leroy *et al.*, 2002).

I.3.1.3. Dégradation de substrats « difficiles »

Suite à la découverte du dégradosome d'ARN, les premières études biochimiques sur son activité *in vitro* se sont tournées vers la dégradation de substrats « difficiles » (Py *et al.*, 1996). C'est le cas de l'ARNm polycistronique *malE-malF* dégradé en présence d'ATP (Py *et al.*, 1996). D'autres études biochimiques ont montré qu'il est possible de reconstituer *in vitro*, un « minidégradosome d'ARN fonctionnel » capable de dégrader les ARN structurés (Coburn *et al.*, 1999). Ce dégradosome d'ARN minimal est composé seulement de la RNase E, de RhlB et de la PNPase hautement purifiées. La coopération et la coordination entre ces trois protéines permettent de dégrader efficacement

l'ARNm polycistronique *malE-malF* en présence d'ATP, sans éolase ou les protéines minoritaires. Cette dégradation de cet ARN peut aussi s'effectuer de manière indépendante de l'activité de la RNase E.

La première évidence *in vivo* de l'activité du dégradosome d'ARN, a été montrée par les travaux de Khemici & Carpousis, 2004. La dégradation des séquences REP nécessite deux voies parallèles de dégradation impliquant chacune RhlB ou la poly(A) polymérase I (PAP I). Les ARNm du double mutant pour ces deux protéines sont stabilisés tandis que dans un mutant délété pour une seule des deux protéines, la dégradation est faiblement ralentie (Khemici & Carpousis, 2004). Dans la voie de dégradation qui implique RhlB, l'assemblage du dégradosome d'ARN *in vivo* est nécessaire pour avoir une dégradation normale des REP présents chez certains messagers (Khemici & Carpousis, 2004).

I.3.2. Dégradation des ARN stables

En ce qui concerne les ARNr et les ARNt, des fractions du dégradosome d'ARN obtenues par purification d'une RNase E étiquetée FLAG, contenait de l'ARNr mais pas d'ARNt (Bessarab *et al.*, 1998). Ceci confirme les travaux obtenus précédemment où des ARN ont été trouvés dans les fractions du dégradosome d'ARN (Miczak *et al.*, 1996). Cependant, les travaux de Lopez *et al.*, 1999, ont montré que le mutant *rne131* ($\Delta 477$ derniers acides aminés de la RNase E), n'a pas d'effet sur la maturation de l'ARN 5S, ce qui suggère que le dégradosome d'ARN n'est pas nécessaire à sa maturation. La même observation a été faite par les travaux de l'équipe de Dr Kushner (Ow *et al.*, 2000). Ainsi, aucun rôle du dégradosome d'ARN n'a été identifié dans la maturation et dégradation des ARN stables.

II. Interactions médiées par la RNase E au sein du dégradosome d'ARN

II.1. La région C-terminale de la RNase E

Les interactions médiées par la RNase E au sein du dégradosome d'ARN impliquent la région C-terminale de la RNase E qui s'étend de 530 à 1061 acides aminés. Même si cette région est non essentielle et dépourvue d'activité catalytique (Kido *et al.*, 1996, McDowall & Cohen, 1996), sa délétion montre un profil anormal de dégradation des ARN (Bernstein *et al.*, 2004). De plus, cette région C-terminale est importante pour la fitness de la cellule (Briegel *et al.*, 2006, Kido *et al.*, 1996, Leroy *et al.*, 2002). La région C-terminale a été extensivement étudiée par des expériences bio-informatiques, biochimiques et biophysiques pour comprendre la structure des interactions au sein du dégradosome d'ARN.

L'analyse de la séquence de la RNase E a montré que la région C-terminale est caractérisée comme étant une région de faible complexité de séquence, qui est une propriété des protéines très peu structurées (Callaghan *et al.*, 2004). Généralement, environ 35 à 51% des protéines eucaryotes et 6 à 33% des protéines bactériennes, possèderaient une région de plus de 40 résidus intrinsèquement non structurée (Galea *et al.*, 2008). Ces protéines non ou très peu structurées, possèdent une « souplesse » et une « flexibilité » qui leur permet de s'adapter à différentes interactions (Wright & Dyson, 1999). Chez la RNase E d'*E.coli*, la moitié C-terminale est de nature « intrinsèquement peu structurée » en conditions natives (Callaghan *et al.*, 2004). Ceci permettrait à la RNase E d'acquérir des avantages fonctionnels, d'adopter de multiples conformations et de lier plusieurs protéines. Une autre caractéristique de la région C-terminale de la RNase E est qu'elle possède des régions riches en acides aminés arginine (R), proline (P), glycine (G) et acide glutamique (E) (**figure 16A**) qui sont des acides aminés caractéristiques des protéines non structurées (Callaghan *et al.*, 2004, Leroy *et al.*, 2002).

Le programme PONDR® (Predictors of Natural Disordered Regions) a été utilisé pour analyser la séquence protéique entière de la RNase E. Ce programme, qui se base sur les propriétés physico-chimiques des acides aminés, a prédit que la région N-terminale de la RNase E est structurée tandis que la région C-terminale n'est majoritairement pas structurée (Callaghan *et al.*, 2004). Ceci est en

accord avec les expériences biochimiques caractérisant ces deux régions. Toutefois, il existe dans la région C-terminale de la RNase E, trois segments prédits pour être des régions à forte propension à se structurer ou RISP (Regions of Increased Structural Propensity). Ces segments ont été appelés **A**, **C** et **D** et correspondent aux acides aminés allant de 565 à 585, 839 à 850 et 1021 à 1061 respectivement (**figure 16B**). Le segment A correspond au motif MTS qui permet à la RNase E de lier la membrane (Khemici et al., 2008). Le segment C allant de 839 à 850 acides aminés interagit avec l'énolase tandis que le segment D interagit avec la PNPase (Callaghan et al., 2004). Un autre segment appelé **B**, a été prédit comme contenant une structure en coiled-coil, par un autre programme appelé COILS, pour les acides aminés allant de 633 à 662 et 685 à 712 (**figure 16C**) (Callaghan et al., 2004). La structure en coiled-coil (ou faisceau d'hélices) est un motif structural tertiaire où deux hélices α s'enroulent l'une autour de l'autre. Il est retrouvé chez de nombreuses protéines capables d'oligomériser ou par exemple chez les protéines impliquées dans la régulation des gènes (comme les facteurs de transcription) (Robson Marsden & Kros, 2010). Le rôle de cette structure en coiled-coil chez la RNase E d'*E.coli* reste inconnu.

L'alignement de séquences de la région C-terminale des homologues de la RNase E d'*E.coli*, chez les *Entérobactériales* et bactéries proches d'*E.coli*, a révélé la présence de courtes régions de 15 à 40 acides aminés conservées dans la région C-terminale de la RNase E (travaux de thèse de V. Chandran). Certaines de ces régions correspondent aux segments A, B, C et D prédites par PONDR® et COILS tandis que d'autres, correspondent à l'AR2 et le site de fixation de RhlB. Par conséquent, la moitié C-terminale de la RNase E qui organise le dégradosome d'ARN, est intrinsèquement peu structurée à l'exception de petits îlots de 15 à 40 acides aminés appelés « microdomaines » (Marcaida et al., 2006). Ces microdomaines sont responsables des interactions avec la membrane, avec l'ARN et des interactions protéines-protéines pour l'assemblage du dégradosome d'ARN. La conservation de ces microdomaines chez les *Entérobactériales* et bactéries proches d'*E.coli*, suggère la formation, chez ces bactéries, de dégradosomes d'ARN similaires à celui d'*E.coli*. Cette conservation souligne l'importance de ces microdomaines, car ils se trouvent dans la région C-terminale extrêmement variable et qui évolue rapidement en comparaison avec la région catalytique fortement conservée.

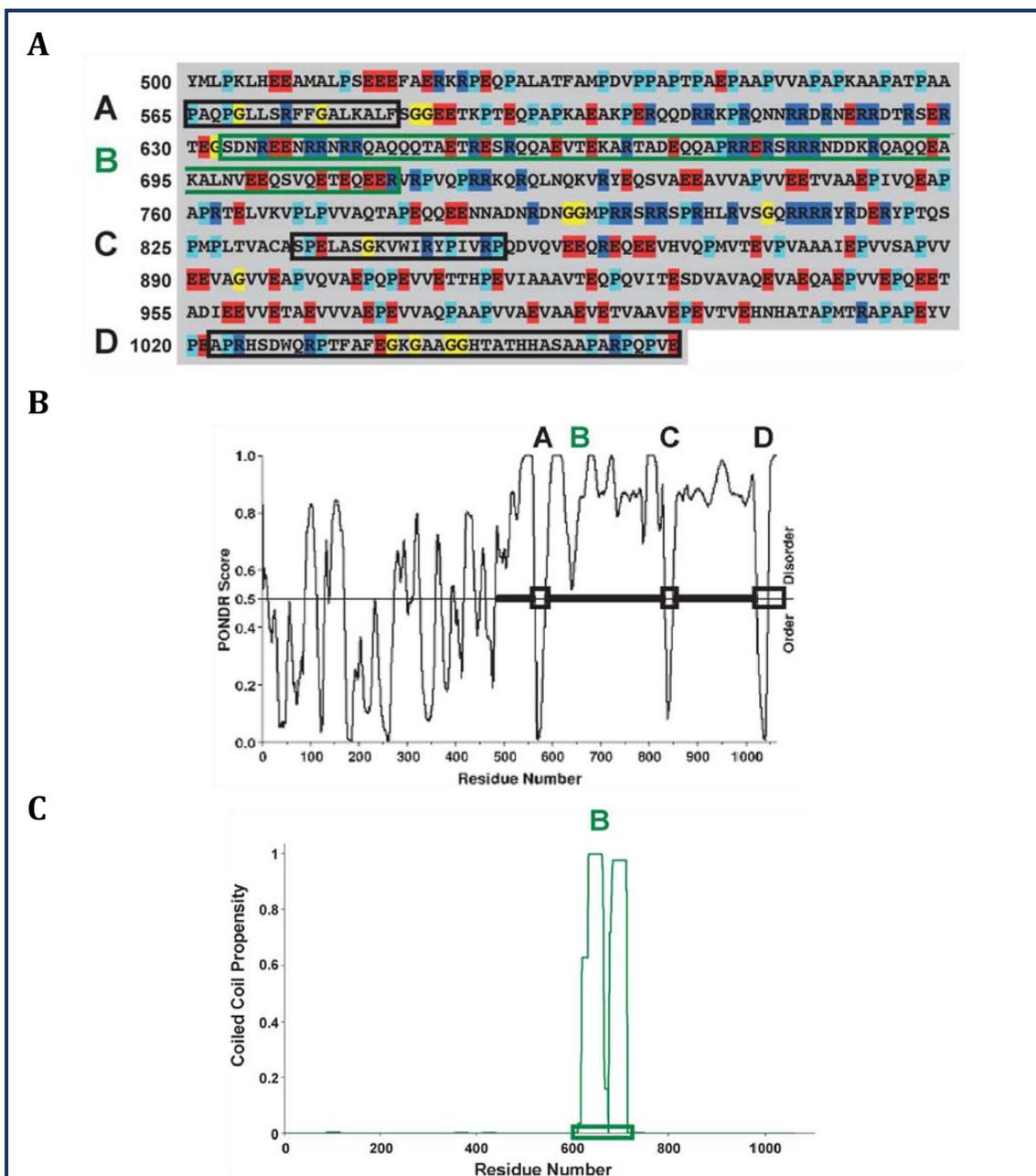


Figure 16 : Analyse de la région C-terminale de la RNase E d'*E.coli*.

(A) Séquence primaire de la région C-terminale de la RNase E (acides aminés allant de 500 à 1061). Arginine (R) en bleu foncé, proline (P) en bleu clair, glycine (G) en jaune et acide glutamique (E) en rouge. Les acides aminés entourés correspondent aux segments A, B, C et D. **(B)** Prédiction de RISP chez la RNase E en utilisant le programme PONDNR®. Les régions non structurées ont un score au dessus de 0.5 où se trouve la ligne horizontale en trait noir épais. A, B et C sont des RISP. B est la région prédite comme étant un coiled-coil **(C)** Prédiction de structure en coiled-coil chez la RNase E d'*E.coli* en utilisant le programme COILS. Figures proviennent de Callaghan et al., 2004.

II.2. Interactions médiées par les microdomaines

II.2.1. Interaction RNase E-membrane

La RNase E est une protéine membranaire

Le microdomaine MTS (ou motif A) allant de 568 à 582 acides aminés, est l'un des microdomaines identifiés récemment comme ayant une forte propension à se structurer (Callaghan et al., 2004). De manière générale, les MTS sont présentes chez de nombreuses protéines ciblées à la membrane comme la protéine MinD (Szeto *et al.*, 2003). En ce qui concerne la RNase E d'*E.coli*, il a été montré par notre équipe que ce segment de 15 acides aminés forme une hélice α amphipatique qui interagit *in vitro* directement avec les lipides (**figure 17A et B**) (Khemici *et al.*, 2008). Cette hélice α possède une région hydrophobe qui permet à la RNase E de s'insérer directement dans la bicouche lipidique de la membrane cytoplasmique. De ce fait, la RNase E est la seule ribonucléase membranaire connue à ce jour chez *E.coli* (L. Poljack et V. Khemici, communication personnelle).

Les recherches *in silico* du motif A chez les RNase E d'autres bactéries par alignements de séquences, a montré que le motif A, est conservé chez les γ -protéobactéries et les β -protéobactéries où l'hélice α amphipatique est plus courte que le motif A et a été nommé motif A' (**figure 17C**) (Khemici et al., 2008). Chez d'autres bactéries comme notamment les α -protéobactéries, aucune hélice n'a été détectée (Khemici et al., 2008). Ceci est en accord avec les travaux publiés récemment où il a été montré que la RNase E de l' α -protéobactérie *Caulobacter crescentus* serait localisée de manière intéressante au niveau de l'ADN (Montero Llopis *et al.*, 2010). Il semblerait ainsi que la localisation de la RNase E à la membrane soit une caractéristique des γ -protéobactéries et les β -protéobactéries. De plus, la conservation de cette hélice α chez les RNase E des γ -protéobactéries et les β -protéobactéries suggère que ces RNase E sont des protéines membranaires interagissant avec la membrane de manière similaire à la RNase E d'*E.coli* et souligne l'importance de l'interaction RNase E-membrane chez ces bactéries. Cependant, la raison fonctionnelle de cette interaction reste inconnue d'autant plus que cette localisation n'est pas essentielle pour la viabilité cellulaire. On observe tout de même, un défaut de croissance et un effet de dominant négatif (données non publiées). Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer l'interaction RNase E-membrane (Khemici et al., 2008). L'hypothèse du « storehouse » stipule que la RNase E serait « stockée » au niveau de la membrane et permet de réguler la quantité de RNase E active dans le cytoplasme. Une autre hypothèse propose que la localisation de la RNase E à la membrane permette de « compartimenter » les processus de métabolisme de l'ARN au niveau de la membrane plasmique comme cela avait été suggéré précédemment par Miczak et al, 1996. Dans ce cas, une séparation spatiale des différents processus biologiques existe dans la cellule. Confortant cette hypothèse, d'autres protéines impliquées dans le métabolisme de l'ARN seraient également localisées à la membrane comme la PNPase et RhIB de

Localisation du dégradosome d'ARN

Le dégradosome d'ARN serait localisé à la membrane de par la localisation de la RNase E. Ceci confirmerait les données observées auparavant montrant que le dégradosome d'ARN existe *in vivo* au niveau de la membrane cytoplasmique d'*E.coli* (Liou et al., 2001). Plus récemment, de nouvelles données ont montré que le dégradosome d'ARN serait un constituant du cytosquelette bactérien (Taghbalout & Rothfield, 2007). Le dégradosome d'ARN s'organiserait en filaments d'hélices tout au long de la membrane cytoplasmique de manière indépendante des protéines du cytosquelette MinD et MreB même si elles ont une organisation similaire (**figure 18A**) (Taghbalout & Rothfield, 2007, Taghbalout & Rothfield, 2008b). En ce qui concerne les trois autres protéines majeures du dégradosome d'ARN, RhlB serait formerait des filaments en hélice de manière indépendante de la RNase E, de MreB et des protéines MinCDE (Taghbalout & Rothfield, 2008b). En revanche, la PNPase s'organiserait en filaments de manière dépendante de la RNase E ou de RhlB tandis que l'énolase nécessiterait la RNase E. Un modèle de l'organisation du dégradosome a été proposé en tenant compte que le motif A de la RNase E est responsable de l'interaction directe avec la membrane cytoplasmique (**figure 18**) (Taghbalout & Rothfield, 2008a). Dans la cellule, les filaments de RNase E co-localiseraient avec ceux de RhlB, dont la formation serait ATP dépendante (Taghbalout & Rothfield, 2008b).

L'ensemble de ces données est récent et doit être considéré avec attention. Les données de notre équipe sont en accord avec l'organisation en « filament-like structure » du dégradosome d'ARN (données non publiées). Cependant, en ce qui concerne la localisation et la polymérisation en filaments de RhlB, les données dont nous disposons sont en désaccord avec les travaux publiés. Les données non publiées de V. Khemici ont montré que la localisation de RhlB à la membrane est dépendante de la RNase E. De plus, la formation de filaments de RhlB nécessite sa polymérisation. Une auto-association de RhlB a été reportée précédemment (Liou et al., 2002) et à très forte concentration, RhlB semble dimériser mais aucune polymérisation n'a été observée (Ben Luisi, Zbigniew Pietras, Cambridge, communication personnelle). Aussi, aucune structure de RhlB n'a été résolue malgré les nombreuses tentatives pour la cristalliser seule ou en présence d'ATP, d'ARN ou du peptide RNase E (Chandran et al., 2007), Ben Luisi, Agamemnon Carpousis, communication personnelle. C'est pourquoi il est important de replacer l'ensemble de ces données dans les conditions physiologiques *in vivo* qui font que la formation de filaments de RhlB reste controversée.

Au côté du modèle de Taghbalout & Rothfield, 2008a, deux autres modèles d'organisation structurale du dégradosome d'ARN dans la cellule avaient été proposés d'après les études biophysiques, biochimiques et cristallographiques (Carpousis, 2007, Marcaida et al., 2006). Cependant, il est difficile de proposer des modèles de structure du dégradosome d'ARN de par le fait que la RNase E soit une protéine membranaire. De plus, comme nous le verrons plus loin, la composition du dégradosome d'ARN peut varier en fonction des conditions physiologiques. De ce

fait, l'idée émergente de ces dernières années est que le dégradosome d'ARN serait une machinerie enzymatique dynamique et flexible qui peut être remodelée.

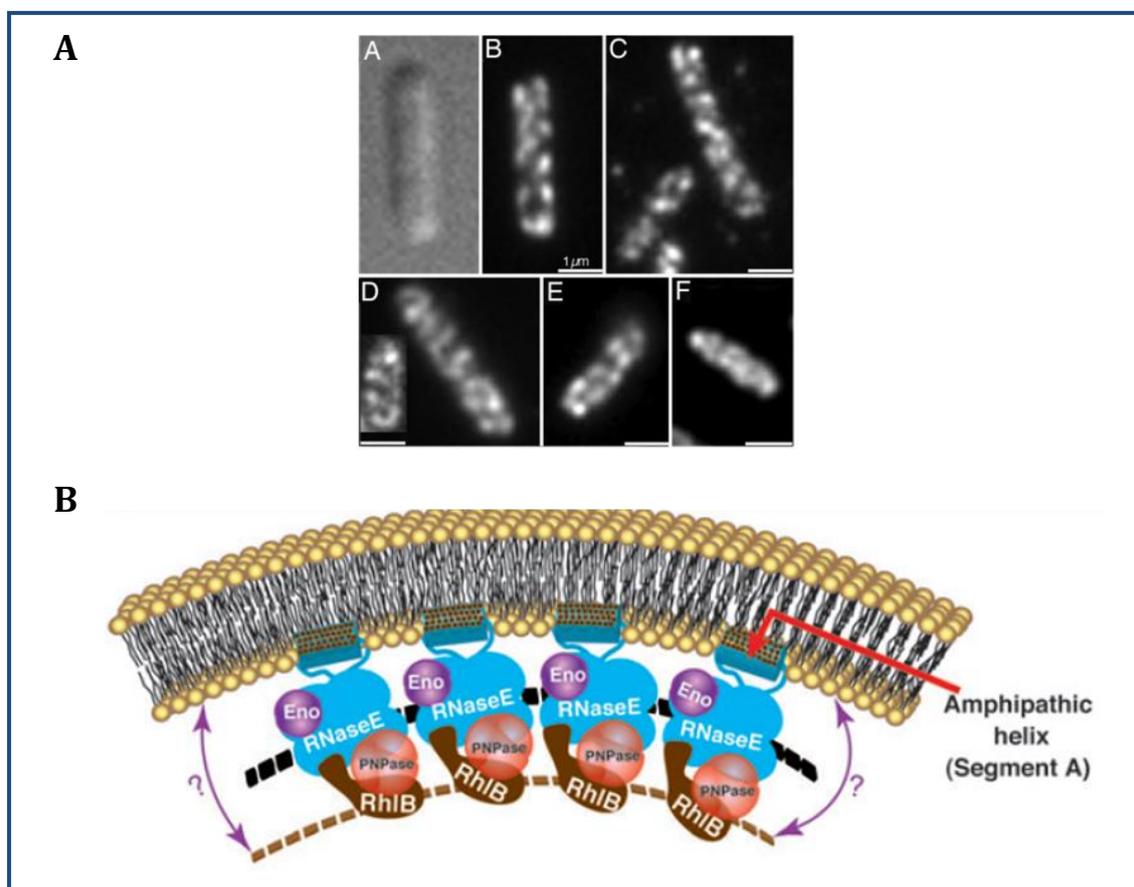


Figure 18 : Organisation de la RNase E et du dégradosome d'ARN en filaments d'hélices.

(A) A : Observation au microscope en contraste de phase d'une cellule d'*E.coli*. B : RNase E étiquetée YFP forme des structures en filaments dans la cellule. C : RNase E étiquetée HA forme également des filaments. D, E et F : Les autres composants du dégradosome (RhIB, énoIase et la PNPase respectivement) font également partie du cytosquelette. Figure provenant de Taghbalout and Rothfield, 2007. **(B)** La RNase E interagit avec la membrane via le motif A. L'énoIase et la PNPase sont localisées à la membrane par leur liaison à la RNase E et par liaison à RhIB pour la PNPase. Les traits discontinus marron et noir représentent les filaments en hélice que forment la RNase E et RhIB. RhIB pourrait d'après ce modèle interagir avec la membrane (points d'interrogation). Figure provenant de (Taghbalout & Rothfield, 2008a).

II.2.2. Interaction RNase E-ARN

La RNase E d'*E.coli* possède deux sites de fixation à l'ARN présents dans la région C-terminale, en plus du domaine S1 d'interaction à l'ARN présent dans la région N-terminale (Cormack *et al.*, 1993, Taraseviciene *et al.*, 1995). Ces deux sites de fixation : AR-RBD (Arginine rich-RNA Binding Domain) et AR2 (Arginine Rich 2) sont dépourvus d'activité catalytique et riches en arginines (Leroy *et al.*, 2002, McDowall & Cohen, 1996, Taraseviciene *et al.*, 1995). La fonction

précise de ces deux régions reste inconnue, d'autant plus que la RNase E possède déjà le domaine S1 de liaison à l'ARN et que la région C-terminale où se trouvent l'AR-RBD et l'AR2, n'est pas essentielle. De ce fait, pourquoi la RNase E possède-t-elle deux sites de fixation à l'ARN supplémentaires ? Quelle est la fonction biologique de ces interactions ? Le rôle de ces deux régions reste à déterminer d'autant qu'il est difficile d'étudier le phénotype de leurs délétions étant donné que la région C-terminale n'est pas essentielle. Les travaux de Chandran et al., 2007 ont montré que les deux régions AR-RBD et AR2, stimulent l'activité hélicase de RhlB. En effet, l'activité hélicase de RhlB est diminuée en présence du peptide RNase E (694-790) qui est dépourvu des deux sites de fixation de l'ARN, en comparaison avec le peptide RNase E (628-843). Étant donné que la stimulation de l'activité ATPase de RhlB par ces deux peptides est équivalente, l'absence des deux régions de fixation de l'ARN induit une diminution de l'activité hélicase de RhlB (Chandran et al., 2007). Il semblerait ainsi que l'AR-RBD et/ou l'AR2, jouent un rôle important dans le mécanisme de stimulation de l'activité hélicase de RhlB. D'autres travaux récents ont montré que ces deux sites de fixation de l'ARN de la RNase E, sont les sites de fixation d'une petite protéine qui inhibe l'activité de la RNase E appelée RraA (Regulator of RNase E Activity A) (Gorna *et al.*, 2010). De ce fait, ces deux sites AR-RBD et AR2 peuvent lier d'autres molécules que l'ARN à des fins régulatrices. On peut également envisager, que l'interaction entre la RNase E et la petite protéine chaperonne Hfq pour dégrader des ARNm cible via de petits ARN non codant, fait intervenir ces deux sites AR-RBD et AR2. Ainsi, d'autres rôles sont à envisager pour ces deux sites AR-RBD et AR2 caractérisés comme liant l'ARN et riches en arginines. Ces deux sites possèdent des caractéristiques qui les différencient :

L'AR-RBD

La région de fixation de l'ARN s'étend chez la RNase E de 604 à 688 acides aminés (Callaghan et al., 2004, Kaberdin *et al.*, 2000, McDowall & Cohen, 1996, Taraseviciene et al., 1995), travaux de thèse de V. Chandran, 2006, Cambridge. L'AR-RBD est nécessaire pour le clivage efficace de l'ARN 9S, précurseur de l'ARNr 5S par la RNase E (Kaberdin et al., 2000) et pour le recrutement d'ARN structurés par la RNase E (Kaberdin et al., 2000, Leroy et al., 2002). Ow et al, 2000 ont montré que la délétion de la région AR-RBD ralentissait la dégradation de certains transcrits et que la délétion de l'AR-RBD, en plus de la région d'assemblage du dégradosome d'ARN, ralentissait fortement la dégradation des ARNm étudiés. La région AR-RBD interviendrait ainsi dans la dégradation des ARNm. Les travaux de Callaghan et al, 2004 ont montré que l'AR-RBD est présent dans la région du segment B, prédit pour former une structure en coiled-coil (région de 633 à 712 acides aminés de la RNase E) (**figure 16C**). Les auteurs proposent que cette structure en coiled-coil pourrait être induite dès le contact avec l'ARN pour lier des ARN structurés (Callaghan et al., 2004).

L'AR2

En ce qui concerne l'AR2, il s'étend chez la RNase E de 796 à 819 acides aminés et est capable de fixer l'ARN de manière indépendante de l'AR-RBD (Leroy et al., 2002). L'alignement de

séquences effectués par Vidya Chandran durant sa thèse dans l'équipe de Ben Luisi à Cambridge, a montré que l'AR2 situé juste avant le site de fixation de l'énolase, est conservé chez les RNase E homologues à la RNase E d'*E.coli* des bactéries proches d'*E.coli*. Nous verrons dans la partie résultats de ce manuscrit que ce segment est plus largement conservé et présent chez la RNase E de la bactérie marine *P.haloplanktis* relativement distante d'*E.coli*. Cependant, malgré la forte conservation de la séquence en acides aminés, aucune structure n'a été prédite pour l'AR2 (Callaghan et al., 2004). Un gain de structure est possible lors de l'interaction avec l'ARN. La conservation de l'AR2 suggère un rôle fonctionnel important de ce segment qui reste inconnu à ce jour. Des rôles directs pour l'AR2 dans la stimulation de l'activité hélicase de RhlB ou dans le mécanisme d'action de la petite protéine RraA sont possibles (Chandran et al., 2007, Gorna et al., 2010). Il n'est pas exclu que l'AR2 intervienne dans l'interaction RNase E/énolase, étant donné la proximité de l'AR2 du site de l'énolase (Nurmohamed *et al.*, 2010).

II.2.3. Interaction RNase E-RhlB

L'interaction RhlB-RNase E est de stoechiométrie 1 : 1 (Chandran et al., 2007, Miczak et al., 1996, Vanzo et al., 1998, Worrall et al., 2008b). La structure de cette interaction n'a pas encore été élucidée. (Chandran et al., 2007) ont tenté de cristalliser l'interaction RNase E-RhlB pour comprendre le mécanisme de stimulation de l'activité ATPase de RhlB par la RNase E, en synthétisant un peptide de 13 acides aminés correspondant à la RNase E (730-742). Nous verrons dans la partie résultats que la région riche en arginine de la RNase E située juste en amont de ce peptide, est prédite pour former une hélice α qui peut intervenir dans la liaison et la stimulation de l'activité ATPase de RhlB. La région minimale qui porte le site de fixation de RhlB s'étend entre les acides aminés 698 et 762 (Chandran et al., 2007). Dans cette région se trouve un segment conservé chez les RNase E des bactéries proches d'*E.coli* qui porte l'arginine 730 dont la mutation en alanine (R730A) abolit l'interaction avec RhlB (**figure 19**) (Chandran et al., 2007, Khemici et al., 2004). Côté RhlB, le site d'interaction de la RNase E est situé dans le domaine C-terminal de RhlB (Chandran et al., 2007, Liou et al., 2002). Par les méthodes de prédiction d'interface de contact (ODA, Optical Docking Area), un site de liaison putatif de la RNase E a été prédit au niveau d'un motif en coil exposé entre les acides aminés 377 à 383 de RhlB (Chandran et al., 2007). Ce site d'interaction se situerait chez RhlB à 20 Å du site d'interaction de l'ATP et de son hydrolyse, suggérant que la RNase E stimulerait l'activité ATPase de RhlB de manière indirecte. (Worrall et al., 2008b) ont testé deux variants de RhlB, S381A et Y383A. Le premier présente une activité ATPase mesurable et une petite différence d'enthalpie pour la liaison du peptide RNase E (696-762). Ceci suggère que ce résidu aurait un faible rôle dans l'activité ATPase. Le second variant Y383A n'a plus d'activité ATPase qui serait dû à son oligomérisation. Ainsi, la surface de contact de la RNase E chez RhlB reste à être identifiée.

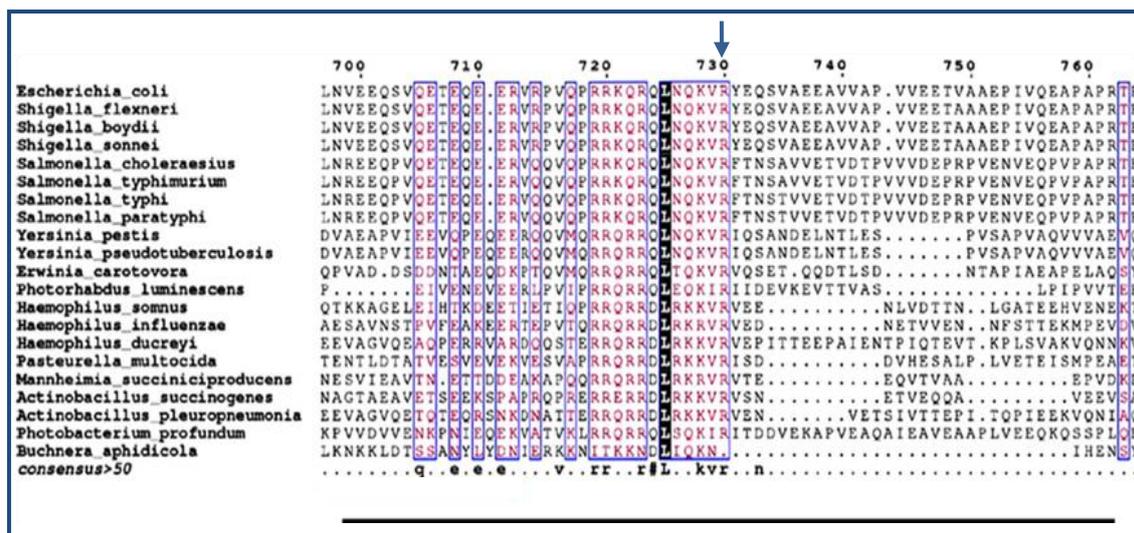


Figure 19 : Morceau d'alignement de séquence des RNase E des bactéries proches d'*E.coli*.

La région minimale d'interaction RNase E-RhlB est soulignée. La flèche indique la position de l'histidine 730 interagissant avec RhlB. Extrait de Chandran et al., 2007.

II.2.4. Interaction RNase E-énoïase

L'interaction de l'énoïase avec la RNase E implique une stœchiométrie de 2 :1, un dimère d'énoïase par RNase E (Callaghan et al., 2004). La structure d'interaction entre ces deux protéines a été résolue en cristallisant l'énoïase en présence d'un peptide synthétique de 18 ou de 28 acides aminés de la RNase E (Callaghan et al., 2004, Chandran & Luisi, 2006). Ces peptides contiennent les 13 acides aminés de la RNase E allant de 833 à 850 qui sont prédits par PONDR® (segment C) comme ayant une forte propension à se structurer (**figure 20A**) (Callaghan et al., 2004). En effet, ce microdomaine C forme une hélice α qui s'engouffre dans l'espace formé par un dimère d'énoïase (**figure 20B**). Cependant, on ne sait pas si cette hélice α préexiste avant la formation du complexe. Cette hélice α de la RNase E interagit par des liaisons hydrogènes avec les deux monomères d'énoïase. Plus exactement, l'hélice α interagit avec une portion du domaine N-terminal qui l'entoure, et avec une portion du domaine C-terminal qui forme le « fond » de la poche établie par deux monomères d'énoïase. Ces domaines N-terminal et C-terminal sont conservés chez les procaryotes et eucaryotes tandis que côté RNase E, le microdomaine nécessaire et suffisant pour interagir avec l'énoïase, est conservé chez plusieurs γ -protéobactéries à Gram négatif proches d'*E.coli* (Chandran & Luisi, 2006). Ceci suggère une conservation de l'interaction RNase E-énoïase chez les *Entérobactériales* et les *Vibrionales* (**figure 20C**) (Chandran & Luisi, 2006). Cependant, nous verrons qu'au-delà de ces bactéries, l'interaction RNase E-énoïase est absente (Ait-Bara & Carpousis, 2010). Chez la bactérie *B.subtilis* dépourvue de RNase E, l'énoïase ferait partie du dégradosome d'ARN en interagissant avec l'endoribonucléase RNase Y (Commichau et al., 2009). Il semblerait ainsi que

l'interaction endoribonucléase-énolase chez les bactéries ne soit pas spécifique à la RNase E, mais peut impliquer d'autres endoribonucléases.

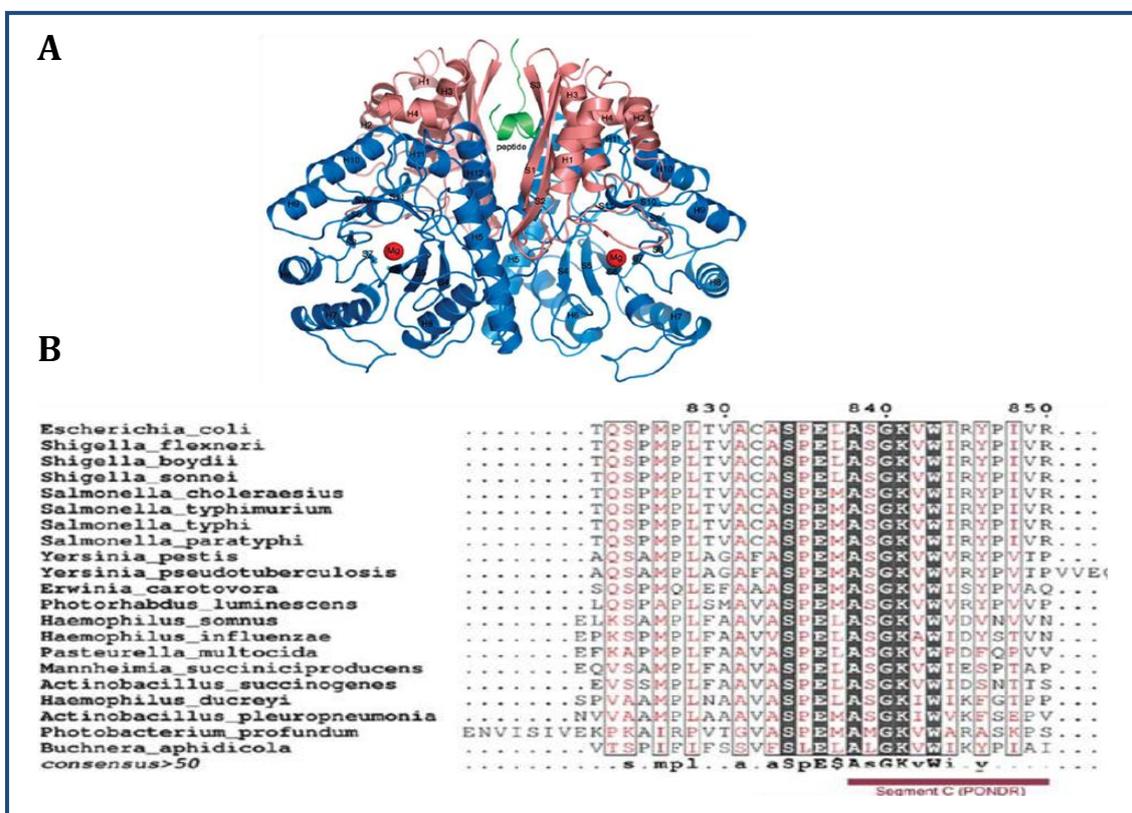


Figure 20 : Structure de l'interaction RNase E-énolase et conservation du microdomaine chez la RNase E.

(A) Structure d'interaction entre la RNase E (hélice α en vert) qui s'engouffre dans l'espace formé par un dimère d'énolase (constitué des domaines grands et petits en bleu et rouge respectivement). **(B)** Extrait d'un alignement de séquences de la région C-terminale des RNase E homologues des bactéries proches d'*E.coli*. Le trait rouge localise le segment C prédit par PONDR®. Figures provenant de Chandran & Luisi, 2006.

II.2.5. Interaction RNase E-PNPase

La structure de l'interaction RNase E-PNPase a été récemment résolue (Nurmohamed et al., 2009). Un peptide correspondant aux 40 derniers acides aminés de la RNase E (1021-1061 acides aminés) et qui correspond au peptide D prédit par PONDR® pour avoir une forte propension à se structurer, a été synthétisé et cristallisé en présence de la PNPase core (dépourvue des sites KH et S1 de liaison à l'ARN) (Callaghan et al., 2004, Nurmohamed et al., 2009). Une molécule du peptide D interagit avec un protomère de PNPase avec une constante d'affinité faible (0,9 μ M) (Nurmohamed et al., 2009). Le peptide D forme un feuillet β qui interagit directement avec des feuillets β présents à la surface de la PNPase core pour former une interaction en extension de feuillet β (**figure 21**) (Nurmohamed et al., 2009). La chaîne latérale des acides aminés de ce peptide interagissent par des

interactions Van der Waals avec les acides aminés présents dans l'espace inter protomère de la PNPase core. De manière remarquable, la même structure d'interaction entre la RNase E et la PNPase est retrouvée au sein de l'exosome humain, entre les sous-unités Rrp45 et Rrp46 apparentées à la RNase PH (Nurmohamed et al., 2009). Ceci suggère que la surface d'interaction chez les protéines PNPase et Rrp45 est un « hot-spot », acides aminés clés impliqués dans des interactions protéines-protéines (Nurmohamed et al., 2009). Cette conservation structurale de l'interaction montre comment une interaction en extension de feuillet β , répandue chez les protéines (Remaut & Waksman, 2006), peut être un « hot-spot » à interaction protéines-protéines. De plus, cette conservation d'interaction montre qu'une structure d'interaction protéines-protéines peut être conservée sans pour autant avoir une conservation des acides aminés impliqués dans l'interaction. Chez la bactérie *Streptomyces coelicolor*, une interaction entre la RNase E et la PNPase a été reportée, mais les analyses comparatives de séquences révèlent l'absence de similarité de séquence avec le peptide D (Lee & Cohen, 2003, Nurmohamed et al., 2009). Par conséquent, l'interaction RNase E-PNPase chez *S.coelicolor* pourrait impliquer une interaction en extension de feuillet β similaire à l'interaction RNase E-PNPase d'*E.coli* (Nurmohamed et al., 2009). Ceci pourrait être le cas également, de l'interaction entre les protéines RNase E et PNPase de la bactérie *P.haloplanktis*, observée lors des travaux de thèse présentés dans ce manuscrit (Ait-Bara & Carpousis, 2010).

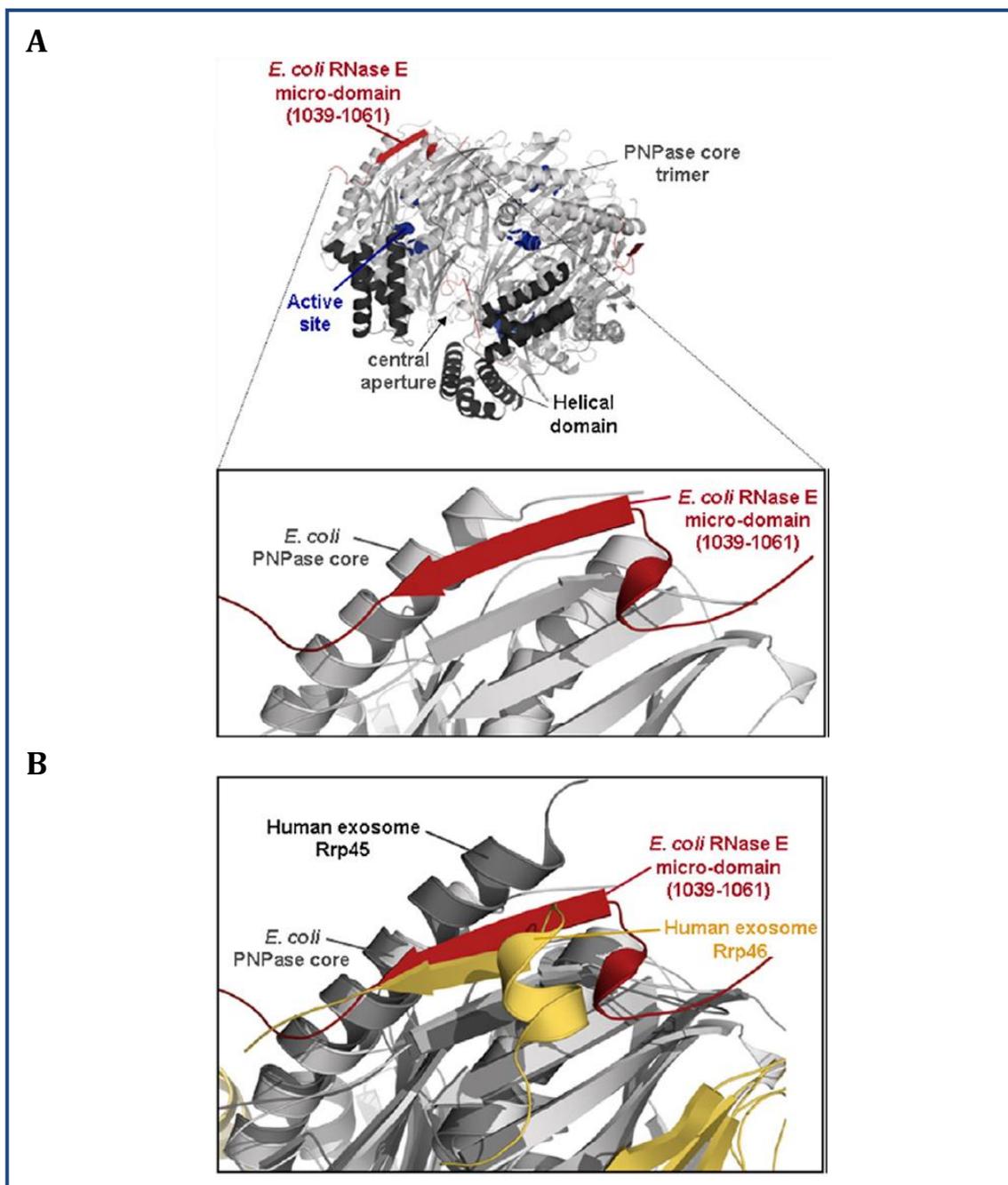


Figure 21 : Structure d'interaction RNase E-PNPase.

(A) Structure résolue de l'interaction entre la PNPase core (en gris) et le microdomaine de la RNase E allant de 1039 à 1061 acides aminés (en rouge). En bleu le site actif de la PNPase et en gris foncé, le domaine hélicale. **(B)** Comparaison de la structure d'interaction RNase E-PNPase, avec la structure d'interaction entre les protéines Rrp45 et Rrp46 de l'exosome humain. Figure provenant de Nurmohamed et al., 2009.

II.3. Autres interactions RNase E-protéines

II.3.1. Formes alternatives du dégradosome d'ARN

Le dégradosome d'*E.coli* est composé majoritairement de quatre protéines qui forment le dégradosome d'ARN « canonique » dans les conditions classiques de croissance en laboratoire (37 °C, milieu LB). À ces quatre protéines majeures, viennent se rajouter des protéines minoritaires dont le rôle au sein du dégradosome d'ARN reste à préciser. De plus, la composition du dégradosome d'ARN d'*E.coli*, peut varier selon les conditions de croissances, en réponse à un stress environnemental, donnant des « formes alternatives » du dégradosome d'ARN (Carpousis, 2007, Kaberdin & Lin-Chao, 2009).

II.3.1.1. Un dégradosome d'ARN « du froid »

La RNase E est capable d'interagir *in vitro* avec des hélicases à ARN autres que RhlB (Khemici et al., 2004, Prud'homme-Genereux *et al.*, 2004). Il s'agit des hélicases CsdA, RhlE et SrmB qui lient la RNase E en aval du site de fixation de RhlB, au niveau des acides aminés allant de 791 à 843. CsdA et RhlE sont capables *in vitro*, de remplacer fonctionnellement RhlB au sein du dégradosome d'ARN en facilitant la dégradation d'ARN structurés par la PNPase (Khemici et al., 2004, Prud'homme-Genereux et al., 2004). De plus, CsdA qui est une protéine dont l'expression est induite par le froid, interagirait *in vivo* avec la RNase E en réponse au choc au froid (Prud'homme-Genereux et al., 2004). Ce recrutement de CsdA par la RNase E permettrait de remodeler le dégradosome d'ARN en un « dégradosome du froid » capable de dégrader des ARN possédant des structures secondaires stabilisées à basse température (Prud'homme-Genereux et al., 2004). À ce jour, RhlB est la seule hélicase à ARN à avoir un rôle précis au sein du dégradosome d'ARN *in vivo* et *in vitro* (Khemici & Carpousis, 2004, Py et al., 1996). Pour les trois autres hélicases : CsdA, RhlE, et SrmB, les fonctions biologiques de leurs interactions avec la RNase E restent inconnues. De plus, aucune interaction n'a été détectée entre la RNase E et les hélicases SrmB, RhlE et CsdA, pendant la phase exponentielle de croissance d'une souche délétée pour le gène *rhlB* et cultivée à 37 °C en milieu riche (travaux de thèse de V. Khemici). La même observation a été constatée lors de la surexpression de ces hélicases à ARN. En revanche, la présence de SrmB dans les fractions des immunoprécipitations réalisées sur des cultures en phase exponentielle ou stationnaire exprimant la protéine PAP I étiquetée GFP, a été observée récemment (Carabetta et al., 2010). La présence de SrmB dans ces fractions est dépendante d'une protéine appelée SprE, qui intervient dans la régulation de la polyadénylation chez *E.coli* (Carabetta et al., 2010). CsdA est également présente dans les immunoprécipitations lorsque les cultures sont incubées à 4°C (Carabetta et al., 2010). De l'ensemble de ces données, il semblerait que

le recrutement de CsdA au sein du dégradosome d'ARN dépendrait des conditions physiologiques et il en serait de même pour les protéines SrmB et RhlE.

II.3.1.2. Un dégradosome d'ARN « du stress »

Un autre cas de forme alternative du dégradosome d'ARN, est l'interaction de la RNase E avec la petite protéine chaperonne des ARN Hfq, observée lors du blocage de la glycolyse ou d'une carence en fer (Morita et al., 2005). Cette interaction permet, avec l'aide de petits ARN non codants induits dans ces cas de stress (SgrS et RhyB, respectivement), de dégrader spécifiquement des ARNm cibles. Il y a formation d'un complexe ribonucléoprotéique indépendant des composants du dégradosome d'ARN à l'exception de la RNase E (Morita et al., 2005). Le blocage de la glycolyse par exemple, qui se traduit par l'accumulation du glucose-6-phosphate (G6P) dans la cellule, induit l'expression du petit ARN SgrS (227 nt) afin de cibler la dégradation de l'ARNm *ptsG* (Vanderpool & Gottesman, 2004). Ce messenger code pour le transporteur majeur du glucose et sa dégradation permet d'arrêter l'assimilation du glucose lorsque le G6P est accumulé dans la cellule. L'action du petit ARN SgrS (et de RhyB en cas de carence en fer) aboutit à un couplage entre blocage de l'initiation de la traduction et dégradation du messenger cible comme conséquence du blocage (Masse et al., 2003, Morita et al., 2005).

Le mécanisme moléculaire d'action de ces complexes reste inconnu. Cependant, l'action de ces petits ARN nécessite l'interaction entre la région C-terminale de la RNase E et la protéine Hfq, d'après les expériences de co-purification par affinité en utilisant une version chromosomique de la RNase E étiquetée FLAG (Morita et al., 2005). Le site de fixation de Hfq a été délimité par l'équipe du docteur Aiba Hiroji, dans la région C-terminale de la RNase E, de manière indépendante des protéines RhlB, émolase et PNPase, au niveau des acides aminés allant de 701 à 1061 (Morita et al., 2005). Plus exactement, Aiba Hiroji a révélé lors de sa conférence au congrès FASEB 2008, que l'interaction de la RNase E avec Hfq se situerait au niveau des acides aminés allant de 701 à 750 où se situe le site de fixation de RhlB. Cependant, dans l'équipe du Dr Ben Luisi à Cambridge, l'interaction observée entre la RNase E et la protéine Hfq nécessite la présence d'ARN lors d'expériences de gel retard (Worrall et al., 2008b). Ce qui suggère que l'interaction RNase E-Hfq serait une interaction médiée par les ARN. Ces différents résultats obtenus par ces deux équipes pourraient être dus aux différentes approches utilisées. De ce fait, la nature directe ou indirecte de l'interaction RNase E-Hfq reste à déterminer.

II.3.1.3. Un dégradosome d'ARN « régulé » pour « réguler »

Deux petites protéines d'*E.coli* appelées RraA et RraB (Regulator of RNase E Activity A et B) ont été identifiées comme étant des régulateurs de l'activité de la RNase E *in vitro* et *in vivo* (Gao et al., 2006b, Lee et al., 2003). Ces deux protéines ont été découvertes lors d'un crible génétique qui

recherchait les gènes dont l'expression augmenterait l'activité de la disulfide isomérase DsbC, enzyme impliquée dans les réarrangements des ponts disulfures des protéines non natives (Gao et al., 2006b, Lee et al., 2003). La stabilité de l'ARNm de cette enzyme dépend de la RNase E mais aussi de la présence des protéines RraA et RraB (Gao et al., 2006b, Lee et al., 2003). Les analyses de microarrays ont montré que ces deux protéines affectaient la demi-vie et l'abondance d'un grand nombre de transcrits. Ces deux protéines RraA et RraB sont capables de diminuer l'activité de la RNase E *in vitro* et diminuent la quantité de la PNPase tandis que RraA seule diminue la quantité de RhlB et d'énolase au sein du dégradosome d'ARN (Gao et al., 2006b). Quant à RraB, sa surexpression fait apparaître les protéines DnaK et CsdA au sein du dégradosome d'ARN. L'ensemble de ces données suggère que ces protéines seraient capables de moduler la stœchiométrie du dégradosome d'ARN et de remodeler sa composition protéique.

L'inhibition de l'activité de la RNase E mentionnée par les protéines RraA et RraB nécessite l'interaction avec la région C-terminale de la RNase E (Lee et al, 2003, Gao et al, 2006). Le site d'interaction de RraB chez la RNase E, se trouve au niveau du site de fixation de la protéine RhlB, allant des acides aminés 694 à 727 (Gao et al., 2006b). Quant à RraA, petite protéine de 17.4 kDa qui s'organise en trimère, son interaction avec la RNase E a été caractérisée plus en détail et concerne les deux sites de fixation des ARN situés dans la région C-terminale (Gorna et al., 2010). Ces deux sites riches en arginines sont chargés positivement et interagissent avec le creux formé par deux monomères de RraA, dont la surface est chargée négativement (Gorna et al., 2010). En plus de la RNase E, RraA est capable d'interagir avec la région C-terminale hautement basique de l'hélicase à ARN RhlB mais aussi avec les hélicases SrmB et RhlE (Gorna et al., 2010). Cependant, le site d'interaction serait différent du domaine C-terminal de RhlB. RraA est capable d'inhiber l'activité ATPase de RhlB, et d'inhiber en présence de RhlB, l'activité de maturation du 9S par la RNase E (Gorna et al., 2010). Au vu de toutes ces données, en se fixant au niveau des sites de liaison de l'ARN de la RNase E, RraA pourrait interférer avec la liaison des ARN mais aussi dans la dégradation des ARN structurés qui implique RhlB et la PNPase.

II.3.2. Autres interactions : RNase E-protéines

D'autres interactions RNase E/protéines ont été reportées, mais n'ont pas été caractérisées. C'est le cas de la petite protéine ribosomale L4 qui pourrait masquer les sites d'interaction de la RNase E à l'ARN (Singh *et al.*, 2009). Un autre cas est celui de la protéine MinD du cytosquelette, qui serait capable d'interagir avec la RNase E (Taghbalout & Rothfield, 2007). Cette interaction a été observée par la technique de double hybride de la levure lors de la recherche des éléments interagissant avec le cytosquelette bactérien (Taghbalout & Rothfield, 2007). Ce site d'interaction se situerait entre les acides aminés allant de 378 à 724 de la RNase E. Un dernier cas a été reporté lors de la recherche des protéines d'*E.coli* capables de lier les ARN présentant des queues poly(A) (les PABP,

Poly (A)-Binding Protein). La protéine S1, qui interagit avec l'extrémité 5' de l'ARN lors de l'initiation de la traduction, interagirait avec la RNase E et la PNPase (Feng *et al.*, 2001). Pour l'ensemble de ces interactions RNase E-protéines mentionnées, la signification biologique reste inconnue.

II.4. La RNase E est une « Hub protein »

La **figure 22A** résume l'ensemble des interactions RNase E-protéines caractérisées chez *E.coli* à ce jour. Au total, au moins 16 interactions RNase E-protéines ont été reportées. On constate alors l'incroyable variabilité des partenaires de la RNase E. Certaines de ces interactions RNase E-protéines font intervenir des microdomaines caractérisés, tandis que d'autres n'ont pas encore été caractérisés. L'idée émergente de ces dernières années est que la RNase E fait partie de ces protéines d'*E.coli* qui ont un réseau d'interactions et qui sont appelées « hub protein » (Butland *et al.*, 2005). Certaines interactions semblent être permanentes (PNPase, RhlB et énalase) tandis que d'autres semblent être transitoires (CsdA, Hfq,...). La RNase E aurait ainsi de multiples interfaces d'interaction grâce auxquelles d'une part, les activités de la RNase E et du dégradosome d'ARN seraient régulées selon le set de messagers à dégrader, et d'autre part, le dégradosome d'ARN serait remodelé en réponse aux variations des conditions environnementales (**figure 22A**).

La plupart des interactions RNase E-protéines mentionnées impliquent l'intervention de la région C-terminale de nature intrinsèquement peu structurée (**figure 22B**). En général, les protéines très peu structurées acquièrent une souplesse dans les interactions protéines-protéines (Wright & Dyson, 1999). De ce fait, la souplesse de la région C-terminale très peu structurée permettrait à la RNase E d'avoir une grande plasticité dans les interactions protéines-protéines qui expliquerait sa nature de « hub protein » (Butland *et al.*, 2005). De plus, cette souplesse permettrait aussi à la RNase E d'acquérir des avantages fonctionnels et adaptatifs en réponse à différents stress environnementaux.

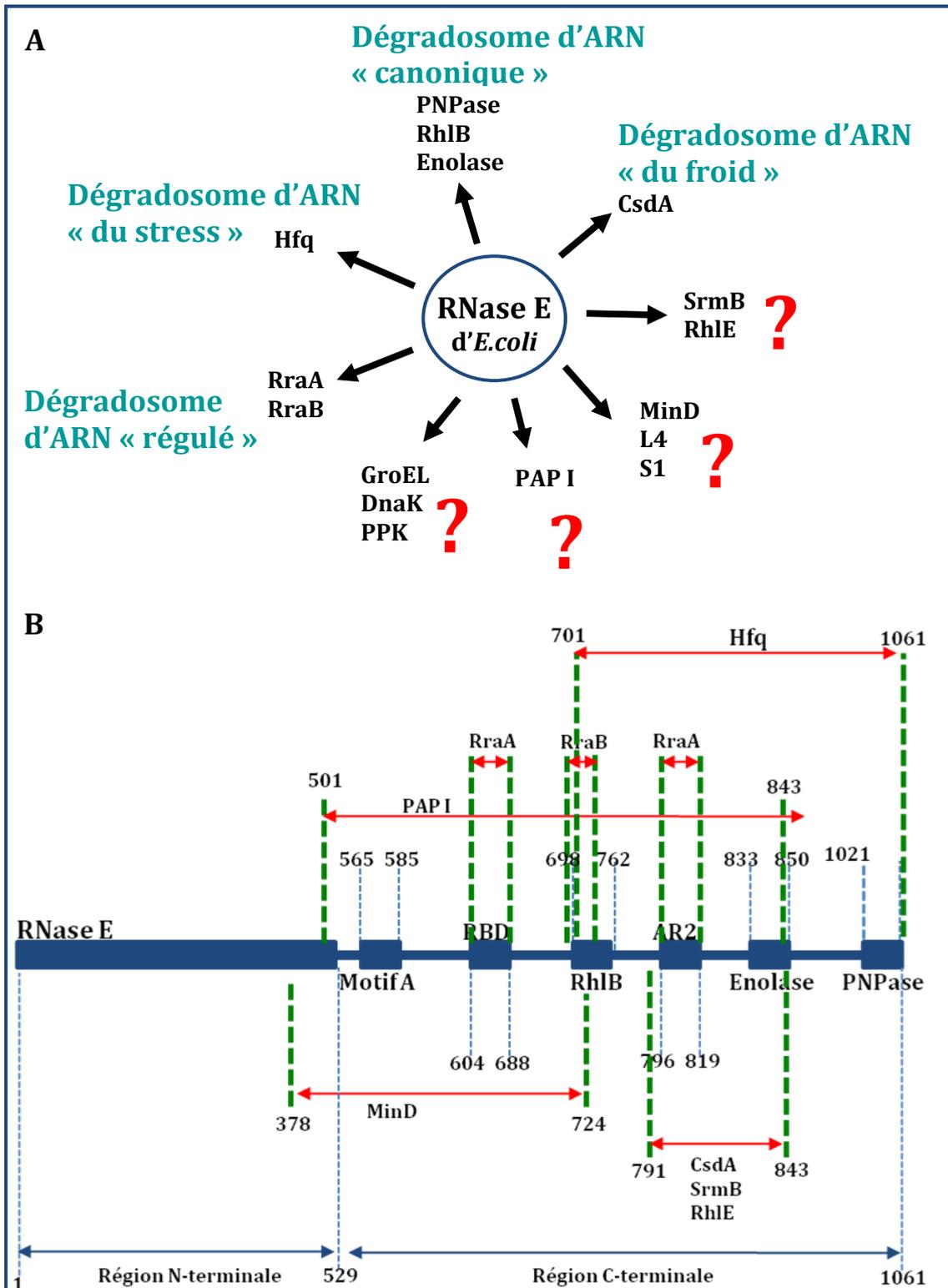


Figure 22 : Ensemble des interactions RNase E-protéines reportées.

(A) Interactions RNase E-protéines et formes différentes du dégradosome d'ARN. **(B)** Localisation des sites d'interactions RNase E-protéines.

II.5. Synopsis

Comme nous venons de le voir, depuis ces dernières années, de nouvelles données ont approfondi nos connaissances sur la RNase E et le dégradosome d'ARN. Certaines ont permis de mieux comprendre les interactions RNase E-protéines, comme c'est le cas de l'énolase et la PNPase. D'autres ont été surprenantes et inattendues comme le fait que la RNase E soit une protéine membranaire capable d'une grande plasticité d'interaction avec de nombreuses protéines cytoplasmiques, ou encore le cas du dégradosome d'ARN « flexible et modulable », qui s'organise en « filament-like structure ». Une question se pose alors : comment replacer l'ensemble de ces données *in vivo* chez *E.coli* ? Dans les conditions classiques en laboratoire, la RNase E est localisée à la membrane ainsi que les trois autres composants du dégradosome d'ARN, RhlB, l'énolase et la PNPase. Lors d'un stress quelconque (froid, carence en fer...), la composition du dégradosome d'ARN est remodelée en changeant la stoechiométrie du dégradosome d'ARN canonique et l'acquisition de nouvelles interactions RNase E-protéines. La RNase E interagirait avec des protéines cytoplasmiques comme les protéines Hfq ou CsdA. Ceci permettrait de délocaliser la RNase E de la membrane afin de cibler la dégradation de messagers spécifiques en réponse aux stress (**figure 23**). Cette délocalisation permettrait de rendre la RNase E accessible aux transcrits localisés au niveau de l'ADN, non loin de leur site de transcription (Montero Llopis et al., 2010). La localisation de la RNase E à la membrane permettrait dans ce cas, de séparer spatialement la RNase E de ces transcrits cibles en cas de non-stress. Cependant, comment le dégradosome d'ARN est-il remodelé ? Quel est le signal perçu par la cellule ? D'autres analyses sont nécessaires pour comprendre l'ensemble de ces données. De plus, la caractérisation des interactions entre la RNase E et d'autres protéines comme les protéines PAP I, CsdA et SrmB, est nécessaire pour comprendre la signification biologique de ces interactions. Les microscopies à fluorescence et/ou de time-lapse peuvent être envisagées pour « suivre » la localisation de la RNase E d'*E.coli* en cas de stress.

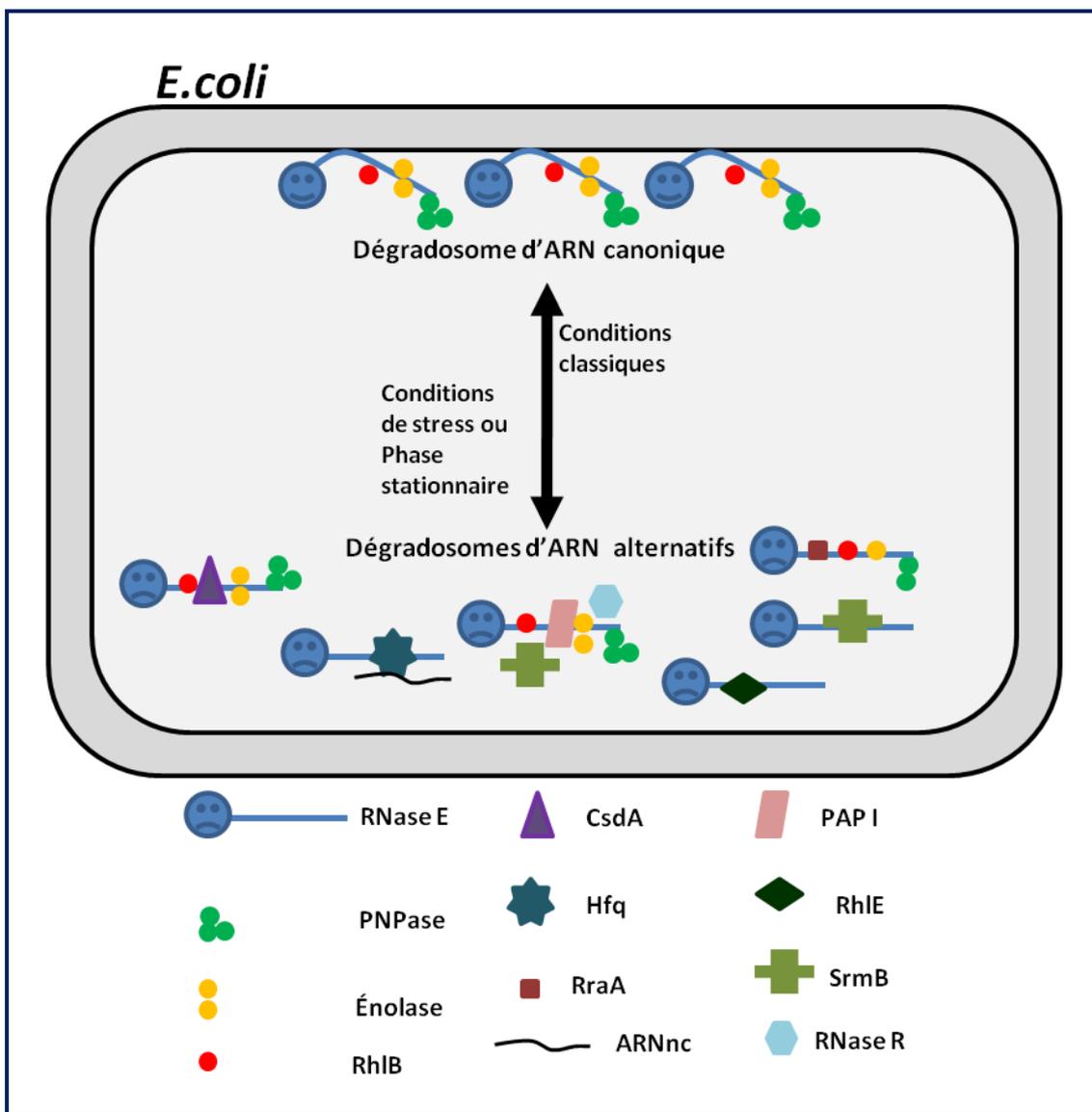


Figure 23 : Dégradosome d'ARN canonique et alternatifs d'*E.coli*.

Dans les conditions classiques de laboratoire, la RNase E et le dégradome d'ARN sont localisés à la membrane. Le dégradome d'ARN est remodelé en plusieurs dégradosomes d'ARN alternatifs selon le stress perçu par la cellule ou à l'entrée en phase stationnaire. Pour faciliter le schéma, la structure quaternaire de la RNase E n'est pas prise en compte.

III. Dégradosomes d'ARN identifiés chez d'autres bactéries

Après la découverte du dégradosome d'ARN d'*E.coli*, plusieurs complexes « degradosome-like » ont été identifiés chez d'autres bactéries, essentiellement chez les protéobactéries (α et γ) et les bactéries à Gram positif. Ces dégradosomes d'ARN sont des « RNase E-based complex » ressemblant de par leur organisation, au dégradosome d'ARN d'*E.coli*. Toutefois, ces dégradosomes d'ARN diffèrent par leurs compositions protéiques.

III.1. Les dégradosomes identifiés

III.1.1. Chez les γ -protéobactéries

Le second dégradosome d'ARN identifié chez une γ -protéobactérie après celui d'*E.coli* est celui de la bactérie psychrophile (aimant le froid) *Pseudomonas syringae* LzW4. L'espèce *P.syringae* est en général connue pour être un pathogène de plantes, cependant, certaines souches de cette espèce ont été isolées en antarctique dans les années 1980 (Shivaji *et al.*, 1989). C'est le cas de *P.syringae* LzW4 dont le dégradosome d'ARN est composé d'une RNase E de type I, de l'hélicase à ARN RhIE et de l'exoribonucléase hydrolytique RNase R (Purusharth *et al.*, 2005). Ce dégradosome d'ARN a été identifié par les méthodes de purifications en conditions natives de la RNase E, de co-purifications et d'immunoprécipitations (Purusharth *et al.*, 2005). Le dégradosome d'ARN de *P.syringae* LzW4 présent dans les fractions de sédimentation, nécessite la présence d'ATP pour dégrader l'ARN structuré RNAI (Purusharth *et al.*, 2005). À ce jour, c'est l'unique fois où l'on retrouve une interaction entre la RNase E et la RNase R et ceci montre que des exoribonucléases autres que la PNPase, peuvent être recrutées au sein du dégradosome d'ARN. Chez *E.coli*, la RNase R est l'unique exoribonucléase capable de dégrader les ARN qui possèdent des structures secondaires sans l'aide d'hélicases à ARN (Cheng & Deutscher, 2005, Vincent & Deutscher, 2009). De plus, la RNase R fait partie des protéines dont l'expression est induite par le froid et qui contribueraient à la croissance d'*E.coli* à basse température (Cairrao *et al.*, 2003). En phase stationnaire d'*E.coli*, la RNase R est présente dans les

fractions d'immunoprécipitations de la PAP I étiquetée GFP (Carabetta et al., 2010). Chez *P.syringae* LzW4, la RNase R est essentielle pour la croissance à 4 °C même si son expression n'est pas induite par le froid, et elle est essentielle pour la maturation en 3' de l'ARNr 16S, 5S et de la dégradation de l'ARNtm (Purusharth *et al.*, 2007). Le recrutement de la RNase R au sein du dégradosome d'ARN chez *P.syringae* LzW4 qui possède le gène codant pour la PNPase, a été proposé par les auteurs de ces travaux, comme étant un mécanisme d'adaptation au froid. En effet, la substitution d'une enzyme phosphorolytique (PNPase) par une enzyme hydrolytique (RNase R) permettrait à cette bactérie psychrophile de réaliser des réactions de faible énergie à basse température (Purusharth et al., 2005). La présence de la RNase R au sein du dégradosome d'ARN de *P.syringae* LzW4 permettrait au complexe de dégrader les ARN fortement structurés et stabilisés par la basse température. Dans ce cas, est-ce que c'est un mécanisme général d'adaptation au froid, commun aux bactéries psychrophiles ? Cette question est l'un des objectifs de mes travaux de thèse et nous verrons que pour la bactérie adaptée au froid *P.haloplaktis*, la PNPase est recrutée au sein du dégradosome d'ARN ce qui montre que le recrutement de la RNase R n'est pas un mécanisme généralisable d'adaptation froid.

En plus de la RNase R, le dégradosome d'ARN de *P.syringae* LzW4 contient l'hélicase à ARN à boîte DEAD RhIE. Son identification est basée sur la comparaison de la séquence N-terminale séquencée, avec celle la souche de *P.syringae* pv *tomato* DC3000 dont le génome a été séquencé (Buell *et al.*, 2003). Le génome de cette souche contient au moins les cinq hélicases à boîte DEAD d'*E.coli*. Chez *E.coli*, la fonction de RhIE est restée longtemps inconnue et un rôle dans la dégradation des ARN a été proposé dû à l'interaction observée avec la poly(A) polymérase (Raynal & Carpousis, 1999). De plus, il a été montré que RhIE d'*E.coli* est capable de remplacer fonctionnellement RhIB pour faciliter la dégradation des ARN qui possèdent des séquences REP par la PNPase (Khemici et al., 2004). Ce rôle dans la dégradation des ARN est renforcé par sa présence chez *P.syringae* LzW4, au sein du dégradosome d'ARN. Cependant, il a été montré récemment que RhIE d'*E.coli* interviendrait dans l'assemblage des ribosomes (Jain, 2008). Chez *P.syringae* LzW4, le rôle de RhIE au sein du dégradosome d'ARN reste inconnu d'autant plus que ce complexe possède déjà la RNase R qui dégrade aussi les ARN présentant des structures secondaires. La présence de RhIE au sein de ce complexe pourrait cibler la dégradation d'ARN structurés qui nécessite de l'ATP.

Ainsi, le dégradosome d'ARN de *P.syringae* LzW4 possède une activité hydrolytique unique chez les bactéries, de par la présence de la RNase R. Cependant, cette propriété est aussi retrouvée au-delà des bactéries, au sein de l'exosome eucaryote où des protéines hydrolytiques sont recrutées comme la protéine Rrp44. Cette protéine appartient à la famille de ribonucléases hydrolytiques dont font partie la RNase R et la RNase II (Worrall & Luisi, 2007). Chez certaines archées où l'exosome est absent comme *Haloferax volcanii*, l'homologue de la RNase R est essentielle et l'exoribonucléase majeure (Portnoy & Schuster, 2006).

Le dégradosome d'ARN de la souche marine hétérotrophique *Vibrio angustum* S14 a été identifié (Erce et al., 2009). La RNase E de *V.angustum* S14 est capable de restaurer la viabilité d'un

mutant *rne-1* thermosensible d'*E.coli* et de maturer l'ARN 16S d'*E.coli*. Par l'analyse de la région C-terminale de la RNase E de type I de *V.angustum* S14 par PONDR® et aussi par alignements de séquences en utilisant des homologues de la RNase E, Erce et al, ont montré la présence de microdomaines putatifs correspondants aux : motif A, AR-RBD, AR2, RhIB, émolase et PNPase. Deux de ces microdomaines, montrés expérimentalement par la méthode de double hybride bactérien (BATCH), sont responsables de l'interaction avec l'émolase et la PNPase. Il a été également montré par cette méthode que ces interactions sont hétérologues, c'est-à-dire, que la PNPase et l'émolase de *V.angustum* S14, sont capables d'interagir avec la RNase E d'*E.coli* et vice versa. Par conséquent, l'interaction entre la RNase E et les protéines PNPase et émolase est indépendante de l'espèce, ce qui suggère la conservation des interfaces de contact (structurale ou de séquence) entre les protéines RNase E/PNPase et RNase E/émolase. Curieusement, un second site ressemblant fortement au microdomaine d'interaction de l'émolase est présent uniquement chez les *Vibrionales* (Erce et al., 2009). Le rôle de ce domaine et son origine (duplication ?) restent inconnus. Les travaux menés par Erce et al, 2009 ainsi que mes travaux de thèse (Ait-Bara & Carpousis, 2010), sont les seuls travaux publiés où les microdomaines d'interaction RNase E-protéines ont été caractérisés chez une bactérie autre qu'*E.coli*.

Chez la bactérie pathogène *Yersinia pseudotuberculosis*, la RNase E de type I interagit avec la PNPase lors d'expériences de co-purification (Yang et al., 2008) et interviendrait dans la régulation du système de sécrétion de type III (SSTIII). Plus exactement, la RNase E et la PNPase réguleraient le niveau des transcrits de SSTIII. Un mutant qui porte une RNase E avec une activité atténuée et qui est déficient pour le SSTIII, voit sa pathogénicité réduite. Il serait intéressant de voir dans ce contexte, si l'émolase et RhIB sont des facteurs importants pour la pathogénicité et si la composition du dégradosome d'ARN varie dans le cas de l'infection.

III.1.2. Chez les α -protéobactéries

La bactérie pourpre photosynthétique non sulfurique *Rhodobacter capsulatus* possède une RNase E de type II qui a été co-purifiée avec deux hélicases à ARN de 74 et 65 kDa, le facteur Rho de terminaison de transcription et deux autres protéines encore non identifiées (Jager et al., 2001). Des quantités minoritaires de PNPase ont été trouvées en plus de quelques protéines non identifiées dans les fractions de purification. Les protéines qui interagissent fortement avec la RNase E de *R.capsulatus* lors d'immunoprécipitation avec un anticorps anti-RNase E sont le facteur Rho, la protéine de 65 kDa identifiée comme étant une hélicase à boîte DEAD et une protéine de 47kDa (Jager et al., 2001). L'ensemble de ces données montre que le dégradosome d'ARN de *R.capsulatus* se distingue de celui d'*E.coli*. De plus, la préparation du dégradosome d'ARN de *R.capsulatus* possède une activité hydrolytique de dégradation de 3' vers 5' mais la protéine responsable de cette activité n'a pas encore

été identifiée. Le dégradosome d'ARN de *R.capsulatus* possède aussi une activité hélicase qui permet de dégrader un substrat de 318 nucléotides contenant des structures secondaires (Jager et al., 2001).

L'une des protéines retrouvées de manière inattendue au sein du dégradosome d'ARN de *R.capsulatus* est le facteur Rho de terminaison de transcription, connu chez *E.coli* comme étant une hélicase hexamérique à ADN/ARN. Les auteurs de ces travaux ont suggéré que la présence de Rho au sein de ce dégradosome d'ARN, pourrait coupler directement la terminaison de la transcription et la dégradation des ARNm chez *R.capsulatus* (Jager et al., 2001). D'autres travaux ont montré que la quantité de Rho et des deux hélicases à boîte DEAD variait en fonction de la quantité en oxygène (Jager et al., 2004). De ce fait, il semblerait que le dégradosome d'ARN de *R.capsulatus* varie en fonction des différentes conditions environnementales comme c'est le cas pour le dégradosome d'ARN d'*E.coli*.

Caulobacter crescentus, une autre α -protéobactérie, possède une RNase E de type II comme la RNase E de *R.capsulatus*. Cette RNase E semble localisée au niveau de l'ADN, contrairement à la RNase E membranaire d'*E.coli* (Montero Llopis et al., 2010). Le dégradosome d'ARN semble être différent de celui de *R.capsulatus* et d'*E.coli*. Il serait composé en plus de la RNase E, de la PNPase, d'une hélicase à boîte DEAD encore non identifiée et de la protéine Aconitase A (Steven Hardwick, Cambridge, communication personnelle). L'Aconitase A est une enzyme métabolique qui intervient dans le cycle acide citrique en catalysant la réaction de conversion du citrate en isocitrate. Sa présence au sein du dégradosome d'ARN serait similaire à celle de l'énolase du dégradosome d'*E.coli* en faisant le lien entre les voies métaboliques et la régulation post-transcriptionnelle. L'Aconitase A comme l'énolase, est également considérée comme une « moonlighting » protéine (Jeffery, 1999). En ce qui concerne la PNPase, elle interagirait avec la RNase E au niveau de l'extrémité C-terminale où est présent un microdomaine contenant les acides aminés GWW (Steven Hardwick, communication personnelle). Ce microdomaine est conservé chez les RNase E des α -protéobactéries et les acides aminés GWW sont fortement conservés (travaux de thèse Ait-Bara). Le motif GWW est aussi présent chez la RNase E de *R.capsulatus* alors que seulement une quantité minoritaire de PNPase interagit avec la RNase E (Jager et al., 2001). Il se pourrait que le recrutement de la PNPase par la RNase E de *R.capsulatus* dépende de certaines conditions physiologiques.

III.1.3. Chez les bactéries à Gram positif

La RNase E de l'actinobactérie *Streptomyces coelicolor*, qui est la plus longue RNase E caractérisée (1340 aa), porte la région catalytique phylogénétiquement conservée au centre de la structure primaire de la protéine (RNase E de type III, **figure 9**). Lors d'expérience de co-purification, la RNase E de *S.coelicolor* interagit avec la PNPase de *S.coelicolor*, par sa région N-terminale (Lee & Cohen, 2003). Ceci suggère la présence d'un dégradosome d'ARN chez certaines bactéries à Gram positif similaire aux bactéries à Gram négatif.

Les actinobactéries *Mycobacterium tuberculosis* agent causal de la tuberculose et *M.bovis*, possèdent une RNase E de type III de structure primaire similaire à la RNase E de *S.coelicolor* (Kovacs et al., 2005). Cependant, le clonage de ces deux RNase E étiquetées FLAG chez *E.coli* puis leur expression et leur purification chez *M.segmatis* et *M.bovis* (bactéries non pathogènes), ont montré que ces deux RNase E interagissaient avec une acétyl transférase et une NAD kinase (Kovacs et al., 2005). De plus, DnaK et GroEL, protéines minoritaires du dégradosome d'*E.coli*, sont présentes dans les fractions de purification. *M.tuberculosis* et *M.bovis* sont deux actinobactéries à Gram positif comme *S.coelicolor*, cependant, la composition du dégradosome d'ARN diffère.

À l'inverse des autres bactéries à Gram positif citées ci-dessus, *B.subtilis* ne possède pas de RNase E (Condon & Putzer, 2002). Toutefois, un dégradosome d'ARN a été identifié récemment et il contient l'endoribonucléase RNase Y, les endo et exoribonucléases RNase J1 et J2 (homologues fonctionnelles de la RNase E), une hélicase à boîte DEAD CshA, la PNPase, l'énolase et la phosphofructokinase (Commichau et al., 2009, Lehnik-Habrink et al., 2010). Cependant, les travaux d'immunopurification réalisés par Mathy et al, 2009, ont montré que la RNase J1 forme un complexe uniquement avec la RNase J2. De ce fait, la présence de ce dégradosome d'ARN chez *B.subtilis* reste controversée.

III.2. Plasticité des interactions RNase E-protéines

La **figure 24** résume l'ensemble des dégradosomes d'ARN identifiés chez les protéobactéries et bactéries à Gram positif et replace ces bactéries dans un contexte phylogénétique. Le dégradosome d'ARN est assez bien répandu chez ces bactéries et présente une grande diversité dans sa composition protéique. Néanmoins, on retrouve pour la majorité des cas, des interactions entre endoribonucléases, exoribonucléases et hélicases à ARN qui sont également retrouvées chez les exosomes eucaryotes et archées, suggérant une conservation de la fonction au cours de l'évolution. Tous les dégradosomes d'ARN identifiés et présents dans la **figure 24** seraient assemblés sur la région non catalytique et non conservée de la RNase E. De ce fait, la plasticité d'interaction RNase E-protéines observée serait due à la variabilité de la région non catalytique qui possède un potentiel évolutif plus rapide que la région catalytique conservée. Chez *E.coli* et *V.angustum*, les interactions RNase E-protéines sont médiées par des microdomaines de 15 à 40 acides aminés présents dans la région C-terminale de la RNase E (Carpousis et al., 2009, Erce et al., 2009). Il est possible que ce soit l'évolution rapide de ces microdomaines qui serait responsable de la plasticité des interactions RNase E-protéines (Marcaida et al., 2006). Cette plasticité dans la composition protéique du dégradosome d'ARN permettrait l'acquisition de nouvelles propriétés régulatrices (nouvelles fonctions) qui faciliteraient l'adaptation de ces bactéries aux variations de leurs niches écologiques (Marcaida et al., 2006). Le dégradosome

d'ARN serait par conséquent, une machinerie de dégradation flexible et modulable afin de s'adapter aux conditions environnementales. Cependant, avant les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit, seuls deux cas (*E.coli* et *V.angustum*) ont été étudiés où les microdomaines ont été caractérisés et la validation de cette hypothèse nécessite la caractérisation d'autres microdomaines de RNase E d'autres bactéries.

III.3. Objectifs de thèse

Les travaux de recherche menés au cours de ma thèse, se sont focalisés sur la RNase E de la γ -protéobactérie adaptée au froid *Pseudoalteromonas haloplanktis* (**figure 24**) pour caractériser le dégradosome d'ARN et les microdomaines responsables des interactions RNase E-protéines. L'intérêt de cette bactérie est de voir s'il y a une corrélation entre la composition du dégradosome d'ARN et la niche écologique de *P.haloplanktis* isolée dans l'océan Antarctique. Dans l'arbre phylogénétique Marcaida et al., 2006 (**figure 24**), la bactérie *P.haloplanktis* est relativement éloignée d'*E.coli* et semble avoir un dégradosome d'ARN différent de celui d'*E.coli*. Le second intérêt d'étudier cette bactérie est de comprendre l'adaptation au froid de la dégradation des ARN. En effet, les régions à basse température occupent la plus grande partie du globe terrestre (90% des eaux des océans sont à des températures inférieures à 5 °C) où des bactéries dites psychrophiles (aimant le froid) ou psychrotolérants (tolérant le froid) se sont adaptées à leur milieu de vie permanent. Dans ces conditions, leur croissance est rapide et comparable à celle de leurs homologues mésophiles aux températures plus élevées et leur dynamisme moléculaire ne semble pas être affecté par la basse température. Outre l'intérêt croissant de ces bactéries en biotechnologies, elles suscitent un intérêt scientifique particulier pour comprendre les mécanismes moléculaires de leur adaptation au froid. C'est le cas des mécanismes moléculaires qui permettent de préserver la fonction de dégradation des ARN de l'effet du froid (apparition de structures secondaires d'ARN très stables). Mes travaux de recherche se sont focalisés dans un premier temps sur le dégradosome d'ARN adapté au froid de la bactérie *P.haloplanktis* afin de savoir si « ce qui vrai pour *E.coli*, est vrai pour *P.haloplanktis* ». Les microdomaines de la RNase E de *P.haloplanktis* responsables des interactions RNase E-protéines ont été caractérisés. En parallèle, des tests de complémentation de la RNase E d'*E.coli* par la RNase E de *P.haloplanktis* ont été réalisés chez *E.coli*. Ensuite, l'analyse des microdomaines caractérisés est élargie de manière *in silico* à d'autres RNase E de γ -protéobactéries pour avoir une vue d'ensemble de la distribution de ces microdomaines. Enfin, une étude phylogénétique de la protéine RhlB a été initiée dans le but de voir une corrélation potentielle entre la présence du microdomaine d'interaction de RhlB chez la RNase E et la présence de RhlB chez les γ -protéobactéries.

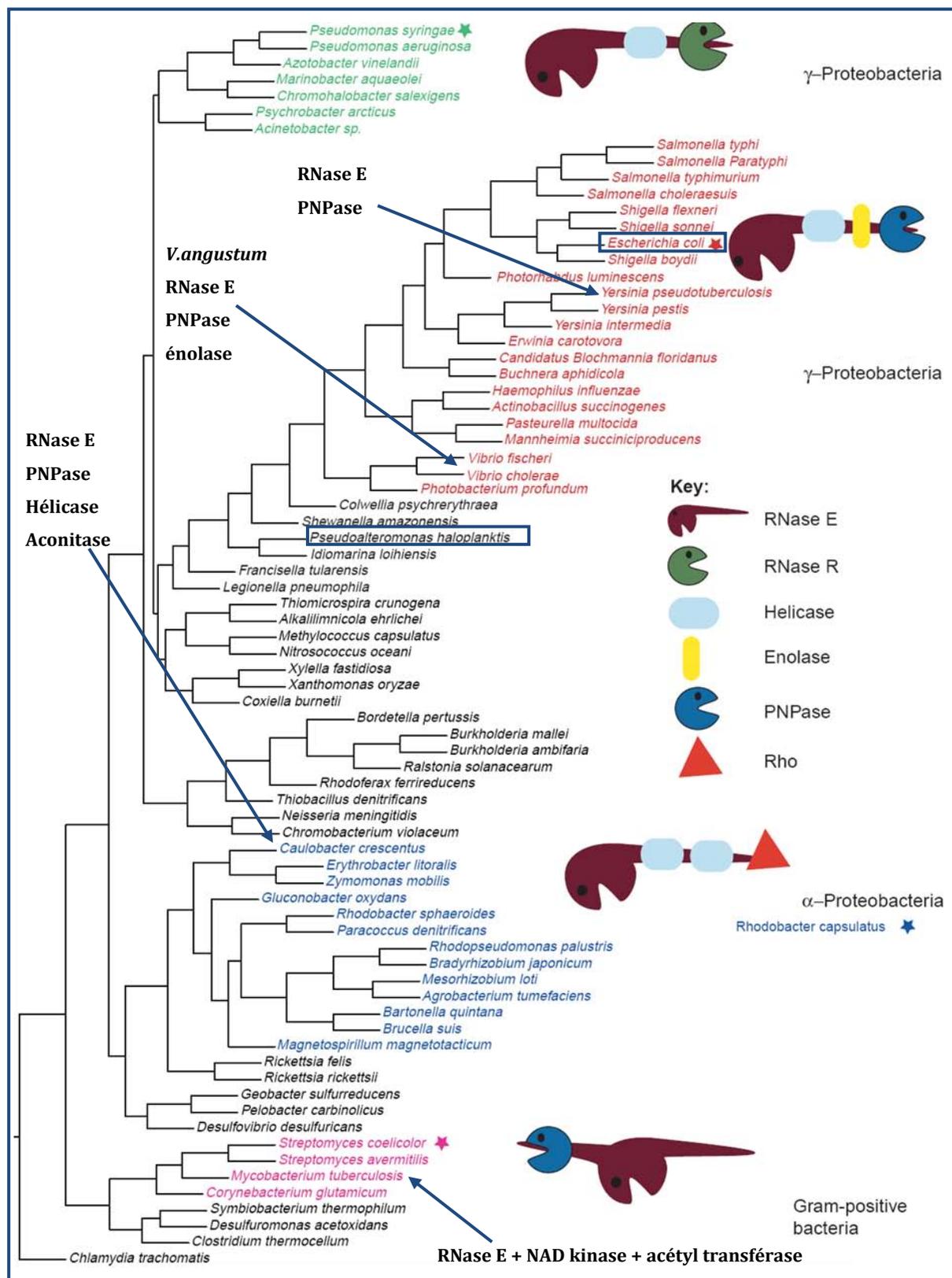


Figure 24 : Arbre phylogénétique basé sur les similarités de séquence de la RNase E. Un schéma des différents dégradosomes d'ARN identifiés chez les protéobactéries et bactéries à Gram positif est donné pour les bactéries indiquées par une étoile. Les bactéries de même couleur présenteraient une même composition du dégradosome d'ARN. Figure actualisée provenant de Marcaida et al, 2006. Les bactéries qui nous intéressent sont encadrées.

2

RESULTATS & DISCUSSIONS

Note : Cette partie résultats est divisée en trois sous parties. La première sous partie est la caractérisation de la RNase E et du dégradosome d'ARN de la bactérie P.haloplanktis qui ont fait l'objet de deux publications. Étant donné les résultats complémentaires de cette étude, les deux publications sont placées en annexe. Les deux sous parties restantes découlent des travaux effectués dans la première sous partie et ne sont pas encore publiés.

I. Identification du dégradosome d'ARN de *P.haloplanktis*

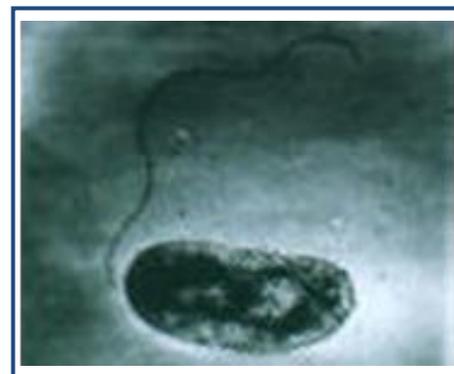
I.1. La bactérie *P.haloplanktis*

I.1.1. Caractéristiques

La bactérie *P.haloplanktis* est une γ -protéobactérie marine non pigmentée aérobie dont l'habitat est l'eau de mer. Elle a été isolée en 1992, proche de la station Dumont d'Urville de la terre Adélie, Antarctique (Birolo *et al.*, 2000). Anciennement *Moraxella* TAC 125, elle a été renommée *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 d'après l'étude phylogénétique basée sur l'ARN 16S, et fait partie de l'ordre des *Alteromonadales*, famille des *Pseudoalteromonadaceae* des γ -protéobactérie (Gauthier *et al.*, 1995). La bactérie *P.haloplanktis* est parmi les bactéries psychrophiles et psychrotolérantes les plus étudiées, pour comprendre les bases moléculaires de leur adaptation au froid. En effet, la souche *P.haloplanktis* TAC125 séquencée croit à 0 °C avec un temps de génération de 12h (Cartier *et al.*, 2010) tandis qu'*E.coli* est incapable de croître en dessous des 8 °C (Cartier *et al.*, 2010, Shaw *et al.*, 1971). La bactérie *P.haloplanktis* croit à des températures allant de 0 à 32 °C avec un optimum de croissance de 26 °C (Cartier *et al.*, 2010). C'est pour cela qu'elle est décrite dans ce manuscrit comme étant une bactérie psychrotolérante.

Figure 25 : La bactérie *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125.

C'est une γ -protéobactérie non pigmentée possédant un unique flagelle. Photo provenant du site de la base de données spécialisée PsychroList (Fang *et al.*, 2005). (<http://bioinfo.hku.hk/PsychroList/>).



Le séquençage du génome de *P.haloplanktis* TAC125 au Génoscope d'Evry a révélé quelques caractéristiques intéressantes et particulières comme l'absence du complexe cAMP-CAP ou encore l'absence du système PTS responsable du transport du sucre, présents chez les bactéries phylogénétiquement proches comme les *Shewanellas* et les *Vibrionales* (Medigue *et al.*, 2005). De plus, le séquençage a révélé quelques mystères de son adaptation au froid comme la présence de plusieurs désaturases putatives qui permettent d'augmenter la fluidité membranaire rigidifiée par le froid (Feller & Gerday, 2003). Le génome de *P.haloplanktis* contient deux chromosomes d'environ 3,2 et 0,6 Mb et un épisode pMtBL d'environ 4 Mb (Medigue *et al.*, 2005, Lanoil *et al.*, 1996). Le chromosome I porte la plupart des gènes essentiels. Le second chromosome de par ses caractéristiques, serait un plasmide acquis au cours de l'évolution et qui porte des gènes essentiels.

I.1.2. Acteurs de la dégradation chez *P.haloplanktis*

La bactérie *P.haloplanktis* possède sur le chromosome I l'orthologue du gène *rne* d'*E.coli* et code pour une grosse RNase E de 1071 acides aminés (vs 1061 acides aminés pour la RNase E d'*E.coli*). La RNase E de *P.haloplanktis* entière possède 52% d'identité de séquence avec la RNase E d'*E.coli*. La région N-terminale de la RNase de *P.haloplanktis* est fortement conservée et présente 78% d'identité de séquence avec la région N-terminale de la RNase E d'*E.coli*. En revanche, la région C-terminale de la RNase E de *P.haloplanktis* est fortement variable et aucune identité de séquence n'a été détectée. Ceci est en accord avec la forte variabilité de la séquence protéique observée précédemment pour la région non catalytique des homologues de la RNase E (Lee & Cohen, 2003). Par cette analyse de la séquence, la RNase E de *P.haloplanktis* appartient au type I de la famille des RNase E/G (**figure 9**).

En plus du gène *rne*, *P.haloplanktis* possède sur le chromosome I, les gènes qui codent pour les protéines orthologues aux composants du dégradosome d'ARN d'*E.coli* (**tableau 2**). Ces gènes sont bien conservés et ont des identités de séquence allant de 65% pour RhlB à 78 % pour l'énolase. Seule la protéine PNPase a fait l'objet d'une publication récemment (Evangelista *et al.*, 2009). La bactérie *P.haloplanktis* possède également sur le chromosome I, les gènes orthologues d'*E.coli* codant pour les protéines minoritaires du dégradosome d'ARN, les protéines que l'on retrouve dans les formes alternatives du complexe ou encore, les protéines présentes dans la composition d'autres dégradosomes d'ARN identifiés chez d'autres bactéries. C'est le cas des gènes qui codent pour DnaK, GroEL, la RNase R, la petite protéine Hfq, les protéines RraA et RraB, le facteur de terminaison de transcription Rho. En ce qui concerne les hélicases à ARN à boîte DEAD, leur nombre semblerait plus important chez les bactéries psychrophiles étant donné leur importance dans le métabolisme de l'ARN comme le déroulement des structures secondaires stables à basse température. La bactérie *P.haloplanktis* en possède 9 contre 5 pour *E.coli* (3 copies du gène *rhIE*, deux du gène *srmB*) (Cartier *et al.*, 2010).

En résumé, la bactérie *P.haloplanktis* possède ainsi les protéines connues impliquées dans le métabolisme de l'ARN qui peuvent potentiellement interagir avec la RNase E de *P.haloplanktis*.

Protéines	<i>E.coli</i>	<i>P.haloplanktis</i>	Identité/similarité de séquence
Région N-terminale de la RNase E	1-529	1-529	78%, 88%
Région C-terminale de la RNase E	530-1061	530-1071	-, -
RNase E	1061	1071	52 %, 63%
PNPase	734	708	71%, 84%
RhlB	420	421	65 %, 79%
Enolase	432	432	78%, 84%

Tableau 2 : Les orthologues des composants du dégradosome d'ARN d'*E.coli* chez *P.haloplanktis*.

Les pourcentages donnés sont obtenus par le programme BLAST (NCBI) en utilisant la séquence des protéines de *P.haloplanktis* récupérées sur la base de données PsychoList comme sonde contre le génome de d'*E.coli* à la recherche de protéines orthologues.

I.2. La RNase E de *P.haloplanktis*

I.2.1. Analyse de la structure primaire

La séquence protéique de la RNase E de *P.haloplanktis* a été analysée comme celle d'*E.coli*, en utilisant le programme PONDR® qui permet d'analyser la séquence en acides aminés, de prédire les régions intrinsèquement peu structurées et celles qui ont une forte propension à se structurer. Le profil de la RNase E de *P.haloplanktis* obtenu est montré dans la **figure 26A** et placé à côté du profil de la RNase E d'*E.coli* afin d'effectuer une comparaison directe (**figure 26B**). Le programme PONDR® prédit que la région N-terminale de la RNase E de *P.haloplanktis* est globalement structurée tandis que la région C-terminale est majoritairement peu structurée comme pour la RNase E d'*E.coli*. Cependant, on observe dans la région C-terminale, de courts segments prédits pour avoir une forte propension à se structurer (région A, 1, 2 et 3 de la **figure 26A**). Le segment A correspond au motif A présent chez la RNase E d'*E.coli* qui forme une hélice α responsable de l'interaction de la RNase E avec la membrane et conservé chez les γ -protéobactéries notamment *P.haloplanktis* (Khemici et al., 2008). Quant aux

trois autres segments prédits (1, 2, et 3), leurs séquences en acides aminés ne correspondent à aucun des microdomaines identifiés chez la RNase E d'*E.coli* (**figure 26**).

Chez la RNase E d'*E.coli*, la région C-terminale contient deux sites de fixation de l'ARN : l'AR-RBD et l'AR2 (**figure 26B**). Ces deux segments sont aussi présents chez la RNase E de *P.haloplanktis* lors de l'analyse visuelle et par alignement de séquence (**figure 26A**).

- Pour l'AR-RBD de la RNase E de *P.haloplanktis*, il s'étend de 587 à 663 acides aminés et contient 19 arginines sur 77 acides aminés, ce qui fait un pourcentage de 24.6% (26 arginine sur 85 acides aminés, soit 30.6 % pour la RNase E d'*E.coli*). Cependant, l'analyse par le programme COILS, montre que l'AR-RBD se situe en amont de la structure en coiled-coil prédite (**figure 27A**) contrairement à la RNase E d'*E.coli* où la structure en coiled-coil se situe au niveau de l'AR-RBD (Callaghan et al., 2004) (**figure 27A**). Pour la RNase E d'*E.coli*, le rôle du segment prédit reste inconnu et aucune donnée ne permet de dire s'il existe un lien entre cette structure prédite et l'AR-RBD. Dans le cas de la RNase E de *P.haloplanktis*, l'AR-RBD et la structure en coiled-coil prédite ne concernent pas les mêmes acides aminés et semblent être indépendants. Ceci est une première différence observée entre les deux RNase E.

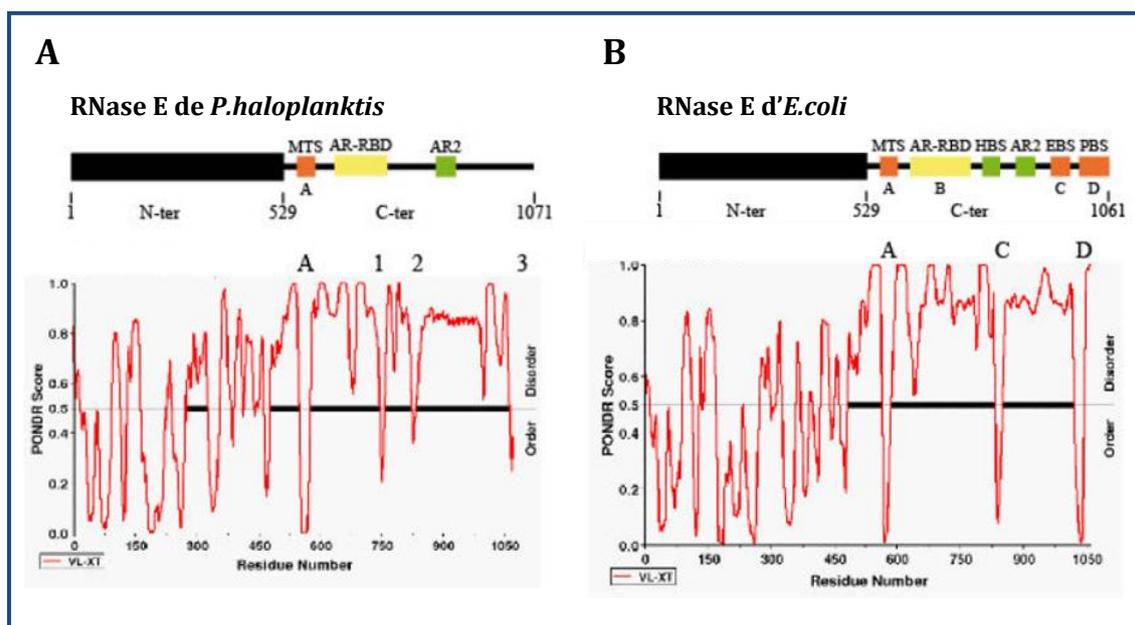


Figure 26 : Structures primaires et analyses PONDR® des RNase E de *P.haloplanktis* (A) et d'*E.coli* (B).

Structures primaires des RNase E. La région N-terminale catalytique est représentée par le rectangle noir. La région C-terminale est représentée par le trait noir. MTS, Membrane Targeting Sequences, AR-RBD, Arginine Rich RNA Binding Domain. AR2, Arginine Rich 2. HBS, Helicase Binding Site. EBS, E nolase Binding Site. PBS, PNPase Binding Site. Sous chaque structure primaire, le résultat de l'analyse PONDR® est donné. Les régions RISP correspondent aux régions ayant un score de moins de 0,5 (ligne horizontale noire épaisse). Les segments A, B et C chez la RNase E d'*E.coli* sont les microdomaines d'interactions avec la membrane, l'énolase et la PNPase respectivement.

- En ce qui concerne l'AR2, la **figure 27B** montre un morceau d'alignement de séquences des homologues de la RNase E des bactéries des ordres des *Alteromonadales* et des *Entérobactériales* dont font partie *P.haloplanktis* et *E.coli* respectivement. L'alignement de séquences montre que l'AR2 est fortement conservé au-delà des *Entérobactériales* car l'AR2 est retrouvé chez les *Alteromonadales*. Sur un « core » commun de 18 acides aminés, 13 sont strictement conservés et 5 sont similaires. La conservation de l'AR2 présent dans une région fortement variable de la RNase E, suggère un rôle important de ce segment qui reste inconnu à ce jour.

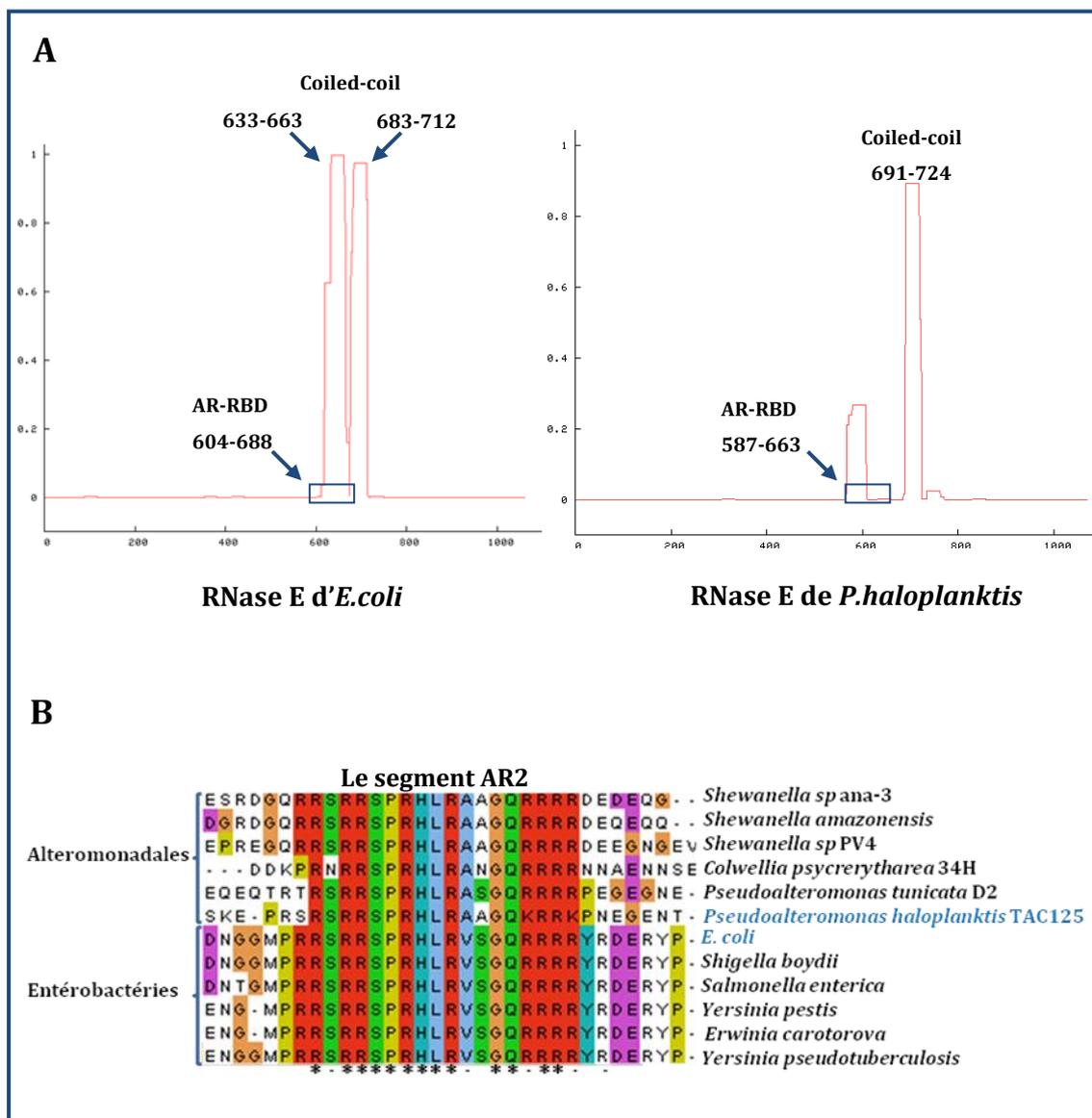


Figure 27 : Analyse des deux sites de fixation de l'ARN chez la RNase E de *P.haloplanktis*.

(A) Prédiction de la présence de structure en coiled-coil par le programme COILS (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html) pour la RNase E d'*E.coli* et celle de *P.haloplanktis*. **(B)** Morceau d'alignement de séquences des homologues de la RNase E des *Alteromonadales* et des *Entérobactériales*. Les noms des bactéries dont la RNase E a été utilisée pour cet alignement sont indiqués à gauche de l'alignement. Les astérisques correspondent aux acides aminés strictement conservés tandis que les points correspondent aux acides aminés similaires. L'alignement de séquence a été effectué en utilisant le logiciel ClustalW.

En résumé, l'analyse de la structure primaire de la RNase E de *P.haloplanktis* a révélé la présence des motifs A, AR2 et AR-RBD. Cependant, aucun des sites d'interaction protéines-protéines caractérisés chez la RNase E d'*E.coli* (sites de fixation de RhlB, éolase et PNPase), n'a été trouvé chez la RNase E de *P.haloplanktis*.

I.2.2. Production d'anticorps anti-RNase E de *P.haloplanktis*

Dans le but d'identifier le dégradosome d'ARN, la stratégie choisie est de produire des anticorps anti-RNase E de *P.haloplanktis* pour réaliser des immunoprécipitations sur des fractions protéiques. Ces fractions protéiques sont obtenues par la purification de la RNase E en conditions natives et suivant le protocole mis au point pour la purification de la RNase E d'*E.coli* (Carpousis *et al.*, 2001). Ceci permettrait de voir les protéines qui interagissent avec la RNase E pour former le dégradosome d'ARN de *P.haloplanktis*. J'ai entamé ces travaux lors de la préparation du M2R Microbiologie et ils sont brièvement décrits pour la compréhension de la partie résultats de la thèse.

Le gène *rne* codant pour la RNase E de *P.haloplanktis* et ses signaux d'expression, ont été amplifiés à partir d'une préparation contenant le génome de *P.haloplanktis*. Le produit d'amplification a été cloné dans le vecteur d'expression pET15b, de manière à pouvoir surexprimer la protéine RNase E de *P.haloplanktis* étiquetée en N-terminal par une étiquette histidine. Le plasmide pSAB1 généré est ensuite transféré dans les souches BL21(DE3) afin d'induire l'expression de la RNase E de *P.haloplanktis* chez *E.coli*. La RNase E de *P.haloplanktis* exprimée a une masse moléculaire apparente sur gel SDS-PAGE, après induction par l'IPTG, d'environ 200 kDa tandis que son poids moléculaire est estimé à 118 kDa (**figure 28A**). Ceci rappelle le défaut de migration d'autres RNase E caractérisées comme celles d'*E.coli* ou de *R.capsulatus* (Carpousis *et al.*, 1994, Jager *et al.*, 2001). Ce défaut serait dû à la région C-terminale intrinsèquement peu structurée riche en prolines et acides aminés hydrophiles qui empêcheraient la fixation du SDS important pour la migration sur gel SDS-PAGE.

La RNase E de *P.haloplanktis* est ensuite purifiée en conditions dénaturantes sur colonne de Nickel (**figure 28B**) puis envoyée à Eurogentec pour produire des anticorps dirigés spécifiquement contre la RNase E de *P.haloplanktis*. Les anticorps produits testés sur des extraits bruts de *P.haloplanktis* et d'*E.coli*, reconnaissent la RNase E de *P.haloplanktis* et aussi la RNase E d'*E.coli* (**figure 28C**). Les anticorps anti-RNase E de *P.haloplanktis* ont été purifiés par affinité pour montrer qu'ils reconnaissent spécifiquement la RNase E de *P.haloplanktis* (**figure 28D**).

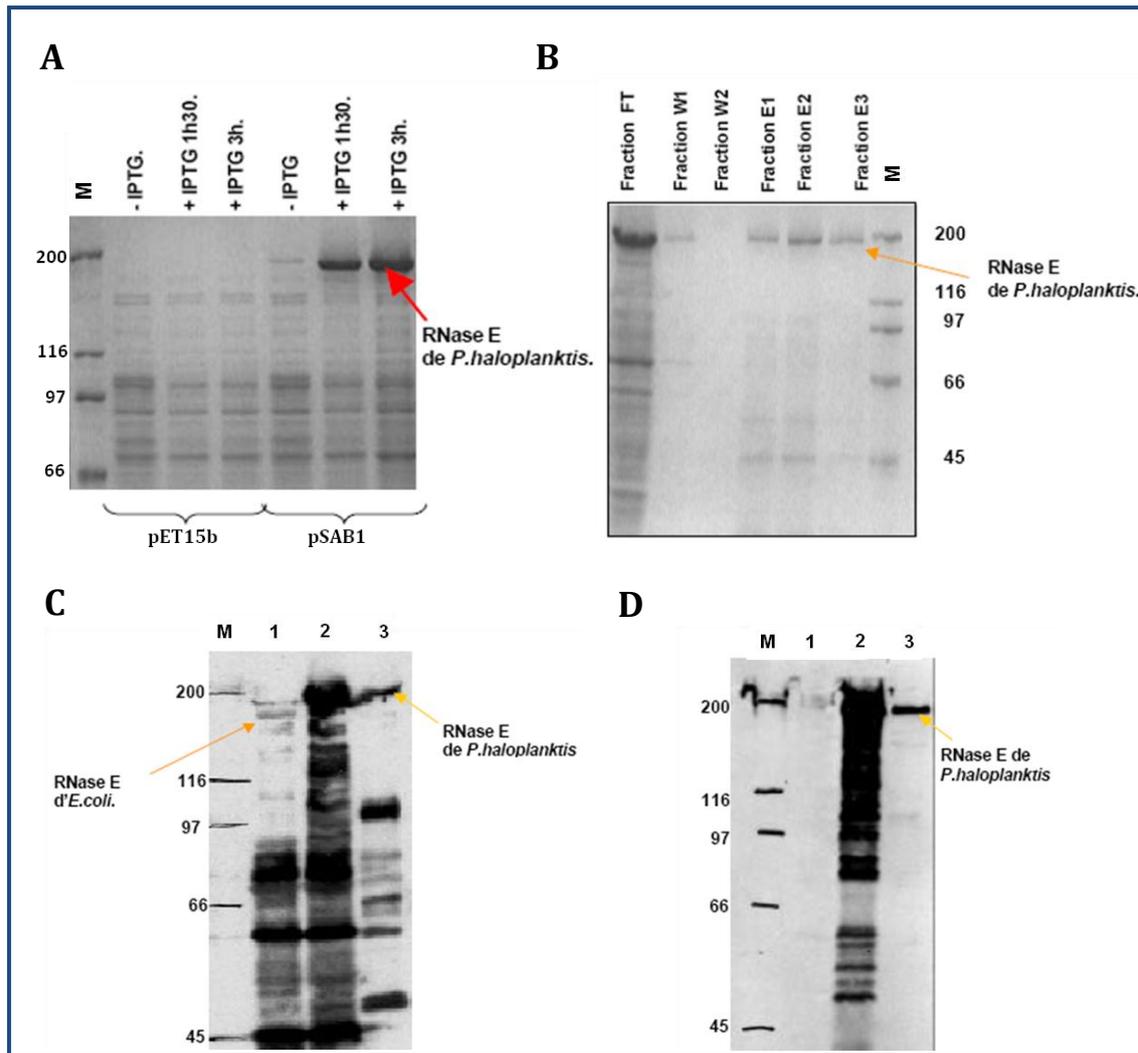


Figure 28 : Surexpression, purification et immunodétection de la RNase E de *P.haloplanktis*. **(A)** Gel SDS-PAGE révélé au bleu de Coomassie. L'expression chez *E.coli* de la RNase E de *P.haloplanktis* est induite par l'ajout de l'IPTG. **(B)** Gel SDS-PAGE révélé au bleu de Coomassie montrant la purification de la RNase E de *P.haloplanktis* en conditions dénaturantes sur colonne de Nickel grâce à la présence d'une étiquette histidine en N-terminale. MM : marqueur moléculaire. FT : Extrait brut passé au travers de la colonne. W1 et W2 : lavage de la colonne avec 30 mM Imidazole. E1, E2 et E3, éluions en utilisant 300 mM imidazole. Immunodétection de la RNase E de *P.haloplanktis* en utilisant les anticorps anti-RNase E avant **(C)** ou après **(D)** purification par affinité. Piste1, extraits bruts d'*E.coli* surexprimant la RNase E d'*E.coli*. Piste 2, extraits bruts d'*E.coli* surexprimant la RNase E de *P.haloplanktis*. Piste 3, extraits bruts de *P.haloplanktis*. M : marqueur moléculaire (en kDa).

1.2.3. Sensibilité de la RNase E de *P.haloplanktis* à la protéolyse

Lors de la préparation de fractions protéiques à partir de cultures de *P.haloplanktis* en suivant le protocole mis au point pour la RNase E d'*E.coli* (Carpousis et al., 2001), il a été observé au cours des différentes étapes de purification, une perte de rendement d'obtention de la RNase E de *P.haloplanktis* (**figure 29A**). Cette perte de rendement serait due à la sensibilité de la RNase E de *P.haloplanktis* à la

protéolyse. On observe également sur l'immunodétection, la présence d'une bande qui migre au-dessus de 116 kDa qui est fortement reconnue par l'anticorps anti-RNase E de *P.haloplanktis*. Cette bande correspond à un produit de protéolyse de la RNase E de *P.haloplanktis* confirmée par la suite par la spectroscopie de masse.

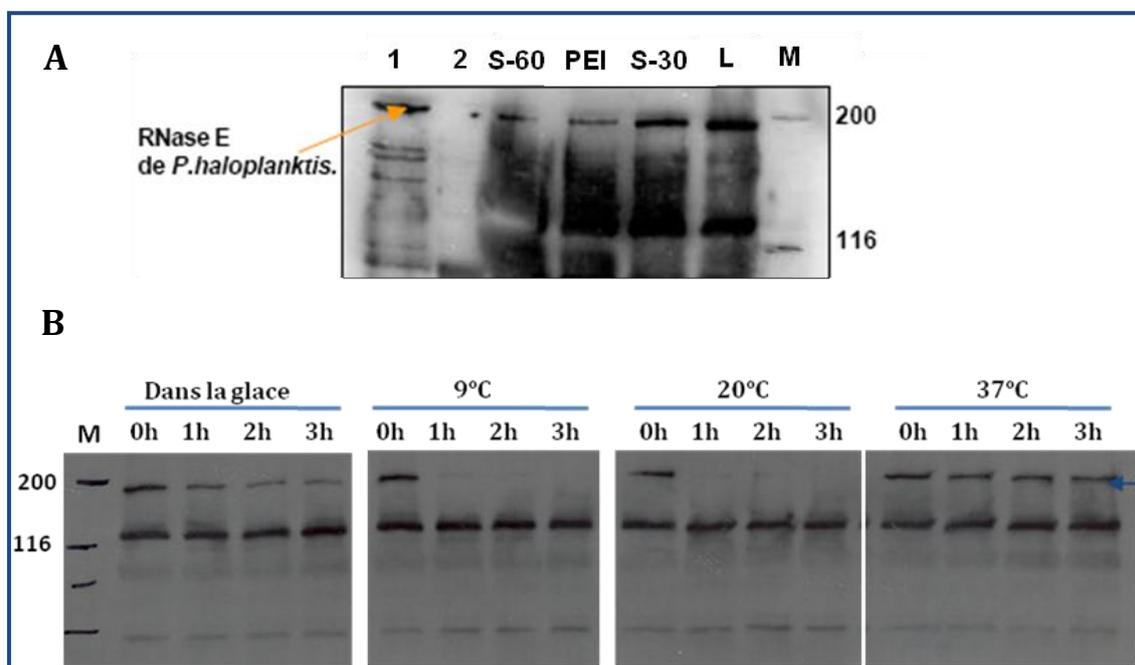


Figure 29 : Sensibilité de la RNase E de *P.haloplanktis* à la protéolyse.

(A) Des échantillons ont été prélevés au cours des étapes de la préparation des extraits protéiques. L : lysat. S-30 : échantillon prélevé après centrifugation une heure à 30 000g. PEI : échantillon prélevé après précipitation au PEI (PolyÉthylèneImine). S-60 : échantillon prélevé après précipitation au sulfate d'ammonium à 60%. 1 : Extrait brut de *P.haloplanktis*, 2 : échantillon du surnageant après précipitation au sulfate d'ammonium à 60%. MM : marqueur moléculaire (en kDa). (B) Effet de la température sur la stabilité de la RNase E de *P.haloplanktis*. Des fractions protéiques de *P.haloplanktis* préparées comme décrits dans (A) sont incubées dans la glace ou dans un bain à 9, 20 ou 37 °C. Des échantillons sont prélevés toutes les heures puis migrés sur gel SDS-PAGE et transférés sur membrane pour une révélation avec l'anticorps anti-RNase E de *P.haloplanktis*. La flèche bleue montre la RNase E de *P.haloplanktis*. M : marqueur moléculaire (en kDa).

Il est connu que la RNase E d'*E.coli* est une protéine extrêmement sensible à la protéolyse et l'utilisation d'une armada d'inhibiteurs de protéases ainsi que le travail à basse température pour inactiver les protéases mésophiles, permettent de réduire le taux de protéolyse de la RNase E (Carpousis et al., 2001, Carpousis et al., 1994). En ce qui concerne la RNase E de *P.haloplanktis* et comme le montre la (figure 29B), la RNase E de *P.haloplanktis* n'est pas stable à 9 et 20 °C, un peu plus stable à 0 °C. En revanche, elle est stable à 37 °C (figure 29B). Les protéases psychrotolérantes de *P.haloplanktis* sont actives à basses températures et diminuent la stabilité de la RNase E. De ce fait, la RNase E de *P.haloplanktis* est extrêmement sensible à la protéolyse mais aussi à la température.

Afin de voir si les protéases de *P.haloplanktis* sont spécifiques de la RNase E de *P.haloplanktis*, des fractions protéiques de *P.haloplanktis* sont mélangées à des fractions protéiques d'*E.coli* obtenues comme décrit dans la **figure 29A**. Les fractions mélangées sont laissées dans la glace et des échantillons sont prélevés toutes les heures puis analysés par immunodétection en utilisant des anticorps anti-RNase E de *P.haloplanktis* et anti-RNase E d'*E.coli* (**figure 30**). La RNase E d'*E.coli* est stable au cours du temps (**figure 30A**) tandis que la RNase E de *P.haloplanktis* ne l'est pas (**figure 30B**). Les protéases de *P.haloplanktis* seraient spécifiques de la RNase E de *P.haloplanktis*.

Étant donné la forte sensibilité de la RNase E de *P.haloplanktis* aux protéases, j'ai entamé en début de thèse l'amélioration du protocole de purification de la RNase E afin d'augmenter la stabilité de la RNase E de *P.haloplanktis*. Plusieurs alternatives ont été testées comme l'utilisation de nouveaux inhibiteurs de protéases comme l'EGTA, chélateur d'ions divalents (Ca^{2+}) ou augmenter leurs concentrations finales lors de leur utilisation. Cependant, très peu d'amélioration n'a été observée. Des immunoprécipitations réalisées à 37° C où la RNase E de *P.haloplanktis* est stable (**figure 29B**) ont été tentées, mais dans ce cas, des interactions non spécifiques sont observées qui seraient dues à la dénaturation des protéines de *P.haloplanktis* par la chaleur.

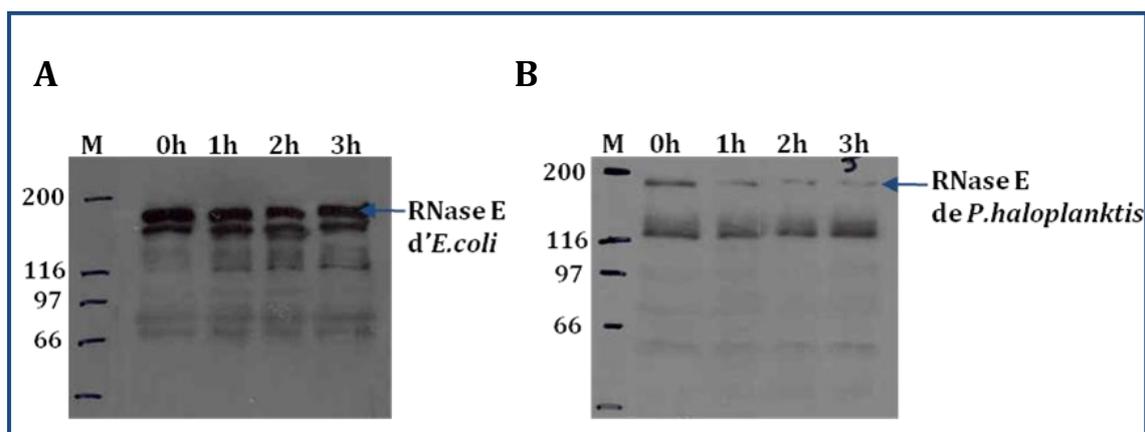


Figure 30 : Spécificité des protéases de *P.haloplanktis*.

Immunodétection de la RNase E d'*E.coli* (**A**) et de *P.haloplanktis* (**B**). Les fractions mélangées contenant la RNase E d'*E.coli* et de *P.haloplanktis* sont incubées dans la glace en chambre froide plusieurs heures. Des échantillons sont prélevés toutes les heures, migrés sur gel SDS-PAGE et révélés par immunodétection en utilisant Ac-RNase E de *P.haloplanktis* 1/10 000, Ac-RNase E de *E.coli* 1/5000. M : marqueur moléculaire (en kDa).

I.3. Identification du dégradosome d'ARN

I.3.1. Clonage et immunopurification de la RNase E de *P.haloplanktis*

Étant donné la forte sensibilité de la RNase E de *P.haloplanktis* à la protéolyse, il est difficile d'identifier le dégradosome d'ARN de *P.haloplanktis* en utilisant les méthodes employées pour l'identification du dégradosome d'*E.coli*. La nouvelle stratégie choisie est de rajouter à l'extrémité C-terminale de la RNase E une étiquette FLAG puis de l'exprimer chez *P.haloplanktis* afin de réaliser des immunopurifications pour voir les protéines interagissant avec la RNase E de *P.haloplanktis*. Cette stratégie a déjà été utilisée auparavant pour la RNase E d'*E.coli* (Miczak et al., 1996, Morita et al., 2004). Le protocole utilisé dérive du protocole de Morita et al, 2004 (matériels et méthodes). Lorsque des extraits de *P.haloplanktis* sont produits en suivant ce protocole, la RNase E endogène de *P.haloplanktis* est stable dans les extraits (**figure 31**). Il semblerait que dans ce protocole où la lyse de la cellule est rapide et efficace, les protéases psychrotolérantes de *P.haloplanktis*, sont éliminées des extraits cellulaires après centrifugation.

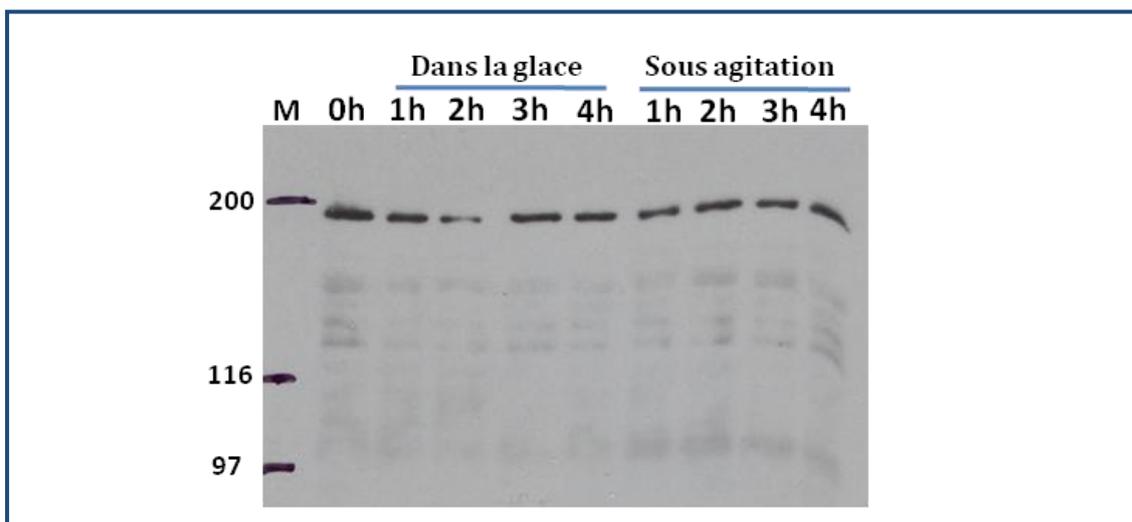


Figure 31 : Stabilité de la RNase E-FLAG chez *P.haloplanktis* dans les extraits préparés.

Immunodétection de la RNase E de *P.haloplanktis* dans les extraits incubés dans la glace ou en chambre froide sous agitation (qui mime les conditions des immunopurifications). M : marqueur moléculaire (en kDa).

Dans un premier temps, l'étiquette FLAG a été rajoutée par « cross over PCR » à l'extrémité C-terminale de la RNase E de *P.haloplanktis*. Ensuite, le gène *rneflag* a été cloné dans un vecteur conjugatif, car *P.haloplanktis* est une bactérie transformable uniquement par conjugaison. Le vecteur de conjugaison utilisé a été construit dans le laboratoire de Marc Dreyfus. Il s'agit du vecteur

conjugatif pJB3 présent chez *E.coli* de 5 à 7 copies par chromosome et qui dérive du plasmide automobilisable RK2 originalement identifié chez *Klebsiella aerogenes* (Blatny *et al.*, 1997). À ce plasmide pJB3, l'origine de réplication ARS (Autonomous Replication Sequence) du plasmide résident pMtBL de *P.haloplanktis* a été rajoutée, pour générer le pIB3. Ce vecteur navette conjugatif pIB3 est ainsi capable de se répliquer à la fois chez *E.coli* et chez *P.haloplanktis*.

Le gène *rneflag* a été cloné dans le vecteur de conjugaison pIB3 pour générer le pSAB17. Puis, ce vecteur a été transféré chez *E.coli* puis mobilisé vers *P.haloplanktis* par conjugaison à température ambiante. La sélection des clones de *P.haloplanktis* portant le pSAB17 est effectuée sur milieu additionné d'ampicilline et incubé à 4 °C pour empêcher la croissance d'*E.coli*.

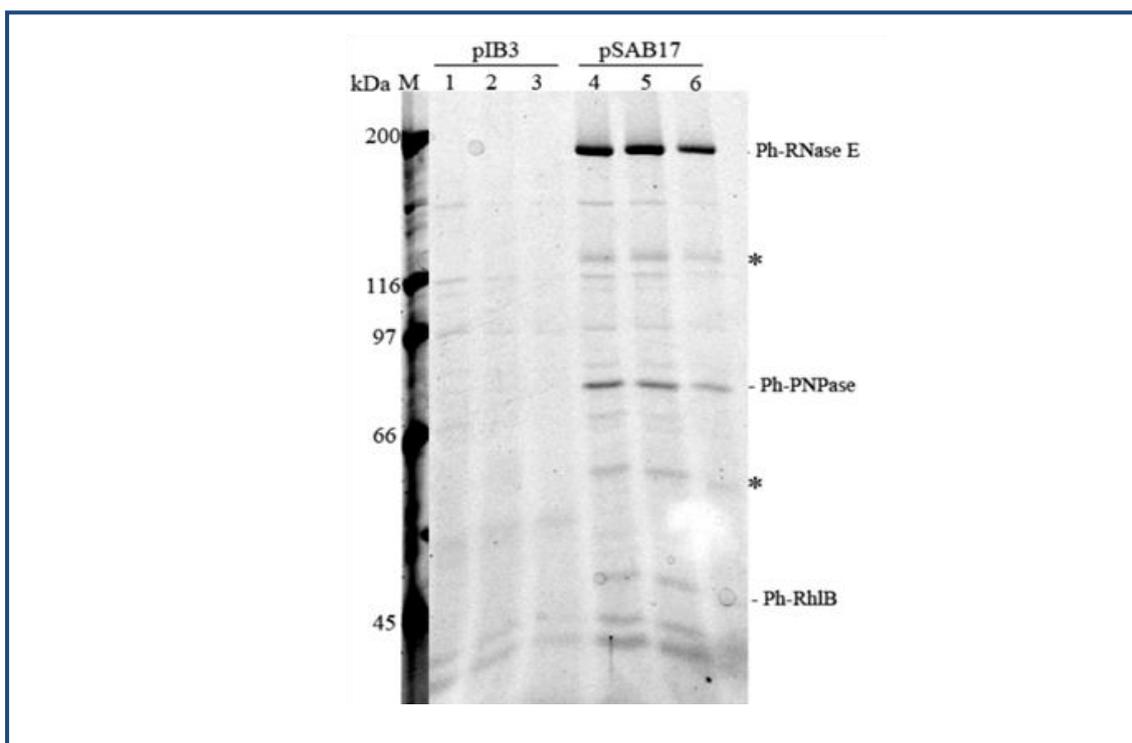


Figure 32 : Identification du dégradosome d'ARN de *P.haloplanktis*.

Gel SDS-PAGE révélé au SyproOrange et montrant deux immunopurifications effectuées avec l'anticorps anti-FLAG sur des extraits cellulaires de *P.haloplanktis* portant soit le pIB3 (vecteur vide) ou le pSAB17 (exprimant la RNase E-FLAG). Les pistes 1, 2 et 3 correspondent aux éluions effectuées pour chaque immunopurification. M : marqueur moléculaire.

I.3.2. Immunopurification et spectroscopie de masse

Une fois la RNase E-FLAG exprimée chez *P.haloplanktis*, des immunopurifications ont été réalisées en suivant le protocole décrit dans matériels et méthodes. Brièvement, *P.haloplanktis* est cultivée à 15 °C jusqu'à une densité d'optique de 0,6. Les cellules sont ensuite récoltées par centrifugation. Après lavage, les cellules sont resuspendues dans un tampon de lyse puis congelées et décongelées plusieurs fois afin de les lyser efficacement. Après centrifugation, des anticorps anti-

FLAG couplés à des billes d'agarose sont ajoutés au surnageant et le tout est incubé deux heures dans la chambre froide sous agitation. La RNase E-FLAG est purifiée sur minicolonne de chromatographie et éluée grâce à l'ajout du peptide FLAG compétitif. La même expérience contrôle est effectuée avec la souche de *P.haloplanktis* portant le vecteur vide pIB3. Le résultat est montré dans la **figure 32**. On observe dans les fractions pSAB17 la présence de quatre bandes protéiques absentes dans les pistes contrôle pIB3. Ces bandes ont été découpées et identifiées par spectroscopie de masse. Les bandes d'environ 80 et 50 kDa sont identifiées comme étant la PNPase et RhlB avec des pourcentages de couverture de 47 et 20 % respectivement. Ces résultats montrent que le dégradosome d'ARN de *P.haloplanktis* est composé d'au moins de la RNase E, de la PNPase et de RhlB. En revanche, aucune interaction n'a été observée pour l'énolase. Ces résultats sont confirmés par les immunodétections en utilisant les anticorps anti-PNPase, anti-énolase d'*E.coli*. De plus, aucune interaction n'a été observée pour les protéines minoritaires du dégradosome d'*E.coli* recherchées dans les fractions. La même composition du dégradosome d'ARN chez *P.haloplanktis* a été observée lorsque les immunopurifications sont effectuées à partir d'extraits de *P.haloplanktis* cultivés à 4 et 26 °C. La RNase E de *P.haloplanktis* recrute ainsi la PNPase et RhlB au sein du dégradosome d'ARN de *P.haloplanktis*. Cependant, l'analyse de la structure primaire par alignements de séquence n'a pas détecté de microdomaines d'interaction correspondant à ces protéines similaires à ceux présents chez la RNase E d'*E.coli*.

I.3.3. Construction de variants de la RNase E de *P.haloplanktis*

Afin de localiser et caractériser les microdomaines responsables des interactions entre la RNase E et les protéines RhlB et PNPase, plusieurs variants tronqués de la RNase E de *P.haloplanktis* ont été construits à partir du plasmide pSAB17 par reverse PCR (**figure 33A**). Ces variants ont été introduits chez *P.haloplanktis* pour effectuer des immunopurifications. L'immunoprécipitation du variant RNase E Δ 493 dépourvue de la région C-terminale montre l'absence des protéines PNPase et RhlB, présentes dans la fraction de l'immunopurification avec la RNase E entière (**figure 33B**). Ceci montre que les sites de fixation de RhlB et de la PNPase se situent dans la région C-terminale de la RNase E de *P.haloplanktis*. En revanche, on observe dans les immunopurifications en utilisant les autres variants de la RNase E de *P.haloplanktis*, la présence de la RNase E endogène de *P.haloplanktis* qui interagit avec les RNase E recombinantes (**figure 33C**, seule l'immunopurification du variant RNase E Δ 34 est montrée). On observe également la présence dans l'immunoprécipitation avec le variant RNase E Δ 34, la présence des protéines RhlB et PNPase. Étant donné la présence de la RNase E endogène de *P.haloplanktis*, il est difficile par cette approche de localiser les sites d'interaction entre RNase E et les protéines RhlB et PNPase.

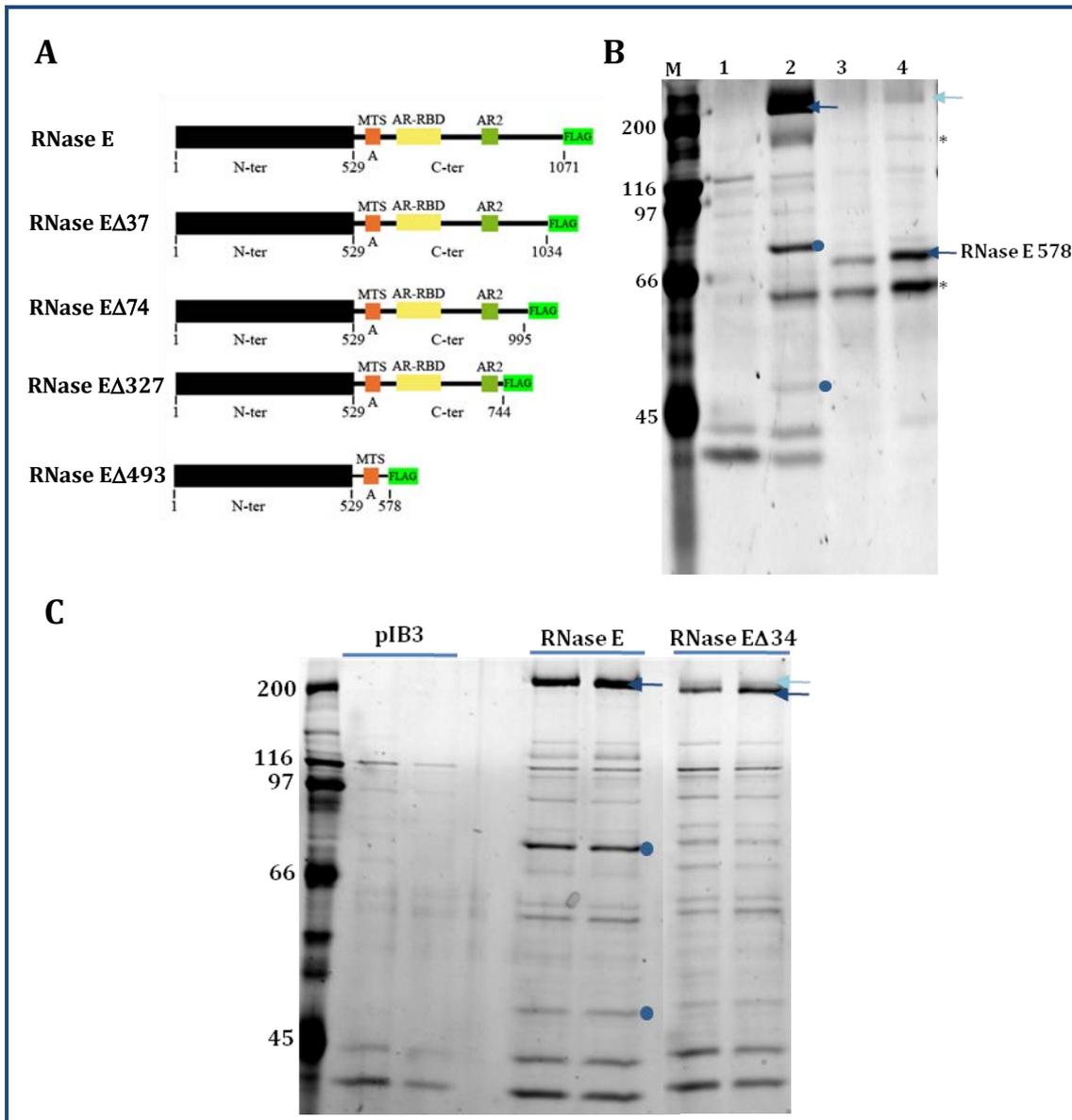


Figure 33 : Immunopurifications des variants de la RNase E de *P.haloplanktis*.

(A) Les différents variants construits à partir de la RNase E entière de *P.haloplanktis*. **(B)** Gel SDS-PAGE révélé au SyproOrange montrant l'immunopurification sur des extraits de *P.haloplanktis* portant : piste 1, le pIB3, Piste 2, le pSAB17, piste 3 et 4, deux clones du variant RNase EΔ493. Les ponts bleus indiquent les bandes protéiques de la PNPase et RhlB. Les astérisques correspondent aux produits de protéolyse de la RNase E. **(C)** Gel SDS-PAGE révélé au SyproOrange montrant les immunoprécipitations réalisées sur des extraits de *P.haloplanktis* portant le pIB3, le pSAB17, et le variant RNase EΔ34. Les flèches bleu foncé montrent les RNase E recombinantes et la flèche bleu ciel, la RNase E endogène de *P.haloplanktis*. M : marqueur moléculaire.

L'ensemble des résultats présentés dans cette section, montre que la bactérie *P.haloplanktis* possède un dégradosome d'ARN composé d'au moins de la RNase E, de RhlB et de la PNPase. Quant à l'énolase, elle ne semble pas faire partie du complexe. Par conséquent, ce dégradosome d'ARN est très similaire à celui d'*E.coli* si on exclut l'interaction avec l'énolase. Pourtant, ces deux bactéries sont éloignées phylogénétiquement et n'ont pas la même niche écologique. Étant donné que la bactérie

P.haloplanktis est pour l'instant, une bactérie génétiquement non modifiable, il est difficile de déterminer les sites des interactions protéines-protéines présents chez la RNase E qui permettent de recruter la PNPase et RhlB au sein du dégradosome d'ARN de *P.haloplanktis*.

I.4. Tests de complémentation chez *E.coli*

L'objectif de cette section est de voir d'une part, si la RNase E de *P.haloplanktis* est capable de compléter la RNase E d'*E.coli* chez *E.coli* et d'autre part, voir si la RNase E de *P.haloplanktis* est capable d'améliorer la croissance d'*E.coli* à basse température, comme c'est le cas pour la protéine chaperonne de GroES de la bactérie psychrophile *Oleispira antarctica* (Ferrer *et al.*, 2003). La stratégie choisie pour effectuer les tests de complémentation est d'utiliser les souches KSL2000 (Lee *et al.*, 2002) où le gène *rne* a été inactivé par l'insertion d'une cassette chloramphénicol (voir matériels et méthodes). Étant donné que la RNase E d'*E.coli* est essentielle, la viabilité de la cellule est restaurée par la présence d'un plasmide (pBAD-*rne*) de faible nombre de copies qui porte le gène *rne* sous le contrôle du promoteur inductible par l'arabinose. La souche KSL2000 est de ce fait viable uniquement en présence de ce sucre.

I.4.1. Expression de la RNase E sous ses propres signaux d'expression

Afin de voir si la RNase E de *P.haloplanktis* est capable de restaurer la viabilité de la souche KSL2000 en absence d'arabinose, le gène *rne* de *P.haloplanktis* étiqueté FLAG et ses signaux d'expression, ont été clonés dans le vecteur pSAB11 pour générer le pSAB15. Ce plasmide a été introduit chez les souches KSL2000 par la procédure de remplacement de plasmide (**figure 34A**). Les souches KSL2000 portant le pBAD-*rne* ont été transformées par ce plasmide. Les plasmides pSAB15 et pBAD-*rne* portent la même origine de répllication ce qui entraîne une incompatibilité entre ces deux plasmides. La sélection du pSAB15 par l'apport de la résistance à la spectinomycine, va permettre de remplacer le pBAD-*rne* qui est perdu au cours des générations. Comme contrôle positif, j'ai utilisé le pVK200 qui porte le gène *rne* d'*E.coli* étiqueté FLAG. Les tests de complémentation ont été effectués à plusieurs températures : 15, 25, 30, 37 et 42 °C.

Les résultats obtenus montrent que la RNase E de *P.haloplanktis* est capable de compléter très faiblement la RNase E d'*E.coli* uniquement à 25 °C (**figure 34B**). Il faut environ 6 jours pour la formation d'une colonie. Ce défaut de complémentation est indépendant de l'utilisation de l'étiquette FLAG puisque les mêmes résultats ont été obtenus avec la RNase E de *P.haloplanktis* exprimée chez *E.coli* sans étiquette FLAG.

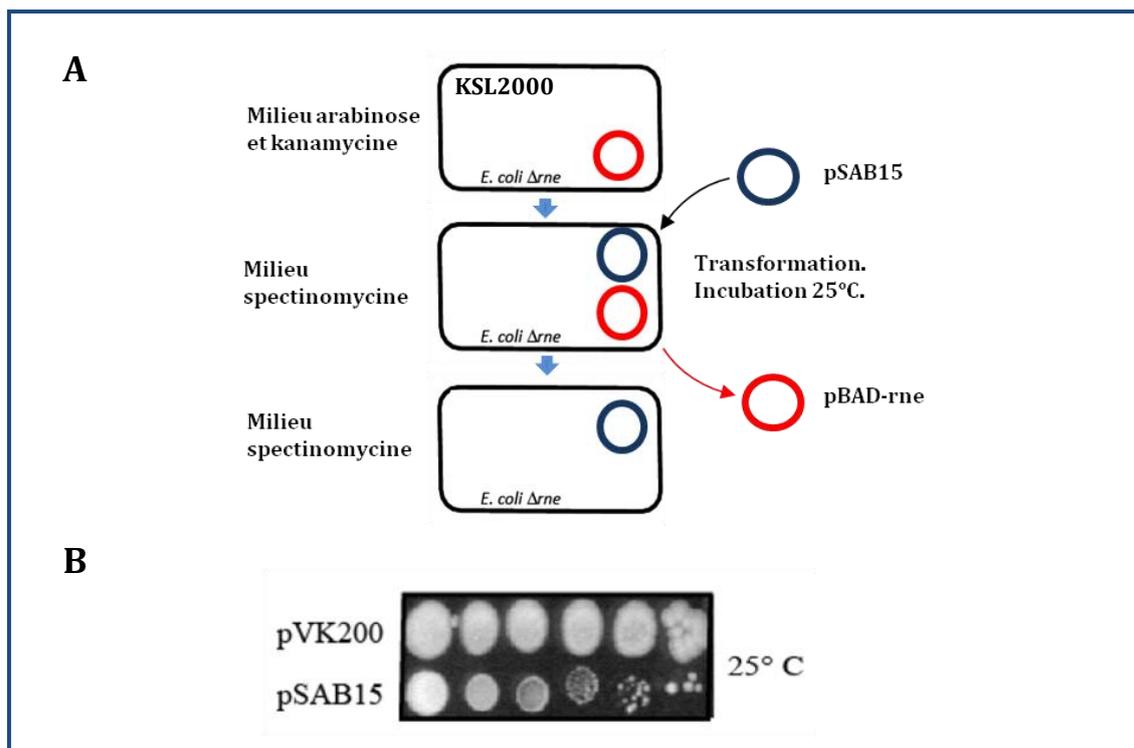


Figure 34 : Procédure de remplacement de plasmide et tests de complémentation.

(A) La souche KSL2000 où le gène *rne* a été délété, porte le plasmide pBAD-*rne* qui maintient la viabilité cellulaire. Cette souche est transformée à 25 °C par le plasmide pSAB15 et incubée à 25 °C sur milieu spectinomycine afin de sélectionner le pSAB15 et perdre le pBAD-*rne*. Le même protocole est suivi pour le pVK200. **(B)** Complémentation de la RNase E d'*E.coli* par la RNase E de *P.haloplanktis* à 25 °C. Les clones obtenus portant le pSAB15 ou le pVK200 sont resuspendus dans du BU (tampon physiologique). Des dilutions ont été effectuées, puis chaque dilution est étalée en spot sur milieu solide et incubée de 15 à 42 °C. Le résultat montré est obtenu après incubation à 25 °C.

La quantité de la RNase E de *P.haloplanktis* exprimée chez *E.coli* a été analysée par immunodétection en utilisant un anticorps anti-FLAG et en la comparant avec la quantité diluée de RNase E d'*E.coli* étiquetée FLAG exprimée à partir du plasmide pVK200. La RNase E de *P.haloplanktis* est très faiblement exprimée (**figure 35**) et sa quantité chez *E.coli* est au moins 32 fois plus faible que celle de la RNase E d'*E.coli* (en comparant la piste 7 avec la piste 6 où la RNase E d'*E.coli* a été diluée au 1/32ème). Par conséquent, la faible complémentation observée à 25 °C pourrait être due à la faible expression de la RNase E de *P.haloplanktis* chez *E.coli*.

Étant donné que les promoteurs de *P.haloplanktis* ont une séquence consensus qui ressemble fortement à celle d'*E.coli* (Duilio *et al.*, 2004), ils devraient être actifs chez *E.coli*. Par conséquent, il est très peu probable que la faible expression de la RNase E de *P.haloplanktis* soit liée à l'utilisation d'un système hétérologue où un promoteur d'une bactérie psychrotolérante est introduit chez *E.coli*. Dans la région en amont du gène *rne* de *P.haloplanktis* (environ 700 pb) se trouvent les signaux d'expression de la RNase E de *P.haloplanktis*. Chez *E.coli*, en amont du gène *rne*, se trouve la région en 5'UTR impliquée dans la régulation de l'expression de la RNase E. La faible expression de la

RNase E de *P.haloplanktis* chez *E.coli* pourrait venir d'un dysfonctionnement au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel de l'expression du gène *rne* de *P.haloplanktis* chez *E.coli*.

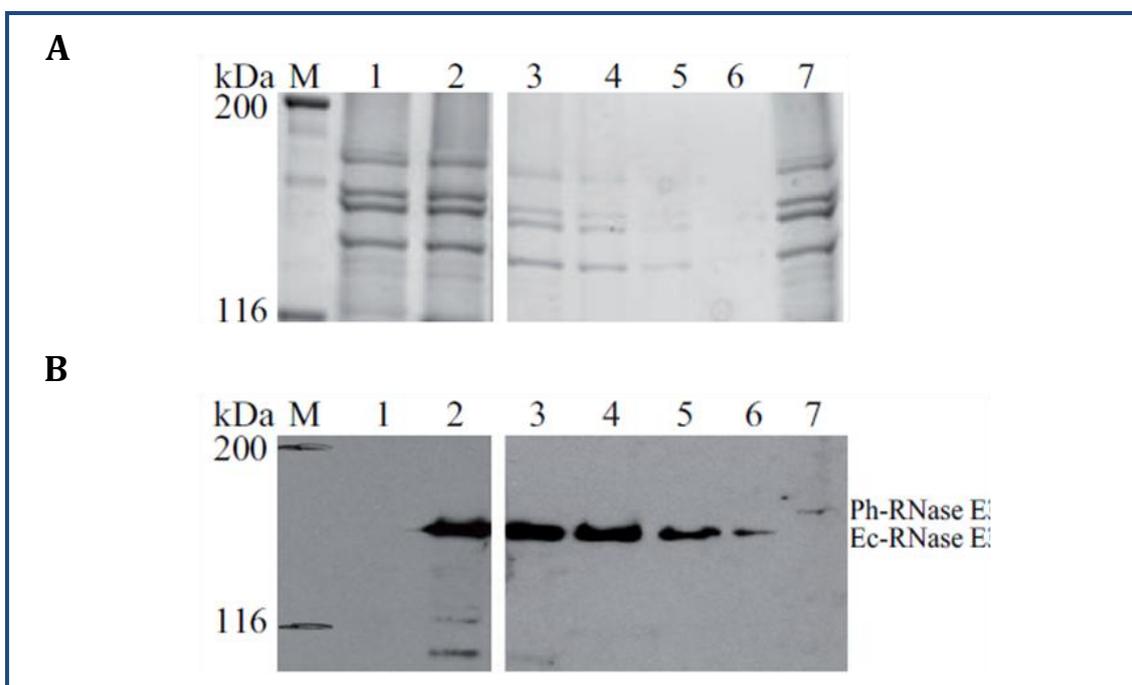


Figure 35 : Expression de la RNase E de *P.haloplanktis* chez *E.coli*.

(A) Gel SDS-PAGE **(B)** Immunodétection en utilisant les anticorps anti-FLAG. Piste 1, souche KSL exprimant le pAM-*rne* (contrôle négatif, RNase E d'*E.coli* dépourvue d'étiquette FLAG). Piste 2, souche KSL portant le pVK200 (RNase E d'*E.coli* étiquetée FLAG). Piste 3, dilution de la piste 2 au 1/4. Piste 4, dilution la piste 2 au 1/8. Piste 5, dilution de la piste 2 au 1/16. Piste 6, dilution de la piste 2 au 1/32. Piste 7, Souche KSL portant la RNase E de *P.haloplanktis* étiquetée FLAG. Le morceau du film des pistes 1 et 2 a été exposé pendant 30secondes. Le film des pistes 3 à 7 a été exposé pendant 4 minutes pour détecter la RNase E de *P.haloplanktis*. M, marqueur moléculaire.

I.4.2. Expression de la RNase E de *P.haloplanktis* sous les signaux d'expression de la RNase E d'*E.coli*

Afin de voir si la faible expression de la RNase E de *P.haloplanktis* chez *E.coli* est liée à ses signaux d'expression, la RNase E de *P.haloplanktis* est exprimée à partir des signaux d'expression de la RNase E d'*E.coli*, grâce à une fusion traductionnelle où les acides aminés allant de 9 à 1079, incluant l'étiquette FLAG, sont ajoutés aux huit premiers acides aminés de la RNase E d'*E.coli* (générant le plasmide pSAB18). Le plasmide est introduit chez les souches KSL. L'analyse quantitative de l'expression de la RNase E de *P.haloplanktis* à 25 °C chez les souches KSL par rapport à la RNase E d'*E.coli*, a montré que la RNase E de *P.haloplanktis* représente environ 50% de la quantité de la RNase E d'*E.coli*. Les tests de complémentation sont reproduits avec le plasmide pSAB18 et les résultats obtenus montrent que la RNase E de *P.haloplanktis* est capable de compléter la RNase E d'*E.coli* à 25, 30 et 37 °C (**figure 36B**). Ces résultats suggèrent que la faible

complémentation observée dans la **figure 34B** est due à la faible expression de la RNase E de *P.haloplanktis* lorsqu'elle est exprimée à partir de ces signaux d'expression. De ce fait, le niveau d'expression de la RNase E de *P.haloplanktis* chez *E.coli* est important pour avoir une complémentation de la croissance d'*E.coli*. À 42 °C, aucune complémentation n'a été observée et ceci serait dû à la dénaturation thermique de la RNase E de *P.haloplanktis* (les enzymes psychrophiles et psychrotolérantes sont sensibles à la chaleur). À 15 °C, la RNase E de *P.haloplanktis* complémente faiblement la RNase E d'*E.coli*. Ce résultat est inattendu, car la RNase E de *P.haloplanktis* est une enzyme psychrotolérante supposée active à basse température, et devrait permettre une complémentation de croissance semblable où meilleure à celle observée à 25 et 30 °C. Étant donné que le niveau d'expression de la RNase E de *P.haloplanktis* entre 30 et 15 °C reste inchangé (**figure 36C**), le défaut de croissance observé à 15 °C, n'est pas dû à une faible expression de la RNase E. Ces résultats suggèrent que la RNase E de *P.haloplanktis* est incapable de complémenter une fonction médiée par la RNase E d'*E.coli* et nécessaire pour la croissance à 15 °C.

I.4.3. Croissance d'*E.coli* à basse température

Afin de voir si la RNase E d'*E.coli* est importante pour la croissance d'*E.coli* à basse température, plusieurs souches d'*E.coli* construites auparavant pour les besoins d'autres études et qui portent des variants de la RNase E d'*E.coli*, ont été testées pour leur croissance à 15 °C.

Résultats avec les souches AC

La souche d'*E.coli* AC21 est la souche qui a été utilisée pour identifier le dégradosome d'ARN (Carpousis et al., 1994). Elle a été utilisée par la suite par Nathalie Vanzo et Anne Leroy lors de leurs thèses au sein de l'équipe, pour la construction de variants de la RNase E afin de voir les effets des délétions dans la région C-terminale de la RNase E (Leroy et al., 2002, Vanzo et al., 1998). La croissance de ces souches a été observée à 15 et 30 °C. Par comparaison entre ces deux températures, on observe à 15 °C, un défaut de croissance des souches AC27, 28 et 32 qui correspondent aux délétions des 477 derniers acides aminés, 636 à 845 acides aminés et 603 à 693 acides aminés de la RNase E respectivement (**figure 37**). Ces observations suggèrent que la région C-terminale de la RNase E, possède des déterminants nécessaires pour la croissance à basse température. Le cas des souches AC28 et 32, suggère que ce déterminant se trouve dans la région de l'AR-RBD.

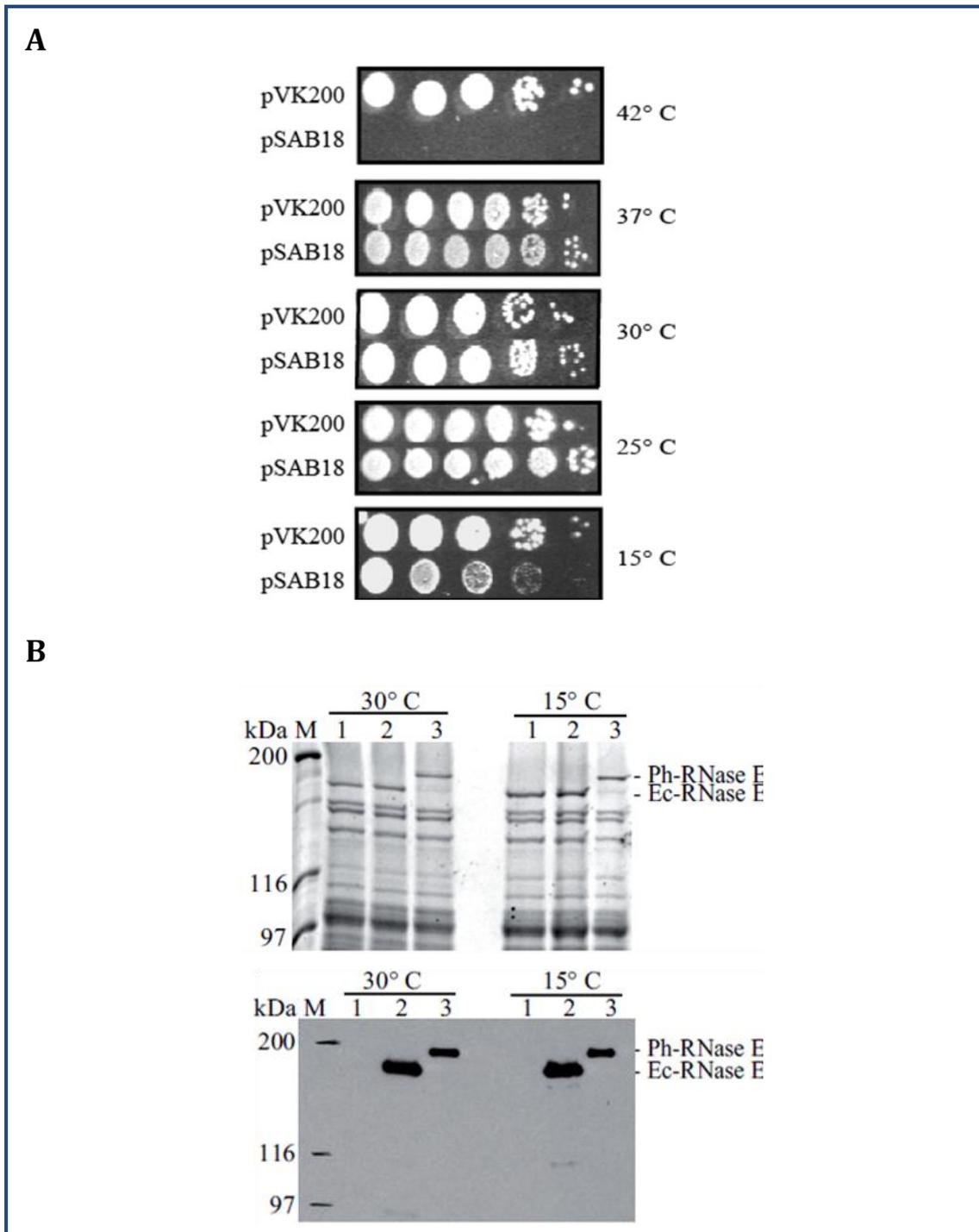


Figure 36: Expression de la RNase E de *P.haloplanktis* chez *E.coli* et tests de complémentation.

(A) Tests de complémentation en utilisant les souches d'*E.coli* portant le pVK200 (RNase E d'*E.coli* étiquetée FLAG) et le pSAB18 et réalisés comme décrit précédemment dans la légende de la figure 34. **(B)** Gel SDS-PAGE révélé au SyproOrange et immunodétection utilisant un anticorps anti-FLAG. Les souches KSL200 ont été complémentées avec le pAM-*rne* (piste 1, RNase E d'*E.coli* sans FLAG), avec le pVK200 (piste 2, RNase E d'*E.coli* avec FLAG) et le pSAB18 (piste 3, RNase E de *P.haloplanktis* avec FLAG). M : Marqueur moléculaire.

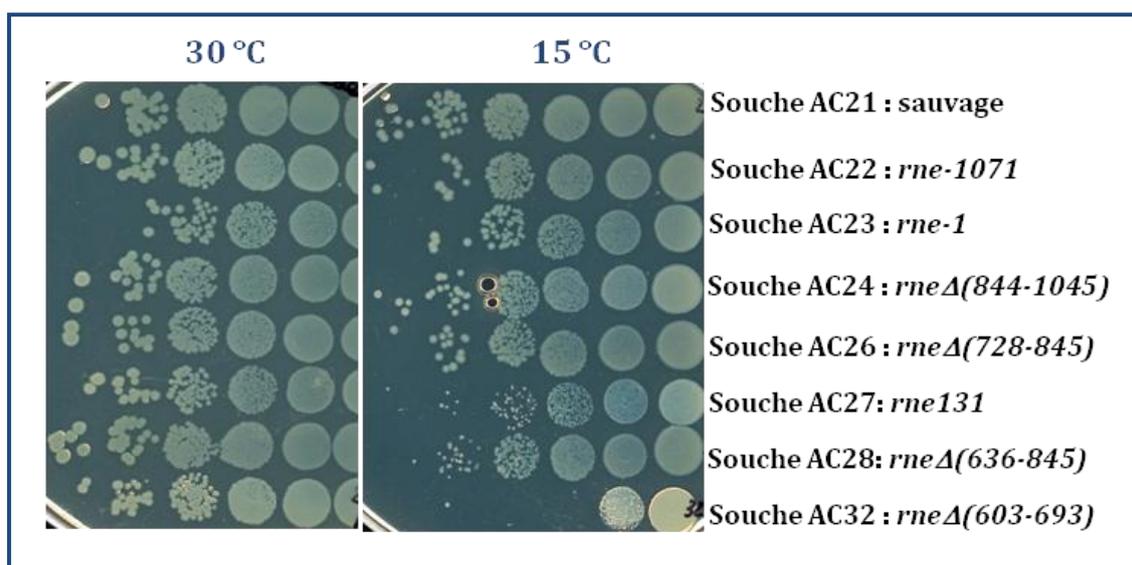


Figure 37 : Défaut de croissance de certaines souches AC à basse température.

Une colonie de chaque souche utilisée a été resuspendue dans du BU (tampon physiologique). Des dilutions au dixième ont été effectuées jusqu'à 10^{-6} puis 3 μ l de chaque dilution sont déposés sur milieu LA. Les souches sont incubées à 15 et 30 °C.

Résultats souches SVK milieu solide et liquide

Les souches SVK407, 408 et 409 sont des souches d'*E.coli* qui portent sur leur chromosome, la RNase E sauvage, le variant de la RNase E allant de 1 à 701 acides aminés et le variant de la RNase E allant de 1 à 598 respectivement. Ces souches ont été utilisées pour analyser leur croissance à basse température. La même expérience effectuée pour les souches AC est répétée en utilisant les souches SVK. Après quatre jours d'incubation à 15 °C, on voit que la souche SVK409 présente un défaut de croissance par rapport aux souches SVK207 et 208 (**figure 38**). Pour savoir si ce défaut de croissance est une incapacité de la souche SVK409 à former des colonies ou un fort ralentissement de croissance, les souches SVK incubées à 15 °C sont laissées à cette température pour quelques jours supplémentaires. Au bout du neuvième jour, on voit que la souche SVK409 a rattrapé significativement son retard de croissance (**figure 38**). Ainsi, dans le cas de la souche SVK409, la délétion de la région non catalytique de la RNase E d'*E.coli* entraîne à 15 °C un fort ralentissement de croissance.

La faible complémentation de la RNase E de *P.haloplanktis* observée uniquement à 25 °C serait due à la faible expression de la protéine chez *E.coli* lorsqu'elle est exprimée à partir de ses signaux d'expression. Le fait de changer les signaux d'expression de la RNase E de *P.haloplanktis* par ceux de la RNase E d'*E.coli*, montre que la faible complémentation serait liée à un dysfonctionnement dans le contrôle de l'expression de la RNase E de *P.haloplanktis* chez *E.coli*.

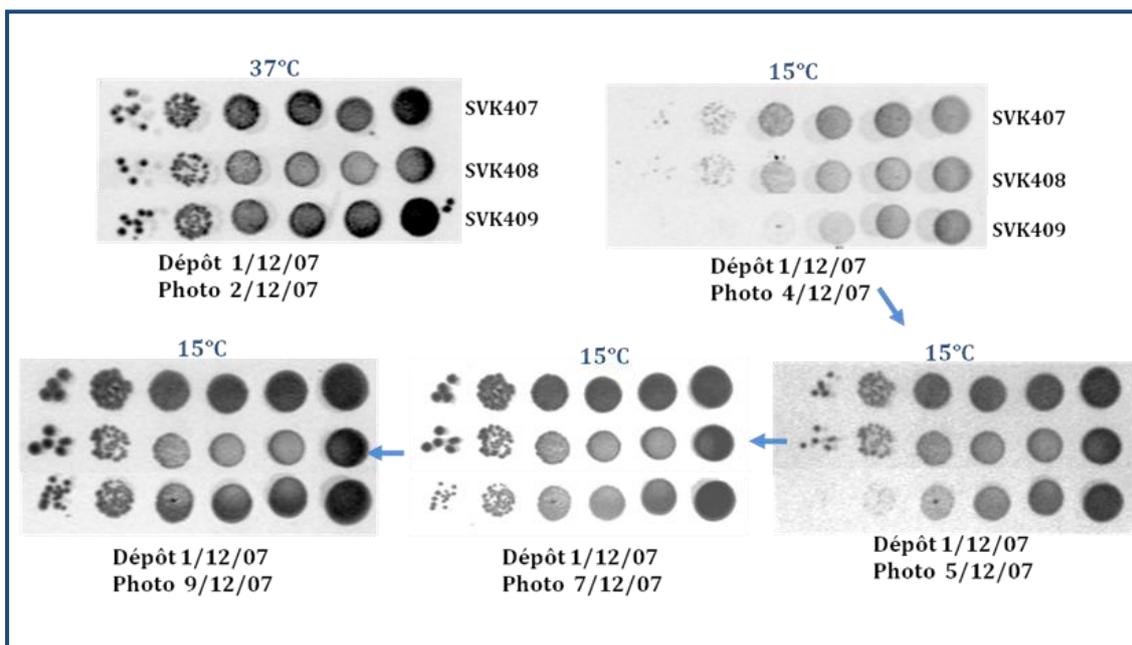


Figure 38 : Défaut de croissance à 15 °C de la souche SVK409.

Pour chaque souche la procédure est la même que la Figure 37 à l'exception que les souches SVK sont laissées à 15 °C.

Le défaut de complémentation observée à 15 °C par la RNase E de *P.haloplanktis* alors que celle-ci est une enzyme psychrotolérante, a été inattendu. Étant donné que l'expression de la RNase E de *P.haloplanktis* ne varie pas, ces résultats suggèrent fortement que la RNase E de *P.haloplanktis* est incapable de complémentation une fonction médiée par la RNase E d'*E.coli* importante pour la croissance à basse température. Les souches d'*E.coli* portant des délétions dans la région C-terminale de la RNase E d'*E.coli* montrent un défaut de croissance des souches AC27, 28 et 32, ainsi que la souche SVK409 à 15 °C, ceci suggère un rôle de la RNase E d'*E.coli* à basse température qui n'est pas complémentation par la RNase E de *P.haloplanktis*. On peut imaginer que la RNase E d'*E.coli* est importante pour la maturation/dégradation de messagers à basse température comme les protéines dont l'expression est induite par le froid comme c'est le cas pour la protéine CspE (Uppal *et al.*, 2008). On peut aussi penser à l'intervention de la RNase E d'*E.coli* dans la dégradation d'ARN structurés stabilisés par la basse température qui seraient recrutés par la région AR-RBD (Kaberdin *et al.*, 2000, Leroy *et al.*, 2002).

I.5. Caractérisation des interactions RNase E-protéines

I.5.1. Immunopurifications chez *E.coli*

La RNase E de *P.haloplanktis* est capable de compléter chez *E.coli* la RNase E d'*E.coli*. Celle-ci interagit avec la PNPase, RhlB et l'énolase pour former le dégradosome d'ARN. Afin de voir si la RNase E de *P.haloplanktis* chez *E.coli* est capable d'interagir avec les protéines du dégradosome d'ARN en absence de la RNase E endogène, des immunopurifications ont été réalisées sur les souches KSL cultivées à 25 °C et portant le pAM-*rne*, le pVK200 et le pSAB18 (exprimant la RNase E de *P.haloplanktis* étiquetée FLAG). Dans le cas du pAM-*rne*, l'immunopurification montre la présence de trois bandes identifiées comme étant les sous-unités de la pyruvate déshydrogénase qui interagissent avec l'anticorps anti-FLAG (**figure 39A**) (Morita et al., 2004). Pour le pVK200, on observe la présence de la PNPase, de RhlB et de l'énolase, qui interagissent avec la RNase E-FLAG d'*E.coli* pour former le dégradosome d'ARN d'*E.coli* (**figure 39A**). Pour la RNase E de *P.haloplanktis* portée par le pSAB18, une bande est présente dans les fractions éluions et qui migre aux alentours des 50 kDa et au même niveau que RhlB d'*E.coli* (**figure 39A**). Par immunodétection, ni la PNPase ni l'énolase ne sont présentes dans la fraction d'éluion. En ce qui concerne la bande à 50 kDa, les anticorps anti-RhlB d'*E.coli* purifiés par affinité reconnaissent fortement la bande à 50 kDa (**figure 39B**). Afin de vérifier l'identification de RhlB comme étant la protéine à 50 kDa interagissant avec la RNase E de *P.haloplanktis*, les immunopurifications ont été répétées en utilisant une souche d'*E.coli* où le gène *rhlB* a été délété (**figure 39C**).

Les résultats des immunopurifications montrent qu'il y a une interaction hétérologue entre la RNase E de *P.haloplanktis* et la protéine RhlB d'*E.coli*. Ceci suggère que la surface/structure d'interaction entre ces deux protéines est fortement conservée. En ce qui concerne l'énolase et la PNPase d'*E.coli*, aucune interaction avec la RNase E de *P.haloplanktis* n'a été détectée. Toutefois, la RNase E de *P.haloplanktis* interagit avec la PNPase de *P.haloplanktis* au sein du dégradosome de *P.haloplanktis*. Ceci suggère que l'interaction RNase E/PNPase est espèce spécifique.

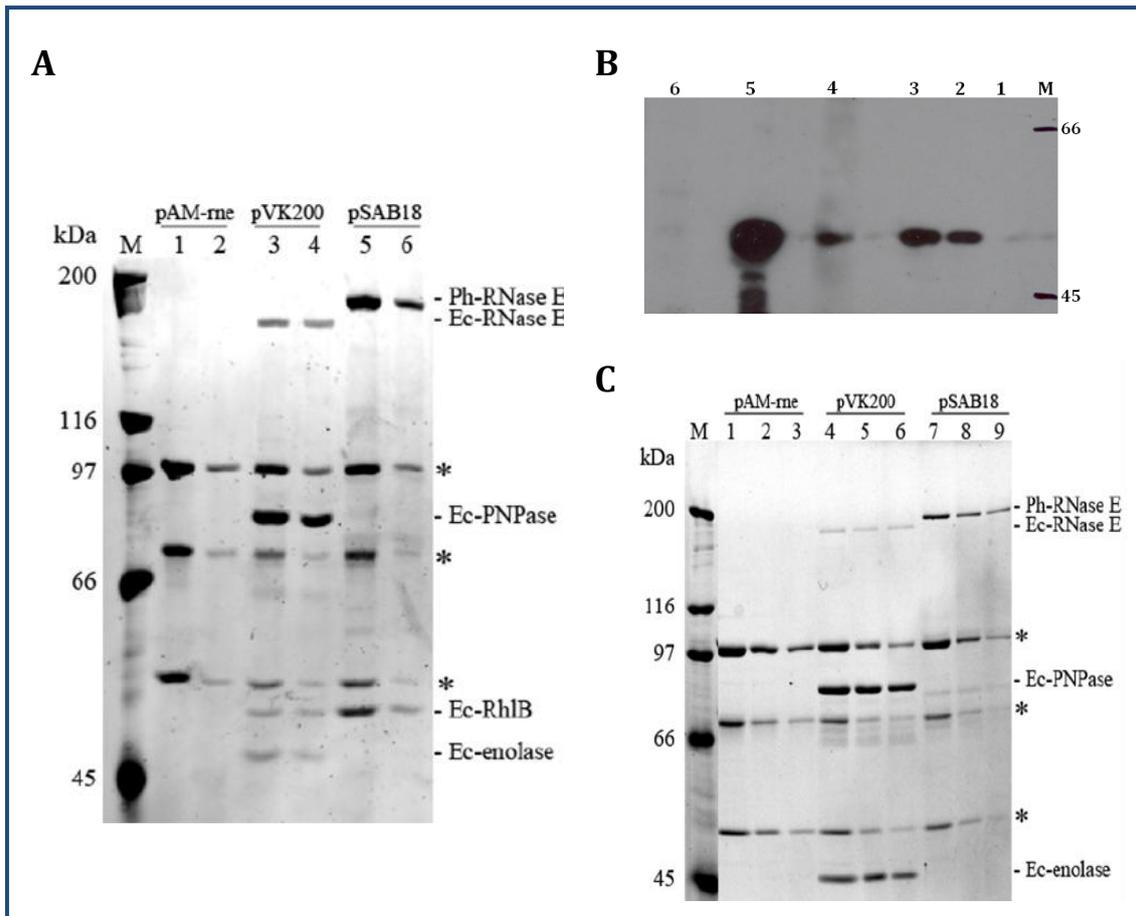


Figure 39 : La RNase E de *P.haloplanktis* exprimée chez *E.coli* interagit avec RhIB d'*E.coli*.

(A) Gel SDS-PAGE révélé au SyproOrange montrant l'immunopurification chez *E.coli* en utilisant les souches KSL portant le pAM-rne, le pVK200 et le pSAB18. **(B)** Immunodétection en utilisant des anticorps anti-RhIB purifiés par affinité. 1 : souche KSL portant le pAM-rne. 2 : souche KSL portant le pVK200. 3 : souche KSL portant le pSAB18. 4 : extraits de la souche BL21(DE3) portant le pET11a. 5 : extraits de la souche DL21(DE3) portant le pET11aRhIB. 6 : Extraits de la souche SVK1 (Δ rhlB). **(C)** Gel SDS-PAGE révélé au SyproOrange montrant une immunopurification en utilisant les mêmes plasmides, mais en utilisant la souche SVK446 dépourvue de RhIB. Les astérisques montrent les bandes correspondant aux sous-unités de la pyruvate déshydrogénase interagissant avec l'anticorps anti-FLAG. M : Marqueur moléculaire.

I.5.2. Caractérisation de l'interaction RNase E-RhIB

Les résultats des immunopurifications réalisées chez *E.coli* ont montré que la RNase E de *P.haloplanktis* est capable d'interagir avec RhIB d'*E.coli*. Cependant, une première analyse de la structure primaire de la RNase E de *P.haloplanktis* n'avait pas révélé de région responsable de l'interaction avec RhIB similaire à celle présente chez la RNase E d'*E.coli*. Afin de rechercher le site de fixation de RhIB, des alignements de séquences en utilisant les RNase E proches de la RNase E d'*E.coli* d'une part (RNase E d'*Entérobactériaes*), et des RNase E proches de la RNase E de *P.haloplanktis* d'autre part (RNase E d'*Alteromonadales*), ont révélé la présence d'une région conservée qui ressemble fortement à la région de fixation de RhIB présente chez la RNase E d'*E.coli*

et conservée chez les *Entérobactériales* (voir **figure 40A**). Sur un « core » de 13 acides aminés communs, quatre sont similaires et 5 acides aminés sont strictement conservés. Parmi ces acides aminés conservés, se trouve l'arginine 730 de la RNase E d'*E.coli* nécessaire pour l'interaction avec RhIB (Khemici et al., 2004).

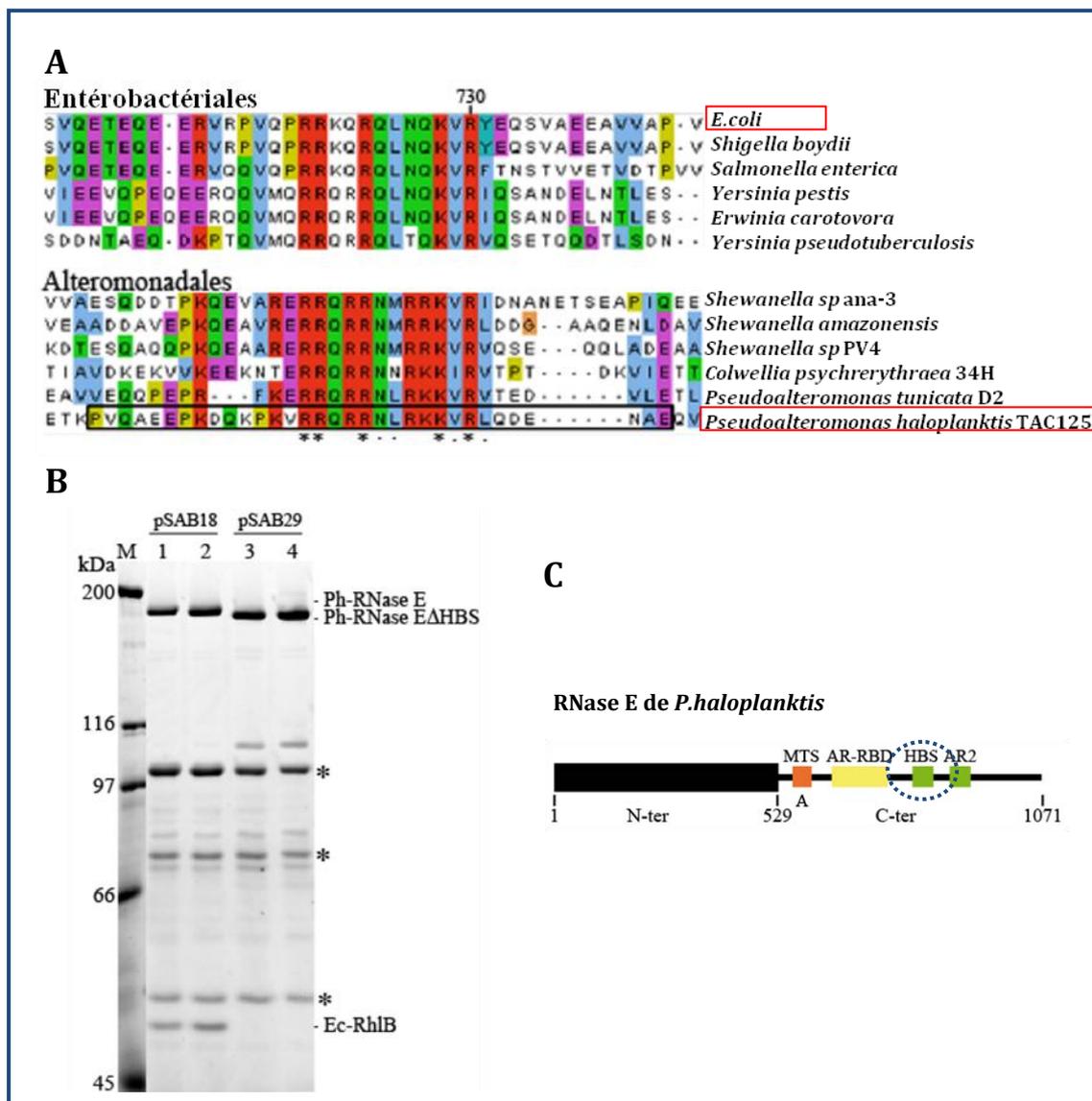


Figure 40 : Identification du site de fixation de RhIB chez la RNase E de *P.haloplanktis*.

(A) Morceau d'alignements de séquence des homologues de la RNase E des *Entérobactériales* et des *Alteromonadales*. Les carrés rouges entourent les RNase E d'*E.coli* et *P.haloplanktis*. Les astérisques indiquent les acides aminés conservés tandis que les points indiquent les acides aminés similaires. Le carré noir indique les acides aminés délétés pour générer le pSAB29. **(B)** Gel SDS-PAGE montrant une immunopurification de la RNase E-FLAG (pistes 1 et 2) et la RNase E-FLAGΔHBS (pistes 3 et 4) de *P.haloplanktis*. Les astérisques montrent les bandes qui correspondent aux sous-unités de la pyruvate déshydrogénase interagissant avec l'anticorps anti-FLAG. M : Marqueur moléculaire. **(C)** Structure primaire de la RNase E de *P.haloplanktis* montrant la localisation du site HBS responsable de la fixation de RhIB (entouré par le cercle en pointillé).

Afin de vérifier que ce site identifié est le site de fixation de RhlB chez la RNase E de *P.haloplanktis*, le plasmide pSAB29 a été généré à partir du pSAB18 en délétant chez la RNase E de *P.haloplanktis*, la région HBS (Helicase binding site) entourée par un carré noir dans la **figure 40A** et qui correspond aux acides aminés allant de 684 à 716 de la RNase E. Des immunopurifications ont été réalisées à partir des souches portant le pSAB18 ou le pSAB29. Dans le cas de ce dernier, on observe la perte de l'interaction entre la RNase E de *P.haloplanktis* et la protéine RhlB d'*E.coli* lorsque l'on délète la région HBS (**figure 40B**). La région HBS correspond au site nécessaire de fixation de RhlB présent chez la RNase E de *P.haloplanktis* (**figure 40C**).

Ainsi, le microdomaine HBS caractérisé est nécessaire pour l'interaction de la RNase E de *P.haloplanktis* avec RhlB. la **figure 40A** montre que cette région est également présente chez d'autres *Alteromonadales* comme *Colwellia psychrethrea* 34H ou *shewanella sp* PV4, deux bactéries psychrophiles dont les génomes ont été séquencés (Gao *et al.*, 2006a, Methe *et al.*, 2005). La conservation du site HBS chez ces RNase E suggère fortement la présence chez ces deux bactéries d'un dégradosome d'ARN composé d'au moins de la RNase E et de RhlB.

I.5.3. Interaction RNase E-PNPase de *P.haloplanktis*

Chez *E.coli*, aucune interaction entre la RNase E de *P.haloplanktis* et la PNPase d'*E.coli* n'a été observée (**figure 39A**). Cependant, lorsque la RNase E de *P.haloplanktis* exprimée chez *E.coli*, est purifiée sur mini-colonne de chromatographie, puis incubée en présence d'extraits cellulaires de *P.haloplanktis* (suivant le protocole présenté dans la **figure 41A**), on observe dans la fraction élution de l'immunopurification, une bande protéique qui migre légèrement en dessous de la PNPase d'*E.coli* lors de l'immunopurification de la RNase E d'*E.coli* (**figure 41B**). Les anticorps anti-PNPase d'*E.coli* utilisés reconnaissent cette bande comme étant la PNPase de *P.haloplanktis* (**figure 41C**). De ce fait, la RNase E de *P.haloplanktis* est capable d'interagir par cette méthode avec la PNPase de *P.haloplanktis*. Ceci est en accord avec l'immunopurification réalisée directement chez *P.haloplanktis* et qui a montré que la PNPase fait partie du dégradosome d'ARN en interagissant avec la RNase E de *P.haloplanktis*.

Afin de caractériser le microdomaine responsable de l'interaction RNase E-PNPase, deux variants de la RNase E de *P.haloplanktis* ont été construits à partir du plasmide pSAB18 qui exprime la RNase E de *P.haloplanktis* étiquetée FLAG sous le contrôle des signaux d'expression de la RNase E d'*E.coli*. Ces variants ont été construits en utilisant les mêmes oligonucléotides qui ont permis la construction de variants délétés des derniers 37 et 76 acides aminés de la RNase E de *P.haloplanktis* (**figure 33A**). Les variants produits sont exprimés chez les KSL2000 puis des immunopurifications sont réalisées. Dans les fractions éluions, l'absence ou la très faible présence de ces variants produits et exprimés chez *E.coli*. C'est le cas du variant RNase E Δ 76FLAG, absent dans la fraction élution de l'immunopurification (**figure 42A**, piste 2). L'immunodétection par l'anticorps anti-FLAG et anti-

RNase E de *P.haloplanktis*, a montré que le variant RNase EΔ76FLAG est majoritairement présent dans la fraction UB (UnBound, fraction de protéines qui ne lient pas la résine) de l'immunopurification (**figure 42B** et **C**). Ceci suggère que la protéine RNase EΔ76FLAG qui est exprimée chez *E.coli*, possède l'étiquette FLAG (présence de l'étiquette dans la fraction dénaturée unbound) et que l'étiquette FLAG de la protéine n'est pas accessible à l'anticorps anti-FLAG. La même chose a été observée pour le variant RNase EΔ37FLAG. Les variants de la RNase E de *P.haloplanktis* délétés pour les derniers 37 et 76 acides aminés adopteraient une conformation qui rendrait l'étiquette FLAG inaccessible à l'anticorps anti-FLAG. Afin de rendre l'étiquette plus accessible, les immunopurifications RNase EΔ37FLAG ont été répétées en changeant la force ionique (**figure 42D**). On n'observe aucune amélioration pour le variant RNase EΔ37FLAG, cependant on observe que dans le cas de RhlB, l'interaction RNase E/RhlB est présente même à une force ionique de 500mM de NaCl (**figure 42D**, piste 3).

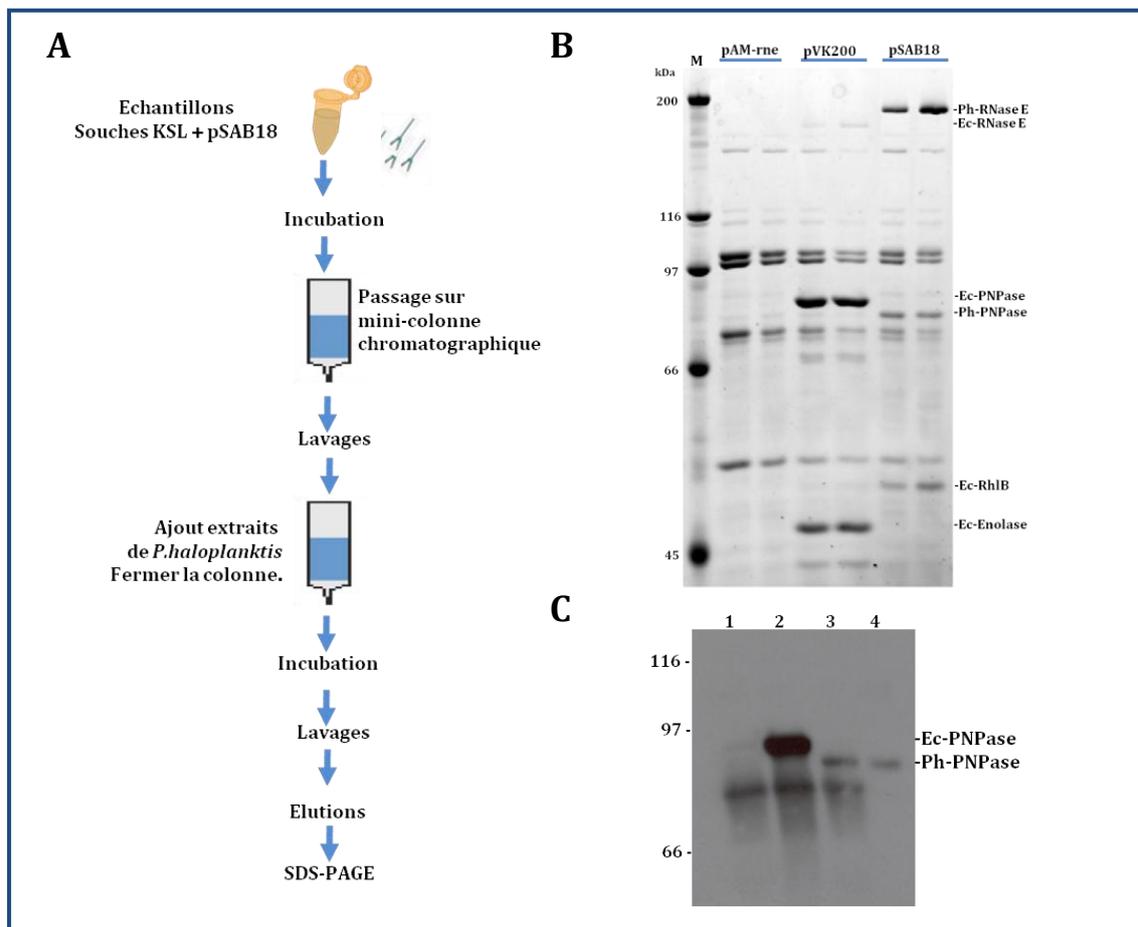


Figure 41 : Interaction RNase E/PNPase de *P.haloplanktis*.

(A) Protocole suivi pour l'immunopurification de la RNase E de *P.haloplanktis* et incubation avec les extraits de *P.haloplanktis*. **(B)** Gel SDS-PAGE montrant l'immunopurification réalisée sur les souches d'*E.coli* portant le pAM-rne, le pVK200 et le pSAB18. Pour chaque cas, deux éluions ont été déposées sur gel. **(C)** Immunodétection en utilisant les anticorps anti-PNPase d'*E.coli*. 1 : Souche KSL portant le pAM-rne. 2 : Souche KSL portant le pVK200. 3 : Souche KSL portant le pSAB18. 4 : extraits de *P.haloplanktis*. M : Marqueur moléculaire.

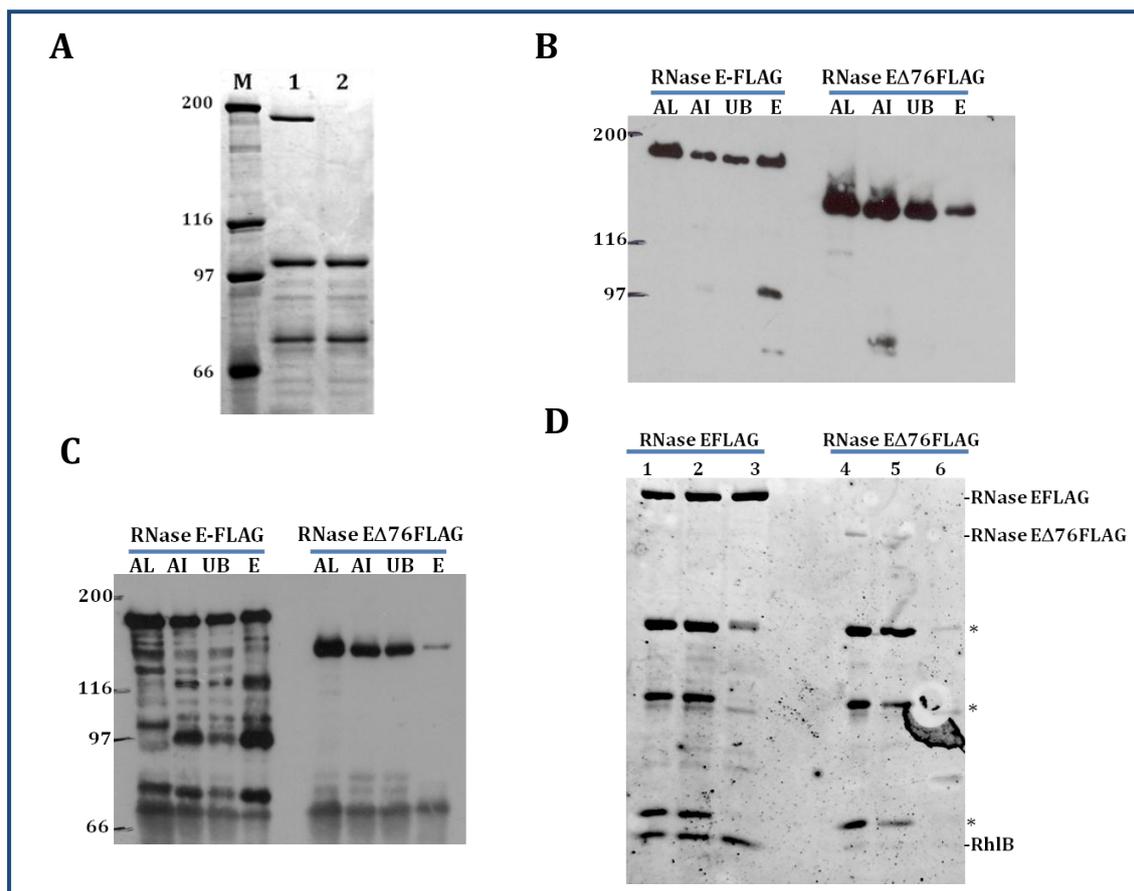


Figure 42 : Immunopurification du variant RNase E Δ 76 FLAG chez *E.coli*.

(A) Gel SDS-PAGE montrant l'immunopurification réalisée en utilisant (1) les souches KSL exprimant la RNase E-FLAG ou (2) le variant RNase E Δ 76FLAG. (B) Immunodétection de l'immunopurification en utilisant des anticorps anti-FLAG ou (C) anti-RNase E de *P.haloplanktis*. (D) Gel SDS-PAGE montrant l'immunopurification réalisée en présence de (1) 100 mM KCl, (2) 10 mM KCl et (3) 500 mM KCl. Les astérisques montrent les bandes correspondant aux sous-unités de la pyruvate déshydrogénase interagissant avec l'anticorps anti-FLAG. M : Marqueur moléculaire.

Pour comprendre le comportement des variants délétés des derniers 37 et 76 acides aminés, la séquence de l'extrémité C-terminale de la RNase E de *P.haloplanktis* a été analysée. J'ai observé la présence de motifs répétés de neuf acides aminés de consensus EEP[A/T]KVE[A/T]P répété onze fois et séparés de motifs répétés VVA ou VVT (**figure 43**). Ces motifs sont localisés en amont du site de fixation de la PNPase. Ces motifs répétés sont de nature hydrophobe, riches en acide glutamique (E), valine (V) et proline (P). Aucune structure n'a été prédite pour ces motifs répétés. Chez la RNase E d'*E.coli*, un seul motif de sept acides aminés est répété deux fois (PAAPVVA) et un motif de six acides aminés est répété six fois (APVVEE) tandis que plusieurs motifs de trois acides aminés sont présents comme le motif PVV répété sept fois. Des motifs répétés sont également présents à l'extrémité de la région C-terminale d'autres RNase E comme c'est le cas de *Shewanella woodyi* et *Moritella sp*. La signification biologique de ces motifs répétés reste inconnue.

Les motifs répétés observés dans la région C-terminale de la RNase E de *P.haloplanktis* pourraient être responsables du comportement du variant RNase EΔ37FLAG lorsque que l'on délète la région de fixation de la PNPase. Ces motifs répétés pourraient entraîner le repliement de la RNase E de *P.haloplanktis* en interagissant avec la région centrale basique lorsque le site de fixation de la PNPase est délété et rendrait l'étiquette FLAG inaccessible. Pour la RNase E d'*E.coli*, cette hypothèse du repliement par interaction de l'extrémité C-terminale et la région basique a été proposée par Anne Leroy, durant sa thèse dans notre laboratoire. En effet, Anne a observé que le variant RNase E délété du site de fixation de la PNPase est plus actif que la RNase E sauvage et a proposé un modèle où la région de fixation de la PNPase permettrait de réguler l'activité de la RNase E (Données non publiés, thèse A. Leroy). De l'ensemble de ces observations, il est possible d'envisager que les motifs répétés présents juste en amont du site de fixation de la PNPase chez les RNase E d'*E.coli* et de *P.haloplanktis*, peuvent être responsables du repliement de la RNase E afin de réguler son activité.

```

MPAAPAPQAAPANVVAPAE TKAQSGLLDAIGKWFK SLFASETVEVKKEETQKQQQE
TRDNTRNNDNRRRNNNNQRRRNNPRSKPRTERTADEEVKTN SVSTPEAATQTNEN
QERGENRNKRRRNPNSRKRPEPRTE DKDAVKVDAPAKAEAE TKPVQAE EEPKDQKP
KVRRQRRLRKKVRLQDENAEQVQT TDETPVQATEKETPVAQE QAPVVEKQTQTA
AEKTAHIKEEKVEDVDSNDETPTTEDEQE QTRTRSRR SPRHLRASGQRRRRPEGEG
NEAKSDEAPAFVPVADQAAA EYEAELKAKSAATPADAAQVEQAVAVEDLAKVEA
VEEPVQTE EEPAKVETPVVTE EEPAKVETPVAAE EEPAKVETPVAAE EEPAKVEAPVVTEE
PAKVETPLVTE EEPAKVEAPVVTE EEPAKVETPVVTE EEPAKVEAPVVTE EPTKVETPVVT
EEPTKVEAPVVTE EEPAKVETPVVTAAPHVK TAIAGGSASAPMAQP TPVADSEVKHTS
VAMAHDKRELVPD SGLRAGSIKPAGRASSTMTKTMSVD

```

EEPAKVETP : 6 fois (bleu clair).

EEPAKVEAP : 3 fois (jaune).

EEPTKVETP : 1 fois (gris).

EEPTKVEAP : 1 fois (vert).

VVT : 8 fois.

VAA : 2 fois.

Figure 43 : Motifs répétés présents à l'extrémité de la région C-terminale de la RNase E de *P.haloplanktis*.

Séquence protéique de la région C-terminale de la RNase E de *P.haloplanktis* allant de 530 à 1071 acides aminés. La recherche est effectuée en utilisant le programme « chercheur de motifs répétés » conçu par le docteur en Informatique, Cédric Bouhours.

Étant donné le comportement des variants de la RNase E de *P.haloplanktis* délétés des derniers 37 et 76 acides aminés, il n'a pas été possible de déterminer le site de fixation de la PNPase de *P.haloplanktis*. De ce fait, pour caractériser ce microdomaine d'interaction, j'ai eu recours à une autre stratégie. Des études antérieures menées par l'équipe ont montré qu'il est possible de reconstituer le

dégradosome d'ARN sur colonne de Nickel, en utilisant la région C-terminale de la RNase E d'*E.coli* étiquetée histidine (Khemici et al., 2004). Le même principe a été utilisé pour la RNase E de *P.haloplanktis* afin de localiser le site de fixation de la PNPase. Dans un premier temps, le CTH de la RNase E de *P.haloplanktis* est cloné dans le vecteur pET15b de manière à avoir le CTH étiqueté histidine en N-terminal (ceci génère le pSAB20). À partir de ce plasmide, des délétions en partant de l'extrémité C-terminale du CTH de la RNase E de *P.haloplanktis*, ont été générées (**figure 44A**). Ensuite, des co-purifications ont été réalisées en incubant, les CTH peptides avec la résine de Cobalt (la PNPase de *P.haloplanktis* lie la colonne de Nickel), puis avec un extrait de *P.haloplanktis*. Sur le gel SDS-PAGE montré dans la **figure 44B**, on observe une bande protéique présente uniquement dans la co-purification utilisant le CTH entier de *P.haloplanktis* (piste 6). Cette protéine est identifiée comme étant la PNPase de *P.haloplanktis*, fortement reconnue par les anticorps anti-PNPase d'*E.coli* (**figure 44C**). Ces résultats montrent que les derniers 37 acides aminés de la PNPase sont nécessaires pour interagir avec la PNPase de *P.haloplanktis*. Ces résultats montrent également que l'interaction entre la RNase E et la PNPase est espèce spécifique comme observé précédemment (**figure 39A**) puisqu'aucune interaction n'a été observée entre la PNPase de *P.haloplanktis* et le CTH de la RNase E d'*E.coli* utilisé (**figure 44B**).

Afin de montrer que l'interaction observée sur minicolonne de chromatographie entre le CTH de la RNase E de *P.haloplanktis* et la PNPase de *P.haloplanktis* est directe, la PNPase de *P.haloplanktis* a été clonée dans le vecteur d'expression pET11a dépourvu d'étiquette histidine, puis surexprimée chez *E.coli* à 25 °C. Pour éviter la formation d'hétérotétramères formés par la PNPase d'*E.coli* et celle de *P.haloplanktis*, la PNPase de *P.haloplanktis* est exprimée dans une souche BL21(DE3) où le gène *pnp* codant pour la PNPase a été inactivé par l'insertion du transposon Tn5 (Khemici et al, 2005). La PNPase de *P.haloplanktis* est surexprimée puis purifiée chez *E.coli* jusqu'à la précipitation au sulfate d'ammonium (**figure 45A et B**).

Une fois la PNPase de *P.haloplanktis* purifiée, des co-purifications en utilisant la résine de Cobalt, sont réalisées en incubant les différents peptides CTH produits (**figure 44A**) avec la PNPase de *P.haloplanktis* purifiée. On observe dans la **figure 46**, la présence de la PNPase uniquement dans les fractions contenant les peptides CTH sauvages et variants de la RNase E de *P.haloplanktis* et d'*E.coli*. D'après ces résultats, l'interaction entre la PNPase et les différents peptides CTH serait non spécifique. Le même résultat a été obtenu en utilisant le pSAB33 (CTH Δ 231). Il se pourrait que des ARN contaminants soient purifiés en présence de la PNPase de *P.haloplanktis* et expliquerait l'interaction non spécifique observée. On peut aussi imaginer que cette interaction soit liée aux conditions de purification de la PNPase de *P.haloplanktis* chez *E.coli* étant donné que celle-ci est une protéine psychrotolérante issue d'un micro-organisme halophile.

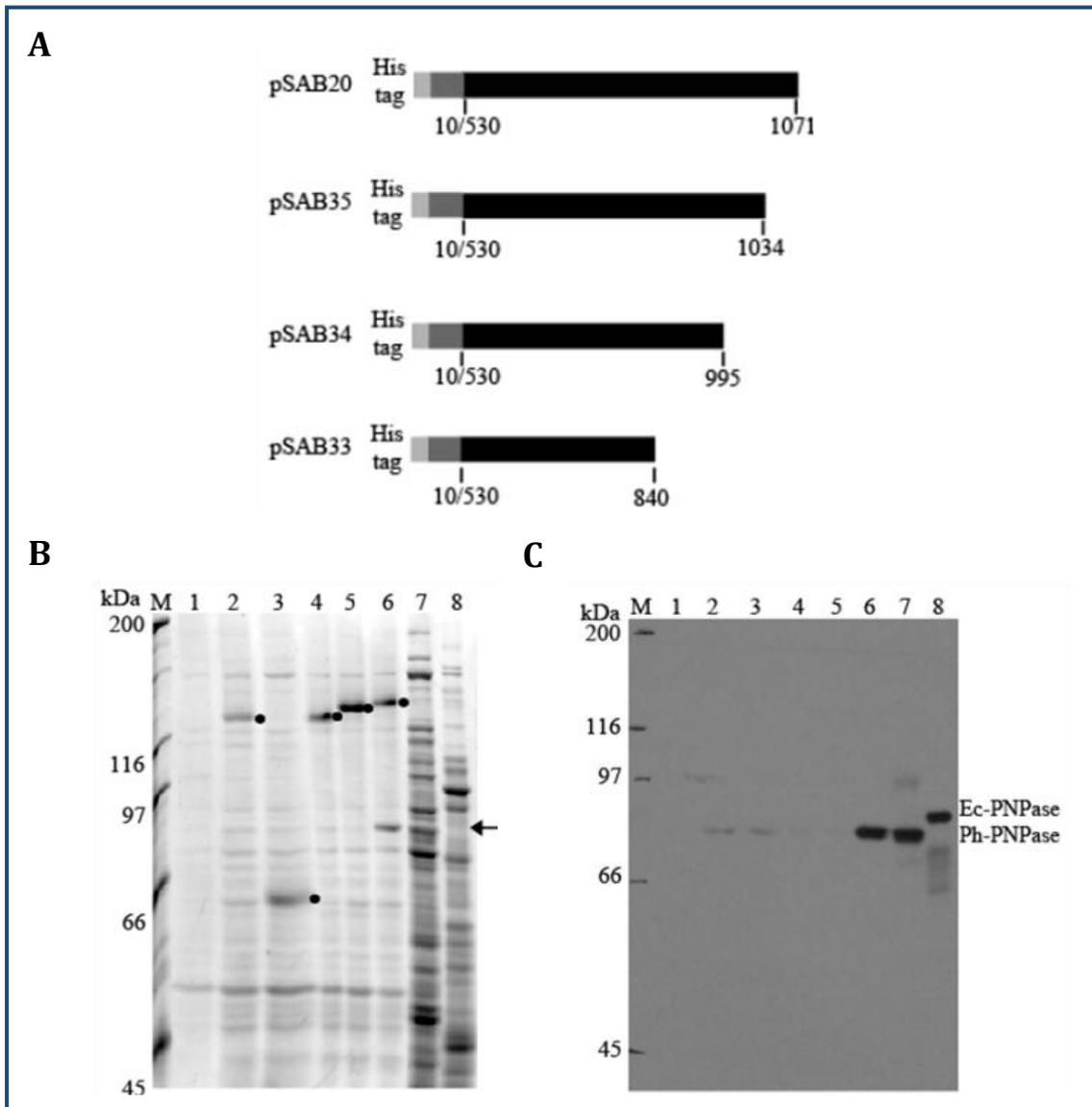


Figure 44 : Interaction entre le CTH de la RNase E de *P.haloplanktis* et la PNPase de *P.haloplanktis*.

(A) Les différents peptides CTH de la RNase E de *P.haloplanktis* produits à partir du pSAB20. **(B)** Gel SDS-PAGE révélé au SyproOrange de la co-purification des CTH étiqueté histidine. Piste 1 : contrôle sans CTH. Piste 2 : Contrôle en utilisant le CTH étiqueté histidine de la RNase E d'*E.coli*. Pistes de 3 à 6 : co-purification en utilisant les pSAB33 (CTH Δ 231), pSAB34 (CTH Δ 76), pSAB35 (CTH Δ 37) et pSAB20 (CTH entier) respectivement. Piste 7 : Extraits de *P.haloplanktis*. Piste 8 : Extrait d'*E.coli*. Les points montrent les différents peptides CTH exprimés. La flèche montre une bande protéique dont la migration est similaire à la PNPase de *P.haloplanktis*. **(C)** Immunodétection réalisée sur un gel comparable à (B) en utilisant les anticorps anti-PNPase. Les forts signaux observés correspondent aux PNPases de *P.haloplanktis* et *E.coli*. M : Marqueur moléculaire.

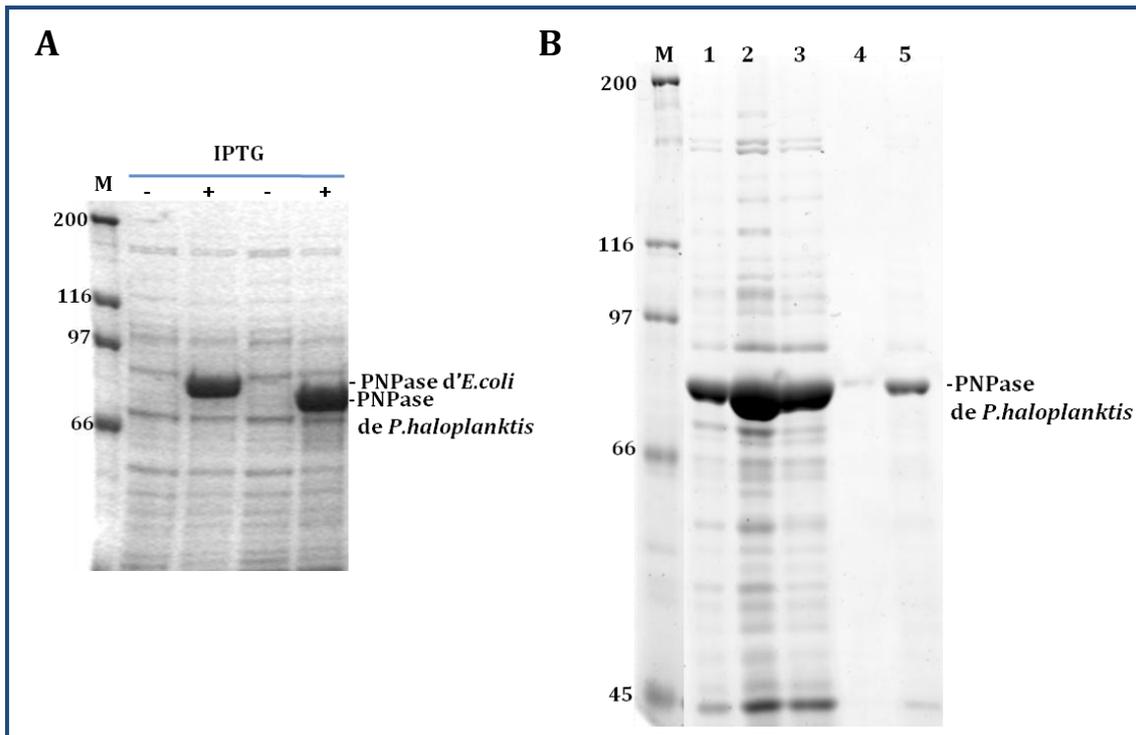


Figure 45 : Surexpression et purification de la PNPase de *P.haloplanktis* exprimée chez *E.coli*. **(A)** Gel SDS-PAGE révélé au bleu de Coomassie montrant la surexpression de la PNPase d'*E.coli* et celle de *P.haloplanktis* chez les BL21(DE3) en présence d'IPTG. **(B)** Gel SDS-PAGE révélé au SyproOrange montrant la purification de la PNPase de *P.haloplanktis* chez *E.coli*. 1 : Extrait BL21(DE3) en présence d'IPTG. 2 : Extrait S-10 obtenu après centrifugation une heure à 10 000 g à 4 °C. 3 : Extrait S-200 obtenu après centrifugation à 200 000 g à 4 °C. 4 : Extrait P-40 obtenu après précipitation au sulfate d'ammonium à 40 %. 5 : Extrait P-60 obtenu après précipitation au sulfate d'ammonium à 60 %. M : marqueur moléculaire.

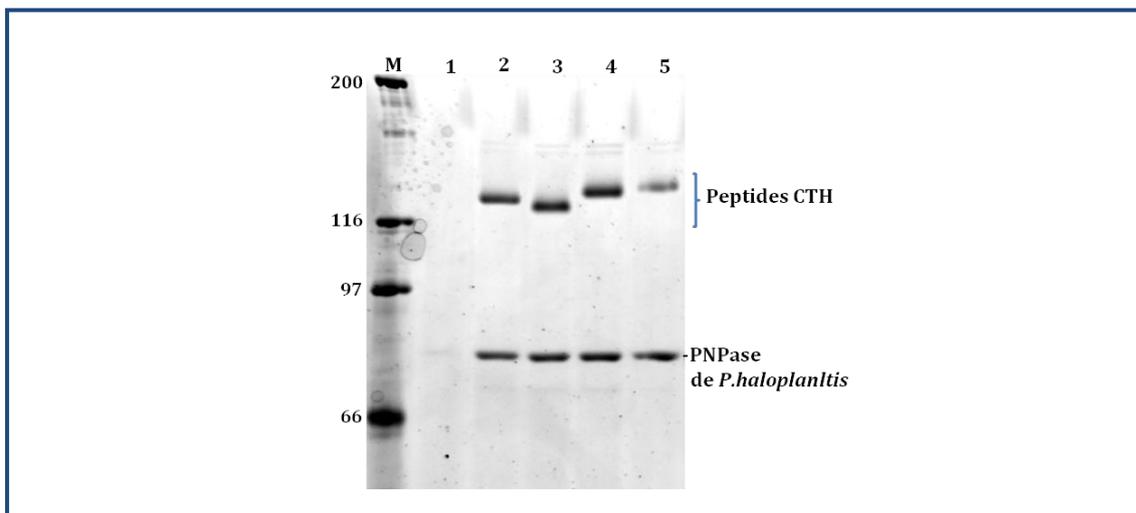


Figure 46 : Co-purification des peptides CTH. Gel SDS-PAGE révélé au SyproOrange des co-purifications réalisées. 1 : Contrôle négatif de co-purification sans CTH. 2 : Co-purification en utilisant le peptide CTH de la RNase E d'*E.coli*. 3 et 4 : Co-purifications des variants CTH Δ 76 et CTH Δ 37. 5 : Co-purification en utilisant le CTH de la RNase E de *P.haloplanktis*. M : marqueur moléculaire.

En résumé, l'interaction RNase E/PNPase implique les derniers 37 acides aminés de la RNase E. Cependant, reste à vérifier que cette interaction est directe. La comparaison de la séquence des 37 derniers acides aminés avec le microdomaine caractérisé de l'interaction RNase E/PNPase d'*E.coli*, par alignement de séquences, montre que le site de fixation de la PNPase est très faiblement conservé. C'est également le cas de celui de *Vibrio angustum* S14 (Erce et al., 2009).

I.6. Discussion

Les travaux menés dans cette première partie ont permis de caractériser le dégradosome d'ARN de la bactérie adaptée au froid *P.haloplanktis*. En effet, les immunopurifications réalisées chez cette bactérie ont montré que la RNase E de *P.haloplanktis* interagit avec les protéines RhIB et PNPase. De ce fait, le dégradosome d'ARN de *P.haloplanktis* est similaire à celui d'*E.coli*, à l'exception de l'absence de l'énolase. Ceci suggère que la dégradation des ARN chez *P.haloplanktis* est aussi similaire à la dégradation des ARN chez *E.coli* malgré l'éloignement phylogénétique de ces deux bactéries et la différence de niche écologique. Dans ce cas, aucune adaptation n'est observée dans la composition du dégradosome d'ARN de *P.haloplanktis*.

Les tests de complémentation réalisés chez *E.coli* ont montré que la RNase E de *P.haloplanktis* est capable de restaurer la viabilité cellulaire d'une souche d'*E.coli* dépourvue de RNase E. Cependant, cette complémentation est faible et observée uniquement à 25 °C lorsque la RNase E de *P.haloplanktis* est exprimée à partir de ses signaux d'expression. L'analyse quantitative a montré que la quantité de RNase E de *P.haloplanktis* exprimée chez *E.coli*, est 32 fois moins que la quantité de RNase E d'*E.coli*. La RNase E de *P.haloplanktis* est ainsi très faiblement exprimée à partir de ses signaux d'expression chez *E.coli*. L'expression de la RNase E de *P.haloplanktis* sous le contrôle des signaux d'expression de la RNase E d'*E.coli*, permet d'avoir une complémentation allant de 15 à 37 °C. À 42 °C, aucune complémentation n'a été observée. La quantité analysée de RNase E de *P.haloplanktis* exprimée chez *E.coli* est d'environ 50 % la quantité de RNase E d'*E.coli*. L'ensemble de ces résultats a montré que la complémentation chez *E.coli* de la RNase E d'*E.coli* par la RNase E de *P.haloplanktis*, dépend de la température et de la quantité de RNase E de *P.haloplanktis* exprimée chez *E.coli*.

Le défaut de complémentation observé à 15 °C de la RNase E de *P.haloplanktis* chez *E.coli* en absence de la RNase E d'*E.coli* a été inattendu, étant donné que la RNase E de *P.haloplanktis* est une enzyme psychrotolérante dont l'expression chez *E.coli* à 15 et 30 °C reste inchangée. Il semblerait que la RNase E de *P.haloplanktis* soit ainsi incapable de compléter une fonction médiée par la RNase E d'*E.coli* à 15 °C. L'analyse de la croissance à 15 °C de plusieurs souches d'*E.coli* portant différentes délétions dans la région C-terminale de la RNase E d'*E.coli*, ont montré que la région C-terminale, et

plus exactement, la région de l'AR-RBD, est importante pour la croissance à basse température. Ceci est une première évidence d'un rôle de la région C-terminale de la RNase E pour la croissance d'*E.coli* à basse température.

Les expériences de co-purification réalisées en utilisant les différents peptides CTH de la RNase E de *P.haloplanktis*, ont montré que les 37 derniers acides aminés de la région C-terminale de la RNase E de *P.haloplanktis* sont nécessaires pour interagir avec la PNPase de *P.haloplanktis*. Cependant, reste à savoir si cette interaction est directe puisque des interactions non spécifiques ont été observées entre les différents peptides CTH utilisés et la PNPase de *P.haloplanktis* purifiée chez *E.coli*. Les expériences d'immunopurification et de co-purification ont également montré que l'interaction entre la RNase E et la PNPase est espèce spécifique : la RNase E de *P.haloplanktis* est capable d'interagir avec la PNPase de *P.haloplanktis* tandis qu'aucune interaction n'a été observée entre la RNase E de *P.haloplanktis* et la PNPase d'*E.coli*. De même, aucune interaction n'a été observée entre la PNPase de *P.haloplanktis* et la région C-terminale de la RNase E d'*E.coli*. La comparaison de la séquence du microdomaine d'interaction RNase E-PNPase de *P.haloplanktis* avec celle du microdomaine caractérisé de l'interaction RNase E-PNPase d'*E.coli* (Nurmohamed et al., 2009), montre que la séquence est fortement variable. C'est le cas aussi de la séquence du microdomaine de la RNase E de *V.angustum* (Erce et al., 2009). Chez *E.coli*, la structure d'interaction entre la RNase E et la PNPase a été récemment résolue et implique une interaction d'extension de feuillet β (Nurmohamed et al., 2009). La modélisation en 3D de la PNPase de *P.haloplanktis* effectuée dans le laboratoire du professeur Ben Luisi à Cambridge, a révélé la présence d'un feuillet β similaire à la PNPase d'*E.coli* qui peut être engagé dans une interaction d'extension de feuillet β avec le microdomaine de la RNase E de *P.haloplanktis*. Par conséquent, la conservation de l'interaction RNase E-PNPase chez *P.haloplanktis* pourrait également impliquer une interaction en extension de feuillet β . Dans ce cas, il y aurait une conservation structurale de l'interaction qui permettrait la conservation de l'interaction RNase E-PNPase sans conservation de la séquence du microdomaine. Une co-variation des interfaces de contact RNase E-PNPase permettrait la conservation structurale de cette interaction. La modélisation en 3D de la PNPase de *P.haloplanktis* a également révélé que les acides aminés présents dans l'environnement spatial de l'interaction d'extension de feuillet β entre la RNase E et la PNPase peuvent être impliqués dans des interactions RNase E-PNPase et seraient responsables de l'interaction RNase E-PNPase espèce spécifique observée.

En ce qui concerne l'interaction RNase E-RhlB, les immunopurifications réalisées chez *P.haloplanktis* ont montré que la protéine RhlB est retrouvée au sein du dégradosome d'ARN de *P.haloplanktis*. De plus, les immunopurifications chez *E.coli* ont montré une interaction hétérologue entre la RNase E de *P.haloplanktis* et RhlB d'*E.coli*. Cette interaction hétérologue suggère que l'interface d'interaction entre ces deux protéines est fortement conservée. L'interaction RNase E de *P.haloplanktis* et RhlB d'*E.coli* nécessite la présence chez la RNase E de *P.haloplanktis*, de la région minimale d'interaction allant de 684 à 716 acides aminés (**figure 40**). Cette région minimale est

similaire à la région présente chez la RNase E d'*E.coli*, conservée chez les *Entérobactériales* (Chandran et al., 2007) (**figure 40**). Ceci suggère que cette région conservée soit le site d'interaction RNase E-RhlB chez *E.coli*.

La **figure 47** résume l'ensemble des données expérimentales et bio-informatiques concernant les microdomaines d'interactions RNase E-protéines, RNase E-ARN et RNase E membrane. L'arbre phylogénétique simplifié des ordres des *Entérobactériales*, des *Pateurellales*, des *Vibrionales*, des *Aeromonadales* et des *Alteromonadales* des γ -protéobactéries, est basé sur le récent arbre phylogénétique publié récemment (Gao *et al.*, 2009). Le microdomaine MTS est présent chez les RNase E des cinq ordres de l'arbre phylogénétique comme indiqué précédemment (Khemici et al., 2008). Les deux sites de fixation à l'ARN AR-RBD et AR2 de la région C-terminale de la RNase E, sont également présents chez ces cinq ordres de même que le microdomaine d'interaction RNase E-RhlB. En ce qui concerne le microdomaine d'interaction à l'énolase, il est absent chez les *Aeromonadales* et les *Alteromonadales*. Pour la PNPase, même si l'interaction RNase E-PNPase semble être conservée chez ces cinq ordres, la séquence du microdomaine diffère. C'est pour cela que la couleur du microdomaine est différente dans la **figure 47**.

La vue d'ensemble que fait ressortir la **figure 47** est la présence d'un « core » ou « module » commun à toutes ces RNase E, constitué des deux microdomaines de fixation à l'ARN et de celui de RhlB (module AR-RBD-HBS-AR2). La conservation de ce module sur une large distance évolutive entre les *Entérobactériales* et les *Alteromonadales* suggère une importante fonction médiée par ces microdomaines. Il se pourrait que cette conservation soit liée au contrôle de l'activité ATPase de RhlB au sein du dégradosome d'ARN, en tenant compte des études menées par Chandran et al., 2007 (**figure 13**).

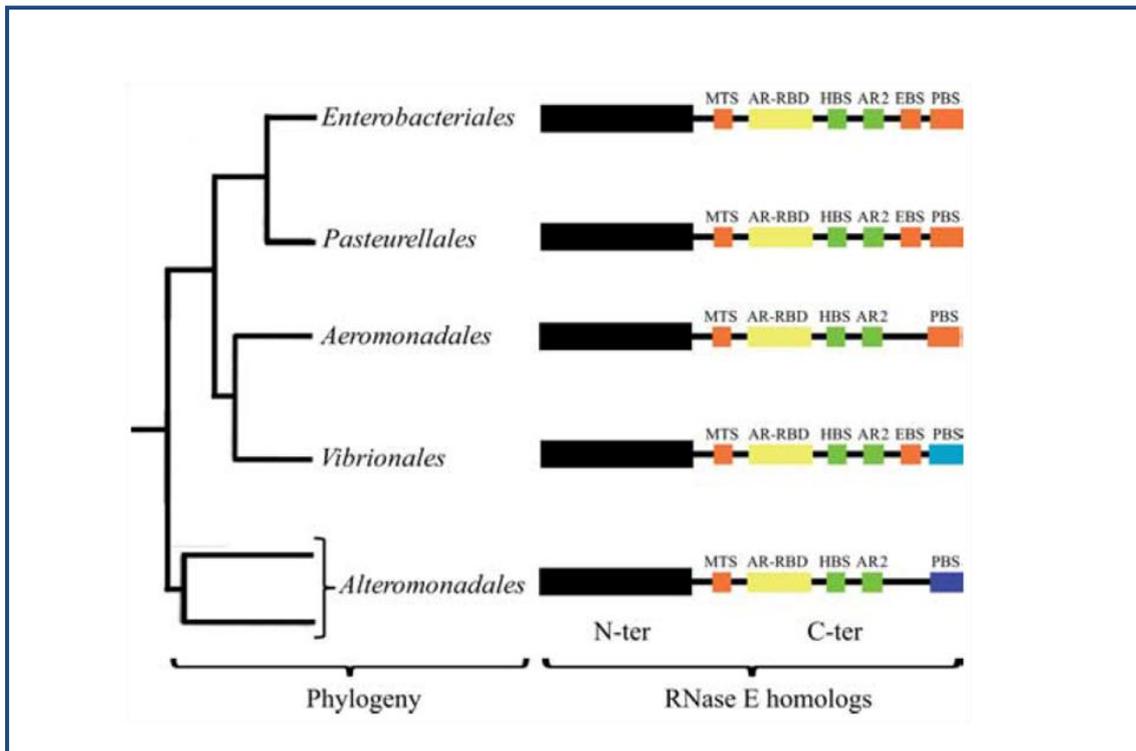


Figure 47 : Conservation des microdomaines chez les homologues de la RNase E.

La structure primaire des homologues de la RNase E chez les *Entérobactériales*, *Pasteurellales*, *Vibrionales*, *Aeromonadales* et les *Alteromonadales* présentée à droite de la figure, résume l'ensemble des données expérimentales et bio-informatiques. La région N-terminale fortement conservée de la RNase E est représentée par le carré noir. La région non catalytique représentée par le trait noir, porte les différents microdomaines présents. MTS, Membrane Targeting Sequence, AR-RBD, Arginine Rich RNA Binding Domain. AR2, Arginine Rich 2. HBS, Helicase Binding Site. EBS, Enolase Binding Site. PBS, PNPase Binding Site.

II. Distribution des microdomaines chez les γ -protéobactéries.

II.1. Objectifs et méthodologie

Les travaux de thèse présentés dans la première partie résultats de ce manuscrit ont montré que certains microdomaines caractérisés chez la RNase E d'*E.coli*, ne sont pas seulement conservés chez les RNase E des *Entérobactériales* et chez les *Vibrionales* (Erce et al., 2009, Marcaida et al., 2006), Thèse de V.chandran, Cambridge 2006, mais sont également conservés chez les *Alteromonadales* (Ait-Bara & Carpousis, 2010). Cependant, qu'en est-il de leur conservation chez les RNase E d'autres bactéries au-delà des *Alteromonadales* ? Dans cette deuxième partie résultats, je me suis intéressée à la recherche des microdomaines caractérisés de la RNase E d'*E.coli* et de *P.haloplanktis*, chez les RNase E d'autres bactéries. Ceci permettrait d'avoir une vue d'ensemble de la distribution de ces microdomaines et leur conservation et permettrait également de déterminer les bactéries qui auraient un dégradosome d'ARN similaire au dégradosome d'ARN d'*E.coli* et de *P.haloplanktis*. Étant donné la forte variabilité en séquence de la région non catalytique de la RNase E portant les microdomaines, la recherche des microdomaines est focalisée sur les RNase E des γ -protéobactéries.

Le groupe des γ -protéobactéries est l'un des plus larges groupes de bactéries connus. Il est très diversifié et contient 14 principaux ordres : les *Enterobacterales*, *Pseudomonadales*, *Alteromonadales*, *Vibrionales*, *Pasteurellales*, *Chromatiales*, *Xanthomonadales*, *Thiotrichales*, *Legionellales*, *Methylococcales*, *Oceanospirillales*, *Acidithiobacillales*, *Cardiobacterales* et les *Aeromonadales* (Gao et al., 2009). Les γ -protéobactéries possèdent une incroyable variété en termes de niches écologiques et de phénotypes métaboliques. Elles possèdent également des pathogènes, des parasites et des symbiotes animaux et végétaux, ainsi que l'organisme probablement le plus étudié au monde *E.coli*. L'ancêtre commun des γ -protéobactéries date d'au moins 500 millions d'années et les distances évolutives entre les espèces sont aussi larges que celles qui séparent les animaux, les plantes et les champignons (Gao et al., 2009).

Afin de rechercher les microdomaines de la RNase E d'*E.coli* chez les RNase E des γ -protéobactéries, et au vu du nombre élevé de leurs génomes séquencés (235, août 2010), les bactéries qui représenteraient au mieux les γ -protéobactéries ont été recherchées. De plus, afin de placer ces

bactéries dans un contexte évolutif, un arbre phylogénétique représentant les γ -protéobactéries a été choisi. Cet arbre phylogénétique récent a été construit par une équipe canadienne qui a voulu élucider les relations évolutives au sein des γ -protéobactéries, en utilisant les approches de phylogénomique et de génomique comparative (Gao et al., 2009). Les auteurs ont choisi les bactéries qui recouvrent au mieux les principaux ordres connus des γ -protéobactéries (13 ordres). Au total, 46 bactéries ont été choisies dont une, *Caulobacter crescentus* qui ne fait pas partie des γ -protéobactéries, mais a été utilisée pour enracer l'arbre phylogénétique. Les auteurs ont construit l'arbre phylogénétique en se basant sur la concaténation de 36 protéines hautement conservées et universellement distribuées (**figure 48**). Les RNase E des 45 γ -protéobactéries sont des RNase E de type I, avec une région N-terminale catalytique fortement conservée et une région non catalytique variable. Quant à la RNase E de *C.crescentus*, c'est une RNase E de type II de taille inférieure aux RNase E de type I et portant une insertion dans la région catalytique. Étant donné la forte conservation de la région catalytique de ces RNase E, seules les séquences de la région C-terminale à partir du 530ème acide aminé ont été utilisées.

Pour rechercher les microdomaines présents dans la région C-terminale de la RNase E d'*E.coli*, chez les 46 régions C-terminales des RNase E, j'ai utilisé le programme MEME (Multiple Em for Motif Elicitation, (Bailey et al., 2006), http://meme.nbcrl.net/meme4_4_0/cgi-bin/meme.cgi). Ce programme permet de rechercher des motifs dans plusieurs séquences protéiques ou ADN. Le résultat de la recherche des motifs par le programme MEME est un alignement des motifs présents chez ces séquences (**figure 49**). À chaque alignement de motifs, est associée une séquence consensus et un « sequence logo » qui permet de voir les acides aminés les plus fréquents dans l'alignement des motifs. Aussi, pour chaque motif est donnée une « *p*-value » où le programme MEME aligne les motifs trouvés d'après la probabilité d'avoir ce motif dans la séquence.

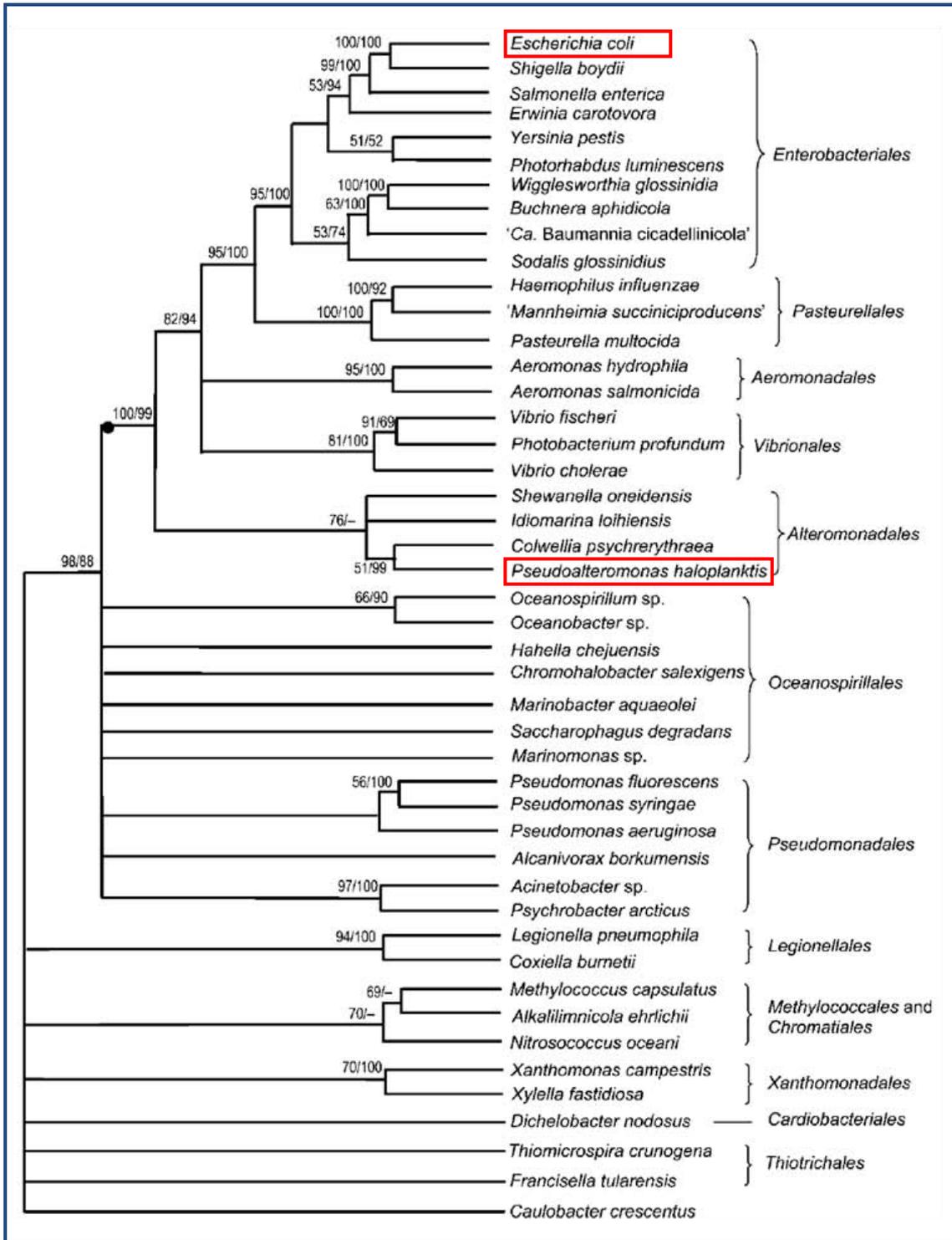


Figure 48 : Arbre phylogénétique des γ -protéobactéries.

Cet arbre phylogénétique est basé sur la concaténation de 36 protéines universellement conservées. Figure provenant de Gao et al, 2009.

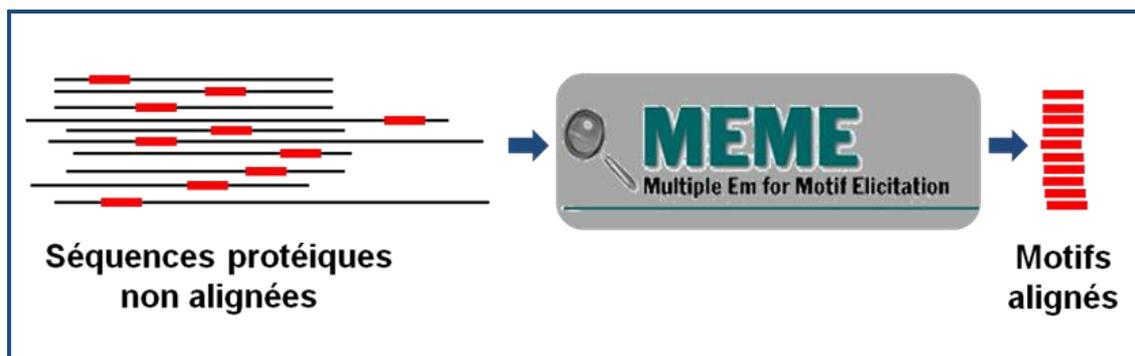


Figure 49 : Principe du programme MEME (Multiple Em for Motif Elicitation).

À partir de séquences non alignées qui possèdent des motifs, MEME fait ressortir uniquement les motifs alignés.

II.2. Recherche des microdomaines par MEME

Les séquences protéiques des RNase E des 46 bactéries de l'arbre phylogénétique ont été récupérées sur le site du NCBI. Les régions C-terminales de ces RNase E ont été soumises au programme MEME puis les 5 microdomaines correspondant chez la RNase E d'*E.coli* aux : motif A, AR2 et les sites de fixation de l'énolase, de RhlB et de la PNPase ont été recherchés (la région RBD n'est pas prise en compte ici, car elle correspond à une région riche en arginine, qui est la moins conservée chez les *Entérobactériales*).

II.2.1. Cas du motif A

Le motif A présent chez la RNase E d'*E.coli*, permet de localiser la RNase E à la membrane en formant une hélice α qui s'ancre dans la bicouche lipidique par la face hydrophobe (Khemici et al, 2008). La recherche du motif A dans les 46 régions C-terminales des RNase E par le programme MEME, fait ressortir un motif aligné et détecté chez 41 bactéries (**figure 50A**). Les cinq bactéries restantes n'auraient pas de motif A. C'est le cas de *Caulobacter crescentus* où apparemment, la RNase E semble être localisée au niveau de l'ADN (Montero Llopis et al., 2010).

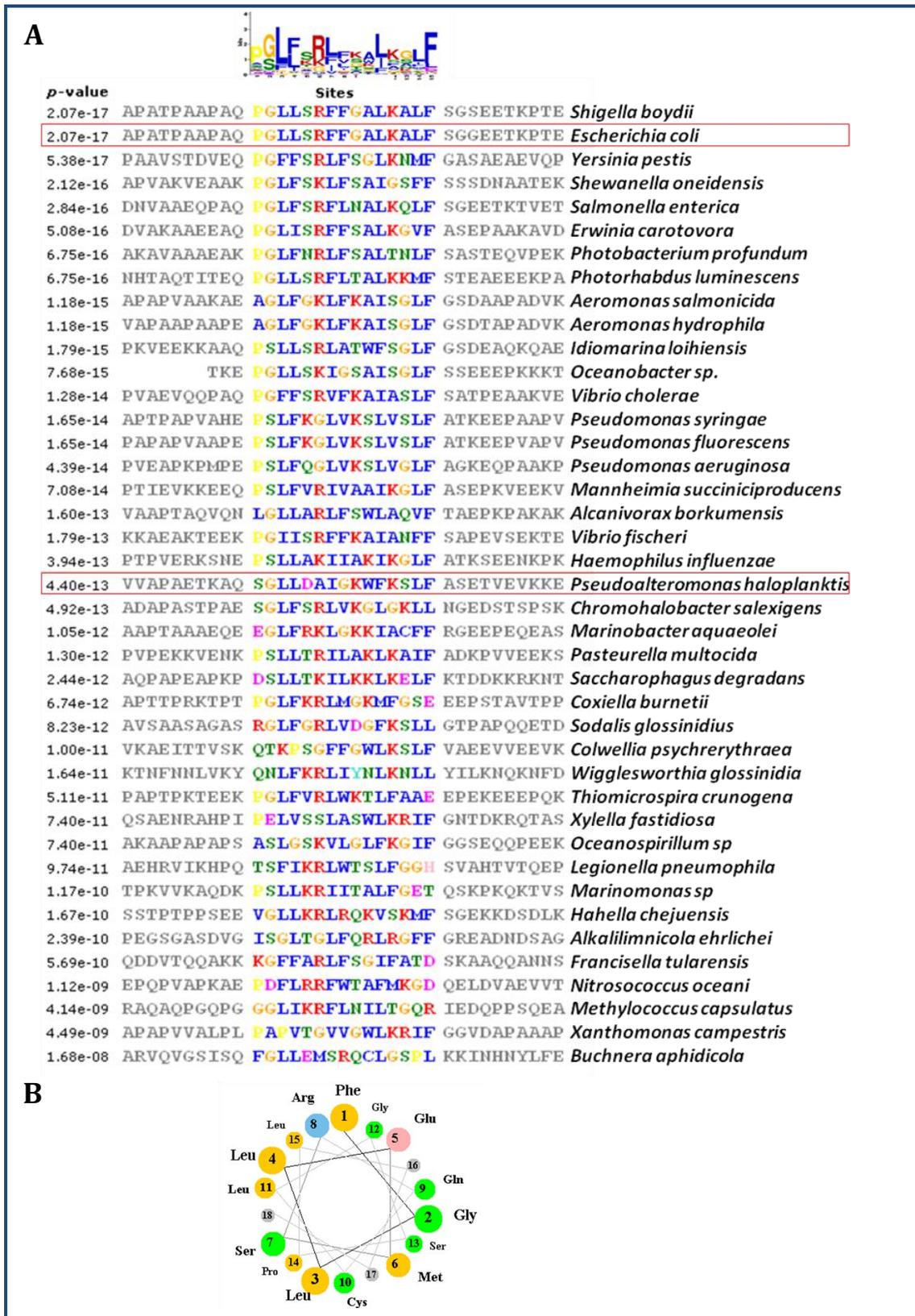


Figure 50 : Aligement du motif A obtenu par le programme MEME.

(A) 41 motifs A putatifs alignés par MEME. (B) Projection en roue hélicale du motif A présentant la plus grande p-value en utilisant le programme Helical Wheel Viewer (<http://cti.itc.virginia.edu/~cmg>). En jaune, les résidus hydrophobes non polaires, en vert, les résidus polaires non chargés et en bleu, les résidus basiques. Les carrés rouges entourent les motifs A des RNase E d'*E.coli* et de *P.haloplanktis*.

L'analyse de la séquence des motifs A trouvés par MEME montre que plus la p -value augmente, plus la séquence du motif A varie de celle des motifs ayant les plus faibles p -value. De ce fait, il se pourrait que le programme MEME fasse ressortir des motifs qui ressemblent au motif A, mais qui ne forment pas d'hélice α d'ancrage à la membrane (faux positifs). La formation de l'hélice α de ces motifs est vérifiée par l'utilisation d'un logiciel qui permet de projeter l'hélice α sur une roue hélicale et qui a été utilisé précédemment pour le motif A de la RNase E d'*E.coli* (Khemici et al., 2008). Tous les motifs détectés par MEME sont capables de former une hélice α comme c'est le cas du dernier motif aligné par MEME et présentant la plus grande p -value (**figure 50B**). En comparant cette hélice α putative avec celle du motif A de la RNase E d'*E.coli* (**figure 17B**), l'hélice α putative semble avoir un côté hydrophobe d'ancrage à la membrane à l'exception de la présence d'une sérine et d'une arginine aux positions 7 et 8 respectivement (**figure 50B**). Ces acides aminés sont également présents chez d'autres hélices α putatives prédites (Khemici et al., 2008). En général, le motif A possède sept acides aminés hydrophobes, mais le motif A' des β -peotéobactéries en possède six (**figure 17C**). De ce fait, l'hélice α putative présentant la plus grande p -value (**figure 50B**) semble ressembler au motif A' des β -peotéobactéries.

En résumé, cette analyse par le programme MEME permet de détecter les motifs A des RNase E de 41 γ -protéobactéries et ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus précédemment où le motif A est un microdomaine bien conservé chez les γ -protéobactéries (Khemici et al., 2008).

II.2.2. Cas de l'AR2

Le deuxième motif que fait ressortir MEME est celui correspondant au microdomaine AR2 de la RNase E d'*E.coli* (**figure 51**). Sur 46 régions C-terminales, MEME détecte un motif chez 38 d'entre elles. Les 18 premiers motifs détectés sont fortement similaires au microdomaine AR2 de la RNase E d'*E.coli*, dont la séquence est fortement conservée en accord avec les résultats obtenus précédemment (Ait-Bara & Carpousis, 2010), thèse de Vidya Chandran, Cambridge 2006. Cependant, le programme MEME détecte également des motifs essentiellement riches en arginines en les alignant avec l'AR2. Par conséquent, MEME est capable dans ce cas, de détecter des séquences non conservées qui ont la propriété d'être riches en arginines comme l'AR2, site de fixation à l'ARN chez la RNase E d'*E.coli* (Leroy et al., 2002). Ces microdomaines riches en arginines détectés par MEME pourraient correspondre à des sites de fixation de l'ARN chez les RNase E dépourvues d'AR2.

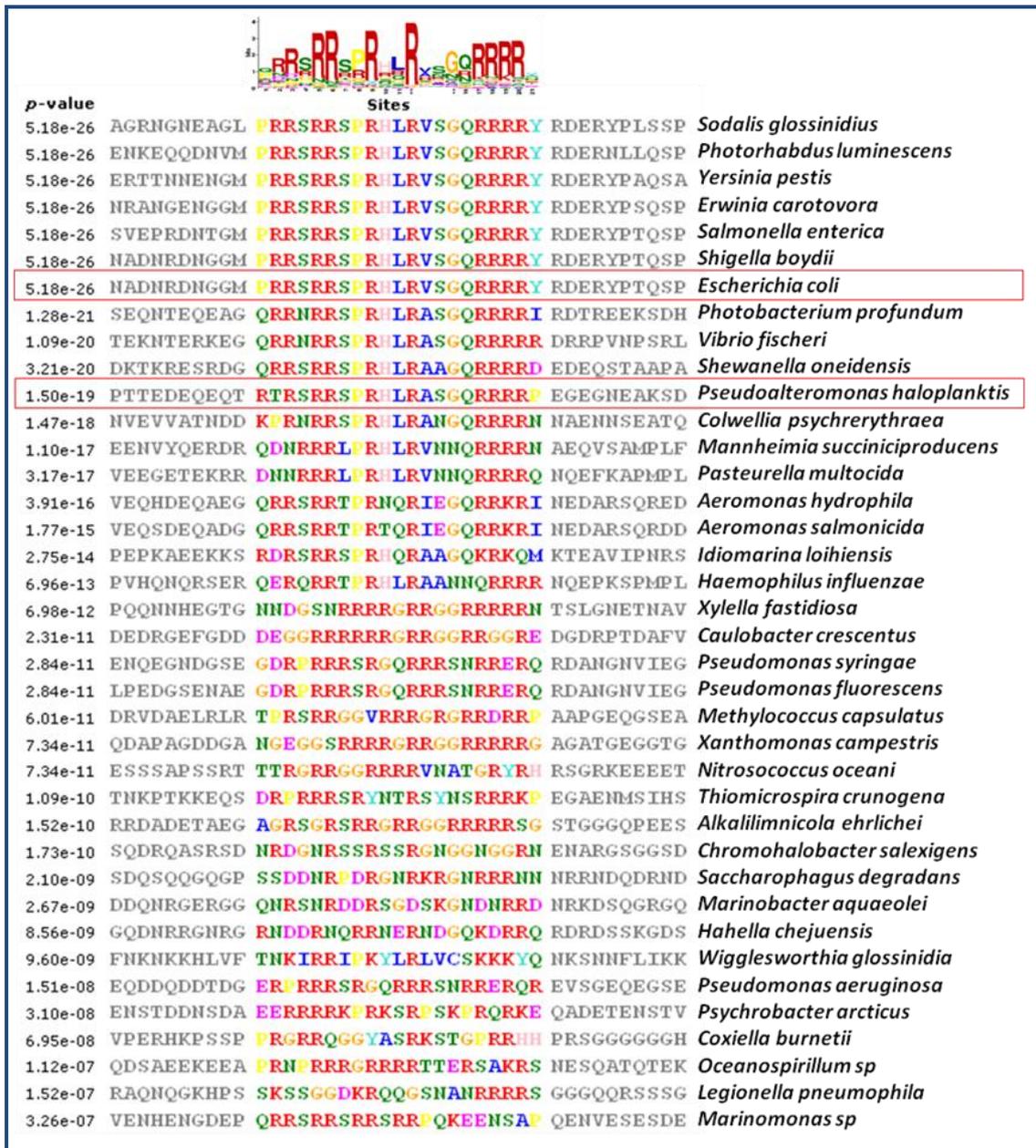


Figure 51 : Alignement de motifs AR2 et riches en arginines détectés par MEME.

Les carrés rouges entourent les motifs de la RNase E d'*E.coli* et de *P.haloplanktis*.

II.2.3. Cas du site de fixation de l'é nolase et la PNPase

Pour le microdomaine responsable de la fixation de l'é nolase caractérisé chez la RNase E d'*E.coli*, le programme MEME détecte 12 motifs sur 46 régions C-terminales (figure 52). Le motif détecté est conservé chez les *Entérobactériales*, les *Pasteurellales*, et les *Vibrionales*. Ceci est en accord avec les travaux obtenus sur la caractérisation du microdomaine d'interaction RNase E-é nolase (Chandran & Luisi, 2006) et les travaux montrant que le site de fixation de l'é nolase est absent chez les *Alteromonadales* (Ait-Bara & Carpousis, 2010).

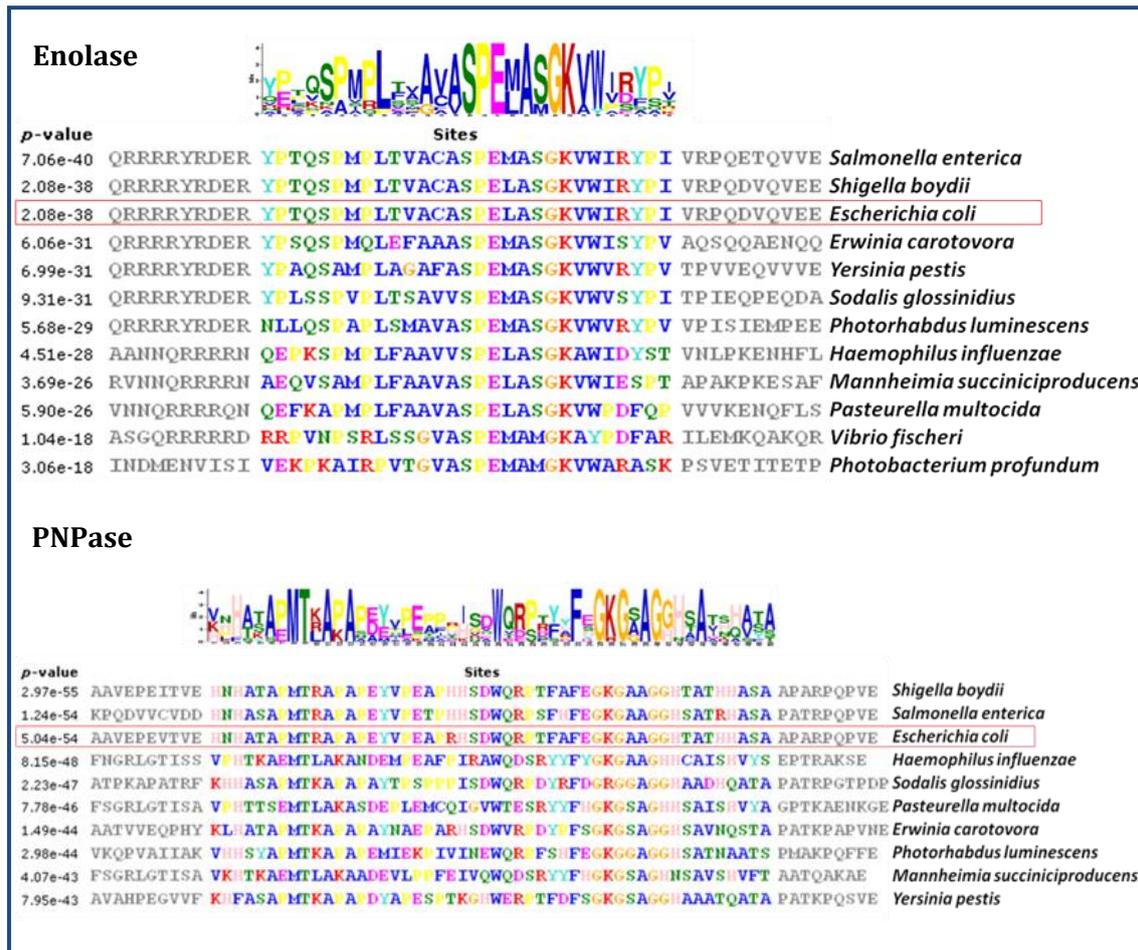


Figure 52 : Résultats MEME pour les microdomaines de fixation de l'énolase et de la PNPase.
Le carré rouge entoure les motifs de la RNase E d'*E.coli*.

Un autre motif détecté par le programme MEME est le microdomaine de fixation de la PNPase. Sur les 46 régions C-terminales de la RNase E, seules 10 d'entre elles possèdent ce motif (**figure 52**). Ceci concerne uniquement les *Entérobactériales* où le site est conservé. Ce résultat obtenu par MEME est en accord avec les travaux montrant que le microdomaine d'interaction avec la PNPase est conservé chez seulement les *Entérobactériales*. De plus, les travaux d'Erce et al., 2009, ont montré que le site d'interaction n'est pas conservé même si l'interaction RNase E-PNPase est conservée. C'est le cas également de mes travaux de thèse, où la PNPase est retrouvée au sein du dégradosome d'ARN de *P.haloplanktis* en interagissant avec la RNase E, même si le microdomaine d'interaction n'est pas conservé (Ait-Bara & Carpousis, 2010). De ce fait, l'interaction RNase E-PNPase est conservée au-delà des *Entérobactériales* sans pour autant avoir une conservation de la séquence du microdomaine d'interaction et renforce l'hypothèse d'une conservation structurale de l'interaction RNase E-PNPase (Ait-Bara & Carpousis, 2010). Au-delà des *Entérobactériales*, le site de fixation de la PNPase a suffisamment varié et évolué pour ne pas être détecté par MEME. Au-delà des *Alteromonadales*, la présence d'une interaction RNase E-PNPase reste inconnue à l'exception des *Pseudomonadales* où la RNase E de *P.syringae* interagit avec la RNase R (Purusharth et al., 2005).

II.2.4. Cas du site de fixation de RhlB

Un dernier motif détecté par le programme MEME et présent dans les 16 régions C-terminales est celui ressemblant au site de fixation de RhlB caractérisé chez les RNase E de *P.haloplanktis* et d'*E.coli* (**figure 53A**) (Ait-Bara & Carpousis, 2010, Chandran et al., 2007, Khemici et al., 2004). Ce résultat obtenu par MEME a montré que le site de fixation de RhlB présent chez la RNase E, est conservé des *Entérobactériales* jusqu'aux *Alteromonadales*. Ceci est en accord avec les données obtenues expérimentalement pour *P.haloplanktis* (Ait-Bara & Carpousis, 2010). Au-delà de ces bactéries, aucun motif n'a été détecté par MEME. Les *Entérobactériales* et *Alteromonadales* sont deux ordres éloignés séparés par les *Pateurellales*, les *Vibrionales* et les *Pateurellales*. De ce fait, l'interaction RNase E-RhlB semble conservée sur une large distance évolutive. Chez *E.coli*, cette interaction est nécessaire pour stimuler l'activité ATPase de RhlB. Cependant, la structure d'interaction RNase E-RhlB et le mécanisme de stimulation de l'activité ATPase de RhlB par la RNase E restent inconnus à ce jour.

Le microdomaine d'interaction RNase E-RhlB détecté par MEME est riche en arginine dont certaines sont fortement conservées notamment l'arginine R730 cruciale pour l'interaction RNase E-RhlB (**figure 53A**). Chez la RNase E d'*E.coli* et de *P.haloplanktis*, le microdomaine de fixation de RhlB est prédit pour former une hélice α (**figure 53B**). La formation de cette hélice α est renforcée par l'analyse de projection de l'hélice α sur une roue hélicale (**figure 53A**). Cette hélice α n'a pas été détectée chez la RNase E d'*E.coli* et *P.haloplanktis* par l'analyse PONDR® effectuée précédemment (Ait-Bara & Carpousis, 2010, Callaghan et al., 2004). Ceci peut être dû à la courte région en acide aminé prédite sur laquelle s'étend l'hélice α . Cette hélice α putative qui contient l'arginine R730 nécessaire pour la liaison de RhlB chez *E.coli*, pourrait être responsable de l'interaction RNase E-RhlB mais aussi de la stimulation de l'activité ATPase de RhlB.

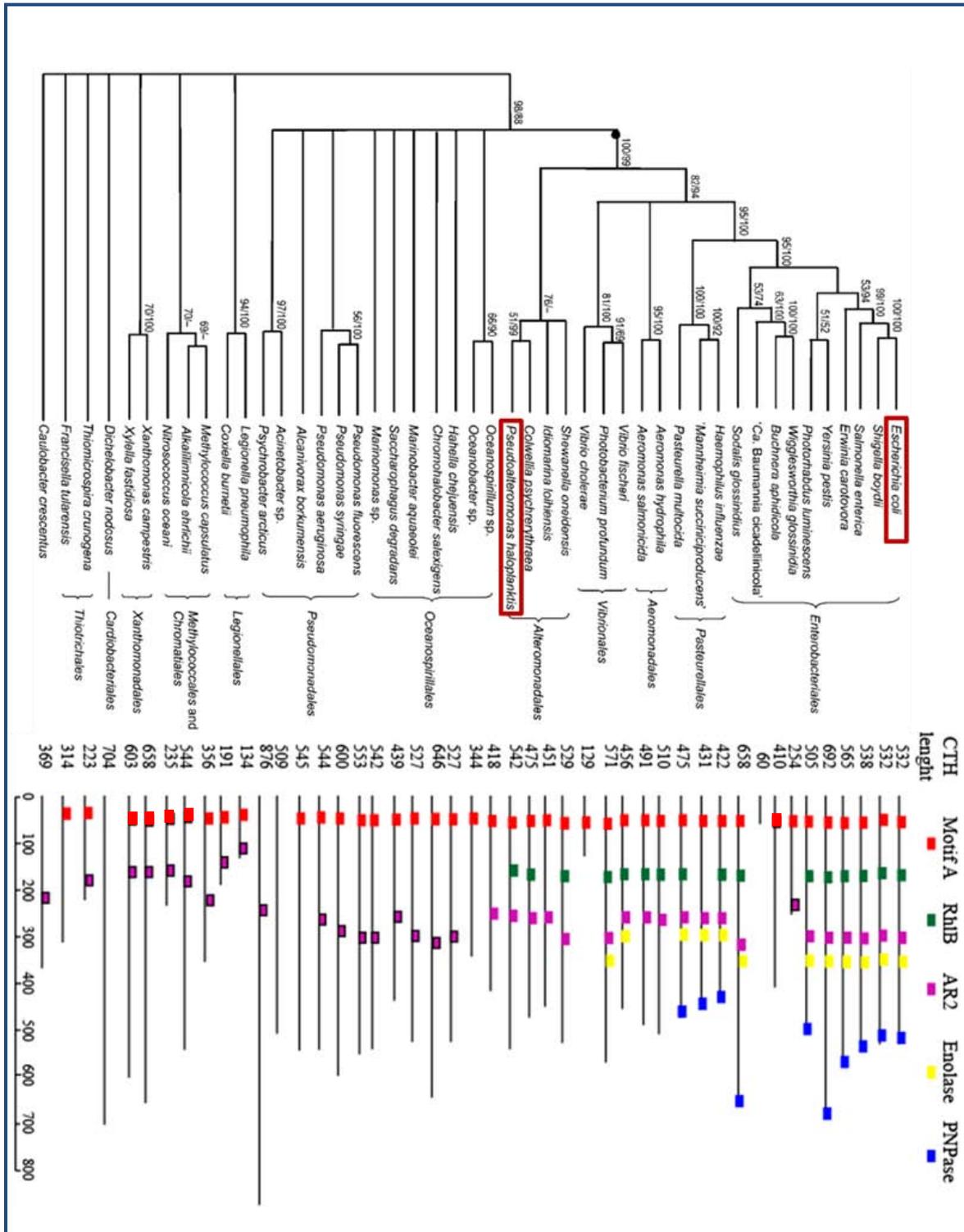


Figure 54 : Vue d'ensemble de la répartition des microdomaines chez les γ -protéobactéries. Pour chaque bactérie, la taille de la région C-terminale de la RNase E est indiquée (CTH lenght). Cette région C-terminale est représentée par une ligne horizontale sur laquelle sont indiqués les microdomaines présents suivant le code couleur. Le carré du microdomaine de l'AR2 en violet est entouré en noir, lorsque le programme MEME fait ressortir un site riche en arginine qui diffère en séquence de l'AR2.

II.2.5. Résumé de l'analyse MEME

La **figure 54** résume l'ensemble des données obtenues par MEME et montre la répartition des microdomaines caractérisés chez la RNase E d'*E.coli* et *P.haloplanktis*, chez d'autres RNase E de γ -protéobactéries. On retrouve le motif A largement distribué chez les γ -protéobactéries comme il a été précédemment montré (Khemici et al., 2008). Au côté du motif A, on constate la présence d'un motif riche en arginine de localisation similaire à l'AR2 chez les RNase E au-delà des *Alteromonadales*. Dans ce cas, il y a une conservation d'un microdomaine riche en arginine dans la région C-terminale des RNase E chez les γ -protéobactéries, qui pourrait être responsable comme l'AR2 des interactions RNase E-ARN. En ce qui concerne le « module » AR-RBD-HBS-AR2, il ne semble pas être conservé au-delà des *Alteromonadales*. La vue d'ensemble de la répartition des microdomaines chez les γ -protéobactéries montre que plus on s'éloigne du groupe des *Entérobactériales*, plus la conservation des microdomaines présents chez la RNase E d'*E.coli* diminue. Ceci montre que le dégradosome n'est pas conservé chez les γ -protéobactéries et renforce l'hypothèse que le dégradosome d'ARN d'*E.coli* est un cas de l'évolution des γ -protéobactéries (Marcaida et al., 2006). Un autre cas d'évolution des γ -protéobactéries est celui des parasites intracellulaires où la plupart des RNase E sont courtes comme c'est le cas de *Candidatus Blochmannia* (**figure 54**). Ces parasites ont tendance à perdre leurs gènes dispensables une fois chez leur hôte. L'ensemble de cette analyse MEME, on constate que les deux seuls microdomaines répartis chez les γ -protéobactéries sont le motif A et un microdomaine riche en arginine.

II.3. Au-delà des γ -protéobactéries

Il est possible d'étendre l'analyse par le programme MEME pour identifier de nouveaux microdomaines non caractérisés chez les RNase E d'autres bactéries en dehors des γ -protéobactéries. À titre d'exemple, si on s'intéresse aux α -protéobactéries, l'analyse MEME réalisée sur 13 séquences de la région C-terminale non catalytique de leur RNase E, récupérées sur le site du NCBI, montre la présence de deux microdomaines conservés (**figure 55**). L'un de ces microdomaines porte le motif GWW détecté chez l'ensemble des séquences choisies à l'exception de *Gluconobacter oxydans*. Ce motif serait responsable de l'interaction RNase E-PNPase chez *Caulobacter crescentus* (Steven Hardwick, Cambridge, communication personnelle) (**figure 55A**). Le programme MEME détecte également la présence de ce motif chez l' α -protéobactérie *Rhodobacter sphaeroides* qui appartient au même genre que *Rhodobacter capsulatus*, où un dégradosome d'ARN a été identifié (Jager et al., 2001). Ce dégradosome d'ARN contient en plus de la RNase E, deux hélicases à boîte DEAD non identifiées et le facteur Rho de terminaison de la transcription. Le motif GWW est aussi présent chez

II.4. Discussion

L'analyse par le programme MEME a permis de regarder la distribution des microdomaines présents chez la RNase E d'*E.coli*, chez d'autres RNase E des γ -protéobactéries. Étant donné la forte variabilité de la région C-terminale de ces RNase E, il aurait été impossible d'effectuer cette analyse en utilisant un programme comme Clustal W pour aligner ces séquences. L'analyse MEME chez les γ -protéobactéries, montre que certains microdomaines sont exclusivement présents chez les *Entérobactériales* jusqu'aux *Vibrionales*. D'autres sont plus largement conservés, et sont présents jusqu'aux *Alteromonadales*. L'analyse MEME montre que plus on s'éloigne des *Entérobactériales*, moins les microdomaines caractérisés de la RNase E d'*E.coli* sont conservés. Ceci suggère que le dégradosome d'ARN d'*E.coli* n'est pas conservé chez les γ -protéobactéries. Ceci rejoint la vue globale et émergente du dégradosome d'ARN d'*E.coli* comme étant un cas de l'évolution des γ -protéobactéries (Marcaida et al., 2006). Cependant, on ne peut pas exclure que les interactions RNase E-RhlB, RNase E-énolase, ou RNase E-PNPase soient conservées lorsque les microdomaines d'interaction ne sont pas conservés. Il est possible que ces microdomaines aient évolué tout en maintenant l'interaction comme c'est le cas pour l'interaction RNase E-PNPase de *P.haloplanktis*. Toutefois, l'absence d'interaction RNase E-énolase chez *P.haloplanktis* est corrélée à l'absence du site de fixation de l'énolase. Chez *P.syringae*, la RNase E interagit avec une hélicase à boîte DEAD autre que RhlB, et l'analyse MEME n'a pas détecté de microdomaine d'interaction RhlB-RNase E d'*E.coli*. De plus, chez *P.syringae* la RNase E interagit avec la RNase R. De ce fait, il semblerait que les microdomaines évoluent différemment et seraient responsables de l'évolution du dégradosome d'ARN et sa diversité. Il est possible d'étendre cette analyse en utilisant MEME pour la recherche de microdomaines présents chez les RNase E d'autres bactéries en dehors des γ -protéobactéries, aux γ -protéobactéries et même au-delà. Ceci serait une approche *in silico* d'identification des sites responsables des interactions RNase E-protéines, RNase E-ARN et/ou RNase E-membrane.

III. Distribution & phylogénie de la protéine RhlB

Les résultats phylogénétiques présentés dans cette partie sont des résultats préliminaires obtenus très récemment et ne sont pas encore publiés.

III.1. Objectifs

L'analyse MEME réalisée sur les microdomaines et les données sur les dégradosomes d'ARN identifiés (Ait-Bara & Carpousis, 2010, Purusharth et al., 2005) montrent que les interactions RNase E avec les protéines émolase et PNPase, ne sont pas conservées chez les γ -protéobactéries, même si l'émolase et la PNPase sont universellement conservées. En revanche, en ce qui concerne RhlB, les travaux réalisés en première partie de ce manuscrit montrent que l'interaction RNase E-RhlB, est plus largement conservée et s'étend des *Entérobactériales* jusqu'aux *Alteromonadales*. Ceci pourrait avoir un lien avec le fait que RhlB, à la différence de l'émolase et la PNPase, dépend de l'interaction physique avec la RNase E pour stimuler son activité ATPase. Existe-t-il une corrélation entre la présence du microdomaine d'interaction chez la RNase E et la présence de RhlB au sein d'une même bactérie ? Au-delà des *Alteromonadales*, aucun microdomaine d'interaction de RhlB chez la RNase E n'a été détecté *in silico* par le programme MEME. Pourtant, RhlB semble être assez bien conservée chez les γ -protéobactéries d'après l'analyse effectuée par (Iost & Dreyfus, 2006). De ce fait, l'interaction RNase E-RhlB semble avoir été perdue chez d'autres bactéries qui possèderaient RhlB, au profit d'autres interactions RNase E-hélicases à boîte DEAD comme chez *P.syringae* où la RNase E interagit avec RhlE (Purusharth et al., 2005). Il se pourrait aussi que la perte de cette interaction soit due à l'absence d'orthologue de RhlB. Étant donné que chez *E.coli*, la protéine RhlB est très proche des quatre autres hélicases à boîte DEAD en raison du « core » commun fortement conservé, il est difficile d'affirmer la présence d'orthologues de RhlB chez d'autres bactéries en les distinguant des autres hélicases. Afin de déterminer plus précisément la distribution des orthologues de RhlB chez les γ -protéobactéries, ces derniers ont été recherchés chez les γ -protéobactéries en tenant compte des

génomés récemment séquencés. Un second critère important est ajouté lors de la recherche de ces orthologues chez les γ -protéobactéries. En effet chez *E.coli*, RhlB se distingue des quatre autres hélicases à boîte DEAD par la présence à la fin du motif V d'une histidine (H320), au lieu d'un acide aspartique (D) chez les quatre autres hélicases à boîte DEAD (Chandran et al., 2007). Cette recherche d'orthologues de RhlB est effectuée dans un premier temps chez les 46 bactéries sélectionnées représentant les γ -protéobactéries. Puis cette analyse a été renforcée par une étude phylogénétique de l'ensemble des orthologues de RhlB connus en se focalisant chez les γ -protéobactéries.

III.2. Les orthologues de RhlB chez les γ -protéobactéries

La recherche des orthologues de RhlB chez les γ -protéobactéries, est effectuée comme précédemment (Iost & Dreyfus, 2006), en tenant compte des génomés récemment séquencés. L'identification des RhlB potentielles est basée sur le score obtenu par le programme BLAST et la soustraction du score qui correspond à l'homologie du « core » commun entre deux hélicases à boîte DEAD (Iost & Dreyfus, 2006). La présence d'une histidine à la fin du motif V de chaque orthologue putatif de RhlB trouvé est analysée pour permettre éventuellement de les distinguer des autres hélicases à boîte DEAD. Le résultat de cette recherche a montré la présence de protéines RhlB putatives chez la plupart des γ -protéobactéries. De plus, ces RhlB putatives portent toutes une histidine à la fin du motif V. Afin de corréler ces résultats avec l'analyse MEME, la présence d'orthologues de RhlB et de l'histidine est reportée suivant l'arbre phylogénétique des γ -protéobactéries (**figure 56**). La protéine RhlB semble être assez bien répandue chez les γ -protéobactéries comme il avait été montré précédemment (Iost & Dreyfus, 2006). On observe une corrélation entre la présence de score de BLAST positif et la présence de l'histidine chez les orthologues putatifs de RhlB (**figure 56**). En revanche, lorsque les scores sont négatifs, un acide aspartique est présent dans la séquence obtenue par BLAST. De ce fait, l'histidine semble être un critère qui distingue les orthologues de RhlB des orthologues des hélicases à boîte DEAD. En ce qui concerne la distribution du microdomaine de fixation de RhlB chez les RNase E, on constate qu'il n'y a pas de corrélation entre la présence du microdomaine et celle de RhlB chez une même bactérie. De ce fait, la perte de l'interaction RNase E-RhlB chez *P.syringae* malgré la présence de RhlB, peut être due à l'absence du microdomaine d'interaction chez la RNase E (Purusharth et al., 2005).

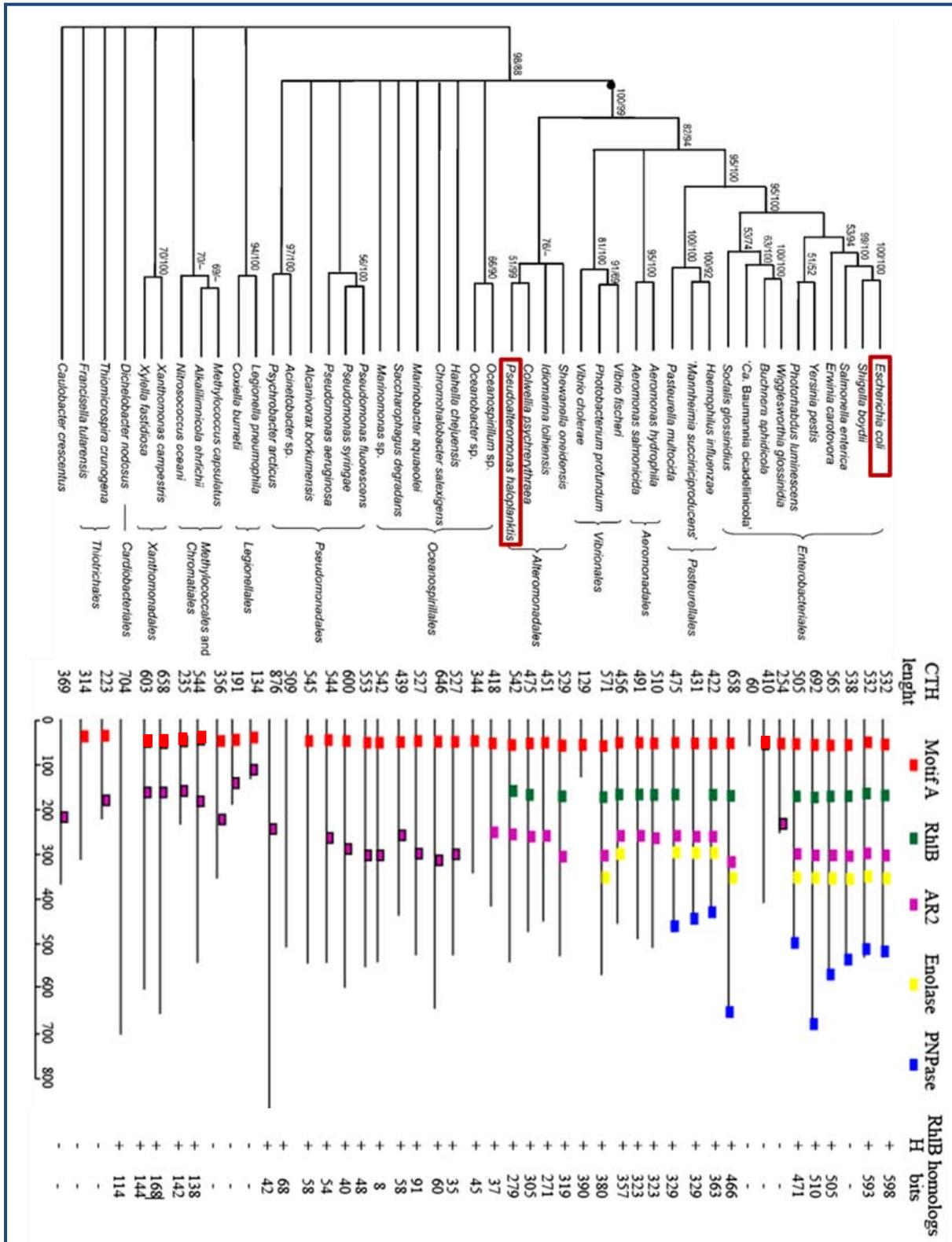


Figure 56 : Présence d'orthologues putatifs de RhlB et de l'histidine chez les γ -protéobactéries.

Pour chaque bactérie, la présence de RhlB est recherchée par BLAST en utilisant la protéine RhlB d'*E.coli* comme « sonde ». Au score obtenu est soustrait le score de 275 qui correspond à l'homologie du core commun des hélicases à boîte DEAD d'*E.coli*. Pour chaque RhlB putative, la présence (+) ou l'absence (-) de l'histidine à la fin du motif V est indiquée.

III.3. Phylogénie de RhlB chez les γ -protéobactéries

III.3.1. Une histidine, critère d'identification de RhlB ?

L'analyse des séquences de l'ensemble des orthologues de RhlB a montré que l'histidine présente chez RhlB d'*E.coli* (H320) à la fin du motif V, est conservée chez tous les orthologues de RhlB (207 orthologues au total, **Tableau 3**). En ce qui concerne les quatre autres hélicases à boîte DEAD d'*E.coli*, seules 24 orthologues putatives de RhlE possèderaient une histidine dans le motif V. Les hélicases à boîte DEAD CsdA, SrmB et DpbA, possèdent à la fin de leur motif V, un acide aspartique (**Tableau 3**). De ce fait, cette histidine fortement conservée chez RhlB, peut être utilisée comme critère qui la distingue des hélicases CsdA, SrmB et DbpA.

Protéines	H (histidine)	D (acide aspartique)
RhlB	207	0
RhlE	24	402
CsdA	0	226
SrmB	0	214
DbpA	0	171

Tableau 3 : Les orthologues des hélicases à boîte DEAD d'*E.coli*.

Pour chaque hélicase d'*E.coli* est donné le nombre d'orthologues qui possèdent à la fin de leur motif V une histidine (H) ou un acide aspartique (D).

III.3.2. RhlB forme un groupe distinct

Étant donné la forte similarité de séquences due au core commun fortement conservé entre les hélicases à boîte DEAD, il est important de valider les recherches effectuées par BLAST et le critère de distinction par l'histidine, par des analyses phylogénétiques. Un arbre phylogénétique des hélicases à boîte DEAD d'*E.coli* a été généré à partir des orthologues putatifs présents chez les γ -protéobactéries. Ceci est réalisé en collaboration avec Yves Quentin, bio-informaticien au Laboratoire de Microbiologie et de Génétique Moléculaires, en partant de l'ensemble des cinq hélicases à boîte DEAD d'*E.coli*, présentes chez les génomes des γ -protéobactéries séquencés. Les séquences des orthologues des cinq hélicases à boîte DEAD sont récupérées puis analysées et triées. Au final, 391

séquences d'hélicases à boîte DEAD des γ -protéobactéries ont été utilisées pour générer l'arbre phylogénétique.

L'analyse de l'arbre phylogénétique montre que les hélicases à boîte DEAD forment cinq groupes distincts (**figure 57**). Cependant, dans le cas de RhlE, le groupe est moins bien défini comparé à celui de RhlB qui est plus largement distribué. Ceci serait dû à la redondance du gène *rhlE* chez plusieurs génomes comme *P.haloplanktis* où l'on trouve trois copies du gène *rhlE*, (Iost & Dreyfus, 2006, Medigue et al., 2005). Ainsi, même si les cinq hélicases à boîte DEAD sont très proches entre elles, il est possible de les distinguer phylogénétiquement. Si on s'intéresse plus particulièrement à la protéine RhlB, la recherche de ses orthologues chez les archées et bactéries, montre que celle-ci est essentiellement confinée chez les γ -protéobactéries (**figure 60**, en annexe) où elle est largement distribuée (**figure 58**).

L'arbre phylogénétique généré à partir des séquences des orthologues putatifs de RhlB montre la présence de RhlB chez les γ -protéobactéries, mais aussi chez les δ -protéobactéries et les *Leptospiraceae* des *Spirochaetales* (**Figure 59**). Les séquences RhlB des δ -protéobactéries sont localisées dans le groupe des γ -protéobactéries ce qui suggère un transfert horizontal de gènes. Pour les séquences des RhlB des *Leptospiraceae*, elles sont localisées en dehors des γ -protéobactéries et forme un « out group » qui suggère une origine ancienne de RhlB. Ces données sont des résultats préliminaires et d'autres analyses plus approfondies sont nécessaires pour valider ces hypothèses.

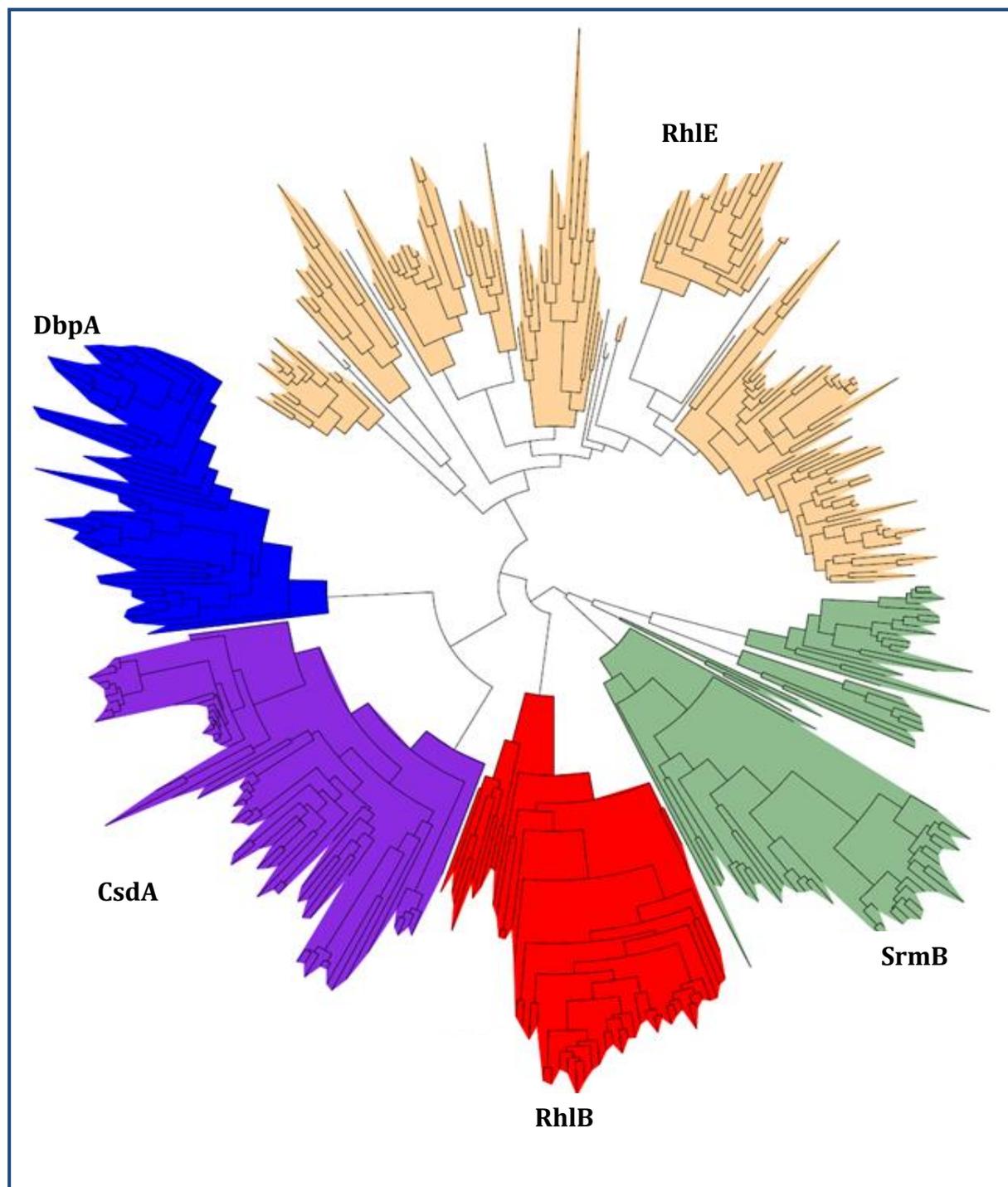
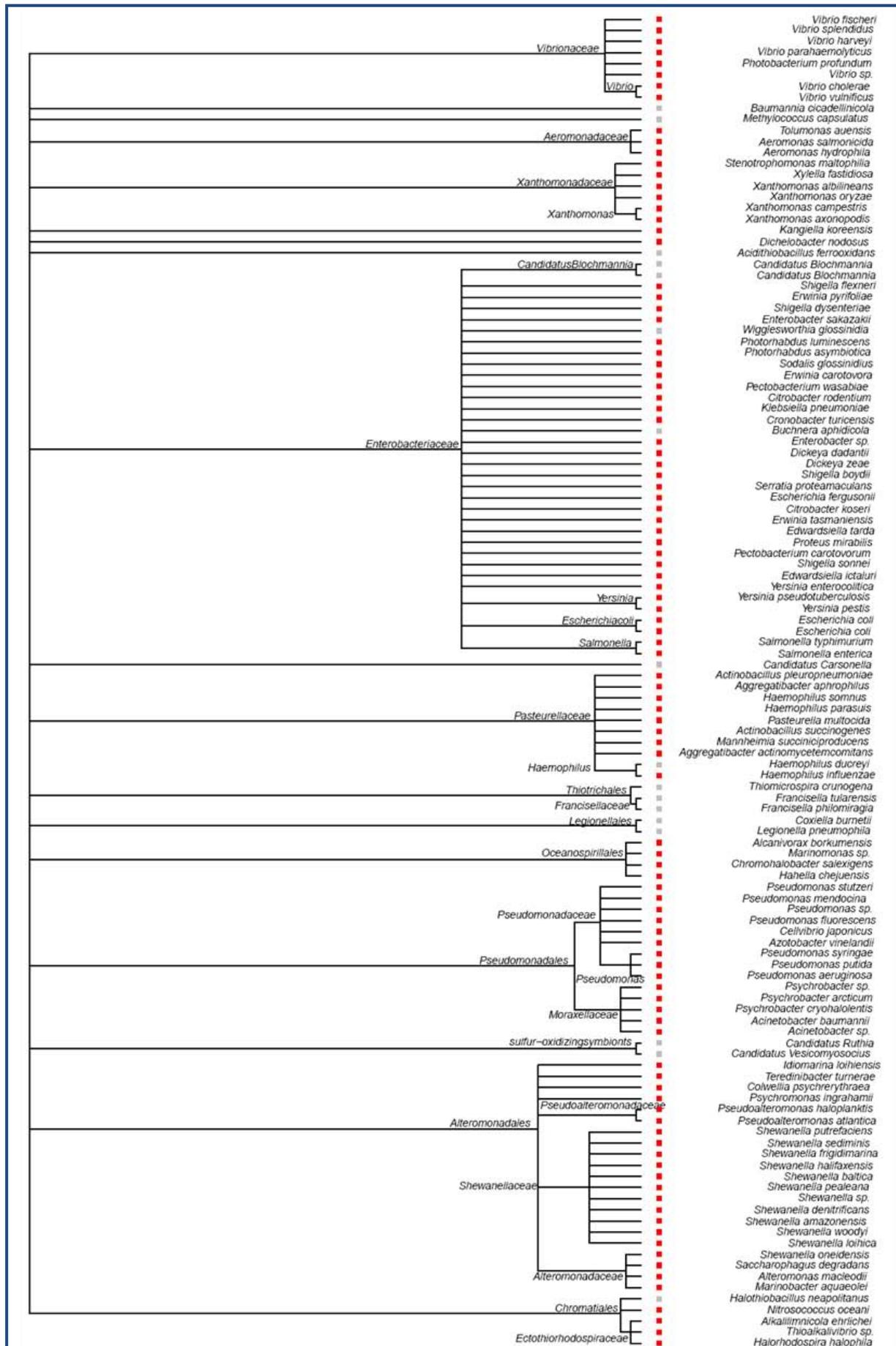


Figure 57 : Arbre phylogénétique des orthologues des hélicases à boîte DEAD d'*E.coli*.
RhIB en rouge, CsdA en violet, DbpA en bleu, RhIE en orange et SrmB en vert.

Figure 58 : Répartition des orthologues de RhIB chez les γ -protéobactéries. En page suivante.



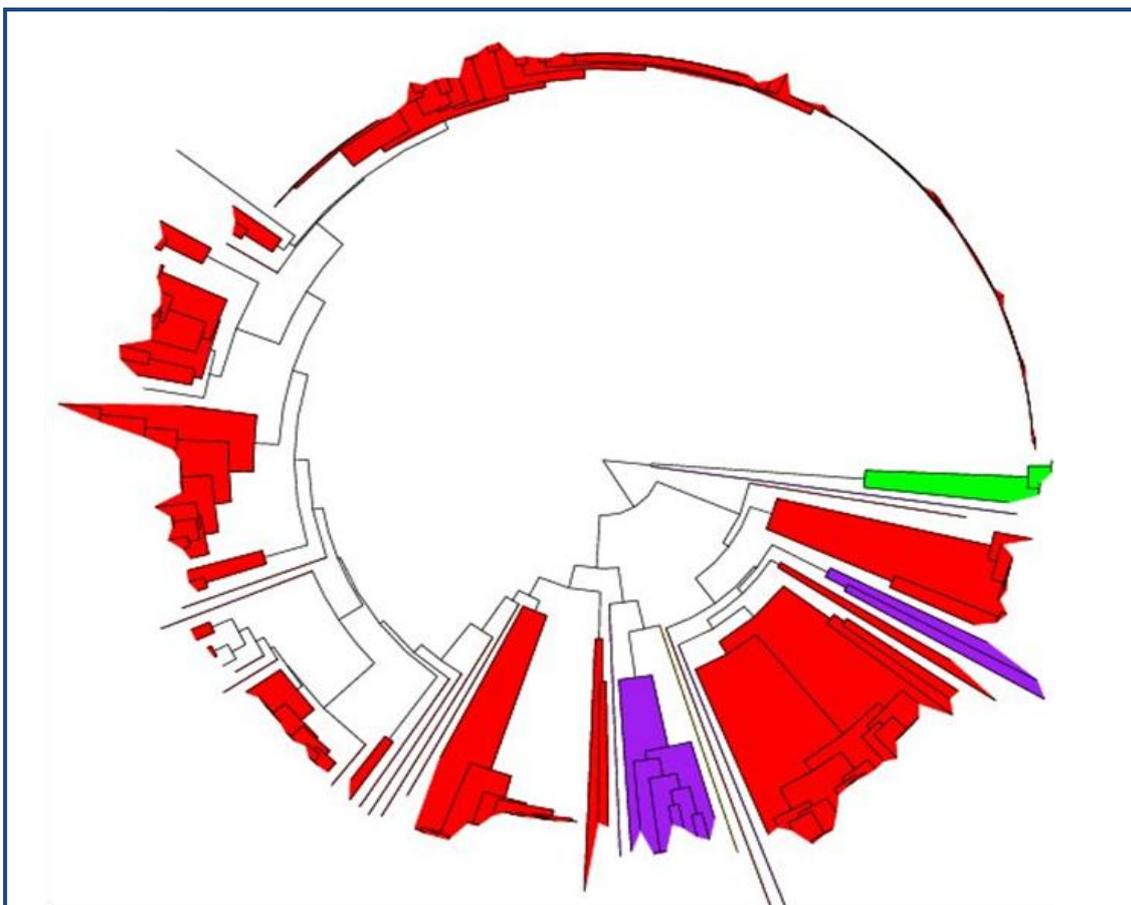


Figure 59 : Arbre phylogénétique de la protéine RhlB.

Présence de RhlB chez les γ -protéobactéries (en rouge), chez les *Spirochaetales* (*Leptospiraceae*) en violet et chez les δ -protéobactéries (en vert).

III.4. Discussion

La protéine RhlB est très proche des quatre autres hélicases à boîte DEAD d'*E.coli* de par la présence du core commun fortement conservé. De ce fait, la détection de la présence d'orthologues de RhlB chez d'autres bactéries est difficile. L'analyse phylogénétique de l'ensemble des hélicases à boîte DEAD orthologues à celle d'*E.coli* chez les γ -protéobactéries, a permis de montrer qu'il est possible de séparer ces protéines phylogénétiquement parce qu'elles forment cinq groupes distincts. En ce qui concerne la protéine RhlB, l'analyse de l'ensemble des orthologues putatifs de RhlB montre qu'elle est essentiellement confinée chez les γ -protéobactéries. Plus exactement, RhlB est largement distribuée chez les γ -protéobactéries à l'exception de quelques cas comme les *Legionellales*. Cette analyse phylogénétique renforce les analyses BLAST effectuées par Iost & Dreyfus, 2006 et celles effectuées au cours de ma thèse en rajoutant le second critère de distinction de RhlB. Cette analyse phylogénétique a permis de montrer que l'histidine présente chez RhlB d'*E.coli* à la fin du motif V, est

fortement conservée et peut être utilisée comme critère de distinction entre les orthologues putatifs de RhlB et ceux de CsdA, SrmB et DbpA. Pour les orthologues de RhlE, il faut être prudent en regardant le score donné par le programme BLAST étant donné que 24 sur 426 RhlE putatives possèdent une histidine. Cette histidine est ainsi fortement conservée chez la protéine RhlB. La signification biologique de cette différence histidine/acide aspartique entre RhlB et les quatre hélicases à boîte DEAD reste inconnue. Il semblerait que cette histidine chez RhlB d'*E.coli* soit en contact direct avec l'ATP (**figure 14**) (Worrall et al., 2008b). Chez le variant RhlB (H320D) aucune activité ATPase n'a été détectée, même en présence du peptide RNase E (696-762) capable de stimuler l'activité ATPase de RhlB (Worrall et al., 2008b). Ceci montre que la présence de l'histidine à la fin du motif V est cruciale pour l'activité ATPase. Ceci expliquerait la forte conservation de cette histidine chez tous les orthologues putatifs de RhlB. Étant donné que la stimulation de l'activité ATPase nécessite la présence de la RNase E, l'histidine pourrait être responsable de la stimulation de RhlB par le peptide RNase E (694-768).

3

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Les travaux de recherche menés au cours de ma thèse se sont focalisés sur la RNase E de la bactérie marine adaptée au froid *P.haloplanktis*. Des tests de complémentation de la RNase E d'*E.coli* par la RNase E de *P.haloplanktis* ont été réalisés chez *E.coli*. Ensuite, les microdomaines responsables des interactions RNase E-protéines pour former le dégradosome d'ARN de *P.haloplanktis* ont été caractérisés. Puis, l'analyse de ces microdomaines est élargie de manière *in silico* à d'autres RNase E des γ -protéobactéries. Enfin, une étude phylogénétique de la protéine RhIB a été initiée.

Les tests de complémentation

Les tests de complémentation réalisés chez *E.coli* ont montré que la RNase E de *P.haloplanktis* est capable de restaurer la viabilité d'une souche d'*E.coli* dépourvue de RNase E. Ceci montre une conservation de la fonction de la RNase E de *P.haloplanktis* comme c'est le cas pour les autres RNase E/G caractérisées. Cependant, cette complémentation dépend de la température et du niveau d'expression de la RNase E de *P.haloplanktis* chez *E.coli*. Un défaut de complémentation inattendu a été observé à 15 °C lors de ces tests de complémentation et montre une première évidence d'un rôle de la RNase E d'*E.coli* à basse température. Plus exactement, la région de l'AR-RBD de la RNase E d'*E.coli* qui permettrait le recrutement d'ARN structurés par la RNase E (Kaberdin et al., 2000, Leroy et al., 2002), semble être importante pour la croissance d'*E.coli*. La comparaison des structures primaires des RNase E d'*E.coli* et de *P.haloplanktis* a montré une différence dans le positionnement de la structure en coiled-coil dans la région de l'AR-RBD (RNase E d'*E.coli*) et le site de fixation de RhIB (RNase E de *P.haloplanktis*). Cette différence pourrait être significative et à l'origine de ce défaut de complémentation. Il a été montré récemment que la RNase E d'*E.coli* et sa région C-terminale ont un rôle dans la régulation de l'expression des protéines induites par un choc au froid comme CspE (Uppal et al., 2008). La RNase E aurait un rôle important dans la réponse au choc au froid. La région de l'AR-RBD pourrait intervenir dans la régulation de ces protéines induites par le froid. Dans ce cas, la délétion de cette région chez la RNase E d'*E.coli* affecterait la stabilité du messenger *cspE*.

Le dégradosome d'ARN de P.haloplanktis

La caractérisation du dégradosome d'ARN de *P.haloplanktis* a montré qu'il est composé au moins de la RNase E et des protéines RhIB et PNPase. À l'exception de l'absence de l'énolase, ce dégradosome d'ARN de *P.haloplanktis* est similaire à celui d'*E.coli*. Ceci suggère que la dégradation des ARN est aussi similaire chez ces deux bactéries. Pourtant, *E.coli* et *P.haloplanktis* sont deux bactéries éloignées phylogénétiquement et ayant deux niches écologiques très différentes. *E.coli* est une bactérie commensale des mammifères retrouvée dans l'intestin où la température avoisine les 37

°C. Quand à la bactérie *P.haloplanktis*, son habitat est l'océan Antarctique où les températures peuvent varier entre 0 et 5 °C. La caractérisation du dégradosome d'ARN de *P.haloplanktis* ne montre aucune adaptation au froid et aucune plasticité d'interaction RNase E-protéines dans la composition du dégradosome d'ARN. Dans ce cas, ce sont les protéines au sein du dégradosome d'ARN de *P.haloplanktis* qui seraient intrinsèquement adaptées au froid, comme c'est le cas de nombreuses protéines de bactéries psychrophiles (Feller, 2007, Feller & Gerday, 2003) et qui permettraient la dégradation des ARN à basse température.

Absence de l'énolase dans le dégradosome d'ARN de P.haloplanktis

L'absence de l'énolase au sein du dégradosome d'ARN de *P.haloplanktis* le différencie du dégradosome d'ARN d'*E.coli*. Chez ce dernier, la structure d'interaction RNase E-énolase a été résolue et implique une hélice α fortement conservée chez les *Entérobactériales*, qui s'insère dans l'espace formé entre deux dimères d'énolase (Chandran & Luisi, 2006, Nurmohamed *et al.*, 2010). Par l'analyse de la séquence primaire, cette hélice α est absente chez la RNase E de *P.haloplanktis* et aucune interaction entre la RNase E et l'énolase de *P.haloplanktis* n'a été observée. Chez *E.coli*, le rôle de l'énolase dans la dégradation de l'ARN est longtemps resté inconnu, mais un premier rôle physiologique a été montré. L'énolase interviendrait dans la dégradation rapide du messager *ptsG* codant pour le transport du sucre, lors d'un stress dû à l'accumulation du G6P dans la cellule (Morita *et al.*, 2005). En ce qui concerne *P.haloplanktis*, le séquençage de son génome a révélé l'absence du système cAMP-CAP responsable de la répression catabolique et du système PTS (Phosphotranferase system) nécessaire pour le transport du sucre. Ceci expliquerait l'incapacité de *P.haloplanktis* à pousser sur du glucose (Medigue *et al.*, 2005). De plus, *P.haloplanktis* est une bactérie marine dont l'habitat est l'eau de mer pauvre en source de carbone, azote et phosphore. De ce fait, *P.haloplanktis* ne rencontrerait pas de stress lié à l'accumulation du G6P et de par le rôle de l'énolase dans la dégradation du messager *ptsG* chez *E.coli*, ceci expliquerait l'absence de l'énolase au sein du dégradosome d'ARN. L'absence de l'interaction RNase E-énolase chez *P.haloplanktis* suggère que cette interaction aurait été acquise au cours de l'évolution des γ -protéobactéries comme les *Entérobactériales*.

Interaction RNase E-PNPase

L'interaction RNase E-PNPase chez *P.haloplanktis* implique un microdomaine variable en séquence en comparaison avec celui des RNase E d'*E.coli* et de *V.angustum*. Ceci peut être expliqué par la nature de l'interaction RNase E-PNPase qui implique une extension de feuillet β , largement répandue dans les interactions protéines-protéines (Nurmohamed *et al.*, 2009, Remaut & Waksman, 2006). De manière remarquable, la même structure d'interaction RNase E-PNPase est retrouvée au sein de l'exosome humain, entre les protéines Rrp45 et Rrp46 (Nurmohamed *et al.*, 2009). Cette interaction RNase E-PNPase ne nécessiterait aucune conservation en séquence du microdomaine d'interaction, mais plutôt une conservation structurale de l'interaction en extension de feuillet β . Une

co-variation des interfaces de contact RNase E-PNPase permettrait la conservation structurale de cette interaction. Ceci expliquerait la conservation chez *P.haloplanktis* de l'interaction RNase E-PNPase ainsi que la spécificité dépendante de l'espèce (Ait-Bara & Carpousis, 2010). Il serait nécessaire de cristalliser la structure d'interaction RNase E-PNPase de *P.haloplanktis* comme pour l'interaction RNase E-PNPase d'*E.coli*, pour comprendre au niveau moléculaire, la conservation de l'interaction RNase E-PNPase sur une large distance évolutive allant des *Entérobactériales* jusqu'aux *Alteromonadales*. Cette interaction RNase E-PNPase est aussi retrouvée au-delà des γ -protéobactéries, chez la bactérie à Gram positif *S.coelicolor* et chez *C.crescentus* (Lee & Cohen, 2003), Steven Hardwick, Cambridge, communication personnelle. Ces interactions pourraient impliquer la même structure en extension de feuillet β dont la conservation structurale maintient l'interaction RNase E-PNPase (Nurmohamed et al., 2009). Il serait nécessaire de cristalliser la structure d'interaction entre les protéines RNase E et PNPase de *C.crescentus* et *S.coelicolor*, après avoir caractérisé le microdomaine d'interaction. L'ensemble de ces données cristallographiques permettrait de comprendre comment l'interaction entre les deux protéines RNase E et PNPase est maintenue au cours de l'évolution au sein de plusieurs dégradosomes.

Chez d'autres γ -protéobactéries, aucune interaction RNase E-PNPase n'a été détectée comme c'est le cas de la bactérie psychrophile *P.syringae* Lz4W où la RNase E interagit avec l'exoribonucléase hydrolytique RNase R (Purusharth et al., 2005). Les auteurs de ces travaux ont proposé que le recrutement de la RNase R au sein du dégradosome d'ARN soit un mécanisme d'adaptation au froid permettant de réaliser à basse température des réactions de faible énergie en dégradant l'ARN par un mécanisme hydrolytique (Purusharth et al., 2005). Cependant, au sein du dégradosome d'ARN de *P.haloplanktis*, on retrouve la PNPase qui possède un mécanisme phosphorolytique de dégradation des ARN. Étant donné que les bactéries *P.haloplanktis* et *P.syringae* ont la même niche écologique, le recrutement de la RNase R n'est pas un mécanisme commun d'adaptation au froid des bactéries psychrophiles et psychrotolérantes. De ce fait, la présence chez une bactérie donnée d'un dégradosome d'ARN d'activité phosphorolytique ou hydrolytique ne semble pas dépendre des conditions environnementales.

Phylogénie de la protéine RhlB

Les études phylogénétiques concernant la protéine RhlB et présentées dans ce manuscrit, ont montré qu'il est possible de distinguer RhlB des quatre autres hélicases à boîte DEAD d'*E.coli* malgré la présence du core commun fortement conservé. En effet, l'arbre phylogénétique généré à partir de tous les orthologues des cinq hélicases à boîte DEAD d'*E.coli* a montré que les cinq hélicases forment 5 groupes distincts. L'étude phylogénétique a montré également que RhlB est conservée essentiellement chez les γ -protéobactéries. En revanche, l'analyse MEME a montré que le microdomaine d'interaction de RhlB chez la RNase E, est conservé des *Entérobactériales* jusqu'aux *Alteromonadales*. Au-delà des *Alteromonadales*, ce microdomaine semble absent tandis que RhlB est

présente comme c'est le cas pour la RNase E de *P.syringae* qui interagit avec l'hélicase RhlB (Purusharth et al., 2005). De ce fait, il n'y aurait aucune corrélation entre la présence du microdomaine d'interaction de RhlB chez la RNase E et la présence de RhlB. Chez *E.coli*, ce microdomaine est crucial pour stimuler l'activité ATPase de RhlB qui nécessite la présence chez RhlB de l'histidine H320. Cette histidine qui distingue RhlB des quatre autres hélicases à boîte DEAD (Chandran et al., 2007) est conservée chez tous les orthologues putatifs de RhlB et peut être utilisée comme critère de distinction des quatre autres hélicases à boîte DEAD d'*E.coli*. Le rôle de cette histidine H320 reste inconnu, mais elle pourrait être responsable de la stimulation de RhlB par le peptide RNase E (694-768) (Worrall et al., 2008a).

Interaction RNase E-RhlB

En ce qui concerne l'interaction RNase E-RhlB, elle est retrouvée au sein du dégradosome d'ARN de *P.haloplanktis*, mais aussi entre la RNase E de *P.haloplanktis* et RhlB d'*E.coli*. Cette interaction hétérologue suggère que la surface d'interaction est hautement conservée et nécessite la région minimale d'interaction chez la RNase E de *P.haloplanktis* allant de 684 à 716 acides aminés (Ait-Bara & Carpousis, 2010). Ce microdomaine d'interaction est similaire à la région présente chez la RNase E d'*E.coli*, conservée chez les *Entérobactériales*, et contenant l'arginine R730 fortement conservée nécessaire pour la liaison de RhlB (Ait-Bara & Carpousis, 2010, Chandran et al., 2007, Khemici et al., 2004). L'analyse par le programme MEME de plusieurs régions C-terminales des RNase E de γ -protéobactéries, montre que le microdomaine d'interaction RNase E-RhlB de *P.haloplanktis* est conservé des *Entérobactériales* jusqu'aux *Alteromonadales*, ce qui représente une large distance évolutive. De plus, cette analyse MEME a révélé que ce microdomaine conservé est riche en arginine dont certaines sont fortement conservées. Chez les RNase E de *P.haloplanktis* et d'*E.coli*, ce microdomaine est prédit pour former une hélice α indétectable par l'analyse PONDR®. La présence de plusieurs arginines au niveau du microdomaine d'interaction RNase E-RhlB et plus exactement au niveau de l'hélice α prédite, fait penser à un mécanisme « d'arginine finger » (R-finger) de stimulation de l'activité ATPase de RhlB par la RNase E. Ce mécanisme de stimulation de l'activité ATPase est retrouvé chez de nombreuses NTPases et implique une arginine capable de lier le γ -phosphate des NTP lié à la protéine (Scheffzek et al., 1998). Ceci permet l'hydrolyse du NTP en stabilisant l'état de transition de la réaction qui peut amener à un changement conformationnel après hydrolyse du NTP. Cette arginine finger peut être portée par un domaine de l'ATPase elle-même comme pour la protéine DbpA, situé au niveau du motif VI (Sharpe and Uhlenbeck, 2007) ou par un partenaire protéique de l'ATPase (Scheffzek et al., 1998). Ce dernier cas pourrait correspondre à celui de RhlB dont l'activité ATPase est stimulée par la RNase E. De ces observations, plusieurs perspectives sont à envisager. Des peptides de différentes tailles portant le microdomaine d'interaction RNase E-RhlB de *P.haloplanktis* et d'*E.coli* peuvent être surexprimés en même temps que RhlB par un système de co-expression qui permet de voir par co-purification, le complexe RhlB-peptides

(Worrall et al., 2008a). Des mutations dirigées des acides aminés de ces peptides permettraient d'identifier les acides aminés responsables de l'interaction RNase E-RhlB. De plus, des tests de stimulation de l'activité ATPase de RhlB en présence de ces peptides sauvages et portant les mutations permettraient de voir les acides aminés responsables de la stimulation de l'activité ATPase. La mutation en alanine des arginines fortement conservées et présentes dans le microdomaine, permettrait d'identifier une arginine finger potentielle de stimulation de l'activité ATPase qui remplit les critères suivants : cette arginine finger ne serait pas fonctionnellement remplacée par un acide aminé basique et sa mutation affecterait uniquement la stimulation de l'activité ATPase sans affecter l'interaction RNase E-RhlB (Scheffzek et al., 1998). À ces études biochimiques, peuvent se rajouter des études cristallographiques en utilisant des peptides synthétiques portant le microdomaine d'interaction RNase E-RhlB d'*E.coli* et de *P.haloplanktis* pour tenter de cristalliser ces peptides en présence de RhlB. L'ensemble de ces perspectives permettrait de mieux comprendre l'interaction RNase E-RhlB qui est l'interaction RNase E-protéine la moins caractérisée du dégradosome d'ARN d'*E.coli* et comprendre le mécanisme moléculaire par lequel la RNase E contrôle l'activité ATPase de RhlB. Ce contrôle de l'activité ATPase de RhlB peut être lié à la conservation chez certaines RNase E d'un « module » composé des microdomaines de fixation de RhlB et des deux sites de fixation de l'ARN (Ait-Bara & Carpousis, 2010) en accord avec le modèle de coopération proposé récemment (Chandran et al., 2007).

En résumé, l'ensemble de ces travaux de thèse a permis de caractériser le dégradosome d'ARN de la bactérie marine adaptée au froid *P.haloplanktis* qui s'ajoute aux dégradosomes d'ARN identifiés chez les bactéries. D'abord, la caractérisation des microdomaines chez la RNase E de *P.haloplanktis* a permis de mieux comprendre la conservation de deux types d'interaction retrouvés au sein du dégradosome d'ARN et répandus sur une large distance évolutive : l'interaction RNase E-PNPase et RNase E-RhlB. La première interaction impliquerait une conservation structurale de l'interaction tandis que la seconde, nécessite une conservation d'acides aminés clés du microdomaine qui peut être lié au contrôle de l'activité ATPase de RhlB. Ensuite, les travaux utilisant le programme MEME renforcent de manière *in silico* que la dégradosome d'ARN d'*E.coli* est un cas de l'évolution des γ -protéobactéries. Enfin, la caractérisation plus en détail du microdomaine de fixation de RhlB est un premier pas pour comprendre la structure d'interaction RNase E-RhlB et le mécanisme de stimulation de l'activité ATPase de RhlB par la RNase E.

4

MATERIELS & METHODES

Plasmides & souches utilisés

Plasmides	Caractéristiques	Références
pAM238	Dérive du pGB2 (origine de répllication du pSC101). Résistance à la spectinomycine.	(Churchward <i>et al.</i> , 1984)
pAM- <i>rne</i>	pAM238 portant le fragment chromosomique PstI contenant le gene <i>rne</i> .	(Vanzo <i>et al.</i> , 1998)
pVK200	pAM- <i>rne</i> FLAG.	V. Khemici
pET15b-RneCTH	La région C-terminale (CTH) de la RNase E d' <i>E.coli</i> est clonée dans le pET15b.	(Khemici <i>et al.</i> , 2004)
pJB3	Vecteur de clonage à large spectre d'hôte. Dérive du plasmide RK2.	(Blatny <i>et al.</i> , 1997)
pIB3	pJB3 portant l'origine de répllication du plasmide résident pMtBL de <i>P.haloplanktis</i> (fragment 1914-2786 pb).	I. Bagdiul & M. Dreyfus.
pET15b	Vecteur d'expression de protéines chez <i>E.coli</i> .	Novagen
pSAB1	pET15b, <i>Phrne</i> .	
pSAB11	pAM238 où la région lacZ a été délétée.	
pSAB12	pSAB11, <i>Phrne</i> .	
pSAB13	pSAB11, le gène <i>rne</i> de <i>P.haloplanktis</i> est exprimé à partir des signaux d'expression de la RNase E d' <i>E.coli</i> .	
pSAB15	pSAB11, <i>Phrneflag</i> (étiquette FLAG en C-terminal).	
pSAB17	pIB3, <i>Phrneflag</i> (étiquette FLAG en C-terminal).	
pSAB18	pSAB15, le gène <i>rneflag</i> de <i>P.haloplanktis</i> est exprimé à partir des signaux d'expression de la RNase E d' <i>E.coli</i> .	
pSAB22	pSAB18, <i>Phrneflag</i> Δ(579-1071)	
pSAB24	pSAB17, <i>Phrneflag</i> Δ(841-1071).	
pSAB25	pSAB17, <i>Phrneflag</i> Δ(996-1071).	
pSAB26	pSAB17, <i>Phrneflag</i> Δ(1035-1071).	
pSAB29	pSAB18, <i>Phrneflag</i> ΔHBS.	
pSAB20	pSAB1, <i>Phrne</i> Δ(11-528).	
pSAB33	pSAB20, <i>Phrne</i> Δ(841-1071).	
pSAB34	pSAB20, <i>Phrne</i> Δ(996-1071).	
pSAB35	pSAB20, <i>Phrne</i> Δ(1035-1071).	

Souches	Caractéristiques	Références
<i>P. haloplanktis</i> TAC125	Souche sauvage.	(Birolo <i>et al.</i> , 2000)
KSL2000	<i>rne::cat, recA::Tn10</i> .	(Lee <i>et al.</i> , 2002)
SVK438	KSL2000 <i>recA</i> ⁺	V. Khemici
SVK446	KSL2000 <i>recA</i> ⁺ Δ <i>rhIB</i>	V. Khemici
DH5α		
S17.1	RP4 2-Tc::Mu-Km::Tn7 <i>pro res mod1</i>	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
BI21(DE3)	F- <i>ompT hsdS_B(r_B⁻, m_B⁻) dcm gal λ(DE3)</i>	(Studier <i>et al.</i> , 1990)
AC21	MC1061, <i>zce-726 ::Tn10</i>	(Carpousis <i>et al.</i> , 1994)
AC22	MC1061, <i>zce-726 ::Tn10, rne-3071</i> .	(Carpousis <i>et al.</i> , 1994)
AC23	MC1061, <i>rne1</i> .	(Leroy <i>et al.</i> , 2002)

AC24	AC23, <i>rneΔ10</i> (Δ844-1045).	(Leroy et al., 2002)
AC26	AC23, <i>rneΔ18</i> (Δ728-845).	(Leroy et al., 2002)
AC27	AC23, <i>rne131</i> .	(Leroy et al., 2002)
AC28	AC23, <i>rneΔ14</i> (Δ636-845).	(Leroy et al., 2002)
AC32	AC23, <i>rneΔ22</i> (Δ603-693).	(Leroy et al., 2002)
SVK407	MC1061, <i>zce-726 ::Tn10, rne flag⁺</i>	V. Khemici
SVK408	MC1061, <i>zce-726 ::Tn10, rneflag</i> (Δ702-1061)	V. Khemici
SVK409	MC1061, <i>zce-726 ::Tn10, rneflag</i> (Δ599-1061)	V. Khemici
SVK16	BI21(DE3) <i>Δpnp</i>	(Khemici & Carpousis, 2004)

Tableau 4 : Plasmides & souches utilisés

Milieux, solutions & tampons utilisés

Milieu riche TYP pour *P.haloplanktis*

- 16 g/L de yeast extract.
- 16g/L de bactotryptone
- 15g/L g de NaCl.
- 1.5% agar pour milieu solide.

Tampon de charge FSB 2,5X (pour protéines)

- 160 mM de Tris-Hcl (stock à 1M).
- 5 % de SDS.
- 0,1 % de PBP (stock à 1%).
- 25 % de glycérol (stock à 87 %).

PBS 10X

- 0,17M NaCl.
- 3,3mM KCl.
- 10mM Na₂HPO₄.
- 1,8mM KH₂PO₄.

Gels & immunodétection

La migration des échantillons protéiques se fait après dénaturation des protéines (au moins 3 minutes dans du FSB à 95 °C sur gel SDS-PAGE de 7.5 %, en général à 20 mA (grand et petit gel) ou à 8 mA sur la nuit (grand gel). La révélation des immunodétections est réalisée comme décrit précédemment (Vanzo et al., 1998).

Protocole de conjugaison de *P.haloplanktis*

Souches utilisées :

P.haloplanktis. Croissance sur TYP.

S17.1 (E.coli) portant le vecteur conjugatif pIB3. Croissance sur LB + ampicilline à 100 µg/ml.

Conjugaison :

Jour 1 : travail à température ambiante (environ 22 °C).

Prendre une colonie sur boîte et ensemercer 10 ml de LB ou TYP.

Culture jusqu'à une DO_{600 nm} ~ 0.5-1 (Essayer d'avoir la même DO pour les deux cultures).

Prendre 1 ml de chaque culture, centrifuger à 2500 rpm pendant 3 minutes.

Enlever tout le surnageant.

Resuspendre dans 30 µl de LB (*E.coli*) ou TYP (*P.haloplanktis*) (attention, ne pas vortexer).

Mélanger les deux suspensions. Dépôt de toute la suspension en spot sur boîte TYP non sélectif.

Incubation pendant 16 heures.

Lendemain : Racler pour récupérer tout le spot de cellules et le suspendre dans 300 µl de TYP.

Faire deux dilutions (volume final : 30 µl + 270 µl de TYP).

Étaler 100 µl de chaque dilution sur boîte TYP + ampicilline à 50 µg/ml.

Incubation dans la chambre froide. Au bout d'une dizaine de jours, on observe l'apparition de colonies. Strier des colonies sur boîtes TYP + ampicilline et incuber à 10 °C. Quelques jours plus tard, on obtient des clones purs. Pour vérifier l'absence d'*E.coli*, ces clones peuvent être striés sur TYP et incubés à 37 °C (*P.haloplanktis* ne pousse pas à 37 °C). La présence du vecteur conjugatif (ou des plasmides construits) est vérifiée par extraction plasmidique à partir de culture de *P.haloplanktis* dans le milieu TYP additionné d'ampicilline.

Purification de la RNase E de *P.haloplanktis* en conditions dénaturantes

Utilisation des colonnes de Nickel. Capacité de liaison : 150 µg de protéines.

Décongeler le surnageant de la lyse des cellules (lysate).

Équilibrer la colonne de Nickel-NTA (QIAGEN) avec 600 µl du tampon B :

8 M d'urée ultrapure

94 mM Na₂HPO₄ (stock à 0,2M)

6 mM de NaH₂PO₄ (stock à 0,2M)

10 mM Tris-HCl pH 8,0

Si nécessaire, ajuster le pH en rajoutant 10 µl HCl 1M.

Centrifuger à 1600 rpm pendant 5 minutes à température ambiante.

Placer les colonnes dans des tubes microcentrifuges de 2 ml.

Charger 300 µl du lysate et centrifuger.

Recharger l'éluat sur la colonne (3 fois) et centrifuger.

Laver les colonnes à température ambiante avec 600 µl du tampon C :

8M d'urée ultrapure

19 mM Na₂HPO₄

81 mM NaH₂PO₄.

10 mM Tris-HCl pH 6.3

Si nécessaire, ajuster le pH en rajoutant 10 µl HCl 1M.

Centrifuger. Répéter le lavage. Centrifuger.

Eluer la protéine à température ambiante avec le tampon E (pH 4,5) :

8M Urea

100 mM NaH₂PO₄

10 mM Tris-HCl

Centrifuger. Répéter 2 fois. Centrifuger.

À chaque étape de purification, prendre des échantillons pour la migration sur gel SDS-PAGE.

Charger 20 à 25 µl des échantillons sur gel SDS-PAGE à 7,5 %.

Congeler le reste des échantillons à -20 °C.

Induction de l'expression de la RNase E et du CTH

Induction à petite échelle (Vérification de la surexpression de la protéine recombinante).

Faire une préculture en milieu LB et ampicilline sous agitation à 37 °C.

Diluer au 1/100 dans 10 ml de LB + ampicilline.

Culture à 37 °C sous agitation jusqu'à 0.3- 0.4. Induire avec de l'IPTG (1mM final).

Induction à grande échelle

Faire une préculture milieu LB et ampicilline sous agitation à 37 °C.

Diluer au 1/100 dans 50 ml de LB + ampicilline.

Culture à 37 °C sous agitation jusqu'à DO_{600nm} ~ 0,4.

Enlever 0,5 ml de la culture, échantillon sans IPTG.

Congélation éventuelle de la souche : (1 ml de culture + 1 ml de glycérol 20%, congeler 1.8 ml).

Ajouter de l'IPTG 1mM final (stock à 100 mM).

Remettre sous agitation à 30 °C pendant 3h.

Prendre 0,5 ml de la culture, échantillon avec IPTG.

Laisser la culture 10 minutes dans la glace.

Transvaser dans les bouteilles de 250 ml allant dans le rotor JA-14.

Centrifuger pendant 10' à 4 °C à 6000 rpm. Enlever le surnageant.

Resuspendre et laver les cellules avec 4 ml d'une solution à 50 mM Tris-HCl à pH 7,5.

Centrifuger pendant 10 minutes à 6000 rpm à 4 °C.

Enlever le surnageant et resuspendre dans 1 ml de la solution B (vu précédemment).

Balancer lentement pendant 1h à température ambiante.

Sonication des cellules pour les lyser si besoin.

Centrifuger 30 minutes à vitesse maximale (13 000 g).

Récupérer le surnageant délicatement. Enlever 10 µl (pour migration sur gel SDS-PAGE).

Congeler à -20 °C.

Protocole d'immunopurification

Le protocole d'immunopurification dérive du protocole utilisé dans (Morita et al., 2004).

Préparation des extraits cellulaires

Faire une préculture dans du milieu LB ou TYP et antibiotique.

Dilution au 1/100 dans 200 ml de LB. Culture jusqu'à $DO_{600nm} \sim 0.6$.

Mettre échantillon sur glace.

Centrifugation à 10 minutes à 6000 rpm à 4 °C.

Lavage des cellules dans 10ml de solution contenant 50 mM Tris-HCl pH7.5 et 5 mM EDTA.

Note importante : pour *P.haloplanktis*, ne pas utiliser de l'EDTA car il provoque la lyse prématurée des cellules).

Centrifugation à 10 minutes à 6000 rpm à 4 °C. Resuspension le culot dans 5 ml tampon IP :

20 mM Tris-HCl pH 8.0

0.1 M KCl

5 mM MgCl₂

10% glycérol

0.1% Tween20

Lysozyme 150 µg/ml

Inhibiteurs de protéases 1X

Faire trois cycles de congélation-décongélation à -80 °C.

Sonication 4 x 30 secondes puis centrifuger une heure à 30 000g à 4 °C.

Récupérer le surnageant. Faire des aliquots de 1ml après dosage au nanodrop.

Les échantillons peuvent être congelés à cette étape.

Clarifier des extraits en cas de congélation, centrifugation à 14 000 rpm, 20 minutes à 4 °C.

Préparation de la résine à température ambiante.

Préparer du TBS (0.15 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5) pour la préparation de la résine, lavages de la colonne et dilution du peptide FLAG.

Prendre la quantité de la résine selon le besoin (50 µl par immunopurification).

Centrifuger 30 secondes à 5000 g. Attendre 1 à 2 minutes. Retirer le SN.

Ajouter 500 µl de TBS et mélanger (ne pas vortexer).

Répéter deux fois ce lavage avec 1 ml de TBS. Centrifuger. Enlever le surnageant.

Immunopurification

Avoir la même quantité de protéines pour chaque immunopurification.

Prendre 50 µl la résine et l'ajouter à l'extrait cellulaire (en général, pour 1 ml d'aliquot).

Agitation lente à 4 °C pendant 2h.

Prendre une colonne mini-chromatographie (Biorad) et la mettre dans un tube en plastique.

Faire passer le mélange billes/extrait sur la colonne. Récolter la fraction UB (UnBound).

Changer de tube en plastique. Faire un lavage avec 1 ml de TBS. Répéter une fois.

Élution avec 50 µl de peptide FLAG à 100µg/ml dans du TBS.

(Peptide FLAG stocké à -20 °C à 500µg/ml. Diluer dans du TBS pour avoir 100µg/ml).

Répéter 2 fois en changeant le tube à récolter (en général, ce n'est pas utile de faire 3 éluions).

Échantillons sont dénaturés dans du FSB.

Migration sur gel SDS-PAGE et révélation au Sypro orange ou au PageBlue.

Purifications des protéines surexprimées

Ce protocole permet de purifier les protéines jusqu'à l'étape de précipitation au sulfate d'ammonium.

Lancer une préculture sur la nuit de la souche portant la protéine d'intérêt.

Diluer au 1/100 dans un volume final de 200ml

(Le mieux est de faire 4x50 ml jusqu'à $DO_{600nm} \sim 0.4$, le rendement est plus efficace).

Ajout IPTG pour 1 mM final. Cultiver pendant 2h30 à 30 °C.

Mettre dans la glace. Centrifuger le tout 10 minutes à 6000 rpm à 4 °C.

Lavage cellules dans 10ml de 50 mM Tris-HCl pH7.5 et 5 mM EDTA.

Centrifuger 10 minutes à 6000 rpm à 4 °C.

Resuspension du culot dans 5 ml de tampon IP (vu précédemment).

Faire trois cycles de congélation-décongélation à -80 °C.

Sonication 4 x 30 secondes puis centrifuger une heure à 30 000g à 4 °C.

Récupérer le surnageant.

Centrifuger une heure à 61 000 rpm à 4 C° (200 000g, ultracentrifugeuse, rotor TLA 100.3).

Récupérer délicatement le surnageant.

Précipitation au sulfate d'ammonium 60%.

Agitation lente pendant 15 minutes à 4 °C puis centrifuger 30 minutes à 30 000 g à 4 °C.

Resuspendre le culot dans 300 µl du tampon GB 300 mM NaCl ($V_f = 5$ ml).

Pastille inhibiteurs de protéases 1X.

5 % glycérol (stock à 87 %)

300 ml NaCl (stock à 5 M)

10 mM Tris-HCl, pH 7,5 (stock 1 M)

0,05 % Genopol X-080 (stock à 20)

1 mM EDTA (0,5 M)

1 mM DTT (0,5 M)

Congeler immédiatement à -20 °C (court terme) ou à -80 °C (long terme).

Pour chaque étape, prendre des échantillons pour la migration sur gel SDS-PAGE.

Co-purification des peptides CTH

Dans un premier temps, les différents peptides CTH produits et surexprimés, sont purifiés en conditions dénaturantes comme indiqué précédemment à l'exception de l'utilisation de la résine de Cobalt (Clonotech) car la PNPase de *P.haloplanktis* est capable de lier la colonne de Nickel. Les différents CTH peptides sont renaturés en enlevant l'urée, en utilisant le tampon EQ : 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0.1 M KCl, 5 mM MgCl₂, 10% glycérol, 0.1% Tween20, 0,1 mg/ml du sérum albumine bovin (BSA) et des inhibiteurs de protéases 1X. La colonne est ensuite mise dans la chambre froide et le lavage avec le tampon EQ répété. 1 ml d'extrait cellulaire de *P.haloplanktis* (préparé comme mentionné précédemment) a été rajouté à la colonne et incubé deux heures. La colonne est lavée deux fois avec le tampon EQ additionné de 20 mM imidazole et dépourvu de BSA. L'élution est réalisée en utilisant le tampon EQ additionné de 300 mM imidazole et dépourvu de BSA.

Protocole de purification par affinité des anticorps

Préparer des extraits bruts d'*E.coli* surexprimant la protéine reconnue par l'anticorps que l'on souhaite purifier.

Migration des échantillons sur deux gels SDS-PAGE. Transfert sur membrane de nitrocellulose. (Marquer au crayon la bande qui correspond à la protéine d'intérêt).

Blocage de la membrane pendant une heure avec du PBS et lait 5%.

Rinçage 3 fois avec du PBS.

Incubation deux heures avec 500µl d'anticorps polyclonal primaire dans 25 ml PBS lait 1%.

Rinçage au PBS.

Découper la membrane au niveau de la protéine.

Incubation du morceau de membrane 5 minutes dans la solution acide, puis 5 minutes dans la solution basique.

Solution acide

1 X PBS

20 mM HCl

0.02% Tween (stock à 10%)

Vérifier que le pH est aux alentours de 2.

Solution basique

1X PBS

20 mM NaOH

0.02% Tween (stock à 10%)

Vérifier que le pH est aux alentours de 2.

Récupérer les deux solutions qui contiennent l'anticorps purifié, ajouter 21 ml de PBS lait 1%.

Incubation de la seconde membrane avec les anticorps purifiés pendant deux heures.

Lavages 3 fois 15 minutes avec du PBS.

Incubation avec l'anticorps secondaire et révélation.

Liste des anticorps utilisés et leurs dilutions

Anticorps anti-FLAG : 1/370. 27 µl dans 10 ml PBS 1X et BSA 1%.

(A réutiliser plusieurs fois et stocker au congélateur).

Anticorps anti-RNase E *P.haloplanktis* : 1/10 000, 2.5 µl dans 25 ml PBS lait 1%.

Anticorps anti-RNase E *E.coli* : 1/2500, 4 µl dans 10 ml PBS lait 1%.

Anticorps anti-PNPase *E.coli* : 1/10 000, 2.5 µl dans 25 ml PBS lait 1%.

(Peut être utilisé avec l'Ac-énolase).

Anticorps anti-Enolase d'*E.coli* : 1/5000, 5 µl dans 25 ml PBS lait 1%.

(Peut être utilisé avec l'Ac-PNPase).

Anticorps anti-RhlB d'*E.coli* : 1/200. Marche très mal. À purifier par affinité.

Anticorps anti-SrmB, anticorps anti-RhlE et anticorps anti-CsdA d'*E.coli* : 1/5000, 5 µl dans 25 ml PBS lait 1%.

Spectroscopie de masse

L'identification des protéines du dégradosome d'ARN de *P.haloplanktis* est réalisée par spectroscopie de masse (MS/MS). Les bandes correspondant aux protéines qui interagissent avec la RNase E de *P.haloplanktis*, sont découpées du gel SDS-PAGE, mises dans de l'acide acétique 10% et envoyées au Pôle Protéomique, Plateforme Génomique Fonctionnelle Bordeaux, Université Victor Segalen.

Analyses phylogénétiques

Yves Quentin, bio-informaticien au Laboratoire de Microbiologie et de Génétique Moléculaires, a créé une banque de données regroupant tous les orthologues putatifs des hélicases à boîte DEAD à partir des génomes bactériens séquencés. Après avoir trié les séquences pour éviter les redondances et les séquences partielles, des alignements multiples ont été générés en utilisant le programme Maft. Les régions fortement conservées sont ensuite extraites par le programme Gblocks2 et utilisées pour générer les arbres phylogénétiques par le programme phym tree2.

Programmes utilisés

- Clustal W (Chenna *et al.*, 2003). (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).
- Jalview (Clamp *et al.*, 2004).

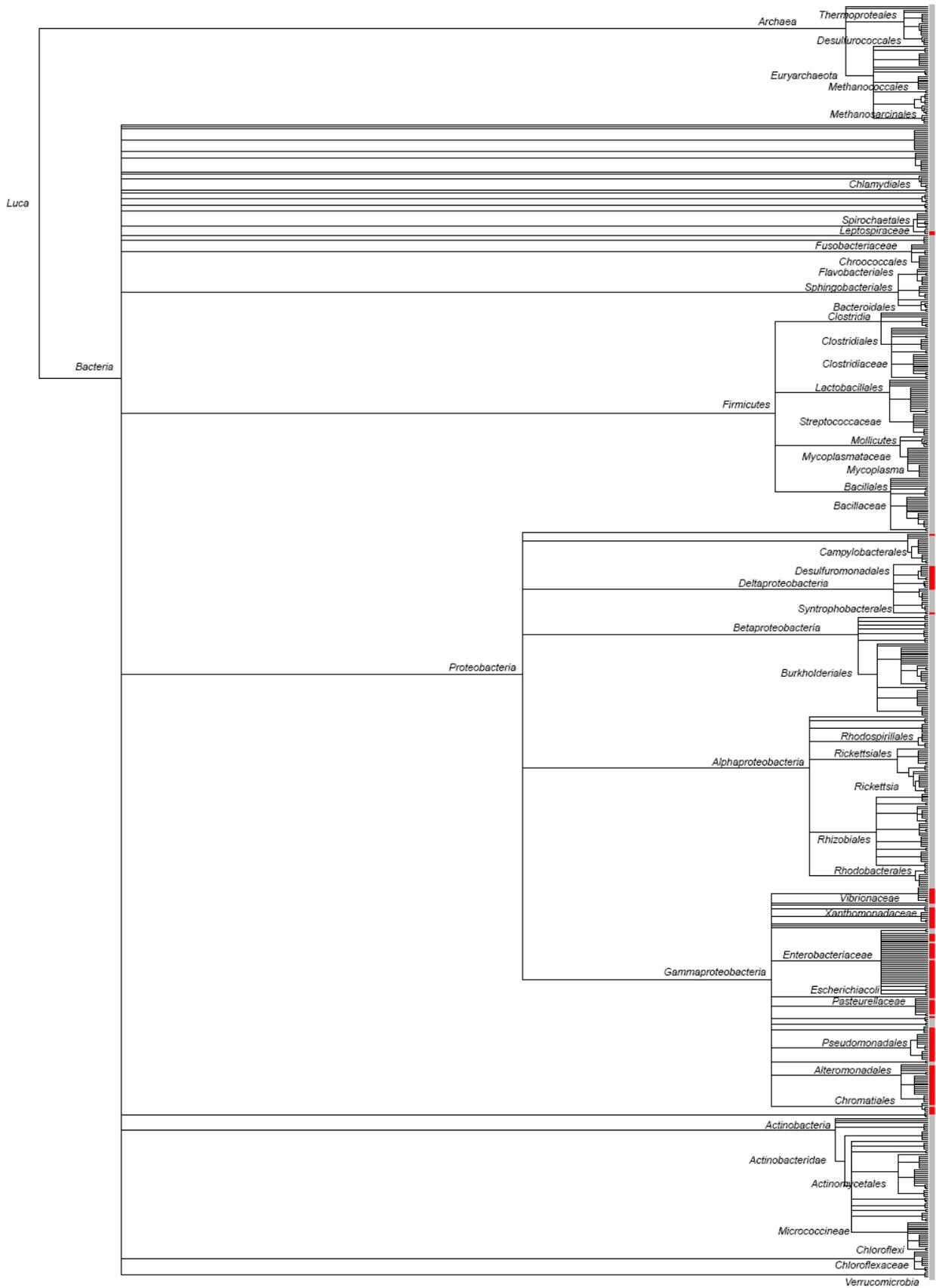
- MEME : Multiple Em for Motif Elicitation (Bailey et al., 2006).
http://meme.nbcr.net/meme4_4_0/cgi-bin/meme.cgi.
- PONDR® : Predictor of Naturally Disordered Regions (Li *et al.*, 1999a).
<http://www.pondr.com>.
- Helical Wheel Viewer (<http://cti.itc.virginia.edu/~cmg>).
- Logiciel « chercheur de motifs répétés » conçu par Cédric Bouhours, docteur en Informatique.
- HNN (Hierarchical Neural Network) (Combet *et al.*, 2000).
http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_nn.html).

5

ANNEXES

Figure 60 : Répartition des orthologues de RhlB chez les bactéries et les archées.

Arbre phylogénétique regroupant les bactéries et les archées. En rouge, la présence de RhlB chez ces organismes. On observe que RhlB est essentiellement présente chez les γ -protéobactéries.



Article 1 : Co-immunopurification of Multiprotein Complexes Containing RNA-Degrading Enzymes. Agamemnon J. Carpousis, Vanessa Khemici, Soraya Aït-Bara, and Leonora Poljak.

Cet article traite de la méthode d'immunopurification qui permet d'identifier des complexes protéiques en utilisant des anticorps polyclonaux. Cette méthode a été utilisée auparavant pour l'identification du dégradosome d'ARN d'*E.coli* et peut être utilisée pour l'identification de dégradosomes d'ARN d'autres bactéries. La dernière partie de l'article (5.1) concerne des travaux effectués au début de ma thèse où des anticorps polyclonaux dirigés spécifiquement contre la RNase E de *P.haloplanktis* ont été produits (figure 4.3 de l'article) puis des immunopurifications ont été réalisées sur des extraits cellulaires de *P.haloplanktis*. Cependant, la RNase E de *P.haloplanktis* est extrêmement sensible aux protéases psychrotolérantes de *P.haloplanktis* actives à basse température, ce qui rend l'identification du dégradosome d'ARN de *P.haloplanktis* difficile. Ce problème a été contourné en changeant le mode de lyse des cellules qui permet de séparer efficacement la RNase E de *P.haloplanktis*, des protéases psychrotolérantes (article 2)

CO-IMMUNOPURIFICATION OF MULTIPROTEIN COMPLEXES CONTAINING RNA-DEGRADING ENZYMES

Agamemnon J. Carpousis, Vanessa Khemici, Soraya Ait-Bara,
and Leonora Poljak

Contents

1. Introduction	66
2. General Considerations	68
3. Materials	71
4. Protocols	72
4.1. Buffers and stock solutions	72
4.2. Cross-linking IgG to protein A Sepharose beads	72
4.3. Co-immunopurification with antibodies coupled to protein A beads	73
4.4. Small-scale affinity purification of polyclonal antibodies	75
5. Perspective	76
5.1. Characterization of the RNase E of psychrotolerant bacteria	77
Acknowledgments	79
References	80

Abstract

Co-immunopurification is a classical technique in which antiserum raised against a specific protein is used to purify a multiprotein complex. We describe work from our laboratory in which co-immunopurification was used to characterize the RNA degradosome of *Escherichia coli*, a multiprotein complex involved in RNA processing and mRNA degradation. Polyclonal rabbit antibodies raised against either RNase E or PNPase, two RNA degrading enzymes in the RNA degradosome, were used in co-immunopurification experiments aimed at studying the assembly of the RNA degradosome and mapping protein–protein interactions within the complex. In *E. coli*, this method has been largely supplanted by approaches in which proteins are engineered to contain tags that interact with

Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaire (LMGM), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and Université Paul Sabatier, Toulouse, France

Methods in Enzymology, Volume 447
ISSN 0076-6879, DOI: 10.1016/S0076-6879(08)02204-0

© 2008 Elsevier Inc.
All rights reserved.

commercially available antibodies. Nevertheless, we believe that the method described here is valid for the study of bacteria in which the genetic engineering needed to introduce tagged proteins is difficult or nonexistent. As an example, we briefly discuss ongoing work in our laboratory on the characterization of RNase E in the psychrotolerant bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis*.

1. INTRODUCTION

RNase E is a single-strand specific endoribonuclease that has a general role in RNA processing and mRNA degradation in *Escherichia coli*. Homologs of RNase E are found in many gram-negative bacteria. *E. coli* also encodes a paralog of RNase E named RNase G. Together, RNase E and RNase G belong to a large family of bacterial ribonucleases known as the RNase E/G family (Carpousis, 2002; Condon and Putzer, 2002; Lee and Cohen, 2003). Originally discovered as a ribonuclease necessary for the maturation of 5S ribosomal RNA, RNase E was subsequently identified as an enzyme important in the degradation of mRNA and the maturation of tRNA (Babitzke and Kushner, 1991; Mudd *et al.*, 1990; Ow and Kushner, 2002; Taraseviciene *et al.*, 1991). In many cases, RNase E is the key endoribonuclease in initiating mRNA degradation, although recent evidence suggests that an initial cleavage by RNase E might be preceded by the conversion of the 5'-triphosphate of a primary transcript to a 5'-monophosphate (Celesnik *et al.*, 2007). RNase E is also involved in the degradation of mRNAs that are targeted by noncoding regulatory RNAs (Carpousis, 2003; Masse *et al.*, 2003; Morita *et al.*, 2005). Most work on the role of RNase E in RNA metabolism has been reviewed previously, and we direct the reader to a selection of reviews (Carpousis, 2007; Carpousis *et al.*, 1999; Coburn and Mackie, 1999; Grunberg-Manago, 1999; Kushner, 2002).

RNase E is an unusually large protein composed of a 1061-residue protomer that associates to form a tetrameric enzyme with a molecular weight of 472 kDa (Callaghan *et al.*, 2005a,b). RNase E interacts with three other enzymes by means of protein-protein contacts, RhlB (RNA helicase B), enolase, and PNPase (polynucleotide phosphorylase), to form a complex now known as the RNA degradosome (Carpousis *et al.*, 1994; Py *et al.*, 1994, 1996; Vanzo *et al.*, 1998). It is believed that RNase E normally exists in the cell complexed with these proteins (Liou *et al.*, 2001; Taghbalout and Rothfield, 2007), although evidence suggests that, under certain conditions, the RNA degradosome can be remodeled to form different RNase E-based complexes (Gao *et al.* 2006; Khemici *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2003; Morita *et al.*, 2005; Prud'homme-Genereux *et al.*, 2004). The 1061-residue protomer of RNase E is organized into two distinct regions. The N-terminal half of RNase E (529 residues) forms a

structure that assembles into the tetrameric catalytic domain. The C-terminal half of RNase E (532 residues) has no known catalytic activity. RNase G and its homologs lack the large C-terminal extension that distinguishes RNase E from RNase G. The noncatalytic region of RNase E is a natively unstructured protein (Callaghan *et al.*, 2004). That is, under physiologic conditions, the noncatalytic region has little, if any, propensity to fold into secondary and higher order structures. Nevertheless, this region is the scaffold for the interaction of RNase E with RhlB, enolase, and PNPase. These interactions involve relatively short motifs within the noncatalytic region of RNase E. Different proteins interact with different residues in the C-terminal of RNase E: RhlB and RNase E involve residues 698 to 762 of RNase E (Chandran *et al.*, 2007), enolase and RNase E involve residues 833 to 850 of RNase E (Chandran and Luisi, 2006), and the interaction between PNPase and RNase E involves residues 1023 to 1061 of RNase E (Callaghan *et al.*, 2004). Indeed, the crystal structure of enolase complexed with a polypeptide derived from residues 833 to 850 has been solved to high resolution, revealing an elaborate network of hydrogen-bonding interactions between the polypeptide and enolase (Chandran and Luisi, 2006).

Homologs of RNase E can be identified by sequence comparisons of the N-terminal catalytic domain, which is highly conserved, and the presence of a large noncatalytic region. However, the sequence of the noncatalytic regions of these homologs is highly variable (Marcaida *et al.*, 2006). It should be noted that despite the lack of primary sequence conservation, a noncatalytic region of 400 to 600 residues is a hallmark of RNase E homologs (Carpousis, 2002; Condon and Putzer, 2002; Lee and Cohen, 2003; Marcaida *et al.*, 2006). Among the RNase E homologs of the enterobacteria, the γ -Proteobacteria most closely related to *E. coli*, conserved sequence motifs of 20 to 50 residues can be identified within the noncatalytic region. Three of these motifs correspond to the sites for protein-protein interactions of *E. coli* RNase E with RhlB, enolase, and PNPase. For this reason, we believe that the enterobacteria contain an RNA degradosome similar to the complex in *E. coli*, although this prediction has not been tested experimentally (Marcaida *et al.*, 2006). RNase E-based degradosomes from distantly related gram-negative bacteria have also been identified, but their composition differs from that of *E. coli*. A complex composed of RNase E, a DEAD-box protein, and RNase R has been identified in *Pseudomonas syringae* (Purusharth *et al.*, 2005); RNase E, two DEAD-box proteins, and the Rho transcription termination factor in *Rhodobacter capsulatus* (Jager *et al.*, 2001). We believe that the variable composition of the different RNase E-based complexes is related to the sequence plasticity of the noncatalytic region of RNase E (Marcaida *et al.*, 2006). On the basis of these considerations, it has been suggested that plasticity in RNA degradosome composition might confer adaptive

advantages during evolution by permitting modulation of the posttranscriptional control of gene expression (Marcaida *et al.*, 2006).

In previous work on the identification and characterization of the RNA degradosome in *E. coli*, co-immunopurification experiments had an important role in demonstrating that RNase E is part of a multiprotein complex and in identifying the other components of the complex (Carpousis *et al.*, 1994; Py *et al.*, 1994; Vanzo *et al.*, 1998). Antibodies against RNase E were used in co-immunopurification experiments with partially purified proteins. Initially, three major polypeptides of 85, 50, and 48 kDa were found to co-immunopurify with RNase E (Carpousis *et al.*, 1994). The 85-kDa protein was identified as PNPase on the basis of enzymatic activity, protein fingerprinting, and cross-reactivity with antibodies raised against purified PNPase. The 50- and 48-kDa proteins were identified as RhlB and enolase by N-terminal protein sequencing (Py *et al.*, 1996). In subsequent work, antibodies against RNase E and PNPase were used in co-immunopurifications with mutant strains in which various regions within the noncatalytic region of RNase E were deleted (Vanzo *et al.*, 1998). This work showed that the noncatalytic region of RNase E contains elements that are essential for the interaction with RhlB, enolase, and PNPase. More recently, co-immunopurification experiments were used to demonstrate that the presence of RhlB in the degradosome is not necessary for the interaction of enolase and PNPase with RNase E and that catalytically inactive RhlB still associates with RNase E as part of the RNA degradosome (Khemici *et al.*, 2005). Here we describe the method that was used in the co-immunopurification work on the RNA degradosome of *E. coli* and discuss the possible application of this method to the characterization of the RNA degradosome in other bacteria.

2. GENERAL CONSIDERATIONS

Immunopurification covers a large variety of techniques in which antibodies specific to a particular antigen are used to purify that antigen from a complex mixture. The term *co-immunopurification* as used here refers to a technique in which antibodies against a specific protein are used to identify and characterize other proteins (or nucleic acids) that form a stable complex with the protein to which the antibodies were raised. A general discussion about techniques that use antibodies is largely beyond the scope of this chapter. We have routinely used *Antibodies* by E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratories, 1988) as a general reference, and we highly recommend it as a comprehensive resource on the raising and handling of antibodies.

Antibodies for co-immunopurification can be either polyclonal or monoclonal. Each has its advantages and disadvantages. In our work, we

used polyclonal antibodies raised in rabbits, and this choice will be discussed here. In principal, monoclonal antibodies are directed against a single site (epitope) in a protein, whereas polyclonal antibodies are a mixture of IgGs that interact with many different epitopes in a specific protein. It is also possible to raise polyclonal antibodies against a synthetic peptide. In this case, the polyclonal antibody will react against one or a small number of epitopes in the polypeptide. The advantage of a carefully selected monoclonal antibody or polyclonal antibody raised against a peptide is their high affinity and specificity against one or a few epitopes. Nevertheless, because co-immunopurification experiments are often performed under native conditions, it is difficult to know in advance which epitopes in a multiprotein complex will be available on the surface for interaction with an antibody. Furthermore, the mammalian immune system does not produce antibodies against all possible epitopes. The advantage of polyclonal antibodies raised against a whole protein is that they will interact with many different epitopes, and at least a few of them will, hopefully, be on a surface available for interaction with an antibody. For this reason, we prefer to perform co-immunopurification experiments with polyclonal antibodies. Nevertheless, it should be noted that rabbit antisera raised against whole proteins tend to cross-react with other proteins in whole-cell extracts. Solutions to this problem will be discussed in a subsequent section. Finally, it should be mentioned that purified proteins used as antigens for immunization can be either native or denatured. We have routinely used denatured proteins to raise high-titer antisera that are active in both Western blotting and the co-immunopurification of multiprotein complexes.

Another consideration in co-immunopurification experiments is the preparation of cell extracts. We published previously in *Methods in Enzymology* protocols for the large-scale purification of the RNA degradosome from *E. coli* and for the small-scale preparation of extracts that can be used in co-immunopurification experiments (Carpousis *et al.*, 2001). Here we will only make a few general comments about the preparation of cell extracts. Extracts or partially purified fractions for co-immunopurification experiments should consist of soluble protein that is free of cell debris, ribosomes, and nucleic acids. In the case of the RNase E of *E. coli*, a number of points also apply to other multiprotein complexes containing RNA-degrading enzymes. Numerous trials showed that RNase E requires a nonionic detergent such as Triton X-100 and high ionic strength (0.5 to 1.0 M NaCl) for efficient solubilization during the preparation of cell extracts (Carpousis *et al.*, 1994; Ehretsmann *et al.*, 1992). At low ionic strength, RNase E avidly binds RNA and ribosomes. For these reasons, we prepared high-speed supernatants at high ionic strength to remove ribosomes and then precipitated RNase E with ammonium sulfate to remove soluble RNA. As an alternative, the high-speed centrifugation step can be replaced by precipitating ribosomes and nucleic acids with polyethylenimine (Carpousis *et al.*, 2001).

Because a multiprotein complex like the RNA degradosome contains several enzymes that bind RNA avidly, there is always the question of whether an interaction detected by co-immunopurification is a direct protein–protein interaction or an RNA-mediated interaction between two RNA binding proteins. It is, in principle, possible to address this issue by treating protein extracts with RNase A or micrococcal nuclease to degrade RNA (Carpousis *et al.*, 1994; Morita *et al.*, 2005). Nevertheless, adequately addressing this question requires additional approaches such as the direct detection of a protein–protein interaction with purified proteins or an analysis with the yeast two-hybrid system to validate the interaction (Vanzo *et al.*, 1998). It should be noted that the method described here could easily be adapted to identify and characterize RNA that is tightly bound to a multiprotein complex (MPC).

A final general consideration is the choice of resin used to immobilize antibodies for co-immunopurification work. In the protocol described in the following, protein A covalently attached to a Sepharose bead is used to immobilize IgG (immunoglobulin G) molecules from rabbit antiserum. Protein A is a bacterial protein that makes a strong noncovalent interaction with the constant region of an IgG molecule. Protein A Sepharose beads are sold commercially for the affinity purification of IgG from antiserum. In our hands, commercially available protein A Sepharose beads have been a reliable support for immobilizing IgGs from rabbit antisera.

Figure 4.1 shows a schematic diagram of the overall strategy used with protein A Sepharose beads. In step 1, the beads are incubated with antiserum and washed. In step 2, the IgG molecule is chemically cross-linked to protein A. In step 3, the beads are incubated with a cell extract and washed. In step 4, the multiprotein complex (MPC) is eluted under denaturing conditions, and protein A and IgG, which remain coupled to the Sepharose bead, are removed by sedimentation. In step 5, the MPC is analyzed by SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis).

Two covalent interactions hold together the protein A–IgG complex (Fig. 4.1). The heavy and light chains of each IgG molecule are linked by disulfide bonds. The glutaraldehyde treatment covalently links protein A to IgG. The protein A–IgG complex linked to the Sepharose bead can be maintained intact under denaturing conditions if precautions are taken to avoid breaking these covalent links. Reducing agents such as β -mercaptoethanol should be avoided to preserve the disulfide bridges, and heating above 55 °C should be avoided to preserve the covalent links formed by glutaraldehyde. Two points should be noted here: (1) Polyclonal antisera contain a complex mixture of IgGs and only a small proportion of these molecules (probably less than 1%) are specific to the antigen used to immunize the rabbit. (2) The Sepharose beads used here are very stable. They can be boiled in SDS-loading mix or briefly treated with strong acid or base without harming the bead.

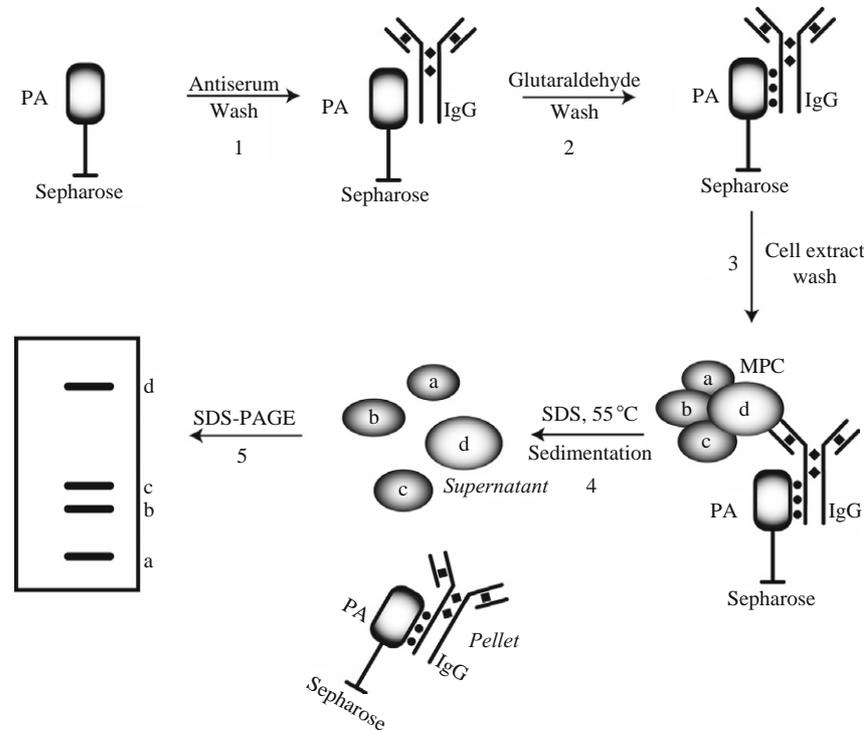


Figure 4.1 Preparation of IgG cross-linked to protein A (PA) Sepharose beads and immunoprecipitation of a multiprotein complex (MPC). See text for details.

3. MATERIALS

RNase E was overexpressed with the pET15 expression vector and BL21(DE3) as the host strain (Novagen). The N-terminal 6× His-tag encoded by pET15 was used to purify RNase E under denaturing conditions (8 M urea). Purification was performed with an Ni-NTA Spin Kit (Qiagen) following the manufacturer's protocol. The yield from four spin columns, typically 200 to 400 μg of protein, is sufficient to immunize two rabbits. Rabbit antisera were raised commercially (Eurogentec) following the standard inoculation schedule. Normal rabbit serum (Sigma) can be used as a generic preimmune serum if authentic preimmune serum is not available. Protein A Sepharose CL-4B beads were purchased from GE Health Care (formerly Pharmacia). The beads were rehydrated in 1× PBS and washed according to the manufacturer's instructions. All other reagents were the highest grade available.

4. PROTOCOLS

4.1. Buffers and stock solutions

10× PBS: 1.37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄, 20 mM KH₂PO₄. This stock is autoclaved and stored at room temperature.

5× CLB: 100 mM Na₂HPO₄, 25 mM NaH₂PO₄, 1 M NaCl, 2.5 mM EDTA. This stock is autoclaved and stored at room temperature.

BG300: 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 300 mM NaCl, 5% glycerol, 0.5% Genapol X-080, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, aprotinin (2 μg/ml), pepstatin A (0.8 μg/ml), leupeptin (0.8 μg/ml). PMSF, aprotinin, pepstatin A, and leupeptin can be replaced by complete protease inhibitor cocktail tablets, EDTA-free (Roche Diagnostics). This buffer, which has been optimized to stabilize the RNA degradosome and protect it from proteolysis, is made fresh from concentrated stock solutions. For further details see [Carpousis *et al.* \(2001\)](#).

2.5× SDS-PAGE loading buffer: 160 mM Tris-HCl (pH 6.8), 5% SDS, 25% glycerol, 0.1% BPB (bromophenol blue). This stock is stored at room temperature. If β-mercaptoethanol is required, the buffer is diluted to 1×, and β-mercaptoethanol is added to a final concentration of 5%.

4.2. Cross-linking IgG to protein A Sepharose beads

This protocol involves the absorption of IgG from the rabbit antiserum by the protein A bead and chemical cross-linking of the protein A-IgG complex with glutaraldehyde ([Fig. 4.1](#)). As a rule of thumb, the concentration of IgG in rabbit antiserum is approximately 10 mg/ml, and the rehydrated protein A beads can bind at least 10 mg of IgG/ml. To be sure that the beads are saturated, we generally use 2 to 3 volumes of antiserum per volume of bead. Here, the volume of bead refers to the volume of the packed pellet after low-speed centrifugation. Because high-titer antisera are precious, we recommend initially testing this protocol with normal rabbit serum. For all steps, we use disposable plastic culture tubes, preferably with a conical bottom. Agitation is performed by gentle rocking on a horizontal platform. The volume of the tube should be at least 10 times the volume of the antiserum, permitting the slurry of antiserum and beads to move from end to end of the tube during the rocking motion. Sedimentation of the beads can be performed by gravity or at low speed in a tabletop centrifuge. Precautions should be taken to avoid breaking or crushing the beads: avoid pipetting with small orifice pipette tips; avoid high-speed centrifugation.

All steps are at 4 °C unless indicated otherwise. Typically, 0.4 ml of bead is mixed with 1.0 ml of antiserum. The beads and antiserum are agitated for 1 to 3 h. After 1 min of low-speed centrifugation, the supernatant is

removed and discarded; 4 ml of cold 1× PBS is added, the beads are agitated for 15 min, and then pelleted by low speed centrifugation for 1 min. This step, hereafter referred to as a wash, is repeated twice (3 washes total). The beads are then washed in 4 ml of 1× CLB three times. The beads are suspended in 4 ml of 1× CLB containing 1% glutaraldehyde (freshly diluted) and agitated for 1 h. The beads are washed three times with 4 ml of 1× CLB and twice with 4 ml of BG300.

The efficiency of binding and cross-linking to protein A Sepharose can be checked by a simple test with SDS-PAGE. Rabbit IgGs are composed of two 55-kDa heavy chains and two 25-kDa light chains. The chains can be visualized on Coomassie blue-stained gels, although the bands are diffuse because of substantial heterogeneity among various classes of IgG heavy and light chains. Prepare the beads as described previously except that after absorbing the IgG and washing, split the beads into two aliquots. Cross-link one aliquot and perform a mock cross-link on the other aliquot by omitting the glutaraldehyde. Suspend 50 μ l of beads from each aliquot in 100 μ l of 1× SDS-PAGE loading buffer without β -mercaptoethanol, heat to 55 °C for 15 min, and cool to room temperature. Pellet the beads by brief (1 min) sedimentation in a microfuge at room temperature. Transfer the supernatant to a fresh tube, add β -mercaptoethanol (5% final) and heat at 95 °C for 3 min. Cool to room temperature and run the samples side by side on SDS-PAGE. The mock cross-linking permits quantification of how much IgG was absorbed on the protein A bead. The cross-linked sample permits quantification of the efficiency of cross-linking with glutaraldehyde. IgG from the beads that were not cross-linked should be clearly visible on a Coomassie blue-stained gel. In contrast, little, if any, IgG should be detected with the glutaraldehyde cross-linked beads.

4.3. Co-immunopurification with antibodies coupled to protein A beads

All steps are at 4 °C unless indicated otherwise. Agitation and washing are performed as described in the previous section. Cell extracts, prepared as described previously (Carpousis *et al.*, 2001), usually have concentrations ranging from 2 to 4 mg/ml of protein. The protein concentration can be determined by UV absorbance if the extract is free of nucleic acid or by Lowry assay. To 100 μ l of bead, add 2 mg of protein (the volume depends on the concentration). The beads are agitated for 2 to 3 h and then washed three times with 1 ml of GB300. At room temperature, suspend the beads in 200 μ l of 1× SDS-PAGE loading buffer without β -mercaptoethanol, heat to 55 °C for 15 min, and cool to room temperature. Pellet the beads by brief (1 min) sedimentation in a microfuge at room temperature. Transfer the supernatant to a fresh tube, add β -mercaptoethanol, and heat at 95 °C for 3 min. Cool to room temperature and analyze by SDS-PAGE.

Figure 4.2 shows examples where this protocol has been used in previously published work. Panel A shows lanes from a silver-stained SDS gel of RNA degradosome co-immunopurified with antisera raised against RNase E or PNPase. In this analysis, authentic preimmune serum was used as a control. These co-immunopurifications were part of a larger study in which the composition of the RNA degradosome was analyzed in strains in which different parts of the noncatalytic region of RNase E were deleted. For

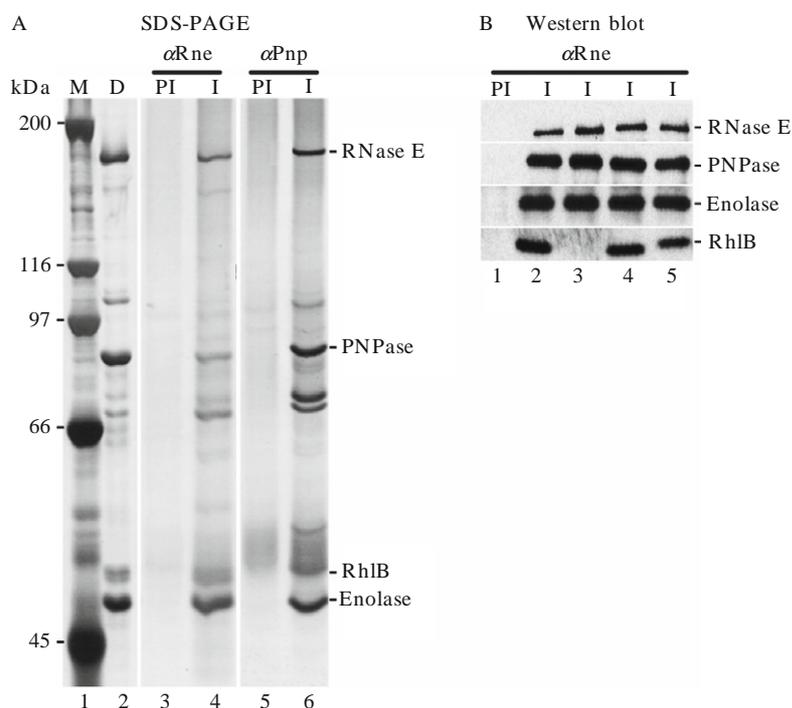


Figure 4.2 (A) Silver-stained SDS-PAGE of the co-immunopurification of the RNA degradosome from *E. coli*. Lanes 1 and 2 are controls showing protein size standards (M) and a preparation of the RNA degradosome purified by a large-scale, classical biochemical approach (Carpousis *et al.*, 1994) (D). Lanes 3 and 4, co-immunopurification from protein extracts with preimmune (PI) control or antiserum (I) raised against RNase E (α Rne). Lanes 5 and 6, same as lanes 3 and 4, except that the antiserum was raised against PNPase (α Pnp). The molecular weight of the markers is indicated to the left of the panel; the positions of RNase E, PNPase, RhlB, and enolase are indicated to the right of the panel. (B) Western blot analysis of immunopurified RNA degradosome. Lane 1, control with preimmune serum (PI); lanes 2 to 5, co-immunopurification with antiserum (I) raised against RNase E (α Rne). Lanes 1 and 2 are the analysis of cell extracts from the wild-type control; lane 3, a strain in which the gene encoding RhlB was deleted; lanes 4 and 5, strains producing catalytically inactive RhlB because of point mutants targeting residues important for enzymatic activity. This figure was adapted from previously published work (Khemici *et al.*, 2005; Vanzo *et al.*, 1998).

further discussion of these results, see [Vanzo *et al.* \(1998\)](#). Panel B shows Western blots that were performed after co-immunopurification with antisera against RNase E. In the analysis, normal rabbit serum was used as a control, because the authentic preimmune serum had been exhausted in previous work. RNA degradosome co-immunopurified with antiserum raised against RNase E was separated on SDS-PAGE, blotted, and then analyzed with antiserum raised against RNase E, PNPase, enolase, or RhlB. This analysis allowed us to conclude that catalytically inactive variants of RhlB were assembled into the RNA degradosome. For further discussion of these results see [Khemici *et al.* \(2005\)](#).

4.4. Small-scale affinity purification of polyclonal antibodies

We have occasionally found it useful to affinity-purify antibodies on a small scale for Western blotting. Here, we describe a simple protocol that can be performed at the same time that a blot is prepared for Western analysis. In this technique, purified RhlB is run on SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose filter following any standard Western blotting procedure. We usually run the RhlB in two or three lanes of the gel (1 μ g per lane). The remaining lanes of the gel can be used for the samples that are to be analyzed by Western blotting. After coloration of the filter with Ponceau red, the region containing RhlB is marked with a soft pencil. After blocking the filter, the strip of nitrocellulose containing the RhlB is excised with a sharp scissors or a scalpel. The following steps are performed at 4 °C. The strip is placed on the side of a plastic disposable tube, and 1 ml of antiserum is layered on top of the filter. The tube is agitated on rocking platform as described previously for 2 to 3 h to bind the RhlB-specific antibodies to the RhlB on the filter. The antiserum is removed, and the filter is washed twice for 15 min with 4 ml of 1 \times PBS containing 0.1 mg/ml BSA (bovine serum albumin) and 0.02% Tween 20. The antibody is then eluted from the filter by brief treatments with acid and base. The filter is washed for 4 min with 1 ml of 1 \times PBS containing 0.02 N HCl and 0.02% Tween 20 and then for 4 min with 1 ml of 1 \times PBS containing 0.02 N NaOH and 0.02% Tween 20. The washes are combined immediately.

The following should be noted regarding this protocol. In principle, the elution is nondenaturing. The acid and base treatments disrupt the antigen-antibody complex by altering the charge of acidic and basic amino acid residues at the interface between the antigen and antibody; 1 \times PBS buffer has a pH of approximately 7.5. The addition of 0.02 N HCl forms an acid phosphate buffer with a pH of approximately 2.5; the addition of 0.02 N NaOH forms a basic phosphate buffer with a pH of approximately 12.5. Long-term exposure to either of these extremes of pH can lead to irreversible damage because of denaturation and hydrolysis of protein. When the acid and base washes are mixed, the pH is restored to neutrality, minimizing

possible damage. We perform the Western analysis the same day that the antibody is affinity purified. We use half of the affinity-purified antibody, holding the other half on ice as a reserve in case there is a problem with the initial Western blot. This protocol was developed to affinity-purify antiserum raised against *E. coli* RhlB, because it is a rather poor antigen-producing antisera with low titers and extensive cross-reactivity to other *E. coli* proteins. For high-titer antisera, it should be possible to use significantly less antiserum (diluted into $1 \times$ PBS if necessary).

5. PERSPECTIVE

Here we have described techniques for use of polyclonal rabbit antibodies in the identification and characterization of multiprotein complexes containing RNA degrading enzymes. This method was used over the past decade to help characterize the RNA degradosome of *E. coli*. When a model organism such as *E. coli* is used, technology that is more recent has largely supplanted the approach described here. RNase E tagged with FLAG or other epitopes can be immunopurified with commercially available high-specificity antibodies coupled to beads (Miczak *et al.*, 1996; Morita *et al.*, 2005). This technology can be used with any protein that can be engineered to present an accessible epitope. Indeed, an *E. coli* protein “interactome” has recently been determined on the basis of the systematic analysis of nearly 1000 protein-coding genes that were engineered to add a C-terminal SPA tag (Butland *et al.*, 2005). The composition of SPA-tagged MPCs was determined by mass spectrometry, and a network of protein-protein interactions was mapped. All of the protein-protein interactions described previously in the identification and characterization of the RNA degradosome were detected in the systematic analysis of the *E. coli* interactome.

Nevertheless, systematic studies of protein-protein interactions by a proteomics approach are available only in a few well-characterized model organisms. Indeed, although genomic sequences of prokaryotic microorganisms are now being produced at the rate of several hundred per year, most of these organisms are refractory to the genetic engineering needed to introduce epitope-tagged proteins. This method requires the capacity to introduce DNA vectors that either self-replicate or integrate into the chromosome. Although certain bacteria are naturally transformable and others can be transformed by conjugation, optimizing these processes for a specific bacterium is difficult and time consuming. Thus, there are ample reasons to consider the use of the method described here for the analysis of MPCs in microorganisms where the possibilities for genetic engineering are limited or nonexistent. In this context, we will briefly describe unpublished

work from our laboratory aimed at identifying and characterizing the RNA degradosome from *Pseudoaltermonas haloplanktis*.

5.1. Characterization of the RNase E of psychrotolerant bacteria

Pseudoaltermonas haloplanktis is a marine bacterium isolated in Antarctica whose genome has recently been sequenced (Medigue *et al.*, 2005). One interest in studying this bacterium is that it grows well at temperatures ranging from 10 to 30 °C, with generation times that are not very different from *E. coli* growing in the range of 20 to 40 °C. Bacteria like *P. haloplanktis* are known as *psychrotolerant* or *psychrophilic*, meaning that they tolerate or grow well in the cold. Like *E. coli*, *P. haloplanktis* is a γ -proteobacterium, although it is not an enterobacterium. *E. coli* and *P. haloplanktis* have many homologs in common, and conservation at the level of protein sequence ranges from 70 to 90%. *P. haloplanktis* has clearly identifiable homologs for all of the components of the RNA degradosome (see, for instance, Iost and Dreyfus, 2006). The RNase E of *P. haloplanktis* is 1071 residues in length compared with 1061 for *E. coli*. The first 530 residues of each protein make up the catalytic domain whose sequence is conserved at the level of 85%. However, there is little, if any, conservation of sequence in the noncatalytic region. Furthermore, there are no clear signatures in the RNase E noncatalytic region of *P. haloplanktis* for the motifs identified in the enterobacteria as necessary for protein–protein interactions between RNase E and RhlB, enolase, and PNPase. Two scenarios that are not necessarily mutually exclusive could explain these observations. Either the sequences of the motifs for protein–protein interactions have diverged significantly or the RNase E of *P. haloplanktis* interacts with a different set of proteins.

Our long-term interest is to identify and characterize the RNA degradosome of *P. haloplanktis* to understand how it has been modified to work efficiently at lower temperatures. To initiate this project, we raised polyclonal antibodies against the RNase E of *P. haloplanktis* by overexpressing it in *E. coli*, purifying it under denaturing conditions, and immunizing rabbits. Figure 4.3 shows the characterization of this antiserum. Panel A shows a Coomassie blue–stained SDS gel loaded with whole cell extracts used to perform the Western blot in panel B. The Western blot in panel B was performed with the antiserum against the RNase E of *P. haloplanktis* diluted 1/4000. Lane 1 in each panel is a whole cell extract from *P. haloplanktis*, whereas lanes 2 to 5 are extracts from *E. coli*. Note that to get approximately equal signals in the Western blot, 4-fold less *P. haloplanktis* protein than *E. coli* protein was loaded. Thus, the Coomassie blue–stained protein in lane 1 of panel A is barely visible in this image. In panel B, lane 1, the antiserum reacts with two proteins from *P. haloplanktis*. The larger protein running at approximately 180 kDa is RNase E. The smaller protein running at

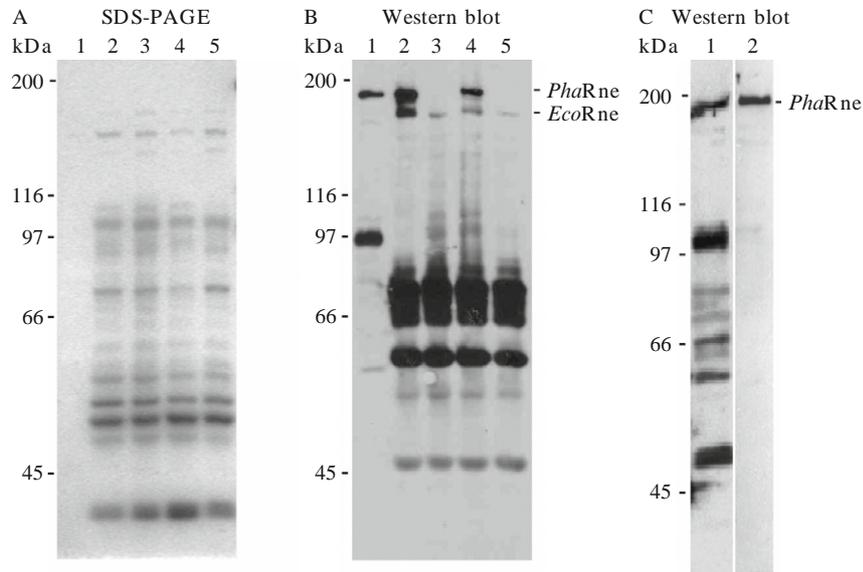


Figure 4.3 Polyclonal antibodies against the RNase E of *P. haloplanktis*. (A and B) Lane 1, *P. haloplanktis* whole cell extract; lanes 2 to 5, *E. coli* whole cell extracts. In lanes 2 and 4, the DH5 α strain of *E. coli* was transformed with a low copy number plasmid containing a 5-kbp insert of *P. haloplanktis* genomic DNA encoding RNase E. Lanes 3 and 5 are the empty vector controls, pLN135.1 and pAM238, respectively. Note that the protein loaded on lane 1, which is fourfold less than in lanes 2 to 5, is barely visible in the Coomassie-stained SDS-PAGE (panel A). The antiserum, raised against the RNase E of *P. haloplanktis*, was diluted 1/4000, the secondary antibody was anti-rabbit IgG conjugated to peroxidase (Sigma A8275), and the blot was developed with an ECL kit (GE Healthcare/Amersham). (C) Western blot before (lane 1) and after (lane 2) affinity purification of the antiserum raised against the *P. haloplanktis* RNase E. The whole cell extract analyzed in this Western blot was from *P. haloplanktis*. The position of protein size markers is indicated to the left of each panel. *PhaRne* and *EcoRne* indicate the position of the *P. haloplanktis* RNase E and the *E. coli* RNase E, respectively.

approximately 97 kDa could be either a proteolysis product of RNase E or a different protein that cross-reacts with the antiserum. To distinguish between these two possibilities, we performed a small-scale affinity purification of the antiserum against full-length *P. haloplanktis* RNase E following the protocol described previously. Panel C shows lanes from Western blots of a whole cell extract of *P. haloplanktis* with antiserum (lane 1) or affinity-purified antibody (lane 2). Note that, as expected, the affinity-purified antibody interacts with the full-length RNase E. Because the 97-kDa protein and other smaller polypeptides were not detected after affinity purification, the possibility that they are proteolysis products of RNase E can be excluded. Finally, in other Western blots, the antiserum has been diluted to 1/20,000 with little loss of the specific signal against full-length RNase E and a significant reduction of the cross-reaction with the protein at

97 kDa (data not shown). From these results, we conclude that the antiserum has a high titer of IgGs specific to the RNase E of *P. haloplanktis*, and, on the basis of our previous experience with antisera raised against the RNase E and PNPase of *E. coli*, this antiserum can be used in co-immunopurification experiments without further purification.

Lanes 2 and 4 in panel B (Fig. 4.3) are *E. coli* whole cell extracts prepared from cells harboring low copy number plasmids containing *P. haloplanktis* genomic DNA encoding RNase E. Lanes 3 and 5 are the empty vector controls. In this Western blot, the antiserum was diluted 1/4000 to permit visualization of the *E. coli* RNase E. This interspecies cross-reactivity is due to antibodies against epitopes that are conserved between the RNase E of these bacteria. Note that expression of the RNase E of *P. haloplanktis* is clearly detected in lanes 2 and 4, showing that it can be expressed in *E. coli* with endogenous transcription and translation signals from the chromosome of *P. haloplanktis*. We are currently testing whether these plasmids can complement *E. coli* strains lacking RNase E. Lanes 2 to 5 show that, at this dilution of antiserum, there is a strong cross-reaction with *E. coli* proteins in the range of 40 to 80 kDa. This could be due to either the presence of reactive antibodies before the rabbit was immunized (rabbits are susceptible to infections by pathogenic enterobacteria) or to contaminants in the RNase E used for immunization (the *P. haloplanktis* RNase E for immunization was overexpressed in *E. coli*). Regardless of these considerations, the Western blot in panel C demonstrates that, if necessary, the antiserum can be affinity purified for analysis of the expression of *P. haloplanktis* RNase E in *E. coli*.

We have adapted protocols used previously with *E. coli* (Carpousis *et al.*, 2001) to make protein extracts from *P. haloplanktis* for co-immunopurification experiments. Although preliminary results are encouraging, we have encountered a problem that needs to be resolved. The RNase E of *E. coli* is known to be sensitive to proteolysis in crude protein extracts. This problem is even more severe in protein extracts from *P. haloplanktis*. On the basis of experiments in which we have mixed extracts from *E. coli* and *P. haloplanktis* and analyzed the degradation of the endogenous RNase E, we believe that *P. haloplanktis* contains psychrophilic proteases that are active on ice even in the presence of the battery of protease inhibitors that we normally use. With the possible exception of EDTA, increasing the concentration of the protease inhibitors does not seem to help. Ongoing work, which will not be detailed here, suggests that it should be possible to overcome the proteolysis problem by changing the procedure that we use to lyse the cells.

ACKNOWLEDGMENTS

Our research is supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) with additional funding from the Agence Nationale de la Recherche (ANR, grant NT05_1-44659).

REFERENCES

- Babitzke, P., and Kushner, S. R. (1991). The AMS (altered mRNA stability) protein and ribonuclease E are encoded by the same structural gene of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1–5.
- Butland, G., Peregrin-Alvarez, J. M., Li, J., Yang, W., Yang, X., Canadien, V., Starostine, A., Richards, D., Beattie, B., Krogan, N., Davey, M., Parkinson, J., Greenblatt, J., and Emili, A. (2005). Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli*. *Nature* **433**, 531–537.
- Callaghan, A. J., Aurikko, J. P., Ilag, L. L., Gunter Grossmann, J., Chandran, V., Kuhnel, K., Poljak, L., Carpousis, A. J., Robinson, C. V., Symmons, M. F., and Luisi, B. F. (2004). Studies of the RNA degradosome-organizing domain of the *Escherichia coli* ribonuclease RNase E. *J. Mol. Biol.* **340**, 965–979.
- Callaghan, A. J., Marcaida, M. J., Stead, J. A., McDowall, K. J., Scott, W. G., and Luisi, B. F. (2005a). Structure of *Escherichia coli* RNase E catalytic domain and implications for RNA turnover. *Nature* **437**, 1187–1191.
- Callaghan, A. J., Redko, Y., Murphy, L. M., Grossmann, J. G., Yates, D., Garman, E., Ilag, L. L., Robinson, C. V., Symmons, M. F., McDowall, K. J., and Luisi, B. F. (2005b). “Zn-link”: A metal-sharing interface that organizes the quaternary structure and catalytic site of the endoribonuclease, RNase E. *Biochemistry* **44**, 4667–4675.
- Carpousis, A. J. (2002). The *Escherichia coli* RNA degradosome: Structure, function and relationship to other ribonucleolytic multienzyme complexes. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 150–155.
- Carpousis, A. J. (2003). Degradation of targeted mRNAs in *Escherichia coli*: Regulation by a small antisense RNA. *Genes Dev.* **17**, 2351–2355.
- Carpousis, A. J. (2007). The RNA degradosome of *Escherichia coli*: An mRNA-degrading machine assembled on RNase E. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**, 71–87.
- Carpousis, A. J., Leroy, A., Vanzo, N., and Khemic, V. (2001). *Escherichia coli* RNA degradosome. *Methods Enzymol.* **342**, 333–345.
- Carpousis, A. J., Van Houwe, G., Ehretsmann, C., and Krisch, H. M. (1994). Copurification of *E. coli* RNAase E and PNPase: Evidence for a specific association between two enzymes important in RNA processing and degradation. *Cell* **76**, 889–900.
- Carpousis, A. J., Vanzo, N. F., and Raynal, L. C. (1999). mRNA degradation: A tale of poly(A) and multiprotein machines. *Trends Genet.* **15**, 24–28.
- Celesnik, H., Deana, A., and Belasco, J. G. (2007). Initiation of RNA decay in *Escherichia coli* by 5′-pyrophosphate removal. *Mol. Cell* **27**, 79–90.
- Chandran, V., and Luisi, B. F. (2006). Recognition of enolase in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *J. Mol. Biol.* **358**, 8–15.
- Chandran, V., Poljak, L., Vanzo, N. F., Leroy, A., Miguel, R. N., Fernandez-Recio, J., Parkinson, J., Burns, C., Carpousis, A. J., and Luisi, B. F. (2007). Recognition and cooperation between the ATP-dependent RNA helicase RhlB and ribonuclease RNase E. *J. Mol. Biol.* **367**, 113–132.
- Coburn, G. A., and Mackie, G. A. (1999). Degradation of mRNA in *Escherichia coli*: An old problem with some new twists. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **62**, 55–108.
- Condon, C., and Putzer, H. (2002). The phylogenetic distribution of bacterial ribonucleases. *Nucleic Acids Res.* **30**, 5339–5346.
- Ehretsmann, C. P., Carpousis, A. J., and Krisch, H. M. (1992). Specificity of *Escherichia coli* endoribonuclease RNase E: *In vivo* and *in vitro* analysis of mutants in a bacteriophage T4 mRNA processing site. *Genes Dev.* **6**, 149–159.
- Gao, J., Lee, K., Zhao, M., Qiu, J., Zhan, X., Saxena, A., Moore, C. J., Cohen, S. N., and Georgiou, G. (2006). Differential modulation of *E. coli* mRNA abundance by inhibitory proteins that alter the composition of the degradosome. *Mol. Microbiol.* **61**, 394–406.

- Grunberg-Manago, M. (1999). Messenger RNA stability and its role in control of gene expression in bacteria and phages. *Annu. Rev. Genet.* **33**, 193–227.
- Iost, I., and Dreyfus, M. (2006). DEAD-box RNA helicases in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **34**, 4189–4197.
- Jager, S., Fuhrmann, O., Heck, C., Hebermehl, M., Schiltz, E., Rauhut, R., and Klug, G. (2001). An mRNA degrading complex in *Rhodobacter capsulatus*. *Nucleic Acids Res.* **29**, 4581–4588.
- Khemici, V., Poljak, L., Toesca, I., and Carpousis, A. J. (2005). Evidence *in vivo* that the DEAD-box RNA helicase RhlB facilitates the degradation of ribosome-free mRNA by RNase E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 6913–6918.
- Khemici, V., Toesca, I., Poljak, L., Vanzo, N. F., and Carpousis, A. J. (2004). The RNase E of *Escherichia coli* has at least two binding sites for DEAD-box RNA helicases: Functional replacement of RhlB by RhlE. *Mol. Microbiol.* **54**, 1422–1430.
- Kushner, S. R. (2002). mRNA decay in *Escherichia coli* comes of age. *J. Bacteriol.* **184**, 4658–4665.
- Lee, K., and Cohen, S. N. (2003). A *Streptomyces coelicolor* functional orthologue of *Escherichia coli* RNase E shows shuffling of catalytic and PNPase-binding domains. *Mol. Microbiol.* **48**, 349–360.
- Lee, K., Zhan, X., Gao, J., Qiu, J., Feng, Y., Meganathan, R., Cohen, S. N., and Georgiou, G. (2003). RraA, a protein inhibitor of RNase E activity that globally modulates RNA abundance in *E. coli*. *Cell* **114**, 623–634.
- Liou, G. G., Jane, W. N., Cohen, S. N., Lin, N. S., and Lin-Chao, S. (2001). RNA degradosomes exist *in vivo* in *Escherichia coli* as multicomponent complexes associated with the cytoplasmic membrane via the N-terminal region of ribonuclease E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 63–68.
- Marcaida, M. J., DePristo, M. A., Chandran, V., Carpousis, A. J., and Luisi, B. F. (2006). The RNA degradosome: Life in the fast lane of adaptive molecular evolution. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 359–365.
- Masse, E., Escorcia, F. E., and Gottesman, S. (2003). Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **17**, 2374–2383.
- Medigue, C., Krin, E., Pascal, G., Barbe, V., Bernsel, A., Bertin, P. N., Cheung, F., Cruveiller, S., D'Amico, S., Duilio, A., Fang, G., Feller, G., *et al.* (2005). Coping with cold: The genome of the versatile marine Antarctica bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Genome Res.* **15**, 1325–1335.
- Miczak, A., Kaberdin, V. R., Wei, C. L., and Lin-Chao, S. (1996). Proteins associated with RNase E in a multicomponent ribonucleolytic complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 3865–3869.
- Morita, T., Maki, K., and Aiba, H. (2005). RNase E-based ribonucleoprotein complexes: Mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. *Genes Dev.* **19**, 2176–2186.
- Mudd, E. A., Krisch, H. M., and Higgins, C. F. (1990). RNase E, an endoribonuclease, has a general role in the chemical decay of *Escherichia coli* mRNA: Evidence that *rne* and *ams* are the same genetic locus. *Mol. Microbiol.* **4**, 2127–2135.
- Ow, M. C., and Kushner, S. R. (2002). Initiation of tRNA maturation by RNase E is essential for cell viability in *E. coli*. *Genes Dev.* **16**, 1102–1115.
- Prud'homme-Genereux, A., Beran, R. K., Iost, I., Ramey, C. S., Mackie, G. A., and Simons, R. W. (2004). Physical and functional interactions among RNase E, polynucleotide phosphorylase and the cold-shock protein, CsdA: Evidence for a “cold shock degradosome.” *Mol. Microbiol.* **54**, 1409–1421.
- Purusharth, R. I., Klein, F., Sulthana, S., Jager, S., Jagannadham, M. V., Evguenieva-Hackenberg, E., Ray, M. K., and Klug, G. (2005). Exoribonuclease R interacts with

- endoribonuclease E and an RNA helicase in the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas syringae* Lz4W. *J. Biol. Chem.* **280**, 14572–14578.
- Py, B., Causton, H., Mudd, E. A., and Higgins, C. F. (1994). A protein complex mediating mRNA degradation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **14**, 717–729.
- Py, B., Higgins, C. F., Krisch, H. M., and Carpousis, A. J. (1996). A DEAD-box RNA helicase in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Nature* **381**, 169–172.
- Taghbalout, A., and Rothfield, L. (2007). RNaseE and the other constituents of the RNA degradosome are components of the bacterial cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 1667–1672.
- Taraseviciene, L., Miczak, A., and Apirion, D. (1991). The gene specifying RNase E (*rne*) and a gene affecting mRNA stability (*ams*) are the same gene. *Mol. Microbiol.* **5**, 851–855.
- Vanzo, N. F., Li, Y. S., Py, B., Blum, E., Higgins, C. F., Raynal, L. C., Krisch, H. M., and Carpousis, A. J. (1998). Ribonuclease E organizes the protein interactions in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Genes Dev.* **12**, 2770–2781.

Article 2 : Characterization of the RNA Degradosome of *Pseudoalteromonas haloplanktis*: Conservation of the RNase E-RhlB Interaction in the γ -proteobacteria. Soraya Aït-Bara and Agamemnon J. Carpousis.

Dans cet article, les travaux montrés concernent l'identification du dégradosome d'ARN de la bactérie *P.haloplanktis* et la caractérisation des microdomaines responsables des interactions RNase E-RhlB et RNase E-PNPase. Le microdomaine d'interaction à RhlB chez la RNase E de *P.haloplanktis* a été étudié plus en détail. Ces travaux ont permis de mieux comprendre les interactions entre la RNase E et les protéines PNPase et RhlB et d'analyser la répartition des microdomaines d'interaction chez les ordres séparant les bactéries *P.haloplanktis* d'*E.coli*. Cet article montre également les tests de complémentation de la RNase E d'*E.coli* chez *E.coli* par la RNase E de *P.haloplanktis*.

Characterization of the RNA Degradosome of *Pseudoalteromonas haloplanktis*: Conservation of the RNase E-RhlB Interaction in the Gammaproteobacteria[∇]

Soraya Aït-Bara and Agamemnon J. Carpousis*

Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaires, UMR 5100, Centre National de la Recherche Scientifique et Université de Toulouse 3, 31062 Toulouse, France

Received 25 May 2010/Accepted 6 August 2010

The degradosome is a multienzyme complex involved in mRNA degradation in *Escherichia coli*. The essential endoribonuclease RNase E contains a large noncatalytic region necessary for protein-protein interactions with other components of the RNA degradosome. Interacting proteins include the DEAD-box RNA helicase RhlB, the glycolytic enzyme enolase, and the exoribonuclease PNPase. *Pseudoalteromonas haloplanktis*, a psychrotolerant gammaproteobacterium distantly related to *E. coli*, encodes homologs of each component of the RNA degradosome. In *P. haloplanktis*, RNase E associates with RhlB and PNPase but not enolase. Plasmids expressing *P. haloplanktis* RNase E (Ph-RNase E) can complement *E. coli* strains lacking *E. coli* RNase E (Ec-RNase E). Ph-RNase E, however, does not confer a growth advantage to *E. coli* at low temperature. Ph-RNase E has a heterologous protein-protein interaction with Ec-RhlB but not with Ec-enolase or Ec-PNPase. The Ph-RNase E binding sites for RhlB and PNPase were mapped by deletion analysis. The PNPase binding site is located at the C-terminal end of Ph-RNase E at the same position as that in Ec-RNase E, but the sequence of the site is not conserved. The sequence of the RhlB binding site in Ph-RNase E is related to the sequence in Ec-RNase E. Together with the heterologous interaction between Ph-RNase E and Ec-RhlB, our results suggest that the underlying structural motif for the RNase E-RhlB interaction is conserved. Since the activity of Ec-RhlB requires its physical interaction with Ec-RNase E, conservation of the underlying structural motif over a large evolutionary distance could be due to constraints involved in the control of RhlB activity.

In the model Gram-negative bacterium *Escherichia coli*, RNase E is an essential RNase involved in RNA processing and mRNA degradation (6, 14, 28). RNase E is a large 1,061-residue protein. Residues 1 to 529 of RNase E correspond to the catalytic domain, which associates to form a tetrameric holoenzyme (3). In *E. coli*, RNase G is a paralog of RNase E, which is 497 residues in length (34, 52, 54). There is a high degree of sequence conservation between the catalytic domains of RNase E and RNase G, and these enzymes have similar catalytic properties. Both enzymes are 5'-end-dependent endoribonucleases with specificity for AU-rich single-strand cleavage sites. The 5'-end dependence involves a site in the catalytic domain that binds 5' monophosphate ends (3, 36). Together, RNase E and RNase G are the founders of a family of bacterial ribonucleases conserved in many, but not all, bacteria (4, 13, 23, 30). A major difference between RNase E and RNase G is the large C-terminal extension of RNase E, which is equal in length to the region corresponding to the catalytic domain.

The noncatalytic region of RNase E, residues 530 to 1061, is mostly natively unstructured (2). However, it contains short regions involved in interactions with phospholipid membranes, RNA, or protein. In some cases, these regions have been shown to form secondary structures involved in the interaction,

and the term “microdomain” has been used to describe these structures (37). “Segment A” of *E. coli* RNase E, corresponding to residues 568 to 582, has recently been shown to form a short amphipathic α -helix that binds to phospholipid membranes *in vitro* and that is necessary for the localization of RNase E to the inner cytoplasmic membrane *in vivo* (25). Residues 604 to 683, known as the arginine-rich RNA binding domain (AR-RBD), binds RNA *in vitro* (38, 51), and it is believed to enhance the activity of RNase E *in vivo* (35, 44). A second short arginine-rich segment (residues 796 to 819), known as AR2 (arginine-rich region 2), is also involved in RNA binding (32). Residues 701 to 1061 form a scaffold for protein-protein interactions with RNA helicase B (RhlB), enolase, and polynucleotide phosphorylase (PNPase) (23, 53). The multienzyme complex comprised of RNase E, RhlB, enolase, and PNPase is known as the RNA degradosome (7, 41, 47). RhlB is a DEAD-box RNA helicase involved in mRNA degradation (24, 47, 53). Enolase is a glycolytic enzyme whose role in RNA metabolism is unclear, although it has been suggested that it might link the mRNA degradation machinery to the control of central intermediary metabolism. PNPase is an exoribonuclease involved in RNA processing and mRNA degradation (12, 19). In the case of enolase and PNPase, the microdomains in the scaffold that are responsible for the protein-protein interactions have been characterized at atomic resolution by X-ray crystallography (8, 43). The microdomain involved in RhlB binding has been localized to a specific region in the scaffold by deletion and point mutation analysis, but its structure has not been elucidated (9, 27, 53).

In addition to the canonical RNA degradosome, a different

* Corresponding author. Mailing address: LMG, UMR 5100, CNRS-Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 9, France. Phone: 33561335894. Fax: 33561335886. E-mail: carpousi@ibcg.biotoul.fr.

[∇] Published ahead of print on 20 August 2010.

complex containing RNase E, Hfq, and SgrS, a small regulatory RNA, is formed under conditions of phosphosugar stress (42, 55). The formation of the complex with Hfq and SgrS requires the same region of RNase E that is necessary for the formation of the RNA degradosome, and evidence suggests that the degradosome is remodeled because of the new interaction. RraA and RraB, protein factors that downregulate RNase E activity, are also believed to remodel the RNA degradosome, and there is evidence that RNase E can form a "cold shock" RNA degradosome in which CsdA, another DEAD-box RNA helicase, is recruited to the complex (18, 27, 31, 45, 48). The noncatalytic region of RNase E can therefore be viewed as an interaction hub involved in a variety of protein-protein interactions. It has been suggested that remodeling the canonical RNA degradosome in response to environmental changes facilitates the rapid adjustment of the program of gene expression by a posttranscriptional mechanism involving mRNA stability (37).

Authentic homologs of RNase E are found in many bacteria, and in the limited cases studied, these homologs have been found to interact with other enzymes to make RNA degradosome-like complexes (13, 37). The RNase E of the actinobacterium *Streptomyces coelicolor* has been shown to interact with PNPase (30). The RNase E of the photosynthetic alphaproteobacterium *Rhodobacter capsulatus* has been shown to interact with two DEAD-box RNA helicases and the transcription termination factor Rho (20, 21). The RNase E of gammaproteobacterium *Pseudomonas syringae* Lz4W has been shown to interact with a DEAD-box RNA helicase and the exoribonuclease RNase R (46). The composition of the RNase E-based complex thus varies with species, suggesting a specialized role for the RNA degradosome in molecular evolution (37). The variability in composition of the RNA degradosome likely involves changes in the sequences and structure of microdomains in the noncatalytic region of RNase E, although this idea awaits experimental validation.

Pseudoalteromonas haloplanktis TAC125 is a psychrotolerant gammaproteobacterium that was isolated from the Antarctic Ocean (1). Although described as a psychrophilic bacterium, we prefer the term psychrotolerant since it can grow at temperatures ranging from 4°C to 30°C. The genome of *P. haloplanktis* has been completely sequenced (39). Phylogenetic analysis shows that *P. haloplanktis* is a member of the *Alteromonadales*, an order that is separated from the *Enterobacteriales* (*E. coli*) by the *Vibrionales*, *Aeromonadales*, and *Pasteurellales* (17). Interest in *P. haloplanktis* is 2-fold, as follows: industrial applications involving psychrotolerant enzymes and environmental studies involving that adaptation of bacteria to a cold marine niche. Here we have identified and characterized the RNA degradosome of *P. haloplanktis*, showing that it is comprised of RNase E, RhlB, and PNPase but not enolase. The sites in RNase E for protein-protein interactions with RhlB and PNPase were mapped by deletion analysis. Together with a recently published two-hybrid analysis of protein-protein interactions in the RNA degradosome of *Vibrio angustum* S14 (16), this is the first work in which microdomains of RNase E involved in protein-protein interactions have been identified and characterized in a bacterium other than *E. coli*.

MATERIALS AND METHODS

Strains. Strains used in this work are listed in Table 1. *P. haloplanktis* TAC125 was grown at 15°C in TYP broth (16 g/liter yeast extract, 16 g/liter Bacto tryptone, and 15 g/liter NaCl) supplemented with 50 µg/ml ampicillin when necessary.

Plasmids. Plasmids used in this work are listed in Table 1. pSAB11 was constructed by deleting the lactose promoter and operator of pAM238. The gene encoding FLAG-tagged *P. haloplanktis* RNase E (Ph-RNase E) under its own expression signals was constructed by PCR and inserted into pSAB11 to create pSAB15. In pSAB18, the coding sequence of Ph-RNase E was fused at AUG to the *E. coli* RNase E (Ec-RNase E) expression signals. pSAB29 was derived from pSAB18 by deleting the region corresponding to the putative RhlB binding site by inverse PCR.

Conjugation. The shuttle vector pIB3 and *E. coli* strain S17.1 (kindly provided by M. Dreyfus) were used for transconjugation. pIB3 and pSAB17 were mobilized from *E. coli* S17.1 into *P. haloplanktis* TAC125 by conjugation. Aliquots (1 ml) of cultures in logarithmic growth phase were mixed and spotted onto a TYP plate. After 16 h at room temperature, the cells were suspended in 300 µl of TYP broth. Transconjugants were selected at 4°C by plating on TYP plates containing 100 µg/ml ampicillin.

Whole-cell extracts and immunopurification. FLAG-tagged RNase E was immunopurified by a modification of a protocol described previously (42). Cells were grown in 200-ml cultures of LB (*E. coli*) or TYP (*P. haloplanktis*) to an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.6. The cultures were chilled on ice, and all subsequent steps were performed in the cold. The cells were harvested by centrifugation and washed in 10 ml of 50 mM Tris-HCl at pH 8.0 and 5 mM EDTA, except that EDTA was omitted for *P. haloplanktis* since the cells lysed prematurely in its presence. The cell pellets were suspended in 5 ml of IP buffer (20 mM Tris-HCl at pH 8.0, 0.1 M KCl, 5 mM MgCl₂, 10% glycerol, 0.1% Tween 20, 1× Roche EDTA-free protease inhibitor cocktail, 150 µg/ml lysozyme). The cell suspension was subjected to three freeze-thaw steps, sonicated, and centrifuged at 10,000 × g for 1 h at 4°C. The supernatant (1 ml) was incubated with 50 µl of anti-FLAG M2-agarose suspension (Sigma) for 2 h at 4°C with gentle agitation. The mixture was filtered by using a mini-chromatography column (Bio-Rad). The bound proteins were eluted with 50 µl of TBS (50 mM Tris-HCl at pH 7.5 and 0.15 M NaCl) containing 5 µg of FLAG peptide (Sigma). The proteins were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (7.5%). Western blotting was performed using peroxidase conjugated anti-FLAG antibody (Sigma) and an ECL kit (GE Healthcare).

Purification of RNase E CTH polypeptide and incubation with *P. haloplanktis* cell extracts. The His-tagged RNase E C-terminal half (CTH) polypeptide was expressed using pET15b (Novagen). Briefly, pSAB1 was constructed by ligating the Ph-RNase E coding sequence into pET15b. pSAB20 was constructed by deleting the region corresponding to residues 11 to 528. Thus, the Ph-RNase E CTH polypeptide contains the His tag from pET15b and residues 1 to 10 of Ph-RNase E fused to residues 529 to 1071 of Ph-RNase E. pSAB33, pSAB34, and pSAB35 were derived from pSAB20 by deleting the region corresponding to the last 231, 76, and 37 residues of Ph-RNase E CTH, respectively.

BL21(DE3) was transformed with pSAB20, pSAB33, pSAB34, and pSAB35. Cultures were grown at 30°C and induced at an OD₆₀₀ of 0.4 to 0.5 with 1 mM IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside). Cells were harvested 3 h after induction by centrifugation at 6,000 rpm at 4°C for 15 min and washed with ice-cold 50 mM Tris-HCl, pH 7.5. The following steps, which were done under denaturing conditions in 8 M urea, were performed at room temperature. A cleared lysate was prepared in buffer B according to the manufacturer's instructions (Qiagen). Approximately 100 µg of overexpressed protein was diluted in buffer B and incubated with 200 µl of Talon metal affinity resin (cobalt; Clontech). The beads were collected in a mini-chromatography column (Bio-Rad) and washed with 1 ml buffer C (Qiagen). The urea was removed by washing with buffer EQ (20 mM Tris-HCl at pH 7.5, 0.1 M KCl, 5 mM MgCl₂, 10% glycerol, 0.1% Tween 20, 0.1 mg/ml bovine serum albumin [BSA], and 1× Roche EDTA-free protease inhibitor cocktail). The column was transferred to 4°C and washed again with cold buffer EQ. Subsequent steps were performed at 4°C. Whole-cell extract (1 ml) from *P. haloplanktis* was added and incubated for 2 h. The column was washed twice with buffer 1 (buffer EQ containing 20 mM imidazole without BSA). Elutions were performed with buffer 2 (buffer 1 containing 300 mM imidazole).

Mass spectrometry. Proteins that copurified with FLAG-tagged Ph-RNase E were identified by mass spectrometry. Bands from SDS-PAGE were excised and sent to the proteomics service of the University of Bordeaux for analysis (Plateforme de Génomique Fonctionnelle Bordeaux, Université Victor Segalen). Coverage ranged from 47% for PNPase to 20% for RhlB.

TABLE 1. Strains and plasmids

Strain/plasmid	Description ^a	Reference/ source
Strains		
<i>P. haloplanktis</i> TAC125	Wild type	1
KSL2000	<i>me::cat recA::Tn10</i>	31
AC21	MC1061 <i>zce-726::Tn10</i>	8
AC27	MC1061 <i>zce-726::Tn10 me131</i>	34
SVK438	KSL2000 <i>recA</i> ⁺	V. Khemici
SVK446	KSL2000 <i>recA</i> ⁺ Δ <i>rh1b</i>	V. Khemici
S17.1	RP4 2-Tc::Mu-Km::Tn7 <i>pro res mod1</i>	52
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) dcm gal</i> λ (DE3)	53
Plasmids		
pAM238	pGB2-derived plasmid	12
pAM- <i>me</i>	Chromosomal PstI fragment containing the <i>me</i> gene cloned into pAM238 (pSC101ori, spectinomycin resistance)	56
pVK200	pAM238, Ec-RNase E, C-terminal FLAG	V. Khemici
pET15b-RneCTH	T7 expression of the RNase E CTH with an N-terminal His tag	29
pJB3	Broad-host-range cloning vector, RK2 derivative plasmid	2
pIB3 (shuttle vector)	Fragment 1914 to 2786 of the resident plasmid pMtBL of <i>P. haloplanktis</i> containing the origin of replication was cloned into pJB3	Ivona Bagdiul
pSAB1	pET15b, <i>Ph-me</i> CDS under the control of T7 expression signals	This work
pSAB11	pAM238, lactose expression signals deleted	This work
pSAB12	pSAB11, <i>Ph-me</i>	This work
pSAB13	pSAB11, <i>E. coli</i> expression signals fused to <i>Ph-me</i> CDS	This work
pSAB15	pSAB11, <i>Ph-me</i> , C-terminal FLAG	This work
pSAB17	pIB3, <i>Ph-me</i> , C-terminal FLAG	This work
pSAB18	pSAB15, <i>E. coli</i> expression signals fused to <i>Ph-me</i> CDS	This work
pSAB29	pSAB18, <i>Ph-me</i> (deletion of HBS)	This work
pSAB20	pSAB1, <i>Ph-me</i> (deletion of residues 11–528)	This work
pSAB33	pSAB20, <i>Ph-me</i> CTH (deletion of residues 841–1071)	This work
pSAB34	pSAB20, <i>Ph-me</i> CTH (deletion of residues 996–1071)	This work
pSAB35	pSAB20, <i>Ph-me</i> CTH (deletion of residues 1035–1071)	This work

^a CDS, coding sequence.

PONDR and ClustalW. The *P. haloplanktis* RNase E protein sequence was analyzed by the Predictor of Naturally Disordered Regions (PONDR) (Molecular Kinetics, Inc., Indianapolis, IN) (33). Protein sequence alignments were performed on the EMBL-EBI website (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) using CLUSTALW (10) and the Jalview editor (11).

RESULTS

Prediction of microdomains in the noncatalytic region of Ph-RNase E. The genome of *P. haloplanktis* encodes orthologs of *E. coli* RNase E, Rh1B, enolase, and PNPase that are conserved with overall sequence identities ranging from 52% for RNase E to 78% for enolase (data not shown). The score for the N-terminal catalytic domain (residues 1 to 529) of RNase E is 78% identity. No significant sequence conservation was detected between the C-terminal noncatalytic region of *P. haloplanktis* RNase E (Ph-RNase E) and *E. coli* RNase E (Ec-RNase E), a result consistent with previous work demonstrating a high degree of sequence variability in the noncatalytic region, even in closely related bacteria. Experimental work with *E. coli* RNase E has revealed six segments in the noncatalytic region that are involved in interactions with the phospholipid membrane, RNA, or protein (Fig. 1A). The membrane-targeting sequence (MTS) has been shown to interact with phospholipid membranes (25). The arginine-rich RNA binding domain (AR-RBD) and a second arginine-rich region (AR2) have been shown to bind RNA. The helicase binding site (HBS), enolase-binding site (EBS), and PNPase binding

site (PBS) have been shown to bind Rh1B, enolase, and PNPase, respectively. Three of these segments overlap with or correspond to regions that have been predicted by PONDR to have the propensity to form secondary structures (Fig. 1A, segments A, C, and D), and experimental results have confirmed these predictions (2, 8, 25, 43). Segment B, which overlaps the AR-RBD, is predicted to have the propensity to form a coiled-coil structure, although there is no experimental evidence supporting this prediction.

We analyzed the protein sequence of Ph-RNase E by PONDR, and the profile shown in Fig. 1B is similar to that shown in results previously obtained with the RNase E of *E. coli* and *Vibrio angustum* S14 (2, 16). For comparison, the profile for Ec-RNase E is shown in Fig. 1A. The conserved N-terminal catalytic domain of Ph-RNase E is predicted to be mostly structured. Segment A in the noncatalytic region, which corresponds to the MTS, is clearly predicted to be structured, consistent with previous work showing that this microdomain is conserved throughout the gammaproteobacteria (25). Three other short segments of predicted structure were detected in the noncatalytic region of Ph-RNase E (Fig. 1B, regions 1 to 3), but by visual inspection and sequence alignment, there is no obvious correspondence to any of the microdomains identified in Ec-RNase E. The only other clearly discernible elements in the noncatalytic region of the Ph-RNase E are the AR-RBD and AR2, which were detected by visual inspection and alignment of the Ec-RNase E and Ph-RNase sequences. In sum-

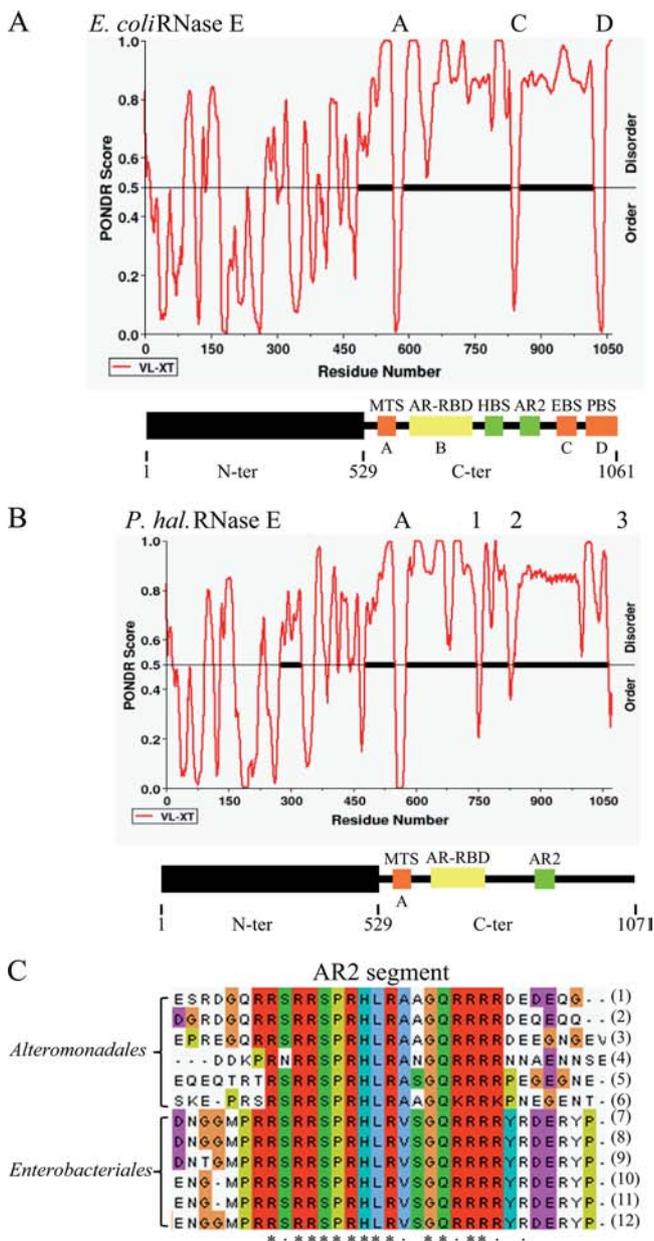


FIG. 1. Primary structure of *P. haloplanktis* RNase E. (A, B) POND analysis for prediction of RISPs (regions of increased structural propensity) and schematic representation of Ec-RNase E (A) and Ph-RNase E (B). RISPs correspond to regions with a score of less than 0.5. The analysis of Ec-RNase E, which has appeared previously (2), is presented to permit direct comparison with Ph-RNase E. In the schematic, the N-terminal catalytic domain is represented as a black box, and the noncatalytic C-terminal region is represented as a line. The noncatalytic region of Ec-RNase E contains six microdomains involved in membrane, RNA, and protein interactions. MTS, membrane targeting sequence; AR-RBD, arginine-rich RNA binding domain; HBS, helicase binding site; AR2, arginine-rich region 2; EBS, enolase binding site; PBS, PNPase binding site. Segments A, C, and D (red) correspond to regions predicted to form secondary structures by POND. Segment B (yellow), which overlaps with the AR-RBD, was predicted to form a coiled-coil structure (see reference 2). Two other microdomains (green) are known to make interactions but do not correspond to regions of predicted secondary structure. (C) Sequence alignment of the AR2 segments of RNase E homologs from the *Ateromonadales* and *Enterobacteriales*. The asterisks indicate strictly conserved resi-

dues; the dots indicate residues that are similar. The homologs used in this alignment correspond to *Shewanella* sp. ANA-3 (1), *Shewanella amazonensis* SB2B (2), *Shewanella* sp. PV-4 (3), *Colwellia psychrethraea* 34H (4), *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 (5), *Pseudoalteromonas tunicata* D2 (6), *Escherichia coli* (7), *Shigella boydii* Sb227 (8), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (9), *Yersinia pestis* Antiqua (10), *Yersinia pseudotuberculosis* IP 31758 (11), and *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* SCRI1043 (12).

dues; the dots indicate residues that are similar. The homologs used in this alignment correspond to *Shewanella* sp. ANA-3 (1), *Shewanella amazonensis* SB2B (2), *Shewanella* sp. PV-4 (3), *Colwellia psychrethraea* 34H (4), *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 (5), *Pseudoalteromonas tunicata* D2 (6), *Escherichia coli* (7), *Shigella boydii* Sb227 (8), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (9), *Yersinia pestis* Antiqua (10), *Yersinia pseudotuberculosis* IP 31758 (11), and *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* SCRI1043 (12).

primary, by structure prediction and sequence analysis, we detected segments in the noncatalytic region of Ph-RNase E that correspond to the MTS, AR-RBD, and AR2 of Ec-RNase E. For AR2, a sequence alignment of RNase E homologs from *Enterobacteriales* and *Ateromonadales* is shown in Fig. 1C, demonstrating a common core of 18 residues with 13 positions that are strictly conserved. By sequence alignment, we were unable to detect microdomains corresponding to the binding sites for RhlB, enolase, or PNPase. By structure prediction, the position of region 3 of Ph-RNase E corresponds to segment D of Ec-RNase E, which is the PNPase binding site.

RNA degradosome of *P. haloplanktis*. To test whether Ph-RNase E forms an RNA degradosome and to identify partner proteins, we employed pIB3, which is a shuttle vector permitting the transfer by conjugation of plasmids from *E. coli* to *P. haloplanktis*. A genomic fragment of *Ph-me*, including flanking sequences necessary for expression, was cloned into the shuttle vector. The *Ph-me* gene was modified to express Ph-RNase E with a C-terminal FLAG tag, creating the plasmid pSAB17 (Table 1). This plasmid was conjugated into *P. haloplanktis*. The expression of the FLAG-tagged Ph-RNase E was verified by Western blotting (data not shown). To detect proteins that interact with Ph-RNase E, whole-cell extracts were prepared, and the FLAG-tagged RNase E was affinity purified using anti-FLAG agarose beads. The FLAG-tagged Ph-RNase E was eluted with a competitor FLAG peptide and analyzed by SDS-PAGE (Fig. 2). Lane 1 of Fig. 2 shows the result of using a background control with an extract prepared from *P. haloplanktis* conjugated with the empty shuttle vector; lane 2 shows the result of using pSAB17. Five proteins, clearly visible in the eluate of the FLAG construct but absent in the background control, were identified by mass spectrometry. As indicated, the largest protein, migrating at about 180 kDa, is the full-length FLAG-tagged Ph-RNase E. Two smaller proteins (Fig. 2, asterisks) were identified as fragments of Ph-RNase E. Since these fragments were not detected by Western blotting when total protein was prepared by directly lysing the cells with SDS and heat, we believe that the fragments are due to proteolysis that occurs during the preparation of the whole-cell extract. Ec-RNase E is known to be exceptionally sensitive to proteolysis, and we observed previously that there is significant proteolysis of Ph-RNase E in native extracts prepared from *P. haloplanktis*, even in the presence of a cocktail of protease inhibitors (5).

Two other proteins detected and shown in Fig. 2 were identified as Ph-PNPase and Ph-RhlB. These proteins migrate at the expected sizes of 80 and 50 kDa, respectively. Enolase, which is expected to migrate at 48 kDa, was not detected by mass spectrometry nor was it detected by Western blotting using polyclonal rabbit serum raised against Ec-enolase (data

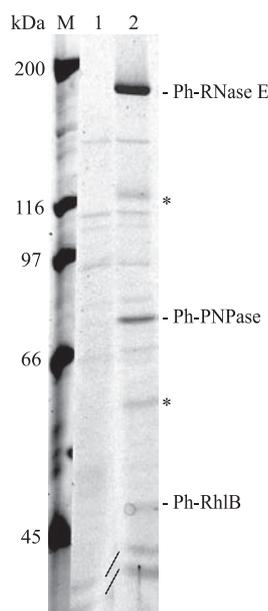


FIG. 2. RNA degradosome of *P. haloplanktis*. SDS-PAGE stained with Sypro orange. Whole-cell extracts were prepared from *P. haloplanktis* conjugated with the empty shuttle vector (pIB3) or the vector encoding FLAG-tagged Ph-RNase E (pSAB17). After adsorption to the anti-FLAG agarose beads and being washed, Ph-RNase E was eluted with FLAG peptide. Lane 1, pIB3 (background control); lane 2, pSAB17 (FLAG-tagged Ph-RNase E). M, molecular mass markers. The proteins shown in lane 2 were identified by mass spectrometry. The asterisks indicate proteolytic products of Ph-RNase E.

not shown). Enolase is a highly conserved enzyme, and control experiments showed that our antiserum readily detects Ph-enolase in *P. haloplanktis* whole-cell extracts (data not shown). Taken together, these results show that the Ph-RNase E forms an RNA degradosome containing Ph-PNPase and Ph-RhlB and suggest that Ph-enolase is not tightly associated with Ph-RNase E (see below).

Complementation of *E. coli* strains lacking Ec-RNase E by Ph-RNase E. We wanted to test whether Ph-RNase E could replace the function of Ec-RNase E in *E. coli* and whether the substitution of a mesophilic RNase E by a psychrotolerant RNase E affects the growth of *E. coli* in the cold. We used the KSL2000 strain of *E. coli*, in which the gene encoding RNase E on the chromosome is disrupted (29). Since RNase E is essential, it is supplied in *trans* by pBAD-*rne*, which is a low-copy-number plasmid with the Ec-RNase E coding sequence under the control of the *arabinose* promoter. We transferred the *Ph-rne* gene with the FLAG tag from pSAB17 to pSAB11 to create pSAB15. Both pBAD-*rne* and pSAB15 have the same origin of DNA replication (pSC101) but different antibiotic resistance markers. By transforming the KSL2000 strain with pSAB15 and selecting for spectinomycin, it was possible to displace the pBAD-*rne* plasmid and complement the deletion of Ec-RNase E on the chromosome with *Ph-rne* on the plasmid. However, this strain formed only visible colonies after 6 days of growth at 25°C compared to the control strain complemented with *Ec-rne* (pVK200), which formed visible colonies after 2 days (Fig. 3A). A control experiment using Ph-RNase E without FLAG gave the same result (data not shown). Quan-

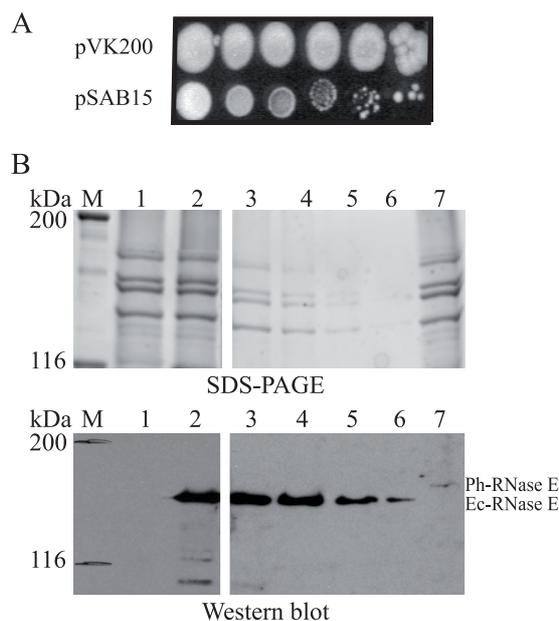


FIG. 3. Complementation of KSL2000 and expression of Ph-RNase E in *E. coli*. (A) Complementation of the KSL2000 strain (disruption of the chromosomal gene encoding Ec-RNase E) by plasmids expressing FLAG-tagged Ec-RNase E (pVK200) or FLAG-tagged Ph-RNase E (pSAB15). Serial dilutions (10-fold) were spotted on LB plates and grown at 25°C for 6 days. (B) SDS-PAGE stained with Sypro orange and Western blotting using anti-FLAG antibodies. Lane 1, pAM-*rne* (Ec-RNase E without FLAG); lane 2, pVK200; and lane 7, pSAB15. M, molecular mass markers. The protein loaded in lane 2 was diluted 4-fold (lane 3), 8-fold (lane 4), 16-fold (lane 5), and 32-fold (lane 6). In the panel showing lanes 1 and 2, the blot was exposed for 30 s, whereas in the panel showing lanes 3 to 7, the blot was exposed for 4 min to permit detection of Ph-RNase E.

tative Western blotting (Fig. 3B), in which a cell extract from the *Ec-rne* control was serially diluted, showed that the amount of Ph-RNase E in the strain complemented with pSAB15 was at least 32-fold lower than the amount of Ec-RNase E in the strain complemented with pVK200 (Fig. 3B, compare lane 7, undiluted Ph-RNase E, to lane 6, 32-fold-diluted Ec-RNase E). Note that in Fig. 3B, the image corresponding to lanes 3 to 7 was the result of a 4-min exposure to permit detection of Ph-RNase E, whereas the panel corresponding to lanes 1 and 2 was the result of a 30-s exposure. We therefore hypothesized that the weak complementation of the KSL2000 strain by pSAB15 might be due to low levels of expression of Ph-RNase E.

Promoters of transcription in *P. haloplanktis* have essentially the same consensus sequence as those in *E. coli* and are therefore expected to act as promoters in *E. coli* (15). The genomic region containing the *Ph-rne* gene used in our experiments contains approximately 700 bp of DNA upstream of the *rne* coding sequence. This region, which includes a 400-bp intergenic spacer and part of an upstream coding sequence, contains signals for transcription and translation, as evidenced by expression of FLAG-tagged Ph-RNase E when the gene carried by pSAB17 was introduced into *P. haloplanktis* by conjugation (Fig. 2). The control of the expression of Ec-RNase E involves a complex system of posttranscriptional autoregulation in which a 361-nucleotide (nt)-long 5' untranslated region

is targeted by RNase E to destabilize the mRNA (22). Taken together, our results suggest that low-level expression is due to a dysfunction in either the transcriptional or posttranscriptional control of the *Ph-rne* gene in *E. coli*.

To express Ph-RNase E at levels comparable to those of Ec-RNase E in the KSL2000 strain, we constructed a hybrid *rne* gene in which the 5' noncoding region of *Ec-rne* was fused to the coding sequence of Ph-RNase E. pSAB18, harboring the *rne* fusion, transformed into KSL2000 exhibited robust complementation at temperatures ranging from 25 to 37°C (Fig. 4A). Western blotting showed that the amount of Ph-RNase E in the strain complemented by pSAB18 is about 50% of the amount of Ec-RNase E in the strain complemented by pVK200 (Fig. 4B and quantification not shown). Taken together, these results suggest that the weak complementation by pSAB18 is due to low levels of expression of Ph-RNase E in *E. coli* when the coding sequence is under the control of the homologous *P. haloplanktis* expression signals. In Fig. 4A, Ph-RNase E failed to complement at 42°C, which is likely due to the thermolability of Ph-RNase E.

It is notable that complementation by Ph-RNase E at 15°C is weak (Fig. 4A). The amount of Ph-RNase E does not change between 30 and 15°C, as shown by Western blotting (Fig. 4B). Therefore, the growth defect at 15°C is not due to small amounts of Ph-RNase E. Since the endoribonuclease activity of Ph-RNase E is expected to be robust at 15°C, relatively poor growth at this temperature suggests that Ph-RNase E fails to provide a noncatalytic function that is necessary for growth in the cold. Moreover, the *E. coli* MC1061 strain harboring the *rne131* mutant lacking the last 477 residues of Ec-RNase E (32) grows slower than the wild-type strain at 15°C, whereas at 30°C, no growth defect was observed (Fig. 4C). Thus, the noncatalytic region of Ec-RNase E appears to have a function at low temperature that is not provided by Ph-RNase E.

Heterologous interaction between Ph-RNase E and Ec-RhIB. Since we were able to complement the KSL2000 strain with FLAG-tagged Ph-RNase E, we decided to check for heterologous interactions with *E. coli* proteins. By following the same strategy described above for the characterization of the RNA degradosome in *P. haloplanktis*, FLAG-tagged Ph-RNase E was purified from *E. coli* whole-cell extracts using anti-FLAG agarose beads. In Fig. 5A, lane 1 contains a negative control showing KSL2000 complemented with pAM-*rne* (harboring Ec-RNase E without FLAG). The three proteins marked with the asterisks are subunits of pyruvate dehydrogenase, an *E. coli* enzyme that adventitiously reacts with the FLAG agarose beads (42). Lane 2 contains a control showing the results from the KSL2000 strain complemented with pVK200 (FLAG-tagged Ec-RNase E). As expected, Ec-PNPase, Ec-RhIB, and Ec-enolase copurify with Ec-RNase E. Lane 3 shows the results from the KSL2000 strain complemented with pSAB18 (FLAG-tagged Ph-RNase E). We detected neither Ec-PNPase nor Ec-enolase. This result was confirmed by Western blotting, which should have been sensitive enough to detect trace amounts of PNPase or enolase (data not shown). The failure to detect enolase in lane 3 of Fig. 5A corroborates the results in Fig. 2, adding support to the suggestion that Ph-RNase E does not tightly associate with enolase. There was, however, in Fig. 2, a protein associated with Ph-RNase E that migrated at 50 kDa with mobility identical to that of Ec-RhIB.

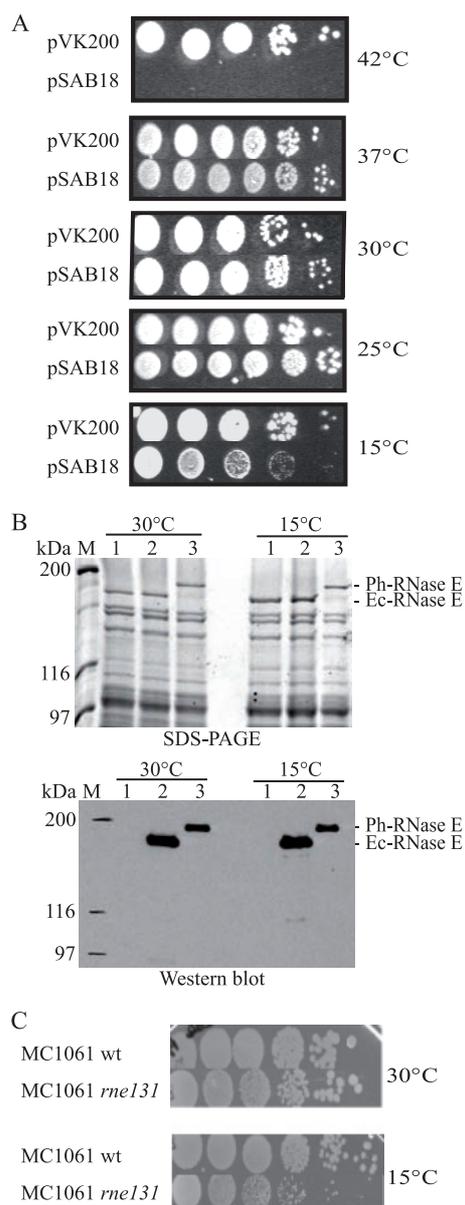


FIG. 4. Complementation of KSL2000, expression of Ph-RNase E at 30 and 15°C, and growth of the MC1061 *rne131* strain at 15°C. (A) Complementation of the KSL2000 strain (the chromosomal gene encoding Ec-RNase E was disrupted) by a plasmid expressing FLAG-tagged Ph-RNase E (pSAB18). Serial dilutions (10-fold) were spotted on LB plates and grown at the indicated temperatures for times ranging from 1 day (37 and 42°C) to 10 days (15°C). (B) SDS-PAGE stained with Sypro orange and Western blotting using anti-FLAG antibodies. Lane 1, KSL2000 complemented with pAM-*rne* (Ec-RNase E without FLAG); lane 2, pVK200 (Ec-RNase E with FLAG); and lane 3, pSAB18 (Ph-RNase E with FLAG). M, molecular mass markers. (C) Growth of MC1061 (wild type [wt], AC21) and the *rne131* derivative (AC27) at 30 and 15°C (10-fold serial dilutions).

This protein was identified as Ec-RhIB by Western blotting (data not shown) and by repeating the experiment using a strain of *E. coli* (SVK446) in which the gene encoding RhIB was disrupted (Fig. 5B). The absence of the band corresponding to Ec-RhIB in lane 2 (Ec-RNase E) and lane 3 (Ph-RNase

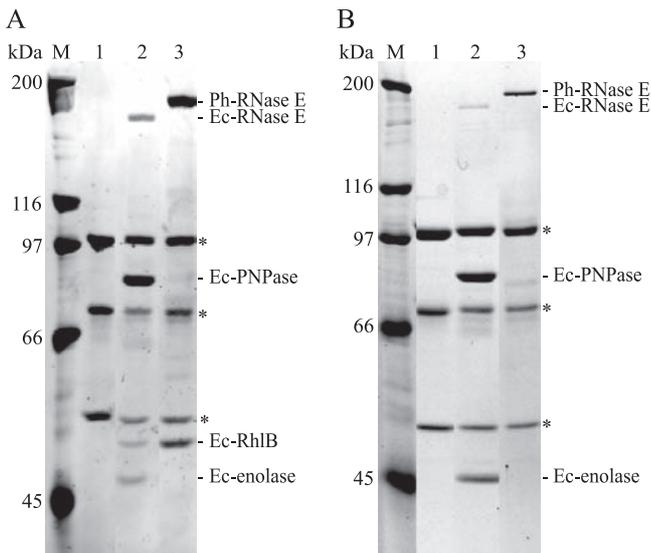


FIG. 5. Ph-RNase E expressed in *E. coli* interacts with Ec-RhlB. SDS-PAGE stained with Sypro orange. (A) Immunoprecipitations were performed as shown in Fig. 2. Lane 1, KSL2000 complemented with pAM-*me* (Ec-RNase E without FLAG); lane 2, pVK200 (Ec-RNase E with FLAG); and lane 3, pSAB18 (Ph-RNase E with FLAG). M, molecular mass markers. The asterisks indicate subunits of pyruvate dehydrogenase, which interacts adventitiously with the FLAG antibody. (B) The experiment shown in panel A was repeated using a strain (SVK446) in which the gene encoding RhlB was disrupted.

E) confirms that the protein associated with Ph-RNase E is Ec-RhlB. Taken together, these results show that Ph-RNase E makes a heterologous interaction with Ec-RhlB but not Ec-PNPase or Ec-enolase.

Identification of the RhlB binding site in Ph-RNase E. In order to identify the helicase binding site (HBS) in Ph-RNase E, we aligned the sequences of RNase E homologs from the *Alteromonadales*, the order of bacteria that includes *P. haloplanktis*. We identified a motif located in the same region as the HBS of RNase E homologs from the *Enterobacteriales* that is related by sequence (Fig. 6A). These motifs have in common a core of 13 residues, with 5 positions that are strictly conserved. To test if the motif identified in Ph-RNase E is necessary for RhlB binding, we deleted the corresponding region in pSAB18 to create pSAB29. The deletion corresponds to the boxed sequence in Fig. 6A. Figure 6B shows that the deletion results in the loss of the immunoprecipitation of RhlB with Ph-RNase E (compare lanes 1 and 2). From this result, we conclude that the sequence motif identified in Fig. 5A corresponds to the microdomain necessary for the heterologous protein-protein interaction between Ec-RhlB and Ph-RNase E.

Identification of the PNPase binding site in Ph-RNase E. Using the same approach that led to the identification of the HBS, we failed to identify a sequence motif in the RNase E homologs of the *Alteromonadales* that was related to the PNPase binding site (PBS) of Ec-RNase E. Since the PBS is located in the C-terminal region of Ec-RNase E and since this region in Ph-RNase E is predicted to have the propensity to form secondary structure (Fig. 1B, region 3), we decided to construct a series of nested deletions extending from the C-terminal end into the protein. The protein interaction was tested *in vitro*

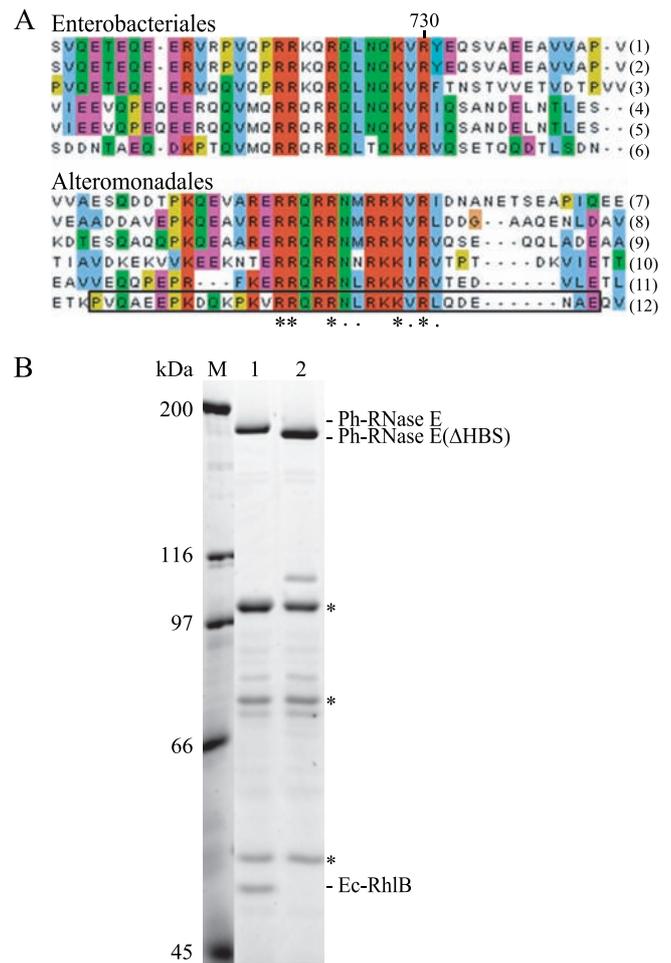


FIG. 6. Identification of the RhlB binding site of Ph-RNase E. (A) Sequence alignment of the HBSs in homologs from the *Enterobacteriales* (top) and the corresponding regions in homologs from the *Alteromonadales* (bottom). The asterisks indicate residues that are conserved; the dots indicate residues that are similar. The homologs used in these alignments correspond to *Escherichia coli* (1), *Shigella boydii* Sb227 (2), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (3), *Yersinia pseudotuberculosis* IP 31758 (4), *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* SCRI1043 (5), *Yersinia pestis* Antiqua (6), *Shewanella* sp. ANA-3 (7), *Shewanella amazonensis* SB2B (8), *Shewanella* sp. PV-4 (9), *Colwellia psychrerythraea* 34H (10), *Pseudoalteromonas tunicata* D2 (11), and *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 (12). The deletion of the region corresponding to the motif identified in Ph-RNase E in pSAB18 to create pSAB29 corresponds to the boxed sequence. (B) SDS-PAGE stained with Sypro orange. Immunoprecipitations were performed as shown in Fig. 2. Lane 1, pSAB18 (Ph-RNase E with FLAG); lane 2, pSAB29, which expresses a variant of Ph-RNase E deleted from residues 684 to 716 (boxed in panel A, last line). M, molecular mass markers. The asterisks correspond to the subunits of pyruvate dehydrogenase, which interacts adventitiously with the FLAG antibody.

using an N-terminal His-tagged derivative corresponding to the noncatalytic C-terminal half (CTH) of Ph-RNase E (Fig. 7A). We showed previously that the Ec-CTH interacts with Ec-PNPase *in vitro* to form a complex that can be purified using a His tag (27). In the experiment performed here, the Ph-CTH was overexpressed in *E. coli* and purified by affinity chromatography. The resin with the bound Ph-CTH was then incubated with a whole-cell extract prepared from *P. haloplanktis*,

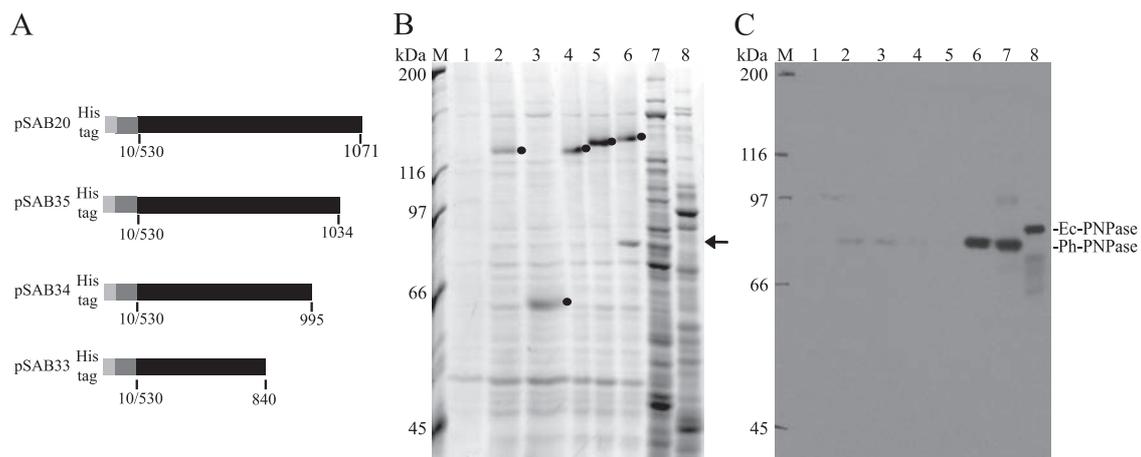


FIG. 7. Interaction between Ph-RNase E and Ph-PNPase. (A) Schematic diagram of His-tagged polypeptides corresponding to the CTH of Ph-RNase E (pSAB20) and a nested set of deletions extending from the C-terminal end (pSAB35, pSAB34, and pSAB33). (B) SDS-PAGE stained with Sypro orange of proteins that copurify with the His-tagged CTH peptides. Lane 1, negative control without His-tagged polypeptide; lane 2, control using the His-tagged CTH of Ec-RNase E; lanes 3 to 6, pSAB33, pSAB34, pSAB35, and pSAB20, respectively; lanes 7 and 8, controls showing *P. haloplanktis* and *E. coli* whole-cell extracts, respectively. M, molecular mass markers. The black dots in lanes 2 to 6 indicate the positions of the His-tagged polypeptides. The arrow to the right of the panel indicates the position of a protein in lane 6 that copurifies with the CTH of Ph-RNase E and migrates at a position corresponding to the molecular mass of Ph-PNPase. (C) Western blot. A gel comparable to the gel shown in panel B was blotted and probed with antibodies against Ec-PNPase. The major signal detected in lane 8 corresponds to Ec-PNPase, which runs as a slightly larger protein than Ph-PNPase (lanes 6 and 7).

washed, and eluted with imidazole. Figure 7B shows SDS-PAGE of the eluates. Lane 1 shows a negative control with a mock reaction that did not contain the CTH, lane 2 shows the result using the Ec-CTH, and lane 6 shows the result using the Ph-CTH. In lane 6, a protein of about 80 kDa copurified with Ph-CTH (indicated by the arrow). Western blotting identified the protein in lane 6 of Fig. 7B as Ph-PNPase (Fig. 7C). In this Western blot, trace amounts of Ph-PNPase were detected in lanes 2 and 3, but this result, which is not reproducible, is likely due to incomplete removal during the wash step. Taken together, these results suggest that the interaction of PNPase and RNase E is species specific. This conclusion is supported by the *in vivo* results shown in Fig. 5, in which we failed to detect an interaction between Ec-PNPase and Ph-RNase E. Each of the deletions (Fig. 7B, lanes 3 to 5) failed to interact with Ph-PNPase, demonstrating that residues 1035 to 1071 of Ph-RNase E are necessary for the interaction with Ph-PNPase. In subsequent work, we overexpressed Ph-PNPase at 25°C in an *E. coli* strain in which the gene encoding Ec-PNPase was disrupted, and we prepared a highly enriched fraction of Ph-PNPase by high-speed centrifugation and ammonium sulfate precipitation. For unknown reasons, we have not been able to demonstrate specific binding to the Ph-CTH using purified Ph-PNPase. Our results therefore need to be interpreted with caution, since we lack proof that Ph-PNPase by itself is sufficient for the interaction with Ph-RNase E.

DISCUSSION

We report here the identification of the RNA degradosome of *P. haloplanktis* and the characterization of microdomains in Ph-RNase E involved in the protein-protein interactions. We have also shown that Ph-RNase E can restore the viability of *E. coli* strains lacking Ec-RNase E. The introduction of the *Ph-me*

gene on a low-copy-number plasmid (pSAB15) into *E. coli* in which the chromosomal *Ec-me* gene was disrupted resulted in weak complementation, with detectable colony formation only after 6 days at 25°C. Analysis of Ph-RNase E in this strain showed that the amount was at least 32-fold lower than the normal amount of Ec-RNase E. Thus, the *Ph-me* gene under endogenous expression signals is poorly expressed in *E. coli*. To improve expression of Ph-RNase E in *E. coli*, we constructed a hybrid gene in which the 5' expression signals of the *Ec-me* gene were fused to the coding sequence of *Ph-me*. The resulting fusion on a low-copy-number plasmid (pSAB18) complemented *E. coli* at temperatures ranging from 15 to 37°C. The amount of Ph-RNase E in this strain is about 50% of the normal amount of Ec-RNase E. Taken together, these results show that the poor complementation with the *Ph-me* gene is due to the low level of Ph-RNase E expression in *E. coli*.

Since Ph-RNase E is obtained from a psychrotolerant bacterium, we were surprised to observe that complementation in *E. coli* at 15°C is weak compared to that of the Ec-RNase E control. We have presented experimental evidence that the amount of Ph-RNase E detected at 15°C is comparable to the amount detected at 30°C. Since the endoribonuclease activity of Ph-RNase E is expected to be comparable to or higher than the activity of Ec-RNase E at 15°C, this result suggests that Ph-RNase E fails to supply a noncatalytic function necessary for growth in the cold. In addition, we have shown that the *E. coli* MC1061 strain harboring the *me131* allele, expressing Ec-RNase E lacking the noncatalytic region (32), grows slower than the parental MC1061 strain at 15°C. These results suggest that the noncatalytic region of Ec-RNase E provides a function that facilitates growth at low temperature. This function could, for example, involve the interaction between Ec-RNase E and a protein component of the RNA degradosome.

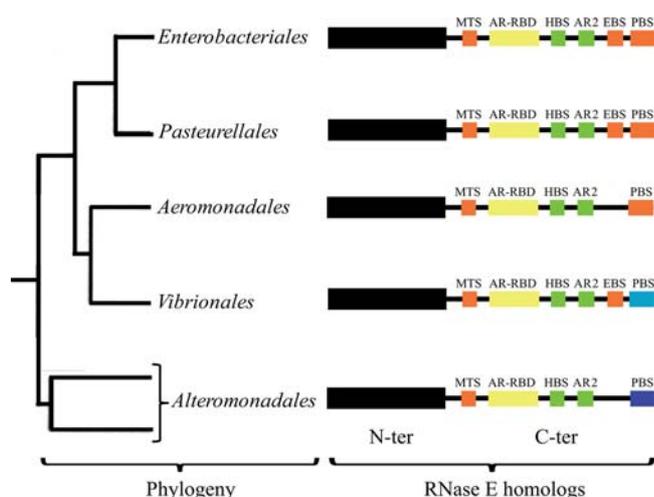


FIG. 8. Primary structure of RNase E homologs in the *Enterobacteriales*, *Pasteurellales*, *Aeromonadales*, *Vibrionales*, and *Alteromonadales*. The tree on the left shows in outline form the relationship of five orders of the *Gammaproteobacteria* (17). The schematic diagrams on the right summarize our understanding of the primary structures of the RNase E homologs of each of these orders. The N-terminal catalytic domain is represented as a black box; the C-terminal noncatalytic region is represented as a line. Microdomains are represented as colored boxes following the scheme described in the legend to Fig. 1. The RNase E homologs of the *Aeromonadales* have a PNPase binding site similar to the homologs from the *Enterobacteriales* and *Pasteurellales* but lack identifiable enolase binding sites based on sequence comparisons. For the RNase E homologs of the *Vibrionales* and *Alteromonadales*, the light and dark blue boxes, respectively, represent PNPase binding sites that are unrelated by sequence to each other or to the corresponding sites in homologs from the *Enterobacteriales* and *Pasteurellales*.

The noncatalytic region of Ec-RNase E contains two well-characterized microdomains that are involved in protein-protein interactions with enolase and PNPase. The structures of these microdomains complexed with their partner proteins have been elucidated by X-ray crystallography. The microdomain involved in enolase binding forms an α -helix that makes an extensive network of hydrogen-bonding interactions at the enolase dimer interface (8). The sequence motif corresponding to the microdomain involved in enolase binding is conserved throughout the *Enterobacteriales*. A recent analysis of *Vibrio angustum* S14, a member of the *Vibrionales*, involving sequence comparisons and two hybrid tests has demonstrated the conservation of the EBS in RNase E homologs of these bacteria (16). Taken together with our results, we can predict that the EBS is conserved in RNase E homologs of the *Enterobacteriales*, *Pasteurellales*, and *Vibrionales* but absent in the *Aeromonadales*, *Alteromonadales*, and more distantly related *Gammaproteobacteria* (Fig. 8). These observations suggest that the interaction with enolase was acquired during the evolution of the *Gammaproteobacteria*. The association of enolase with RNase E in the *Enterobacteriales* could link the mRNA degradation machinery to the control of central intermediary metabolism. *P. haloplanktis* inhabits a marine environment that is poor in sources of carbon, nitrogen, and phosphorus. It notably lacks the cyclic AMP-catabolite gene activator protein (cAMP-CAP) system responsible for catabolite repression and the phosphotransferase system (PTS) required for the transport of

glucose (39). The association of enolase with RNase E in *E. coli* might therefore be an adaptation to a niche such as the animal gut, where nutrient levels vary dramatically and rapid adjustments in the control of nutrient uptake and utilization give a competitive advantage.

The microdomain of Ec-RNase E involved in the protein-protein interaction with Ec-PNPase extends a preexisting β -sheet on the surface of PNPase (43). β -sheet extension has been suggested as a potentially common element in protein-protein interactions (49). The RNase E-PNPase interaction appears to be widespread in the *Proteobacteria*. Our results, however, suggest that the interaction is species specific. That is, Ec-RNase E binds Ec-PNPase but not Ph-PNPase, and Ph-RNase E binds Ph-PNPase but not Ec-PNPase. Our results, together with the recent two-hybrid analysis of the RNase E-PNPase interaction between *Vibrio angustum* S14 homologs (16), shows that this interaction does not correspond to a sequence motif conserved among the *Alteromonadales* or the *Vibrionales*. Since the interaction is species specific, one possibility is that the underlying structural motif for the interaction is different in different bacteria, although this seems unlikely. Another possibility is that the secondary structure involved in β -sheet extension is conserved but that the constraint on protein sequence of the RNase E microdomains involved in β -sheet extension is low. These considerations suggest that the species-specific RNase E-PNPase interaction could involve a conserved β -sheet extension that imposes minimal constraints on the protein sequence.

PNPase is a phosphate-dependent exoribonuclease. Although PNPase has been found to be associated with RNase E in several different bacteria, this is not always the case. Notably, RNase E of the psychrophilic gammaproteobacterium *Pseudomonas syringae* Lz4W has been shown to be associated with RNase R, which is a hydrolytic exoribonuclease (46). Exoribonucleases related to PNPase and RNase R are widely distributed in bacteria, plants, and animals (13, 40). These enzymes represent two distinct families of exoribonucleases. Like *P. haloplanktis*, *Pseudomonas syringae* Lz4W is a cold-adapted marine gammaproteobacterium (50). Since both of these bacteria inhabit similar environmental niches, the formation of an RNA degradosome with a phosphorolytic rather than hydrolytic exoribonuclease does not appear to correlate with the conditions of growth in a cold marine environment.

Our results show that the Ph-RhlB interacts with Ph-RNase E as a component of the RNA degradosome of *P. haloplanktis*. In Ec-RNase E, the minimal binding site for RhlB has been mapped to the region comprising residues 698 to 762 (9), and a sequence motif within the region is well conserved in the *Enterobacteriales* (Fig. 6A). The substitution of a highly conserved arginine residue in this motif for alanine (R730A) abolishes RhlB binding (27). Ph-RNase E contains a related sequence motif in the same region, which includes a conserved arginine residue corresponding to R730. We have shown that deletion of the region corresponding to the motif abolishes the interaction between Ph-RNase E and Ec-RhlB. In Fig. 1C, region 1, corresponding to residues 747 to 758 of Ph-RNase E, is predicted to have the capacity to form secondary structure. We mapped the Ph-HBS to residues 683 to 716. Thus, the region predicted to have the capacity to form secondary structure and the region necessary for binding to RhlB are distinct.

Like other DEAD-box RNA helicases, the catalytic core of RhlB is comprised of two structurally related domains. The second domain of RhlB has been shown to be necessary and sufficient for the interaction with RNase E (9). The surface of RhlB involved in this interaction and the structure of the microdomain corresponding to the binding site in RNase E have not yet been elucidated (see reference 56). The heterologous interaction of Ec-RhlB with Ph-RNase E suggests that the underlying structural motif for the protein-protein interaction is conserved over a large evolutionary distance. Experimental evidence has shown that RhlB needs to interact with RNase E as part of the RNA degradosome to have biological activity (24, 26). The interaction with RNase E activates the ATPase and RNA unwinding activities of RhlB (9, 27, 53, 56). These considerations suggest that the conservation of the RhlB binding site over a large evolutionary distance could be due to structural constraints involved in the control of RhlB activity.

Figure 8 shows a simplified phylogenetic tree of the *Enterobacteriales*, *Pasteurellales*, *Aeromonadales*, *Vibrionales*, and *Alteromonadales* (17) and summarizes our understanding of the primary structure of the RNase E homologs in these orders of the *Gammaproteobacteria*. The identification of the RNA degradosome of *P. haloplanktis* has revealed two widely conserved interactions with RNase E homologs of the *Gammaproteobacteria*. Although the interaction is conserved, the PNPase binding site (PBS) does not correspond to a conserved sequence motif. The light and dark blue boxes for the RNase E homologs of the *Vibrionales* and the *Alteromonadales*, respectively, indicate that the protein sequences of the PBSs are distinct from the sequences in the homologs of the *Enterobacteriales*, *Pasteurellales*, and *Aeromonadales*. The binding site for RhlB (HBS) corresponds to a conserved sequence motif. Despite the lack of overall sequence conservation of the CTH of the RNase E homologs, our result suggests that there is nevertheless a conserved "module" composed of the MTS, AR-RBD, HBS, and AR2. Based on experimental results, we suggested previously that the AR-RBD and AR2 cooperate in the RNA unwinding activity of RhlB (9). The conservation of the MTS/AR-RBD/HBS/AR2 module over a relatively large evolutionary distance suggests an important conserved function, which for example, could be the control of the activity or specificity of RhlB within the RNA degradosome.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank I. Bagdiul, M. Dreyfus, and V. Khemici for providing the plasmids and strains; members of the Carpousis group, M. Dreyfus and B. Luisi, for helpful discussions; and B. Clouet-d'Orval and P. Genevaux for critical reading of the manuscript.

S.A.-B. was supported by a predoctoral fellowship from the MESR (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche). Research in our group is supported by the CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) and the ANR (Agence Nationale de la Recherche, projects CARMa NT05_1-44659 and mRNases BLAN08-1_329396).

REFERENCES

- Birolo, L., M. L. Tutino, B. Fontanella, C. Gerday, K. Mainolfi, S. Pascarella, G. Sannia, F. Vinci, and G. Marino. 2000. Aspartate aminotransferase from the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125. Cloning, expression, properties, and molecular modelling. *Eur. J. Biochem.* **267**:2790–2802.
- Callaghan, A. J., J. P. Aurikko, L. L. Ilag, J. Gunter Grossmann, V. Chandran, K. Kuhnelt, L. Poljak, A. J. Carpousis, C. V. Robinson, M. F. Symmons, and B. F. Luisi. 2004. Studies of the RNA degradosome-organizing domain of the *Escherichia coli* ribonuclease RNase E. *J. Mol. Biol.* **340**:965–979.
- Callaghan, A. J., M. J. Marcaida, J. A. Stead, K. J. McDowall, W. G. Scott, and B. F. Luisi. 2005. Structure of *Escherichia coli* RNase E catalytic domain and implications for RNA turnover. *Nature* **437**:1187–1191.
- Carpousis, A. J. 2002. The *Escherichia coli* RNA degradosome: structure, function and relationship to other ribonucleolytic multienzyme complexes. *Biochem. Soc. Trans.* **30**:150–155.
- Carpousis, A. J., V. Khemici, S. Ait-Bara, and L. Poljak. 2008. Co-immunopurification of multiprotein complexes containing RNA-degrading enzymes. *Methods Enzymol.* **447**:65–82.
- Carpousis, A. J., B. F. Luisi, and K. J. McDowall. 2009. Endonucleolytic initiation of mRNA decay in *Escherichia coli*. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **85**:91–135.
- Carpousis, A. J., G. Van Houwe, C. Ehretsmann, and H. M. Krisch. 1994. Copurification of *E. coli* RNAase E and PNPase: evidence for a specific association between two enzymes important in RNA processing and degradation. *Cell* **76**:889–900.
- Chandran, V., and B. F. Luisi. 2006. Recognition of enolase in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *J. Mol. Biol.* **358**:8–15.
- Chandran, V., L. Poljak, N. F. Vanzo, A. Leroy, R. N. Miguel, J. Fernandez-Recio, J. Parkinson, C. Burns, A. J. Carpousis, and B. F. Luisi. 2007. Recognition and cooperation between the ATP-dependent RNA helicase RhlB and ribonuclease RNase E. *J. Mol. Biol.* **367**:113–132.
- Chenna, R., H. Sugawara, T. Koike, R. Lopez, T. J. Gibson, D. G. Higgins, and J. D. Thompson. 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.* **31**:3497–3500.
- Clamp, M., J. Cuff, S. M. Searle, and G. J. Barton. 2004. The Jalview Java alignment editor. *Bioinformatics* **20**:426–427.
- Coburn, G. A., and G. A. Mackie. 1999. Degradation of mRNA in *Escherichia coli*: an old problem with some new twists. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **62**:55–108.
- Condon, C., and H. Putzer. 2002. The phylogenetic distribution of bacterial ribonucleases. *Nucleic Acids Res.* **30**:5339–5346.
- Deutscher, M. P. 2006. Degradation of RNA in bacteria: comparison of mRNA and stable RNA. *Nucleic Acids Res.* **34**:659–666.
- Duilio, A., S. Madonna, M. L. Tutino, M. Pirozzi, G. Sannia, and G. Marino. 2004. Promoters from a cold-adapted bacterium: definition of a consensus motif and molecular characterization of UP regulative elements. *Extremophiles* **8**:125–132.
- Erce, M. A., J. K. Low, P. E. March, M. R. Wilkins, and K. M. Takayama. 2009. Identification and functional analysis of RNase E of *Vibrio angustum* S14 and two-hybrid analysis of its interaction partners. *Biochim. Biophys. Acta* **1794**:1107–1114.
- Gao, B., R. Mohan, and R. S. Gupta. 2009. Phylogenomics and protein signatures elucidating the evolutionary relationships among the *Gammaproteobacteria*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**:234–247.
- Gao, J., K. Lee, M. Zhao, J. Qiu, X. Zhan, A. Saxena, C. J. Moore, S. N. Cohen, and G. Georgiou. 2006. Differential modulation of *E. coli* mRNA abundance by inhibitory proteins that alter the composition of the degradosome. *Mol. Microbiol.* **61**:394–406.
- Grunberg-Manago, M. 1999. Messenger RNA stability and its role in control of gene expression in bacteria and phages. *Annu. Rev. Genet.* **33**:193–227.
- Jager, S., O. Fuhrmann, C. Heck, M. Hebermehl, E. Schiltz, R. Rauhut, and G. Klug. 2001. An mRNA degrading complex in *Rhodobacter capsulatus*. *Nucleic Acids Res.* **29**:4581–4588.
- Jager, S., M. Hebermehl, E. Schiltz, and G. Klug. 2004. Composition and activity of the *Rhodobacter capsulatus* degradosome vary under different oxygen concentrations. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **7**:148–154.
- Jain, C., and J. G. Belasco. 1995. RNase E autoregulates its synthesis by controlling the degradation rate of its own mRNA in *Escherichia coli*: unusual sensitivity of the *rne* transcript to RNase E activity. *Genes Dev.* **9**:84–96.
- Kaberdin, V. R., A. Miczak, J. S. Jakobsen, S. Lin-Chao, K. J. McDowall, and A. von Gabain. 1998. The endoribonucleolytic N-terminal half of *Escherichia coli* RNase E is evolutionarily conserved in *Synechocystis* sp. and other bacteria but not the C-terminal half, which is sufficient for degradosome assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**:11637–11642.
- Khemici, V., and A. J. Carpousis. 2004. The RNA degradosome and poly(A) polymerase of *Escherichia coli* are required *in vivo* for the degradation of small mRNA decay intermediates containing REP-stabilizers. *Mol. Microbiol.* **51**:777–790.
- Khemici, V., L. Poljak, B. F. Luisi, and A. J. Carpousis. 2008. The RNase E of *Escherichia coli* is a membrane-binding protein. *Mol. Microbiol.* **70**:799–813.
- Khemici, V., L. Poljak, I. Toesca, and A. J. Carpousis. 2005. Evidence *in vivo* that the DEAD-box RNA helicase RhlB facilitates the degradation of ribosome-free mRNA by RNase E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**:6913–6918.
- Khemici, V., I. Toesca, L. Poljak, N. F. Vanzo, and A. J. Carpousis. 2004. The RNase E of *Escherichia coli* has at least two binding sites for DEAD-box

- RNA helicases: functional replacement of RhlB by RhlE. *Mol. Microbiol.* **54**:1422–1430.
28. **Kushner, S. R.** 2002. mRNA decay in *Escherichia coli* comes of age. *J. Bacteriol.* **184**:4658–4665.
 29. **Lee, K., J. A. Bernstein, and S. N. Cohen.** 2002. RNase G complementation of rne null mutation identifies functional interrelationships with RNase E in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **43**:1445–1456.
 30. **Lee, K., and S. N. Cohen.** 2003. A *Streptomyces coelicolor* functional orthologue of *Escherichia coli* RNase E shows shuffling of catalytic and PNPase-binding domains. *Mol. Microbiol.* **48**:349–360.
 31. **Lee, K., X. Zhan, J. Gao, J. Qiu, Y. Feng, R. Meganathan, S. N. Cohen, and G. Georgiou.** 2003. RraA: a protein inhibitor of RNase E activity that globally modulates RNA abundance in *E. coli*. *Cell* **114**:623–634.
 32. **Leroy, A., N. F. Vanzo, S. Sousa, M. Dreyfus, and A. J. Carpousis.** 2002. Function in *Escherichia coli* of the non-catalytic part of RNase E: role in the degradation of ribosome-free mRNA. *Mol. Microbiol.* **45**:1231–1243.
 33. **Li, X., P. Romero, M. Rani, A. K. Dunker, and Z. Obradovic.** 1999. Predicting protein disorder for N-, C-, and internal regions. *Genome Inform. Ser. Workshop Genome Inform.* **10**:30–40.
 34. **Li, Z., S. Pandit, and M. P. Deutscher.** 1999. RNase G (CafA protein) and RNase E are both required for the 5' maturation of 16S ribosomal RNA. *EMBO J.* **18**:2878–2885.
 35. **Lopez, P. J., I. Marchand, S. A. Joyce, and M. Dreyfus.** 1999. The C-terminal half of RNase E, which organizes the *Escherichia coli* degradosome, participates in mRNA degradation but not rRNA processing *in vivo*. *Mol. Microbiol.* **33**:188–199.
 36. **Mackie, G. A.** 1998. Ribonuclease E is a 5'-end-dependent endonuclease. *Nature* **395**:720–723.
 37. **Marcaida, M. J., M. A. DePristo, V. Chandran, A. J. Carpousis, and B. F. Luisi.** 2006. The RNA degradosome: life in the fast lane of adaptive molecular evolution. *Trends Biochem. Sci.* **31**:359–365.
 38. **McDowall, K. J., and S. N. Cohen.** 1996. The N-terminal domain of the rne gene product has RNase E activity and is non-overlapping with the arginine-rich RNA-binding site. *J. Mol. Biol.* **255**:349–355.
 39. **Medigue, C., E. Krin, G. Pascal, V. Barbe, A. Bernsel, P. N. Bertin, F. Cheung, S. Cruveiller, S. D'Amico, A. Duilio, G. Fang, G. Feller, C. Ho, S. Mangenot, G. Marino, J. Nilsson, E. Parrilli, E. P. Rocha, Z. Rouy, A. Sekowska, M. L. Tutino, D. Vallenet, G. von Heijne, and A. Danchin.** 2005. Coping with cold: the genome of the versatile marine Antarctica bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Genome Res.* **15**:1325–1335.
 40. **Mian, I. S.** 1997. Comparative sequence analysis of ribonucleases HII, III, II PH and D. *Nucleic Acids Res.* **25**:3187–3195.
 41. **Miczak, A., V. R. Kaberdin, C. L. Wei, and S. Lin-Chao.** 1996. Proteins associated with RNase E in a multicomponent ribonucleolytic complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**:3865–3869.
 42. **Morita, T., K. Maki, and H. Aiba.** 2005. RNase E-based ribonucleoprotein complexes: mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. *Genes Dev.* **19**:2176–2186.
 43. **Nurmohamed, S., B. Vaidialingam, A. J. Callaghan, and B. F. Luisi.** 2009. Crystal structure of *Escherichia coli* polynucleotide phosphorylase core bound to RNase E, RNA and manganese: implications for catalytic mechanism and RNA degradosome assembly. *J. Mol. Biol.* **389**:17–33.
 44. **Ow, M. C., Q. Liu, and S. R. Kushner.** 2000. Analysis of mRNA decay and rRNA processing in *Escherichia coli* in the absence of RNase E-based degradosome assembly. *Mol. Microbiol.* **38**:854–866.
 45. **Prud'homme-Genereux, A., R. K. Beran, I. Iost, C. S. Ramey, G. A. Mackie, and R. W. Simons.** 2004. Physical and functional interactions among RNase E, polynucleotide phosphorylase and the cold-shock protein, CsdA: evidence for a 'cold shock degradosome.' *Mol. Microbiol.* **54**:1409–1421.
 46. **Purusharth, R. I., F. Klein, S. Sulthana, S. Jager, M. V. Jagannadham, E. Evgenieva-Hackenberg, M. K. Ray, and G. Klug.** 2005. Exoribonuclease R interacts with endoribonuclease E and an RNA helicase in the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas syringae* Lz4W. *J. Biol. Chem.* **280**:14572–14578.
 47. **Py, B., C. F. Higgins, H. M. Krisch, and A. J. Carpousis.** 1996. A DEAD-box RNA helicase in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Nature* **381**:169–172.
 48. **Regonesi, M. E., M. Del Favero, F. Basilico, F. Briani, L. Benazzi, P. Tortora, P. Mauri, and G. Deho.** 2006. Analysis of the *Escherichia coli* RNA degradosome composition by a proteomic approach. *Biochimie* **88**:151–161.
 49. **Remaut, H., and G. Waksman.** 2006. Protein-protein interaction through beta-strand addition. *Trends Biochem. Sci.* **31**:436–444.
 50. **Shivaji, S., N. S. Rao, L. Saisree, V. Sheth, G. S. Reddy, and P. M. Bhargava.** 1989. Isolation and identification of *Pseudomonas* spp. from Schirmacher Oasis, Antarctica. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:767–770.
 51. **Taraseviciene, L., G. R. Bjork, and B. E. Uhlin.** 1995. Evidence for an RNA binding region in the *Escherichia coli* processing endoribonuclease RNase E. *J. Biol. Chem.* **270**:26391–26398.
 52. **Tock, M. R., A. P. Walsh, G. Carroll, and K. J. McDowall.** 2000. The CafA protein required for the 5'-maturation of 16 S rRNA is a 5'-end-dependent ribonuclease that has context-dependent broad sequence specificity. *J. Biol. Chem.* **275**:8726–8732.
 53. **Vanzo, N. F., Y. S. Li, B. Py, E. Blum, C. F. Higgins, L. C. Raynal, H. M. Krisch, and A. J. Carpousis.** 1998. Ribonuclease E organizes the protein interactions in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Genes Dev.* **12**:2770–2781.
 54. **Wachi, M., G. Umitsuki, M. Shimizu, A. Takada, and K. Nagai.** 1999. *Escherichia coli* cafA gene encodes a novel RNase, designated as RNase G, involved in processing of the 5' end of 16S rRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **259**:483–488.
 55. **Worrall, J. A., M. Gorna, N. T. Crump, L. G. Phillips, A. C. Tuck, A. J. Price, V. N. Bavro, and B. F. Luisi.** 2008. Reconstitution and analysis of the multienzyme *Escherichia coli* RNA degradosome. *J. Mol. Biol.* **382**:870–883.
 56. **Worrall, J. A., F. S. Howe, A. R. McKay, C. V. Robinson, and B. F. Luisi.** 2008. Allosteric activation of the ATPase activity of the *Escherichia coli* RhlB RNA helicase. *J. Biol. Chem.* **283**:5567–5576.

Bibliographie

- Abdel-Mawgoud, A. M., F. Lepine & E. Deziel, (2010) Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**: 1323-1336.
- Ait-Bara, S. & A. J. Carpousis, (2010) Characterization of the RNA degradosome of *Pseudoalteromonas haloplanktis*: conservation of the RNase E-RhlB interaction in the {gamma}-Proteobacteria. *J Bacteriol.*
- Andrade, J. M. & C. M. Arraiano, (2008) PNPase is a key player in the regulation of small RNAs that control the expression of outer membrane proteins. *RNA* **14**: 543-551.
- Apirion, D., (1978) Isolation, genetic mapping and some characterization of a mutation in *Escherichia coli* that affects the processing of ribonucleic acid. *Genetics* **90**: 659-671.
- Arraiano, C. M., J. M. Andrade, S. Domingues, I. B. Guinote, M. Malecki, R. G. Matos, R. N. Moreira, V. Pobre, F. P. Reis, M. Saramago, I. J. Silva & S. C. Viegas, (2010) The critical role of RNA processing and degradation in the control of gene expression. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 883-923.
- Babitzke, P. & S. R. Kushner, (1991) The Ams (altered mRNA stability) protein and ribonuclease E are encoded by the same structural gene of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 1-5.
- Baginsky, S. & W. Gruissem, (2001) Chloroplast mRNA 3'-end nuclease complex. *Methods Enzymol* **342**: 408-419.
- Bailey, T. L., N. Williams, C. Misleh & W. W. Li, (2006) MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic Acids Res* **34**: W369-373.
- Bernstein, J. A., P. H. Lin, S. N. Cohen & S. Lin-Chao, (2004) Global analysis of *Escherichia coli* RNA degradosome function using DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 2758-2763.
- Bessarab, D. A., V. R. Kaberdin, C. L. Wei, G. G. Liou & S. Lin-Chao, (1998) RNA components of *Escherichia coli* degradosome: evidence for rRNA decay. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 3157-3161.
- Birolo, L., M. L. Tutino, B. Fontanella, C. Gerday, K. Mainolfi, S. Pascarella, G. Sannia, F. Vinci & G. Marino, (2000) Aspartate aminotransferase from the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125. Cloning, expression, properties, and molecular modelling. *Eur J Biochem* **267**: 2790-2802.
- Blatny, J. M., T. Brautaset, H. C. Winther-Larsen, K. Haugan & S. Valla, (1997) Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon. *Appl Environ Microbiol* **63**: 370-379.
- Blum, E., B. Py, A. J. Carpousis & C. F. Higgins, (1997) Polyphosphate kinase is a component of the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Mol Microbiol* **26**: 387-398.
- Bonneau, F., J. Basquin, J. Ebert, E. Lorentzen & E. Conti, (2009) The yeast exosome functions as a macromolecular cage to channel RNA substrates for degradation. *Cell* **139**: 547-559.
- Briegleb, K. J., A. Baker & C. Jain, (2006) Identification and analysis of *Escherichia coli* ribonuclease E dominant-negative mutants. *Genetics* **172**: 7-15.
- Buell, C. R., V. Joardar, M. Lindeberg, J. Selengut, I. T. Paulsen, M. L. Gwinn, R. J. Dodson, R. T. Deboy, A. S. Durkin, J. F. Kolonay, R. Madupu, S. Daugherty, L. Brinkac, M. J. Beanan, D. H. Haft, W. C. Nelson, T. Davidsen, N. Zafar, L. Zhou, J. Liu, Q. Yuan, H. Khouri, N. Fedorova, B. Tran, D. Russell, K. Berry, T. Utterback, S. E. Van Aken, T. V. Feldblyum, M. D'Ascenzo, W. L. Deng, A. R. Ramos, J. R. Alfano, S. Cartinhour, A. K. Chatterjee, T. P. Delaney, S. G. Lazarowitz, G. B. Martin, D. J. Schneider, X. Tang, C. L. Bender, O. White, C. M. Fraser & A. Collmer, (2003) The complete genome sequence of the Arabidopsis and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 10181-10186.
- Butland, G., J. M. Peregrin-Alvarez, J. Li, W. Yang, X. Yang, V. Canadien, A. Starostine, D. Richards, B. Beattie, N. Krogan, M. Davey, J. Parkinson, J. Greenblatt & A. Emili, (2005) Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli*. *Nature* **433**: 531-537.

- Bycroft, M., T. J. Hubbard, M. Proctor, S. M. Freund & A. G. Murzin, (1997) The solution structure of the S1 RNA binding domain: a member of an ancient nucleic acid-binding fold. *Cell* **88**: 235-242.
- Cairrao, F., A. Cruz, H. Mori & C. M. Arraiano, (2003) Cold shock induction of RNase R and its role in the maturation of the quality control mediator SsrA/tmRNA. *Mol Microbiol* **50**: 1349-1360.
- Callaghan, A. J., J. P. Aurikko, L. L. Ilag, J. Gunter Grossmann, V. Chandran, K. Kuhnel, L. Poljak, A. J. Carpousis, C. V. Robinson, M. F. Symmons & B. F. Luisi, (2004) Studies of the RNA degradosome-organizing domain of the Escherichia coli ribonuclease RNase E. *J Mol Biol* **340**: 965-979.
- Callaghan, A. J., J. G. Grossmann, Y. U. Redko, L. L. Ilag, M. C. Moncrieffe, M. F. Symmons, C. V. Robinson, K. J. McDowall & B. F. Luisi, (2003) Quaternary structure and catalytic activity of the Escherichia coli ribonuclease E amino-terminal catalytic domain. *Biochemistry* **42**: 13848-13855.
- Callaghan, A. J., M. J. Marcaida, J. A. Stead, K. J. McDowall, W. G. Scott & B. F. Luisi, (2005a) Structure of Escherichia coli RNase E catalytic domain and implications for RNA turnover. *Nature* **437**: 1187-1191.
- Callaghan, A. J., Y. Redko, L. M. Murphy, J. G. Grossmann, D. Yates, E. Garman, L. L. Ilag, C. V. Robinson, M. F. Symmons, K. J. McDowall & B. F. Luisi, (2005b) "Zn-link": a metal-sharing interface that organizes the quaternary structure and catalytic site of the endoribonuclease, RNase E. *Biochemistry* **44**: 4667-4675.
- Carabetta, V. J., B. K. Mohanty, S. R. Kushner & T. J. Silhavy, (2009) The response regulator SprE (RssB) modulates polyadenylation and mRNA stability in Escherichia coli. *J Bacteriol* **191**: 6812-6821.
- Carabetta, V. J., T. J. Silhavy & I. M. Cristea, (2010) The response regulator SprE (RssB) is required for maintaining poly(A) polymerase I-degradosome association during stationary phase. *J Bacteriol* **192**: 3713-3721.
- Carpousis, A. J., (2002) The Escherichia coli RNA degradosome: structure, function and relationship to other ribonucleolytic multienzyme complexes. *Biochem Soc Trans* **30**: 150-155.
- Carpousis, A. J., (2007) The RNA degradosome of Escherichia coli: an mRNA-degrading machine assembled on RNase E. *Annu Rev Microbiol* **61**: 71-87.
- Carpousis, A. J., A. Leroy, N. Vanzo & V. Khemici, (2001) Escherichia coli RNA degradosome. *Methods Enzymol* **342**: 333-345.
- Carpousis, A. J., B. F. Luisi & K. J. McDowall, (2009) Endonucleolytic initiation of mRNA decay in Escherichia coli. *Prog Mol Biol Transl Sci* **85**: 91-135.
- Carpousis, A. J., G. Van Houwe, C. Ehretsmann & H. M. Krisch, (1994) Copurification of E. coli RNAase E and PNPase: evidence for a specific association between two enzymes important in RNA processing and degradation. *Cell* **76**: 889-900.
- Cartier, G., F. Lorieux, F. Allemand, M. Dreyfus & T. Bizebard, (2010) Cold adaptation in DEAD-box proteins. *Biochemistry* **49**: 2636-2646.
- Caruthers, J. M., Y. Feng, D. B. McKay & S. N. Cohen, (2006) Retention of core catalytic functions by a conserved minimal ribonuclease E peptide that lacks the domain required for tetramer formation. *J Biol Chem* **281**: 27046-27051.
- Celesnik, H., A. Deana & J. G. Belasco, (2007) Initiation of RNA decay in Escherichia coli by 5' pyrophosphate removal. *Mol Cell* **27**: 79-90.
- Chandran, V. & B. F. Luisi, (2006) Recognition of enolase in the Escherichia coli RNA degradosome. *J Mol Biol* **358**: 8-15.
- Chandran, V., L. Poljak, N. F. Vanzo, A. Leroy, R. N. Miguel, J. Fernandez-Recio, J. Parkinson, C. Burns, A. J. Carpousis & B. F. Luisi, (2007) Recognition and cooperation between the ATP-dependent RNA helicase RhlB and ribonuclease RNase E. *J Mol Biol* **367**: 113-132.
- Charollais, J., M. Dreyfus & I. Iost, (2004) CsdA, a cold-shock RNA helicase from Escherichia coli, is involved in the biogenesis of 50S ribosomal subunit. *Nucleic Acids Res* **32**: 2751-2759.
- Charollais, J., D. Pflieger, J. Vinh, M. Dreyfus & I. Iost, (2003) The DEAD-box RNA helicase SrmB is involved in the assembly of 50S ribosomal subunits in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **48**: 1253-1265.
- Cheng, Z. F. & M. P. Deutscher, (2003) Quality control of ribosomal RNA mediated by polynucleotide phosphorylase and RNase R. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 6388-6393.

- Cheng, Z. F. & M. P. Deutscher, (2005) An important role for RNase R in mRNA decay. *Mol Cell* **17**: 313-318.
- Chenna, R., H. Sugawara, T. Koike, R. Lopez, T. J. Gibson, D. G. Higgins & J. D. Thompson, (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* **31**: 3497-3500.
- Churchward, G., D. Belin & Y. Nagamine, (1984) A pSC101-derived plasmid which shows no sequence homology to other commonly used cloning vectors. *Gene* **31**: 165-171.
- Clamp, M., J. Cuff, S. M. Searle & G. J. Barton, (2004) The Jalview Java alignment editor. *Bioinformatics* **20**: 426-427.
- Claverie-Martin, F., M. R. Diaz-Torres, S. D. Yancey & S. R. Kushner, (1991) Analysis of the altered mRNA stability (ams) gene from Escherichia coli. Nucleotide sequence, transcriptional analysis, and homology of its product to MRP3, a mitochondrial ribosomal protein from Neurospora crassa. *J Biol Chem* **266**: 2843-2851.
- Clements, M. O., S. Eriksson, A. Thompson, S. Lucchini, J. C. Hinton, S. Normark & M. Rhen, (2002) Polynucleotide phosphorylase is a global regulator of virulence and persistency in Salmonella enterica. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 8784-8789.
- Clouet-d'Orval, B., D. Rinaldi, Y. Quentin & A. J. Carpousis, (2010) Euryarchaeal beta-CASP proteins with homology to bacterial RNase J Have 5'- to 3'-exoribonuclease activity. *J Biol Chem* **285**: 17574-17583.
- Coburn, G. A., X. Miao, D. J. Briant & G. A. Mackie, (1999) Reconstitution of a minimal RNA degradosome demonstrates functional coordination between a 3' exonuclease and a DEAD-box RNA helicase. *Genes Dev* **13**: 2594-2603.
- Combet, C., C. Blanchet, C. Geourjon & G. Deleage, (2000) NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem Sci* **25**: 147-150.
- Commichau, F. M., F. M. Rothe, C. Herzberg, E. Wagner, D. Hellwig, M. Lehnik-Habrink, E. Hammer, U. Volker & J. Stulke, (2009) Novel activities of glycolytic enzymes in Bacillus subtilis: interactions with essential proteins involved in mRNA processing. *Mol Cell Proteomics* **8**: 1350-1360.
- Condon, C., (2007) Maturation and degradation of RNA in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **10**: 271-278.
- Condon, C. & H. Putzer, (2002) The phylogenetic distribution of bacterial ribonucleases. *Nucleic Acids Res* **30**: 5339-5346.
- Cordin, O., J. Banroques, N. K. Tanner & P. Linder, (2006) The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene* **367**: 17-37.
- Cormack, R. S., J. L. Genereaux & G. A. Mackie, (1993) RNase E activity is conferred by a single polypeptide: overexpression, purification, and properties of the ams/rne/hmp1 gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 9006-9010.
- de la Sierra-Gallay, I. L., L. Zig, A. Jamalli & H. Putzer, (2008) Structural insights into the dual activity of RNase J. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 206-212.
- Deana, A., H. Celesnik & J. G. Belasco, (2008) The bacterial enzyme RppH triggers messenger RNA degradation by 5' pyrophosphate removal. *Nature* **451**: 355-358.
- Deutscher, M. P., G. T. Marshall & H. Cudny, (1988) RNase PH: an Escherichia coli phosphate-dependent nuclease distinct from polynucleotide phosphorylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 4710-4714.
- Diges, C. M. & O. C. Uhlenbeck, (2001) Escherichia coli DbpA is an RNA helicase that requires hairpin 92 of 23S rRNA. *EMBO J* **20**: 5503-5512.
- Diwa, A., A. L. Bricker, C. Jain & J. G. Belasco, (2000) An evolutionarily conserved RNA stem-loop functions as a sensor that directs feedback regulation of RNase E gene expression. *Genes Dev* **14**: 1249-1260.
- Diwa, A. A. & J. G. Belasco, (2002) Critical features of a conserved RNA stem-loop important for feedback regulation of RNase E synthesis. *J Biol Chem* **277**: 20415-20422.
- Diwa, A. A., X. Jiang, M. Schapira & J. G. Belasco, (2002) Two distinct regions on the surface of an RNA-binding domain are crucial for RNase E function. *Mol Microbiol* **46**: 959-969.
- Duilio, A., S. Madonna, M. L. Tutino, M. Pirozzi, G. Sannia & G. Marino, (2004) Promoters from a cold-adapted bacterium: definition of a consensus motif and molecular characterization of UP regulative elements. *Extremophiles* **8**: 125-132.

- Dziembowski, A., J. Piwowarski, R. Hoser, M. Minczuk, A. Dmochowska, M. Siep, H. van der Spek, L. Grivell & P. P. Stepien, (2003) The yeast mitochondrial degradosome. Its composition, interplay between RNA helicase and RNase activities and the role in mitochondrial RNA metabolism. *J Biol Chem* **278**: 1603-1611.
- Ehretsmann, C. P., A. J. Carpousis & H. M. Krisch, (1992) Specificity of Escherichia coli endoribonuclease RNase E: in vivo and in vitro analysis of mutants in a bacteriophage T4 mRNA processing site. *Genes Dev* **6**: 149-159.
- Erce, M. A., J. K. Low, P. E. March, M. R. Wilkins & K. M. Takayama, (2009) Identification and functional analysis of RNase E of Vibrio angustum S14 and two-hybrid analysis of its interaction partners. *Biochim Biophys Acta* **1794**: 1107-1114.
- Evangelista, G., P. Falasca, I. Ruggiero, M. Masullo & G. Raimo, (2009) Molecular and functional characterization of polynucleotide phosphorylase from the antarctic eubacterium Pseudoalteromonas haloplanktis. *Protein Pept Lett* **16**: 999-1005.
- Even, S., O. Pellegrini, L. Zig, V. Labas, J. Vinh, D. Brechemmier-Baey & H. Putzer, (2005) Ribonucleases J1 and J2: two novel endoribonucleases in B.subtilis with functional homology to E.coli RNase E. *Nucleic Acids Res* **33**: 2141-2152.
- Evguenieva-Hackenberg, E. & G. Klug, (2009) RNA degradation in Archaea and Gram-negative bacteria different from Escherichia coli. *Prog Mol Biol Transl Sci* **85**: 275-317.
- Evguenieva-Hackenberg, E., P. Walter, E. Hochleitner, F. Lottspeich & G. Klug, (2003) An exosome-like complex in Sulfolobus solfataricus. *EMBO Rep* **4**: 889-893.
- Fang, G., C. Ho, Y. Qiu, V. Cubas, Z. Yu, C. Cabau, F. Cheung, I. Moszer & A. Danchin, (2005) Specialized microbial databases for inductive exploration of microbial genome sequences. *BMC Genomics* **6**: 14.
- Feller, G., (2007) Life at low temperatures: is disorder the driving force? *Extremophiles* **11**: 211-216.
- Feller, G. & C. Gerday, (2003) Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nat Rev Microbiol* **1**: 200-208.
- Feng, Y., H. Huang, J. Liao & S. N. Cohen, (2001) Escherichia coli poly(A)-binding proteins that interact with components of degradosomes or impede RNA decay mediated by polynucleotide phosphorylase and RNase E. *J Biol Chem* **276**: 31651-31656.
- Feng, Y., T. A. Vickers & S. N. Cohen, (2002) The catalytic domain of RNase E shows inherent 3' to 5' directionality in cleavage site selection. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Ferrer, M., T. N. Chernikova, M. M. Yakimov, P. N. Golyshin & K. N. Timmis, (2003) Chaperonins govern growth of Escherichia coli at low temperatures. *Nat Biotechnol* **21**: 1266-1267.
- Galea, C. A., Y. Wang, S. G. Sivakolundu & R. W. Kriwacki, (2008) Regulation of cell division by intrinsically unstructured proteins: intrinsic flexibility, modularity, and signaling conduits. *Biochemistry* **47**: 7598-7609.
- Gao, B., R. Mohan & R. S. Gupta, (2009) Phylogenomics and protein signatures elucidating the evolutionary relationships among the Gammaproteobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**: 234-247.
- Gao, H., A. Obraztova, N. Stewart, R. Popa, J. K. Fredrickson, J. M. Tiedje, K. H. Nealson & J. Zhou, (2006a) Shewanella loihica sp. nov., isolated from iron-rich microbial mats in the Pacific Ocean. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 1911-1916.
- Gao, J., K. Lee, M. Zhao, J. Qiu, X. Zhan, A. Saxena, C. J. Moore, S. N. Cohen & G. Georgiou, (2006b) Differential modulation of E. coli mRNA abundance by inhibitory proteins that alter the composition of the degradosome. *Mol Microbiol* **61**: 394-406.
- Gauthier, G., M. Gauthier & R. Christen, (1995) Phylogenetic analysis of the genera Alteromonas, Shewanella, and Moritella using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus Alteromonas into two genera, Alteromonas (emended) and Pseudoalteromonas gen. nov., and proposal of twelve new species combinations. *Int J Syst Bacteriol* **45**: 755-761.
- Gavin, A. C., P. Aloy, P. Grandi, R. Krause, M. Boesche, M. Marzioch, C. Rau, L. J. Jensen, S. Bastuck, B. Dumpelfeld, A. Edelmann, M. A. Heurtier, V. Hoffman, C. Hoefert, K. Klein, M. Hudak, A. M. Michon, M. Schelder, M. Schirle, M. Remor, T. Rudi, S. Hooper, A. Bauer, T. Bouwmeester, G. Casari, G. Drewes, G. Neubauer, J. M. Rick, B. Kuster, P. Bork, R. B. Russell & G. Superti-Furga, (2006) Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature* **440**: 631-636.

- Ghora, B. K. & D. Apirion, (1978) Structural analysis and in vitro processing to p5 rRNA of a 9S RNA molecule isolated from an rne mutant of E. coli. *Cell* **15**: 1055-1066.
- Ghosh, S. & M. P. Deutscher, (1999) Oligoribonuclease is an essential component of the mRNA decay pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 4372-4377.
- Gorbalenya, A. E. & E. V. Koonin, (1993) Helicases: amino acid sequence comparisons and structure–function relationships. *Curr. Opin. Struct. Biol.* : 419-429.
- Gorna, M. W., Z. Pietras, Y. C. Tsai, A. J. Callaghan, H. Hernandez, C. V. Robinson & B. F. Luisi, (2010) The regulatory protein RraA modulates RNA-binding and helicase activities of the E. coli RNA degradosome. *RNA* **16**: 553-562.
- Grishin, N. V., (2001) KH domain: one motif, two folds. *Nucleic Acids Res* **29**: 638-643.
- Grossmann, J. G., A. J. Callaghan, M. J. Marcaida, B. F. Luisi, F. H. Alcock, K. Tokatlidis, M. Moulin, M. Haertlein & P. Timmins, (2008) Complementing structural information of modular proteins with small angle neutron scattering and contrast variation. *Eur Biophys J* **37**: 603-611.
- Grunberg-Manago, M., P. J. Ortiz & S. Ochoa, (1955) Enzymatic synthesis of nucleic acidlike polynucleotides. *Science* **122**: 907-910.
- Gulick, A. M., B. K. Hubbard, J. A. Gerlt & I. Rayment, (2000) Evolution of enzymatic activities in the enolase superfamily: crystallographic and mutagenesis studies of the reaction catalyzed by D-glucarate dehydratase from Escherichia coli. *Biochemistry* **39**: 4590-4602.
- Horie, Y., Y. Ito, M. Ono, N. Moriwaki, H. Kato, Y. Hamakubo, T. Amano, M. Wachi, M. Shirai & M. Asayama, (2007) Dark-induced mRNA instability involves RNase E/G-type endoribonuclease cleavage at the AU-box and SD sequences in cyanobacteria. *Mol Genet Genomics* **278**: 331-346.
- Iost, I. & M. Dreyfus, (1995) The stability of Escherichia coli lacZ mRNA depends upon the simultaneity of its synthesis and translation. *EMBO J* **14**: 3252-3261.
- Iost, I. & M. Dreyfus, (2006) DEAD-box RNA helicases in Escherichia coli. *Nucleic Acids Res* **34**: 4189-4197.
- Ishii, R., O. Nureki & S. Yokoyama, (2003) Crystal structure of the tRNA processing enzyme RNase PH from Aquifex aeolicus. *J Biol Chem* **278**: 32397-32404.
- Jager, S., O. Fuhrmann, C. Heck, M. Hebermehl, E. Schiltz, R. Rauhut & G. Klug, (2001) An mRNA degrading complex in Rhodobacter capsulatus. *Nucleic Acids Res* **29**: 4581-4588.
- Jager, S., M. Hebermehl, E. Schiltz & G. Klug, (2004) Composition and activity of the Rhodobacter capsulatus degradosome vary under different oxygen concentrations. *J Mol Microbiol Biotechnol* **7**: 148-154.
- Jagessar, K. L. & C. Jain, (2010) Functional and molecular analysis of Escherichia coli strains lacking multiple DEAD-box helicases. *RNA* **16**: 1386-1392.
- Jain, C., (2008) The E. coli RhlE RNA helicase regulates the function of related RNA helicases during ribosome assembly. *RNA* **14**: 381-389.
- Jain, C. & J. G. Belasco, (1995) RNase E autoregulates its synthesis by controlling the degradation rate of its own mRNA in Escherichia coli: unusual sensitivity of the rne transcript to RNase E activity. *Genes Dev* **9**: 84-96.
- Jain, C., A. Deana & J. G. Belasco, (2002) Consequences of RNase E scarcity in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **43**: 1053-1064.
- Jarrige, A., D. Brechemier-Baey, N. Mathy, O. Duche & C. Portier, (2002) Mutational analysis of polynucleotide phosphorylase from Escherichia coli. *J Mol Biol* **321**: 397-409.
- Jasiecki, J. & G. Wegrzyn, (2005) Localization of Escherichia coli poly(A) polymerase I in cellular membrane. *Biochem Biophys Res Commun* **329**: 598-602.
- Jeffery, C. J., (1999) Moonlighting proteins. *Trends Biochem Sci* **24**: 8-11.
- Jiang, X. & J. G. Belasco, (2004) Catalytic activation of multimeric RNase E and RNase G by 5'-monophosphorylated RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 9211-9216.
- Jiang, X., A. Diwa & J. G. Belasco, (2000) Regions of RNase E important for 5'-end-dependent RNA cleavage and autoregulated synthesis. *J Bacteriol* **182**: 2468-2475.
- Jourdan, S. S. & K. J. McDowall, (2008) Sensing of 5' monophosphate by Escherichia coli RNase G can significantly enhance association with RNA and stimulate the decay of functional mRNA transcripts in vivo. *Mol Microbiol* **67**: 102-115.

- Kaberdin, V. R. & T. Bizebard, (2005) Characterization of Aquifex aeolicus RNase E/G. *Biochem Biophys Res Commun* **327**: 382-392.
- Kaberdin, V. R., Y. H. Chao & S. Lin-Chao, (1996) RNase E cleaves at multiple sites in bubble regions of RNA I stem loops yielding products that dissociate differentially from the enzyme. *J Biol Chem* **271**: 13103-13109.
- Kaberdin, V. R. & S. Lin-Chao, (2009) Unraveling new roles for minor components of the E. coli RNA degradosome. *RNA Biol* **6**: 402-405.
- Kaberdin, V. R., A. Miczak, J. S. Jakobsen, S. Lin-Chao, K. J. McDowall & A. von Gabain, (1998) The endoribonucleolytic N-terminal half of *Escherichia coli* RNase E is evolutionarily conserved in Synechocystis sp. and other bacteria but not the C-terminal half, which is sufficient for degradosome assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 11637-11642.
- Kaberdin, V. R., A. P. Walsh, T. Jakobsen, K. J. McDowall & A. von Gabain, (2000) Enhanced cleavage of RNA mediated by an interaction between substrates and the arginine-rich domain of E. coli ribonuclease E. *J Mol Biol* **301**: 257-264.
- Kanai, A., H. Oida, N. Matsuura & H. Doi, (2003) Expression cloning and characterization of a novel gene that encodes the RNA-binding protein FAU-1 from *Pyrococcus furiosus*. *Biochem J* **372**: 253-261.
- Khemici, V. & A. J. Carpousis, (2004) The RNA degradosome and poly(A) polymerase of *Escherichia coli* are required *in vivo* for the degradation of small mRNA decay intermediates containing REP-stabilizers. *Mol Microbiol* **51**: 777-790.
- Khemici, V., L. Poljak, B. F. Luisi & A. J. Carpousis, (2008) The RNase E of *Escherichia coli* is a membrane-binding protein. *Mol Microbiol* **70**: 799-813.
- Khemici, V., L. Poljak, I. Toesca & A. J. Carpousis, (2005) Evidence *in vivo* that the DEAD-box RNA helicase RhlB facilitates the degradation of ribosome-free mRNA by RNase E. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 6913-6918.
- Khemici, V., I. Toesca, L. Poljak, N. F. Vanzo & A. J. Carpousis, (2004) The RNase E of *Escherichia coli* has at least two binding sites for DEAD-box RNA helicases: functional replacement of RhlB by RhlE. *Mol Microbiol* **54**: 1422-1430.
- Kido, M., K. Yamanaka, T. Mitani, H. Niki, T. Ogura & S. Hiraga, (1996) RNase E polypeptides lacking a carboxyl-terminal half suppress a *mukB* mutation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**: 3917-3925.
- Kim, K. S. & Y. Lee, (2004) Regulation of 6S RNA biogenesis by switching utilization of both sigma factors and endoribonucleases. *Nucleic Acids Res* **32**: 6057-6068.
- Koonin, E. V., Y. I. Wolf & L. Aravind, (2001) Prediction of the archaeal exosome and its connections with the proteasome and the translation and transcription machineries by a comparative-genomic approach. *Genome Res* **11**: 240-252.
- Koslover, D. J., A. J. Callaghan, M. J. Marcaida, E. F. Garman, M. Martick, W. G. Scott & B. F. Luisi, (2008) The crystal structure of the *Escherichia coli* RNase E apoprotein and a mechanism for RNA degradation. *Structure* **16**: 1238-1244.
- Kovacs, L., A. Csanadi, K. Megyeri, V. R. Kaberdin & A. Miczak, (2005) Mycobacterial RNase E-associated proteins. *Microbiol Immunol* **49**: 1003-1007.
- Kuhnel, K. & B. F. Luisi, (2001) Crystal Structure of the *Escherichia coli* RNA Degradosome Component Enolase. *J Mol Biol* **313**: 583-592.
- Lake, J. A., (2009) Evidence for an early prokaryotic endosymbiosis. *Nature* **460**: 967-971.
- Lanoil, B. D., L. M. Ciuffetti & S. J. Giovannoni, (1996) The marine bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* has a complex genome structure composed of two separate genetic units. *Genome Res* **6**: 1160-1169.
- Lee, K., J. A. Bernstein & S. N. Cohen, (2002) RNase G complementation of *rne* null mutation identifies functional interrelationships with RNase E in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **43**: 1445-1456.
- Lee, K. & S. N. Cohen, (2003) A *Streptomyces coelicolor* functional orthologue of *Escherichia coli* RNase E shows shuffling of catalytic and PNPase-binding domains. *Mol Microbiol* **48**: 349-360.
- Lee, K., X. Zhan, J. Gao, J. Qiu, Y. Feng, R. Meganathan, S. N. Cohen & G. Georgiou, (2003) RraA, a protein inhibitor of RNase E activity that globally modulates RNA abundance in *E. coli*. *Cell* **114**: 623-634.

- Lehnik-Habrink, M., H. Pfortner, L. Rempeters, N. Pietack, C. Herzberg & J. Stulke, (2010) The RNA degradosome in *Bacillus subtilis*: identification of CshA as the major RNA helicase in the multiprotein complex. *Mol Microbiol*.
- Leroy, A., N. F. Vanzo, S. Sousa, M. Dreyfus & A. J. Carpousis, (2002) Function in *Escherichia coli* of the non-catalytic part of RNase E: role in the degradation of ribosome-free mRNA. *Mol Microbiol* **45**: 1231-1243.
- Leszczyniecka, M., R. DeSalle, D. C. Kang & P. B. Fisher, (2004) The origin of polynucleotide phosphorylase domains. *Mol Phylogenet Evol* **31**: 123-130.
- Leszczyniecka, M., D. C. Kang, D. Sarkar, Z. Z. Su, M. Holmes, K. Valerie & P. B. Fisher, (2002) Identification and cloning of human polynucleotide phosphorylase, hPNPase old-35, in the context of terminal differentiation and cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 16636-16641.
- Li, X., P. Romero, M. Rani, A. K. Dunker & Z. Obradovic, (1999a) Predicting Protein Disorder for N-, C-, and Internal Regions. *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform* **10**: 30-40.
- Li, Z. & M. P. Deutscher, (2002a) RNase E plays an essential role in the maturation of *Escherichia coli* tRNA precursors. *RNA* **8**: 97-109.
- Li, Z. & M. P. Deutscher, (2002b) RNase E plays an essential role in the maturation of *Escherichia coli* tRNA precursors. *Rna* **8**: 97-109.
- Li, Z., S. Pandit & M. P. Deutscher, (1999b) RNase G (CafA protein) and RNase E are both required for the 5' maturation of 16S ribosomal RNA. *Embo J* **18**: 2878-2885.
- Lin-Chao, S., C. L. Wei & Y. T. Lin, (1999) RNase E is required for the maturation of *ssrA* RNA and normal *ssrA* RNA peptide-tagging activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 12406-12411.
- Lin-Chao, S., T. T. Wong, K. J. McDowall & S. N. Cohen, (1994) Effects of nucleotide sequence on the specificity of *rne*-dependent and RNase E-mediated cleavages of RNA I encoded by the pBR322 plasmid. *J Biol Chem* **269**: 10797-10803.
- Liou, G. G., H. Y. Chang, C. S. Lin & S. Lin-Chao, (2002) DEAD Box RhlB RNA Helicase Physically Associates with Exoribonuclease PNPase to Degrade Double-stranded RNA Independent of the Degradosome-assembling Region of RNase E. *J Biol Chem* **277**: 41157-41162.
- Liou, G. G., W. N. Jane, S. N. Cohen, N. S. Lin & S. Lin-Chao, (2001) RNA degradosomes exist in vivo in *Escherichia coli* as multicomponent complexes associated with the cytoplasmic membrane via the N-terminal region of ribonuclease E. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 63-68.
- Lopez, P. J., I. Marchand, S. A. Joyce & M. Dreyfus, (1999) The C-terminal half of RNase E, which organizes the *Escherichia coli* degradosome, participates in mRNA degradation but not rRNA processing in vivo. *Mol Microbiol* **33**: 188-199.
- Lorentzen, E., P. Walter, S. Fribourg, E. Evgenieva-Hackenberg, G. Klug & E. Conti, (2005) The archaeal exosome core is a hexameric ring structure with three catalytic subunits. *Nat Struct Mol Biol*.
- Lundberg, U. & S. Altman, (1995) Processing of the precursor to the catalytic RNA subunit of RNase P from *Escherichia coli*. *RNA* **1**: 327-334.
- Lykke-Andersen, S., D. E. Brodersen & T. H. Jensen, (2009) Origins and activities of the eukaryotic exosome. *J Cell Sci* **122**: 1487-1494.
- Mackie, G. A., (1998) Ribonuclease E is a 5'-end-dependent endonuclease. *Nature* **395**: 720-723.
- Maeda, T., T. Sakai & M. Wachi, (2009) The *Corynebacterium glutamicum* NCgl2281 gene encoding an RNase E/G family endoribonuclease can complement the *Escherichia coli* *rng::cat* mutation but not the *rne-1* mutation. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**: 2281-2286.
- Marcaida, M. J., M. A. DePristo, V. Chandran, A. J. Carpousis & B. F. Luisi, (2006) The RNA degradosome: life in the fast lane of adaptive molecular evolution. *Trends Biochem Sci* **31**: 359-365.
- Masse, E., F. E. Escorcia & S. Gottesman, (2003) Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **17**: 2374-2383.
- Mathy, N., L. Benard, O. Pellegrini, R. Daou, T. Wen & C. Condon, (2007) 5'-to-3' exoribonuclease activity in bacteria: role of RNase J1 in rRNA maturation and 5' stability of mRNA. *Cell* **129**: 681-692.

- McDowall, K. J. & S. N. Cohen, (1996) The N-terminal domain of the *rne* gene product has RNase E activity and is non-overlapping with the arginine-rich RNA-binding site. *J Mol Biol* **255**: 349-355.
- McDowall, K. J., R. G. Hernandez, S. Lin-Chao & S. N. Cohen, (1993) The *ams-1* and *rne-3071* temperature-sensitive mutations in the *ams* gene are in close proximity to each other and cause substitutions within a domain that resembles a product of the *Escherichia coli* *mre* locus. *J Bacteriol* **175**: 4245-4249.
- McDowall, K. J., S. Lin-Chao & S. N. Cohen, (1994) A+U content rather than a particular nucleotide order determines the specificity of RNase E cleavage. *J Biol Chem* **269**: 10790-10796.
- Medigue, C., E. Krin, G. Pascal, V. Barbe, A. Bernsel, P. N. Bertin, F. Cheung, S. Cruveiller, S. D'Amico, A. Duilio, G. Fang, G. Feller, C. Ho, S. Mangenot, G. Marino, J. Nilsson, E. Parrilli, E. P. Rocha, Z. Rouy, A. Sekowska, M. L. Tutino, D. Vallenet, G. von Heijne & A. Danchin, (2005) Coping with cold: the genome of the versatile marine Antarctica bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Genome Res* **15**: 1325-1335.
- Methe, B. A., K. E. Nelson, J. W. Deming, B. Momen, E. Melamud, X. Zhang, J. Moul, R. Madupu, W. C. Nelson, R. J. Dodson, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, A. S. Durkin, R. T. DeBoy, J. F. Kolonay, S. A. Sullivan, L. Zhou, T. M. Davidsen, M. Wu, A. L. Huston, M. Lewis, B. Weaver, J. F. Weidman, H. Khouri, T. R. Utterback, T. V. Feldblyum & C. M. Fraser, (2005) The psychrophilic lifestyle as revealed by the genome sequence of *Colwellia psychrerythraea* 34H through genomic and proteomic analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 10913-10918.
- Miczak, A., V. R. Kabardin, C. L. Wei & S. Lin-Chao, (1996) Proteins associated with RNase E in a multicomponent ribonucleolytic complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 3865-3869.
- Misra, T. K. & D. Apirion, (1979) RNase E, an RNA processing enzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **254**: 11154-11159.
- Mitchell, P., E. Petfalski, A. Shevchenko, M. Mann & D. Tollervey, (1997) The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases. *Cell* **91**: 457-466.
- Mohanty, B. K. & S. R. Kushner, (2000) Polynucleotide phosphorylase functions both as a 3' right-arrow 5' exonuclease and a poly(A) polymerase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 11966-11971.
- Mohanty, B. K. & S. R. Kushner, (2006) The majority of *Escherichia coli* mRNAs undergo post-transcriptional modification in exponentially growing cells. *Nucleic Acids Res* **34**: 5695-5704.
- Mohanty, B. K. & S. R. Kushner, (2010) Processing of the *Escherichia coli* *leuX* tRNA transcript, encoding tRNA(Leu5), requires either the 3'→5' exoribonuclease polynucleotide phosphorylase or RNase P to remove the Rho-independent transcription terminator. *Nucleic Acids Res* **38**: 597-607.
- Montero Llopis, P., A. F. Jackson, O. Sliusarenko, I. Surovtsev, J. Heinritz, T. Emonet & C. Jacobs-Wagner, (2010) Spatial organization of the flow of genetic information in bacteria. *Nature* **466**: 77-81.
- Morita, T., H. Kawamoto, T. Mizota, T. Inada & H. Aiba, (2004) Enolase in the RNA degradosome plays a crucial role in the rapid decay of glucose transporter mRNA in the response to phosphosugar stress in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **54**: 1063-1075.
- Morita, T., K. Maki & H. Aiba, (2005) RNase E-based ribonucleoprotein complexes: mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. *Genes Dev* **19**: 2176-2186.
- Mudd, E. A., A. J. Carpousis & H. M. Krisch, (1990a) *Escherichia coli* RNase E has a role in the decay of bacteriophage T4 mRNA. *Genes Dev* **4**: 873-881.
- Mudd, E. A. & C. F. Higgins, (1993) *Escherichia coli* endoribonuclease RNase E: autoregulation of expression and site-specific cleavage of mRNA. *Mol Microbiol* **9**: 557-568.
- Mudd, E. A., H. M. Krisch & C. F. Higgins, (1990b) RNase E, an endoribonuclease, has a general role in the chemical decay of *Escherichia coli* mRNA: evidence that *rne* and *ams* are the same genetic locus. *Mol Microbiol* **4**: 2127-2135.
- Mudd, E. A., P. Prentki, D. Belin & H. M. Krisch, (1988) Processing of unstable bacteriophage T4 gene 32 mRNAs into a stable species requires *Escherichia coli* ribonuclease E. *Embo J* **7**: 3601-3607.

- Mudd, E. A., S. Sullivan, M. F. Gisby, A. Mironov, C. S. Kwon, W. I. Chung & A. Day, (2008) A 125 kDa RNase E/G-like protein is present in plastids and is essential for chloroplast development and autotrophic growth in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **59**: 2597-2610.
- Nurmohamed, S., A. R. McKay, C. V. Robinson & B. F. Luisi, (2010) Molecular recognition between *Escherichia coli* enolase and ribonuclease E. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**: 1036-1040.
- Nurmohamed, S., B. Vaidialingam, A. J. Callaghan & B. F. Luisi, (2009) Crystal structure of *Escherichia coli* polynucleotide phosphorylase core bound to RNase E, RNA and manganese: implications for catalytic mechanism and RNA degradosome assembly. *J Mol Biol* **389**: 17-33.
- Ono, M. & M. Kuwano, (1979) A conditional lethal mutation in an *Escherichia coli* strain with a longer chemical lifetime of messenger RNA. *J Mol Biol* **129**: 343-357.
- Ow, M. C., Q. Liu & S. R. Kushner, (2000) Analysis of mRNA decay and rRNA processing in *Escherichia coli* in the absence of RNase E-based degradosome assembly. *Mol Microbiol* **38**: 854-866.
- Ow, M. C., Q. Liu, B. K. Mohanty, M. E. Andrew, V. F. Maples & S. R. Kushner, (2002) RNase E levels in *Escherichia coli* are controlled by a complex regulatory system that involves transcription of the *rne* gene from three promoters. *Mol Microbiol* **43**: 159-171.
- Peil, L., K. Virumae & J. Remme, (2008) Ribosome assembly in *Escherichia coli* strains lacking the RNA helicase *DeaD/CsdA* or *DbpA*. *FEBS J* **275**: 3772-3782.
- Pfeiffer, V., K. Papenfort, S. Lucchini, J. C. Hinton & J. Vogel, (2009) Coding sequence targeting by *MicC* RNA reveals bacterial mRNA silencing downstream of translational initiation. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 840-846.
- Piowowski, J., P. Grzechnik, A. Dziembowski, A. Dmochowska, M. Minczuk & P. P. Stepień, (2003) Human polynucleotide phosphorylase, hPNPase, is localized in mitochondria. *J Mol Biol* **329**: 853-857.
- Portnoy, V. & G. Schuster, (2006) RNA polyadenylation and degradation in different Archaea; roles of the exosome and RNase R. *Nucleic Acids Res* **34**: 5923-5931.
- Prud'homme-Genereux, A., R. K. Beran, I. Iost, C. S. Ramey, G. A. Mackie & R. W. Simons, (2004) Physical and functional interactions among RNase E, polynucleotide phosphorylase and the cold-shock protein, *CsdA*: evidence for a 'cold shock degradosome'. *Mol Microbiol* **54**: 1409-1421.
- Purusharth, R. I., F. Klein, S. Sulthana, S. Jager, M. V. Jagannadham, E. Evguenieva-Hackenberg, M. K. Ray & G. Klug, (2005) Exoribonuclease R interacts with endoribonuclease E and an RNA helicase in the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas syringae* Lz4W. *J Biol Chem* **280**: 14572-14578.
- Purusharth, R. I., B. Madhuri & M. K. Ray, (2007) Exoribonuclease R in *Pseudomonas syringae* is essential for growth at low temperature and plays a novel role in the 3' end processing of 16 and 5 S ribosomal RNA. *J Biol Chem* **282**: 16267-16277.
- Py, B., H. Causton, E. A. Mudd & C. F. Higgins, (1994) A protein complex mediating mRNA degradation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **14**: 717-729.
- Py, B., C. F. Higgins, H. M. Krisch & A. J. Carpousis, (1996) A DEAD-box RNA helicase in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Nature* **381**: 169-172.
- Raynal, L. C. & A. J. Carpousis, (1999) Poly(A) polymerase I of *Escherichia coli*: characterization of the catalytic domain, an RNA binding site and regions for the interaction with proteins involved in mRNA degradation. *Mol Microbiol* **32**: 765-775.
- Raynal, L. C., H. M. Krisch & A. J. Carpousis, (1996) Bacterial poly(A) polymerase: an enzyme that modulates RNA stability. *Biochimie* **78**: 390-398.
- Régnier, P., M. Grunberg-Manago & C. Portier, (1987) Nucleotide sequence of the *pnp* gene of *Escherichia coli* encoding polynucleotide phosphorylase. Homology of the primary structure of the protein with the RNA-binding domain of ribosomal protein S1. *J Biol Chem* **262**: 63-68.
- Remaut, H. & G. Waksman, (2006) Protein-protein interaction through beta-strand addition. *Trends Biochem Sci* **31**: 436-444.
- Robson Marsden, H. & A. Kros, (2010) Self-assembly of coiled coils in synthetic biology: inspiration and progress. *Angew Chem Int Ed Engl* **49**: 2988-3005.

- Sarkar, D. & P. B. Fisher, (2006) Polynucleotide phosphorylase: an evolutionary conserved gene with an expanding repertoire of functions. *Pharmacol Ther* **112**: 243-263.
- Schaeffer, D., B. Tsanova, A. Barbas, F. P. Reis, E. G. Dastidar, M. Sanchez-Rotunno, C. M. Arraiano & A. van Hoof, (2009) The exosome contains domains with specific endoribonuclease, exoribonuclease and cytoplasmic mRNA decay activities. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 56-62.
- Scheffzek, K., M. R. Ahmadian & A. Wittinghofer, (1998) GTPase-activating proteins: helping hands to complement an active site. *Trends Biochem Sci* **23**: 257-262.
- Schein, A., S. Sheffy-Levin, F. Glaser & G. Schuster, (2008) The RNase E/G-type endoribonuclease of higher plants is located in the chloroplast and cleaves RNA similarly to the E. coli enzyme. *RNA* **14**: 1057-1068.
- Schmid, M. & T. H. Jensen, (2008) The exosome: a multipurpose RNA-decay machine. *Trends Biochem Sci* **33**: 501-510.
- Schmid, S. R. & P. Linder, (1992) D-E-A-D protein family of putative RNA helicases. *Mol Microbiol* **6**: 283-291.
- Schoenberg, D. R., (2007) The end defines the means in bacterial mRNA decay. *Nat Chem Biol* **3**: 535-536.
- Schuck, A., A. Diwa & J. G. Belasco, (2009) RNase E autoregulates its synthesis in Escherichia coli by binding directly to a stem-loop in the rne 5' untranslated region. *Mol Microbiol* **72**: 470-478.
- Sengoku, T., O. Nureki, A. Nakamura, S. Kobayashi & S. Yokoyama, (2006) Structural basis for RNA unwinding by the DEAD-box protein Drosophila Vasa. *Cell* **125**: 287-300.
- Shahbadian, K., A. Jamalli, L. Zig & H. Putzer, (2009) RNase Y, a novel endoribonuclease, initiates riboswitch turnover in Bacillus subtilis. *EMBO J* **28**: 3523-3533.
- Sharpe Elles, L. M., M. T. Sykes, J. R. Williamson & O. C. Uhlenbeck, (2009) A dominant negative mutant of the E. coli RNA helicase DbpA blocks assembly of the 50S ribosomal subunit. *Nucleic Acids Res* **37**: 6503-6514.
- Shaw, M. K., A. G. Marr & J. L. Ingraham, (1971) Determination of the minimal temperature for growth of Escherichia coli. *J Bacteriol* **105**: 683-684.
- Shi, Z., W. Z. Yang, S. Lin-Chao, K. F. Chak & H. S. Yuan, (2008) Crystal structure of Escherichia coli PNPase: central channel residues are involved in processive RNA degradation. *RNA* **14**: 2361-2371.
- Shivaji, S., N. S. Rao, L. Saisree, V. Sheth, G. S. Reddy & P. M. Bhargava, (1989) Isolation and identification of Pseudomonas spp. from Schirmacher Oasis, Antarctica. *Appl Environ Microbiol* **55**: 767-770.
- Simon, R., U. Priefer & A. Pühler, (1983) A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Bio/Technology*: 784-791.
- Singh, D., S. J. Chang, P. H. Lin, O. V. Averina, V. R. Kaberdin & S. Lin-Chao, (2009) Regulation of ribonuclease E activity by the L4 ribosomal protein of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 864-869.
- Sohlberg, B., U. Lundberg, F. U. Hartl & A. von Gabain, (1993) Functional interaction of heat shock protein GroEL with an RNase E-like activity in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 277-281.
- Stickney, L. M., J. S. Hankins, X. Miao & G. A. Mackie, (2005) Function of the conserved S1 and KH domains in polynucleotide phosphorylase. *J Bacteriol* **187**: 7214-7221.
- Studier, F. W., A. H. Rosenberg, J. J. Dunn & J. W. Dubendorff, (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**: 60-89.
- Symmons, M. F., G. H. Jones & B. F. Luisi, (2000) A duplicated fold is the structural basis for polynucleotide phosphorylase catalytic activity, processivity, and regulation. *Structure Fold Des* **8**: 1215-1226.
- Szeto, T. H., S. L. Rowland, C. L. Habrukowich & G. F. King, (2003) The MinD membrane targeting sequence is a transplantable lipid-binding helix. *J Biol Chem* **278**: 40050-40056.
- Taghbalout, A. & L. Rothfield, (2007) RNaseE and the other constituents of the RNA degradosome are components of the bacterial cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 1667-1672.
- Taghbalout, A. & L. Rothfield, (2008a) New insights into the cellular organization of the RNA processing and degradation machinery of Escherichia coli. *Mol Microbiol* **70**: 780-782.

- Taghbalout, A. & L. Rothfield, (2008b) RNaseE and RNA helicase B play central roles in the cytoskeletal organization of the RNA degradosome. *J Biol Chem* **283**: 13850-13855.
- Taraseviciene, L., G. R. Bjork & B. E. Uhlin, (1995) Evidence for an RNA binding region in the Escherichia coli processing endoribonuclease RNase E. *J Biol Chem* **270**: 26391-26398.
- Trubetskoy, D., F. Proux, F. Allemand, M. Dreyfus & I. Iost, (2009) SrmB, a DEAD-box helicase involved in Escherichia coli ribosome assembly, is specifically targeted to 23S rRNA in vivo. *Nucleic Acids Res* **37**: 6540-6549.
- Uppal, S., V. S. Akkipeddi & N. Jawali, (2008) Posttranscriptional regulation of cspE in Escherichia coli: involvement of the short 5'-untranslated region. *FEMS Microbiol Lett* **279**: 83-91.
- Vanderpool, C. K. & S. Gottesman, (2004) Involvement of a novel transcriptional activator and small RNA in post-transcriptional regulation of the glucose phosphoenolpyruvate phosphotransferase system. *Mol Microbiol* **54**: 1076-1089.
- Vanzo, N. F., Y. S. Li, B. Py, E. Blum, C. F. Higgins, L. C. Raynal, H. M. Krisch & A. J. Carpousis, (1998) Ribonuclease E organizes the protein interactions in the Escherichia coli RNA degradosome. *Genes Dev* **12**: 2770-2781.
- Vincent, H. A. & M. P. Deutscher, (2009) Insights into how RNase R degrades structured RNA: analysis of the nuclease domain. *J Mol Biol* **387**: 570-583.
- Walker, J. E., M. Saraste, M. J. Runswick & N. J. Gay, (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* **1**: 945-951.
- Worrall, J. A., M. Gorna, N. T. Crump, L. G. Phillips, A. C. Tuck, A. J. Price, V. N. Bavro & B. F. Luisi, (2008a) Reconstitution and analysis of the multienzyme Escherichia coli RNA degradosome. *J Mol Biol* **382**: 870-883.
- Worrall, J. A., F. S. Howe, A. R. McKay, C. V. Robinson & B. F. Luisi, (2008b) Allosteric activation of the ATPase activity of the Escherichia coli RhlB RNA helicase. *J Biol Chem* **283**: 5567-5576.
- Worrall, J. A. & B. F. Luisi, (2007) Information available at cut rates: structure and mechanism of ribonucleases. *Curr Opin Struct Biol* **17**: 128-137.
- Wright, P. E. & H. J. Dyson, (1999) Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J Mol Biol* **293**: 321-331.
- Yang, J., C. Jain & K. Schesser, (2008) RNase E regulates the Yersinia type 3 secretion system. *J Bacteriol* **190**: 3774-3778.
- Zangrossi, S., F. Briani, D. Ghisotti, M. E. Regonesi, P. Tortora & G. Deho, (2000) Transcriptional and post-transcriptional control of polynucleotide phosphorylase during cold acclimation in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **36**: 1470-1480.
- Zeller, M. E., A. Csanadi, A. Miczak, T. Rose, T. Bizebard & V. R. Kaberdin, (2007) Quaternary structure and biochemical properties of mycobacterial RNase E/G. *Biochem J* **403**: 207-215.
- Zuo, Y. & M. P. Deutscher, (2001) Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. *Nucleic Acids Res* **29**: 1017-1026.

Résumé :

La dégradation des ARNm est l'un des processus biologiques essentiels qui implique chez les bactéries, l'intervention d'un complexe multiprotéique appelé « dégradosome d'ARN ». Chez *E.coli*, la formation de ce complexe nécessite l'endoribonucléase essentielle « RNase E », qui porte dans sa région non conservée, des îlots de 15 à 40 acides aminés appelés « microdomaines ». Ces microdomaines sont responsables des interactions entre la RNase E et trois protéines : l'hélicase à ARN RhlB, l'enzyme de la glycolyse émolase et l'exoribonucléase PNPase. Chez d'autres bactéries, plusieurs dégradosomes d'ARN assemblés sur la RNase E ont été identifiés et ils présentent une composition protéique différente du dégradosome d'*E.coli*. Il y a ainsi une plasticité des interactions RNase E-protéines qui serait due à la divergence de la séquence des microdomaines et leur évolution. Cependant, au début de ce travail de thèse, seuls les microdomaines de la RNase E d'*E.coli* ont été caractérisés.

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit se sont focalisés sur la bactérie marine adaptée au froid et relativement distante d'*E.coli*, *Pseudoalteromonas haloplanktis*, pour caractériser le dégradosome d'ARN et les microdomaines responsables des interactions RNase E-protéines. Le dégradosome d'ARN adapté au froid de *P.haloplanktis* est composé de la RNase E, de l'exoribonucléase PNPase et de l'hélicase à ARN RhlB. Chez *E.coli*, la RNase E de *P.haloplanktis* est capable de restaurer la viabilité d'*E.coli* dépourvue de RNase E sans conférer un avantage de croissance à *E.coli* à basse température. De plus, la RNase E de *P.haloplanktis* est capable d'interagir avec la protéine RhlB d'*E.coli*. Les microdomaines d'interaction entre la RNase E et les protéines RhlB et PNPase ont été caractérisés ce qui a permis de mieux comprendre la conservation de ces deux types d'interaction retrouvés au sein du dégradosome d'ARN d'*E.coli*, malgré la distance évolutive séparant *P.haloplanktis* et *E.coli*. L'interaction RNase E-PNPase de *P.haloplanktis* implique un microdomaine de séquence non conservée en comparaison avec celui de l'interaction RNase E-PNPase d'*E.coli*. Ceci suggère une conservation structurale de l'interaction RNase E-PNPase. Quant à l'interaction RNase E-RhlB, le microdomaine d'interaction présente des acides aminés conservés et similaires au microdomaine d'interaction RNase E-RhlB d'*E.coli*. L'analyse de ces microdomaines est élargie de manière *in silico* à d'autres RNase E des γ -protéobactéries pour avoir une vue d'ensemble de leur distribution. Enfin, une étude phylogénétique de la protéine RhlB a été initiée dans le but de voir une corrélation potentielle entre la présence du microdomaine de fixation de RhlB et la présence de RhlB chez les γ -protéobactéries.