

**ETUDE DES MÉCANISMES DE CONTRÔLE DE L'ARNm PAR LES
RIBORÉGULATEURS TRADUCTIONNELS D'*ESCHERICHIA COLI***

Par

Laurène Bastet

Thèse présentée au département de biologie en vue de l'obtention du grade de docteur en
science (Ph.D.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, Juillet 2015

Le 29 Juillet 2015

Le Jury a accepté la thèse de Madame Laurène Bastet dans sa version finale

Membres du Jury d'évaluation

Professeur Daniel Lafontaine

Directeur de recherche

Département de biologie

Professeur Eric Massé

Membre externe au programme

Département de biochimie

Professeur Sébastien Faucher

Membre externe

Université McGill

Professeur Vincent Burrus

Président rapporteur

Département de biologie

SOMMAIRE

Les bactéries utilisent un large éventail de mécanismes afin d'ajuster avec précision le niveau d'expression génique en fonction des besoins cellulaires. Aujourd'hui, il est clair que les ARN régulateurs ont une fonction clef dans ce phénomène d'adaptation. Parmi eux se trouvent les riborégulateurs. Ces éléments génétiques sont localisés dans la région 5' non traduite de certains ARNm bactériens. La liaison d'un métabolite au riborégulateur induit un changement conformationnel de l'ARNm ce qui contrôle l'expression du gène en aval.

Durant mes recherches doctorales, je me suis intéressée aux riborégulateurs *thiM* et *btuB* d'*Escherichia coli*, reconnaissant respectivement la thiamine pyrophosphate et l'adénosylcobalamine. Ces deux riborégulateurs étaient initialement connus pour bloquer l'initiation de la traduction du gène adjacent suite à la liaison du ligand. Cependant, mes travaux ont montré que l'arrêt de la traduction est corrélé à une diminution du niveau d'ARNm des gènes régulés. Dans le cas du riborégulateur *thiM*, j'ai démontré que l'inhibition de la traduction est un prérequis à la diminution de l'ARNm. Cette régulation implique une séquence unique de l'ARNm qui induit à la fois une terminaison de la transcription Rho-dépendante et l'initiation de la dégradation. Mes résultats suggèrent que ce mécanisme de contrôle serait davantage répandu. Cette découverte établit ainsi un nouveau paradigme expliquant le fonctionnement des riborégulateurs bactériens.

Au cours de mes recherches, j'ai également montré que le petit ARN OmrA s'apparie par complémentarité de séquence à *btuB* afin d'inhiber l'initiation de la traduction. L'expression du même gène est donc contrôlée au niveau traductionnel par deux catégories distinctes d'ARN non codants. Tout comme pour le riborégulateur, le blocage de la traduction induit par OmrA est suivi de la diminution rapide de l'ARNm. Étonnamment, mes résultats montrent que les voies de contrôle de l'ARNm employées par le riborégulateur et le petit ARN sont foncièrement différentes. Cette étude contribue grandement à améliorer la compréhension des mécanismes corrélant la traduction à la dégradation.

Mots clefs : Riborégulateurs, petits ARN, traduction, ARNm, régulation

“Alice: Would you tell me, please, which way I ought to go from there?”

The Cheshire Cat: That depends a good deal on where you want to get to.

Alice: I don't much care where

The Cheshire Cat: Then it doesn't much matter which way you go.

Alice: so long as I get somewhere

The Cheshire Cat: Oh, you're sure to do that, if only you walk long enough”

— Lewis Carroll, *Alice in Wonderland*

REMERCIEMENTS

Ces années doctorales n'auraient certainement pas été aussi enrichissantes sans mon directeur de thèse le Pr. Daniel Lafontaine. Daniel, merci pour ton soutien et ta confiance à mon égard. Merci d'avoir encouragé ma curiosité et mes tendances exploratrices. Tes conseils avisés, ta vision de la science, ainsi que ta rigueur marquent sans équivoque mon développement scientifique.

Je tiens à remercier le Pr. Eric Massé, mon conseiller et collaborateur. Il va sans dire que nos discussions et tes suggestions ont grandement contribué à l'élaboration de mon projet de thèse. Merci également pour ton hospitalité au sein de ton laboratoire lorsque mes expériences le demandaient. Merci au Pr. Vincent Burrus, mon conseiller. Nos réunions annuelles ponctuées de tes questions et commentaires ont toujours été très enrichissantes. Je te remercie aussi pour ton soutien et ta disponibilité.

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude au Pr. Sébastien Faucher pour avoir accepté d'être examinateur externe de mon jury de thèse.

Je remercie également nos collaborateurs, le Pr. Joseph T. Wade et son étudiant Navjot Singh.

Un grand merci à tous les membres du laboratoire, des collègues et des amis qui ont mis du piquant à mon quotidien professionnel et personnel. Merci à Pat avec qui j'ai grandi, à Max le maître Yoda, à Sébastien, Julien et Pierre pour leur relax attitude, à Hey Rich et Jeff pour leurs blagues désopilantes, à Adrien pour son entrain et ses magnifiques décorations de Noël, à Mélanie pour les discussions culinaires alléchantes, à Fatima et ses avis stylisés à Antony pour sa bonne humeur. Un énorme merci aux « mamans » du laboratoire Audrey et Anne-Marie pour leur ténacité et leur soutien inconditionnel. Qui aurait cru que ce soit possible de rencontrer autant de personnes géniales dans l'espace restreint d'un laboratoire!

Merci aux membres du laboratoire d'Eric Massé. Plus spécifiquement à Karine, David, Élodie pour leur aide précieuse. Merci à Julie-Anna alias Jujube, ma collègue, ma partenaire de congrès, mon amie. Merci Jujube pour ton écoute, ton soutien et nos débats scientifiques et moins scientifiques.

Merci à ceux qui demeurent avec moi tout en vivant de l'autre côté de l'océan.

Merci à Ceccio pour avoir traversé l'océan.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|-----------------------------|------|
| Sommaire | i |
| Remerciements | ii |
| Table des matières..... | iii |
| Liste des abréviations..... | viii |
| Liste des tableaux..... | x |
| Liste des figures | xi |

INTRODUCTION

| | |
|--|----------|
| B- Mise en contexte | 1 |
| A.1- Le contrôle de l'initiation de la traduction chez les procaryotes | 1 |
| A.1.1- Aperçu de l'étape d'initiation de la traduction | 1 |
| A.1.2- Modulation de l'initiation de la traduction | 2 |
| A.1.3- Effet de l'inhibition de la traduction sur le niveau d'ARNm | 3 |
| A.2- Vue globale du projet de thèse | 3 |
| B- Impact de la régulation traductionnelle sur le niveau d'ARNm | 4 |
| B.1- Impact de l'inhibition de la traduction sur la terminaison Rho-dépendante | 4 |
| B.1.1- La terminaison de la transcription Rho-dépendante | 4 |
| B.1.1.1- Importance de la terminaison Rho-dépendante | 4 |
| B.1.1.2- Mécanisme de la terminaison Rho-dépendante | 5 |
| B.1.1.2.1- Liaison de Rho à l'ARN | 5 |
| B.1.1.2.2- Translocation de Rho le long de l'ARN | 5 |
| B.1.1.2.3- Dissociation de l'ARN polymérase | 6 |
| B.1.2- La traduction et la terminaison Rho-dépendante | 7 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| B.1.2.1- | Le couplage entre la transcription et la traduction | 7 |
| B.1.2.2- | Compétition entre Rho et le ribosome pour l'accès à l'ARN..... | 7 |
| B.2- | Impact de l'inhibition de la traduction sur la dégradation de l'ARNm | 9 |
| B.2.1- | Aperçu des étapes de la dégradation chez <i>E.coli</i> | 9 |
| B.2.2- | La RNase E | 10 |
| B.2.2.1- | Structure de la RNase E | 11 |
| B.2.2.2- | Mécanisme de dégradation par la RNase E | 12 |
| B.2.3- | Le dégradosome ARN | 14 |
| B.2.4- | La traduction et la dégradation | 15 |
| B- | Les ARN régulateurs chez les procaryotes | 16 |
| C.1- | Les petits ARN régulateurs | 16 |
| C.1.1- | Aperçu des mécanismes de régulation | 17 |
| C.1.1.1- | Mode de régulation négatif | 17 |
| C.1.1.2- | Mode de régulation positif | 18 |
| C.1.1.3- | Titration de protéines | 18 |
| C.1.2- | Rôle de la protéine Hfq dans la régulation par les petits ARN | 19 |
| C.1.3- | Les petits ARN OmrA et OmrB | 20 |
| C.1.3.1- | Description d'OmrA et OmrB | 20 |
| C.1.3.2- | Les gènes régulés par OmrA et OmrB | 21 |
| C.1.3.3- | Le mode d'action d'OmrA et OmrB | 22 |
| C.2- | Les riborégulateurs..... | 22 |
| C.2.1- | Définition du concept de riborégulateur | 24 |
| C.2.2- | Diversité et abondance des riborégulateurs | 25 |
| C.2.3- | Les mécanismes de régulation | 27 |
| C.2.3.1- | Contrôle de la terminaison prématurée de la transcription | 28 |

| | |
|---|-----------|
| C.2.3.2- Contrôle de l'initiation de la dégradation | 28 |
| C.2.3.3- Contrôle de l'initiation de la traduction | 29 |
| C.2.4- Contrôle cinétique ou thermodynamique des riborégulateurs | 30 |
| C.2.5- Le riborégulateur <i>thiM</i> d' <i>E. coli</i> | 32 |
| C.2.5.1- Le ligand: la thiamine pyrophosphate | 32 |
| C.2.5.2- Les gènes régulés par le riborégulateur TPP chez <i>E. coli</i> | 33 |
| C.2.5.3- Structure du riborégulateur <i>thiM</i> | 33 |
| C.2.5.4- Le mécanisme de régulation du riborégulateur <i>thiM</i> | 34 |
| C.2.6- Le riborégulateur <i>btuB</i> d' <i>E. coli</i> | 36 |
| C.2.6.1- Le ligand: l'adénosylcobalamine | 36 |
| C.2.6.2- Les gènes régulés par le riborégulateur AdoCbl chez <i>E. coli</i> | 37 |
| C.2.6.3- La structure du riborégulateur <i>btuB</i> | 38 |
| C.2.6.4- Le mécanisme de régulation du riborégulateur <i>btuB</i> | 39 |
| | |
| OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE | 41 |
| | |
| CHAPITRE 1 | 42 |
| Résumé | 43 |
| <i>Riboswitch-mediated translation repression directs Rho termination and mRNA decay through a single RNA element</i> | 44 |
| Abstract | 45 |
| Introduction | 46 |
| Results | 49 |
| Discussion | 79 |
| Material and Methods | 86 |
| Acknowledgments | 88 |
| References | 89 |

| | |
|---|-----|
| Supplemental material | 92 |
| CHAPITRE 2 | 106 |
| Résumé | 107 |
| <i>AdoCbl riboswitch and OmrA small RNA both control translation initiation of btuB but triggers different mRNA decay pathway</i> | 108 |
| Abstract | 109 |
| Introduction | 110 |
| Results | 113 |
| Discussion | 136 |
| Material and Methods | 142 |
| Acknowledgments | 145 |
| References | 146 |
| Supplemental material | 150 |
| CONCLUSION ET DISCUSSION | 155 |
| 1- Les riborégulateurs traductionnels modulent le niveau d'ARNm | 155 |
| 1.1- Un paradigme | 155 |
| 1.2- Un contrôle direct ou indirect du niveau d'ARNm | 157 |
| 1.2.1- Un contrôle indirect | 157 |
| 1.2.2- Un contrôle direct | 158 |
| 1.2.3- Les implications du contrôle direct et indirect | 159 |
| 1.3- Un contrôle co- ou post-transcriptionnel, telle est la question | 160 |
| 1.3.1- Le principe | 160 |
| 1.3.2- La terminaison Rho-dépendante : un contrôle cinétique? | 162 |
| 1.3.3- La dégradation : un contrôle thermodynamique? | 163 |
| 1.3.4- Mode de contrôle des riborégulateurs d' <i>E. coli</i> | 164 |

| | |
|--|------------|
| 2- Riborégulateurs vs petits ARN : différences dans le contrôle de l'ARNm | 165 |
| 2.1- Deux ARNnc contrôlent la traduction et le niveau d'ARNm | 165 |
| 2.2- Pourquoi OmrA ne contrôle pas la terminaison Rho-dépendante ? | 166 |
| 2.3- La dégradation non nucléolytique : le petit ARN vs le riborégulateur | 167 |
| 2- Intérêt général de l'étude | 170 |
| | |
| BIBLIOGRAPHIE | 172 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|------------|--|
| 5'-UTR | <i>5'-untranslated region</i> , région 5' non traduite |
| 3'-UTR | <i>3'-untranslated region</i> , région 3' non traduite |
| ADN | Acide DésoxyriboNucléique |
| AdoCbl | Adénosylcobalamine |
| AMPc | Adénosine monophosphate cyclique |
| AR | <i>Arginine Rich</i> riche en arginine |
| ARN | Acide RiboNucléique |
| ARNm | ARN messagers |
| ARNnc | ARN non codant |
| ARNp | ARN polymérase |
| ARNr | ARN ribosomique |
| ARNt | ARN de transfert |
| ATPase | Adenosine triphosphatase |
| C-terminal | carboxy-terminal |
| DNase | Désoxyribonucléase |
| fMét | formylméthionyl |
| FMN | Flavine Mononucléotide |
| GlmS | Glucosamine-6-phosphate |
| nt | nucléotide |
| N-terminal | amine-terminal |
| NTP | Nucléotide Triphosphate |
| ORF | <i>Open reading frame</i> |
| PAP | Poly(A) polymérase |
| pH | potentiel hydrogène |
| Poly (A) | Poly Adenine |
| Poly (U) | Poly Uracil |
| RNase | Ribonucléase |

| | |
|-------|--|
| rut | <i>Rho utilisation (site d'utilisation de Rho)</i> |
| RppH | ARN Pyrrophosphohydrolase |
| SAM | S-Adenosyl méthionine |
| SD | Shine Dalgarno |
| SELEX | <i>Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment</i> |
| TPP | Thiamine pyrophosphate |

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Résumé des mécanismes de contrôle des riborégulateurs d'*E.coli* 157

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Étape d'initiation de la traduction | 2 |
| Figure 2 : Modèles de translocation de Rho au long de l'ARN..... | 6 |
| Figure 3 : Modèles de compétition entre Rho et le ribosome pour la liaison à l'ARNm .. | 8 |
| Figure 4 : Voie de dégradation des ARNm chez <i>E. coli</i> | 10 |
| Figure 5 : Représentation des différents domaines de la RNase E | 11 |
| Figure 6 : Les différentes voies d'entrée de la RNase E pour accéder à son substrat | 13 |
| Figure 7 : Le dégradosome ARN | 14 |
| Figure 8 : Représentation des deux modes de dégradation de l'ARNm | 16 |
| Figure 9 : Mécanismes d'action des petits ARN régulateurs par appariement de bases à un ARNm. | 19 |
| Figure 10 : Structure secondaire des petits ARN OmrA et OmrB..... | 21 |
| Figure 11 : Résumé du mécanisme d'action des petits ARN OmrA et OmrB | 23 |
| Figure 12 : Schématisation d'un riborégulateur bactérien..... | 24 |
| Figure 13 : Représentation des différentes classes de riborégulateurs | 26 |
| Figure 14 : Principaux mécanismes de contrôle de l'expression génique employés par les riborégulateurs bactériens | 30 |
| Figure 15 : Principe des contrôles cinétique et thermodynamique des riborégulateurs .. | 31 |
| Figure 16 : Structure d'une molécule de TPP | 33 |
| Figure 17 : Représentation du contexte génomique du riborégulateur <i>thiM</i> d' <i>E. coli</i> | 33 |
| Figure 18 : Structure secondaire et tertiaire du riborégulateur <i>thiM</i> d' <i>E. coli</i> | 34 |
| Figure 19 : Contrôle de l'initiation de la traduction par le riborégulateur <i>thiM</i> d' <i>E. coli</i> | 35 |
| Figure 20 : Structure d'une molécule d'AdoCbl | 37 |

Figure 21 : Représentation du contexte génomique du riborégulateur *btuB* d'*E. coli* 37

Figure 22 : Structure secondaire et structure tertiaire du riborégulateur *btuB*..... 39

Figure 23 : Contrôle de l'initiation de la traduction par le riborégulateur *btuB* d'*E. coli* 40

DISCUSSION

Figure 24 : Mécanisme direct et indirect de contrôle de l'ARNm par les riborégulateurs 159

Figure 25 : Régulation co- et post-transcriptionnelle 161

Figure 26 : Mécanisme de terminaison Rho-dépendante induit par un riborégulateur 163

Figure 27 : Mécanisme de terminaison Rho-dépendante induit par les petits ARN 167

Figure 28 : Mécanisme de dégradation de l'ARNm induit par les petits ARN et les riborégulateurs. 169

INTRODUCTION

A- Mise en contexte

A.1- Le contrôle de l'initiation de la traduction chez les procaryotes

A.1.1- Aperçu de l'étape d'initiation de la traduction

L'étape limitante de la synthèse protéique est l'initiation de la traduction (Kudla *et al.*, 2009). Celle-ci dépend de l'assemblage du complexe d'initiation qui est composé de la sous-unité 30S du ribosome, de l'ARNt (acide ribonucléique de transfert) initiateur et de l'ARNm (ARN messenger) à traduire (Fig. 1).

La sous-unité 30S s'associe à l'ARNm au niveau du site de liaison du ribosome appelé région Shine-Dalgarno (SD). Le SD est une séquence de 3 à 8 nt (nucléotides) de long, riche en purine, qui est localisée de 5 à 8 nt en amont du codon d'initiation de la traduction dans la région 5' non traduite (5'UTR pour 5' *untranslated region*) de l'ARNm. La liaison du ribosome au SD passe par une interaction entre le SD et une séquence complémentaire présente à l'extrémité 3' de l'ARNr 16S (ARN ribosomal), un composant de la sous-unité 30S. En parallèle, l'ARNt initiateur (le plus souvent un *N*-formylméthionyl-ARNt^{Mét}) s'apparie *via* sa séquence anticodon au codon d'initiation de la traduction de l'ARNm (le plus souvent un AUG parfois un GUG). Une fois que les éléments du complexe de préinitiation sont assemblés, la sous-unité 50S du ribosome s'associe et l'étape d'élongation de la traduction peut s'ensuivre (Fig. 1).

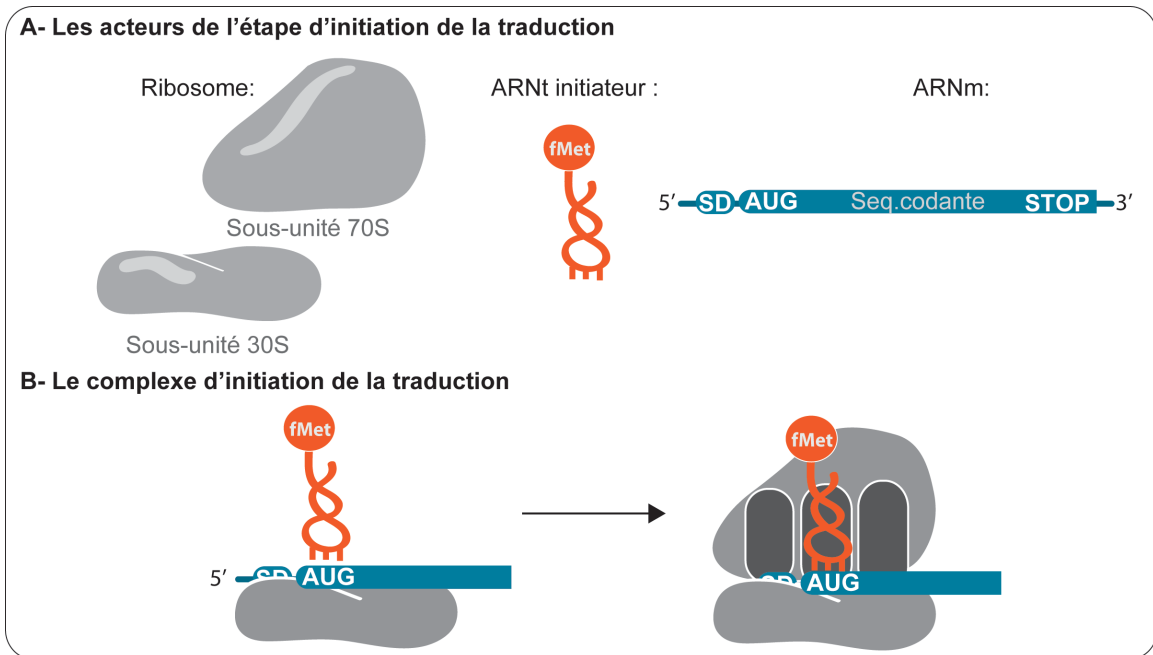


Figure 1 : Étape d'initiation de la traduction. SD : Shine Dalgarno. AUG : codon d'initiation de la traduction, Seq codante : séquence codante, STOP : codon stop. L'ARNt initiateur est ici un N-formylméthionyl-ARNt^{fMet} (fMet : formylméthionine). Les Ribosomes, l'ARNt initiateur ainsi que l'ARNm sont les composantes permettant l'initiation de la traduction (A). Une fois que la sous-unité 30S et l'ARNt s'associent à l'ARNm, la sous-unité 70S peut s'assembler au complexe (B).

A.1.2- Modulation de l'initiation de la traduction

Le niveau de traduction est tributaire de plusieurs paramètres intrinsèques à la région d'initiation (Osterman *et al.*, 2012). Parmi ces éléments sont retrouvés : la stabilité de l'interaction entre la séquence du SD et la séquence anti-SD de l'ARNr 16S; la distance entre le SD et le codon d'initiation; la nature du codon d'initiation de la traduction ou bien la présence de structures de l'ARN. L'ensemble de ces paramètres permet d'établir un niveau basal adéquat de protéine par rapport aux besoins cellulaires.

Afin de répondre aux changements environnementaux, l'étape d'initiation de la traduction peut être soumise à des régulations génétiques. Les principaux acteurs de ce contrôle sont des ARN non-codants (ARNnc) régulateurs et des protéines liant l'ARN.

Généralement, le mécanisme implique l'obstruction à l'accès des ribosomes à la région d'initiation de la traduction de l'ARNm.

A.1.3- Effet de l'inhibition de la traduction sur le niveau d'ARNm

Le ralentissement ou l'inhibition complète de la traduction induit souvent un arrêt prématuré de la transcription (Bossi *et al.*, 2012.; de Smit *et al.*, 2008) ou la dégradation complète de l'ARNm (Deana et Belasco, 2005). Dans les deux cas, le principe est similaire : l'absence de ribosome sur l'ARNm permet la formation de structures terminatrices ou bien facilite l'accès de facteurs de terminaison de la transcription ou d'endoribonucléases.

A.2- Vue globale du projet de thèse

Dans le projet de thèse présenté ici, nous nous intéressons à deux types d'ARN régulateurs bactériens qui contrôlent l'expression génétique au niveau de l'initiation de la traduction. Ce contrôle traductionnel module la quantité d'ARNm des gènes régulés. Afin de comprendre au mieux les mécanismes mis en jeu dans une telle régulation, la prochaine partie décrit l'impact de la régulation traductionnelle sur le niveau d'ARNm. Plus précisément sur la terminaison Rho-dépendante et la dégradation puisque ce sont ces deux mécanismes qui nous intéressent ici. La partie suivante aborde les ARN régulateurs bactériens et met l'emphase sur les protagonistes du projet qui sont les riborégulateurs *thiM* et *btuB* ainsi que les petits ARN régulateurs OmrA et OmrB d'*Escherichia coli*.

B- Impact de la régulation traductionnelle sur le niveau d'ARNm

B.1- Impact de l'inhibition de la traduction sur la terminaison Rho-dépendante

B.1.1- La terminaison de la transcription Rho-dépendante

B.1.1.1- Importance de la terminaison Rho-dépendante

La terminaison Rho-dépendante joue un rôle crucial dans la physiologie bactérienne. Les terminateurs Rho-dépendants requièrent la protéine Rho qui est une hélicase hexamérique avec une activité ATPase (adénosine triphosphatase). Au cours de la transcription, Rho se lie et transloque dans le sens 5' → 3' le long de l'ARNm jusqu'à rencontrer l'ARN polymérase (ARNp). Ceci aboutit à la dissociation de l'ARNp du duplex ARN/ADN (acide désoxyribonucléique).

Une étude menée par l'équipe de Landick a permis d'identifier chez *E. coli*, dans des conditions données, 199 sites de terminaison de la transcription Rho-dépendantes putatifs (Peters *et al.*, 2009). Parmi ces sites, 102 sont localisés dans des régions intergéniques et permettraient la terminaison de la transcription des ARNm ou petits ARNnc. Les 97 autres sites restants de terminaison Rho-dépendantes sont localisés dans des régions intragéniques. Ces derniers seraient dépendants de l'efficacité du processus de traduction. Ainsi, ils aideraient à diminuer la quantité d'ARNm lorsque ceux-ci sont peu ou pas traduits. Rho est aussi responsable de l'effet de polarité de la transcription d'un opéron (de Smit *et al.*, 2008). En effet, lorsque l'un des premiers gènes d'un opéron est peu ou pas traduit, sa transcription est réduite par action de la protéine Rho. Ceci a un impact direct sur l'expression des gènes situés en aval. Ainsi, il est clair que le mécanisme liant Rho aux ribosomes est d'une importance primordiale pour la cellule.

B.1.1.2- Mécanisme de la terminaison Rho-dépendante

Trois étapes décrites dans les lignes suivantes caractérisent la terminaison Rho dépendante (Peters, Vangeloff, et Landick, 2011).

B.1.1.2.1- Liaison de Rho à l'ARN

Tout d'abord, la protéine Rho se lie à des séquences d'ARN non structurées appelées sites *rut* (*Rho utilisation site*). Comme les séquences *rut* sont très variables, il n'existe aucun consensus permettant une identification *in silico* des terminateurs Rho-dépendants. Cependant, l'analyse des sites *rut* connus montrent que Rho se lie préférentiellement à des séquences d'ARN linéaire d'environ 70 à 80 nt qui ont la particularité d'être riche en cytosine. Des expériences de SELEX *in vitro* (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) montrent que Rho peut se lier aussi efficacement à des régions riches en cytosine qu'à des structures tige-boucles (Schneider *et al.*, 1993). Ainsi les sites de liaison de Rho pourraient être bien plus complexes que ceux qui sont actuellement connus.

B.1.1.2.2- Translocation de Rho le long de l'ARN

Après sa liaison au site *rut*, Rho transloque le long de l'ARN dans le sens 5' → 3' grâce à son activité ATPase. Deux modèles de translocation sont proposés (Peters *et al.*, 2011). Dans un premier modèle nommé « poursuite » (*tracking*), le site *rut* est toujours associé à Rho pendant la translocation (Fig. 2A). Dans le second modèle, nommé « translocation simple », le site *rut* est dissocié et l'ARN passe dans la cavité centrale de la protéine Rho (Fig. 2B).

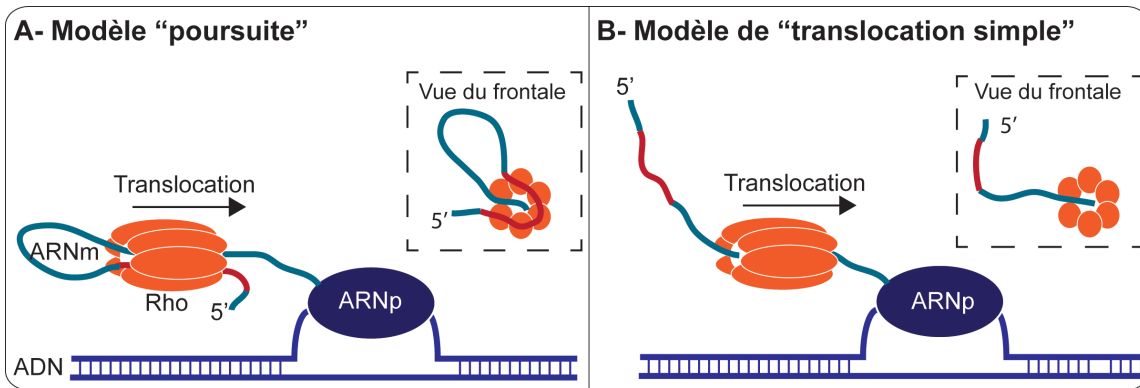


Figure 2 : Modèles de translocation de Rho au long de l'ARN. Le site *rut* est représenté en rouge sur l'ARNm. Les modèles représentent la vue latérale de la protéine Rho. L'encadré montre la vue frontale de la protéine Rho en cours de translocation. Dans le modèle de poursuite (A) le site *rut* est toujours associé à Rho contrairement au modèle de translocation simple (B).

B.1.1.2.3- Dissociation de l'ARN polymérase

À l'étape finale Rho dissocie le complexe d'élongation de la transcription arrêté à un site de pause. Les pauses de l'ARNp au cours de la transcription sont induites par des séquences d'ADN ou des structures naissantes de l'ARNm (Artsimovitch et Landick 2000; Komissarova et Kashlev 1997; Landick 2009). Généralement la terminaison a lieu à plusieurs sites de pauses localisés entre 60 et 120 nt en aval du site *rut* (Lau *et al.*, 1982; Hollands *et al.*, 2012).

Trois modèles expliquent comment le facteur Rho permet la dissociation de l'ARNp de l'hybride ARN-ADN (Peters *et al.*, 2011). Dans un premier modèle, appelé « la cassure des hybrides » (*hybrid shearing*), Rho transloque le long de l'ARN diminuant ainsi la distance la séparant de l'ARNp. Quand Rho et l'ARNp sont à proximité, ceci induit une tension de l'ARN qui déstabilise le duplex ARN:ADN et déloge l'ARNp. Dans le second modèle, appelé « hypertranslocation », Rho pousse l'ARNp qui transloque sur l'ADN sans faire l'élongation de l'ARN. Enfin dans un dernier modèle, appelé « invasion », c'est l'activité hélicase de Rho qui permet de défaire l'hybride ARN:ADN aboutissant ainsi à la dissociation de l'ARNp.

B.1.2- La traduction et la terminaison Rho-dépendante

B.1.2.1 Le couplage entre la transcription et la traduction

L'efficacité du couplage du processus de transcription et de traduction est déterminante dans la terminaison Rho dépendante. Chez les bactéries, la traduction commence dès que le SD émerge de l'ARNp. L'ARNp est donc suivie de près par les ribosomes. Nudler et son équipe ont récemment découvert que le taux de transcription est dépendant du taux de traduction (Proshkin *et al.*, 2010). Dans leur modèle, le ribosome pousse l'ARNp.

La coordination entre les processus de traduction et de transcription repose sur l'interaction de la protéine NusG avec la protéine NusE (aussi nommée S10; Burmann *et al.*, 2010). NusG est un facteur d'élongation de la transcription qui est lié *via* son domaine N-terminal à l'ARNp (Sevostyanova et Artsimovitch, 2010). Cette interaction a pour effet d'accélérer la transcription. Le domaine C-terminal de NusG interagit avec la protéine NusE. La protéine NusE est quant à elle associée à la sous-unité 30S du ribosome. L'interaction NusG :NusE permet ainsi d'ajuster le taux de transcription par rapport au niveau de traduction (Fig. 3B).

Les pauses de l'ARNp au cours de la transcription participent aussi au couplage de la synthèse d'ARN et de protéines (Gong et Yanofsky, 2003; Landick *et al.*, 1985). Lorsque l'ARNp s'arrête à un site spécifique durant la biosynthèse d'ARN, ceci alloue du temps au ribosome pour rejoindre le complexe d'élongation de la transcription. Une fois que le ribosome contacte l'ARNp, celle-ci est libérée de son site de pause et poursuit ainsi l'élongation de la transcription.

B.1.2.2- Compétition entre Rho et le ribosome pour l'accès à l'ARNm

Lorsque les sites de terminaison sont dans des régions traduites de l'ARNm, Rho et le ribosome sont en compétition pour leur liaison à l'ARNm [18]. Deux modèles sont actuellement proposés afin d'expliquer ce phénomène. Dans un premier modèle, la

présence de ribosomes sur l'ARNm masque les sites *rut*. De ce fait, Rho ne peut pas se lier à l'ARNm naissant (Fig. 3A). Lorsque la traduction est diminuée ou bien arrêtée, Rho accède plus facilement au site *rut* et provoque l'arrêt de la transcription. Dans un second modèle, Rho et le ribosome sont en compétition pour lier le facteur NusG complexé à l'ARNp (Fig. 3B). La protéine NusG est, dans certains cas, essentielle à la terminaison Rho-dépendante (Peters *et al.*, 2014). Le domaine C terminal de NusG peut lier la protéine Rho (Chalissery *et al.*, 2011). Les interactions NusG-NusE (voir section précédente) et NusG-Rho sont mutuellement exclusives. Dans un contexte où la traduction est efficace, la protéine NusE du ribosome interagit avec NusG, ce qui empêche l'association NusG-Rho de se former. En revanche, si la traduction est arrêtée ou inefficace, Rho peut alors interagir avec la protéine NusG et terminer la transcription. Les deux modèles présentés ci-dessus ne sont pas incompatibles puisque la liaison de Rho au site *rut* n'exclue pas une interaction entre Rho et NusG.

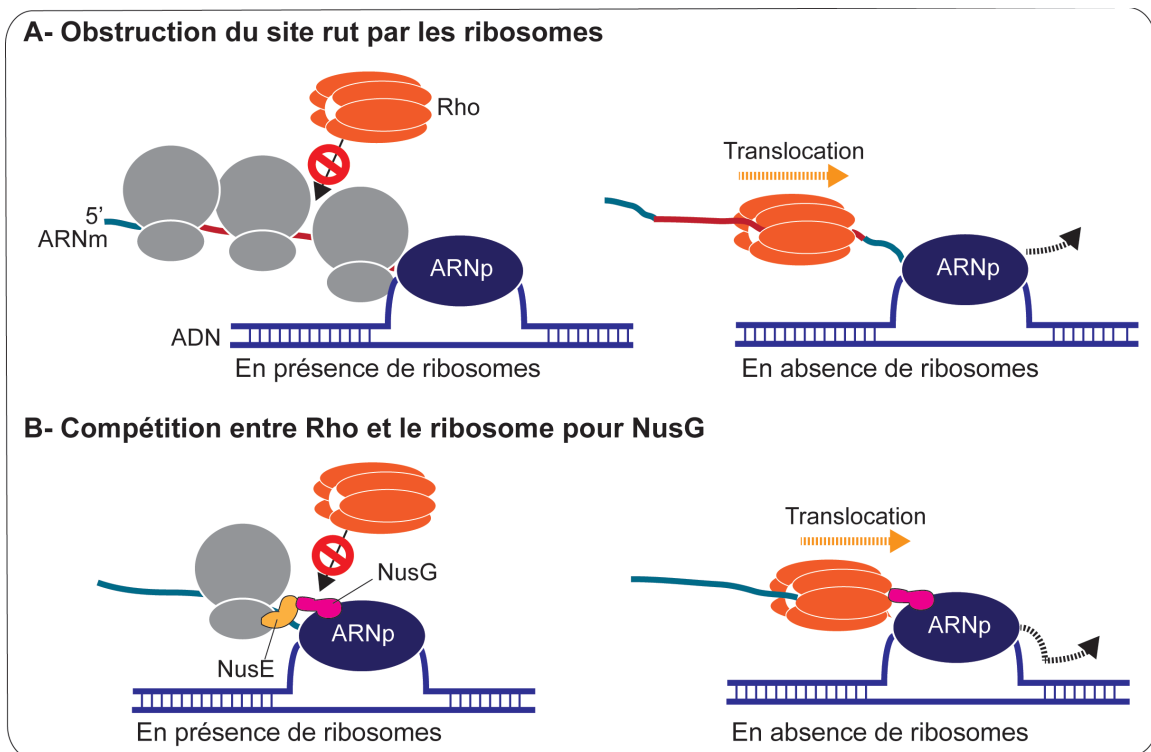


Figure 3 : Modèles de compétition entre Rho et le ribosome pour la liaison à l'ARNm. Le site *rut* est représenté en rouge sur l'ARNm. Les ribosomes masquent le site *rut* par encombrement stérique (A). Rho et le ribosome sont en compétition pour lier le facteur NusG qui est associé à l'ARNp (B).

B.2- Impact de l'inhibition de la traduction sur la dégradation de l'ARNm

B.2.1- Aperçu des étapes de la dégradation chez *E. coli*

Les processus de dégradation de l'ARN font participer de façon combinée des endoribonucléases et des 3' exoribonucléases (Fig. 4). La dégradation est généralement initiée par une endoribonucléase qui clive les liens phosphodiester internes de l'ARN. C'est souvent la RNase E qui amorce le processus de dégradation. Le clivage endonucléolytique initial est considéré comme limitant pour la suite de la dégradation (Fig. 4A; Deana and Belasco 2005; Mackie 2013). Les fragments d'ARN résultants sont dégradés par des exoribonucléases qui clivent de façon processive le nucléotide terminal de la chaîne d'ARN dans le sens 3' → 5' sans spécificité de séquence (Fig. 4B et C; Kushner 2002). La PNPase, la RNase II et la RNase R sont les principales exoribonucléases impliquées dans la dégradation des ARN. La RNase R et la PNPase, contrairement à la RNase II, peuvent dégrader des ARN structurés. Toutefois, ces deux enzymes nécessitent une région linéaire d'ARN comme point d'ancrage pour amorcer la réaction (Belasco, 2010). Pour pallier à cela, la cellule possède une poly(A) polymérase (PAP) qui ajoute une succession d'une vingtaine d'adénines en 3' de l'ARN (queue poly(A)). Ceci suffit à initier la dégradation par les exoribonucléases (Fig. 4C; Andrade *et al.*, 2009; Hajnsdorf *et al.*, 1995; Liu et Parkinson 1989). L'ajout répété d'une queue poly(A) ainsi que parfois l'aide d'une hélicase, facilite la dégradation complète d'ARN très structurés (Coburn *et al.*, 1999a). Enfin, l'oligoRNase intervient à la toute fin du processus de dégradation (Ghosh et Deutscher, 1999). Cette enzyme est une exoribonucléase essentielle à la cellule. Elle convertit les intermédiaires de dégradation présents sous forme de courts oligonucléotides en mononucléotides afin qu'ils soient utilisés *de novo* pour la transcription.

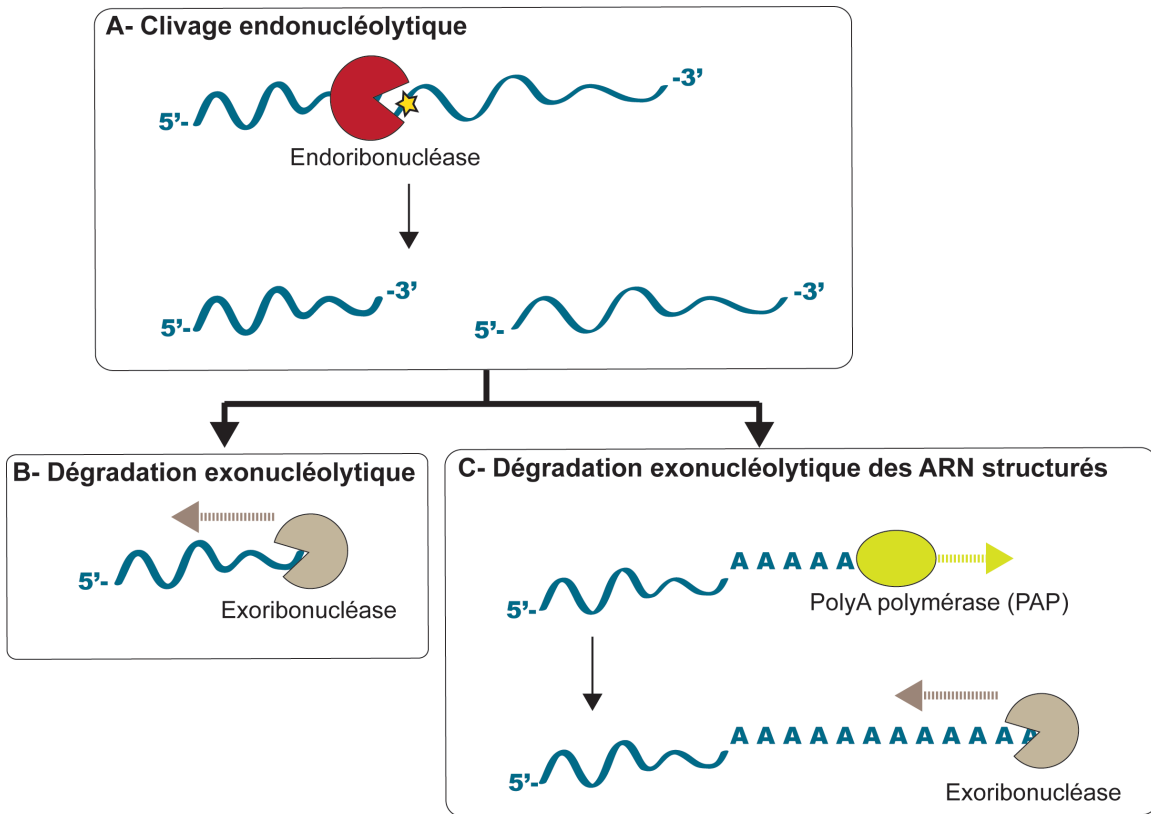


Figure 4 : Voie de dégradation des ARNm chez *E. coli*. Le processus de dégradation débute par le clivage d'une endoribonucléase (A). Les fragments résultants sont ensuite pris en charge par des exoribonucléase (B). Si les fragments d'ARN sont structurés, la PAP ajoute une queue poly(A) afin que les exoribonucléases puissent poursuivre la dégradation (C).

B.2.2- La RNase E

La RNase E est considérée comme l'enzyme majeure de dégradation et de maturation des ARN. Cette endoribonucléase est connue pour être impliquée dans la maturation des ARNr (5S et 16S), des ARNt et de la sous-unité ARN de la RNase P (Ghora et Apirion 1978; Li *et al.*, 1999; Li et Deutscher, 2002; Lundberg et Altman, 1995). En plus de cela, plusieurs études montrent que la RNase E joue un rôle primordial dans la dégradation de l'ensemble des ARN chez *E. coli*. Des analyses transcriptomiques (Stead *et al.*, 2011) révèlent ainsi que l'absence de la RNase E affecte la quantité d'environ 60% des ARN

chez *E. coli*. Les prochaines sections visent à donner un aperçu du fonctionnement de la RNase E.

B.2.2.1- Structure de la RNase E

La RNase E est un tétramère composé de quatre monomères Rne qui forment le cœur du complexe protéique appelé Dégradosome ARN (Callaghan *et al.*, 2005). Chaque monomère contient 1061 acides aminés et peut être subdivisé en deux domaines majeurs (Fig. 5). La partie globulaire N-terminale (de 1 à 529 acides aminés) héberge l'activité catalytique de l'enzyme. La partie C-terminale (de 565-1061 acides aminés) est faiblement structurée. Elle est le siège des interactions avec des protéines composant le complexe du Dégradosome ARN (voir section B.2.3). Le domaine C-terminal possède également un motif de liaison aux phospholipides responsable de l'association de la RNase E à la membrane interne de la paroi bactérienne (Khemici *et al.*, 2008).

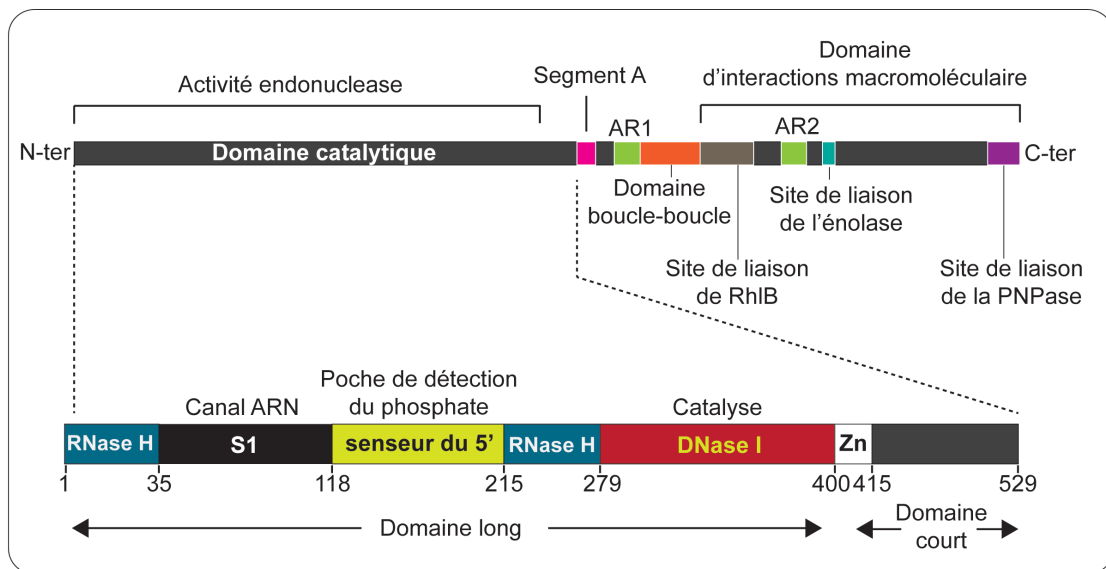


Figure 5 : Représentation des différents domaines de la RNase E. Le domaine N-terminal porte l'activité catalytique et est divisé en plusieurs sous-domaines fonctionnels. Le domaine DNase I like (désoxyribonucléase) catalyse le clivage. Les domaines RNase H se replient de façon similaire à la RNase H, mais aucune fonction ne leur est attribuée à ce jour. La région Zn lie le zinc pour la coordination des deux monomères Rne. Le

domaine C-terminal permet l'association à différentes protéines et à la membrane interne par le segment A. Deux segments riches en arginine (AR1 et AR2) seraient impliqués dans la liaison à l'ARN.

B.2.2.2- Mécanisme de dégradation par la RNase E

La RNase E clive usuellement des régions linéaires de l'ARN riches en résidu adénine et uracile. Elle peut accéder à son substrat selon deux mécanismes bien distincts (Fig. 6).

Le premier mécanisme dépend de l'état de phosphorylation de l'extrémité 5' de l'ARNm. En effet, la RNase E a une forte affinité pour les substrats ARN présentant une extrémité 5' monophosphate (Mackie, 1998). Le cristal de la RNase E montre que le domaine senseur localisé dans la partie catalytique N-terminal peut facilement accommoder une extrémité 5' monophosphate de l'ARN (Callaghan *et al.*, 2005). La reconnaissance du 5' monophosphate augmente l'efficacité du clivage.

Cette voie d'entrée de la RNase E requiert la génération d'une extrémité 5' monophosphate car les ARNm arborent normalement une extrémité 5' triphosphate. Celle-ci peut résulter d'un clivage préliminaire par une autre endoribonucléase (Fig. 6A). Dans ce cas, la RNase E cible les ARNm dont la dégradation est déjà amorcée. L'extrémité 5' triphosphate de l'ARNm peut aussi être convertie en monophosphate par une ARN pyrophosphorylase nommée RppH (Celesnik *et al.*, 2007; Deana *et al.*, 2008). Cette enzyme ôte les groupements phosphate β et γ du 5' de l'ARN ne laissant alors que le groupement α (Fig. 6A). L'action de RppH peut être bloquée par la présence de structure tige-boucle en 5' de l'ARNm (Emory *et al.*, 1992; Hsieh *et al.*, 2013). Toutefois, ceci ne suffit pas à expliquer la spécificité de reconnaissance de RppH et la sélection des ARNm cibles.

Le deuxième mode d'accès de la RNase E à son substrat est indépendant du 5' de l'ARNm (Fig. 6B). Cette voie alternative est nommée « voie d'entrée directe » ou « voie d'entrée interne » (Bouvier et Carpousis, 2011). Une étude récente suggère qu'il s'agirait de la voie majeure de dégradation des ARN chez *E. coli* (Clarke *et al.*, 2014). Bien que le

mécanisme d'entrée interne de la RNase E ne soit pas élucidé, celui-ci impliquerait la reconnaissance spécifique de la région d'ARN à cliver.

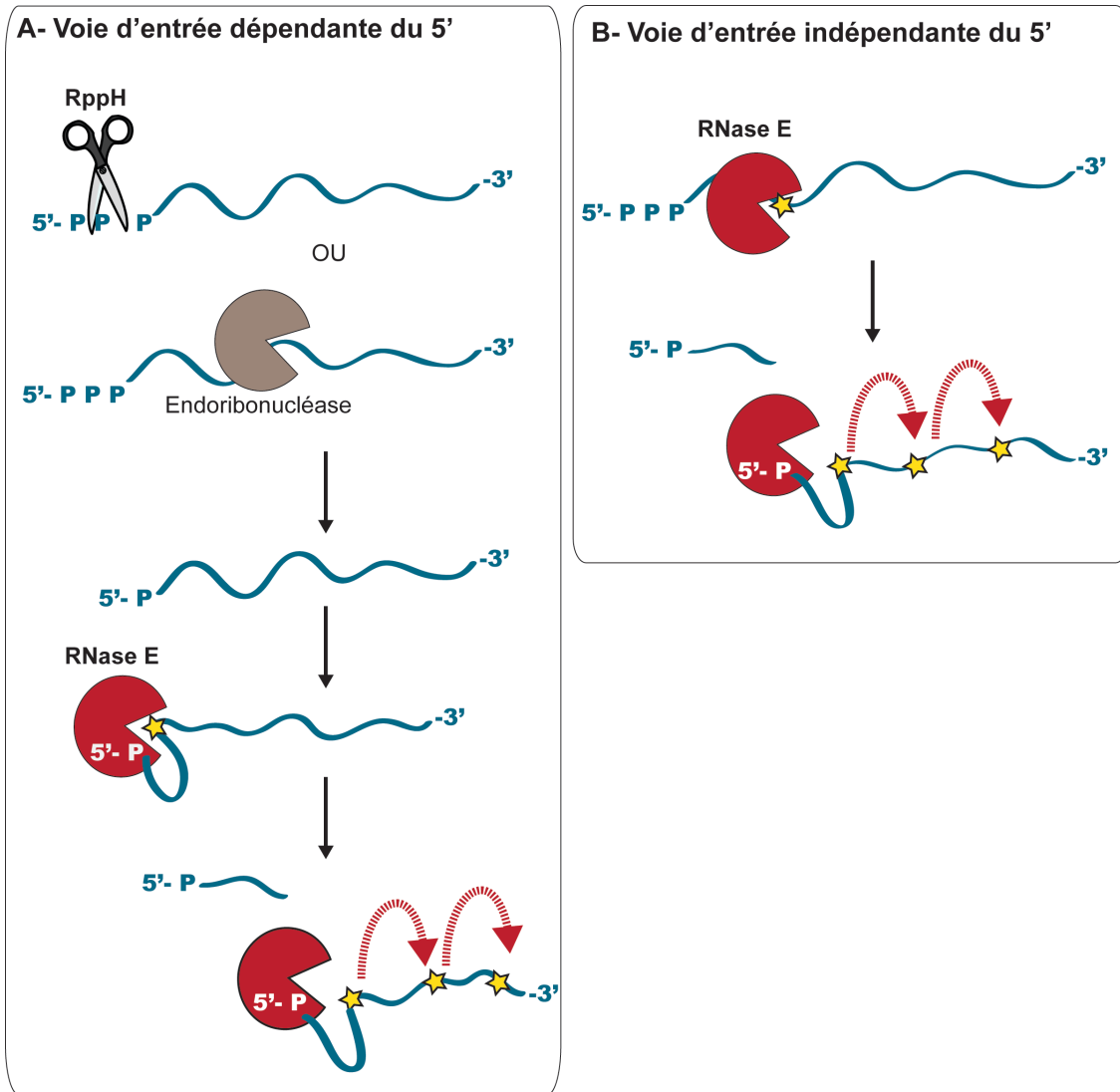


Figure 6 : Les différentes voies d'entrée de la RNase E pour accéder à son substrat. La RNase E accède à son substrat de façon dépendante (A) ou indépendante (B) de l'extrémité 5' de l'ARNm ciblé. Le clivage de la RNase E génère dans les deux cas (A et B) une extrémité 5' monophosphate qui stimule de novo l'activité de la RNase E.

B.2.3- Le dégradosome ARN

Chez *E. coli*, la RNase E fait partie d'un complexe protéique de dégradation majeur appelé « dégradosome ARN » (Fig. 7). En plus de la RNase E, le dégradosome ARN, est formé de la PNPase, d'une hélicase nommée RhlB et d'une émolase. Ces enzymes interagissent directement avec le domaine C-terminal de la RNase E (Fig. 5 et Fig. 7).

La protéine RhlB est de la famille des hélicases à motif DEAD. Ce motif très conservé est nécessaire à l'hydrolyse de l'ATP permettant l'activité hélicase. L'efficacité de l'activité de RhlB est significativement augmentée lorsque la protéine est associée au dégradosome ARN (Coburn *et al.*, 1999b). La fonction de RhlB dans le dégradosome ARN serait de dérouler les structures d'ARN qui bloqueraient la dégradation 3' → 5' par la PNPase. La RNase E, la PNPase et RhlB agiraient donc conjointement pour la dégradation rapide et efficace des ARN.

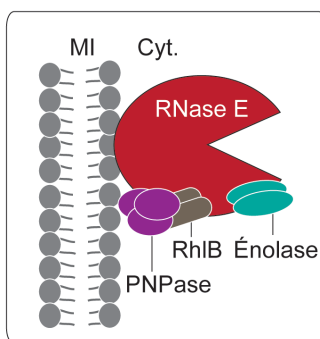


Figure 7 : Le dégradosome ARN. Le complexe est composé de la RNase E, la PNPase, l'hélicase RhlB et une émolase. Il est associé à la membrane interne de la paroi bactérienne.

L'émolase joue un rôle central dans le métabolisme bactérien puisqu'elle est impliquée dans la voie de la glycolyse [44]. Par contre, la fonction de cette enzyme au sein du dégradosome n'est pas entièrement élucidée. Une étude structurale indique que l'association de l'émolase au dégradosome faciliterait la réorganisation du site de liaison à

l'ARN (AR2, Fig. 5) de la RNase E (Chandran et Luisi 2006). De plus, l'interaction éno­lase-dégradosome affecte le niveau d'ARNm impliqués dans le métabolisme éner­gétique et la réponse au stress sucre-phosphate (Bernstein *et al.*, 2004; Morita *et al.*, 2004; Carpousis 2007). Une des hypothèses actuelles est que l'éno­lase, associée au dégradosome ARN, permettrait d'établir un lien étroit entre le métabolisme et la dégradation des ARN [48].

Outre la PNPase, l'éno­lase et RhlB, d'autres protéines peuvent faire partie du complexe de dégradation. Ainsi, la RNase II a été récemment montrée pour s'associer au dégradosome ARN en présence de RhlB et de la PNPase [49]. Le dégradosome ARN est aussi un complexe dynamique dont la composition dépend des phases ou des conditions de croissance. Par exemple, RhlB peut être remplacée par l'hélicase CsdA exprimée lors d'un choc thermique ou RhlE (Prud'homme-Genereux *et al.*, 2004; Vanzo *et al.*, 1998).

B.2.4- La traduction et la dégradation

Les processus de traduction et de dégradation de l'ARNm sont intimement liés. En effet, beaucoup d'ARN sont inactivés par l'initiation de la dégradation qui empêche par la suite le processus de traduction. Cette dégradation appelée «nucléolytique» (Fig. 8A) est souvent médiée par une endoribonucléase. Celle-ci peut cliver soit entre les ribosomes soit en aval du ribosome de tête ou enfin de part et d'autre de la région codante, au niveau de séquences importantes à la traduction (Dreyfus, 2009).

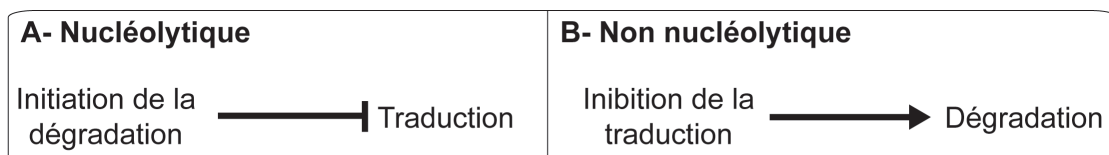


Figure 8 : Représentation des deux modes de dégradation de l'ARNm. La dégradation nucléolytique aboutit à l'inhibition de la traduction (A) tandis que la dégradation non nucléolytique est une conséquence de l'inhibition de la traduction (B).

À l'inverse de la dégradation nucléolytique, l'inhibition de la traduction peut provoquer l'initiation de la dégradation [52]. Il s'agit ici d'une dégradation «non nucléolytique» (Fig. 8B). Cette régulation est basée sur la fonction protectrice des ribosomes, car leur présence sur l'ARNm rend inaccessibles les sites de clivage aux RNases cellulaires. L'inhibition de la traduction est généralement médiée par un répresseur qui bloque l'accès des ribosomes à l'ARNm (voir section A.1.3). Alors que le contrôle traductionnel exercé ici peut être théoriquement réversible, l'initiation de la dégradation permet de rendre la régulation irréversible.

C- Les ARN régulateurs chez les procaryotes

C.1- Les petits ARN régulateurs

Les petits ARN régulateurs bactériens sont des acteurs cruciaux de la régulation génétique. Le plus souvent, ils s'apparient à un ARNm et affectent sa traduction ou sa stabilité (Lalaouna *et al.*, 2013). Les spécificités des mécanismes d'action sont néanmoins variées. Ainsi un petit ARN peut contrôler l'expression de plusieurs gènes selon des modes différents. Des études globales ont grandement facilité l'identification des petits ARN régulateurs (Thomason et Storz, 2010). À titre d'exemple, *E. coli* possède plus de 50 petits ARN de 40 à 400 nt ce qui représente plus de 1% de son génome. Les tailles et les séquences des petits ARN sont hétérogènes et leur expression répond à un large éventail de changements environnementaux (Thomason et Storz, 2010). De par l'ensemble de ces propriétés, les petits ARN assurent une régulation rapide et simultanée de l'expression génique en fonction des besoins cellulaires.

C.1.1- Aperçu des mécanismes de régulation

D'une manière générale, les petits ARN modulent l'expression génique en s'appariant à des ARNm par complémentarité de séquence. Certains petits ARN sont encodés sur le brin opposé de l'ARNm régulé. Il s'agit d'une régulation en *cis* où l'ARN s'apparie à sa cible par complémentarité de base parfaite. À l'inverse, d'autres petits ARN sont encodés sur un locus distant de l'ARNm régulé. Il s'agit alors d'une régulation en *trans* et la complémentarité de bases entre le petit ARN et l'ARNm est ici imparfaite. Dans la grande majorité des cas le petit ARN requiert la protéine chaperonne Hfq pour son fonctionnement (De Lay *et al.*, 2013; Vogel et Luisi, 2011). Les caractéristiques d'Hfq sont présentées plus en détail dans la section C.1.2. Les lignes suivantes décrivent brièvement les différents modes de régulation des petits ARN.

C.1.1.1- Mode de régulation négatif

L'appariement du petit ARN à sa cible affecte fréquemment de façon négative l'expression génique (Fig. 9A). Le mécanisme de régulation prédominant est l'inhibition de la traduction (Lalaouna *et al.*, 2013). Le petit ARN s'apparie sur ou à proximité de la région d'initiation de la traduction de l'ARNm ce qui empêche le complexe de préinitiation de la traduction de s'assembler. La synthèse protéique n'a alors pas lieu (Fig. 9Ai). De façon concomitante à l'inhibition de la traduction, le dégradosome ARN peut être recruté à l'ARNm ciblé *via* une interaction avec la protéine Hfq. Il s'en suit ainsi la dégradation du transcrit (Prévost *et al.*, 2011).

Quelques fois, l'initiation de la dégradation peut avoir lieu en absence de contrôle traductionnel (Fig. 9Aii). Selon le même principe, le dégradosome ARN est recruté au site d'appariement du petit ARN qui peut être, dans ce cas, localisé dans la région codante de l'ARNm (Pfeiffer *et al.*, 2009). La RNase III est également connue pour initier la dégradation de l'ARNm médiée par des petits ARN. Toutefois, son recrutement semble être indépendant de la protéine Hfq et passerait plutôt par la reconnaissance et le clivage du duplex petit ARN-ARNm (Huntzinger *et al.*, 2005; Viegas *et al.*, 2011).

C.1.1.2- Mode de régulation positif

A contrario des mécanismes présentés ci-dessus, l'appariement du petit ARN à l'ARNm module parfois de façon positive l'expression génique (Fig. 9B; Papenfort et Vanderpool 2015). Par exemple, celui-ci peut faciliter l'accès du ribosome au SD en induisant un changement de conformation de l'ARN dans la région d'initiation de la traduction (Fig. 9i; Prevost *et al.*, 2007). D'une tout autre façon, un petit ARN peut stabiliser un ARNm en s'appariant au niveau du site de clivage d'une RNase. Comme la RNase ne peut accéder au site, la dégradation de l'ARNm n'a pas lieu (Fig. 9Bii; Kalamorz *et al.*, 2007; Urban *et al.*, 2007).

C.1.1.3- Titration de protéines

Certains petits ARN ont un mode de régulation qui ne repose pas sur un appariement ARN-ARN, mais sur la titration de protéines liant l'ARN. Les petits ARN interagissent au niveau du site de liaison de l'ARNm de la protéine et l'empêchent d'exercer leur fonction cellulaire. Par exemple, le petit ARN 6S « mime l'ADN » et interagit ainsi avec l'ARNp associée au facteur $\sigma(70)$ (Wassarman et Storz, 2000). Ceci prévient l'association de l'ARNp avec certaines régions promotrices.

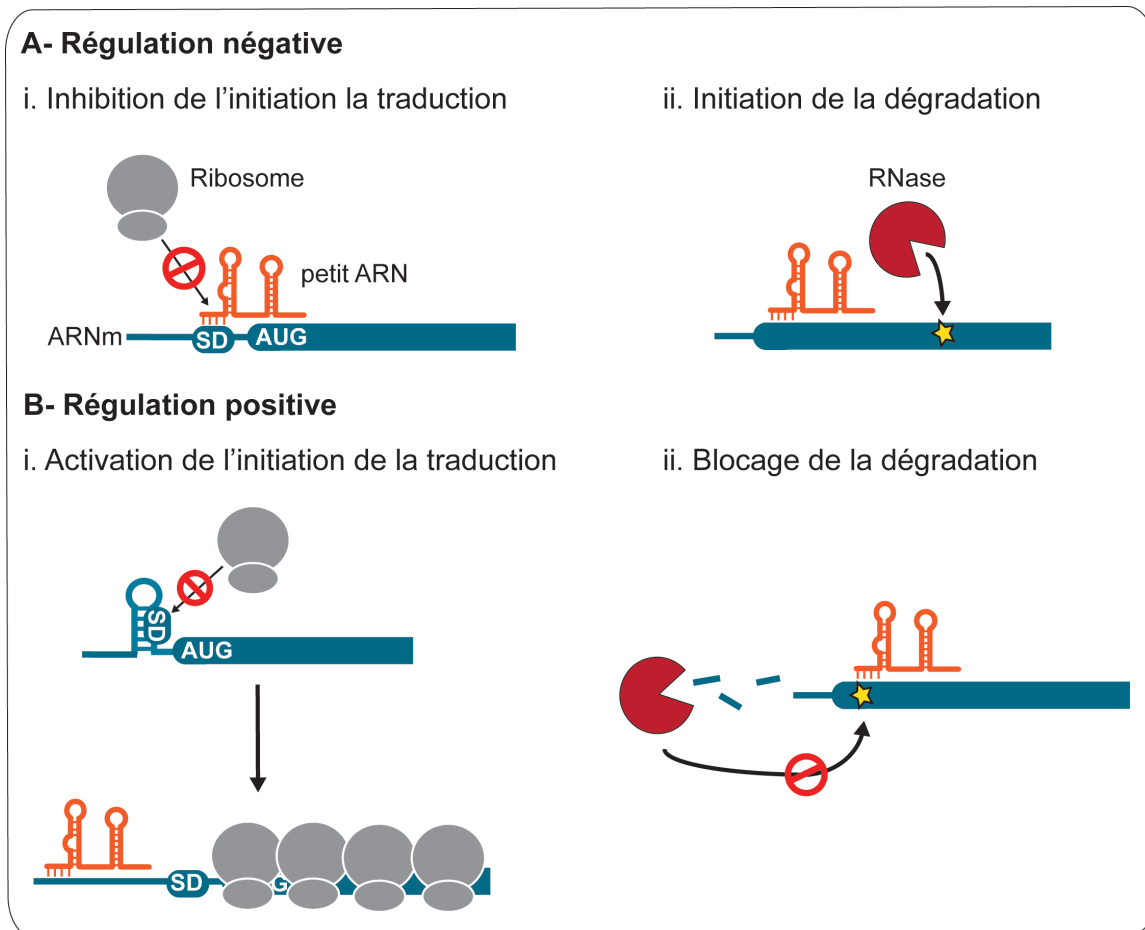


Figure 9 : Mécanismes d'action des petits ARN régulateurs par appariement de bases à un ARNm. Les petits ARN peuvent avoir un effet négatif sur l'expression génique (A) en inhibant l'initiation de la traduction (Ai.) ou bien en induisant la dégradation (Aii.). Parfois les petits ARN peuvent avoir un effet positif sur l'expression génique (B) en modifiant la structure de l'ARNm de façon à permettre l'initiation de la traduction (Bi.) ou bien en protégeant l'ARNm de la dégradation (Bii.)

C.1.2- Rôle de la protéine Hfq dans la régulation par les petits ARN

Chez *E. coli*, la majorité des petits ARN s'associent à la protéine chaperonne Hfq. Une analyse comparative montre que Hfq est homologue aux protéines Sm et LSm (*Sm-like*) qui font partie du complexe d'épissage et de dégradation chez les eucaryotes (Schumacher *et al.*, 2002). Les monomères de Hfq s'assemblent en hexamère ou dodécamère dans la cellule. La protéine forme alors un anneau avec une face dite

«proximale» et une autre face dite «distale» (Mikulecky *et al.*, 2004). La face proximale de Hfq lie les petits ARN au niveau de la queue poly(U) de leur terminateur de transcription (Otaka *et al.*, 2011). La face distale interagit avec l'ARNm au niveau de séquences riches en adénine (Link *et al.*, 2009).

Les rôles de Hfq dans la régulation sont multiples. Tout d'abord, en se liant au petit ARN, Hfq bloque l'accès aux RNases. Le petit ARN est donc stabilisé. Ensuite, en se liant à l'ARNm, Hfq augmente la concentration locale en petits ARN. Parfois, Hfq remodèle des structures de l'ARNm favorisant ainsi l'appariement du petit ARN (Zhang *et al.*, 2003; Moller *et al.*, 2002). La protéine Hfq peut avoir un rôle crucial dans la régulation de l'expression génique. Par exemple, la liaison de Hfq au niveau du SD de l'ARNm peut être directement responsable de l'inhibition de la traduction (Desnoyers et Masse 2012; Vytvytska *et al.*, 2000). La protéine Hfq est également connue pour s'associer de façon stable à la région C-terminale de la RNase E. Cette interaction est à l'origine du recrutement du dégradosome au site d'appariement. Ce qui résulte en la dégradation rapide du duplex petit ARN-ARNm (Ikeda *et al.*, 2011).

C.1.3- Les petits ARN OmrA et OmrB

C.1.3.1- Description d'OmrA et OmrB

Les séquences ADN d'OmrA et OmrB sont localisées de façon adjacente dans le génome d'*E. coli*. L'expression de ces deux petits ARN est sous le contrôle d'un système à deux composants EnvZ-OmpR qui répond au choc osmotique (Fig. 11). EnvZ est l'histidine kinase et OmpR le régulateur de réponse. Lorsque le milieu extracellulaire présente une osmolarité élevée, c'est-à-dire une forte concentration en un soluté, OmpR est phosphorylé. Sous cette forme, OmpR active l'initiation de la transcription d'OmrA et OmrB en se liant à leur séquence promotrice respective [75]. OmpR sous sa forme phosphorylée aurait plus d'affinité pour la région promotrice d'OmrB que d'OmrA (Argaman *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2003). Une étude récente indique également que

l'expression d'OmrA (mais pas celle d'OmrB) serait dépendante du facteur de transcription alternatif $\sigma(S)$ en réponse à un stress (Peano *et al.*, 2015).

Les petits ARN OmrA et OmrB comptent respectivement 88 et 82 nt de long. Tandis que les nucléotides de la région centrale diffèrent, les 21 premiers et 30 derniers nt sont similaires (Fig. 10; Guillier et Gottesman, 2006). Cette caractéristique indique qu'OmrA et OmrB pourraient contrôler l'expression de cibles identiques par la région 5' ou 3' et de cibles différentes par la région centrale.

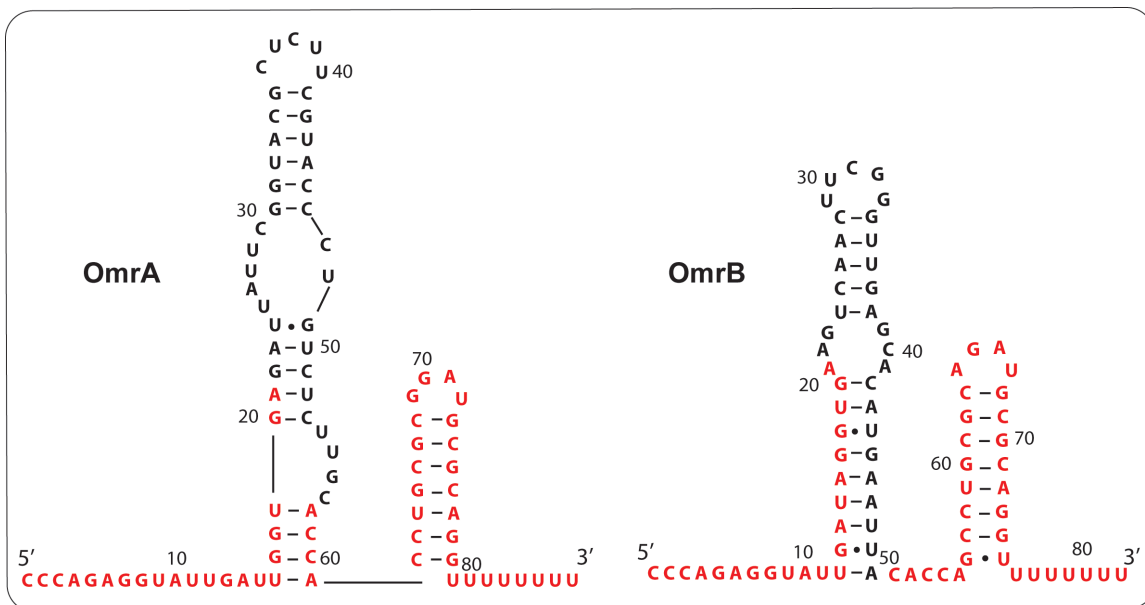


Figure 10 : Structure secondaire des petits ARN OmrA et OmrB. Les nucléotides en rouges représentent les régions similaires entre les deux petits ARN; ceux en noirs les régions variables. La structure est basée sur des analyses Mfold et sur la structure conservée donnée sur Rfam.

C.1.3.2- Les gènes régulés par OmrA et OmrB

Une étude transcriptomique a récemment montré que la surexpression d'OmrA et OmrB contrôle négativement le niveau d'ARNm codant pour des protéines de la membrane externe (Guillier et Gottesman, 2006). Parmi eux se trouvent: *ompT* codant pour une

protéase de peptides antimicrobiens; *cirA*, *fecA* et *fepA* qui codent pour des récepteurs au fer ainsi que *btuB* qui code pour un récepteur du coenzyme B12. CirA, FecA, FepA et BtuB sont également des récepteurs à colicines et aux bactériophages. La même étude montre que les deux petits ARN contrôlent l'expression de leur propre régulateur OmpR. OmrA et OmrB sont également connus pour réguler négativement l'expression des gènes *csgD*, *flhDC*, *ydaM*, impliqués dans la mobilité bactérienne (Holmqvist *et al.*, 2010; De Lay et Gottesman, 2012; Mika et Hengge, 2014).

Les deux petits ARN OmrA et OmrB provoquerait ainsi le remodelage de la composition en protéine de la membrane externe et inhiberait la mobilité cellulaire en cas de choc osmotique ou d'un autre stress. L'intérêt serait d'éviter l'entrée de composés qui pourraient nuire à la survie bactérienne et de prévenir la biosynthèse de curli et de flagelle qui serait délétère dans certaines conditions (Mika et Hengge, 2014). Dans le cas de bactéries pathogènes qui sont confrontées à des stress variés, la diminution de la présence de récepteur à surface de la bactérie pourrait permettre d'échapper au système immunitaire de l'hôte (Guillier et Gottesman, 2006; Barnhart et Chapman, 2006).

C.1.3.3- Le mode d'action d'OmrA et OmrB

Le mécanisme d'action d'OmrA et OmrB a été caractérisé plus en détail pour les cibles *ompT*, *ompR*, *cirA* et *csgD* (Guillier et Gottesman, 2008; Holmqvist *et al.*, 2010). Comme pour beaucoup d'autres petits ARN, Hfq est essentielle au mécanisme d'action d'OmrA et OmrB. Dans tous les cas caractérisés, la région 5' des deux petits ARN s'apparient directement à l'ARNm cible au niveau ou à proximité du SD (Fig. 11). Ceci résulte en l'inhibition de la traduction de l'ARNm ciblé. L'arrêt de la traduction induit par OmrA et OmrB est combiné à une dégradation rapide de l'ARNm (Fig. 11). Le dégradosome ARN est nécessaire à cette étape. Le mécanisme présenté ici est basé uniquement sur l'étude de quelques cibles. Ainsi, OmrA et OmrB pourraient employer des mécanismes d'action plus divers pour contrôler l'expression génique.

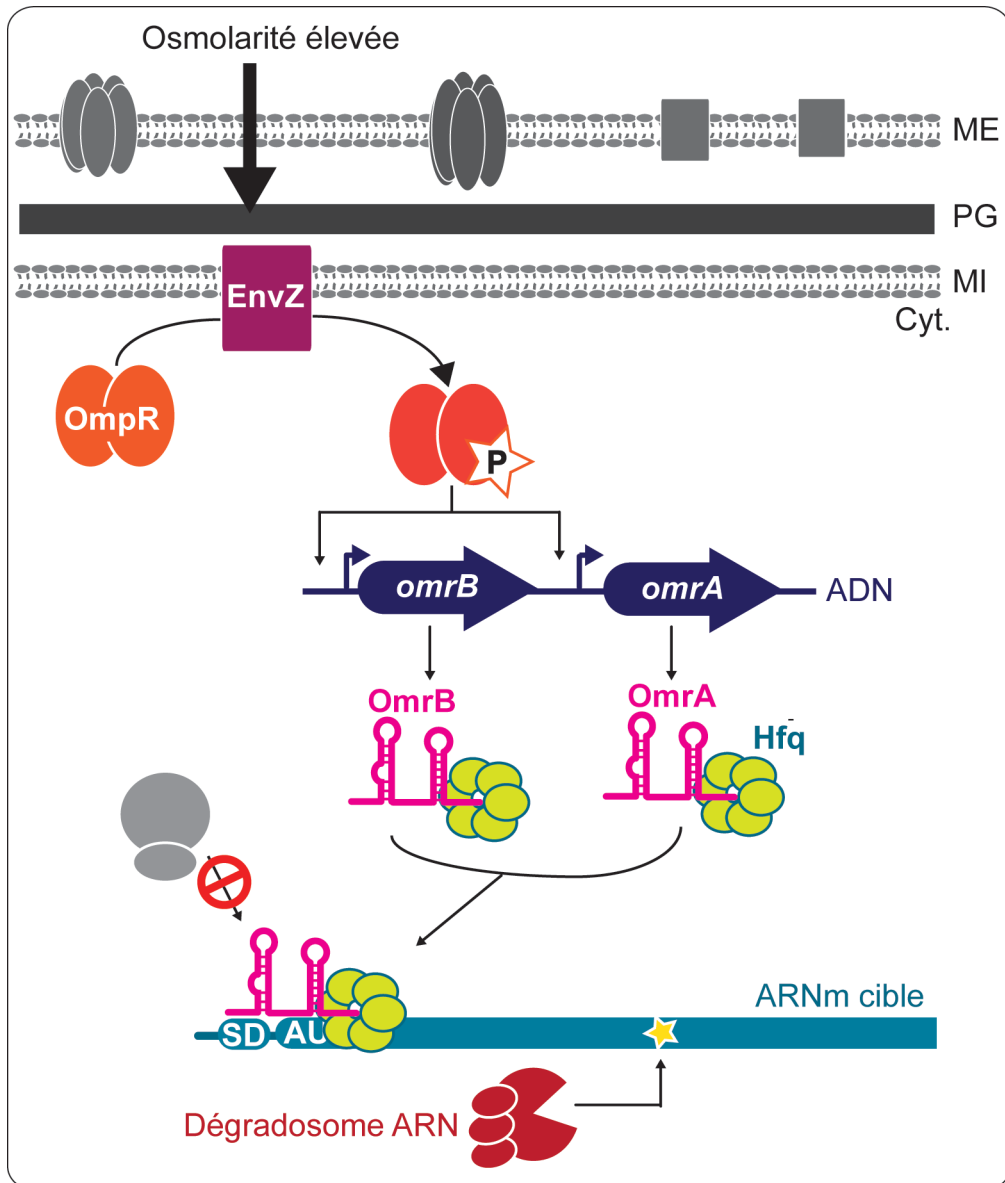


Figure 11 : Résumé du mécanisme d'action des petits ARN OmrA et OmrB. Le système à deux composants EnvZ/OmpR contrôle l'expression d'OmrA et OmrB. Les deux petits ARN requièrent la protéine Hfq. OmrA et OmrB inhibent l'initiation de la traduction et activent la dégradation de l'ARNm cible par le dégradosome ARN. Cyt cytoplasme, MI : membrane interne, ME : membrane externe, PG : peptidoglycane.

C.2- Les riborégulateurs

C.2.1- Définition du concept de riborégulateur

Les riborégulateurs sont des éléments génétiques situés dans les régions 5' non traduites de certains ARNm bactériens (Fig. 12). Ces éléments régulent l'expression du gène en aval suite à la liaison directe et spécifique d'une petite molécule. L'ARN possède donc à la fois une fonction de senseur et d'effecteur lui permettant de répondre à un stress environnemental ou cellulaire sans l'intervention de facteurs en *trans* (Serganov et Nudler, 2013).

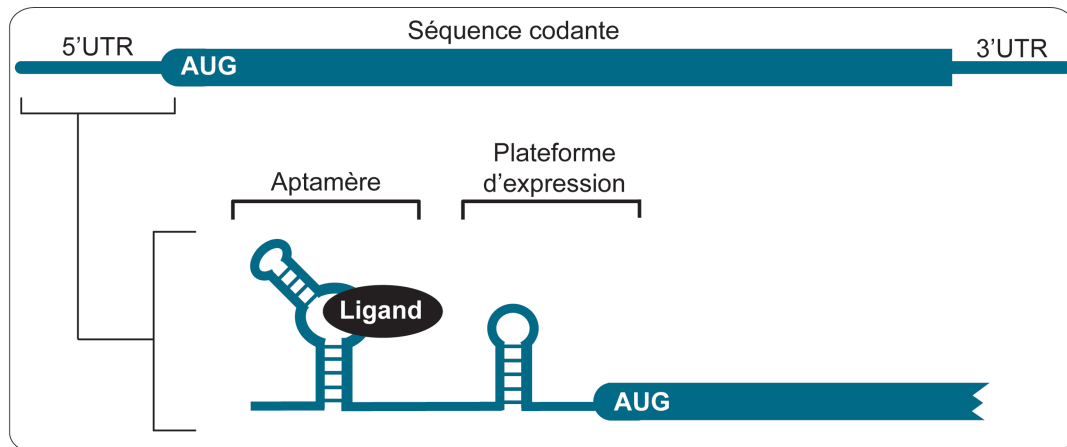


Figure 12 : Schématisation d'un riborégulateur bactérien. Les riborégulateurs sont composés de deux domaines : l'aptamère qui reconnaît un ligand et la plateforme d'expression qui module l'expression du gène en aval. 3'UTR pour 3'untranslated region (région 3'non codante).

Les riborégulateurs sont composés de deux domaines fonctionnels juxtaposés (Nudler et Mironov, 2004): un aptamère et une plateforme d'expression (Fig. 12). L'aptamère joue le rôle de senseur puisqu'il a la capacité de lier spécifiquement un métabolite. Les bases azotées sont décisives pour l'interaction avec le ligand, ainsi la séquence nucléotidique et la structure secondaire sont extrêmement conservées pour ce domaine. La liaison du métabolite à l'aptamère génère des changements conformationnels au niveau du motif. La

restructuration de la plateforme d'expression est déterminante dans la modulation de l'expression du gène adjacent. Ce domaine joue donc le rôle d'effecteur. La plateforme d'expression adopte des structures secondaires particulières pouvant moduler directement les processus d'expression génique, généralement la transcription et la traduction. La plateforme d'expression est beaucoup moins conservée que l'aptamère.

C.2.2- Diversité et abondance des riborégulateurs

De par la grande conservation de l'aptamère au cours de l'évolution, ce domaine définit la classe de riborégulateur dépendamment du métabolite reconnu. Une classe de riborégulateurs est donc composée d'un type d'aptamère, mais peut en revanche présenter des plateformes d'expressions variables. Actuellement une vingtaine de classes sont caractérisées. La grande majorité de ces éléments sont régulés par la concentration intracellulaire en un métabolite (Fig. 13- Henkin 2008). En règle générale, une molécule est reconnue par un seul type d'aptamère, soit par une classe de riborégulateurs. Néanmoins, cinq riborégulateurs différents sont capables de lier le S-adenosyl méthionine (SAM; Corbino *et al.*, 2005; Fuchs, Grundy, et Henkin, 2006) et deux lient la pré-quéuosine (Meyer *et al.*, 2008).

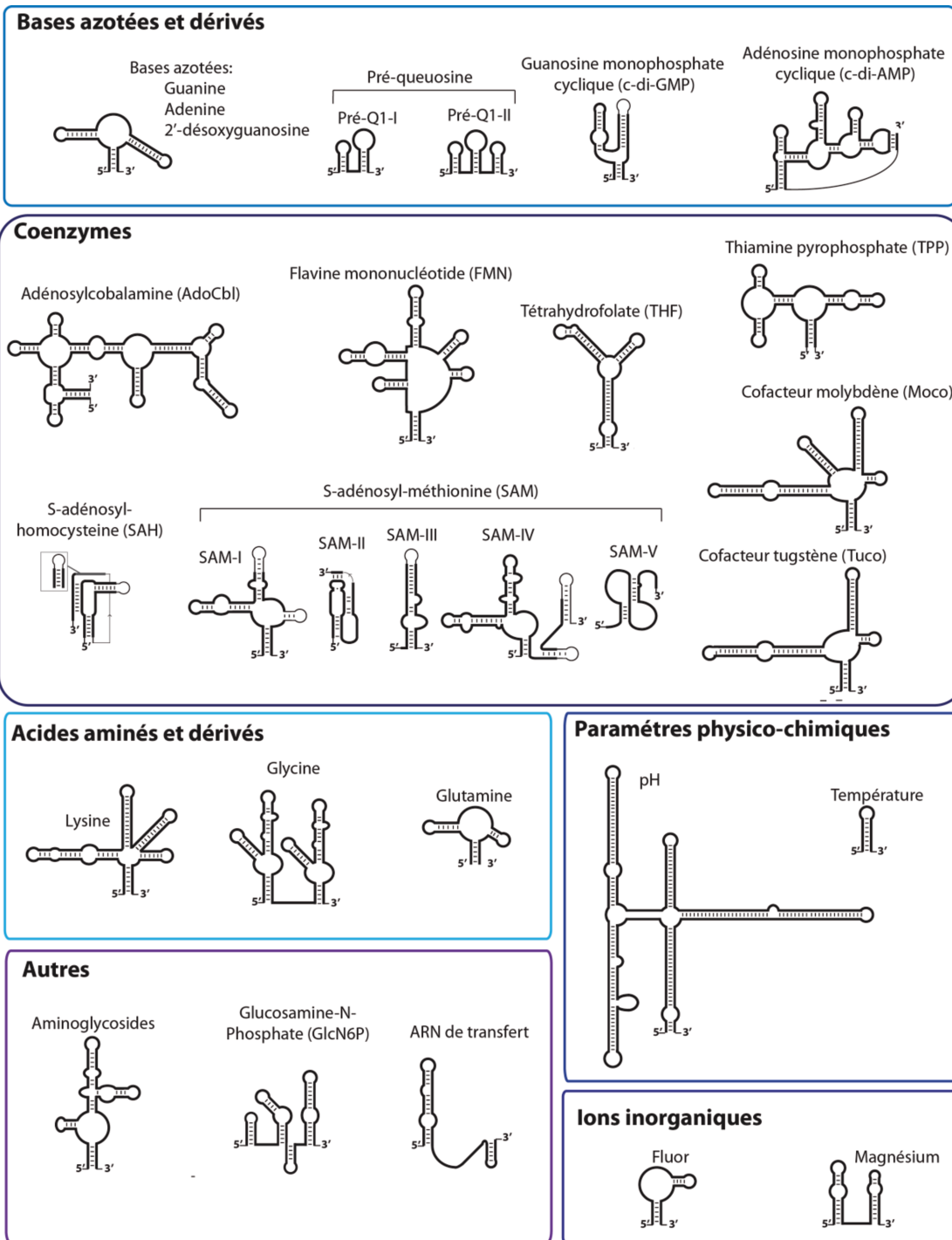


Figure 13 : Représentation des différentes classes de riborégulateurs. Il est à noter que cette représentation ne comprend pas tous les riborégulateurs actuellement connus

Il existe également des motifs d'ARN conservés qui détectent des paramètres physico-chimiques afin de moduler l'expression génique (Fig. 13). La classification de ces éléments en tant que riborégulateur est controversée, car le mécanisme ne corrèle pas entièrement avec la définition donnée qui souligne la formation d'un complexe ligand-riborégulateur. Actuellement deux classes sont connues qui sont les ARN thermosenseurs et le riborégulateur pH (potentiel hydrogène) (Narberhaus *et al.*, 2006; Nechooshtan *et al.*, 2009).

Le séquençage des génomes et les études bio-informatiques révèlent toute l'étendue de ce mécanisme de régulation chez les bactéries [91]. La base de données Rfam indique l'existence de 36 riborégulateurs (putatifs et connus) et selon Breaker, plus d'une centaine de classes de riborégulateur restent à découvrir [92]. Le riborégulateur TPP est le plus répandu à travers les espèces tandis que pré-Q1 est parmi les moins communs. À titre indicatif, Rfam signale plus de 12000 séquences correspondant au riborégulateur TPP dans ~ 4300 espèces et ~ 750 séquences du riborégulateur Pré-Q1 dans ~ 600 espèces. À ce jour, seul le riborégulateur TPP a été démontré pour contrôler l'expression génique chez les eucaryotes (Sudarsan *et al.*, 2003).

C.2.3- Les mécanismes de régulation

Les riborégulateurs interviennent essentiellement dans la modulation de l'expression de gènes du métabolisme primaire nécessaires à la croissance bactérienne. Dépendamment de la liaison du métabolite à l'aptamère, la plateforme d'expression adopte des conformations structurales distinctes définissant le mode de régulation. Le plus souvent, la formation du complexe ligand-riborégulateur a un effet inhibiteur sur l'expression génique. Les prochaines lignes visent à donner un aperçu des principaux mécanismes de contrôle utilisés par les riborégulateurs bactériens

C.2.3.1- Contrôle de la terminaison prématurée de la transcription

Dans le cas d'une régulation transcriptionnelle Rho-indépendante (Fig. 14Ai), la liaison du ligand induit la formation d'un terminateur intrinsèque de la transcription dans la plateforme d'expression. Les terminateurs sont caractérisés par une structure tige-boucle de l'ARN de 7 à 20 nucléotides, riche en GC, suivie d'une succession de 7 à 8 uraciles appelée queue poly(U). Au cours de la transcription, la formation de la tige déstabilise l'hybride ARN-ADN ce qui a pour effet de dissocier l'ARNp (Peters *et al.*, 2011). La transcription du gène localisé en aval du riborégulateur est avortée et donne lieu à un transcrit tronqué.

Récemment, les équipes de Groisman et Nudler ont montré qu'au moins deux riborégulateurs (le riborégulateur *ribB* d'*E. coli* et *mgtA* de *Salmonella enterica*) contrôlent l'expression génique par un arrêt de la transcription Rho-dépendant (Fig. 14Aii; Hollands *et al.*, 2012). Dans ce cas, la liaison du ligand rendrait accessible les sites *rut* à la protéine Rho. La protéine Rho par son activité hélicase-ATPase transloque le long de l'ARN jusqu'à rencontrer l'ARNp et la dissocier du complexe ARN-ADN (voir section B.1.1.2). Le gène localisé en aval du riborégulateur n'est alors pas transcrit.

C.2.3.2- Contrôle de l'initiation de la dégradation

L'implication des riborégulateurs dans le contrôle de la dégradation de l'ARNm a été mise en évidence avec le riborégulateur liant la glucosamine-6-phosphate (GlmS). En plus de sa fonction de riborégulateur, celui-ci possède une activité autocatalytique qui fait de lui un ribozyme [94]. La liaison du GlmS agit comme un cofacteur et favorise un clivage en amont de l'aptamère. Chez *Bacillus subtilis*, il a été montré que l'ARN résultant arbore une extrémité 5'OH qui est reconnue par les RNases cellulaires. Suite à l'autoclivage, l'ARNm est donc rapidement dégradé. Le cas du riborégulateur GlmS reste particulier. À ce jour, un tel mécanisme n'a jamais été rencontré pour d'autres classes de riborégulateurs.

Notre équipe a récemment découvert un tout autre mécanisme de régulation de l'initiation de la dégradation qui pourrait être davantage répandu (Caron *et al.*, 2012). En plus de contrôler l'initiation de la traduction, le riborégulateur lysine d'*E. coli* module l'accessibilité de sites de clivage de la RNase E qui sont localisés dans la plateforme d'expression (Fig. 14B). En absence de ligand, les sites de clivage sont séquestrés dans une structure tige-boucle. L'ARNm *lysC* n'est alors pas dégradé. En présence de ligand, la plateforme d'expression change de conformation et les sites deviennent accessibles à la RNase E. L'ARNm *lysC* est alors rapidement dégradé.

Dernièrement, le contrôle de l'initiation de la dégradation a été également retrouvé pour le riborégulateur FMN de *Corynebacterium glutamicum* (Takemoto *et al.*, 2014). Ce riborégulateur contrôlerait directement l'accessibilité d'un site de clivage de la RNase G (homologue à la RNase E) en fonction de sa liaison au FMN. En plus du contrôle de l'initiation de la dégradation, ce riborégulateur modulerait aussi directement la terminaison Rho-dépendante.

C.2.3.3- Contrôle de l'initiation de la traduction

Dans le cas d'une régulation traductionnelle (Fig. 14C), la plateforme d'expression module la formation d'une structure tige-boucle qui séquestre les signaux d'initiation de traduction. En absence de ligand, le SD et le codon d'initiation de la traduction sont accessibles aux ribosomes. L'ARNm est donc traduit. En présence de ligand, le SD et/ou le codon d'initiation de la traduction sont séquestrés dans la structure tige-boucle. Les ribosomes ne peuvent pas accéder à ces signaux, l'ARNm n'est alors pas traduit.

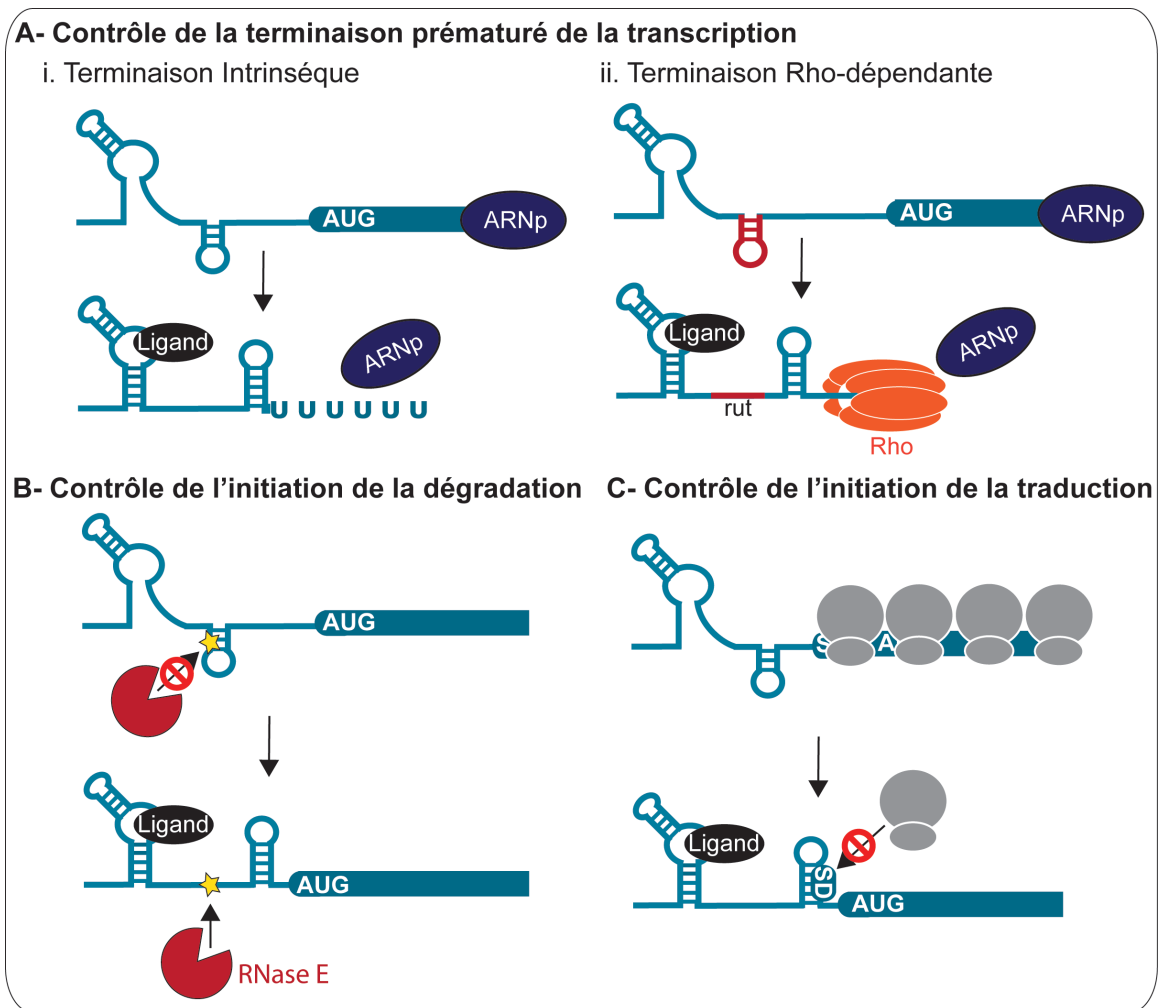


Figure 14 : Principaux mécanismes de contrôle de l'expression génique employés par les riborégulateurs bactériens. Le plus souvent les riborégulateurs contrôlent la terminaison prématurée de la transcription de façon Rho-indépendante (Ai, terminaison intrinsèque) ou bien Rho-dépendante (Aii); l'initiation de la dégradation (B) et l'initiation de la traduction (C).

C.2.4- Contrôle cinétique ou thermodynamique des riborégulateurs

Le contrôle cinétique et thermodynamique de la liaison du ligand dicte la transition du riborégulateur d'une forme inactive vers une forme active. Le contrôle cinétique est fonction de la vitesse de liaison du ligand à l'aptamère par rapport à la vitesse de polymérisation de l'ARNp (Fig. 15A). La vitesse d'élongation de l'ARNp est tributaire

de la disponibilité en NTP (Nucléotide Triphosphate), magnésium ainsi que de la présence de sites de pauses sur l'ARNm (Coppins *et al.*, 2007). Si la vitesse de polymérisation est plus élevée que la vitesse de liaison du ligand, alors la structure active sera adoptée avant même que le ligand n'ait pu se lier (Fig. 15Ai). À l'inverse, si la vitesse de liaison du ligand est plus rapide, alors le ligand se liera à l'aptamère avant que la plateforme d'expression n'ait pu être transcrite (Fig. 15Aii). Cette dernière pourra adopter une conformation inactive. La liaison du ligand ainsi que le changement de conformation du riborégulateur se font ici au cours du processus de transcription.

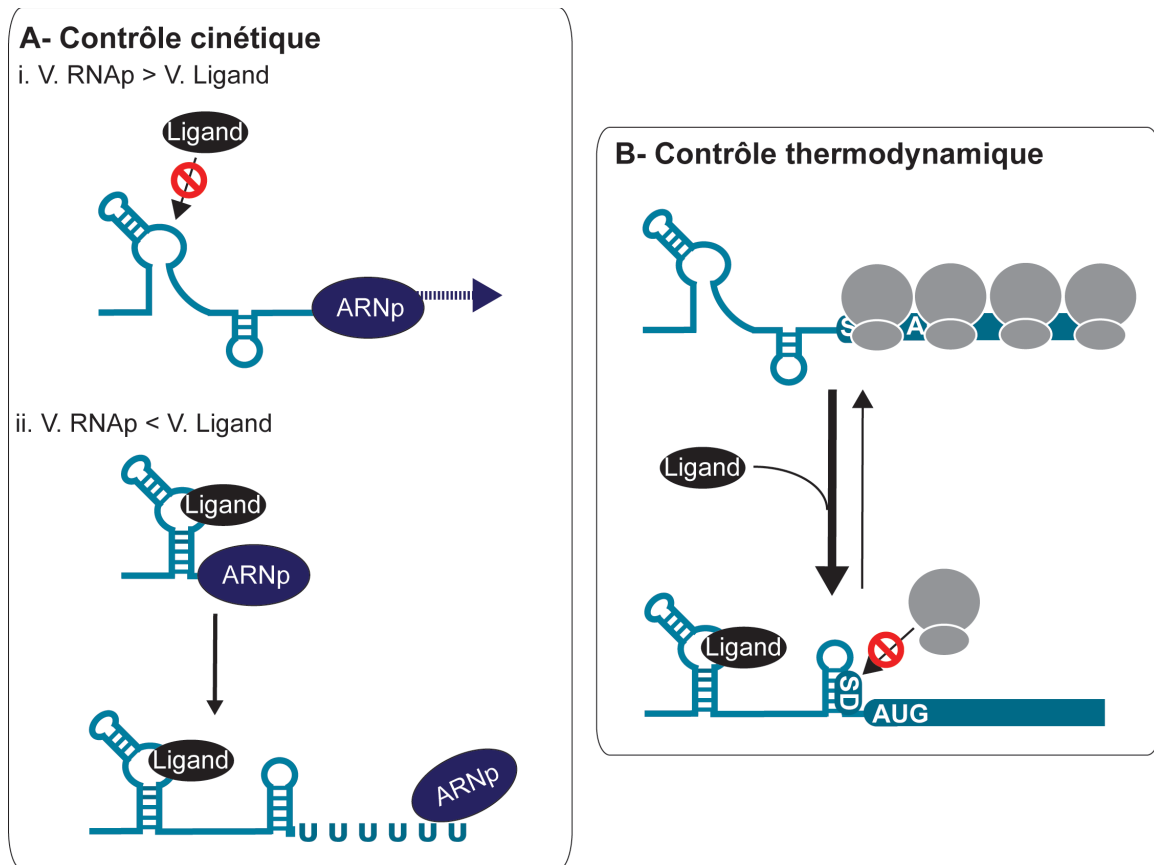


Figure 15 : Principe des contrôles cinétique et thermodynamique des riborégulateurs. Lors d'un contrôle cinétique (A), si la vitesse de l'ARNp ($V. \text{ARNp}$) est supérieure à la vitesse de liaison du ligand ($V. \text{Ligand}$), alors le riborégulateur ne pourra pas répondre au ligand (Ai). Si la vitesse de l'ARNp est inférieure à la vitesse de liaison du ligand, le riborégulateur pourra lier le ligand et adopter la structure adéquate (Aii). Lors d'un contrôle thermodynamique (B), le ligand stabilise une conformation du riborégulateur par rapport à l'autre.

Le contrôle thermodynamique correspond à un équilibre entre l'aptamère complexé au ligand et l'aptamère non lié (Fig. 15B). Le contexte transcriptionnel n'est pas essentiel à la liaison du ligand et au changement de conformation. Il peut donc avoir lieu de façon post-transcriptionnelle. La liaison du ligand va ici simplement stabiliser la forme inactive du riborégulateur.

C.2.5- Le riborégulateur *thiM* d'*E. coli*

Les riborégulateurs TPP (thiamine pyrophosphate) sont les premiers à avoir été découverts (Winlker *et al.*, 2002). Ils sont très largement retrouvés chez les procaryotes et les seuls à avoir été identifiés chez les plantes et les champignons (Sudarsan *et al.*, 2003). Dans le cadre de cette étude, nous nous intéresserons au riborégulateur *thiM* d'*E. coli* dont les différentes caractéristiques sont présentées ci-dessous.

C.2.5.1- Le ligand: la thiamine pyrophosphate

Le riborégulateur TPP lie la thiamine pyrophosphate correspondant à la forme active de la vitamine B1 (Fig. 16). La TPP consiste en un anneau pyrimidine liée à un groupement thiazole lui-même attaché à un pyrophosphate. La TPP est un cofacteur essentiel à plusieurs enzymes qui sont impliquées dans le métabolisme des carbohydrates. Tous les organismes vivants utilisent la TPP cependant seulement les bactéries et certains protozoaires, plantes et champignons sont capables de la synthétiser.

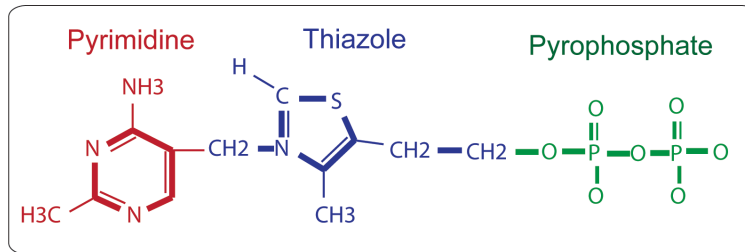


Figure 16 : Structure d'une molécule de TPP

C.2.5.2- Les gènes régulés par le riborégulateur TPP chez *E. coli*

Chez *E. coli*, il existe trois riborégulateurs TPP. Le riborégulateur *thiB* est localisé en amont de l'opéron *thiBPQ* dont les gènes codent pour un ABC transporteur nécessaire à l'importation ou l'exportation de la thiamine et du TPP. Le riborégulateur *thiC* est présent en amont de l'opéron *thiCEFSGH* dont les gènes codent pour des enzymes directement impliquées dans la biosynthèse de la pyrimidine et de l'ajout du groupement thiazole. Enfin, le riborégulateur *thiM* est retrouvé en amont de l'opéron *thiMD* dont les gènes codent pour des kinases permettant l'ajout du pyrophosphate afin former une molécule de TPP (Fig. 17).

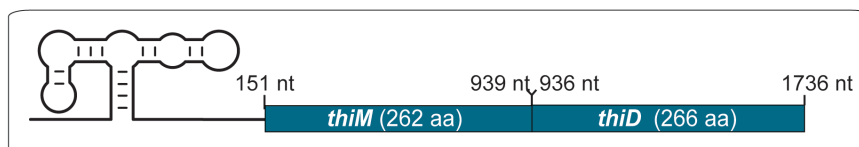


Figure 17 : Représentation du contexte génomique du riborégulateur thiM d'*E. coli*. Le riborégulateur TPP est localisé en amont des gènes thiMD.

C.2.5.3- Structure du riborégulateur thiM

D'une façon générale, les riborégulateurs TPP sont caractérisés par cinq structures tige-boucle et une séquence nucléotidique conservées (Nahvi *et al.*, 2002). Les riborégulateurs

TPP forment une jonction 3 voies c'est-à-dire que trois tiges entourent le cœur de l'aptamère (Fig. 18A). Le cristal du riborégulateur *thiM* (Serganov *et al.*, 2006) révèle une architecture composée de deux domaines hélices parallèles reliées par la tige P1 (Fig. 18B). Le domaine le plus en 5' inclut les tiges P2 et P3 qui forment une poche de liaison du groupement pyrimidine du TPP. Le domaine le plus en 3' contient les tiges P4 et P5 formant une poche de liaison pour le groupement pyrophosphate.

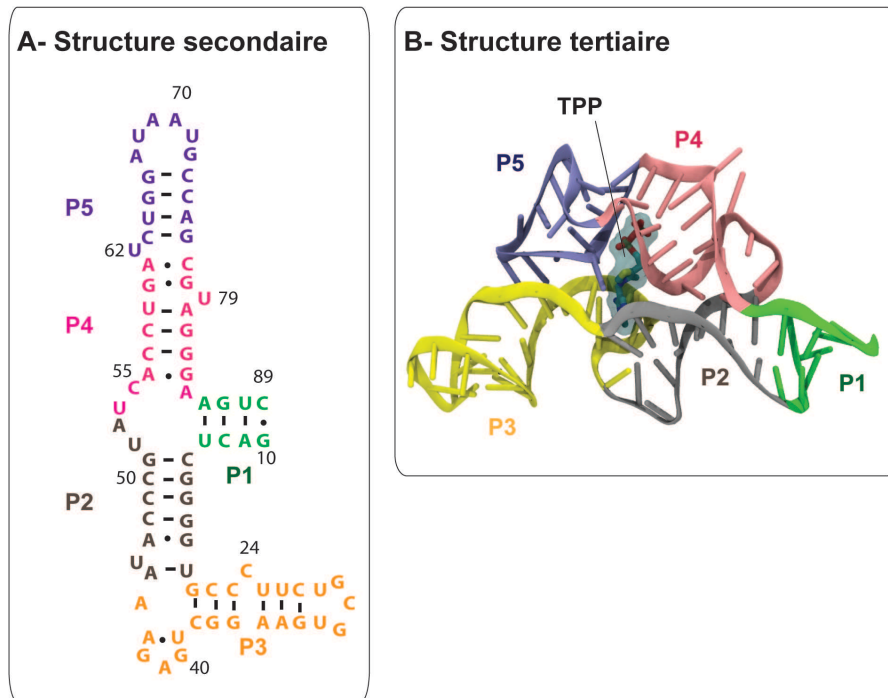


Figure 18: Structure secondaire et tertiaire du riborégulateur *thiM* d'*E. coli*. Les structures colorées en A correspondent aux mêmes structures colorées en B. (A) Représentation de la structure secondaire du riborégulateur *thiM* d'*E. coli* (B) Représentation de la structure tertiaire obtenue à partir du cristal du riborégulateur *thiM* d'*E. coli* basé sur l'étude de Serganov *et al.*, 2006 (fait par F.Colizzi).

C.2.5.4- Le mécanisme de régulation du riborégulateur *thiM*

Le riborégulateur *thiM* d'*E. coli* est connu pour contrôler strictement l'initiation de la traduction du gène *thiM* (Winkler *et al.*, 2002; Rentmeister *et al.*, 2007). Dans le modèle de régulation actuel, la liaison du ligand à l'aptamère stabilise la tige P1 ce qui induit la

formation d'une structure tige-boucle séquestrant les séquences d'initiation de la traduction (Fig. 19; Rentmeister *et al.*, 2007). À l'inverse, en absence de ligand, la séquence 3' de la P1 s'apparie à des nucléotides situés dans la plateforme d'expression afin de former une tige « anti-séquestratrice ». Le SD et le codon d'initiation de la traduction sont alors accessibles aux ribosomes.

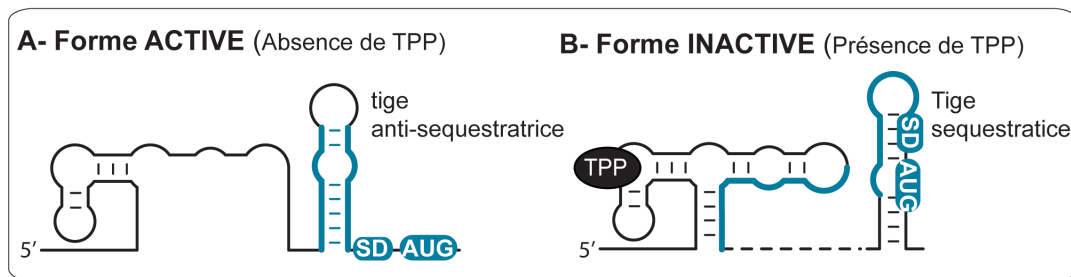


Figure 19 : Contrôle de l'initiation de la traduction par le riborégulateur thiM d'*E. coli*. En absence de ligand, le riborégulateur adopte une structure active (A) qui permet l'initiation de la traduction. En présence de ligand, le riborégulateur adopte une structure inactive (B) qui bloque l'accès des ribosomes à la région d'initiation de la traduction.

Nous avons récemment découvert que la liaison du TPP à l'aptamère provoque une diminution rapide du niveau d'ARNm de *thiM* (Caron *et al.*, 2012). Nos résultats indiquent que des éléments localisés dans la région codante de *thiM* permettent de réguler le niveau d'ARNm de façon dépendante du TPP. Ceci laisse supposer que le contrôle reposerait sur un mécanisme d'inactivation non nucléolytique (voir section B.2.4) où la dégradation de l'ARNm serait une conséquence de l'inhibition de la traduction. L'élucidation des mécanismes mis en jeu dans cette régulation fait l'objet du premier article présenté dans le chapitre 1 de cette thèse.

C.2.6- Le riborégulateur *btuB* d'*E. coli*

Les riborégulateurs liant l'adénosylcobalamine (AdoCbl) sont extrêmement répandus à travers les espèces bactériennes (Barrick et Breaker 2007). Structurellement parlant, il s'agit du plus grand et plus complexe riborégulateur actuellement connu. Le chapitre 2 de cette étude a pour sujet le riborégulateur *btuB* d'*E. coli* liant l'AdoCbl. Dans cette section, nous verrons les caractéristiques inhérentes à ce riborégulateur et le gène régulé.

C.2.6.1- Le ligand: l'adénosylcobalamine

Le ligand AdoCbl (aussi appelé coenzyme B12) est la forme active de la vitamine B12. L'AdoCbl est une molécule particulièrement grande et complexe qui aurait été synthétisée à la période prébiotique (Roth *et al.*, 1996). L'AdoCbl est composée d'un anneau corrin qui contient en son centre un cobalt, d'un groupement adenosyl et d'une boucle nucléotidique (Fig. 20). Cette molécule est le cofacteur essentiel d'enzymes intervenant dans la fermentation anaérobie de petites molécules tel que le glycérol, le propanédiol et l'éthanolamine (Abeles et Lee., 1961; Bradbeer, 1965; Toraya, Honda et Fukui, 1979). La bactérie *E. coli* ne possède pas les enzymes liées au métabolisme du glycérol et du propanédiol, ainsi l'AdoCbl est principalement utilisé dans le métabolisme de l'éthanolamine. Ce dernier composé est un dérivé de lipides membranaires. L'utilisation de l'éthanolamine est importante chez les bactéries entériques pour leur croissance *in vivo* et la pathogénèse (Garsin *et al.*, 2010). L'AdoCbl est aussi utilisée dans des réactions aérobies dites secondaires (car apparue plus tard que la fermentation en terme d'évolution) telles que la synthèse des méthionines et la réduction des nucléotides. Ces dernières réactions sont aujourd'hui cruciales au métabolisme des organismes du règne animal et de plusieurs procaryotes. *E. coli* possède deux voies de biosynthèse de la méthionine, dont une qui est dépendante de l'AdoCbl (Guest *et al.*, 1960).

Seulement certains organismes procaryotes ont la capacité de synthétiser l'AdoCbl. *E. coli* ne possède pas l'ensemble des gènes *cob* permettant la biosynthèse complète de l'AdoCbl. Cette bactérie initie ainsi la biosynthèse d'AdoCbl en utilisant un intermédiaire cobinamide provenant du milieu extracellulaire.

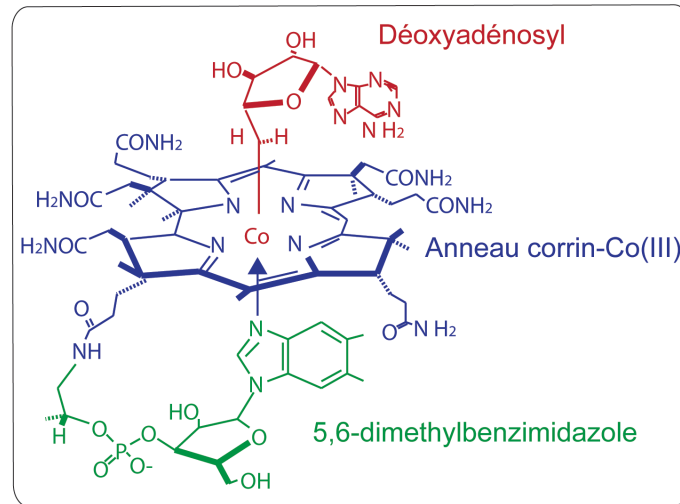


Figure 20 : Structure d'une molécule d'AdoCbl

C.2.6.2 Les gènes régulés par le riborégulateur AdoCbl chez *E. coli*

Un seul riborégulateur AdoCbl a été identifié chez *E. coli*. Celui-ci est localisé en amont du gène *btuB* qui formerait un opéron avec le gène *murI* (Fig. 21).



Figure 21 : Représentation du contexte génomique du riborégulateur btuB d'*E. coli*. Le riborégulateur AdoCbl est retrouvé en amont des gènes *btuB* et *murI*. La séquence codante de *murI* chevauche la séquence codante de *btuB* sur 45nt.

La protéine BtuB est un récepteur de la membrane externe qui fait partie d'un système d'ABC transporteur impliqué dans l'importation de vitamine B12 et de ses dérivés. BtuB est également connu pour être un récepteur à la colicine E, colicine A et au bactériophage BF3. Le gène *murI* de son côté code pour une glutamate racémase impliquée dans la biosynthèse de peptidoglycane.

C.2.6.3 La structure du riborégulateur *btuB*

Le riborégulateur *btuB* d'*E. coli* est caractérisé par un cœur contenant une jonction 4 voies définissant la région centrale; une région périphérique avec des structures tige-boucle P10 et P11 très conservées; et enfin une tige-boucle dite accessoire qui forme une interaction boucle-boucle avec la tige-boucle P5 (Fig. 22A). La structure cristalline du riborégulateur AdoCbl des organismes *Symbiobacterium thermophyllum* et *Thermoanaerobacter tengcongensis* montre que l'AdoCbl se lie dans une cavité semi-ouverte impliquant les tiges P3-P6 et P5 puis P11 (Fig. 22B; Johnson Jr. *et al.*, 2012; Peselis et Serganov 2012). L'interaction boucle-boucle L5-L13 piègerait le ligand à l'intérieur de la poche de liaison. Bien que les interactions soient faibles entre cette dernière structure et le ligand, elle est néanmoins essentielle à la régulation (Nahvi *et al.*, 2002). Le riborégulateur *btuB* est hautement spécifique à l'AdoCbl, cependant il existe des variants qui reconnaissent des dérivés de l'AdoCbl. Cette différence de spécificité est liée à un résidu adénosine localisé dans la jonction 6-3 qui interagit avec le groupement adénosyl de l'AdoCbl.

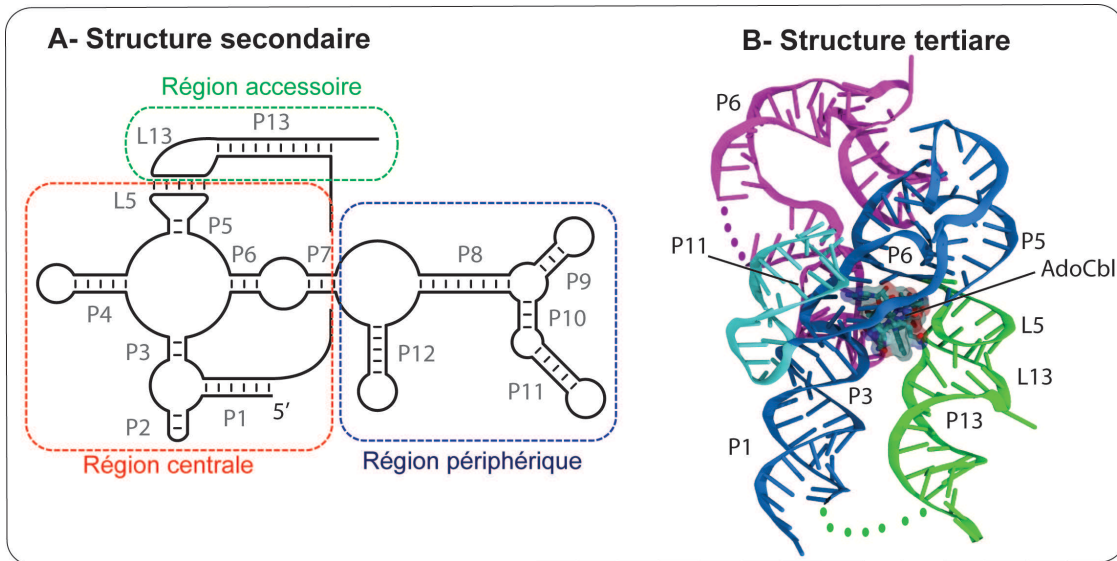


Figure 22 : Structure secondaire et structure tertiaire du riborégulateur *btuB*. (A) Représentation de la structure secondaire du riborégulateur AdoCbl d'*E. coli* (B) Représentation de la structure tertiaire obtenue à partir du cristal du riborégulateur AdoCbl de *T. tengcongensis* (Johnson Jr. et al., 2012; fait par F. Colizzi).

C.2.6.4-Le mécanisme de régulation du riborégulateur *btuB*

Le riborégulateur *btuB* d'*E. coli* a été montré pour contrôler strictement l'initiation de la traduction (Nou et Kadner, 2000). Dans le modèle de régulation actuel, en absence de ligand, la P1 et l'interaction boucle-boucle L5-L13 ne sont pas formées (Fig. 23; Perdrizet *et al.*, 2012). En revanche, une structure P13'' alternative est stabilisée ce qui rend accessible la séquence SD aux ribosomes. En présence de ligand, la P1 et l'interaction L5-L13 sont stabilisées. La tige P13 est plus courte et permet la formation d'une « tige sequestratrice » qui renferme la séquence du SD. Dans ce contexte, la traduction du gène *btuB* n'a pas lieu.

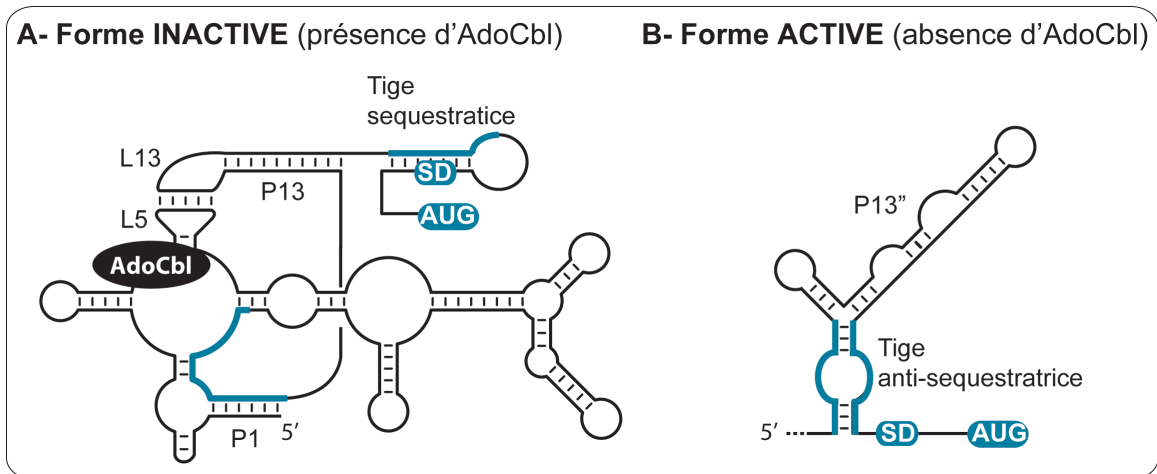


Figure 23 : Contrôle de l'initiation de la traduction par le riborégulateur *btuB* d'*E. coli*. En absence de ligand, le riborégulateur adopte une structure active (A) qui permet l'initiation de la traduction. En présence de ligand, le riborégulateur adopte une structure inactive (B) qui bloque l'accès des ribosomes à la région d'initiation de la traduction.

En plus du contrôle traductionnel, des séquences régulatrices localisées au début de la région codante de *btuB* modulent la quantité d'ARNm en fonction de la présence de ligand (Franklund et Kadner 1997; Nou et Kadner 1998). Ces études ont été menées avant de savoir que l'élément localisé en 5' de *btuB* était en fait un riborégulateur. Kadner et son équipe ont identifié une structure tige-boucle suivie d'une succession de quatre uraciles dans la région codante qui serait potentiellement importante pour le contrôle du niveau d'ARNm. Ceci les a amenés à spéculer qu'il pouvait s'agir d'un terminateur intrinsèque de la transcription (Franklund et Kadner 1997). Plus tard, ils ont montré que le début de la région codante de *btuB* est responsable de la diminution de la stabilité de l'ARNm en présence d'AdoCbl (Nou et Kadner 1998). Leurs résultats suggèrent également que cette dégradation accrue serait la conséquence indirecte de l'inhibition de l'initiation de la traduction. Ainsi, le contrôle du niveau d'ARNm se ferait par une inactivation de l'expression du gène *btuB* selon un mode « non nucléolytique » (voir section B.2.4).

OBJETCIFS DU PROJET DE RECHERCHE

À mon arrivée dans le laboratoire du Pr. Daniel Lafontaine en 2009, le mécanisme et la fonction cellulaire de ces éléments régulateurs étaient encore un domaine pour le moins inexploré. Pourtant, aux vues des applications émergentes utilisant ces motifs d'ARN, cet aspect est de toute évidence d'une importance fondamentale. L'objectif général de mon projet de thèse visait donc à caractériser les mécanismes de contrôles sous-jacents des riborégulateurs dans la bactérie.

Au cours de mes recherches doctorales, je me suis concentrée sur les riborégulateurs *thiM* (voir section C.2.5) et *btuB* (voir section C.2.6) de l'organisme modèle *E. coli*. Ces deux riborégulateurs étaient alors connus pour agir strictement au niveau de l'initiation de la traduction. Cependant, des données préliminaires suggéraient que les ARNm *thiMD* et *btuB* étaient aussi régulés en fonction de leur ligand respectif (Franklund et Kadner, 1997; Caron *et al.*, 2012). Les deux riborégulateurs contrôlèrent donc à la fois l'initiation de la traduction et le niveau d'ARNm. Ces derniers constituent un système intéressant en vue d'améliorer la compréhension des mécanismes de coordination entre le niveau de traduction et le niveau d'ARNm. Ainsi, mon premier objectif de recherche était de caractériser les éléments régulateurs affectant le niveau d'ARNm suite à la liaison du riborégulateur au ligand. Cet objectif est présenté dans le chapitre 1 de cette thèse qui concerne le riborégulateur *thiM*.

Une étude précédente nous indiquait que l'ARNm *btuB* serait aussi contrôlé par les petits ARN régulateurs OmrA et OmrB (Guillier et Gottesman, 2006). Dans le chapitre 2 de cette thèse, nous montrons que tout comme le riborégulateur, OmrA bloque l'initiation de la traduction de *btuB*. Nous avons donc un système unique permettant de comparer les mécanismes d'action d'un riborégulateur et d'un petit ARN. Cette comparaison compose le deuxième objectif de recherche qui est présenté dans le chapitre 2 de cette thèse.

CHAPITRE 1

Riboswitch-mediated translation repression directs Rho termination and mRNA decay through a single RNA element

Auteurs de l'article: Laurène Bastet¹, Adrien Chauvier¹, Navjot Singh², Antony Lussier¹, Joseph Wade^{2,3} and Daniel A. Lafontaine^{1,*}

¹ Department of Biology, Faculty of Science, RNA Group, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada, J1K 2R1. ² Wadsworth Center, New York State Department of Health, Albany, NY, 12208, USA. ³ Department of Biomedical Sciences, University at Albany, Albany, NY, 12201, USA.

Statut de l'article: soumis

Contribution: J'ai réalisé les expériences de northern blot, des essais β -galactosidase, les essais de dégradation *in vitro* et les 3'RACE. Les expériences de transcription *in vitro* et les essais RNase H ont été faits par Adrien Chauvier. Les expériences de ChiP (Co-immunoprécipitation) ont été faites par Navjot Singh du laboratoire de Joseph Wade. Antony Lussier a réalisé des expériences de β -galactosidase relatives au mutant de la région d'initiation de la traduction de *thiM*.

J'ai participé à la rédaction de l'article conjointement avec Daniel Lafontaine et Joseph Wade.

RÉSUMÉ

Le riborégulateur *thiM* d'*E. coli* est retrouvé en amont des gènes *thiMD* codant pour des protéines impliquées dans la biosynthèse du TPP. La liaison du ligand TPP au riborégulateur bloque l'initiation de la traduction du gène *thiM*. Toutefois, nos expériences de buvardage de type northern montrent une diminution du niveau d'ARNm *thiMD* après l'ajout du TPP. Le riborégulateur contrôlerait donc l'expression de l'ensemble des gènes de l'opéron *thiMD*. L'article présenté dans ce chapitre vise à caractériser les mécanismes régulant le niveau d'ARNm *thiMD* en fonction de la liaison du riborégulateur au TPP.

Dans cet article, nous montrons que l'arrêt de la traduction, induit par le TPP, est un prérequis à la diminution du niveau d'ARNm *thiMD*. La région nucléotidique comprise entre les 6 et les 27 premiers codons de *thiM* est suffisante pour la régulation du niveau d'ARNm. Remarquablement, au sein de cette région, une séquence unique est la cible à la fois du dégradosome ARN et de la protéine Rho. Le niveau d'ARNm *thiMD* est donc étroitement contrôlé suite à la liaison du riborégulateur au TPP. Le mécanisme implique une terminaison Rho-dépendante et la dégradation active de l'ARNm.

Dans cette même étude, nous montrons que le riborégulateur traductionnel *lysC* d'*E. coli* (reconnaissant la lysine) contrôle aussi la dégradation et la terminaison Rho-dépendante en utilisant une séquence d'ARN unique. Ceci suggère que le mécanisme caractérisé ici pourrait être davantage répandu.

Enfin, dans le but d'identifier d'autres riborégulateurs d'*E. coli* qui en plus d'exercer un contrôle traductionnel, modulent la terminaison Rho-dépendante; nous avons utilisé la technique de ChiP (immunoprécipitation de la chromatine) de l'ARNp. Les résultats indiquent que parmi les sept riborégulateurs d'*E. coli*, cinq pourraient contrôler la terminaison Rho-dépendante en fonction de la liaison à leur ligand respectif.

Riboswitch-mediated translation repression directs Rho termination and mRNA decay through a single RNA element

Laurène Bastet¹, Adrien Chauvier¹, Navjot Singh², Antony Lussier¹, Joseph Wade^{2,3} and Daniel A. Lafontaine^{1,*}

¹ Department of Biology, Faculty of Science, RNA Group, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada, J1K 2R1.

²Wadsworth Center, New York State Department of Health, Albany, NY, 12208, USA.

³Department of Biomedical Sciences, University at Albany, Albany, NY, 12201, USA.

Keywords: Riboswitch, Thiamine pyrophosphate, RNA degradosome, Rho, Translation, Transcription.

Running title: Riboswitch control of transcription termination and mRNA decay

*To whom correspondence should be addressed.

Address correspondence to: Daniel Lafontaine, 2500, Blvd Université, Sherbrooke, Quebec, Canada, J1K 2R1.

E-mail: Daniel.Lafontaine@USherbrooke.ca

ABSTRACT

Riboswitches are mRNA regulatory elements that control gene expression by modifying their structure when bound to cellular metabolites. Most studies have been performed on *Bacillus subtilis* riboswitches regulating transcription termination and very little information is currently available on *Escherichia coli* riboswitches that are presumed to control translation initiation. In contrast to previous reports, we demonstrate here that the *E. coli* TPP-dependent *thiM* riboswitch modulates RNase E cleavage activity and Rho-dependent transcription termination. We found that both regulation mechanisms were triggered upon riboswitch-mediated translation repression, and relied on recognition determinants found in a single regulatory element. This provides a unique means to ensure that prematurely terminated transcripts are targeted by the RNA degradosome. We show that such a dual-regulatory mechanism is also employed by the lysine-dependent *E. coli lysC* riboswitch. Furthermore, our data suggest that most translationally-acting riboswitches in *E. coli* modulate mRNA levels upon ligand binding, thus ensuring the regulation of single genes or large polycistronic mRNAs. Our work provides strong evidence that translationally-regulating riboswitches not only control translation initiation, but also affect the level and decay of regulated mRNAs through an integrated mechanism ensuring tight control of gene expression.

INTRODUCTION

Bacteria must adapt to a wide range of environmental conditions such as changes in temperature, pH, ions and metabolite levels. The bacterial adaptive response is exemplified by riboswitches, which are structured RNA elements specifically recognizing cellular metabolites (Haller et al. 2011; Breaker 2012; Serganov and Nudler 2013). Riboswitches are located in the 5' untranslated regions (UTR) of several bacterial mRNAs and control the expression of downstream genes as a function of metabolite binding. Riboswitches exert their regulatory effects by controlling transcription termination, translation initiation or mRNA decay (Serganov and Nudler 2013). These RNA switches are composed of two modular regions: an aptamer domain involved in metabolite recognition and an expression platform that undergoes structural change to regulate gene expression (Serganov and Nudler 2013). In *Bacillus subtilis*, the majority of characterized riboswitches have been shown to control premature transcription termination by modulating the formation of Rho-independent terminators (Breaker 2012; Serganov and Nudler 2013). In contrast, close inspection of *Escherichia coli* riboswitch sequences (Barrick and Breaker 2007) suggests that they control gene expression by modulating ribosome access to the ribosome binding site (RBS) and/or AUG start codon. However, in addition to controlling translation initiation, recent studies have reported that *E. coli* riboswitches make use of additional mechanisms to regulate gene expression. For example, in agreement with chromatin immunoprecipitation and microarray data (ChIP-chip) (Peters et al. 2009), Hollands et al. have shown that the *E. coli ribB* riboswitch controls Rho-dependent transcription termination (Hollands et al. 2012). Moreover, Caron et al. discovered a different mechanism for the *E. coli lysC* lysine-sensing riboswitch that directly modulates RNase E-dependent degradation of the *lysC* mRNA (Caron et al. 2012). Lastly, it was also shown that while the *btuB* riboswitch only represses translation initiation, regulatory elements located in this ORF negatively modulate the level of *btuB* mRNA in the presence of adenosylcobalamin (AdoCbl) (Nou and Kadner 1998). Together, these studies suggest that *E. coli* riboswitches can efficiently regulate gene expression by combining translational and mRNA level controls, the latter ensuring irreversible gene repression.

Although the *E. coli thiM* thiamine pyrophosphate (TPP)-sensing riboswitch is one of the most studied riboswitches (Winkler et al. 2002; Lang et al. 2007; Miranda-Rios 2007; Rentmeister et al. 2007; Ontiveros-Palacios et al. 2008; Chen et al. 2010), we know very little about the RNA regulatory elements involved in inhibiting translation initiation. The *thiM* riboswitch is found upstream of the *thiMD* operon, which encodes enzymes involved in TPP biosynthesis (see Supplemental Fig. S1A for schematic description of *thiMD* operon). Thiamine pyrophosphate is an essential cofactor for carbohydrate metabolism. According to the current *thiM* riboswitch regulation model (Winkler et al. 2002; Edwards and Ferre-D'Amare 2006; Rentmeister et al. 2007), TPP binding stabilizes the aptamer domain, leading to the formation of the RBS/AUG sequestering stem, thereby inhibiting translation initiation (Supplemental Fig. S1B). Whereas previous studies have reported that ligand-dependent *thiM* riboswitch conformational changes strictly regulate translation initiation (Winkler et al. 2002; Ontiveros-Palacios et al. 2008), we have obtained experimental evidence suggesting that *thiM* mRNA levels are modulated in TPP-rich growth conditions (Caron et al. 2012).

Herein, we characterize TPP-dependent *thiM* riboswitch regulation at both the translational and mRNA levels. We observed that, in addition to translation repression, TPP binding to the riboswitch initiates a series of regulatory events involving the RNA degradosome and Rho transcription terminator. Our data suggest that both mechanisms rely on overlapping regulatory elements in a region located between the 20th and 34th *thiM* codons. Furthermore, we observed that TPP binding to the riboswitch occurred both co- and post-transcriptionally, indicating that the riboswitch controls the outcome of nascent transcripts through Rho transcription termination and pre-existing *thiMD* mRNAs via RNA degradosome cleavage activity. Strikingly, chromatin immunoprecipitation (ChIP) revealed that most *E. coli* riboswitches modulate Rho transcription termination, suggesting that mRNA control is widespread among transcriptionally acting riboswitches. Our data describe a novel mechanism for coordinated control of transcription termination and mRNA degradation when translation initiation is repressed. This is the first characterization of a single RNA element controlling both Rho transcription termination and mRNA decay.

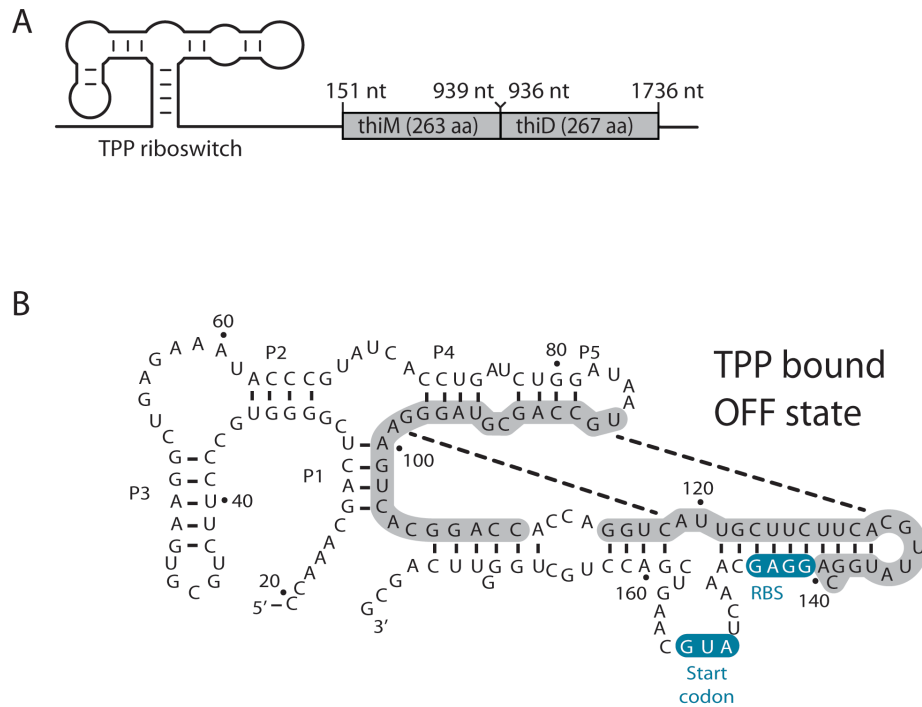


Figure S1. Genetic regulation of the *E. coli thiM* riboswitch.

(A) Schematic representing the *thiM* riboswitch and the *thiMD* operon. The secondary structure of the *thiM* riboswitch aptamer is shown upstream of the *thiM* and *thiD* genes. Genomic locations and sizes of both proteins are indicated. Note that there is an overlap of 3 nucleotides between *thiM* and *thiD*. (B) Predicted secondary structure of the *thiM* riboswitch in the presence of TPP (OFF state). Nucleotides involved in the formation of the antisequestering stem (ON state) are shown in gray and indicated by dotted lines. The RBS and AUG start codons are in blue boxes. The nomenclature indicates the nucleotide positions and the paired regions (P1-P5).

RESULTS

The *thiM* coding region is important for TPP-dependent mRNA control

According to available data (Winkler et al. 2002; Ontiveros-Palacios et al. 2008; Caron et al. 2012), TPP binding to the *thiM* riboswitch induces a structural change leading to translation inhibition through the formation of a RBS/AUG sequestering stem (Fig. 1A). We recently reported that inhibition of *thiM* translation is associated with a decreased level of its mRNA (Caron et al. 2012). Although several mechanisms are possibly involved in *thiM* mRNA regulation, we previously postulated that regulation could be achieved via a non-nucleolytic degradation pathway (Caron et al. 2012). In such a mechanism, mRNA decay is facilitated by the absence of translating ribosomes to protect the mRNA from ribonuclease attack (Dreyfus 2009). Here, we characterize the molecular basis underlying a TPP-induced, non-nucleolytic mRNA repression mechanism.

We first investigated *thiM* mRNA regulation in Northern blot experiments using a probe targeting the *thiM* ORF. As shown in Figure 1B, a large decrease in mRNA was observed when TPP was added to the culture medium, consistent with modulation of the *thiM* mRNA levels in the presence of TPP. A similar ligand-induced mRNA decrease was also observed with a probe directed against *thiD* (Fig. 1C), indicating that the riboswitch modulates the mRNA level of the complete *thiMD* operon. These results further expand the riboswitch regulatory role that was initially presumed to control only *thiM* translation initiation (Winkler et al. 2002). Analysis of *thiMD* mRNA regulation with a probe targeting the riboswitch domain produced a different profile containing three different major RNA fragments corresponding to the *thiMD* operon and two other smaller fragments (Fig. 1D). Using molecular markers (Supplemental Fig. S2) and 3' RACE assays, we determined that the longer fragment corresponds to an mRNA species of ~225-260 nt (intermediate 1) and the shorter fragment consists of the aptamer domain, exhibiting 3' ends of ~106-110 nt. While the level of intermediate 1 was not significantly affected by the presence of ligand, the aptamer domain levels increased in a TPP-dependent manner (Fig. 1D), suggesting that aptamer production is related to *thiMD* mRNA regulation.

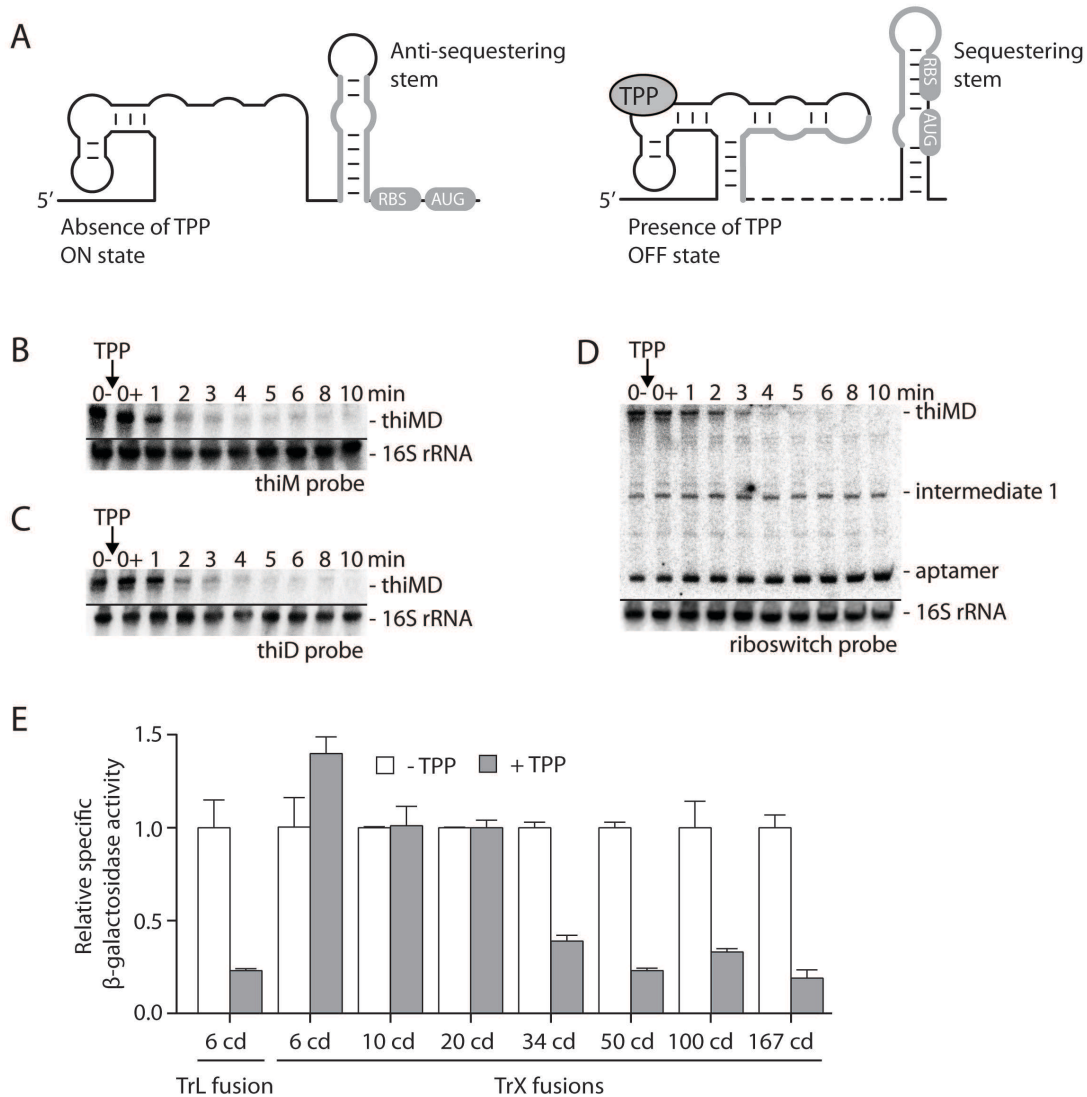


Figure 1. The *E. coli* *thiM* riboswitch controls translation initiation and mRNA levels.

(A) Schematic representing *thiM* riboswitch translational control. In the absence of TPP, the anti-sequestering stem (gray) exposes the ribosome binding site (RBS) and allows translation initiation. TPP binding sequesters both the RBS and the AUG start codon. The dotted line represents the immediate connectivity between linked regions.

(B, C and D) Northern blot analysis of *thiMD* mRNA levels. Total RNA was extracted at the indicated times immediately before (0-) and after (0+) addition of TPP (0.5 mg/mL). The probe was designed to detect *thiM* (B), *thiD* (C) or the riboswitch domain (D). RNA species are indicated on the right of the gels. 16S rRNA was used as a loading control.

(E) β -Galactosidase assays of translational ThiM-LacZ and transcriptional *thiM-lacZ* fusions performed in the absence or presence of 500 μ g/mL TPP. The number of *thiM* codons is indicated below the histograms. Values were normalized to the activity obtained in the

absence of TPP. The average values of three independent experiments with standard deviations (SD) are shown.

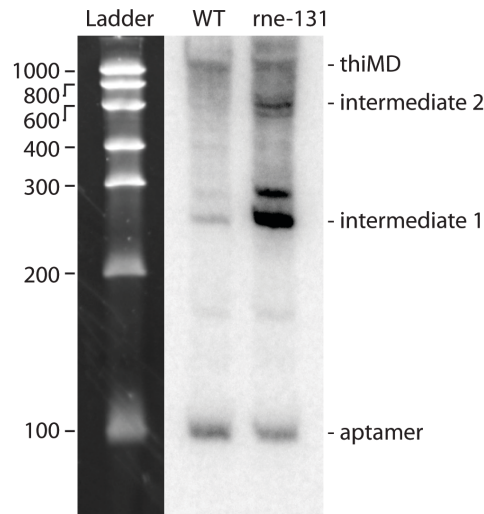


Figure S2. Determination of molecular sizes of *thiMD* mRNA species detected by Northern blot analysis.

Total RNA was extracted at midlog phase from wild-type and *rne-131* *E. coli* strains. RNAs were co-migrated with the RiboRuler Low Range RNA Ladder (Fisher Scientific) in 5% denaturing acrylamide gel. RNA ladder bands were visualized with ethidium bromide and *thiMD* mRNA by Northern blot assays using a probe hybridizing to the riboswitch domain. RNA species are indicated to the right of the gel. Note that intermediate species are more abundant in the *E. coli* strain carrying a *rne-131* mutation, which prevents the formation of the RNA degradosome (Kido et al. 1996). The use of *rne-131* strain is described in the Results section *The RNA degradosome targets thiMD mRNA upon translation repression*.

We previously observed that TPP reduces *thiM* mRNA levels in the presence of ORF sequence elements (Caron et al. 2012). To determine the minimum sequence conferring TPP-dependent mRNA regulation, we used transcriptional *lacZ* chromosomal fusions containing various *thiM* ORF sizes. Constructs containing 34 codons or more resulted in an approximate 6-fold reduction in β -galactosidase activity in presence of TPP (Fig. 1E). In contrast, shorter fusions containing 6, 10 or 20 codons did not result in repression, indicating that the minimum sequence for mRNA modulation is between 20 and 34 codons. As expected, a translational

lacZ fusion containing the riboswitch fused to only the first 6 *thiM* codons demonstrated TPP-dependent repression (Fig. 1E). These results suggest that while the *thiM* riboswitch regulates translation initiation in the presence of only 6 codons, the mRNA regulation requires specific element(s) located between codons 20 and 34.

Inhibition of translation initiation is a prerequisite for mRNA regulation

To determine if the *thiM* mRNA decrease was dependent on translation inhibition, we engineered constructs harboring mutations expected to reduce translation initiation (Fig. 2A). These experiments were performed using the *lacZ* transcriptional construct containing 34 codons, which is the shortest fusion producing TPP-dependent mRNA regulation (Fig. 1E). As shown in Figure 2A, RBS (G142C) and AUG (U152A) mutations resulted in a TPP-independent loss of regulation and low β -galactosidase activities, suggesting that translation elongation is crucial for mRNA control. As expected, β -galactosidase assays performed with transcriptional fusions containing RBS or AUG mutations in the presence of only the first 6 *thiM* codons yielded high β -galactosidase activities (Fig. 2B), demonstrating the absence of any mRNA regulatory element. No β -galactosidase expression was detected when altering the RBS and AUG start codon in the context of translational fusions (Supplemental Fig. S3). Thus, these results support a model where TPP-induced translation inhibition triggers an mRNA control mechanism relying on regulatory element(s) located between *thiM* codons 20 and 34.

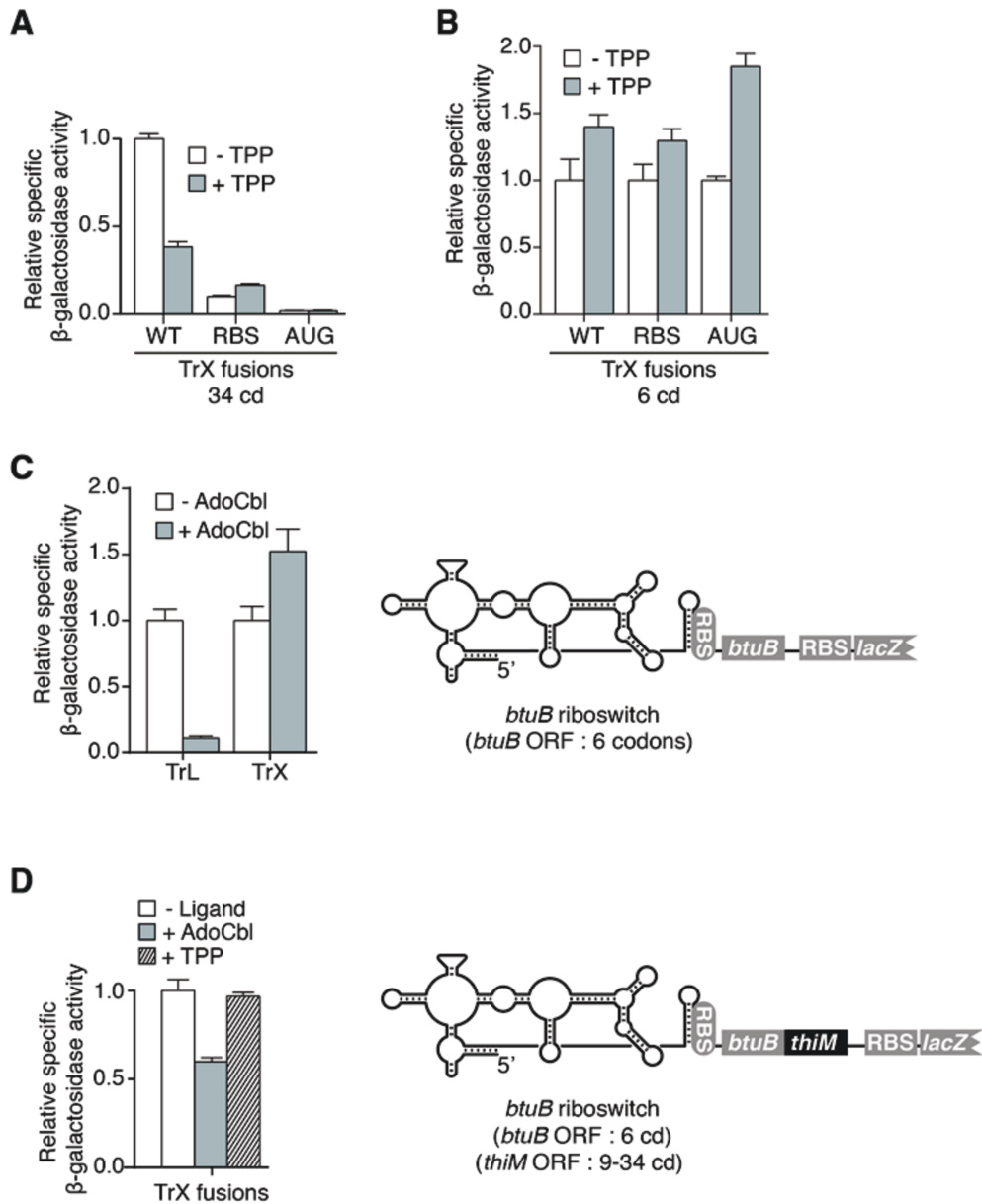
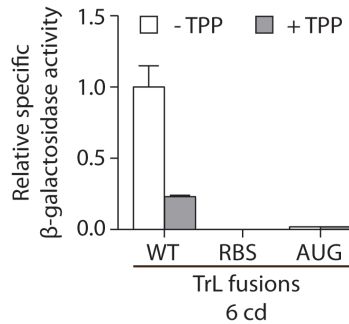


Figure 2. Translation inhibition is a prerequisite for TPP-dependent mRNA decrease. (A and B) β -Galactosidase assays of transcriptional *thiM-lacZ* fusions containing 34 (A) or 6 *thiM* codons (B) performed in the absence or presence of 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TPP. Assays were done with wild-type, and RBS (G142C) and AUG start codon (U152A) mutants. Values were normalized to enzymatic activity obtained for the WT construct in the absence of TPP. The average values of three independent experiments with SDs are shown. (C and D) β -Galactosidase assays using translational BtuB-LacZ, transcriptional *btuB-lacZ* fusions (C) and transcriptional *btuB-thiM-lacZ* fusions (D). Enzymatic activities were measured in the absence

or presence of 5 μM AdoCbl or 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TPP. Values were normalized to enzymatic activity obtained without ligand. Schematics representing transcriptional constructs are shown on the right. The average values of three independent experiments with SDs are shown.



S3. β -galactosidase assays using translational ThiM-LacZ fusions containing mutations at the level of the RBS (G142C) and AUG (U152A) start codon sequences. Values were normalized to the enzyme activity obtained for the wild-type in absence of ligand. Enzymatic activities were measured in the absence or presence of 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TPP. Values were normalized to the enzyme activity obtained for the wild-type in absence of ligand. The average values of three independent experiments with SDs are shown.

Riboswitch identity is not crucial for mRNA control

Since the first 23 nt of *thiM* ORF mRNA are part of the riboswitch expression platform (residues 151-172, Supplemental Fig. S1B), we determined whether riboswitch sequence element(s) were involved in mRNA control. To do so, we used the *E. coli* AdoCbl-sensing *btuB* riboswitch that was shown to strictly control translation initiation (Nou and Kadner 2000). We first assayed a translational BtuB-LacZ fusion containing only the first 6 codons of *btuB* in the absence or presence of AdoCbl, and observed ligand-dependent repression (Fig. 2C). Importantly, no ligand-dependent repression was observed using a *lacZ* transcriptional fusion (Fig. 2C), consistent with *btuB* translation inhibition not modulating mRNA levels. However, adding a sequence corresponding to codons 9 to 34 of *thiM*, downstream of *btuB* codons, significantly reduced β -galactosidase activity in the presence of AdoCbl (Fig. 2D). No such effect was observed with TPP (Fig. 2D). These results indicate that *thiM* codons 9-34 are sufficient to modulate mRNA levels. Hence, *thiM* mRNA regulation does not rely on specific riboswitch elements but, rather, on inhibiting translation initiation.

The RNA degradosome targets *thiMD* mRNA upon translation repression

In *E. coli*, the initiation of mRNA decay is often mediated by RNase E (Kushner 2002). This endoribonuclease is part of the RNA degradosome complex, which typically contains an exoribonuclease (PNPase), an RNA helicase (RhlB) and an enolase. A previous transcriptomic study (Bernstein et al. 2004) showed that *thiM* mRNA half-life is higher in a degradosome mutant strain. We thus speculated that the degradosome could be involved in TPP-dependent *thiM* mRNA control. To test this hypothesis, we employed an *E. coli* strain carrying a *rne-131* mutation, preventing the formation of the degradosome but retaining RNase E ribonucleolytic activity (Kido et al. 1996). Northern blot assays showed an efficient TPP-dependent decrease of the *thiMD* mRNA in the mutant strain (Fig. 3A), suggesting that RNA degradosome integrity is not essential for mRNA control. In addition, rifampicin treatments revealed that the half-life of *thiMD* mRNA is decreased approximately 2-fold in the presence of TPP, both in wild-type and *rne-131* strains (Supplemental Fig. S4A-F), indicating that mRNA decay is modulated in a TPP-dependent manner. The higher abundance (Fig. 3A) and stability (Supplemental Fig. S4G) of intermediate 1 in *rne-131* suggests that this fragment is targeted by the RNA degradosome. Given that intermediate 1 (~225-260 nt) encompasses the first 34 *thiM* codons (252 nt), which is the shortest ORF region showing TPP-dependent regulation (Fig. 1E), we speculated that the RNA degradosome could be involved in *thiM* gene regulation. Thus, to determine whether the RNA degradosome directly targets *thiM* mRNA in a TPP-dependent manner, we performed β -galactosidase assays using the 34-codon *thiM-lacZ* transcriptional construct in a *rne-131* background. TPP-induced repression was less efficient in *rne-131* than in the wild-type, suggesting that the RNA degradosome targets the 34-codon *thiM* region (Fig. 3B).

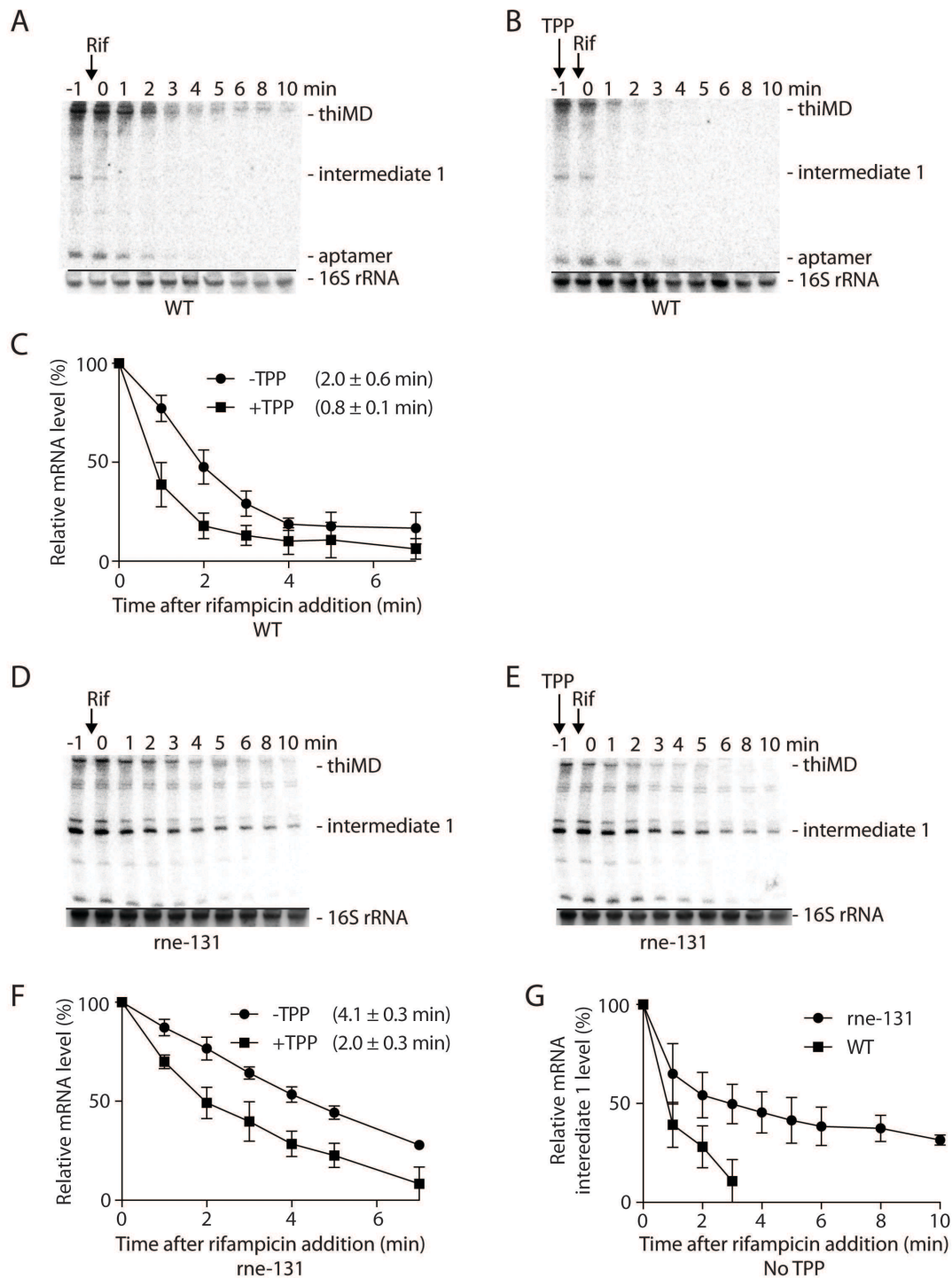


Figure S4. Study of *thiMD* mRNA stability as a function of TPP.

(A and B) Northern blot analysis of *thiMD* mRNA levels in the context of the wild-type strain. The strain was grown to mid-log phase in M63 minimal medium with 0.2% glucose at 37°C and total RNA was isolated at different times before (-1) and after (0) the addition of rifampicin (250 µg/mL). The experiment was performed in the absence (A) or presence of 500 µg/mL TPP (B). The loading control was 16S rRNA. The *thiMD* operon, the intermediate 1 and aptamer species are shown to the right of the gels. (C) Quantification analysis of Northern

blots shown in panels A and B. Half-lives obtained in absence and presence of TPP are indicated. The quantification represents the stability of the *thiMD* mRNA in the context of the wild-type strain. The average values of three independent experiments with SDs are shown. (D and E) Northern blot analysis of *thiMD* mRNA level in the context of the *rne-131* strain. Experiments were performed as indicated in panel A and B. The loading control was 16S rRNA. The *thiMD* operon, the intermediate 1 and the aptamer species are shown to the right of the gels. (F) Quantification analysis of Northern blots shown in panels D and E. The quantification represents the stability of the full-length *thiMD* mRNA in the context of the *rne-131* strain. Half-lives obtained in the absence and presence of TPP are indicated. The average values of three independent experiments with SDs are shown. (G) Quantification analysis of Northern blots shown in panels A and D. The quantification represents the stability of the intermediate 1 species in the wild-type and *rne-131* strains. The average values of three independent experiments with SDs are shown.

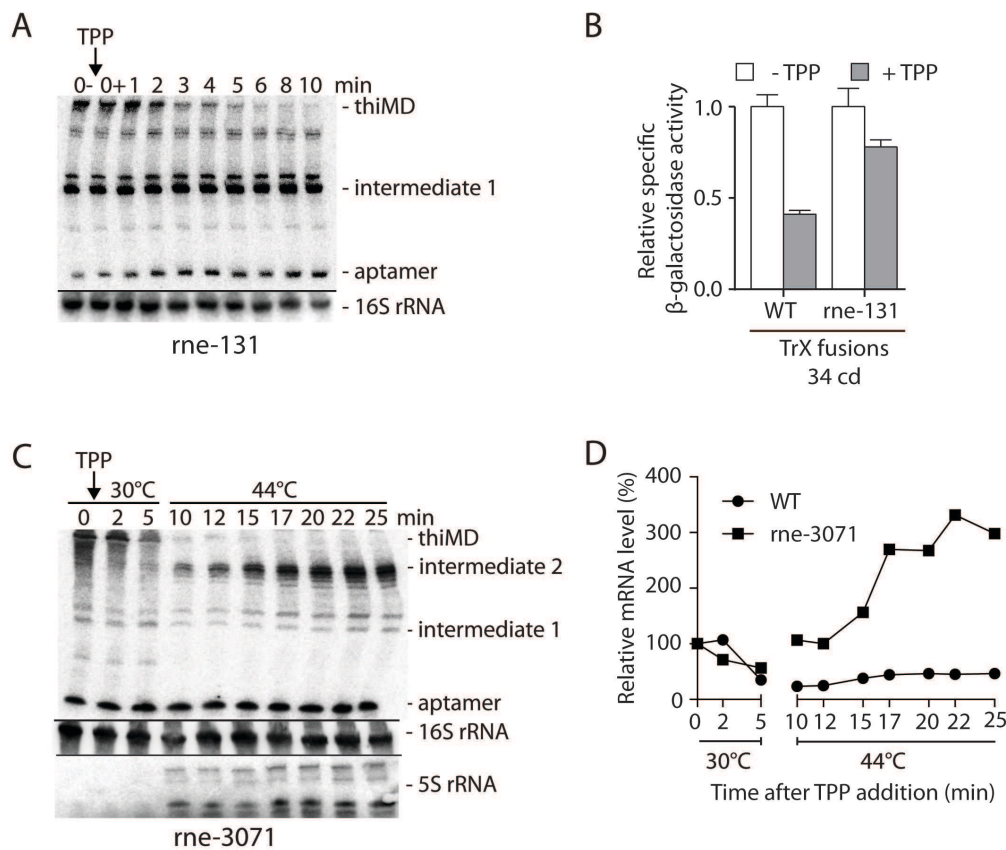


Figure 3. The RNA degradosome is involved in TPP-dependent *thiMD* mRNA decay. (A) Northern blot analysis of the *thiMD* mRNA in a *rne-131* background. A probe hybridizing to the riboswitch domain was used. 16S rRNAs was used as a loading control. (B) β -Galactosidase experiments of transcriptional *thiM-lacZ* fusions performed with wild-type and *rne-131* strains in the absence or presence of 500 μ g/mL TPP. Values were normalized to the enzymatic activity obtained in the absence of TPP. The average values of three independent experiments with SDs are shown. (C) Northern blot analysis of *thiMD* mRNA levels in the *rne-3071* strain (RNase E^{ts}) grown at 30°C followed by a temperature shift to 44°C. 16S rRNA

was used as loading control. The presence of unprocessed 5S rRNA intermediates confirms the inactivation of RNase E at 44°C. (D) Quantification analysis of Northern blots shown in Figure 3C and Supplemental Figure S5. The intermediate 2 species was increased in the *rne-3071* strain at 44°C. Such a recovery was not observed in the wild-type strain (Supplemental Fig. S5). The average values of three independent experiments with SDs are shown.

Because the degradation efficiency of *thiMD* mRNA in *rne-131* can be due to the remaining activity of RNase E (Fig. 3A), we next employed an *rne-3071 E. coli* strain carrying a thermosensitive mutation in the RNase E active site (Apirion and Lassar 1978). While *rne-3071* exhibits active RNA degradosome complexes at 30°C, the catalytic activity of RNase E is completely abolished at 44°C (Apirion and Lassar 1978). Accordingly, addition of TPP at 30°C decreased *thiMD* mRNA levels (Fig. 3C). However, no recovery of *thiMD* mRNA was observed when cells were shifted to 44°C, indicating that RNase E is not essential for initiating *thiMD* mRNA decay. Importantly, a new mRNA species, intermediate 2 (~600 nt, see Supplemental Fig. S2 for molecular markers), showed an increase of approximately 300% over time (Fig. 3C,D), whereas no such increase was detected in the wild-type (Supplemental Fig. S5). These data suggest that intermediate 2 is generated by at least one other RNase cleaving within the *thiM* ORF at ~600 nt, and is degraded through RNase E activity. Furthermore, the abundance of intermediate 1 in *rne-131* but not in *rne-3071* suggests that intermediate 1 is generated through RNase E cleavage, either from intermediate 2 or the full *thiMD* mRNA. Hence, only an active RNA degradosome complex can degrade the resulting intermediate 1.

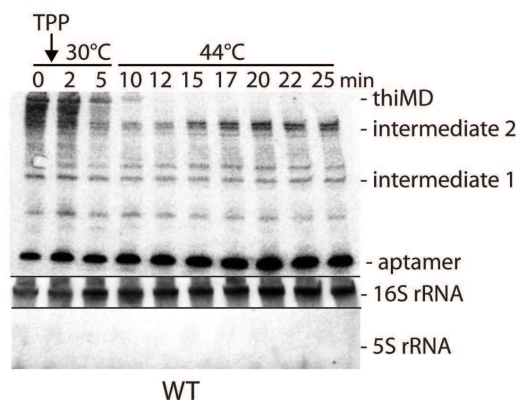


Figure S5. Northern blot analysis of *thiMD* mRNA as a function of temperature.

The wild-type strain was grown from 0 to 5 min at 30°C followed by a temperature shift to 44°C for 10 to 25 min. Bacteria were cultured and RNA extracted as described in Figure 3B. The quantification of intermediate 2 is shown in Figure 3D. Note that intermediate 2 is lower in abundance in the WT than in the *rne-131* strain (Fig. 3C). The loading control was 16S rRNA. The absence of unprocessed 5S rRNA intermediates indicates that RNase E is active at 44°C.

In light of these results, we looked for additional ribonucleases targeting *thiMD* mRNA. We performed Northern blot assays using various ribonuclease mutant strains inactivated for RNase III, RNase II, RNase R, RNase G or PNPase (Supplemental Fig. S6B-F), and a strain mutated for polyadenylate polymerase, which is known to facilitate the degradation of structured RNA (*pcnB*, Supplemental Fig. S6G). Our results showed that *thiMD* mRNA regulation was unaffected in any of the mutant strains. Nevertheless, the intermediate 1 species and a ~170 nt fragment (identified by 3' RACE) were more abundant in the PNPase mutant strain (Supplemental Fig. S6F), indicating that this exoribonuclease, a component of the RNA degradosome, participates in the decay of mRNA intermediates. Furthermore, the TPP-dependent increase of the aptamer species was significantly higher in *rnr* (encoding RNase R) and *pcnB* mutant strains (3.6-fold and 4.0-fold, respectively, Supplemental Fig. S6H), indicating that both enzymes are involved in degrading the TPP-bound aptamer. This is supported by an aptamer half-life about 2-fold higher in the *pcnB* mutant in the presence of TPP (Supplemental Fig. S6I). Although our experiments did not identify an additional ribonuclease important for *thiMD* mRNA decay, they suggested that the highly structured TPP-bound aptamer is likely degraded via the addition of a polyA tail (PcnB) and the exoribonuclease activity of RNase R.

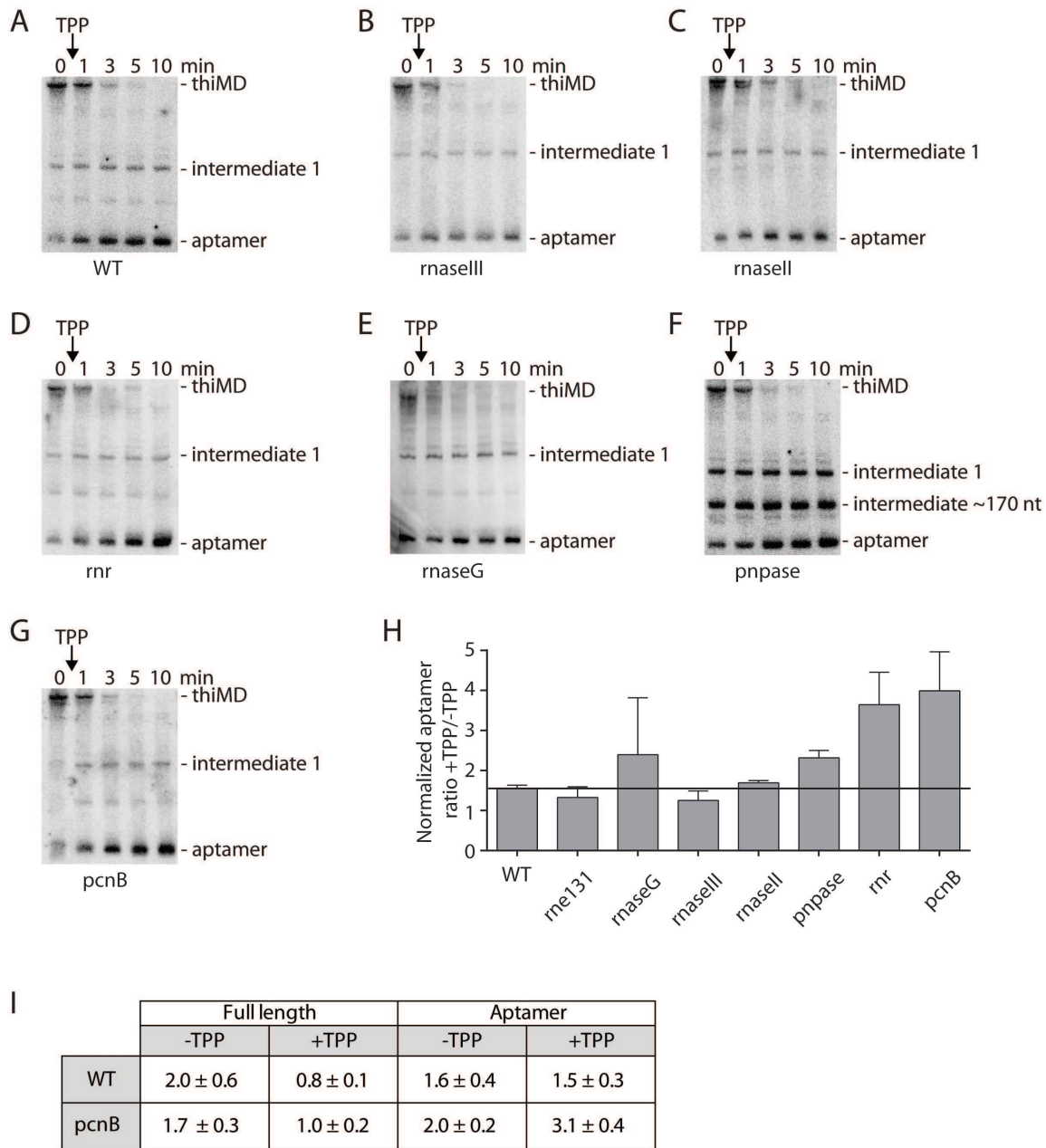


Figure S6. Northern blot analysis of *thiMD* mRNA in different mutant strains.

(A, B, C, D, E, F and G) Northern blot analyses of *thiMD* mRNA level performed in wild-type (A) and mutated strains for RNase III (B), RNase II (C), RNase R (D), RNase G (E), PNPase (F) and PcnB (G). Experiments were performed as indicated in Figure 1B.

(H) Normalized aptamer ratios determined in the presence and in absence of TPP for the wild-type and mutant strains. The relative intensities of the aptamer species at 0 and 10 min after TPP addition were determined from Northern blot assays performed for each strain (panels A to G). The horizontal line represents the ratio obtained in the wild-type strain. The average values of three independent experiments with SDs are shown. (I) Half-life determination performed for wild-type and *pcnB* strains. Only the *pcnB* mutant strain is showing a

significant half-life increase (~2-fold) of the aptamer in presence of TPP, suggesting that the poly A polymerase (PAP) is important for its degradation. The average values of three independent experiments with SDs are shown.

The RNA degradosome targets *thiMD* mRNA between codons 20 and 34

To characterize the RNase E cleavage activity targeting the 34-codon *thiM* region, we carried out an *in vitro* cleavage assay using purified RNA degradosomes (Caron et al. 2012). We used a portion of the *thiM* mRNA sequence (174-271 nt) encompassing codons 9 to 40 (Fig. 4A). When incubating the transcript in the presence of purified RNA degradosomes, three cleavage site regions were mapped at positions 212, 219 and 255 (Fig. 4B). The sequence of the cleavage site at position 219 is similar to that previously observed for the *lysC* riboswitch (Caron et al. 2012), suggesting that both *thiM* and *lysC* are recognized through similar determinants by the RNA degradosome. Based on these observations, we constructed several mutants to examine the importance of the cleavage site at position 219 and the stem-loop structure for the specificity of RNA degradosome cleavage (Fig. 4B,C). Overall, altering the sequence of the 219 cleavage site resulted in the complete inhibition, or drastic reduction, of cleavage activity at positions 219 and 255. Even though positions 212 and 219 are closely located in the *thiM* sequence (Fig. 4A), cleavage at position 212 was preserved when cleavage at 219 was disabled (M1, M2 and M3 mutants), indicating that RNA degradosome cleavage at these sites can be uncoupled. Furthermore, stem-loop mutagenesis data showed that the stability of the stem (M4 mutant), but not the sequence of the loop (M5 mutant), is highly important for cleavage activity (Fig. 4C).

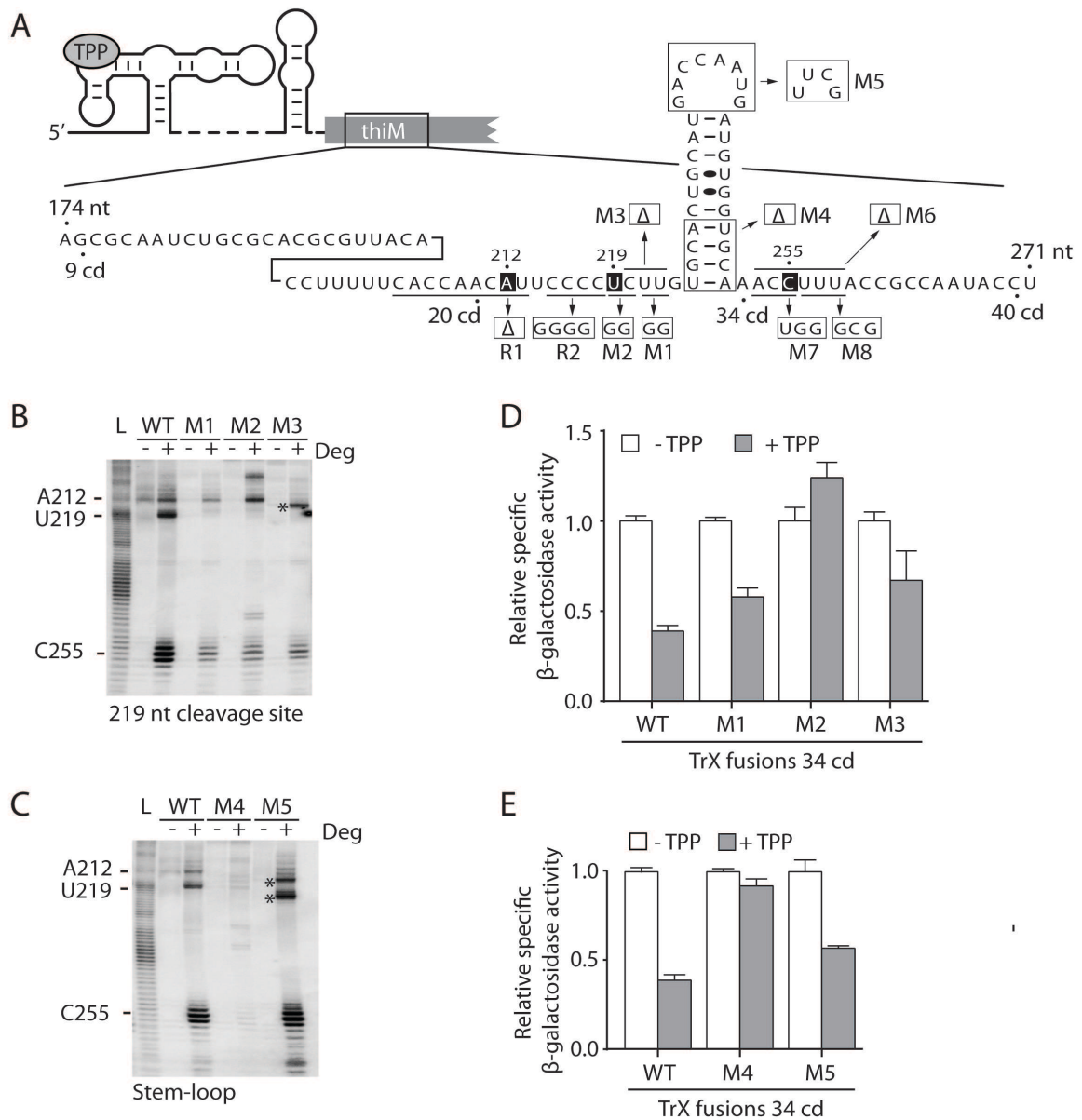


Figure 4. The RNA degradosome activity targets specific *thiMD* RNA sites. (A) Schematic representing *thiM* ORF comprising codons 9 to 40. Nucleotides shown in black squares correspond to RNA degradosome cleavage sites (positions 212, 219 and 255). Mutations and deletions (Δ) are shown in the structure. (B and C) *In vitro* mapping of RNA degradosome cleavage sites. Experiments were done with mutants of cleavage site 219 (B) and stem-loop (C). RNA molecules were incubated in the absence (-) or presence (+) of RNA degradosomes (Deg). Alkaline hydrolysis (L) was used to generate molecular markers for gel migration. Cleavage sites 212, 219 and 255 are indicated on the left. Asterisks indicate mutants resulting in shorter RNA cleavage products. (D and E) β -Galactosidase assays of transcriptional *thiM-lacZ* fusions performed in the absence or presence of 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TPP. Measurements were performed for mutants targeting site 219 (D) and the stem-loop (E).

Values were normalized to the activity obtained in the absence of TPP. The average values of three independent experiments with SDs are shown.

Of the mutants we tested, only M2 and M4 completely abolished TPP-dependent gene regulation in *thiM-lacZ* transcriptional fusions (Fig. 4D,E), suggesting that the cleavage site at position 219 and stem-loop stability are the major requirements for mRNA control. Interestingly, *lysC* riboswitch gene regulation is also completely perturbed in the presence of M2 mutations (Caron et al. 2012), suggesting that the cleavage site at position 219 is important for both *thiM* and *lysC* riboswitches. Increasing the ORF size to more than 100 codons in an M2 mutant background recovered TPP-dependent mRNA regulation (Supplemental Fig. S7A). This result agrees with the presence of additional downstream sequences controlling the level of *thiMD* mRNA. However, although such downstream elements could include cleavage site 255, which is not present in 34-codon transcriptional fusions (Fig. 4D,E), the absence of regulation in the 50-codon M2 mutant transcriptional fusion indicates that it is not crucial for *thiMD* mRNA control (Supplemental Fig. S7A). Consistent with these results, no effect on *thiMD* mRNA regulation was detected when performing mutations of the cleavage site at position 255 (Supplemental Fig. S7B,C). Importantly, our data show that even if targeted by the RNA degradosome, cleavage within the first 34 *thiM* codons is not limiting for *thiMD* mRNA regulation.

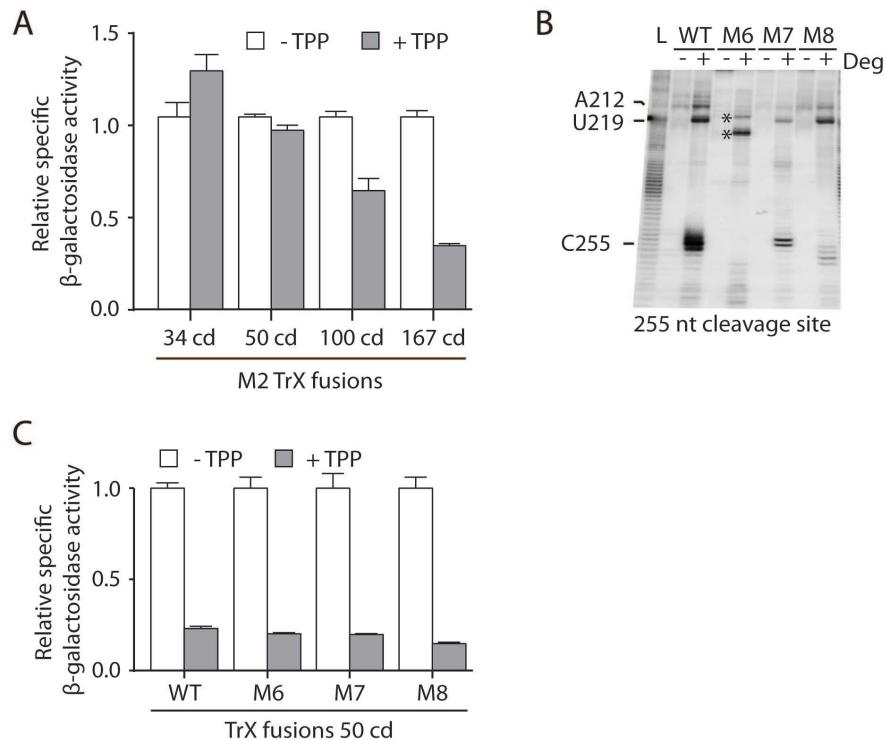


Figure S7. Characterization of the M2 mutant and cleavage site at position 255 for *thiM* mRNA regulation.

(A) β -Galactosidase assays of transcriptional *thiM-lacZ* fusions of the M2 mutant with fusions at codons 34, 50, 100 and 167 of *thiM*. Enzymatic activities were conducted in the wild-type strain in the absence or presence of 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TPP. Values were normalized to the enzymatic activity obtained in the absence of TPP. The average values of three independent experiments with SDs are shown. (B) *In vitro* mapping of RNA degradosome cleavage sites (see Fig. 4A for mutant description). RNA molecules were incubated in the absence (-) or presence (+) of RNA degradosomes (Deg). Alkaline hydrolysis (L) was used to generate molecular markers for gel migration. Cleavage sites 212, 219 and 255 are indicated to the left of the gel. Asterisks indicate mutants resulting in shorter RNA cleavage products. (C) β -Galactosidase assays of transcriptional *thiM-lacZ* fusions performed in the absence or presence of 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TPP (see Fig. 4A for mutant description). Constructs contained 50 codons to include the target site. Values were normalized to the activity obtained in the absence of TPP. The average values of three independent experiments with SDs are shown.

The Rho transcription terminator is involved in *thiMD* mRNA regulation

Based on previous studies (Hollands et al. 2012), we speculated that Rho transcription termination could be involved in *thiMD* regulation. Close examination of the first 34-codon sequence shows high and low proportions of cytosines and guanines, respectively, often

associated with Rho utilization sites (*rut*) (Fig. 5A) (Hollands et al. 2012; Figueroa-Bossi et al. 2014). Interestingly, a C-stretch sequence located at nucleotides 215-218 is positioned immediately upstream of the RNA degradosome cleavage site at position 219 (Fig. 4A). To establish if Rho is involved in *thiM* mRNA regulation, we measured β -galactosidase activity using a *thiM-lacZ* transcriptional fusion in presence or absence of bicyclomycin, an inhibitor of Rho translocation activity (Kohn and Widger 2005). As shown in Figure 5B, we observed a complete loss of TPP-induced repression (34 cd, WT TrX fusion), indicating that Rho transcription termination is directly involved in *thiMD* mRNA control. Intriguingly, even when Rho is inhibited by bicyclomycin, TPP-dependent gene regulation resulting from RNase E cleavage activity is expected. However, given that bicyclomycin interferes with Rho translocation but not mRNA binding (Skordalakes et al. 2005) (see Discussion), it is most likely that a bicyclomycin-Rho complex stalls around position 219, thereby preventing RNA degradosome cleavage activity. We thus reasoned that a larger *thiM* ORF fragment should allow TPP-dependent mRNA regulation due to the presence of downstream regulatory element(s) (Supplemental Fig. S7A). Partial restoration of TPP-dependent gene regulation was indeed obtained using a longer *thiM-lacZ* fusion (100 cd, Fig. 5B), consistent with the presence of a stalled bicyclomycin-Rho complex inhibiting RNase E activity at position 219. A large increase in β -galactosidase activity was observed when assessing an RBS-mutated *thiM-lacZ* construct in the presence of bicyclomycin (RBS construct, Fig. 5B), consistent with constitutive Rho transcription termination in the absence of active translation. Moreover, a *btuB-thiM-lacZ* transcriptional fusion completely abolished gene repression in the presence of bicyclomycin (Fig. 5C). These results indicate that Rho transcription termination does not rely on riboswitch identity and that the region containing *thiM* codons 9-34 is sufficient for regulation. Our data suggest that, in addition to RNase E cleavage activity, the *thiM* riboswitch modulates Rho transcription termination through translational control.

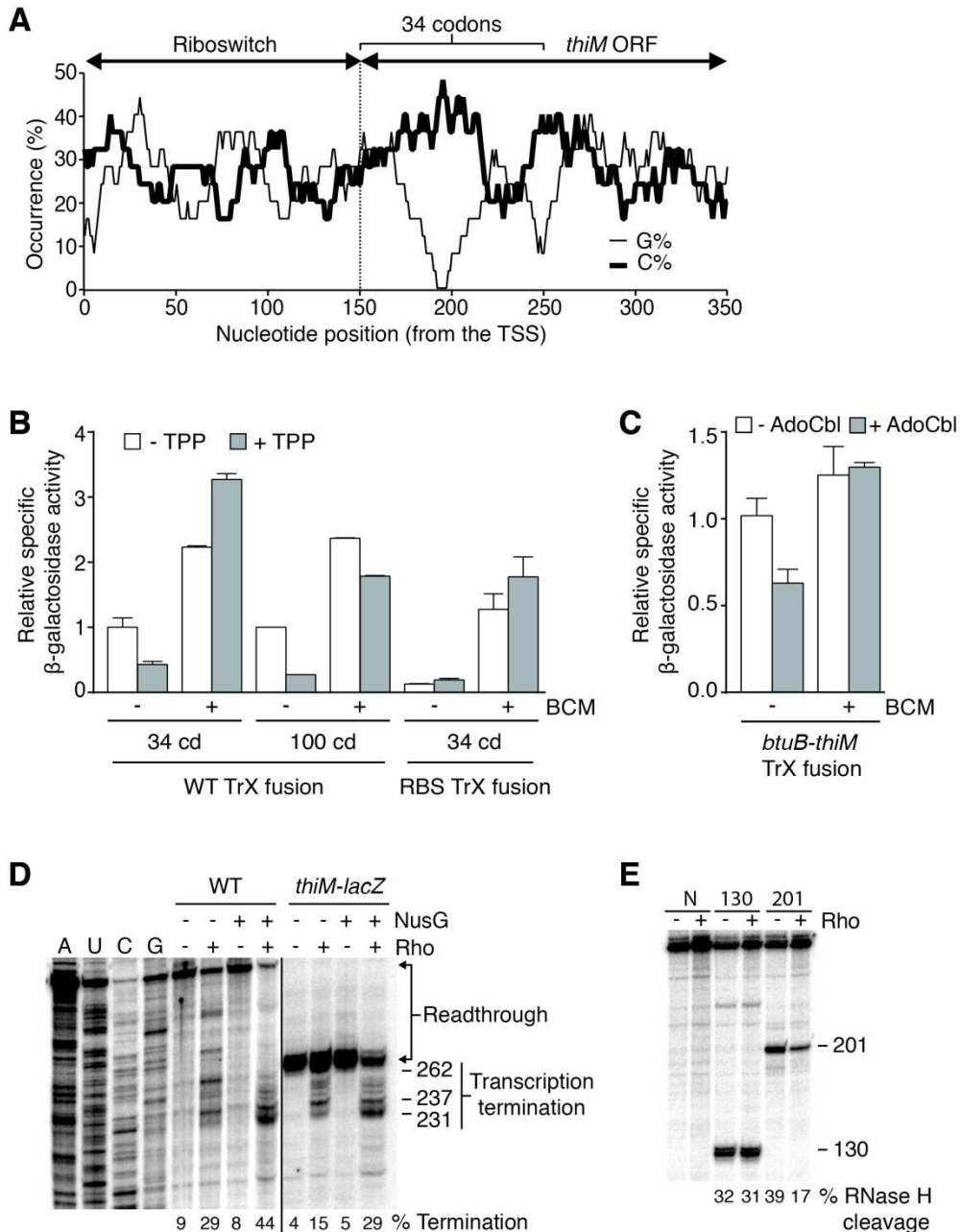


Figure 5. The *thiM* riboswitch controls Rho-dependent transcription termination. (A) Sequence analysis of cytosine (C%) and guanine (G%) distribution in the *thiM* sequence. A scanning window of 25 nt was used to determine C and G occurrences as a function of the transcription start site (TSS). (B and C) β -Galactosidase assays of the wild-type and RBS mutant in transcriptional *thiM-lacZ* fusions (B) and of a transcriptional *btuB-thiM-lacZ* fusion (C). Sizes of *thiM* ORFs (34 and 100 codons) are indicated below histograms. Enzymatic activities were measured in the absence or presence of 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TPP, 5 μM AdoCbl or 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bicyclomyacin (BCM). Values were normalized to enzymatic activity obtained for wild-type constructs without ligand. The average values of three independent experiments with SDs are shown. (D) *In vitro* Rho-dependent transcriptions performed using wild-type *thiM* mRNA and *thiM-lacZ* transcriptional fusion. Transcriptions were done in the absence (-) or presence

(+) of 50 nM NusG or 50 nM Rho. Readthrough and termination transcripts are indicated at the right. Termination efficiencies are indicated below. Note that readthrough products of 400 and 274 nt are expected for the wild-type and 34-codon *thiM-lacZ* fusion, respectively. (E) RNase H probing of Rho binding on *thiM* mRNA. RNase H assays were performed in the absence (-) or presence (+) of 50 nM Rho. Cleavage assays were done using DNA oligonucleotides targeting regions 130-139 (130) or 201-210 (201). Cleavage products and cleavage efficiencies are indicated on the right and below, respectively. Non-cleaved transcripts (N) are shown as controls.

Rho transcription termination occurs close to RNase E cleavage sites

Single-round transcription assays were next performed to determine Rho transcription termination sites. In the presence of Rho, we observed specific *thiM* mRNA transcription arrests at several sites, including positions 237 and 262 (WT, Fig. 5D). An additional strong termination site was observed at position 231 when Rho and the transcription factor NusG (Li et al. 1993; Shashni et al. 2014) were included in the transcription reaction (WT, Fig. 5D). No difference was observed in the presence of TPP (data not shown). As expected, Rho termination occurred in the context of a transcriptional 34-codon *lacZ-thiM* fusion (Fig. 5D), consistent with bicyclomycin inhibiting Rho transcription termination in *lacZ* fusions (Fig. 5B).

To establish whether the Rho binding site occurs in the first 34 codons of *thiM* mRNA, we employed a well-established RNase H assay that cleaves at RNA:DNA hybrid regions (Treiber and Williamson 2000). In these experiments, 5'-radiolabelled *thiM* mRNA transcripts produced using the *E. coli* RNA polymerase (RNAP) were incubated in presence of Rho, but without ATP, to avoid Rho translocation activity. We used a DNA oligonucleotide to target residues 201-210 (oligonucleotide 201, Fig. 5E). We expect these residues to be part of the rut site, given their high and low composition in cytosines and guanines, respectively (Fig. 5A). In the absence of Rho, we observed efficient cleavage of the *thiM* transcript by RNase H (39%), indicating that the region is accessible for the binding of the oligonucleotide 201 (Fig. 5E). However, the presence of Rho resulted in much decreased RNase H cleavage (17%), suggesting that Rho binding protects the 201-210 nucleotides region from oligonucleotide binding. No such Rho-dependent protection was observed when using an oligonucleotide targeting residues 130-139 (oligonucleotide 130, Fig. 5E). Thus, our data indicate that Rho binding specifically occurs at the predicted rut in the first 34 codons of *thiM* mRNA (Fig. 5A).

The importance of the *rut* sequence was determined using transcriptional *thiM-lacZ* fusions containing deletions of the C-rich region (205-213 nt, R1 mutant) or base substitutions of the C-stretch (215-218 nt, R2 mutant; see Fig. 4A for mutant description). While a loss of regulation was observed for mutant R1 (Supplemental Fig. S8A), both a disruption in gene regulation and higher β -galactosidase activities were obtained for the mutant R2 (Supplemental Fig. S8A), suggesting that the C-stretch is highly important for *thiM* mRNA regulation. Moreover, *in vitro* assays showed that RNA degradosome cleavage activity on mutant R2 was also more perturbed, since only the cleavage site at position 212 was not significantly affected for this mutant (Supplemental Fig. S8B). These results imply that the C-stretch sequence is involved in both Rho transcription termination and RNA degradosome cleavage activity. Notably, M2 mutations, which are located immediately downstream of the C-stretch, completely inhibited gene regulation (Fig. 4E), consistent with this region being crucial for *thiM* regulation.

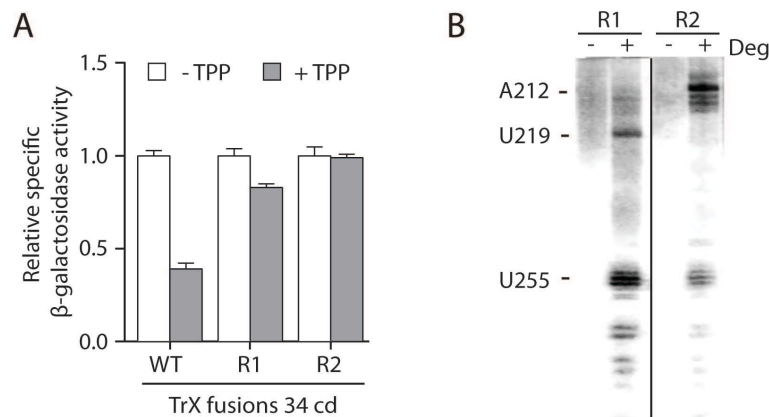


Figure S8. *In vitro* mapping of RNA degradosome cleavage sites.

(A) β -Galactosidase assays of transcriptional *thiM-lacZ* fusions for wild-type, R1 and R2 mutants (see Fig. 4A for mutant description). Enzymatic activities were measured as a function of 500 μ g/mL TPP. Values were normalized to the enzyme activity obtained for the wild-type construct without TPP. The average values of three independent experiments with SDs are shown. (B) *In vitro* mapping of RNA degradosome cleavage sites for R1 and R2 mutants (see Fig. 4A for mutant description). Experiments were performed as described for Figure 4B. RNA molecules were incubated in cleavage buffer in the absence (-) or presence (+) of RNA degradosomes. Expected cleavage sites for positions 212, 219 and 255 are indicated to the left of the gel.

Monitoring Rho transcription termination using ChIP assays

To evaluate the influence of Rho on *thiM* mRNA transcription, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) of the RNAP (β subunit) with quantitative PCR (ChIP-qPCR). These experiments were performed in the context of a wild-type and a R66S Rho mutant strain; R66S mutant Rho is defective in the termination of many RNAs, presumably due to a defect in its ability to bind RNA (Martinez et al. 1996). Cells were grown in rich LB medium allowing TPP intracellular accumulation (Leonardi and Roach 2004). RNAP local occupancy was assessed by measuring the amount of *thiM* DNA co-immunoprecipitated with RNAP, using two pairs of primers targeting specific regions of the 5' UTR and ORF domains. We found lower RNAP occupancy within the ORF compared to the 5' UTR, suggesting transcriptional termination within the early coding sequence (Fig. 6A). However, a smaller difference in RNAP occupancy between 5' UTR and ORF domains was detected in the *rho* mutant cells (Fig. 6A), consistent with Rho inactivation leading to increased transcription efficiency across *thiM*. To summarize the effect of the R66S Rho mutant on RNAP association across a gene, we calculated a "Rho termination score", defined as the ratio of RNAP association in the ORF versus the transcript 5' UTR in the Rho mutant, normalized to the equivalent ratio in the wild-type. Rho termination scores significantly greater than 1.0 indicate of Rho termination within the gene. We determined a Rho termination score for *thiM* of 2.8, indicating Rho-dependent termination within *thiM* (Fig. 6A), consistent with *in vitro* transcription data (Fig. 5D). As expected, a Rho termination score of 9.3 was observed for *rho* (Fig. 6B), which is known to be auto-regulated (Matsumoto et al. 1986). In contrast, we determined the Rho termination score for *btuB* to be 0.9 (Fig. 6A), suggesting that Rho is not involved in *btuB* regulation. The similar level of RNAP occupancy for both 5' UTR and ORF domains in the wild-type strain suggests either that no transcriptional control is in place or that a low AdoCbl concentration is present in the growth medium (Lawrence and Roth 1995). Nevertheless, the absence of Rho participation is supported by both the lack of bicyclomycin effect when using a 27-codon *btuB-lacZ* transcriptional construct (Supplemental Fig. S9A) and the absence of a C-rich/G-poor sequence profile in the corresponding mRNA region (Supplemental Fig. S9B). Together, our data indicate a role for Rho-dependent termination in the regulation of *thiM* but not *btuB*.

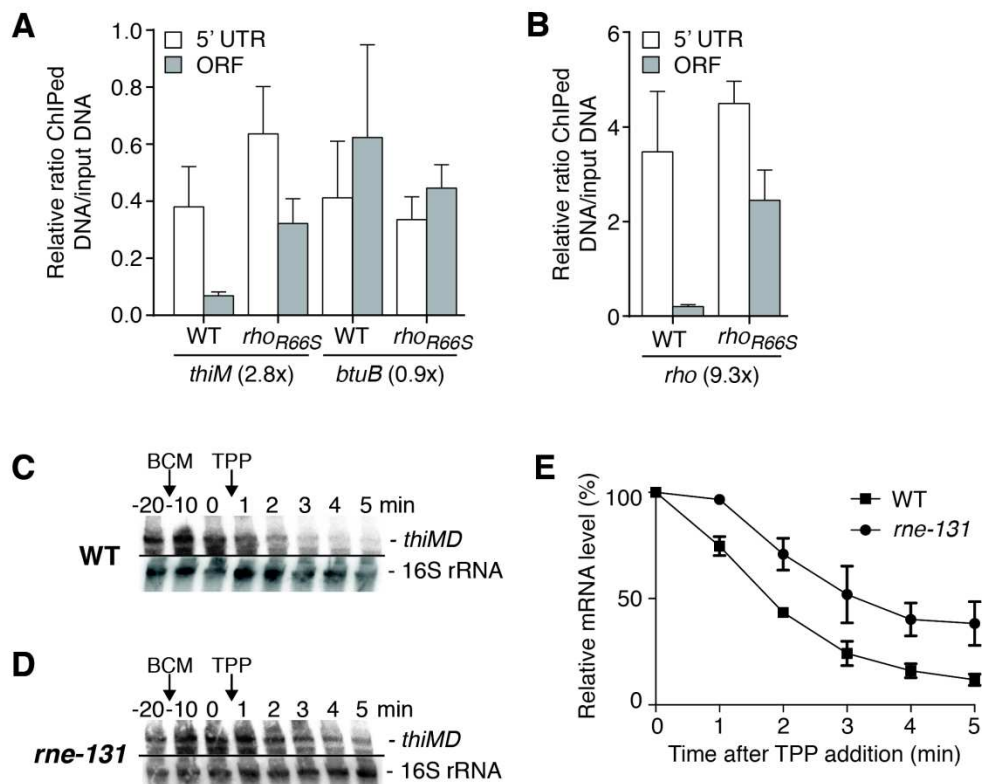


Figure 6. The Rho/RNA degradosome regulation mechanism is crucial for mRNA decay. (A and B) ChIP-qPCR data showing RNA polymerase occupancy upstream for *thiM* and *btuB* (A) and *rho* (B). ChIP-qPCR data showing RNA polymerase (β subunit) occupancy at indicated locations. Values indicated represent the relative enrichment of ChIP DNA to the input control in wild-type cells or cells expressing the R66S Rho mutant from its native locus. (C and D) Northern blot experiments using wild-type (C) and *rne-131* (D) strains in presence of 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TPP and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bicyclomycin (BCM). RNAs were extracted at midlog phase before (-20 min) and after bicyclomycin addition (-10 min), and before (0) and after (1, 2, 3, 4, 5 min) TPP addition. A probe hybridizing to the *thiM* ORF domain was used. 16S rRNA was used as a loading control. (E) Quantification analysis of Northern blots shown in panels C and D. The graph represents the relative percentage of mRNA as a function of time. The average values of three independent experiments with SDs are shown.

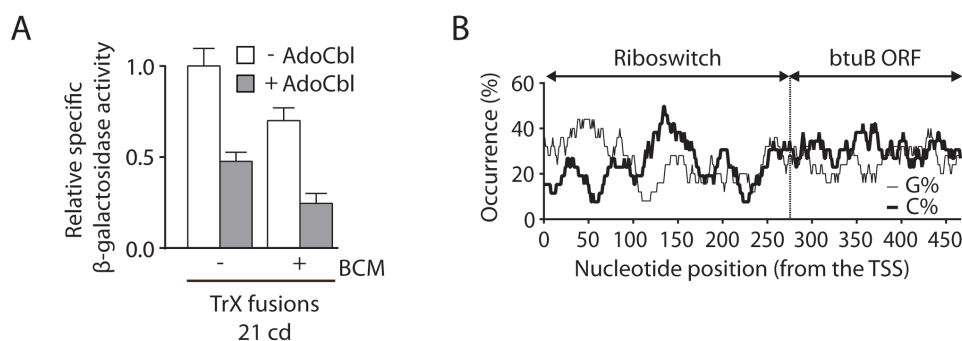


Figure S9. The *E. coli* *btuB* riboswitch does not rely on Rho transcription termination. (A) β -Galactosidase assays of transcriptional *btuB-lacZ* fusions containing 27 *btuB* codons were performed in the wild-type strain. Reactions were performed in the absence or presence of 5 μ M AdoCbl and 25 μ g/mL bicyclomycin (BCM). Values were normalized to the enzyme activity obtained for wild-type constructs without ligand. The average values of three independent experiments with SDs are shown. (B) Sequence analysis of the cytosine (C%) and guanine (G%) distribution on *btuB* riboswitch and 77 *btuB* codons. A scanning window of 25 nt was used to determine the relative presence of both nucleotides (C and G) as a function of *btuB* sequence positions. Note that there is no C-rich/G-poor sequence indicating a possible rut site.

The dual Rho/RNA degradosome mechanism is crucial for *thiMD* mRNA control

The importance of a dual Rho/RNA degradosome mechanism was assessed in the context of endogenous *thiMD* mRNA. Addition of TPP to a bicyclomycin-containing growth medium efficiently decreased *thiMD* mRNA levels (compare Figs. 1B and 6C), suggesting that Rho inactivation does not perturb *thiMD* mRNA regulation. Rho inactivation was confirmed by the increased in *rho* mRNA levels in the presence of bicyclomycin (Supplemental Fig. S10A). In contrast, bicyclomycin addition to an RNA degradosome-defective *rne-131* strain resulted in a significantly slower rate of mRNA decrease (Fig. 6D,E), indicating that inactivation of both mechanisms is detrimental for *thiMD* mRNA control. Furthermore, the use of a probe targeting the *thiM* riboswitch in wild-type and *rne131* strains resulted in the accumulation of multiple intermediate mRNA fragments (Supplemental Fig. S10A,B), probably reflecting alternative degradation pathways to ensure *thiMD* mRNA degradation when Rho is inhibited. Thus, our results suggest that both Rho transcription termination and RNA degradosome activity must be simultaneously inhibited to perturb TPP-dependent *thiMD* mRNA regulation.

Our results suggest that the *thiM* riboswitch regulates gene expression both co-transcriptionally by Rho transcription termination and post-transcriptionally by RNA degradosome activity, the latter supported by reduced mRNA half-life in the presence of TPP (Supplemental Fig. S4C). To investigate TPP binding kinetics, we used RNase H cleavage assays to monitor TPP binding to nascent *thiM* transcripts. In this assay, a DNA oligonucleotide is added after transcription completion to probe TPP-dependent formation of the P1 stem (Supplemental Fig. S11A,B). Thus, by monitoring P1 formation as a function of time (Supplemental Fig. S11C), it is possible to estimate the apparent rate of TPP binding to the riboswitch. We first performed transcription of the *thiM* riboswitch without TPP and observed efficient RNase H cleavage of nascent transcripts (lane C, Supplemental Fig. S12A). However, transcription reactions with TPP (co-transcriptional binding) yielded cleavage protection for all transcription time points, consistent with efficient TPP binding (Supplemental Fig. S12A). Post-transcriptional TPP addition also resulted in RNase H protection, although to a lesser degree (Supplemental Fig. S12A). Fitting the data to a single-exponential model yielded apparent binding rates of $0.13 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ and $0.05 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$ for co- and post-transcriptional TPP addition, respectively (Supplemental Fig. S12B). These apparent binding rates indicate that TPP recognition is performed only 2.5-fold slower post-transcriptionally, suggesting that the riboswitch can sense TPP both co- and post-transcriptionally.

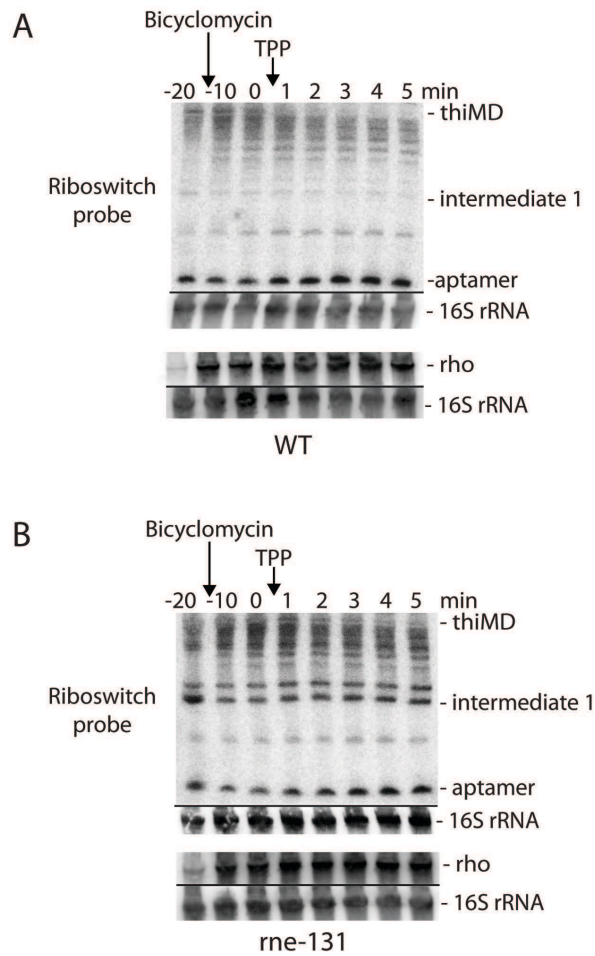


Figure S10. Analysis of the *thiMD* mRNA level as a function of TPP, bicyclomycin and RNA degradosome integrity.

(A and B) Northern blot analysis of *thiMD* mRNA levels in wild-type (A) and *rne-131* (B) strains using a probe targeting the riboswitch domain. Bacterial strains were grown and RNA extracted as indicated in Figure 6C. Bicyclomycin (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and TPP (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were added at the indicated times. A probe targeting *rho* mRNA (positions 256 to 455) was used to establish the efficacy of bicyclomycin in blocking Rho activity. The loading control was 16S rRNA. RNA species are indicated to the right of the gels.

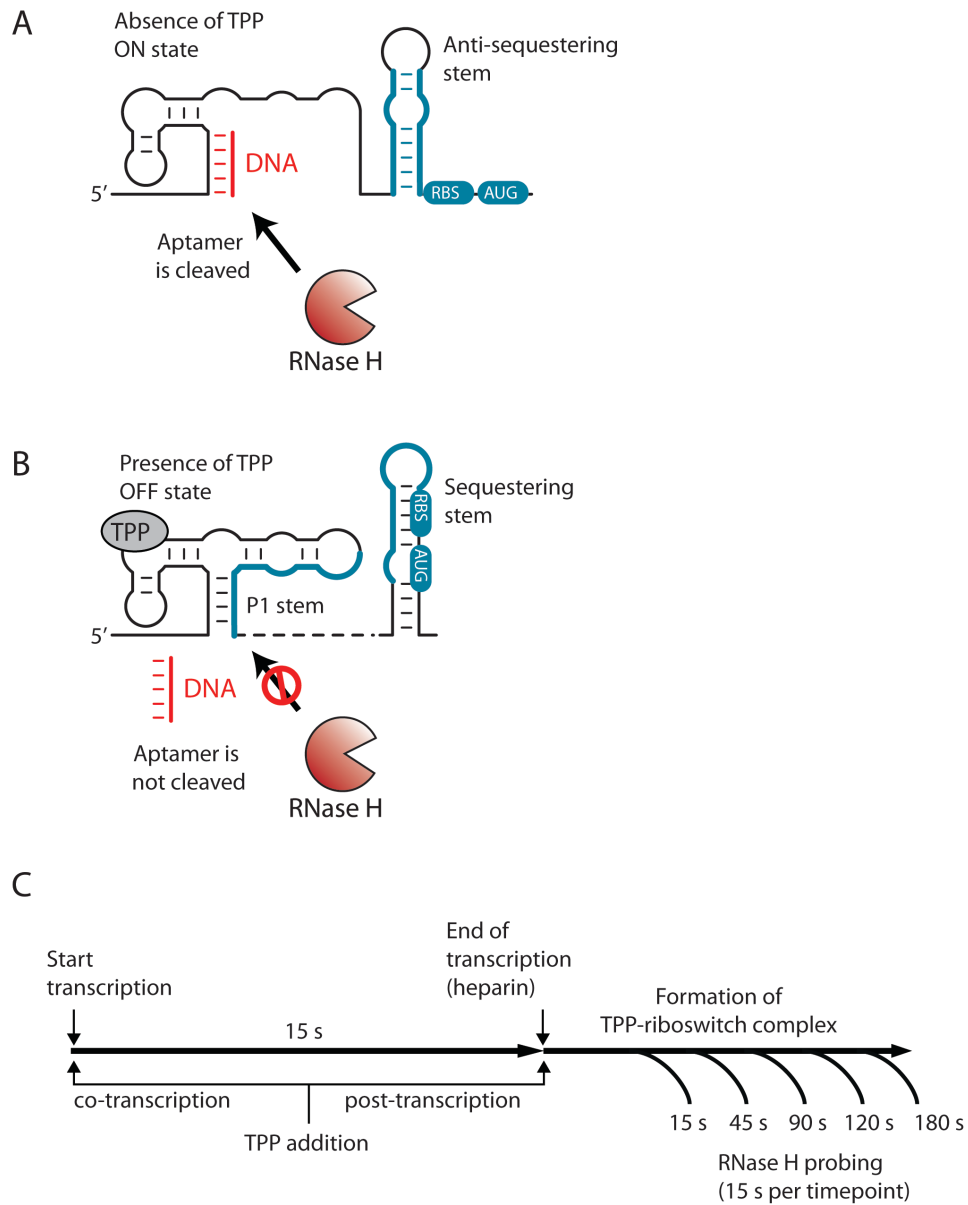


Figure S11. Schematic of the RNase H cleavage assay probing TPP binding to the *thiM* riboswitch.

(A) Representation of the *thiM* riboswitch in the absence of TPP. Because the riboswitch is in the ON state, the incubation of a DNA oligonucleotide (red) specifically hybridizing to the aptamer domain results in RNase H cleavage activity of the riboswitch.

(B) Representation of the *thiM* riboswitch in presence of TPP. TPP binding leads to the adoption of the OFF state in which the P1 stem is formed. In this condition, DNA oligonucleotide binding to the riboswitch is not possible and RNase H cleavage of the riboswitch is not observed.

(C) Experimental setup assessing TPP binding to the *thiM* riboswitch. Addition of TPP is performed either at the beginning or at the end of a 15 s transcription reaction, thereby allowing TPP binding to occur either co-transcriptionally or

post-transcriptionally, respectively. Under these conditions, full-length transcription is achieved in less than 15 s and the presence of heparin ensures that no transcription re-initiation occurs. RNase H cleavage assays were performed at the indicated time points for 15 s.

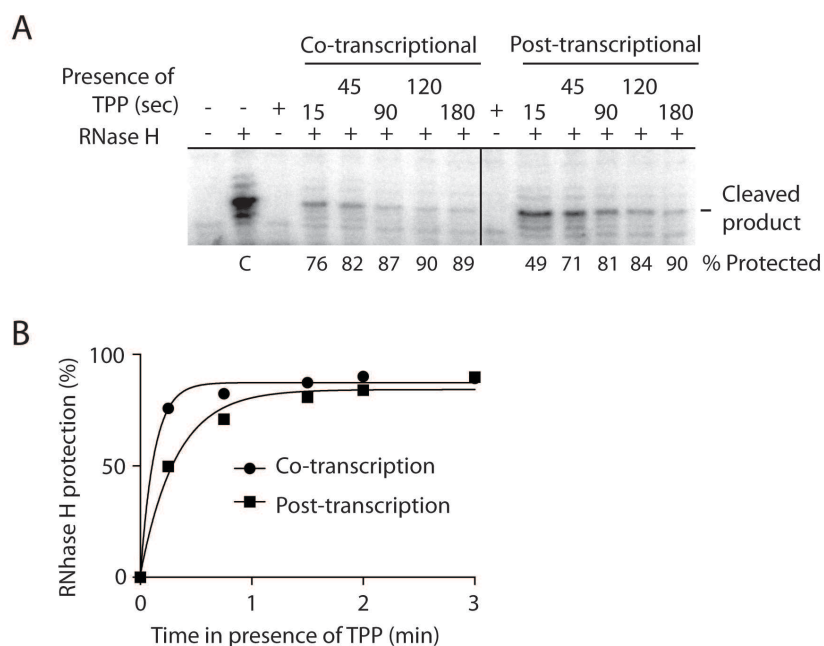


Figure S12. RNase H cleavage assays monitoring co- and post-transcriptional TPP binding to the *thiM* riboswitch.

(A) RNase H assays performed on nascent *thiM* mRNAs. Transcription was performed using *E. coli* RNAP and RNase H reactions were performed for 15 s in all cases. A control (lane C) shows the cleaved product in the absence of TPP, consistent with accessibility of the P1 stem to oligonucleotide binding and RNase H cleavage. Co-transcriptional studies were carried out by adding TPP (10 μ M) at the beginning of the transcription and by performing RNase H assays at the indicated times. Post-transcriptional TPP binding studies were conducted similarly but TPP was added at the end of transcription. The DNA probe was designed to target the P1 stem. (B) Quantification analysis of RNase H experiments shown in panel A. Data were fitted to a single-exponential model and yielded apparent TPP binding rates of $0.13 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ and $0.05 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$ for co- and post-transcriptional binding, respectively. The model assumes that no cleavage protection is obtained in the absence of TPP. Reported errors are related to the standard error in the fitting, which is assumed to be approximated by the standard deviation of the points from the fitted curve (Rist and Marino 2001).

The *lysC* riboswitch relies on a dual Rho/RNA degradosome mechanism to control gene expression

Our previous work on the *lysC* riboswitch suggested that Rho is not involved in *lysC* mRNA control (Caron et al. 2012). However, analysis of the *lysC* riboswitch expression platform indicated that previously determined RNase E cleavage sites 1 and 2 (Supplemental Fig. S13A) are located in a region containing high and low proportions of C and G residues, respectively (Supplemental Fig. S13B). Bicyclomycin addition resulted in the complete loss of lysine-dependent mRNA regulation when using a transcriptional *lysC-lacZ* fusion (Supplemental Fig. S13C), clearly indicating the implication of Rho transcription termination. Further confirmation was obtained from ChIP assays producing a Rho termination score of 6.1 (Fig. 7A). These findings, together with our previous work (Caron et al. 2012), indicate that the *lysC* riboswitch also directly controls both Rho transcription termination and the RNA degradosome to modulate *lysC* mRNA.

Rho transcription termination is used by most *E. coli* riboswitches

To establish whether Rho transcription termination is widespread among all other known *E. coli* riboswitches, we used ChIP-qPCR for riboswitch-controlled genes *thiB*, *thiC*, *ribB* and *mgtA*. We obtained Rho termination scores of 12 for *thiB*, 3.0 for *thiC* and 3.1 for *ribB* (Fig. 7B,C), indicative of Rho termination within these genes. The Rho termination score of *ribB* is consistent with previous results (Hollands et al. 2012). In contrast, our Rho termination score of 1.0 for *mgtA* (Fig. 7C) suggests that Rho transcription termination is not involved for this riboswitch. Our data indicate that, in addition to their translational regulation, most *E. coli* riboswitches use Rho-dependent termination to modulate gene expression.

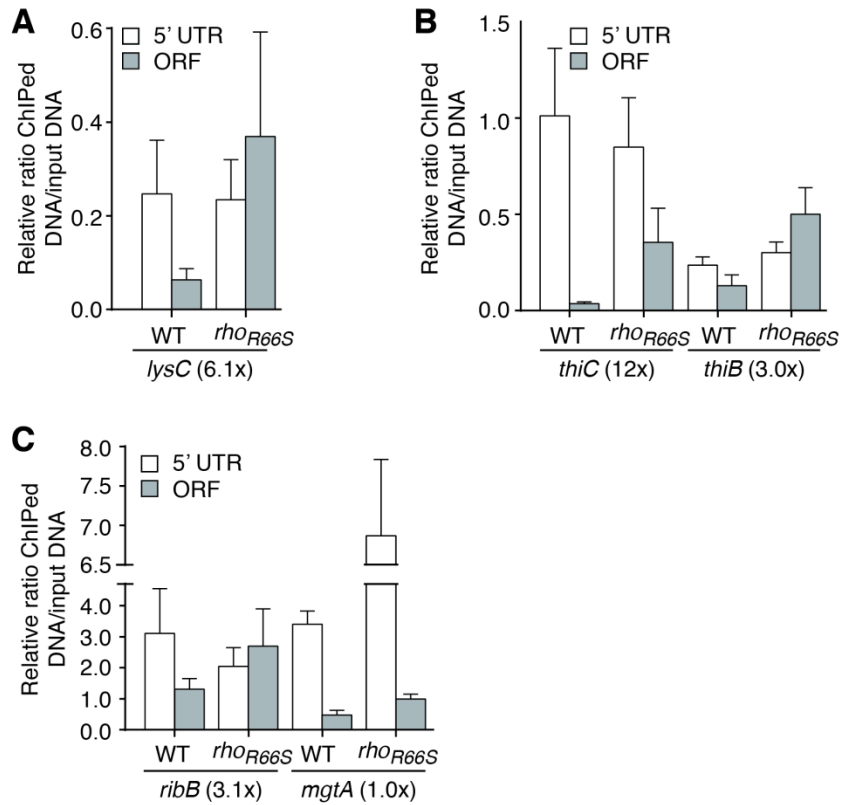


Figure 7. Monitoring the RNA polymerase occupancy of several *E. coli* riboswitches using ChIP.

(A, B and C) ChIP-qPCR data showing RNA polymerase (β subunit) occupancy for *lysC* (A), *thiB* and *thiC* (B) and for *ribB* and *mgtA* (C). Values represent the relative enrichment of ChIP DNA to the input control in wild-type cells or cells expressing the F66S Rho mutant from its native locus.

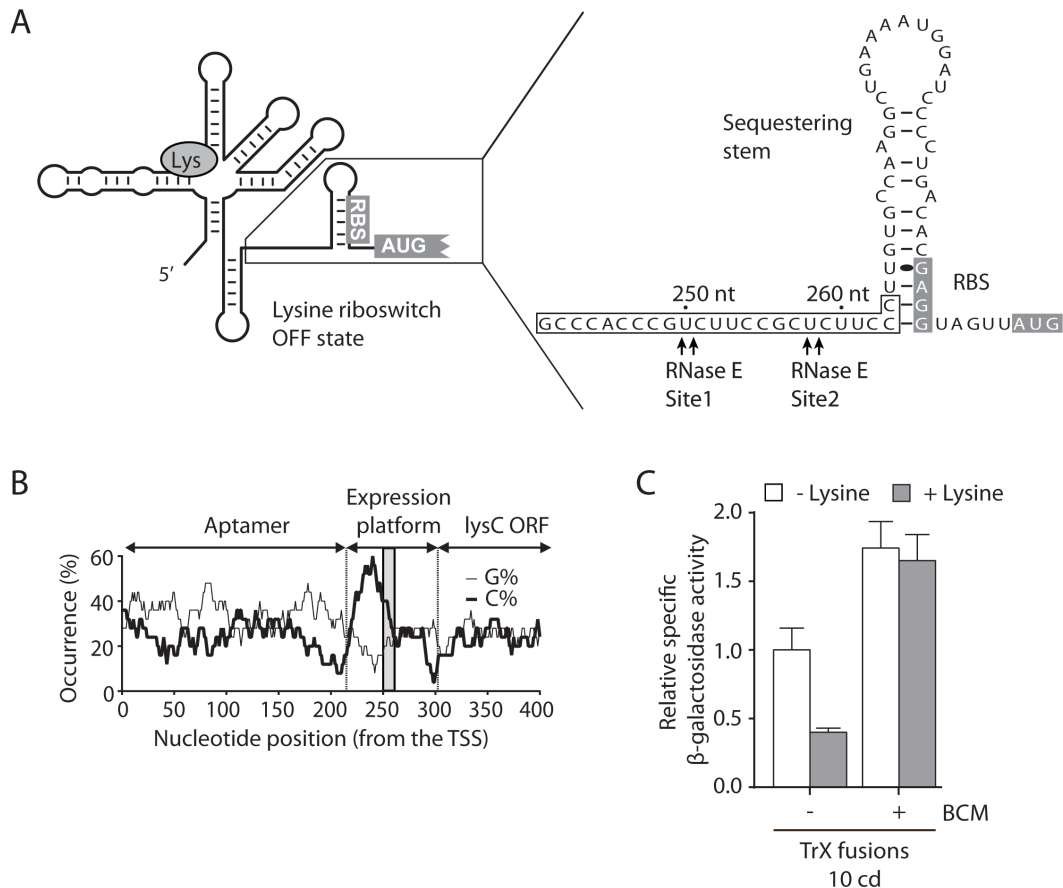


Figure S13. The *lysC* lysine riboswitch modulates Rho transcription termination upon lysine binding.

(A) Schematic representing the *lysC* riboswitch with nucleotide sequence and predicted stem-loop structure of the expression platform. Arrows indicate previously identified RNA degradosome cleavage sites (Caron et al. 2012). Boxed nucleotides show the potential *rut* site located immediately upstream of the translation-sequestering stem. Nucleotides emphasized in gray show the RBS sequence and the AUG start codon. (B) Sequence analysis of cytosine (C%) and guanine (G%) distribution in *lysC* mRNA. A scanning window of 25 nt was used to determine C and G occurrences as a function of nucleotide positions. Note that the region around position 250 nt shows a profile predicted for *rut* sites where high and low proportions of cytosines and guanines are observed, respectively. (C) β -Galactosidase assays of *lysC-lacZ* transcriptional fusions. Enzymatic activities were measured in the absence or presence of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lysine and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bicyclomycin (BCM). Values were normalized to the enzyme activity obtained for the wild-type in absence of ligand and BCM. The average values of three independent experiments with SDs are shown.

DISCUSSION

Overlapping sequences direct riboswitch-mediated RNA processing and Rho-dependent transcription termination

Based on our study, TPP-induced *thiM* translational inhibition triggers both Rho-dependent transcription termination and mRNA decay. Our model proposes that these mechanisms rely on intrinsic properties of the *thiM* riboswitch that allow TPP binding both co- and post-transcriptionally (Fig. 8). This is in marked contrast to the adenine-sensing *pbuE* riboswitch, which only binds ligand co-transcriptionally (Lemay et al. 2011; Frieda and Block 2012). By binding TPP both co- and post-transcriptionally, the riboswitch allows mRNA regulation to be performed on nascent transcripts as well as on transcribed polycistronic mRNAs (Fig. 8). Because Rho and RNase E target sequences overlap, biological regulatory activities may be part of an integrated process that has evolved to ensure intimate coupling of both mechanisms. β -galactosidase experiments using a *thiM-lacZ* transcriptional fusion indicate that Rho termination elements are localized within the first 34 *thiM* codons. Nonetheless, even if ChIP experiments clearly show Rho transcription termination's involvement in *thiMD* regulation, the TPP-dependent decrease of *thiMD* mRNA levels remains unaffected when Rho is inhibited. A reasonable explanation highlighted in our study is that *thiMD* mRNA remains actively degraded by cellular RNases, as suggested by the approximately 2-fold decrease of *thiMD* mRNA half-life in the presence of ligand. It is worth noting that half-life measurements strictly report the effect of TPP on already transcribed mRNAs, suggesting that control of *thiM* mRNA decay must occur through post-transcriptional TPP binding to the riboswitch. Our results also indicate that RNase E is involved but not essential for TPP-dependent *thiMD* mRNA decay. This is mainly supported by the accumulation of a 600 nt RNA (intermediate 2)—but not the complete *thiMD* mRNA—when RNase E is inactivated in the presence of TPP. Hence, we infer that intermediate 2 is most likely generated by an additional unidentified RNase (RNase X), and requires RNase E activity for its degradation (Fig. 8).

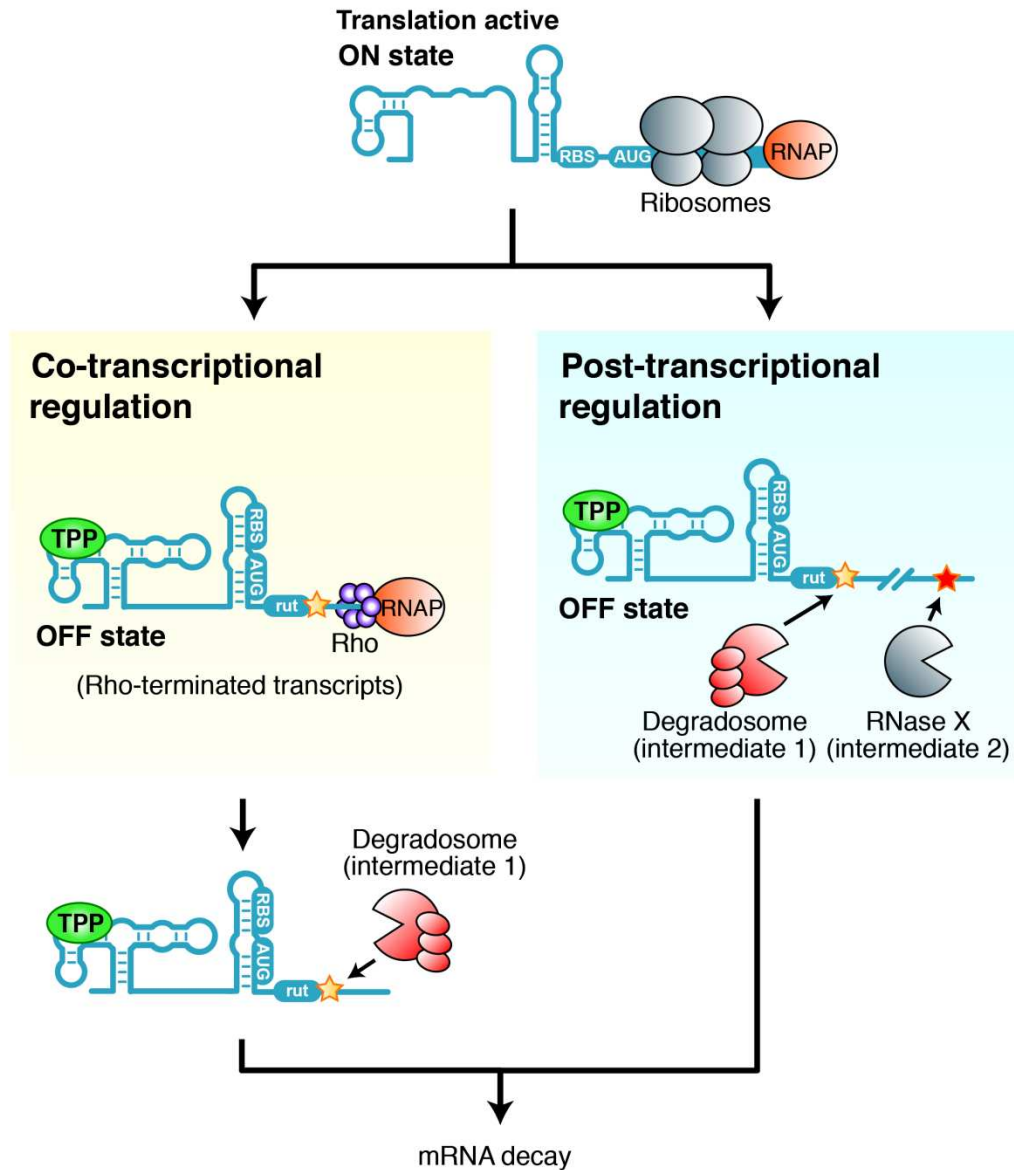


Figure 8. Proposed model describing Rho transcription termination and RNA degradosome regulation mechanisms for *thiM* riboswitch.

Co-transcriptional riboswitch TPP binding (yellow panel) favors inhibition of translation initiation. As a result, the Rho transcription factor binds to a rut site, leading to prematurely terminated transcripts containing an RNase E recognition signal (yellow star). RNase E cleavage of terminated transcripts generates an mRNA fragment (intermediate 1). Alternatively, riboswitch TPP binding occurs post-transcriptionally (blue panel) leading to direct targeting of the *thiMD* mRNA operon by RNase E and other putative RNase(s) to generate intermediates 1 and 2.

Only when Rho is inhibited in an RNA degradosome mutant background is TPP-induced *thiMD* mRNA control perturbed (Fig. 6E), suggesting that a synergetic effect exists between both regulation mechanisms. This observation is substantiated by key findings indicating that a single RNA sequence localized in the first 34 *thiM* codons controls both Rho-dependent termination and mRNA degradation. First, a Rho termination mechanism is consistent with both the presence of a rut region, determined by sequence analysis and RNase H assays (Fig. 5A,E), and Rho transcription termination sites, which occur at positions 231, 237 and 262 (Fig. 5D). Second, *in vitro* degradosome assays, together with β -galactosidase experiments, revealed the presence of RNA degradosome cleavage sites at positions 212, 219 and 255 (Fig. 4B). Taken as a whole, these results strongly indicate that Rho and RNase E recognize overlapping target sequences, consistent with a unique mRNA domain being important for both mechanisms (Fig. 8).

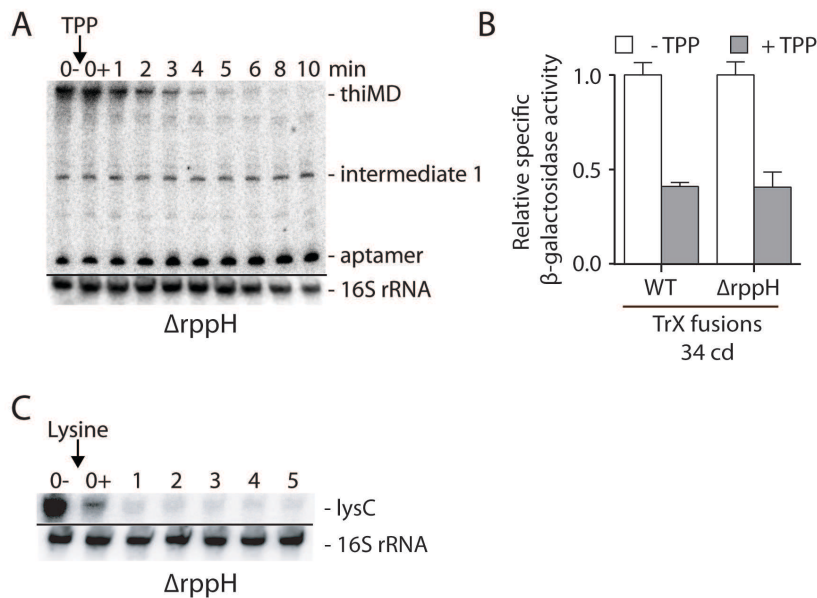
We evaluated various mutants in this RNA regulatory region in the presence of the 34-codon *thiM-lacZ* transcriptional fusion. Only R2, M2 and M4 mutations completely abolished TPP-dependent mRNA decay (Fig. 4D,E; Supplementary Fig. 8A). Therefore, the 215-219 nt sequence and the stability of the stem-loop structure are important for both Rho-dependent transcription termination and RNA degradosome cleavage. No mutation was found to significantly prevent Rho-dependent termination *in vitro* (data not shown), suggesting that other cellular factors modulate Rho specificity *in vivo*. One straightforward explanation could be a technical limitation since Rho termination is likely to be very efficient *in vitro* in the absence of ribosomes or other constraining factors. The strong overlap between Rho and RNase E target sequences is also supported by bicyclomycin-dependent abolition of mRNA regulation in transcriptional *lacZ* fusions (Fig. 5B). Previous experimental evidence indicated that bicyclomycin induces Rho to stall at the rut site (Skordalakes et al. 2005). We expect that Rho stalling could impede RNA degradosome cleavage activity by perturbing mRNA regulation.

In addition to direct implication in *thiMD* mRNA control, colocalization of Rho and RNase E targeted sequences ensures that RNase E efficiently degrades all transcripts prematurely terminated by Rho. This hypothesis is compatible with Rho termination at position 262 (determined *in vitro*) but will need further investigation for transcripts terminated at positions 231 and 237 since our data underlined the importance of the stem-loop structure for RNA

degradosome activity (Fig. 4E). However, such a mechanism is supported by the increase of both intermediate 1 abundance and half-life in the degradosome-deficient *rne-131* strain (Fig. 3A; Supplemental Fig. 4G), and intermediate 1 decrease after bicyclomycin addition in *rne-131* (compare lanes -20 min and -10 min in Supplemental Fig. S10B). Our results also indicate that intermediate 1 is further processed by PNPase (Supplemental Fig. S6F), likely leading to production of the aptamer domain. Hence, the highly structured TPP-bound aptamer is polyadenylated and degraded by the exoribonuclease RNase R (Fig. 8; Supplemental Fig. S6H,I). The degradation of such an RNA intermediate is obviously an essential component of the *thiM* riboswitch regulatory control as it recycles both TPP and ribonucleotides for incorporation into new RNA molecules (Belasco 2010).

Dual regulation of riboswitch-controlled genes is a widespread mechanism

Strikingly, we observed similarities in *lysC* and *thiM* mRNA regulatory sequences. Both regulatory elements contain an RNase E cleavage site consisting of a UCUU sequence followed by a downstream stem-loop (Fig. 4A, Supplementary Fig. 13A). Interestingly, mRNA regulation of *lysC* and *thiMD* is unaffected in an RppH mutant strain ($\Delta rppH$) (Supplemental Fig. 14A-C), which prevents 5'-dependent entry of RNase E (Deana et al. 2008). The latter result suggests that both UCUU sequences could be internal entry sites for RNase E. These findings are consistent with recent RNA-seq analysis showing that the direct entry of RNase E is a major pathway for mRNA decay (Clarke et al. 2014). More importantly, our data indicate that the *lysC* riboswitch also employs a dual regulatory mechanism combining RNA degradosome and Rho transcription termination activities. In this case, the regulating sequence is located in the riboswitch expression platform (Supplemental Fig. S13B) (Caron et al. 2012) and could, therefore, be a riboswitch-controlled mechanism. Similar to *thiM*, the predicted rut site overlaps (Supplemental Fig. S13A) the RNA degradosome cleavage sites (Caron et al. 2012), consistent with the total absence of lysine-induced repression with bicyclomycin (Supplemental Fig. S13C).



Supplemental Figure S14. The *thiMD* operon and the *lysC* mRNA do not rely on RppH activity for mRNA control.

(A) Northern blot analysis of *thiMD* mRNA level in the context $\Delta rppH$ strain. Bacteria were grown and RNA extracted as indicated in Figure 1B. Samples were taken immediately before (0-) and after (0+) the addition of TPP (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The loading control was 16S rRNA.

(B) β -Galactosidase assays of transcriptional *thiM-lacZ* fusions in wild-type and $\Delta rppH$ mutant strains. Enzymatic activities were measured as a function of 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TPP. Values were normalized to the enzyme activity obtained without TPP. The average values of three independent experiments with SDs are shown.

(C) Northern blot analysis of *lysC* mRNA levels in the $\Delta rppH$ strain. Bacteria were grown and RNA extracted as indicated in Figure 1B. Samples were taken immediately before (0-) and after (0+) the addition of lysine (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The loading control was 16S rRNA. Note that because the RNA degradosome activity was previously shown to influence endogenous *lysC* mRNA (Caron et al. 2012), a potential decrease in RNA degradosome efficiency should be detected by Northern blot analysis.

Although no other study has reported Rho and RNA degradosome being part of an integrated mechanism targeting a similar mRNA region, it was recently found in *Corynebacterium glutamicum* that both Rho and RNase G are involved in the FMN riboswitch control mechanism (Takemoto et al. 2015). Similar to our findings, the regulation of mRNA levels was significantly altered only by simultaneously disrupting both Rho and RNase G activity. However, the mechanistic details describing both cellular activities still remain to be established. Interestingly, several prior studies support our model. First, it was reported that a

defect in Rho binding makes mRNA more susceptible to degradation (Sozhamannan and Stitt, 1997). Moreover, a recent study showed that *E. coli rppH* mutants are more sensitive to bicyclomycin, consistent with stalled bicyclomycin-Rho complexes preventing direct entry by RNase E to target cleavage sites (Tran et al. 2011). Also, co-immunoprecipitation experiments have shown that Rho is strongly associated with the RNA degradosome complex in *Rhodobacter capsulatus* (Jager et al. 2001), providing evidence that both protein effectors may be involved in overlapping regulatory pathways. Combined with these findings, our work suggests that coordinated action involving Rho transcription termination and RNase activity may be widespread among prokaryotic organisms.

In the course of this study, we investigated the importance of Rho regulation for several *E. coli* riboswitches. Our ChIP data revealed that riboswitches sensing TPP (*thiB* and *thiC*) and FMN (*ribB*) control Rho-dependent transcription termination (Fig. 7B,C). Rho termination in *thiC* and *ribB* ORFs is supported by previous reports indicating mRNA modulation by both riboswitches (Winkler et al. 2002; Hollands et al. 2012). In contrast, despite ChIP data clearly showing an RNAP decrease in the *mgtA* ORF, indicative of a transcriptional control, no obvious regulation appears to be performed in a Rho-dependent manner (Fig. 7C). One possible explanation is either that the *E. coli mgtA* riboswitch uses a different molecular mechanism to its *Salmonella enterica* homolog (Hollands et al. 2012). Alternatively, the R66S Rho mutant may not prevent *mgtA* Rho-dependent termination. Consistent with this notion, the R66S mutant grows almost as well as wild-type, despite Rho being essential for viability. Moreover, another RNA-binding domain mutant of Rho, F62S, is only defective in Rho termination for a subset of RNAs (Shashni et al. 2014). In the case of the AdoCbl sensing riboswitch (*btuB*), the combination of ChIP and β -galactosidase data suggests that Rho is not involved in the regulation mechanism. As previously suggested, mRNA degradation would be the main mechanism employed by this translationally-acting riboswitch to control the mRNA level (Nou and Kadner 1998). Strikingly, all *E. coli* riboswitches we tested regulate gene expression at the mRNA level, and at least 5 of 7 riboswitches employ Rho-dependent transcription termination. Further investigation is needed to determine whether they all regulate translation and whether they combine both mRNA degradation and premature transcription termination.

Conclusions

Our work provides the first detailed mechanism describing how ligand binding to translation-controlling riboswitches orchestrates the regulation of both premature transcription termination and mRNA decay. The strategic location of such regulatory sequences at the beginning of regulated mRNAs ensures they are recognized early in the expression pathway, thus providing efficient coordination of translation and mRNA regulation. Importantly our study suggests that this mechanism is widespread among riboswitches and most likely among all bacterial mRNA.

MATERIAL AND METHODS

β-Galactosidase Assays

Strains used in the study are listed in the Supplemental Table S1. Kinetic assays for β-galactosidase experiments were performed as described previously (Caron et al. 2012) and fusions used in the study are described in the Supplemental Table S2. Briefly, an overnight bacterial culture grown in M63 0.2% glycerol minimal medium was diluted to an OD₆₀₀ of 0.02 in 50 mL of fresh medium. The culture was incubated at 37°C until an OD₆₀₀ of 0.1 was obtained. Arabinose (0.1%) was then added to induce the expression of *lacZ* constructs. TPP (500 μg/mL), lysine (10 μg/mL) or AdoCbl (80 μg/mL) was added where indicated. β-galactosidase experiments determining Rho factor involvement were performed in 3 mL of culture media as described above. Bicyclomycin (25 μg/mL) was added where indicated.

Northern Blot analysis and mRNA half-life determination

Bacterial cultures were grown at 30°C or 37°C in M63 0.2% glucose minimal medium to midlog-phase (OD₆₀₀ of 0.35). Cells were then centrifuged and resuspended with sterile water, and total RNA was extracted immediately using the hot phenol method (Caron et al. 2012). TPP (500 μg/mL), lysine (10 μg/mL) or bicyclomycin (25 μg/mL) was added at indicated times. For half-life determination, RNA transcription was blocked by adding of rifampicin (250 μg/mL). Northern blot experiments were performed as described previously (Caron et al. 2012). Probes were generated by PCR (see Supplemental Table S3 for constructs).

ChIP-qPCR

Wild-type MG1655 and MG1655 *rhoR66S* mutant strains were grown in LB at 37°C to mid-exponential phase. ChIP of RNAP was performed as described previously (Stringer et al. 2014) using anti-β mouse monoclonal antibody (NeoClone). After purification of ChIP and

input (starting material) DNA samples, real time PCR was performed using an ABI 7500 instrument with the primers listed in Supplementary Table 2. In each reaction, forward and reverse primers were used to amplify either the UTR or ORF region of *rho* or selected riboswitch genes. The percentage of IP efficiency was calculated for each region of interest as the ratio of DNA in the CHIP sample compared to the input sample. Forward and reverse PCR primers are listed in the Supplemental Table S4.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs Eric Massé and Alain Lavigueur for discussion and critical reading of the manuscript and the Canadian Institutes of Health Research for financial support. We thank the laboratory of James Berger and Irina Artsimovitch for providing plasmids for the purification of Rho and NusG protein, respectively. D.A.L. is a Fonds de Recherche Santé Québec Senior Scholar. JTW was funded by the National Institutes of Health through the NIH Director's New Innovator Award Program (1DP2OD007188).

REFERENCES

- Apirion D, Lassar AB. 1978. A conditional lethal mutant of *Escherichia coli* which affects the processing of ribosomal RNA. *J Biol Chem* **253**: 1738-1742.
- Barrick JE, Breaker RR. 2007. The distributions, mechanisms, and structures of metabolite-binding riboswitches. *Genome Biol* **8**: R239.
- Belasco JG. 2010. All things must pass: contrasts and commonalities in eukaryotic and bacterial mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 467-478.
- Bernstein JA, Lin PH, Cohen SN, Lin-Chao S. 2004. Global analysis of *Escherichia coli* RNA degradosome function using DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 2758-2763.
- Breaker RR. 2012. Riboswitches and the RNA World. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**: 1-15.
- Caron MP, Bastet L, Lussier A, Simoneau-Roy M, Masse E, Lafontaine DA. 2012. Dual-acting riboswitch control of translation initiation and mRNA decay. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: E3444-3453.
- Chen L, Cressina E, Leeper FJ, Smith AG, Abell C. 2010. A fragment-based approach to identifying ligands for riboswitches. *ACS Chem Biol* **5**: 355-358.
- Clarke JE, Kime L, Romero AD, McDowall KJ. 2014. Direct entry by RNase E is a major pathway for the degradation and processing of RNA in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **42**: 11733-11751.
- Deana A, Celesnik H, Belasco JG. 2008. The bacterial enzyme RppH triggers messenger RNA degradation by 5' pyrophosphate removal. *Nature* **451**: 355-358.
- Dreyfus M. 2009. Killer and protective ribosomes. *Prog Mol Biol Transl Sci* **85**: 423-466.
- Edwards TE, Ferre-D'Amare AR. 2006. Crystal Structures of the Thi-Box Riboswitch Bound to Thiamine Pyrophosphate Analogs Reveal Adaptive RNA-Small Molecule Recognition. *Structure* **14**: 1459-1468.
- Figuroa-Bossi N, Schwartz A, Guillemardet B, D'Heygere F, Bossi L, Boudvillain M. 2014. RNA remodeling by bacterial global regulator CsrA promotes Rho-dependent transcription termination. *Genes Dev* **28**: 1239-1251.
- Frieda KL, Block SM. 2012. Direct observation of cotranscriptional folding in an adenine riboswitch. *Science* **338**: 397-400.
- Haller A, Souliere MF, Micura R. 2011. The Dynamic Nature of RNA as Key to Understanding Riboswitch Mechanisms. *Acc Chem Res*.
- Hollands K, Proshkin S, Sklyarova S, Epshtein V, Mironov A, Nudler E, Groisman EA. 2012. Riboswitch control of Rho-dependent transcription termination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 5376-5381.
- Jager S, Fuhrmann O, Heck C, Hebermehl M, Schiltz E, Rauhut R, Klug G. 2001. An mRNA degrading complex in *Rhodobacter capsulatus*. *Nucleic Acids Res* **29**: 4581-4588.
- Kido M, Yamanaka K, Mitani T, Niki H, Ogura T, Hiraga S. 1996. RNase E polypeptides lacking a carboxyl-terminal half suppress a mukB mutation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**: 3917-3925.

- Kohn H, Widger W. 2005. The molecular basis for the mode of action of bicyclomycin. *Curr Drug Targets Infect Disord* **5**: 273-295.
- Kushner SR. 2002. mRNA decay in Escherichia coli comes of age. *J Bacteriol* **184**: 4658-4665; discussion 4657.
- Lang K, Rieder R, Micura R. 2007. Ligand-induced folding of the thiM TPP riboswitch investigated by a structure-based fluorescence spectroscopic approach. *Nucleic Acids Res* **35**: 5370-5378.
- Lawrence JG, Roth JR. 1995. The cobalamin (coenzyme B12) biosynthetic genes of Escherichia coli. *J Bacteriol* **177**: 6371-6380.
- Lemay JF, Desnoyers G, Blouin S, Heppell B, Bastet L, St-Pierre P, Masse E, Lafontaine DA. 2011. Comparative Study between Transcriptionally- and Translationally-Acting Adenine Riboswitches Reveals Key Differences in Riboswitch Regulatory Mechanisms. *PLoS Genet* **7**: e1001278.
- Leonardi R, Roach PL. 2004. Thiamine biosynthesis in Escherichia coli: in vitro reconstitution of the thiazole synthase activity. *J Biol Chem* **279**: 17054-17062.
- Li J, Mason SW, Greenblatt J. 1993. Elongation factor NusG interacts with termination factor rho to regulate termination and antitermination of transcription. *Genes Dev* **7**: 161-172.
- Martinez A, Burns CM, Richardson JP. 1996. Residues in the RNP1-like sequence motif of Rho protein are involved in RNA-binding affinity and discrimination. *J Mol Biol* **257**: 909-918.
- Matsumoto Y, Shigesada K, Hirano M, Imai M. 1986. Autogenous regulation of the gene for transcription termination factor rho in Escherichia coli: localization and function of its attenuators. *J Bacteriol* **166**: 945-958.
- Miranda-Rios J. 2007. The THI-box Riboswitch, or How RNA Binds Thiamin Pyrophosphate. *Structure* **15**: 259-265.
- Nou X, Kadner RJ. 1998. Coupled changes in translation and transcription during cobalamin-dependent regulation of btuB expression in Escherichia coli. *J Bacteriol* **180**: 6719-6728.
- . 2000. Adenosylcobalamin inhibits ribosome binding to btuB RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 7190-7195.
- Ontiveros-Palacios N, Smith AM, Grundy FJ, Soberon M, Henkin TM, Miranda-Rios J. 2008. Molecular basis of gene regulation by the THI-box riboswitch. *Mol Microbiol* **67**: 793-803.
- Peters JM, Mooney RA, Kuan PF, Rowland JL, Keles S, Landick R. 2009. Rho directs widespread termination of intragenic and stable RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 15406-15411.
- Rentmeister A, Mayer G, Kuhn N, Famulok M. 2007. Conformational changes in the expression domain of the Escherichia coli thiM riboswitch. *Nucleic Acids Res* **35**: 3713-3722.
- Serganov A, Nudler E. 2013. A decade of riboswitches. *Cell* **152**: 17-24.
- Shashni R, Qayyum MZ, Vishalini V, Dey D, Sen R. 2014. Redundancy of primary RNA-binding functions of the bacterial transcription terminator Rho. *Nucleic Acids Res* **42**: 9677-9690.
- Skordalakes E, Brogan AP, Park BS, Kohn H, Berger JM. 2005. Structural mechanism of inhibition of the Rho transcription termination factor by the antibiotic bicyclomycin. *Structure* **13**: 99-109.

- Stringer AM, Currenti S, Bonocora RP, Baranowski C, Petrone BL, Palumbo MJ, Reilly AA, Zhang Z, Erill I, Wade JT. 2014. Genome-scale analyses of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* AraC reveal noncanonical targets and an expanded core regulon. *J Bacteriol* **196**: 660-671.
- Takemoto N, Tanaka Y, Inui M. 2015. Rho and RNase play a central role in FMN riboswitch regulation in *Corynebacterium glutamicum*. *Nucleic Acids Res* **43**: 520-529.
- Tran L, van Baarsel JA, Washburn RS, Gottesman ME, Miller JH. 2011. Single-gene deletion mutants of *Escherichia coli* with altered sensitivity to bicyclomycin, an inhibitor of transcription termination factor Rho. *J Bacteriol* **193**: 2229-2235.
- Treiber DK, Williamson JR. 2000. Kinetic oligonucleotide hybridization for monitoring kinetic folding of large RNAs. *Methods Enzymol* **317**: 330-353.
- Winkler W, Nahvi A, Breaker RR. 2002. Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature* **419**: 952-956.

Riboswitch-mediated translation repression directs Rho termination and mRNA decay through a single RNA element

Laurène Bastet¹, Adrien Chauvier¹, Navjot Singh², Antony Lussier¹, Joseph Wade^{2,3} and Daniel A. Lafontaine^{1,*}

*To whom correspondence should be addressed.

E-mail: Daniel.Lafontaine@USherbrooke.ca

SUPPLEMENTAL MATERIAL

This file includes:

- Supplemental Methods
- Supplemental Tables S1 to S4
- Supplemental References

SUPPLEMENTAL METHODS

DNA oligonucleotides, Bacterial Strains and Plasmids.

DNA oligonucleotides were purchased from Integrated DNA Technologies. Strains used in this study are derived from *Escherichia coli* MG1665. Strain genotypes are listed in Supplemental Table S1. Strain DH5 α was used for routine cloning procedures (Yu et al. 2000) and BL21 (DE3) was used for overproduction of the RNA degradosome, Rho and NusG proteins. The *thiM* transcriptional and translational fusions were constructed with the PM1205 strain (Supplemental Table S2) (Caron et al. 2012). The PCR strategy to obtain *thiM* riboswitch translational constructs is listed in Supplemental Table S3. Transcriptional fusions used an additional PCR step (LB1-LB47) to insert a stop codon. Mutations performed in *thiM* were made using 3 PCR steps (Supplemental Table S3). PCR1 and PCR2 were performed with the genomic DNA and PCR3 was performed using products of the PCR1 and PCR2 reactions. The insertion of pFRD $thiM_{252}$ into genomic DNA has been described previously (Caron et al. 2012). The *thiM* DNA fragment obtained by PCR (LB38-LB39) was cloned into plasmid pRFD. The resulting vector was inserted into bacterial cells by transduction. DNA oligonucleotides used in this study are listed in the Supplemental Table S4.

Enzymes and chemicals

T7 polymerase, RNA degradosome, Rho and NusG protein were purified as described previously (Rabhi et al. 2011). The *E. coli* RNA polymerase was purchased from Epicentre. Bicyclomycin was obtained from Santa Cruz Biotech. TPP, lysine and coenzyme B12 were purchased from Sigma Aldrich. The RiboRuler Low Range RNA Ladder was obtained from Fisher Scientific.

In vitro degradation assays

Templates corresponding to *thiM* positions 175-274 nt were *in vitro* transcribed using purified T7 polymerase. Transcripts were radiolabelled at the 3' end and used for *in vitro* degradation assays as previously described (Caron et al. 2012).

3' Rapid Amplification of cDNA ends (RACE)

Bacterial cultures were grown at 37°C in M63 0.2% glucose minimal medium to midlog phase (OD₆₀₀ of 0.5). Cells were centrifuged and resuspended in sterile water, and total RNA was extracted immediately using hot phenol (Caron et al. 2012). RNA was then treated with Turbo DNase (Ambion) and polyadenylated as previously described (Caron et al. 2012). Reverse transcription was performed using SuperScript II (Invitrogen) and the poly-dT oligonucleotide EM1363. The resulting cDNA was used as template in PCR reaction using oligonucleotides LB1-EM1364. PCR products were cloned using the Zero Blunt TOPO kit (Invitrogen) and sequenced.

Rho transcription termination assays

In vitro transcriptions were performed using either the first 400 nt of *thiM* mRNA or the first 336 nt of the 34-codon *thiM-lacZ* transcriptional fusion. The transcription buffer contained 40 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂ and 1.5 mM DTT. In a reacting vessel, 300 fmol DNA template, 10 μM CUGC tetranucleotide and 400 nM ATP/GTP were incubated in the transcription buffer at 37°C for 5 min. 50 nM Rho and/or NusG were added where indicated. A mixture containing 0.2 U *E. coli* RNA polymerase and 10 μCi [α-³²P] UTP were then added to the transcription reaction and incubated at 37°C for 15 min. A solution containing 50 μM NTPs and 1.5 μg/mL rifampicin was added to complete the transcription reaction. Resulting reactions were phenol/chloroform treated and mixed 1:1 with a stop solution containing 95% formamide, 10 mM EDTA and 0.1% SDS.

TPP binding kinetics monitored using RNase H assays

In vitro transcription assays were conducted using the first 300 nt of *thiM* mRNA. The transcription buffer contained 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM NaCl, 20 mM MgCl₂, 100 μM EDTA and 14 mM β-mercaptoethanol. Radiolabeled transcripts were mixed 1:1 with a solution containing 0.12 U/μL RNase H and 200 μM DNA oligonucleotide (AC3, see Supplemental Table S4) in 5 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 50 μM EDTA and 10 mM β-mercaptoethanol at 37°C for 15 s. Reactions were stopped with denaturing buffer containing 95% formamide, 10 mM EDTA and 0.1% SDS.

Co-transcriptional and post-transcriptional TPP binding analysis was performed by adding TPP either at the beginning (co-transcriptionally) or after the transcription reaction (post-transcriptionally), which was stopped through the addition of heparin. In both cases, samples were taken at various time points and treated with RNase H for 15 s and stopped using the denaturing buffer. Ligand binding analysis assumed a 1:1 stoichiometry between the aptamer and TPP, consistent with in-line probing data (Winkler et al. 2002) and crystal structure (Edwards and Ferre-D'Amare 2006; Serganov et al. 2006; Thore et al. 2006). The fitting was done using a single exponential decay to yield the pseudo-first order rate of ligand binding.

Rho binding monitored using RNase H assays

Using a DNA template corresponding to the first 400 nt of *thiM* mRNA, transcripts were prepared in the absence of Rho, as described in the section *Rho transcription termination assays*. After transcription was complete, the mixture was passed twice through a G50 column to remove free nucleotides. Purified transcripts were then incubated in the presence of 70 nM Rho for 5 min at 37°C. The resulting mixture was incubated with a solution containing 10 μM of a DNA oligonucleotide (130 or 201, see Supplemental Table S4) and 0.12 U/μL RNase H in 5 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 50 μM EDTA and 10 mM β-mercaptoethanol at 37°C for 5 min. Reactions were stopped using 95% formamide, 10 mM EDTA and 0.1% SDS.

Bioinformatic analysis of riboswitch sequences for rut determination

A bash shell script was written to calculate the proportion of cytosines and guanines using riboswitch sequences obtained from public databases. A scanning window of 25 nt was used with a stepping value of 1 nt. The validity of the technique was verified using *pgaA*, which was shown to be a rut site recognized by Rho (Figueroa-Bossi et al. 2014).

Supplemental Table S1. Summary of strains/plasmids used in this study.

| Strains | Relevant marker | References |
|---------|--|-----------------------------|
| AM147 | JW5741-1(11550), rnr-729(del)::kan, BL21(DE3) pIA247 (nusG) BL21(DE3) pET28b-rho | CGSC, Yale |
| BTU1 | PM1205 lacI':PBAD-BtuB _{6cd} | This study |
| BTU2 | PM1205 lacI':PBAD- <i>btuB</i> _{6cd} | This study |
| BTU3 | PM1205 lacI':PBAD- <i>btuB</i> _{27cd} | This study |
| CRB016 | MG1655 <i>rho</i> -R66S <i>ilvD</i> 500::Tn10 | Laboratory collection |
| DAL1 | BL21(DE3) F-ompT hsdS(rB- mB-) gal dcm λ (DE3) | Laboratory collection |
| DAL2 | JW1279-1 (99150) Δ <i>rnb-723</i> ::kan, | CGSC, Yale |
| EM1055 | MG1655 Δ <i>lacZ</i> X174 | (Masse and Gottesman 2002) |
| EM1047 | DH5α + pACYC184 | Laboratory collection |
| EM1237 | DY330 [W3110 delta-lacU169 gal490 lambda-cl857 delta-(<i>cro-bioA</i>)] | (Yu et al. 2000) |
| EM1277 | EM1055 <i>rne-3071</i> (Ts) <i>zce-726</i> ::Tn10 | (Masse et al. 2003) |
| EM1321 | EM1055 rnc14 [P1 from EM1320] | Laboratory collection |
| EM1377 | EM1055 <i>rne131 zce-726</i> ::Tn10 | (Masse et al. 2003) |
| GD054 | EM1055 P1GD053 [pcnB ::tet] | Laboratory collection |
| JF185 | EM1055 <i>rppH</i> :: <i>Tet</i> | Laboratory collection |
| JF296 | JW5851-1 (11950), pnp-776::kan, | CGSC, Yale |
| MPC16 | PM1205 lacI':PBAD-lysC-lacZ | (Caron et al. 2012) |
| PM1205 | <i>lacI</i> '::P _{BAD} - <i>cat-sacB-lacZ</i> , mini λ tet ^R | (Mandin and Gottesman 2009) |
| TPP3 | PM1205 lacI':PBAD- <i>thiM</i> _{6cd} | (Caron et al. 2012) |
| TPP4 | PM1205 lacI':PBAD- <i>ThiM</i> _{6cd} | (Caron et al. 2012) |
| TPP5 | PM1205 lacI':PBAD- <i>thiM</i> _{50cd} | This study |
| TPP6 | EM1055::pfrΔ <i>thiM</i> _{34cd} | This study |
| TPP7 | EM1377::pfrΔ <i>thiM</i> _{34cd} | This study |
| TPP8 | <i>rppH</i> ::pfrΔ <i>thiM</i> _{34cd} | This study |
| TPP9 | PM1205 lacI':PBAD- <i>thiM</i> _{10cd} | This study |
| TPP10 | PM1205 lacI':PBAD- <i>thiM</i> _{21cd} | This study |
| TPP11 | PM1205 lacI':PBAD- <i>thiM</i> _{24cd} | This study |
| TPP12 | PM1205 lacI':PBAD- <i>thiM</i> _{100cd} | This study |
| TPP13 | PM1205 lacI':PBAD- <i>thiM</i> _{167cd} | This study |
| TPP14 | PM1205 lacI':PBAD- <i>thiM</i> _{34cd} mutRBS | This study |
| TPP15 | PM1205 lacI':PBAD- <i>thiM</i> _{34cd} mutAUG | This study |
| TPP16 | PM1205 lacI':PBAD- <i>thiM</i> _{6cd} mutRBS | This study |
| TPP17 | PM1205 lacI':PBAD- <i>thiM</i> _{6cd} mutAUG | This study |
| TPP18 | PM1205 lacI':PBAD- <i>ThiM</i> _{6cd} mutRBS | This study |
| TPP19 | PM1205 lacI':PBAD- <i>ThiM</i> _{6cd} mutAUG | This study |
| TPP20 | PM1205 lacI':PBAD- <i>btuBthiM</i> | This study |
| TPP21 | PM1205 lacI':PBAD- <i>thiM</i> _{34cd} M3 | This study |
| TPP22 | PM1205 lacI':PBAD- <i>thiM</i> _{34cd} M2 | This study |
| TPP23 | PM1205 lacI':PBAD- <i>thiM</i> _{34cd} M1 | This study |
| TPP24 | PM1205 lacI':PBAD- <i>thiM</i> _{50cd} M4 | This study |
| TPP25 | PM1205 lacI':PBAD- <i>thiM</i> _{50cd} M5 | This study |
| TPP26 | PM1205 lacI':PBAD- <i>thiM</i> _{50cd} M6 | This study |
| TPP27 | PM1205 lacI':PBAD- <i>thiM</i> _{34cd} M8 | This study |
| TPP28 | PM1205 lacI':PBAD- <i>thiM</i> _{34cd} M7 | This study |
| TPP29 | PM1205 lacI':PBAD- <i>thiM</i> _{50cd} M2 | This study |
| TPP30 | PM1205 lacI':PBAD- <i>thiM</i> _{100cd} M2 | This study |
| TPP31 | PM1205 lacI':PBAD- <i>thiM</i> _{167cd} M2 | This study |

TPP32
TPP33

PM1205 *lacI'*::PBAD-*thiM*_{34cd}R1
PM1205 *lacI'*::PBAD-*thiM*_{34cd}R2

This study
This study

Supplemental Table S2. Summary of *lacZ* fusions used in this study.

| Strains | Construct | Oligonucleotides |
|--|------------------------------------|--|
| Transcriptional and translational fusions in PM1205 | | |
| BTU1 | BtuB _{6cd} | LB18-LB19 (genomic DNA) |
| BTU2 | <i>btuB</i> _{6cd} | LB18-LB20 (genomic DNA) |
| TPP3 | <i>thiM</i> _{6cd} | LB1-LB3 (genomic DNA) |
| TPP4 | ThiM _{6cd} | LB1-LB2 (genomic DNA) |
| TPP5 | <i>thiM</i> _{50cd} | LB1-LB7 (genomic DNA) |
| TPP9 | <i>thiM</i> _{10cd} | LB1-LB4 (genomic DNA) |
| TPP10 | <i>thiM</i> _{21cd} | LB1-LB5 (genomic DNA) |
| TPP11 | <i>thiM</i> _{34cd} | LB1-LB6 (genomic DNA) |
| TPP12 | <i>thiM</i> _{100cd} | LB1-LB8 (genomic DNA) |
| TPP13 | <i>thiM</i> _{167cd} | LB1-LB9 (genomic DNA) |
| TPP14 | <i>thiM</i> _{34cd} mutRBS | PCR1: LB1-LB11 (genomic DNA) PCR2: LB10-LB6 (genomic DNA) PCR3: LB1-LB6 (PCR1-2) |
| TPP15 | <i>thiM</i> _{34cd} mutAUG | PCR1: LB1-LB12 (genomic DNA) PCR2: LB13-LB6 (genomic DNA) PCR3: LB1-LB6 (PCR1-2) |
| TPP16 | <i>thiM</i> _{6cd} mutRBS | LB1-LB3 (<i>thiM</i> _{34cd} mutRBS) |
| TPP17 | <i>thiM</i> _{6cd} mutAUG | LB1-LB15 (<i>thiM</i> _{34cd} mutAUG) |
| TPP18 | ThiM _{6cd} mutRBS | LB1-LB2 (<i>thiM</i> _{34cd} mutRBS) |
| TPP19 | ThiM _{6cd} mutAUG | LB1-LB14 (<i>thiM</i> _{34cd} mutAUG) |
| TPP20 | <i>btuBthiM</i> | PCR1: LB18-LB17 (genomic DNA) PCR2: LB16-LB6 (genomic DNA) PCR3: LB18-LB6 (PCR1-2) |
| TPP21 | <i>thiM</i> _{34cd} M3 | PCR1: LB1-LB21 (genomic DNA) PCR2: LB22-LB6 (genomic DNA) PCR3: LB1-LB6 (PCR1-2) |
| TPP22 | <i>thiM</i> _{34cd} M2 | PCR1: LB1-LB24 (genomic DNA) PCR2: LB23-LB6 (genomic DNA) PCR3: LB1-LB6 (PCR1-2) |
| TPP23 | <i>thiM</i> _{34cd} M1 | PCR1: LB1-LB26 (genomic DNA) PCR2: LB25-LB6 (genomic DNA) PCR3: LB1-LB6 (PCR1-2) |
| TPP24 | <i>thiM</i> _{50cd} M4 | PCR1: LB1-LB28 (genomic DNA) PCR2: LB27-LB7 (genomic DNA) PCR3: LB1-LB7 (PCR1-2) |
| TPP25 | <i>thiM</i> _{50cd} M5 | PCR1: LB1-LB30 (genomic DNA) PCR2: LB29-LB7 (genomic DNA) PCR3: LB1-LB7 (PCR1-2) |
| TPP26 | <i>thiM</i> _{50cd} M6 | PCR1: LB1-LB32 (genomic DNA) PCR2: LB31-LB7 (genomic DNA) PCR3: LB1-LB7 (PCR1-2) |
| TPP27 | <i>thiM</i> _{34cd} M8 | PCR1: LB1-LB34 (genomic DNA) PCR2: LB33-LB6 (genomic DNA) PCR3: LB1-LB6 (PCR1-2) |
| TPP28 | <i>thiM</i> _{34cd} M7 | PCR1: LB1-LB36 (genomic DNA) PCR2: LB35-LB6 (genomic DNA) PCR3: LB1-LB6 (PCR1-2) |
| TPP29 | <i>thiM</i> _{50cd} M3 | LB1-LB7 (<i>thiM</i> _{167cd} M3) |

| | | |
|--------------------------------|----------------------------------|--|
| TPP30 | <i>thiM</i> _{100cd} M3 | LB1-LB8 (<i>thiM</i> _{167cd} M3) |
| TPP31 | <i>thiM</i> _{167cd} M3 | PCR1: LB1-LB24 (genomic DNA) PCR2: LB23-LB9 (genomic DNA) PCR3: LB1-LB9 (PCR1-2) |
| TPP32 | <i>thiM</i> _{34cd} R1 | PCR1: LB1-LB48 (genomic DNA) PCR2: LB49-LB9 (genomic DNA) PCR3: LB1-LB6 (PCR1-2) |
| TPP33 | <i>thiM</i> _{34cd} R2 | PCR1: LB1-LB50 (genomic DNA) PCR2: LB51-LB9 (genomic DNA) PCR3: LB1-LB6 (PCR1-2) |
| Cloning in plasmid pfrΔ | | |
| TPP6-7-8 | pfrΔ <i>thiM</i> _{34cd} | LB37-LB38 (genomic DNA) |

Supplemental Table S3. PCR constructs used for *in vitro* RNA synthesis.

| Constructions | Oligonucleotides |
|--|---|
| <i>In vitro</i> degradation assay | |
| <i>thiM-WT</i> | LB52-LB53 (genomic DNA) |
| <i>thiM-M1</i> | PCR1: LB54-LB58 PCR2: LB52-LB53 (PCR1) |
| <i>thiM-M2</i> | PCR1: LB54-LB57 PCR2: LB52-LB53 (PCR1) |
| <i>thiM-M3</i> | PCR1: LB54-LB55 PCR2: LB52-LB53 (PCR1) |
| <i>thiM-M4</i> | PCR1: LB61-LB62 PCR2: LB52-LB62 (PCR1) |
| <i>thiM-M5</i> | PCR1: LB61-LB63 PCR2: LB52-LB63 (PCR1) |
| <i>thiM-M6</i> | PCR1: LB61-LB64 PCR2: LB52-LB64 (PCR1) |
| <i>thiM-M8</i> | PCR1: LB54-LB59 PCR2: LB52-LB53 (PCR1) |
| <i>thiM-M7</i> | PCR1: LB54-LB60 PCR2: LB52-LB53 (PCR1) |
| <i>thiM-R1</i> | PCR1: LB1-LB48 PCR2: LB49-LB53 PCR3: LB52-LB53 (PCR1-2) |
| <i>thiM-R2</i> | PCR1: LB1-LB50 PCR2: LB51-LB53 PCR3: LB52-LB53 (PCR1-2) |
| <i>In vitro</i> transcription assay | |
| <i>PlacUV5thiM_{34cd}lacZ</i> | PCR1: LB45-LB46 (Strain TPP11) PCR2: AC1-LB65 (PCR1) |
| <i>PlacUV5thiM₃₀₀</i> | AC1-AC4 (genomic DNA) |
| <i>PlacUV5thiM₄₀₀</i> | AC1-AC2 (genomic DNA) |
| Northern Blot RNA probe | |
| <i>thiM</i> probe | LB39-LB40 (genomic DNA) |
| <i>thiM</i> riboswitch probe | LB43-LB44 (genomic DNA) |
| <i>thiD</i> probe | LB41-LB42 (genomic DNA) |
| <i>lysC</i> probe | EM649-EM656 (genomic DNA) |
| <i>rho</i> probe | LB66-LB67 (genomic DNA) |
| 16S RNA probe | EM293-EM294 (genomic DNA) |
| 5S RNA probe | EM192-EM193 (genomic DNA) |

Supplemental Table S4. Summary of oligonucleotides used in this study.

| Oligonucleotides | Sequence 5'-3' |
|------------------|---|
| 130 | GCCATAACGT |
| 201 | TTGGTGAAAA |
| AC1 | GGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATAATGTGTGGCTGCGATTTATCATCGCAAC C |
| AC2 | CACGCATCGCCTGAGCGCGT |
| AC3 | CCGAGTCGTT |
| AC4 | CATCGCTGGCGATGCACCGAG |
| EM192 | TAATACGACTCACTATAGGGAGATGCCTGGCAGTTCCTACTC |
| EM193 | TGCCTGGCGGAGTAGCG |
| EM293 | TAATACGACTCACTATAGGGAGACGCTTTACGCCAGTAATTCC |
| EM294 | CTCCTACGGGAGGCAGCAGT |
| EM649 | TGTAATACGACTCACTATAGTCCACCACTTGCGAAACGCC |
| EM656 | CAAGTAACGGTGTGGAGGA |
| LB1 | ACCTGACGCTTTTTATCGCAACTCTACTGTTTCTCCATGATTTATCATCGCAACCAAAC |
| LB2 | TAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACCAGCAGGTCGACTTGCATAG |
| LB3 | GTGTGATAAAGAAAGTAAAATGCCGGATCCAGCAGGTCGACTTGCATAG |
| LB4 | GTGTGATAAAGAAAGTAAAATGCCGGATCCGCAGATTGCGCTGAACC |
| LB5 | GTGTGATAAAGAAAGTAAAATGCCGGATCCGCAGATTGCGCTGAACC |
| LB6 | GTGTGATAAAGAAAGTAAAATGCCGGATCTTGACCACATCATTGGTCAT |
| LB7 | GTGTGATAAAGAAAGTAAAATGCCGGATCCATCGCTGGCGATGCACCGAG |
| LB8 | GTGTGATAAAGAAAGTAAAATGCCGGATCTGGATCAAGCGTCCAGGGTGT |
| LB9 | GTGTGATAAAGAAAGTAAAATGCCGGATCGATTGCGCCAGTTTCCCGTGC |
| LB10 | TATGGCAGCAGCAAATATGCAAGTCG |
| LB11 | CGACTTGCATAGTTTGCTGCTGCCATA |
| LB12 | GGAGCAAATATAACAAGTCGAC |
| LB13 | GTCGACTTGATAGTTTGCTCC |
| LB14 | TAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACCAGCAGGTCGACTTGCCTAG |
| LB15 | GTGTGATAAAGAAAGTAAAATGCCGGATCCAGCAGGTCGACTTGCCTAG |
| LB16 | AAAAGCCGGTCAATCTGCGCACGCGTTACACCT |
| LB17 | GTGCGCAGATTGACCGCTTTTTTAATCATTGTAAAG |
| LB18 | ACCTGACGCTTTTTATCGCAACTCTACTGTTTCTCCATGCCGGTCTGTGAGTTAATAG |
| LB19 | TAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACCGAAGCTTTTTTAATCATTGTAAAGC |
| LB20 | GTGTGATAAAGAAAGTAAAATGCCGGATCCGAAGCTTTTTTAATCATTGTAAAGC |
| LB21 | GTCATGCAGTGCACAGGGGAATGTTGGTGAAAAAGGTG |
| LB22 | CATTCCTGTGCACTGCATGACCAATGATGTGGTGC |
| LB23 | CCAACATTCCCCGGTTGTGCACTGCATGACCAATGATG |
| LB24 | CAGTGCACAACCGGGGAATGTTGGTGAAAAAGGTG |
| LB25 | CCCCTCGGGTGCATGACCAATG |
| LB26 | CAGTGCACCCGAGGGGAATGTTGGTGAAAAAGG |
| LB27 | GATGTGGTGCAAACCGCAATACCTTGCTGGCGCTC |
| LB28 | GTATTGGCGTTTGACCACATCATTGGTCATGCAG |
| LB29 | GCAATGGTTTACCGCAATACCTTGCTGGCGC |
| LB30 | GGCGGTAAACCATTGCACCACATCATTGGTCATGCAGTG |
| LB31 | GATGTGGTGCAAACCGCCACCGCAATACCTTGCTGGCGC |

LB32 GGCGGTGGCGGTTTGCACCACATCATTGGTCATG
 LB33 GGTTCGACCACATCGAAATGCAGTGCACAAGAGGGGAATGTTGG
 LB34 CTTGTGCACTGCATUUCGATGTGGTGCAAACCTTTACCGCCAATACCTTGC
 LB35 TTCCACATCATTGGTCATGCAGCAAGAGGGGAATGTTGGTGAAAAAGGTG
 LB36 CTGCATGACCAATGATGTGGAACCTTTACCGCCAATACCTTGCTGGCGC
 LB37 TACCCGGAATTCCGAAGGTGCTGGATTCATATATC
 LB38 TACCGCGGATCCGCTTGCACCACATCATTGGTCAT
 LB39 AATAATACGACTCACTATAGGGTGGATCAAGCGTCCAGGGTGTGTTG
 LB40 CCTTTACCGCCAATACCTTGCTG
 LB41 AATAATACGACTCACTATAGGGCGCCGCTTTTTGCCAGCATAACGG
 LB42 GCGGTACAGTCGGTGTATCGCA
 LB43 AATAATACGACTCACTATAGGGATTGGTCATGCAGTGCACAAGAGG
 LB44 ACCCGTATCACCTGATCTGG
 LB45 GAATCTGGTGTATATGGCGAGC
 LB46 GGGGGATGTGCTGCAAGGC
 LB47 TAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAACGACCATAGCTGTTTCTGTGTGATAAAGAAA
 GTTAAATGCCGGATC
 LB48 CAAGAGGGGAAAAAAGGTGTAACGCGTGCGCAGATTGCG
 LB49 CGCGTTACACCTTTTTCCCTCTTGTGCACTGCATGACC
 LB50 CAAGACCCCAATGTTGGTGAAAAAGGTGTAAACGCGTG
 LB51 CAACATTGGGGTCTTGTGCACTGCATGACCAATGATG
 LB52 AATAATATCGACTCACTATAGGGGCGCAATCTGCGCACGCGTT
 LB53 GCAAGGTATTGGCGGTAAAGG
 LB54 GCGCAATCTGCGCACGCGTTACACCTTTTTACCAACATTCCCC
 LB55 GCAAGGTATTGGCGGTAAAGGTTTGCACCACATCATTGGTCATGCAGTGCACAGGGGAATGTTGGTG
 AAAAAGGTG
 LB56 GCAAGGTATTGGCGGTAAAGGTAACGTGGTGTACATTGGTCATGCAGTGCACAAGAGGGGAATGTT
 GGTGAAAAAGGTG
 LB57 GCAAGGTATTGGCGGTAAAGGTTTGCACCACATCATTGGTCATGCAGTGCACAACCGGGGAATGTTG
 GTGAAAAAGGTG
 LB58 GCAAGGTATTGGCGGTAAAGGTTTGCACCACATCATTGGTCATGCAGTGCACCCGAGGGGAATGTTG
 GTGAAAAAGGTG
 LB59 GCAAGGTATTGGCGGTAAAGGTTTGCACCACATCGAAATGCAGTGCACAAGAGGGGAATGTTGGTG
 AAAAAGGTG
 LB60 GCAAGGTATTGGCGGTAAAGGTTCCACATCATTGGTCATGCAGCAAGAGGGGAATGTTGGTGAAAA
 AGGTG
 LB61 GCGCAATCTGCGCACGCGTTACACCTTTTTACCAACATCCCCTCTTGTGCACTGCATGAC
 LB62 GCAAGGTATTGGCGGTTTGCACCACATCATTGGTCATGCAGTGCACAAGAGGGGA
 LB63 GCAAGGTATTGGCGGTAAACCATTGCACCACATCATTGGTCATGCAGTGCACAAGAGGGGA
 LB64 GCAAGGTATTGGCGGTGGCGGTTTGCACCACATCATTGGTCATGCAGTGCACAAGAGGGGA
 LB65 AAGAAAGTTAAATGCCGGATCTTGCACCACATCATTGGTCAT
 LB66 TAATACGACTCACTATAGGGGAACGGAGGAAACCAATCCATC
 LB67 ATGAATCTTACCGAATTAAG
 F-rho-UTR CAACGCTCCCGTTTTATCT
 R-rho-UTR TTGTGAATGGTATGGCAGGA
 F-rho-ORF TGTGTGCTGATGTTCTG
 R-rho-ORF CTTCTCGATCACCATTCC
 F-thiM-UTR TGAGAAATACCCGTATCACC

| | |
|------------|-----------------------|
| R-thiM-UTR | GTAAAGGTTTGCACCACATC |
| F-thiM-ORF | ATGGACATCGTATCATTGGT |
| R-thiM-ORF | GGAAATGTGGAACAAAACCTG |
| F-thiC-UTR | TTAATCTGCTATCGCATCG |
| R-thiC-UTR | ATAAATGCGTTTTGAGTTGG |
| F-thiC-ORF | ACATCTGCCGGAAAATATCA |
| R-thiC-ORF | GCTTTTCCACTTCTTCTTCG |
| F-lysC-UTR | GGGTGAAAATAGTAGCGAAG |
| R-lysC-UTR | TCAGAAAGCACAAATATCAGC |
| F-lysC-ORF | ATGTACGTAAAGTGATGCGT |
| R-lysC-ORF | GGTCCAGATATCAACACGAG |
| F-ribB-UTR | GGATGGGAGAGAGTAACGAT |
| R-ribB-UTR | GTGCATTTTCAACACGTTC |
| F-ribB-ORF | CTTGATGATGAAGACCGTGA |
| R-ribB-ORF | TTGGCAGATCGAGTTGTTTA |
| F-mgtA-UTR | GTCCCTGCTCAGCTTTATTA |
| R-mgtA-UTR | GACCACCGTATTCACTGTCT |
| F-mgtA-ORF | CGCTGATTGTGCATATGAT |
| R-mgtA-ORF | TCATATACCCTGCCAGAATC |
| F-btuB-UTR | CATCTGGTTCTCATCATCG |
| R-btuB-UTR | AAAACGGTTAGCAGTAACGA |
| F-btuB-ORF | GTATGACTTCGACTGGGGTA |
| R-btuB-ORF | GCAGTTTGGTAGCCATAGAC |
| F-thiB-UTR | GAGAAAATACCCGTCGAAC |
| R-thiB-UTR | GCGAAGGAATCGTAGGTAT |
| F-thiB-ORF | CCTGAAAGAAGTGGTTGAGA |
| R-thiB-ORF | TGGTGTAACCTCAGTACCAGA |

SUPPLEMENTAL REFERENCES

- Caron MP, Bastet L, Lussier A, Simoneau-Roy M, Masse E, Lafontaine DA. 2012. Dual-acting riboswitch control of translation initiation and mRNA decay. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: E3444-3453.
- Edwards TE, Ferre-D'Amare AR. 2006. Crystal Structures of the Thi-Box Riboswitch Bound to Thiamine Pyrophosphate Analogs Reveal Adaptive RNA-Small Molecule Recognition. *Structure* **14**: 1459-1468.
- Figueroa-Bossi N, Schwartz A, Guillemardet B, D'Heygere F, Bossi L, Boudvillain M. 2014. RNA remodeling by bacterial global regulator CsrA promotes Rho-dependent transcription termination. *Genes Dev* **28**: 1239-1251.
- Kido M, Yamanaka K, Mitani T, Niki H, Ogura T, Hiraga S. 1996. RNase E polypeptides lacking a carboxyl-terminal half suppress a mukB mutation in Escherichia coli. *J Bacteriol* **178**: 3917-3925.
- Mandin P, Gottesman S. 2009. A genetic approach for finding small RNAs regulators of genes of interest identifies RybC as regulating the DpiA/DpiB two-component system. *Mol Microbiol* **72**: 551-565.
- Masse E, Escorcía FE, Gottesman S. 2003. Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in Escherichia coli. *Genes Dev* **17**: 2374-2383.
- Masse E, Gottesman S. 2002. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 4620-4625.
- Rabhi M, Espeli O, Schwartz A, Cayrol B, Rahmouni AR, Arluison V, Boudvillain M. 2011. The Sm-like RNA chaperone Hfq mediates transcription antitermination at Rho-dependent terminators. *EMBO J* **30**: 2805-2816.
- Rist M, Marino J. 2001. Association of an RNA kissing complex analyzed using 2-aminopurine fluorescence. *Nucleic Acids Res* **29**: 2401-2408.
- Serganov A, Polonskaia A, Phan AT, Breaker RR, Patel DJ. 2006. Structural basis for gene regulation by a thiamine pyrophosphate-sensing riboswitch. *Nature* **441**: 1167-1171.
- Thore S, Leibundgut M, Ban N. 2006. Structure of the Eukaryotic Thiamine Pyrophosphate Riboswitch with Its Regulatory Ligand. *Science*: 1208-1211.
- Winkler W, Nahvi A, Breaker RR. 2002. Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature* **419**: 952-956.
- Yu D, Ellis HM, Lee EC, Jenkins NA, Copeland NG, Court DL. 2000. An efficient recombination system for chromosome engineering in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 5978-5983.

CHAPITRE 2

Small RNA and riboswitch *btuB* translation inhibition modulate mRNA levels through different mechanisms

Auteurs de l'article : Laurène Bastet¹, Anne-Marie Lamontagne¹, Eric Massé^{2,*} and Daniel A. Lafontaine^{1,*}

¹ Department of Biology, Faculty of Science, RNA Group, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada, J1K 2R1.

² Department of Biochemistry, Faculty of Medicine and Health Sciences, RNA Group , Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada J1E 4K8

Statut de l'article: non publié

Contribution: J'ai réalisé les essais β -galactosidase, les expériences de purification d'affinité avec l'étiquette MS2 et les analyses de séquençage de l'ARN, les expériences de northern blot avec MS2 et les essais *in vitro*. Des expériences de northern blot ainsi que certains essais de β -galactosidase ont été fait par Anne-Marie Lamontagne.

J'ai écrit l'article conjointement avec Daniel Lafontaine.

RÉSUMÉ

Pour répondre efficacement aux changements physiologiques, l'expression d'un gène peut être contrôlée par différents signaux et mécanismes de régulation. Le contrôle de l'expression du gène *btuB* d'*E. coli* est particulièrement remarquable puisqu'il dépend d'un riborégulateur et d'un petit ARN. L'article présenté dans ce chapitre vise à comparer les modes d'action de ces deux ARNc.

Dans cet article, nous montrons que le petit ARN OmrA contrôle l'initiation de la traduction de *btuB*. Nos résultats suggèrent qu'OmrA s'apparie au début de la région codante de *btuB* et guide la liaison d'Hfq au niveau des sites d'initiation de la traduction. La chaperonne Hfq bloque de cette façon l'accès des ribosomes à l'ARNm. Nos données montrent que la répression traductionnelle est accompagnée de la dégradation de l'ARNm *btuB* par le dégradosome ARN. Le clivage endonucléolytique initial a lieu en aval et dans une région distale du site d'appariement.

En parallèle, nous nous sommes intéressés au contrôle exercé par le riborégulateur AdoCbl qui est localisé dans le 5'UTR de *btuB*. En présence de ligand, le riborégulateur inhibe l'initiation de la traduction de *btuB* ce qui a pour effet de diminuer le niveau d'ARNm. Dans l'article présenté ici, nous montrons que la régulation du niveau d'ARNm est induite par une terminaison Rho-dépendante et par l'initiation de la dégradation. Ainsi, bien qu'OmrA et le riborégulateur agissent tous deux au niveau traductionnel, les mécanismes conduisant à la diminution de l'ARNm *btuB* sont différents.

À notre connaissance, cette étude est la première à établir une comparaison sur les modes d'action d'un petit ARN et d'un riborégulateur. Les résultats obtenus ici contribuent sans équivoque à une meilleure compréhension des mécanismes de régulation exercée par l'ARN.

Small RNA and riboswitch *btuB* translation inhibition modulate mRNA levels through different mechanisms

Laurène Bastet¹, Anne-Marie Lamontagne¹, Eric Masse^{2,*} and Daniel A. Lafontaine^{1,*}

¹ Department of Biology, Faculty of Science, RNA Group, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada, J1K 2R1.

² Department of Biochemistry, Faculty of Medicine and Health Sciences, RNA Group , Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada J1E 4K8

Keywords: Riboswitch, Small RNA, translation, mRNA decay.

Running title: mRNA regulation by *E. coli* riboswitches and small RNA

*To whom correspondence should be addressed.

Address correspondence to: Daniel Lafontaine, 2500, Blvd Université, Sherbrooke, Quebec, Canada, J1K 2R1.

E-mail: Daniel.Lafontaine@USherbrooke.ca

ABSTRACT

To efficiently adapt to physiological changes, bacterial gene expression is controlled by different signals and regulatory mechanisms. The expression of the *Escherichia coli* *btuB* gene, encoding a cobalamin transporter, is regulated by an adenosylcobalamin (AdoCbl)-dependent riboswitch. In addition to this feedback regulation, we report here that *btuB* translation initiation is repressed by the small RNA OmrA induced during osmotic stress. Our results put forward a mechanism where OmrA recruits Hfq to *btuB* translation initiation region, thus preventing ribosome access. Strikingly, concomitantly to the translational arrest, the riboswitch and sRNA control the level of *btuB* mRNA through different regulatory pathways. While AdoCbl binding to the *btuB* riboswitch co-transcriptionally controls mRNA levels through Rho-dependent termination, OmrA binding appears to act only at a post-transcriptional level by inducing *btuB* mRNA cleavage at a downstream mRNA site. Taken together, this is the first study demonstrating that riboswitch and small RNA riboregulators may target similar mRNA regions, thus indicating that gene expression can be differentially modulated in response to specific regulatory inputs, such as RNA and cellular metabolites.

INTRODUCTION

Bacteria adapt to environmental changes by employing a variety of regulatory mechanisms that adjust the level of mRNA and proteins in function of a specific signal. In the last decade, non-coding RNAs (ncRNAs) have emerged as crucial actors of the bacterial adaptive response. One of the most common mechanisms employed by regulatory RNAs to control gene expression is to prevent mRNA translation by occluding the access of the Shine Dalgarno (SD) sequence and/or the AUG start codon. Riboswitches and small RNAs (sRNAs) are representative of such a class of RNA translational repressors. Riboswitches are positioned in the 5' untranslated region of certain bacterial mRNA and regulate the expression of downstream gene(s) upon metabolite binding. The translational control exerted by those RNA switches consists in modulating the formation of a stem-loop structure, which sequesters translation initiation region (TIR) upon ligand binding.

Small RNAs (sRNAs) are also translationally controlling elements, but in contrast to riboswitches, they modulate ribosome access by directly base pairing to the SD region of the mRNA target with the help of the Hfq chaperone. Translation repression induced by sRNAs and riboswitches is commonly accompanied by a fast degradation of the regulated transcript^{1,2}. The widely accepted view is that mRNA degradation is a consequence of translation inhibition where the absence of translating ribosomes allows cellular endoribonucleases to cleave and degrade untranslated mRNAs³. Such a regulation mechanism has been proposed for the *btuB* gene, which encodes an external membrane transporter of cobalamin. In this regulatory system, the expression is controlled by a translationally-acting riboswitch recognizing adenosylcobalamin (AdoCbl), an active form of vitamin B12 (Supplementary Fig. 1), where ligand binding promotes the sequestering of the SD sequence. However, in the absence of ligand, the riboswitch adopts a structure allowing ribosome binding and translation initiation⁴⁻⁶ (Supplementary Fig. 1B). In addition to the translational control, experimental evidence indicated that the riboswitch controls mRNA levels by a mechanism that is not yet fully understood⁶⁻⁸.

Previous microarray data suggested that *btuB* expression is also modulated by two highly similar sRNAs, OmrA and OmrB⁹, which are adjacently located in the *Escherichia coli*

chromosome. Their expression is controlled by the two-component system EnvZ-OmpR upon an osmotic stress and by the $\sigma(S)$ during the exponential to the stationary phase transition¹⁰. OmrA and OmrB downregulate the expression of genes involved in cell mobility or encoding outer membrane proteins^{9,11,12}. The OmrA/B regulatory mechanism has been recently characterized for *cirA*, *ompT*, *ompR* and *csgD* mRNA target^{13,12}. Typically, the sRNA pairs by an antisense mechanism within the TIR mRNA whereby it inhibits ribosome access. OmrA and OmrB pairing lead to fast mRNA decay involving the RNA degradosome complex. In this study, we show that in addition to the AdoCbl-responsive riboswitch, OmrA also regulates *btuB* gene expression at the translational level. Remarkably, our data indicate that OmrA pairs within *btuB* ORF and induces Hfq binding to *btuB* AUG start codon. This observation suggests a mechanism where Hfq, rather than OmrA, directly blocks ribosome access. Our work reveals that the mRNA control mediated by the AdoCbl riboswitch is fundamentally different from the one employed by OmrA. While the beginning of the *btuB* ORF is important for OmrA-mediated translational arrest, this sequence is required for AdoCbl-dependent mRNA decay. The characterization of *btuB* regulation provides a unique system showing how different regulatory inputs can differentially regulate mRNA levels.

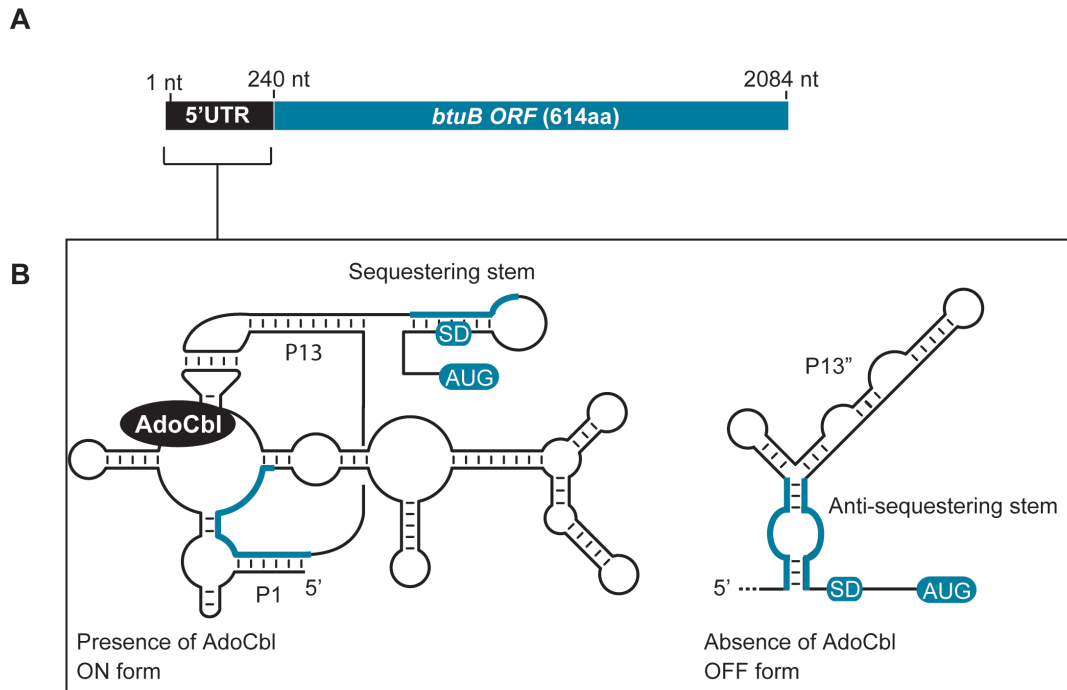


Figure S1: Representation of the *btuB* gene and riboswitch

(A) Schematic representing the *btuB* riboswitch located in the 5'UTR of the *btuB* gene. Genomic locations of *btuB* gene and size of BtuB protein are indicated. **(B)** Schematic representing *btuB* riboswitch translational control. In the absence of AdoCbl, the anti-sequestering stem (bleu) exposes the SD and allows translation initiation. AdoCbl binding sequesters the SD.

RESULTS

OmrA controls *btuB* translation and mRNA decay

The small RNA OmrA has recently been shown to control the expression of several mRNA targets at the translational level¹¹⁻¹³. Moreover, experimental evidence has suggested that the inhibition of translation and the recruitment of the RNA degradosome by the OmrA/Hfq complex drives the fast degradation of the mRNA target^{9,13}. To decipher the molecular basis of this regulatory process, we first analyzed by Northern blot experiments the effect of the ectopic expression of OmrA from an arabinose inducible promoter (pBAD-OmrA) on the chromosomally encoded *btuB* mRNA. We performed these experiments in the context of the wild-type strain (Fig. 1A), *hfq* mutant (Fig. 1B) and *rne-131* mutant strain (Fig. 1C) carrying a mutation in the RNase E C-terminal domain preventing the assembly of the RNA degradosome complex¹⁴. Cells were grown in minimal medium and total RNA was extracted before and after the induction of OmrA expression at several time points. Our results showed an important decrease of *btuB* mRNA levels in the wild-type strain only after inducing OmrA for 2 min (Fig. 1A). No effect was observed when using a control plasmid not harboring OmrA (PNM12), suggesting that arabinose addition by itself does not impact *btuB* mRNA levels (Fig. 1A). In contrast, *btuB* mRNA levels remained largely unaffected in *hfq* (Fig. 1B) or *rne-131* (Fig. 1C) mutant strains. Therefore, these results suggest that Hfq and the RNA degradosome are essential for OmrA-mediated downregulation of *btuB* mRNA levels. These observations are consistent with the idea that OmrA expression, together with Hfq, recruits the RNA degradosome to trigger *btuB* mRNA degradation. We obtained similar results with the small RNA OmrB (Supplementary Fig. 2A, B and C), indicating that both small RNAs control *btuB* expression.

In order to define the region of *btuB* sufficient for OmrA activity, we employed chromosomally encoded translational fusions containing various *btuB* ORF lengths fused to the *lacZ* reporter gene. The expression of the BtuB-lacZ fusion was placed under the control of an arabinose promoter to ensure that observed effects do not originate from promoter transcriptional control. Strains harboring BtuB-lacZ fusions were transformed either with an

IPTG-inducible plasmid expressing OmrA or an empty control plasmid (pBR). BtuB-lacZ fusions of 140, 70, 40 and 27 codons (cd) showed a ~50% to ~75 % decrease in β -galactosidase activity in presence of OmrA (Fig. 1D). However, while *btuB* gene expression was repressed by ~20 % when using a fusion of 21 cd (Fig. 1D), no repression was observed when using a fusion containing 6 cd. Hence, we conclude the region essential for OmrA-mediated *btuB* control is localized between the 6th and 27th codons of *btuB* ORF.

Because Northern blot assays showed that OmrA controls the *btuB* mRNA decay through RNA degradosome activity (Fig. 1C), we next assayed the effect of OmrA on β -galactosidase activity of *btuB-lacZ* transcriptional fusions. We observed that OmrA expression decreased the β -galactosidase activity of the transcriptional fusion containing the first 140 cd by ~33% (Fig. 1E). In contrast, no OmrA-dependent repression was obtained when using constructs containing 70, 27 or 6 cd (Fig. 1E). The low reduction in β -galactosidase activity (140 cd) markedly differs from our Northern Blot experiments showing the complete disappearance of *btuB* mRNA (Fig. 1A). Such a striking difference indicates that additional regulatory elements are probably located further downstream *btuB* ORF. More importantly, given that OmrA reduces the expression of a 6 cd BtuB-lacZ translational fusion but not of the related transcriptional fusion, it suggests that OmrA primarily controls *btuB* expression at a translational level. Similar results were observed in presence of OmrB (Supplementary Fig. 2D and E), supporting the idea that both sRNAs act in a comparable way. However, the effect of OmrB on *btuB* expression is clearly weaker compared to OmrA suggesting that the affinity of both sRNAs for *btuB* mRNA is different.

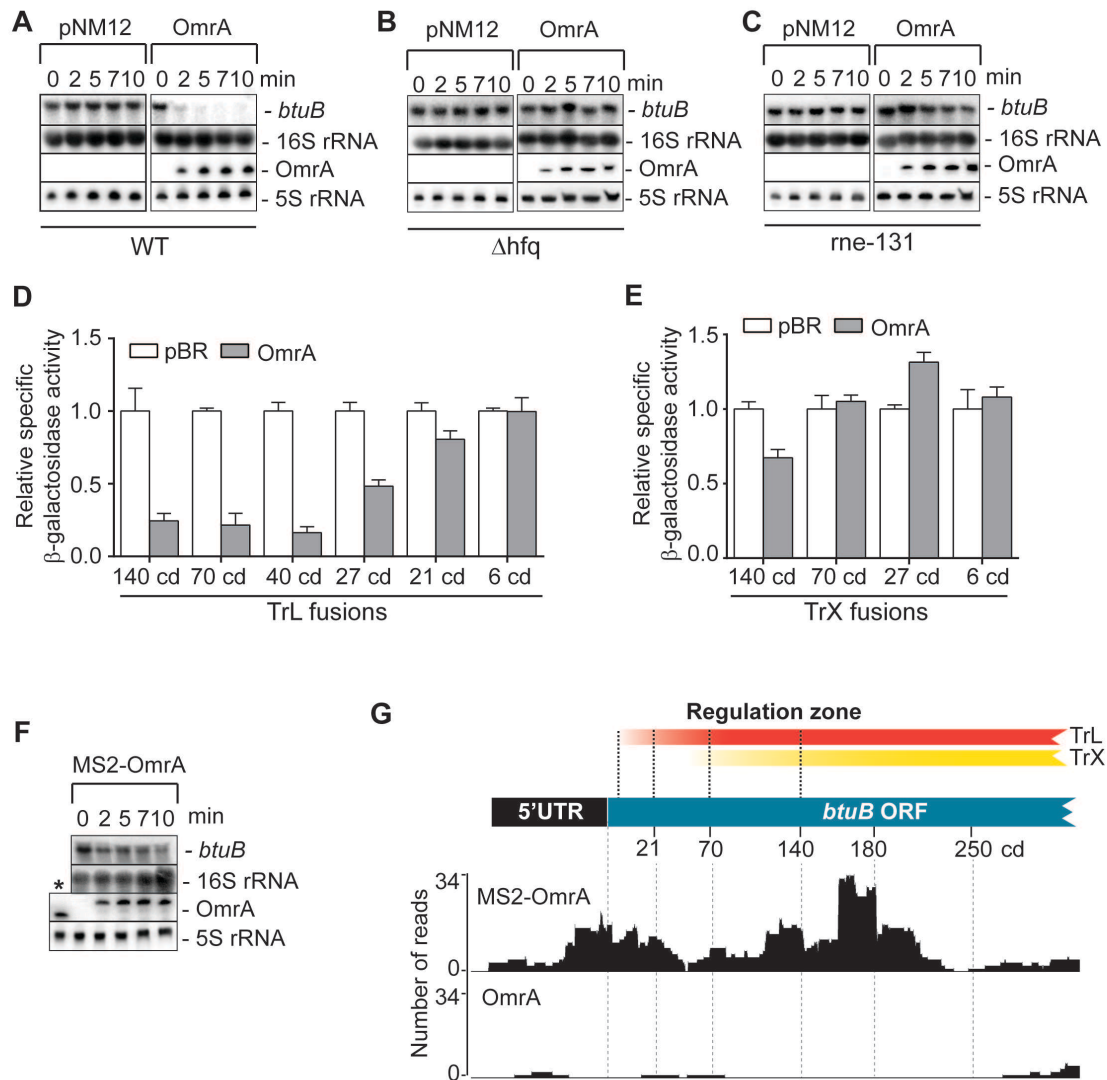


Figure 1: OmrA regulates *btuB* expression

(A, B and C) Northern blot analysis of the *btuB* mRNA level in function of the expression of OmrA in the wild type strain (A), the *hfq* mutant strain (B) and the *rne-131* strain (C). Total RNA was extracted at the indicated times immediately before (0) and after (2,5,7,10 min) the induction of the expression of OmrA (pBAD-OmrA) with 0.1% arabinose. The empty plasmid PNM12 was used as control. The probes were designed to detect the *btuB* mRNA or OmrA. 16S and 5S rRNA were used as a loading control for the membrane corresponding to the *btuB* and OmrA detection respectively. (D and E) Effect of OmrA expression on translational BtuB-LacZ (D) and transcriptional *btuB-lacZ* fusions (E) containing various *btuB* ORF lengths. The number of *btuB* codons is indicated below the histograms. The empty plasmid (pBR) was used as a control. The average values of three independent experiments with standard deviations are shown. Values were normalized to the activity obtained for the strain with the empty plasmid. (F) Northern blot analysis of the *btuB* mRNA level in function of the expression of OmrA fused to the MS2 tag (MS2-OmrA) in the wild type strain. Total RNA was extracted at the indicated times immediately before (0) and after (2,5,7,10 min) the

induction of the expression of MS2-OmrA (pBAD-MS2OmrA) with 0.1% arabinose. The asterik corresponds to RNA extracted form a strain harboring the untagged OmrA plasmid (pBAD-OmrA). The probes were designed to detect the *btuB* mRNA or OmrA. 16S and 5S rRNA were used as a loading control for the membrane corresponding to the *btuB* and OmrA detection respectively. Note that line indicated by an asterisk corresponds to an RNA extraction of a strain harboring the untagged OmrA (**G**) RNA-seq profile for the *btuB* mRNA obtained after *in vivo* affinity purification using the MS2-aptamer tagged OmrA. On the top, the arrow represents the *btuB* mRNA, the 5'UTR is in grey and the coding sequence in blue. Translational (TrL) and (post-) transcriptional (TrX) regulation zones are represented by the color gradient above the *btuB* mRNA. The tracks below show the number of reads obtain at each nucleotide position on the *btuB* mRNA. The experiment was done with MS2-aptamer tagged OmrA (MS2-OmrA) and OmrA without MS2 tag (OmrA) was used as control. The scale on the left indicates the number of sequencing reads for each nucleotides position. Vertical dashed lines indicate the corresponding position on the *btuB* mRNA represented on the top.

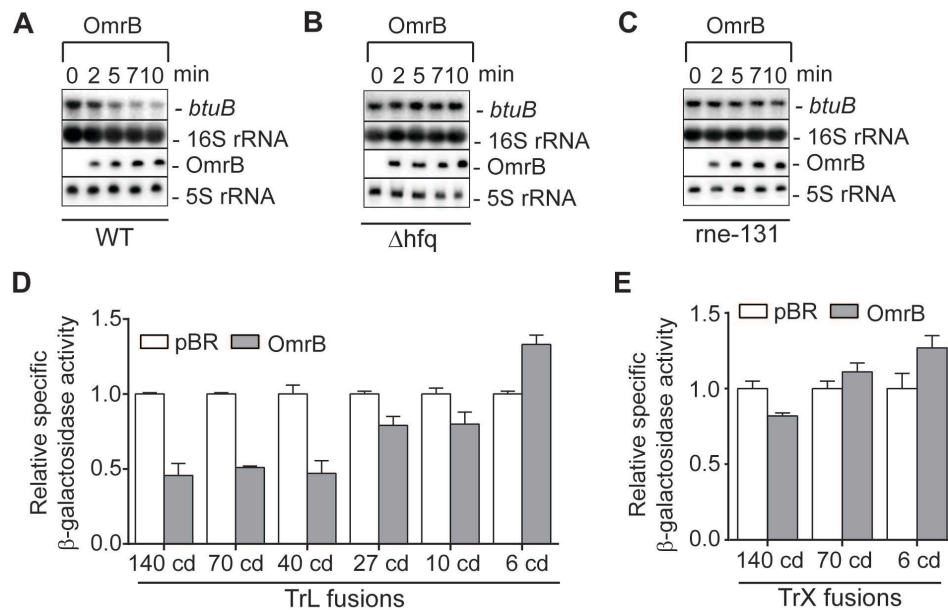


Figure S2: OmrB regulates *btuB* expression

(**A, B and C**) Northern blot analysis of the *btuB* mRNA level in function of the expression of OmrB in the wild type strain (**A**), the *hfq* mutant strain (**B**) and the *rne-131* strain (**C**). Total RNA was extracted at the indicated times immediately before (0) and after (2, 5, 7, 10 min) the induction of the expression of OmrB (pBAD-OmrB) with 0.1% arabinose. The probes were designed to detect the *btuB* mRNA or OmrB. 16S and 5S rRNA was used as a loading control for the membrane corresponding to the *btuB* and OmrB detection respectively. (**D and E**) Effect of OmrB expression on translational BtuB-LacZ (**D**) and transcriptional *btuB-lacZ* fusions (**E**) containing various *btuB* lengths ORF. The number of *btuB* codons is indicated below the histograms. The empty plasmid (pBR) was used as a control. The average values of

three independent experiments with standard deviations are shown. Values were normalized to the activity obtained for the strain with the empty plasmid

OmrA interact with the *btuB* mRNA *in vivo*

To determine whether OmrA directly interacts with *btuB* mRNA *in vivo*, we employed an affinity purification approach using the MS2 coat phage protein that we recently used to identifying sRNA target¹⁵. This technique relies on the high affinity of the MS2 coat phage protein for an RNA aptamer composed of stem loop structure. We designed a construct in which two consecutive MS2 RNA aptamers were fused to OmrA 5' end and where an inducible arabinose promoter controls the expression of the construct. Northern blot experiments showed that the addition of the MS2 aptamer does not prevent OmrA-dependent *btuB* mRNA regulation (Fig. 1F). Because the aim was to co-purify OmrA mRNA targets, we expressed the MS2-OmrA fusion within a strain carrying the *rne-131* mutation to avoid mRNA fast degradation. Cells were grown in minimal medium and total RNA was extracted 10 min after MS2-OmrA induction. The sRNA MS2-OmrA was then purified by affinity chromatography using the MS2 protein. To discriminate against non-specific binding, experiments were also done using the plasmid harboring the untagged OmrA.

Following affinity purification, eluted RNAs were analyzed using RNA-seq to determine OmrA targets. We calculated the enrichment of putative RNA binding partners by comparing the number of reads obtained from tagged MS2-OmrA and untagged OmrA control experiments. As expected, several previously reported OmrA targets were specifically co-purified with MS2-OmrA (Supplementary Fig. 3). For instance, we obtained a strong enrichment for *ompR*, *ompT*, *cirA* and *csgD* mRNAs (Supplementary Fig. 3). Importantly, we found a 10-fold enrichment of *btuB* mRNA indicating that OmrA interacts with *btuB* mRNA *in vivo*. Our results also revealed that several putative targets such as *fliY*, *sdaB* and *folP* were significantly enriched, suggesting that they could also be controlled by OmrA (Supplementary Fig. 3A). The examination of RNA-seq profiles for known mRNA targets showed in several cases a higher number of reads nearby the experimentally determined OmrA pairing site (Supplementary Fig. 3B, C and D). Taking advantage of this, we analyzed the RNA-seq profile for the *btuB* mRNA (Fig. 1G and Supplementary Fig. 4B). Sequencing reads were

found to be concentrated in three main regions of *btuB* mRNA (AUG start codon; ~170 codon and ~500 codon). Interestingly, the distribution of sequencing reads nearby the AUG codon are mostly contained within the first 27 *btuB* codons, which are required for OmrA-mediated regulation (Fig. 1D).

We performed similar experiments to determine the OmrB targets. Northern blot experiments showed that the MS2-OmrB construct downregulates *btuB* expression (Supplementary Fig. 4A). Enrichment calculation and RNA seq profiles demonstrated that MS2-OmrB co-purified with several known and putative mRNA targets (Supplementary Fig.3). The enrichment in *btuB* mRNA was lower compared to the experiment realized with MS2-OmrA (~3 for OmrB and ~10 for OmrA; Supplementary Fig. 3A). Moreover, the RNA-seq profile (Supplementary Fig.4B) showed no significant enrichment within the beginning of the *btuB* ORF. These data together with our previous β -galactosidase experiments (Supplementary Fig. 2D and E) established that OmrB pairing to *btuB* mRNA as well as the resulting regulation is less important compared to OmrA.

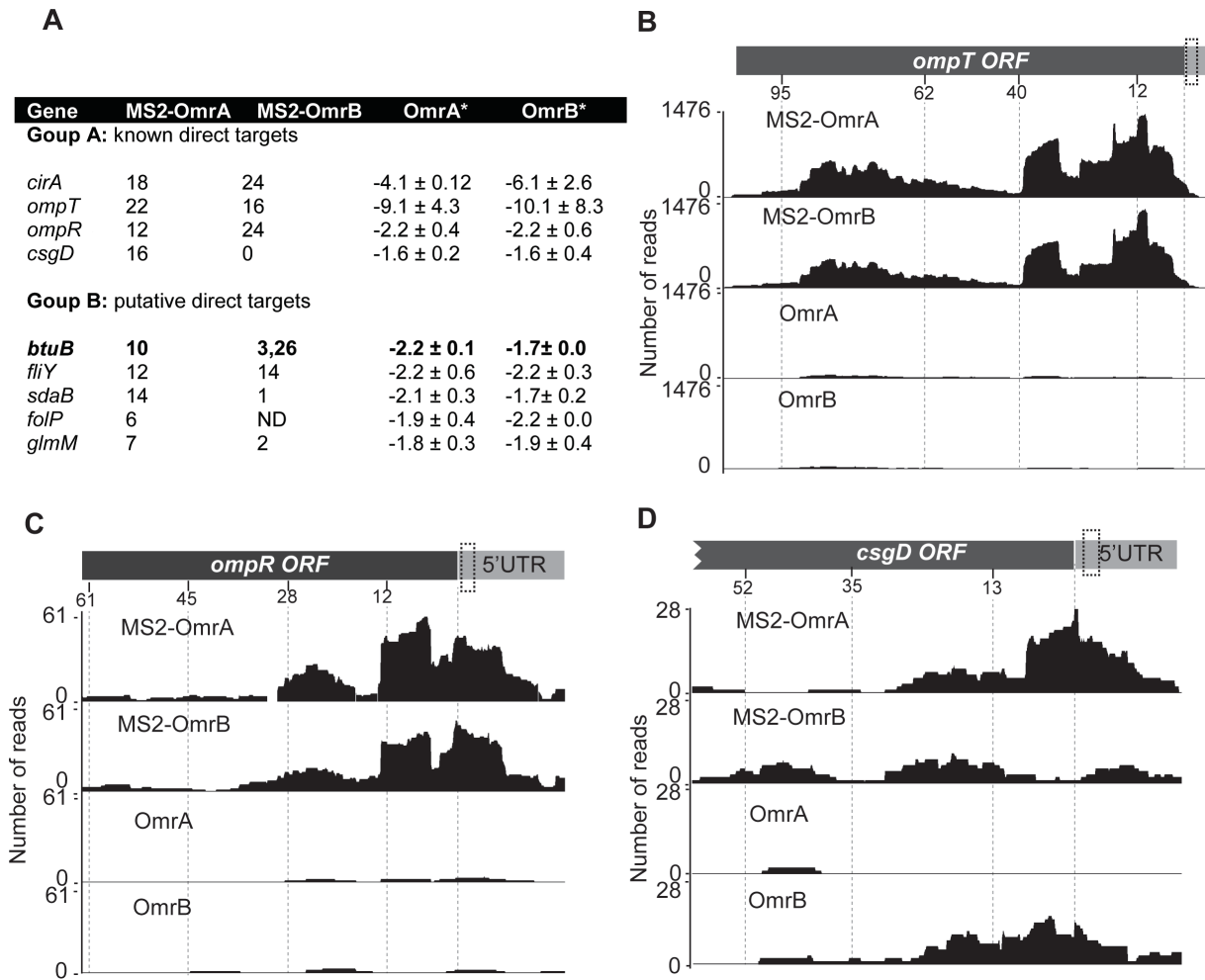


Figure S3: Validity of MS2-Affinity purification technic

(A) Summary of OmrA and OmrB targets enriched after MS2-OmrA and MS2-OmrB affinity purification (ratio MS2-Omr/Omr control) in an *rne-131* background. The reads on gene sequences are reported. * Report the repression level of the mRNA after OmrA or OmrB overexpression (microarray data from Guillier and Gottesman⁹). (B, C and D) RNA-seq profile for the *ompT* (B), *ompR* (C) and *csgD* (D) mRNA obtained after *in vivo* affinity purification using the MS2-aptamer tagged OmrA and OmrB. On the top, the line represents the mRNA, the 5'UTR is in light grey and the coding sequence in dark grey. Some codons positions are indicated. The OmrA/OmrB pairing site position is framed. The tracks below show the number of reads obtains at each nucleotides position on the mRNA. The experiment was done with MS2-aptamer tagged OmrA and OmrB (MS2-OmrA and MS2-OmrB) and OmrA or OmrB without MS2 tag (OmrA and OmrB) was used as control. The scale on the left indicates the number of the sequencing reads for each nucleotides position. Vertical dashed lines indicate the corresponding position on the mRNA represented on the top.

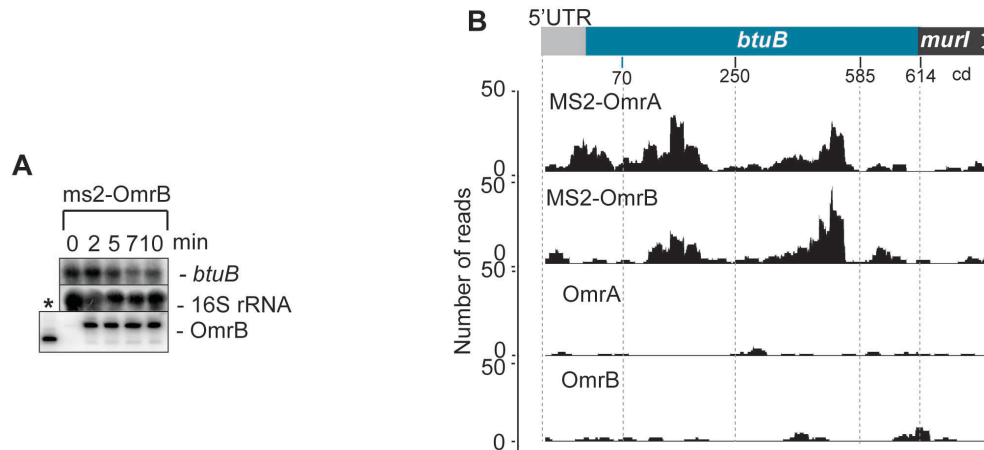


Figure S4: OmrA and OmrB pair to *btuB* mRNA *in vivo*

(A) Northern blot analysis of the *btuB* mRNA level in function of the expression of OmrB fused to the MS2 tag (MS2-OmrB) in the wild type strain. Total RNA was extracted at the indicated times immediately before (0) and after (2, 5, 7, 10 min) the induction of the expression of MS2-OmrB (pBAD-MS2OmrB) with 0.1% arabinose. The asterisk corresponds to RNA extracted from a strain harboring the untagged OmrA plasmid (pBAD-OmrA). The probes were designed to detect the *btuB* mRNA or OmrB. 16S and 5S rRNA was used as a loading control for the membrane corresponding to the *btuB* and OmrB detection respectively.

(G) RNA-seq profile for the *btuB* mRNA obtained after *in vivo* affinity purification using the MS2-aptamer tagged OmrA and OmrB. On the top, the arrow represents the *btuB* mRNA, the 5'UTR is in grey and the coding sequence in blue. Some codons positions are indicated. The tracks below show the number of reads obtained at each nucleotide position on the *btuB* mRNA. The experiment was done with MS2-aptamer tagged OmrA and OmrB (MS2-OmrA and MS2-OmrB) and OmrA or OmrB without MS2 tag (OmrA and OmrB) was used as control. The scale on the left indicates the number of the sequencing reads for each nucleotide position. Vertical dashed lines indicate the corresponding position on the *btuB* mRNA represented on the top.

The sRNA OmrA interacts with the *btuB* coding region

Although our previous β -galactosidase experiments indicated that the *btuB* ORF region between 21 and 27 cd is crucial for OmrA mediated regulation, we cannot exclude that OmrA interacts with 5' UTR *btuB* elements as observed for several sRNAs controlling translation. To evaluate the importance of the 5' UTR region in OmrA regulation, we constructed a BtuB-lacZ_{27cd} fusion in which the *btuB* 5' UTR from the +1 transcriptional start site to + 225 nt was deleted (Δ 1/225; Fig. 2A and 2B). The β -galactosidase activity of this construct and the repression level exerted by OmrA are similar to what obtained with the WT construct (Fig. 2B), indicating that OmrA does not require the *btuB* riboswitch sequence for the regulation.

As expected, no AdoCbl-dependent repression was observed when using the $\Delta 1/225$ construct (Fig. 2B).

These results suggest that the OmrA pairing site is located between positions +225 to +321 nt (27 codons) of *btuB* transcript (Fig. 2A). An *in silico* prediction using the RNA hybrid software indicated a potential pairing site for OmrA at positions +299 to +316 nt of *btuB* mRNA¹⁶ (Fig. 2A). To verify this interaction, we used β -galactosidase experiment in which we mutated *btuB* (B1) or OmrA (A1) nucleotides involved in predicted paired regions (from +304 to +309 of *btuB* mRNA). When disrupting this predicted OmrA-*btuB* interaction (Fig. 2C), we observed the total loss of OmrA-mediated regulation when using both A1 and B1 mutants. However, combining both mutations (A1 and B1) did not allow restoring OmrA-mediated *btuB* regulation. An *mfold* analysis suggested that A1 mutations affected OmrA by forming a stem-loop structure, providing a reasonable explanation to the incapacity of modulating the expression of the B1 mutant (Supplementary Fig. 5A). To verify if sequestered nucleotides could participate to the regulation, we mutated OmrA and performed β -galactosidase experiments. Our data indicated that beside OmrA G5, A6, G7, G8 residues (predicted to be involved in the pairing with *btuB*), mutations introduced in OmrA 5' region do not perturb *btuB* regulation (Supplementary Fig. 5B). Therefore, these results are in agreement with the predicted pairing between OmrA and *btuB* mRNA.

The higher OmrA-dependent repression observed when increasing *btuB* ORF length (Fig. 1D) suggested that OmrA could pair to more distal regions of the *btuB* mRNA. To address this hypothesis, we carried out β -galactosidase experiments in which B1 mutations were inserted in 70 and 140 cd BtuB-lacZ fusions. In both cases, the expression of OmrA was unable to downregulate the expression of the fusion (Fig. 2D), clearly showing that no other OmrA pairing sites are located within the first 170 *btuB* codons.

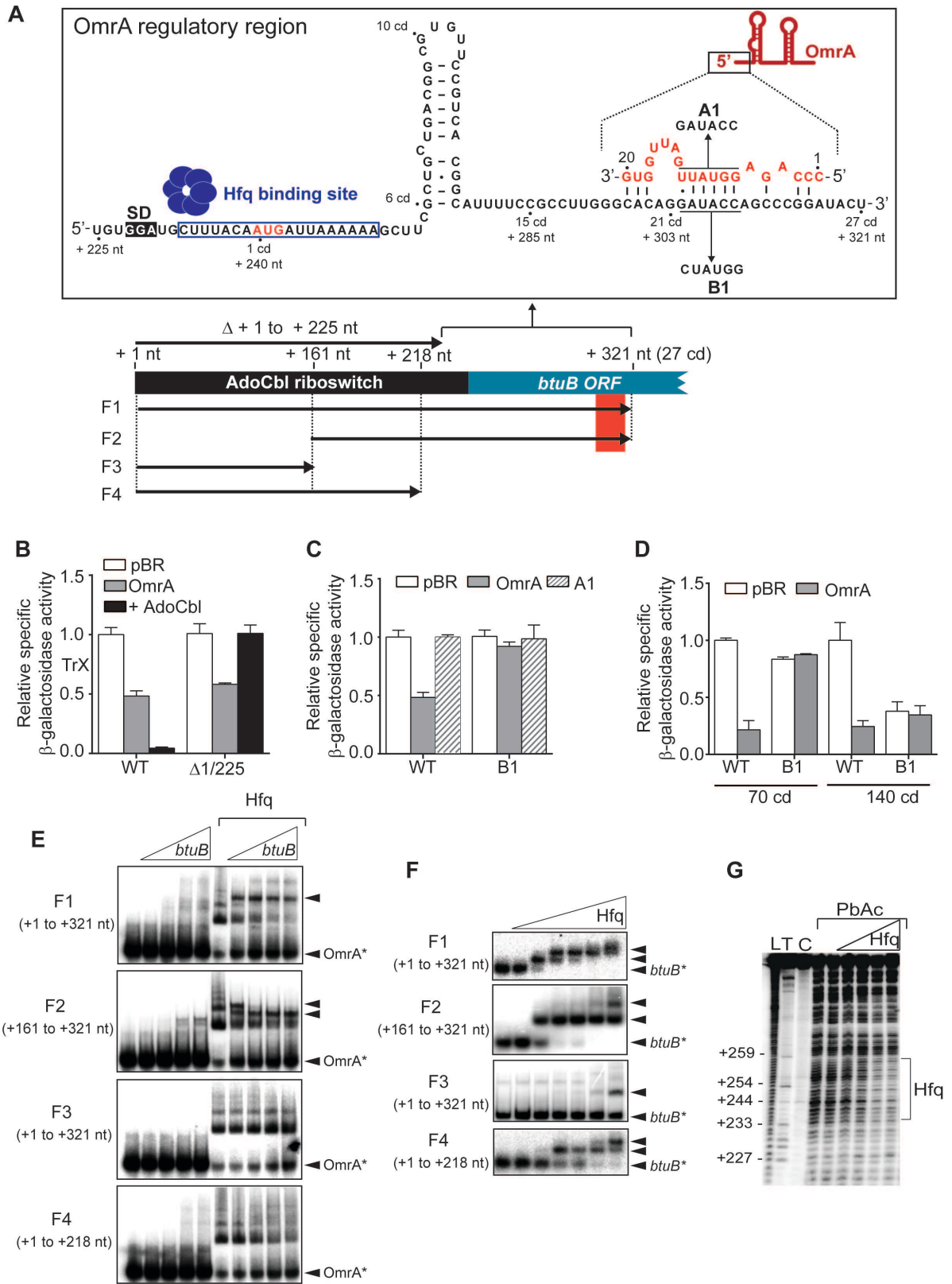


Figure 2: OmrA/Hfq regulatory region is located in the *btuB* ORF

(A) Schematic representation of *btuB* mRNA. The upper portion shows the *btuB* coding sequence necessary and sufficient for OmrA/Hfq regulation. SD nucleotides are indicated by a black box. The start codon corresponds to the position +1. Nucleotides in bleu constitute the Hfq binding site defines in Fig. 2G. The *in silico* predicted OmrA pairing to *btuB* mRNA is shown with red nucleotides. OmrA and *btuB* mutants used in C are indicated as A1 and B1 respectively. The lower part represents the beginning of the *btuB* mRNA with the AdoCbl riboswitch (in black) and the *btuB* ORF (in bleu). The arrow above the representation corresponds to *btuB* deletion (+ 1 to +225 nt) used in B. Arrows below the representation show *btuB* RNA fragments used in E and F. The red frame represents the OmrA pairing site position. **(B)** Effect of OmrA expression on translational BtuB-LacZ_{27cd} fusions none mutated (WT) or deleted for the region from +1 to +225 nt of *btuB* ($\Delta 1/225$). Bacterial cells were grown in M63 minimal medium with 0.2% glycerol. Arabinose 0.1% and IPTG 1mM were added to induce the expression of *btuB* and OmrA respectively. The effect of AdoCbl on the β -galactosidase activity was also monitor. **(C)** Effect of OmrA and OmrA-A1 expression on the WT translational BtuB-LacZ_{27cd} fusions containing the mutation B1 or not mutated (WT). **(D)** Effect of OmrA expression on BtuB-LacZ translational of 70 or 140 cd mutated (B1) or not (WT) for OmrA pairing site. For **B**, **C** and **D**, bacterial cells were grown in M63 minimal medium with 0.2% glycerol. Arabinose 0.1% and IPTG 1mM were added to induce the expression of *btuB* and OmrA respectively. The empty plasmid (pBR) was used as a control. The average values of three independent experiments with standard deviation are shown. Values were normalized to the activity obtained for the strain harboring BtuB-LacZ WT construct and the empty plasmid. **(E)** OmrA/*btuB* *in vitro* binding assays. 5' end labeled OmrA (approximately 10nM final concentration) were incubated with increasing concentration of unlabeled *btuB* RNA fragment (0nM, 1nM, 10nM, 50nM, 100nM) with or without 10nM hexameric Hfq. The designed F1, F2, F3 and F4 fragment are represented in A. Note that only the F1 and F2 fragment contain the OmrA pairing region. Arrows on the right of gels show the unbound radiolabeled OmrA when indicated OmrA* or the shift corresponding to an OmrA/Hfq/*btuB* complex. **(F)** *btuB*/Hfq binding assays. 5' end labeled *btuB* RNA fragment (approximately 10nM final concentration) were incubated with increasing concentration of the purified Hfq protein (0nM, 2.5nM, 5nM, 10nM, 25nM, 50nM, 100nM). *btuB* RNA fragment used in this experiment are the same than in E. Arrows on the right of the gel show unbound radiolabeled *btuB* when indicated *btuB** or the shift corresponding to *btuB*/Hfq complex **(G)** Lead Acetate probing (PbAc) of Hfq binding with the *btuB* mRNA. 5' end labelled *btuB* RNA fragment (form + 161 to + 321 nt) were incubated with increasing concentration of Hfq protein (0 to 20nM). L, Alkaline hydrolysis ladder; T1, RNase T1 ladder (guanine residues); C, non-reacted control.

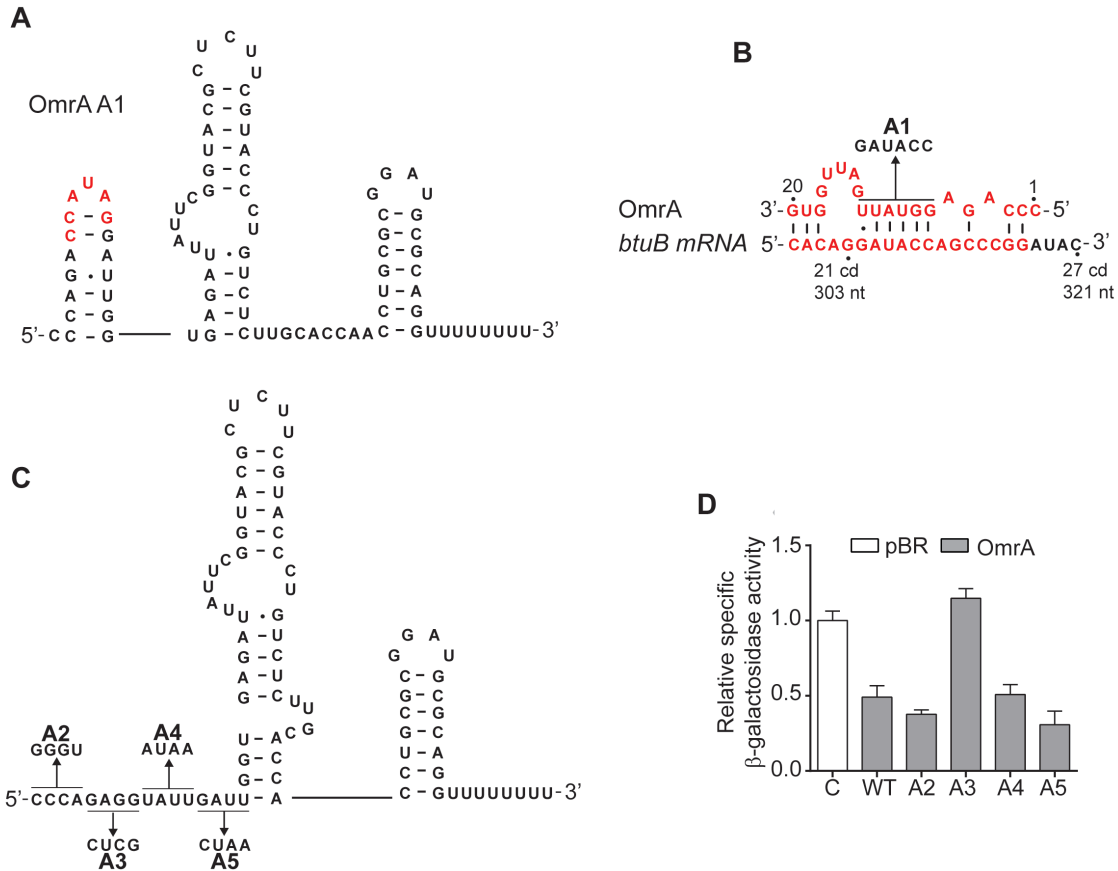


Figure 5: Nucleotides in OmrA 5' are involved in pairing to *btuB*
(A) Mfold analysis of OmrA A1 mutant structure. Note that the A1 mutant formed a stem-loop structure which sequesters the first 17th nucleotides. Mutated nucleotides are indicated in red.
(B) Pairing prediction of OmrA to *btuB* mRNA. A1 mutation used in Fig. 2C is indicated.
(C) Representation of OmrA structure and sequence. Mutations performed in D are indicated.
(D) Effect of OmrA mutants on BtuB-LacZ_{27cd} translational fusion. Bacterial cells were grown in M63 minimal medium with 0.2% glycerol. Arabinose 0.1% and IPTG 1mM were added to induce the expression of *btuB* and OmrA respectively. The empty plasmid (pBR) was used as a control. The average values of three independent experiments with standard deviation are shown. Values were normalized to the activity obtained for the strain with the empty plasmid.

Hfq facilitates OmrA pairing and contributes to *btuB* translation repression

To understand the contribution of Hfq in *btuB* regulation (Fig. 1B), we performed electrophoretic mobility shift assays (EMSA) (Fig. 2E) using different *btuB* RNA fragments as a way to define the Hfq binding site. Increasing concentrations of *btuB* mRNA fragments (Fig.

2A) were incubated with radiolabeled OmrA in the absence or presence of an equimolar ratio of Hfq (10 nM), allowing an efficient OmrA migration shift when incubated with *btuB* (Supplementary Fig. 6A).

For F1 and F4 *btuB* fragments, we observed the appearance of a significant slower mobility shift in OmrA migration at high *btuB* concentrations (Fig. 2E and Supplementary Fig. 6B), which corresponds to an OmrA-*btuB* complex. However, when OmrA was incubated in presence of Hfq, we observed two slower mobility shifts corresponding to an OmrA-Hfq complex. This result is in accordance with previous EMSA experiments¹². Interestingly, the addition of *btuB* resulted in the formation of a complex between OmrA/*btuB*/Hfq for both F1 and F2 fragments. Importantly, this complex is formed at low *btuB* concentrations, indicating that Hfq stabilized the formation of the OmrA-*btuB* complex. As expected, when incubating radiolabeled OmrA with increasing concentration of F3 and F4 fragments, which does not encompass the pairing site region, complexes OmrA/*btuB* or OmrA/*btuB*/Hfq were unable to form. Hence, the presence of the *btuB* pairing site region is essential for the OmrA/*btuB*/Hfq association.

Using EMSA, we next determined whether Hfq could bind to *btuB* RNA. In these experiments, 5' radiolabeled *btuB* RNA fragments (F1, F2, F3 and F4) were incubated with increasing concentrations of Hfq (Fig. 2F). Our data indicated that Hfq efficiently binds to *btuB* mRNA fragment F1 and F2, but not F4, and can also interact to a lower extent with the F3 fragment. These data clearly suggested that Hfq directly interacts with the *btuB* mRNA within the portion + 161 and + 321 nt.

Interestingly, the Figure 2E shows that the addition of *btuB* RNA F1, F2 and F3 (but not F4) is correlated to an increase of OmrA unbound fraction. These results suggested that *btuB* displaces Hfq from OmrA. Such a phenomenon has been previously observed^{17,18}. Typically, Hfq proximal face binds the sRNA *via* the U-rich track of the transcriptional terminator and the distal face binds mRNA *via* an A-rich sequence^{19,20}. However previous data suggest that both RNAs can compete for the binding of the same Hfq site¹⁷.

To further define the Hfq binding site on *btuB* mRNA, we next performed foot-printing experiment (Fig. 2F). A radiolabelled *btuB* mRNA fragment (from + 161 to + 321) was incubated with increasing concentrations of Hfq, followed by a partial digestion with lead acetate²¹. This reagent cleaves the RNA backbone in linear and accessible regions. An Hfq-

dependent protection was observed across the region + 234 to + 254 of the *btuB* mRNA, which corresponds to an A-rich region. This observation is in agreement with the propensity of Hfq to bind mRNA on poly(A) RNA sequences²⁰. Strikingly, the Hfq binding site overlaps the *btuB* AUG start codon, suggesting that Hfq itself could repress *btuB* translation initiation. Taken together our data suggest a regulatory mechanism where OmrA, helped by Hfq, pairs to the *btuB* coding sequence. In such a mechanism, Hfq would play a critical role in the regulation since its binding site overlaps with *btuB* translation initiation codon. This suggests that Hfq could block by steric hindrance ribosome access to *btuB* mRNA.

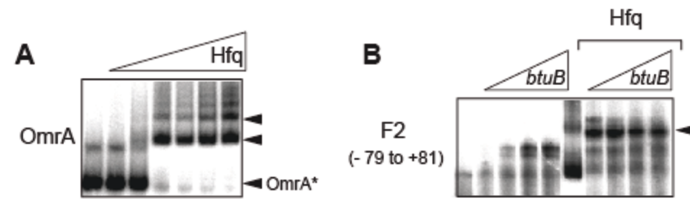


Figure S6: Gel shift mobility assays of OmrA/Hfq and OmrA/*btuB*/Hfq
(A) OmrA/Hfq binding assays. 5' end labeled OmrA RNA fragment (approximately 10nM final concentration) were incubated with increasing concentration of the purified Hfq protein (0nM, 2.5nM, 5nM, 10nM, 25nM, 50nM 100nM). Arrows on the right of the gel show unbound radiolabeled OmrA when indicated OmrA* or the shift corresponding to OmrA/Hfq complex. **(B)** OmrA/*btuB* *in vitro* binding assays. 5' end labeled OmrA (approximately 10nM final concentration) were incubated with increasing concentration of unlabeled *btuB* RNA F2 fragment (0nM, 1nM, 10nM, 50nM, 100nM) with or without 10nM Hfq. The F2, F3 and F4 fragment designed are represented in A. Note that to have a better separation, migration was longer than in Fig. 2E. Arrows on the right of gels show the shift corresponding to an OmrA/Hfq/*btuB* complex.

The *btuB* mRNA control mediated by the AdoCbl riboswitch is different from OmrA

Previous reports have shown that the *btuB* riboswitch acts at a translational level^{4,6}. In addition, regulatory elements located within the *btuB* ORF trigger mRNA decrease upon ligand binding^{6,7}. Since the riboswitch and OmrA modulate *btuB* mRNA levels, it provides a unique system to determine how both regulatory inputs control mRNA decay. In this effort, we further characterized riboswitch-mediated *btuB* regulation.

We first examined by Northern blot experiments the effect of AdoCbl on *btuB* mRNA levels in the context of the wild-type, *hfq* and *rne-131* mutant strains (Fig. 3A). In these three strains, the *btuB* mRNA levels dramatically decreased subsequently to AdoCbl addition in the growth medium. This observation showed that conversely to the OmrA mechanism, the RNA degradosome and the Hfq chaperone are not essential for the AdoCbl-mediated mRNA decay. We next attempted to define the minimal regulatory region allowing an AdoCbl-dependent mRNA decay using β -galactosidase assay. As previously described (Fig. 1B and 1C), we performed transcriptional and translational fusions with various portions of the *btuB* mRNA fused to the *lacZ* reporter gene (Fig. 3B and 3C). When using transcriptional fusions containing 70 or 27 cd, we observed a significant AdoCbl-induced repression of ~80 and ~41 %, respectively. In contrast, the repression is largely reduced with a fusion containing of 15 cd (~9 %) and AdoCbl does not repress the expression of a fusion of 10 or 6 cd (Fig. 3B). However, translational fusions containing 70 and 6 cd exhibited ~90 % decrease in β -galactosidase activity when adding AdoCbl (Fig. 3A). Hence, while the first 6 *btuB* cd are sufficient for the riboswitch translational control, the mRNA level regulation requires at least 27 cd. Importantly, since the *btuB* region necessary for OmrA-dependent mRNA control occurs between the 70th and 140th codons, it supports the idea that OmrA and the *btuB* riboswitch employ different mechanisms to regulate *btuB* mRNA levels. However, it is worth noting that OmrA-dependent and riboswitch translational regulation occur in the same region, within the first 27 codons of *btuB* ORF.

Our results are consistent with studies of Kadner indicating that the first 25 cd of *btuB* ORF are necessary and sufficient to trigger AdoCbl-dependent *btuB* mRNA decrease⁶. Their data also showed that translation repression is a prerequisite for *btuB* mRNA decrease. However, regardless of the translational arrest, it is unclear whether the mRNA degradation depends on the *btuB* riboswitch sequence or structure. To investigate this point, we employed the TPP-sensing *thiM* riboswitch of *E. coli* that was known to strictly control translation initiation^{22,23}. We first assayed a translational ThiM-LacZ fusion containing only 6 *thiM* codons and observed a strong repression in presence of TPP (Fig. 3D). As expected, no TPP-dependent repression was detected when using a *thiM-lacZ* transcriptional fusion, consistent with the *thiM* riboswitch not modulating mRNA levels. However, inserting a sequence corresponding to *btuB* codons 2 to 70 downstream of the *thiM* sequence significantly reduced the β -

galactosidase activity in presence of TPP but not with AdoCbl (Fig. 3E). These data indicate that *btuB* mRNA control does not rely on riboswitch identity but rather on inhibiting translation initiation. We also performed the same experiment with a sequence corresponding to codon 2 to 27 of *btuB* ORF that we added downstream of *thiM*. Based on our previous results (Fig. 3C), the *btuB* sequence employed here would be sufficient to observe an mRNA repression. Nevertheless, β -galactosidase activity of this transcriptional fusion is unaffected by the TPP and, evidently, neither by AdoCbl. Therefore, the AdoCbl-dependent regulation observed for the *btuB-lacZ*_{27cd} transcriptional fusions depends on structures or sequences located upstream the 2th codon.

Results presented above indicated that there are, at least, two different RNA elements independently controlling *btuB* mRNA decay upon ligand binding. One is located upstream the 27th codon and the other downstream, between the 27th and 70th codon. Kadner and coworkers showed that the first 25 *btuB* codons were required to decrease *btuB* mRNA levels upon AdoCbl binding. In addition, they also proposed that the stem-loop structure within the first 27 *btuB* codons could be involved as a transcriptional attenuator (Fig. 2A). Our data are consistent with such propositions since the AdoCbl-dependent repression is completely abolished in a transcriptional fusion in which the stem-loop is truncated (*btuB-lacZ*_{15cd}) (Fig. 3B). However, mutating the 4 U-stretch (+380 to +383) following the stem-loop did not alter the regulation, thus indicating that it is probably not a Rho-independent terminator (Supplementary Fig. 7). We next speculated that the stem-loop could serve as a Rho-dependent transcriptional terminator. We performed β -galactosidase experiments with the *btuB-lacZ*_{27cd} transcriptional fusion in presence of bicyclomycin, which inhibits Rho-translocation activity (Fig. 3F). We observed no difference in the AdoCbl-induced mRNA decrease in presence or absence of bicyclomycin. Therefore, the regulation observed within the first 27 cd of *btuB* ORF does not rely on a transcriptional terminator but most likely only on endoribonuclease activity. When performing the same experiment with a transcriptional fusion of 70 cd, we observed a significant loss of repression in presence of bicyclomycin. This result suggests that the regulation observed between the first 27th and 70th cd relies on a Rho-dependent terminator. Therefore, the AdoCbl-dependent *btuB* mRNA decrease is dependent on both mRNA decay and Rho-dependent termination (Fig. 3G).

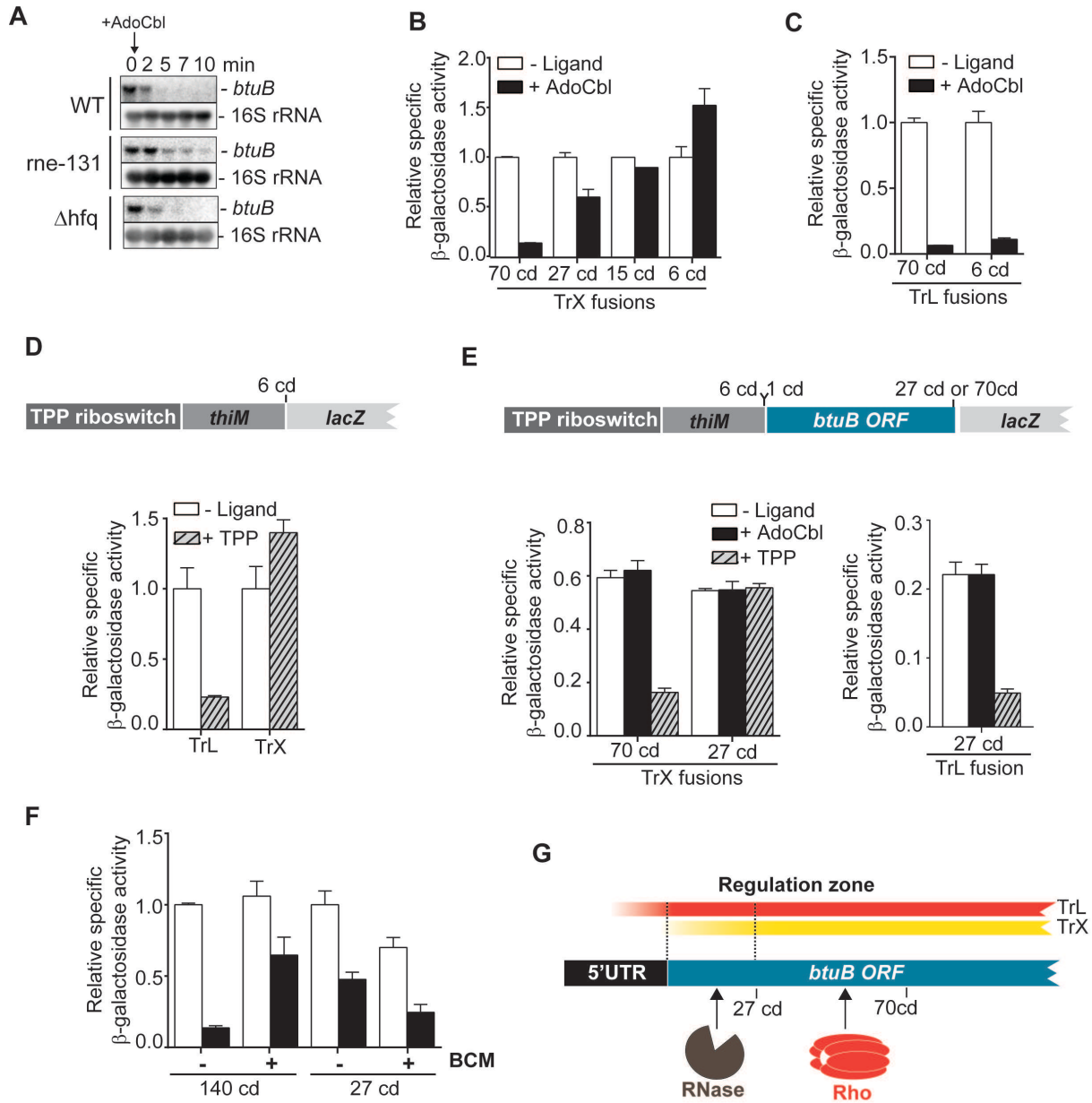


Figure 3: AdoCbl riboswitch controls *btuB* mRNA decay differently to OmrA

(A) Northern blot analysis of the *btuB* mRNA level after the addition of AdoCbl ligand, in the wild type strain, the *rne-131* strain and the *hfq* mutant strain. Cells were grown to midlog phase in M63 minimal medium with 0.2% glucose at 37°C, and total RNA was extracted at the indicated times immediately before (0) and after (2,5,7,10 min) the addition of AdoCbl 5 μ M. The probe was designed to detect the *btuB* mRNA. 16S was used as a loading control. (B, C) β -Galactosidase assays of translational BtuB-LacZ (B) and transcriptional *btuB-lacZ* (C) fusions containing various *btuB* lengths ORF. Enzymatic activities were measured in the absence and presence of AdoCbl. The number of *btuB* codons is indicated below the histograms. Values were normalized to the activity obtained in absence of AdoCbl. The average values of three independent experiments with standard deviation are shown. (D) Effect of TPP on β -Galactosidase activity of translational (TrL) and transcriptional (TrX)

thiM-lacZ fusions. The first 6 cd of the *E. coli thiM* riboswitch were fused to *lacZ* reporter gene. A schematic representation of the construct is shown above the graph. **(E)** Effect of AdoCbl and TPP on β -Galactosidase activity of transcriptional (TrX) and translational (TrL) *btuBthiM-lacZ* fusions. The *E. coli thiM* riboswitch (6 cd) is fused to *btuB* region from the 2^d to the 27th cd (27 cd) or from the 2^d to 70th cd (70 cd). A schematic representation of the construct is shown above the graph. For B, C and D, values were normalized to the enzyme activity obtained without ligand. The average values of three independent experiments with standard deviations are shown. **(F)** β -Galactosidase assays of transcriptional *btuB-lacZ* fusions of 27 cd or 70 cd. Enzymatic activities were measured in the absence or presence of 5 μ M AdoCbl and with (+) or without (-) 25 μ g/mL bicyclomycin (BCM). Values were normalized to enzymatic activity obtained for wild-type constructs without ligand and BCM. The average values of three independent experiments with standard deviation are shown. **(G)** Representation of AdoCbl mediated regulation on the *btuB* mRNA. Upon ligand binding to the riboswitch, the region between 6 and 27 cd is targeted by an unknown endoribonuclease (RNase) and the region between 27 and 70 cd allows Rho-dependent termination. Translational (TrL) and (post-) transcriptional (TrX) regulation zones are represented by the color gradient.

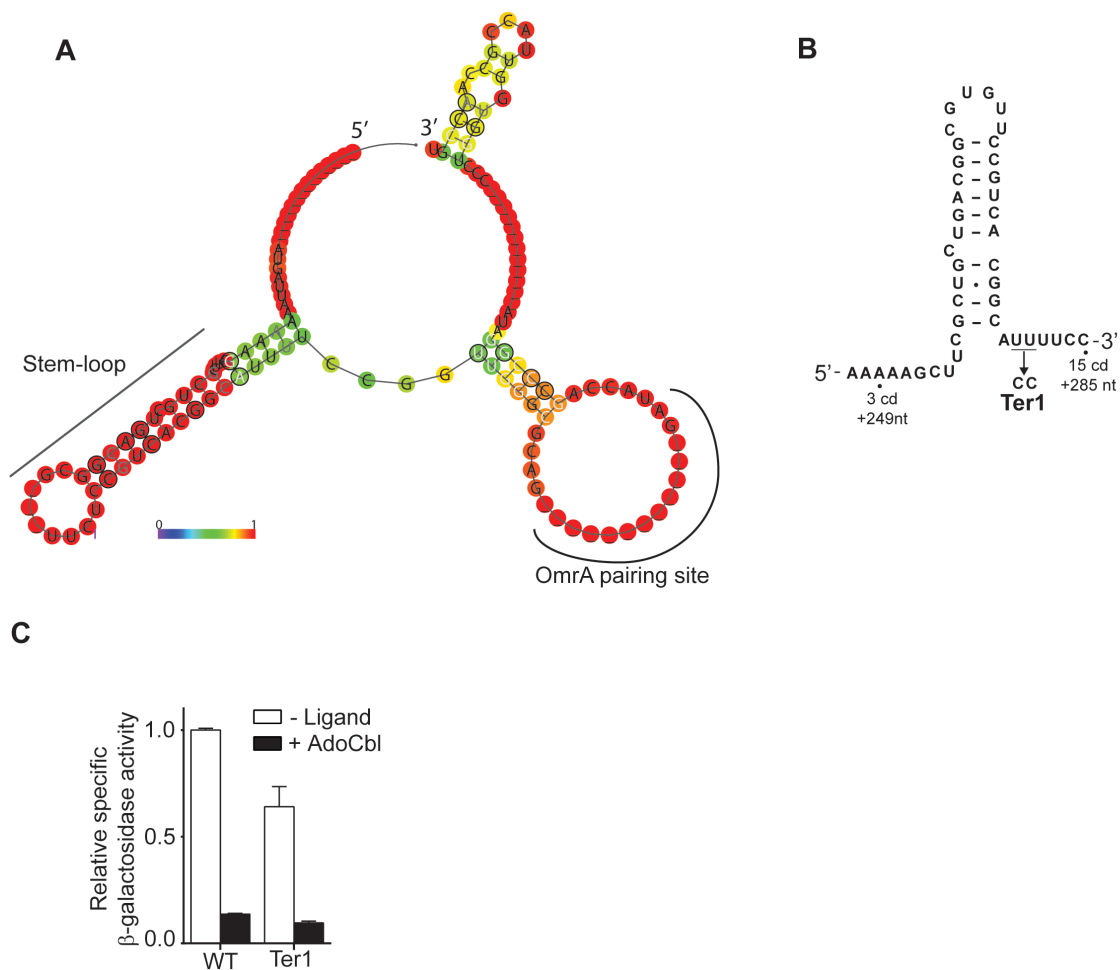


Figure 7: The conserved stem-loop structure is not a transcriptional terminator

(A) RNAalifold analysis of the beginning of the *btuB* ORF. The analysis was done from the ClustalW alignment of 13 *btuB* sequences from different species. The conserved stem-loop structure and OmrA pairing site are indicated. (B) Representation of the sequence and structure of the beginning of *btuB* ORF. The sequence encompasses nucleotides from +247 to +285. Mutation performed in C is indicated. (C) Effect of AdoCbl on transcriptional *btuB-lacZ*_{27cd} fusions containing mutation term1. The average values of three independent experiments with standard deviation are shown. Values were normalized to the activity obtained for the WT construct in absence of AdoCbl.

Interrelationship between the riboswitch and OmrA-mediated *btuB* regulation

Remarkably, OmrA and riboswitch regulation occur both in the first 27 *btuB* codons. This observation prompted us to examine the interrelationship between both regulation mechanisms. We engineered BtuB-LacZ_{27cd} translational fusions containing mutations in the riboswitch expression platform to stabilize either the riboswitch OFF or ON structure (Fig. 4A). The EP1 mutant was designed to destabilize the anti-sequestering stem (Fig. 4A, Supplementary Fig. 1B), which is important for the ON state riboswitch conformation. We also introduced mutations to destabilize the riboswitch kissing-loop interaction (EP2) and the SD sequestering stem (EP3 and EP4).

Very low β -galactosidase activity was obtained for EP1 in the absence of ligand and OmrA, most likely because translation initiation is inhibited due to the riboswitch OFF structure (Fig. 4B). Despite this, the repression level was preserved in presence of OmrA. Interestingly, while the EP2 mutant did not allow AdoCbl-dependent regulation, the presence of OmrA significantly decreased the *btuB* expression. Furthermore, disruption of the SD sequestering loops with either EP3 or EP4 mutants did not alter OmrA regulation, but prevented AdoCbl-dependent regulation in the case of EP3 (Fig. 4A, Supplementary Fig. 1B). It should be mentioned that preventing the formation of the SD sequestering stem could facilitate OmrA regulation since the Hfq binding site overlaps with *btuB* TIR.

Our results suggest that the region between 6 and 27 cd of *btuB* transcript is crucial for OmrA translational control (Fig. 2B) and AdoCbl-dependent mRNA modulation (Fig. 3B). Both regulatory sites overlap and *btuB* structural elements located in this region could influence the efficiency of both mechanisms. The beginning of the *btuB* ORF contains an A-rich sequence where Hfq binds (Fig. 2A and 2G) followed by a conserved stem-loop structure that was

proposed to be a transcriptional attenuator⁸ (Fig. 2A, Supplementary Fig. 7). To investigate the importance of these elements in the AdoCbl and OmrA mediated regulation, we constructed translational and transcriptional fusions of 27 cd containing various mutation of *btuB* ORF (Fig. 4D and 4E). Note that the β -galactosidase activity of *btuB-lacZ*_{27cd} transcriptional fusions was not measured with OmrA since we have shown that the sRNA does not affect the expression of this construct (Fig. 1E).

Mutation of the A-rich sequence (H1) exhibited a low level of β -galactosidase activity irrespectively of the presence OmrA or AdoCbl. Such A-rich regions located downstream of the translation initiation codon have been previously reported to enhance translation efficiency giving a reasonable explanation for the low expression of H1 mutant^{24,25}. We next mutated the conserved stem-loop structure by removing (SL(Δ)), stabilizing (SL1-2) or destabilizing the stem (SL1; Fig. 4C). β -galactosidase activities of translational fusions showed a substantial loss of OmrA-mediated regulation only with the Δ SL mutation. Furthermore, the mRNA repression exerted by AdoCbl is also affected with the Δ SL mutation (Fig. 4E). This result is consistent with the stem-loop being involved in the *btuB* mRNA control upon ligand binding. The SL1 mutation was expected to destabilize the stem but Mfold analysis indicate that a shorter stem-loop structure of 7 based pairs (instead of 10) can still be formed. This observation provides an explanation to the significant repression in presence of AdoCbl and OmrA for the translational and transcriptional SL1 mutant (Fig. 4D and E).

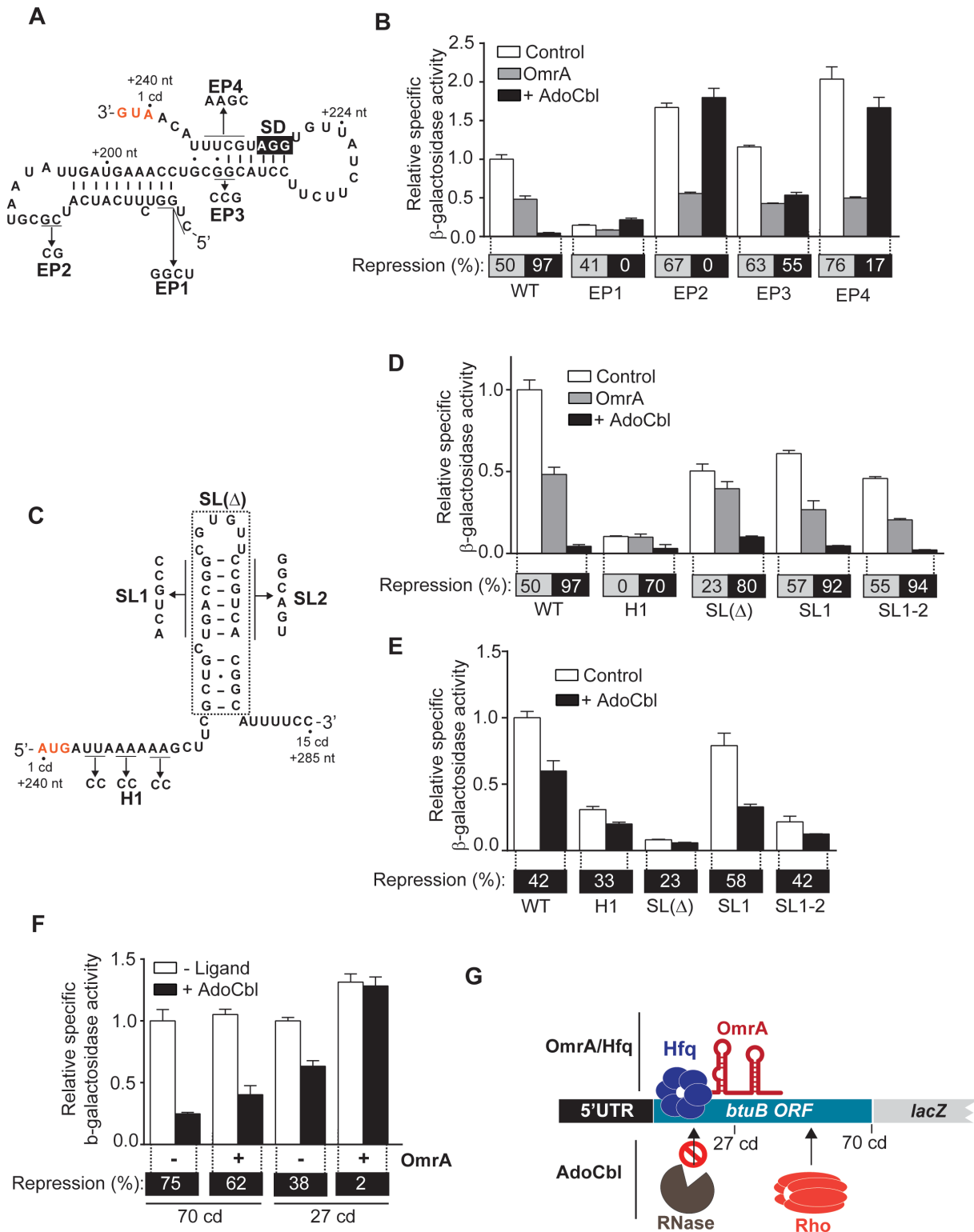


Figure 4: OmrA and riboswitch mediated *btuB* regulation are independent

(A) Representation of the sequence and structure of the *btuB* riboswitch expression platform (OFF state) encompassing nucleotides +172 to +240 (1st cd). Mutations employed in B are indicated. (B) Effect of OmrA expression and AdoCbl on translational BtuB-LacZ_{27cd} fusions.

Experiments were performed with the non-mutated *btuB* sequence (WT) or mutants indicated in A. The percentages of repression for OmrA (grey box) or AdoCbl (black box) compare to the control (empty plasmid, without ligand) are indicated (C) Representation of the sequence and structure of the *btuB* ORF encompassing nucleotides + 240 (1st cd) to +285 (15th cd). Mutations employed in D and E are indicated. (D) Effect of OmrA expression and AdoCbl on translational *BtuB-LacZ_{27cd}* fusions. Experiments were performed with the non-mutated *btuB* sequence (WT) or mutants indicated in C. The percentages of repression for OmrA (grey box) or AdoCbl (black box) compare to the control (empty plasmid, without ligand) are indicated (E) Effect of AdoCbl on transcriptional *btuB-lacZ_{27cd}* fusions. Experiments were performed with the non-mutated *btuB* sequence (WT) or mutants indicated in C. The percentages of repression with AdoCbl (black box) compare to the control (empty plasmid, without ligand) are indicated (F) Concomitant effect of OmrA expression and AdoCbl on transcriptional *btuB-lacZ_{27cd}* and *btuB-lacZ_{70cd}* fusions. The percentages of repression with AdoCbl (black box) compare to the control (empty plasmid, without ligand) are indicated. For B, D, E and F the average values of three independent experiments with standard deviation are shown. Values were normalized to the activity obtained for the strain harboring the WT fusion with the empty plasmid in absence of AdoCbl. (G) Proposed model explaining the loss of regulation observed in F for the transcriptional *btuB-lacZ_{27cd}* in presences of both OmrA and AdoCbl. The binding of Hfq and OmrA within the first 27 cd of *btuB* ORF prevents the degradation of *btuB* mRNA in presence of AdoCbl. However, when using *btuB-lacZ_{70cd}* AdoCbl induced Rho-termination occurs in presence of OmrA/Hfq within the region between 27 and 70 cd.

OmrA and AdoCbl promote independent regulatory mechanisms

The beginning of the *btuB* ORF is decisive for both OmrA-mediated translational regulation and AdoCbl-controlled mRNA decay (Fig. 2B and Fig. 3B). OmrA and Hfq interact with this region to block ribosomes access while upon AdoCbl binding to the riboswitch the same *btuB* region would be targeted by an endoribonuclease. Based on these observations, we next investigated the *btuB* mRNA regulation when OmrA is expressed in presence of AdoCbl. To do so, we first employed a *btuB-lacZ_{27cd}* transcriptional fusion for which we observed gene repression only in presence of AdoCbl but not OmrA (Fig. 1D and Fig. 3B). As expected, we observed a~38% of repression in presence of AdoCbl (Fig. 4F). In contrast, when expressing OmrA, the AdoCbl-dependent repression was significantly perturbed, suggesting that OmrA expression clearly interfered with the AdoCbl-dependent regulation. However, since OmrA downregulates the expression of *btuB*, which encodes an AdoCbl transporter, this can consequently decrease the intracellular concentration of AdoCbl and affect *btuB-lacZ_{27cd}* fusion expression. Also, the direct interaction of OmrA/Hfq with the beginning of the *btuB*

ORF could block the access of a putative RNase involved in the AdoCbl-dependent mRNA decay. To determine which effect is predominant, we next employed a *btuB-lacZ*_{70cd} transcriptional fusion. This construct is of particular interest because our previous experiments suggested that a Rho-dependent termination occurs between the 27th to 70th cd in an AdoCbl-dependent manner. We thus reasoned that if OmrA prevented AdoCbl import, we should not observe a repression of expression of the *btuB-lacZ*_{70cd} construct. However, this latter fusion exhibited a ~75% of repression in presence of AdoCbl and ~62% in presence of AdoCbl and OmrA (Fig. 4F), indicating that the AdoCbl intracellular concentration is most likely sufficient to repress *btuB* expression in presence of OmrA. Hence, the interaction of OmrA and Hfq with the first nucleotides of the *btuB* ORF prevents the AdoCbl dependent cleavage in this region (Fig. 4G). This result agrees with the idea that the first nucleotides of *btuB* ORF are important for OmrA and AdoCbl-dependent regulation (Fig. 4G). Thus, our results show that the presence of OmrA does not inhibit the AdoCbl-dependent regulation indicating that both mechanisms are independent.

DISCUSSION

The regulation of *btuB* gene expression provides a remarkable system to compare sRNA and riboswitch-mediated regulation. So far, the underlying mechanism of such a dual control mechanism involving two ncRNAs classes has never been reported. Such a system is most likely widespread among bacteria since *Listeria monocytogenes* contains a sRNA that has recently been suggested to control *pfrA* expression that is also regulated by a thermosensor²⁶. Herein we show that the sRNA OmrA and the AdoCbl riboswitch control translation of *btuB* mRNA (Fig. 5). Both regulations are accompanied by a decrease of *btuB* mRNA levels. However, our findings indicate that considerably different downstream regulatory pathways are involved in OmrA and AdoCbl riboswitch mechanisms (Fig. 5).

We have shown that the sRNA OmrA controls *btuB* translation and mRNA decay. In contrast to the typical sRNA mechanism targeting the mRNA 5' UTR, OmrA pairs at the beginning of *btuB* ORF, 64 nucleotides downstream of the AUG start codon (Fig. 5B). This unconventional mechanism cannot readily explain how OmrA inhibits translation since the pairing site is distant from the TIR. However, our data indicate that Hfq could play a key role in the regulation. From our Northern blot experiments, it is clear that *btuB* regulation is dependent on Hfq (Fig. 1B). *In vitro* experiments indicated that the binding site of Hfq on *btuB* mRNA overlaps the AUG start codon and a downstream A-rich sequence. The latter sequence appears decisive for OmrA-mediated regulation but also for *btuB* translation efficiency. This observation is consistent with previous studies suggesting that such A-rich elements downstream of the start codon are a common feature for several bacterial mRNA and promote the translation initiation complex formation^{24,25,27,27}. Therefore, Hfq binding on *btuB* mRNA rather than OmrA pairing is most likely directly responsible of translation inhibition. The model proposed below is consistent with two recent discoveries highlighting the direct function of Hfq in sRNA-mediated translation regulation. In the first study, Desnoyers *et al.* reported a mechanism where the sRNA Spot42 recruits and drives Hfq in vicinity of the *sdhC* mRNA TIR. Hfq itself blocks ribosomes association by steric hindrance while the sRNA pairing site is far upstream of the TIR²⁸. In the second study, Rice *et al.* found that the sRNA SgrS pairs downstream of the *manX* mRNA start codon and blocks translation^{29,30}. Although

they did not elucidate the mechanistic details of the regulation, a footprinting experiment suggested that Hfq structurally modifies the SD region and thus possibly interferes with the mRNA translation.

This last study is particularly relevant in light of our results since SgrS, similarly to OmrA, pairs downstream of the regulated mRNA translation initiation codon. Only one other similar case has been reported in which the sRNA RybB pairs 5 nt downstream of the translation start site and directly blocks ribosome association to the mRNA³¹. Note that the location of the SgrS and OmrA pairing sites differ from RybB since both are farther from the start codon (17 nt and 64 nt respectively). Such a distance probably justifies the requirement of Hfq to inhibit translation initiation.

Interestingly, a recent study indicated that the position and orientation of the Hfq binding site influence sRNA pairing³². Accordingly, sRNA annealing is facilitated when Hfq binding site is localized in the vicinity and downstream of the pairing site. In our model, Hfq binding site is upstream and remote from OmrA pairing region suggesting that OmrA-mediated *btuB* regulation is not optimal. However, RNAalifold analysis indicated the presence of conserved structures at the beginning of *btuB* ORF that might compensate the distance (Supplementary Fig. 7). The linear Hfq binding region is followed by a first stem-loop structure of 10 base pairs that appear important for OmrA regulation (Fig. 4D). Ten nucleotides downstream, another stem-loop structure of 6 base pairs could potentially be formed. Strikingly, this latter structure exhibits a large loop of 11 nt encompassing the seed of OmrA pairing site. This RNA conformation can probably give enough flexibility to allow both the annealing of the sRNA and brings closer the Hfq binding region.

In line with these observations, our EMSA experiments suggested that Hfq helps OmrA pairing to *btuB* mRNA. This mechanism is expected. However, efficient OmrA annealing seems useless if the sRNA does not directly interfere with *btuB* translation. A straightforward manner to conciliate both is to consider Hfq/OmrA as one complex in which OmrA has the recognition specificity and Hfq the effector function, where each component cannot act without the other.

Our Northern blot and β -galactosidase experiments show that in addition to the translational control, OmrA drives *btuB* mRNA decay. The degradation process involves the RNA degradosome complex, which cleaves between the 70th and 140th cd of *btuB* ORF. The

degradosome cleavage site is more than 130 nt downstream from OmrA pairing site. Such a regulation in a remote region from the pairing site has been previously reported^{33,34}. For instance, RhyB sRNA blocks translation initiation of *sodB* mRNA and induces an RNA cleavage more than 350 nt upstream its pairing site³⁵. Together with our data, sRNA-induced cleavage at a distal region from the pairing site appears to be a common mechanism. Recent studies indicated that RNase E can interact with polyribosomes and the sRNA/Hfq complex^{36,37}. It is currently proposed that the RNA degradosome associated with sRNA/Hfq complex pass through the interaction with polyribosomes to detect its cleavage site on the target mRNA³⁷. We can envisage that once OmrA/Hfq complex interacts with *btuB* mRNA, RNase E remains associated with the ribosome until it encounters its cleavage site in the region 70 to 140 cd.

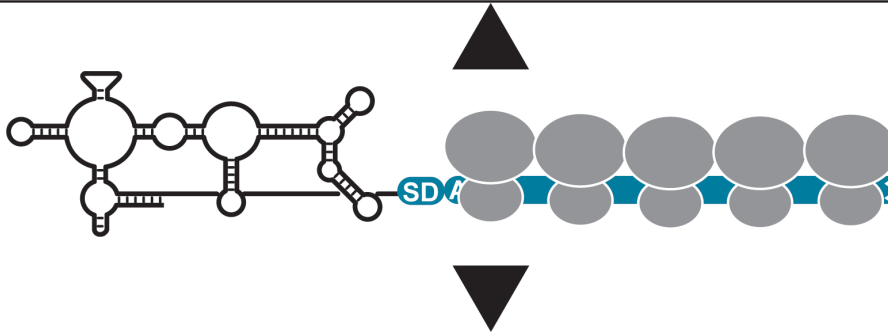
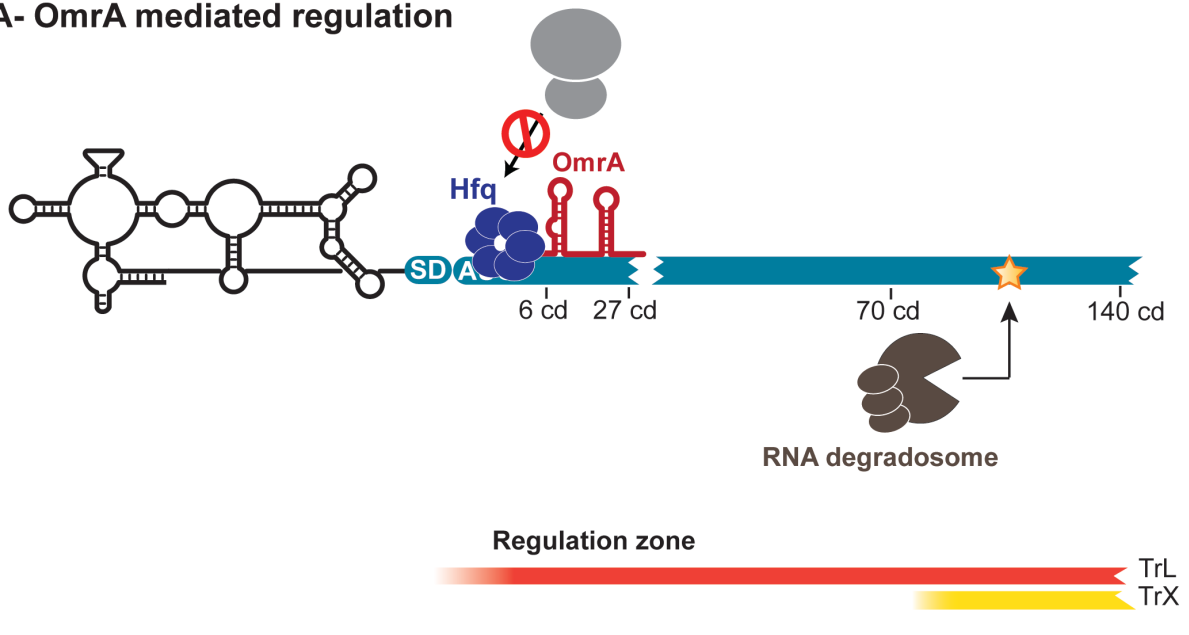
Interestingly the control of the mRNA exerted by the riboswitch is considerably different from the one employed by the sRNA. It has been reported that the AdoCbl riboswitch inhibits translation initiation of the *btuB* gene by sequestering the SD sequence in a stem-loop structure^{4,6}. Kadner and coworkers have previously investigated the mRNA regulation following the translational arrest⁶⁻⁸. They have shown that the first 25 cd are sufficient to destabilize the *btuB* mRNA in presence of ligand⁸. They also proposed that the conserved stem-loop structure at the beginning of the *btuB* ORF could act as a transcriptional attenuator. Our results suggest that no AdoCbl-dependent transcriptional arrest occurs within the first 27 cd of *btuB* ORF thus suggesting a mechanism relying on an endoribonucleolytic cleavage (Fig. 5A). Based on the study of Nou and Kadner showing that AdoCbl destabilizes already transcribed *btuB* mRNAs, we proposed that the riboswitch regulation can be performed in a post-transcriptional manner⁶. Interestingly, the first 27 cd codon of *btuB* ORF are also involved in OmrA-mediated translational regulation. Our results suggest that OmrA/Hfq interaction with *btuB* mRNA blocks endoribonuclease access to the first 27 cd of *btuB* mRNA in presence of AdoCbl but has only a slight impact on AdoCbl-dependent regulation occurring within the region 27 to 70 cd. Our β -galactosidase assays in presence of bicyclomycin indicated the presence of a Rho-termination site in this latter region, which is important for the AdoCbl-dependent mRNA regulation, in contrast to the regulation initiated by OmrA (Fig. 5A). This result is of particular interest because it shows that the riboswitch-

mediated regulation can occur in a co-transcriptional manner, and inversely, it suggests that OmrA-mediated regulation occurs post-transcriptionally.

sRNA were previously assumed to act post-transcriptionally but a recent study of Bossi *et al.* pointed out that a sRNA pairs to its target mRNA in a co-transcriptional manner since it leads to Rho-dependent transcriptional termination³⁸. In theory, no evidence excludes the possibility that a sRNA could interact with its mRNA target as soon as the pairing site emerges from the transcriptional elongation complex. Although *btuB* mRNA levels can be controlled in a Rho-dependent manner, OmrA pairing does not induce this pathway thus suggesting that some factors prevent its association during the transcriptional process or limit its action.

Despite the conformation of the riboswitch influences the amplitude of regulation by OmrA, our results indicate that both mechanisms act independently (Fig. 4). Since OmrA pairing site is located in the *btuB* ORF, it implies that in other organisms OmrA could regulate the translation of *btuB* mRNAs that are not controlled by an AdoCbl riboswitch. In addition, differences between OmrA and the riboswitch-mediated regulations could be determinant for regulation efficiency in function of cellular needs. Even if the comparison is not fully rigorous, assuming that AdoCbl and OmrA are in excess in cells, we can estimate from our experiments that the regulation mediated by the riboswitch is more efficient than the one mediated by OmrA. This phenomenon is easily understandable by the fact that OmrA control needs to bypass ribosomes barrier and occurs in a post-transcriptional manner. Conversely, the riboswitch-mediated regulation occurs in a co-and post-transcriptional manner and upstream the *btuB* ORF. A physiological interest to such discrepancy is that it would be a waste of energy for the cell to synthesize *de novo* the BtuB protein when AdoCbl is abundant. However, when OmrA is expressed, the cell needs to reach an equilibrium in which the amount of BtuB protein is not deleterious and still beneficial for the metabolism. In addition, the BtuB protein is involved in the transport of AdoCbl is also responsible for the translocation of bacteriophage and the entrance of colicin E3. The expression of colicin is induced by the SOS response and various environmental stress³⁹. We can speculate that under osmotic shock or during the transition from the exponential to the stationary phase, OmrA reduces the expression of *btuB* in order to prevent colicin entrance, which would be lethal in such conditions.

A- OmrA mediated regulation



B-Riboswitch mediated regulation

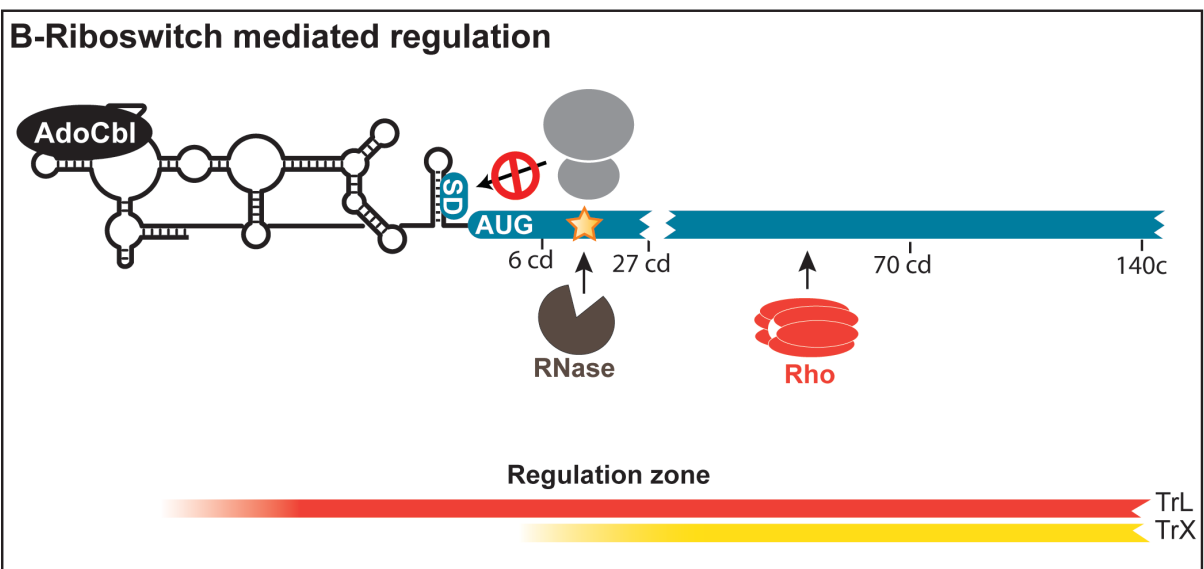


Figure 5: Proposed model describing the control of *btuB* expression by the AdoCbl riboswitch and the sRNA OmrA.

In absence of AdoCbl and OmrA, the *btuB* TIR is accessible to ribosomes, the mRNA is translated. **(A)** In presence of OmrA, the sRNA pairs to *btuB* ORF and Hfq binds on the TIR region. As a result *btuB* mRNA translation initiation is inhibited. In parallel, the RNA degradosome is recruited by the complex Hfq/OmrA and cleaves the *btuB* mRNA in a distal region between codons 70 and 140. The translational (TrL) and post-transcriptional (TrX) regulation zones are indicated. **(B)** In presence of AdoCbl, the riboswitch adopts an OFF state structure. The SD sequence is sequestered in a stem loop structure of the expression platform which blocks translation initiation. The AdoCbl regulation occurs in a co-and post transcriptional manner. During transcriptional process, the absence of ribosomes on the nascent mRNA facilitates the access of the Rho termination factor to the region 27 to 70 cd. For fully transcribed mRNA, the absence of ribosome facilitates the access of RNases to their cleavages site. The region between 6 and 27 cd is targeted by an unknown RNase.

MATERIALS AND METHODS

β-Galactosidase Assays

Strains used in the study are listed in the Supplemental Table S1. Kinetic assays for β -galactosidase experiments were performed as described previously (Caron et al. 2012) and fusions used in the study are described in the Supplemental Table S1. Briefly, an overnight bacterial culture grown in M63 0.2% glycerol minimal medium was diluted to an OD₆₀₀ of 0.02 in 50 mL of fresh medium. When required, ampicillin was added at 100 μ g/mL. The culture was incubated at 37°C until an OD₆₀₀ of 0.1 was obtained. Arabinose (0.1%) was then added to induce the expression of *lacZ* constructs. IPTG (1mM) was added to induce the expression of OmrA or OmrB inserted in the pBr plasmid when indicated. AdoCbl (5 μ M) was added where indicated. β -galactosidase experiments determining Rho factor involvement were performed in 3 mL of culture media as described above. Bicyclomycin (25 μ g/mL) was added where indicated.

Northern Blot analysis

Bacterial cultures were grown at 37°C in M63 0.2% glycerol minimal medium to midlog-phase (OD₆₀₀ of 0.5). When required, ampicillin was added at 100 μ g/mL. Cells were then centrifuged and resuspended with sterile water, and total RNA was extracted immediately using the hot phenol method¹. AdoCbl (5 μ M) or 0.1% of arabinose was added at the indicated time to induce the expression of OmrA and OmrB inserted in the PNM12 plasmid. Northern blot experiments for the detection of *btuB* were performed in 1% agarose gel as described previously³⁵. Northern blot experiments for the detection of OmrA and OmrB were performed in 5% acrylamide gel as described previously¹. Probes were generated by PCR followed by *in vitro* transcription with radiolabeled UTP. The *btuB* probe targets the region +110 to +330. 5' radiolabeled DNA oligonucleotides were used to detect OmrA and OmrB sRNA. Note that these probes were designed to discriminate both sRNA by targeting their central region.

RNA in vitro transcription and labelling

Unlabeled RNA were transcribed *in vitro* from a PCR product with purified T7 polymerase as previously described³⁵. After 3 hours of incubations at 37°C, RNA were precipitated with ethanol then purified from an acrylamide 8% Urea 8M gel and eluted in Millipore water at 4°C overnight. RNA were precipitated before used with ethanol 100%, sodium acetate 50mM, 0.1% glycogen.

Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Prior to the experiment RNA were denature 5 min at 65°C and then slow cool up to 37°C. 5' Radiolabeled OmrA or OmrB (approximately 10nM final concentration) were incubated 10 min in presence or absence of 10nM of Hfq hexamer in solution in a protein buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.25 M NH₄Cl, 10% glycerol). sRNA were then mixed with unlabeled *btuB* RNA fragment (0nM, 1nM, 10nM, 50nM, 100nM) in Afonyuskin buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM magnesium acetate, 100 mM NH₄Cl, .5 mM DTT) and incubated at 37° C for 20 min. Subsequently, reaction were mixed with loading dye (1× TBE, 50% glycerol, 0.1% bromophenol blue, 0.1% xylene cyanol) and separated on native 5% polyacrylamide gel at 4°C in TBE 1X.

For gel shift performed with Hfq and *btuB* fragments, 5' Radiolabeled *btuB* RNA (approximately 10nM final concentration) were incubated 20 min in presence or absence of Hfq hexamer (0nM, 2.5nM, 5nM, 10nM, 25nM, 50nM 100nM) in solution in a protein buffer. As previously, reactions were mixed with loading dye and separated on native 5% polyacrylamide gel at 4°C in TBE 1X.

Probing experiments

5' Radiolabeled *btuB* RNA (from +218 to +321 nt) was incubated with increasing concentration of Hfq protein (0nM, 1nM, 2.5nM, 5nM, 10nM, 20nM). Structural probing experiment with lead acetate was performed as previously described³⁴.

MS2-Affinity purification coupled with RNA-seq

RNA degradosome mutant strains (*rne131*) harboring pBAD-MS2OmrA or pBAD-MS2OmrB and as control pBAD-OmrA and pBAD-OmrB were used for the MS2-affinity purification. The protocol has been details previously in the study of Lalouna et al.¹⁵.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr Alain Lavigueur for discussion and critical reading of the manuscript and the Canadian Institutes of Health Research for financial support. We thank the laboratory of Susan Gottesman for providing plasmids harboring OmrA and OmrB under the control of the pLac promoter. D.A.L. and E.M are Fonds de Recherche Santé Québec Senior Scholars.

REFERENCES

1. Caron, M. P. *et al.* Dual-acting riboswitch control of translation initiation and mRNA decay. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E3444–53 (2012).
2. Prevost, K., Desnoyers, G., Jacques, J. F., Lavoie, F. & Masse, E. Small RNA-induced mRNA degradation achieved through both translation block and activated cleavage. *Genes Dev* **25**, 385–396 (2011).
3. Dreyfus, M. Killer and protective ribosomes. *Prog Mol Biol Transl Sci* **85**, 423–466 (2009).
4. Nahvi, A. *et al.* Genetic control by a metabolite binding mRNA. *Chem Biol* **9**, 1043 (2002).
5. Perdrizet 2nd, G. A., Artsimovitch, I., Furman, R., Sosnick, T. R. & Pan, T. Transcriptional pausing coordinates folding of the aptamer domain and the expression platform of a riboswitch. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 3323–3328 (2012).
6. Nou, X. & Kadner, R. J. Coupled changes in translation and transcription during cobalamin- dependent regulation of *btuB* expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**, 6719–6728 (1998).
7. Franklund, C. V & Kadner, R. J. Multiple transcribed elements control expression of the *Escherichia coli* *btuB* gene. *J Bacteriol* **179**, 4039–4042 (1997).
8. Lundrigan, M. D., Köster, W. & Kadner, R. J. Transcribed sequences of the *Escherichia coli* *btuB* gene control its expression and regulation by vitamin B12. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 1479–1483 (1991).
9. Guillier, M. & Gottesman, S. Remodelling of the *Escherichia coli* outer membrane by two small regulatory RNAs. *Mol Microbiol* **59**, 231–247 (2006).
10. Peano, C. *et al.* Characterization of the *Escherichia coli* σ (S) core regulon by Chromatin Immunoprecipitation-sequencing (ChIP-seq) analysis. *Sci. Rep.* **5**, 10469 (2015).
11. Mika, F. & Hengge, R. Small RNAs in the control of RpoS, CsgD, and biofilm architecture of *Escherichia coli*. *RNA Biol* **11**, 494–507 (2014).
12. Holmqvist, E. *et al.* Two antisense RNAs target the transcriptional regulator CsgD to inhibit curli synthesis. *Embo J* **29**, 1840–1850 (2010).

13. Guillier, M. & Gottesman, S. The 5' end of two redundant sRNAs is involved in the regulation of multiple targets, including their own regulator. *Nucleic Acids Res.* **36**, 6781–6794 (2008).
14. Lopez, P. J., Marchand, I., Joyce, S. A. & Dreyfus, M. 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 (1999).
15. Lalaouna, D. *et al.* A 3' External Transcribed Spacer in a tRNA Transcript Acts as a Sponge for Small RNAs to Prevent Transcriptional Noise. *Mol. Cell* **58**, 393–405 (2015).
16. Rehmsmeier, M., Steffen, P., Hochsmann, M. & Giegerich, R. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA* **10**, 1507–1517 (2004).
17. Hwang, W., Arluison, V. & Hohng, S. Dynamic competition of DsrA and rpoS fragments for the proximal binding site of Hfq as a means for efficient annealing. *Nucleic Acids Res.* **39**, 5131–5139 (2011).
18. Updegrove, T., Wilf, N., Sun, X. & Wartell, R. M. Effect of Hfq on RprA-rpoS mRNA pairing: Hfq-RNA binding and the influence of the 5' rpoS mRNA leader region. *Biochemistry* **47**, 11184–11195 (2008).
19. Otaka, H., Ishikawa, H., Morita, T. & Aiba, H. PolyU tail of rho-independent terminator of bacterial small RNAs is essential for Hfq action. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 13059–13064 (2011).
20. Link, T. M., Valentin-Hansen, P. & Brennan, R. G. Structure of Escherichia coli Hfq bound to polyriboadenylate RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 19292–19297 (2009).
21. Lindell, M., Romby, P. & Wagner, E. G. H. Lead(II) as a probe for investigating RNA structure in vivo. *RNA* **8**, 534–541 (2002).
22. Rentmeister, A., Mayer, G., Kuhn, N. & Famulok, M. Conformational changes in the expression domain of the Escherichia coli thiM riboswitch. *Nucleic Acids Res* **35**, 3713–3722 (2007).
23. Serganov, A., Polonskaia, A., Phan, A. T., Breaker, R. R. & Patel, D. J. Structural basis for gene regulation by a thiamine pyrophosphate-sensing riboswitch. *Nature* **441**, 1167–1171 (2006).
24. Qing, G., Xia, B. & Inouye, M. Enhancement of translation initiation by A/T-rich sequences downstream of the initiation codon in Escherichia coli. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **6**, 133–144 (2003).

25. Etchegaray, J. P. & Inouye, M. Translational enhancement by an element downstream of the initiation codon in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **274**, 10079–10085 (1999).
26. Loh, E. *et al.* A trans-acting riboswitch controls expression of the virulence regulator PrfA in *Listeria monocytogenes*. *Cell* **139**, 770–779 (2009).
27. Brock, J. E., Paz, R. L., Cottle, P. & Janssen, G. R. Naturally occurring adenines within mRNA coding sequences affect ribosome binding and expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **189**, 501–510 (2007).
28. Desnoyers, G. & Masse, E. Noncanonical repression of translation initiation through small RNA recruitment of the RNA chaperone Hfq. *Genes Dev* **26**, 726–739 (2012).
29. Rice, J. B., Balasubramanian, D. & Vanderpool, C. K. PNAS Plus: Small RNA binding-site multiplicity involved in translational regulation of a polycistronic mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, E2691–E2698 (2012).
30. Rice, J. B. & Vanderpool, C. K. The small RNA SgrS controls sugar-phosphate accumulation by regulating multiple PTS genes. *Nucleic Acids Res.* **39**, 3806–3819 (2011).
31. Bouvier, M., Sharma, C. M., Mika, F., Nierhaus, K. H. & Vogel, J. Small RNA Binding to 5' mRNA Coding Region Inhibits Translational Initiation. *Mol. Cell* **32**, 827–837 (2008).
32. Panja, S. & Woodson, S. A. Hfq proximity and orientation controls RNA annealing. *Nucleic Acids Res.* **40**, 8690–8697 (2012).
33. Massé, E., Vanderpool, C. K. & Gottesman, S. Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**, 6962–6971 (2005).
34. Desnoyers, G., Morissette, A., Prévost, K. & Massé, E. Small RNA-induced differential degradation of the polycistronic mRNA *iscRSUA*. *EMBO J.* **28**, 1551–1561 (2009).
35. Prévost, K., Desnoyers, G., Jacques, J. F., Lavoie, F. & Massé, E. Small RNA-induced mRNA degradation achieved through both translation block and activated cleavage. *Genes Dev.* **25**, 385–396 (2011).
36. Morita, T., Maki, K. & Aiba, H. RNase E-based ribonucleoprotein complexes: Mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. *Genes Dev.* **19**, 2176–2186 (2005).
37. Tsai, Y. C. *et al.* Recognition of the 70S ribosome and polysome by the RNA degradosome in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **40**, 10417–10431 (2012).

38. Bossi, L., Schwartz, A., Guillemardet, B., Boudvillain, M. & Figueroa-Bossi, N. A role for Rho-dependent polarity in gene regulation by a noncoding small RNA. *Genes Dev* **26**, 1864–1873 (2012).
39. Cascales, E. *et al.* Colicin biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**, 158–229 (2007).
40. Prevost, K. *et al.* The small RNA RyhB activates the translation of shiA mRNA encoding a permease of shikimate, a compound involved in siderophore synthesis. *Mol Microbiol* **64**, 1260–1273 (2007).

Small RNA and riboswitch *btuB* translation inhibition modulate mRNA levels through different mechanisms

Laurène Bastet¹, Anne-Marie Lamontagne¹, Eric Masse^{2,*} and Daniel A. Lafontaine^{1,*}

¹ Department of Biology, Faculty of Science, RNA Group, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada, J1K 2R1.

² Department of Biochemistry, Faculty of Science, RNA Group, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada, J1K 2R1.

Keywords: Riboswitch, Small RNA, translation, mRNA decay.

Running title: mRNA regulation by *E. coli* riboswitches and small RNA

SUPPLEMENTAL MATERIAL

This file includes:

- Supplemental Methods
- Supplemental Tables S1 to S2
- Supplemental References

SUPPLEMENTAL METHODS

DNA oligonucleotides, Bacterial Strains and Plasmids.

DNA oligonucleotides were purchased from Integrated DNA Technologies. Strains used in this study are derived from *Escherichia coli* MG1665. Strain genotypes are listed in Supplemental Table S1. Strain DH5 α was used for routine cloning procedures (Yu et al. 2000) and BL21 (DE3) was used for overproduction of Hfq. The *btuB* transcriptional and translational fusions were constructed with the PM1205 strain as previously described (Caron et al. 2012). Mutations performed in *btuB* were made using 3 PCR steps. PCR1 and PCR2 were performed with the genomic DNA and PCR3 was performed using products of the PCR1 and PCR2 reactions. Plasmids used in this study are listed in Supplemental Table S2. pBRplacO-OmrA mutant were constructed using PCR amplified and EcoRI/BamHI digested pBRplacO plasmid as previously described ⁹. pBAD-MS2OmrA and pBAD-MS2OmrB were constructed using PCR amplified and EcoRI/SphI digested pBAD-MS2 plasmid as previously described ¹⁵.

Enzymes and chemicals

T7 polymerase and Hfq were purified as described previously ⁴⁰. The *E. coli* RNA polymerase was purchased from Epicentre. Bicyclomycin was obtained from Santa Cruz Biotech. TPP and coenzyme B12 were purchased from Sigma Aldrich.

Supplemental Table S1. Summary of strains/plasmids used in this study.

| Strains | Relevant marker | References |
|----------------|---|-----------------------------|
| BTU1 | PM1205 <i>lacI'</i> ::PBAD-BtuB _{6cd} | (Bastet et al., 2015) |
| BTU2 | PM1205 <i>lacI'</i> ::PBAD- <i>btuB</i> _{6cd} | Bastet et al., 2015 |
| BTU3 | PM1205 <i>lacI'</i> ::PBAD- <i>btuB</i> _{27cd} | Bastet et al., 2015 |
| EM1055 | MG1655 Δ <i>lacZ</i> X174 | (Masse and Gottesman 2002) |
| KP1173 | Δ <i>araB rne131 zce-726</i> ::Tn10 Hfq-3xFLAG | Masse Lab collection |
| EM1264 | EM1055 <i>hfq</i> :: <i>cam</i> | Masse Lab. collection |
| EM1377 | EM1055 <i>rne131 zce-726</i> ::Tn10 | (Masse et al. 2003) |
| PM1205 | <i>lacI'</i> ::P _{BAD} - <i>cat-sacB-lacZ</i> , mini \ddot{e} tet ^R | (Mandin and Gottesman 2009) |
| EM1047 | DH5a+ pACYC184 | Laboratory collection |
| BTU4 | PM1205 <i>lacI'</i> ::PBAD-BtuB _{140cd} | This study |
| BTU5 | PM1205 <i>lacI'</i> ::PBAD-BtuB _{70cd} | This study |
| BTU6 | PM1205 <i>lacI'</i> ::PBAD-BtuB _{40cd} | This study |
| BTU7 | PM1205 <i>lacI'</i> ::PBAD-BtuB _{27cd} | This study |
| BTU8 | PM1205 <i>lacI'</i> ::PBAD-BtuB _{21cd} | This study |
| BTU9 | PM1205 <i>lacI'</i> ::PBAD-BtuB _{10cd} | This study |
| BTU10 | PM1205 <i>lacI'</i> ::PBAD- <i>btuB</i> _{140cd} | This study |
| BTU11 | PM1205 <i>lacI'</i> ::PBAD- <i>btuB</i> _{70cd} | This study |
| BTU12 | PM1205 <i>lacI'</i> ::PBAD- <i>btuB</i> _{40cd} | This study |
| BTU13 | PM1205 <i>lacI'</i> ::PBAD- <i>btuB</i> _{27cd} | This study |
| BTU14 | PM1205 <i>lacI'</i> ::PBAD- <i>btuB</i> _{15cd} | This study |
| BTU15 | PM1205 <i>lacI'</i> ::PBAD-BtuB _{27cd} mutB1 | This study |
| BTU16 | PM1205 <i>lacI'</i> ::PBAD-BtuB _{27cd} mutH1 | This study |
| BTU17 | PM1205 <i>lacI'</i> ::PBAD-BtuB _{27cd} mutDSL | This study |
| BTU18 | PM1205 <i>lacI'</i> ::PBAD-BtuB _{27cd} mutSL1 | This study |
| BTU19 | PM1205 <i>lacI'</i> ::PBAD-BtuB _{27cd} mutSL1-2 | This study |
| BTU20 | PM1205 <i>lacI'</i> ::PBAD-BtuB _{27cd} mutEP1 | This study |
| BTU21 | PM1205 <i>lacI'</i> ::PBAD-BtuB _{27cd} mutEP2 | This study |
| BTU22 | PM1205 <i>lacI'</i> ::PBAD-BtuB _{27cd} mutEP3 | This study |
| BTU23 | PM1205 <i>lacI'</i> ::PBAD-BtuB _{27cd} mutEP4 | This study |
| BTU24 | PM1205 <i>lacI'</i> ::PBAD-BtuB _{27cd} mutEP5 | This study |
| BTU25 | PM1205 <i>lacI'</i> ::PBAD- <i>thiMbtuB</i> _{140cd} | This study |
| BTU26 | PM1205 <i>lacI'</i> ::PBAD- <i>thiMbtuB</i> _{27cd} | This study |
| BTU27 | PM1205 <i>lacI'</i> ::PBAD-ThiMBtuB _{27cd} | This study |
| TPP4 | PM1205 <i>lacI'</i> ::PBAD-ThiM _{6cd} | (Caron et al. 2012) |
| TPP5 | PM1205 <i>lacI'</i> ::PBAD- <i>thiM</i> _{6cd} | (Caron et al. 2012) |

Supplemental Table S2. Summary of plasmids used in this study.

| Plasmid | Description | Reference |
|-------------------|-----------------------------|-----------------------|
| pNM12 | pBAD24 derivative (AmpR) | Majdalani et al. 1998 |
| pBAD-OmrA | pBAD24 +OmrA | This study |
| pBAD-OmrB | pBAD24 +OmrB | 3 |
| pBAD-MS2 | pBAD24 + MS2 aptamer | 4 |
| pBAD-MS2OmrA | pBAD24 + MS2 aptamer + OmrA | This study |
| pBAD-MS2OmrB | pBAD24 + MS2 aptamer + OmrB | This study |
| pBRplac | pBR322 derivative | 1 |
| pBRplacOmrA | pBRplac + OmrA | 1 |
| pBRplacOmrA mutA1 | pBRplac + OmrA A1 mutant | This study |
| pBRplacOmrA mutA2 | pBRplac + OmrA A2 mutant | This study |
| pBRplacOmrA mutA3 | pBRplac + OmrA A3 mutant | This study |
| pBRplacOmrA mutA4 | pBRplac + OmrA A4 mutant | This study |

pBRplacOmrA mutA3
pBRplacOmrB

pBRplac + OmrA A5 mutant
pBRplac + OmrB

This study
1

SUPPLEMENTAL REFERENCES

1. Guillier M, Gottesman S. Remodelling of the Escherichia coli outer membrane by two small regulatory RNAs. *Mol Microbiol.* 2006;59(1):231-247.
2. Prevost K, Salvail H, Desnoyers G, Jacques JF, Phaneuf E, Masse E. The small RNA RyhB activates the translation of shiA mRNA encoding a permease of shikimate, a compound involved in siderophore synthesis. *Mol Microbiol.* 2007;64(5):1260-1273.
3. Salvail H, Lanthier-Bourbonnais P, Sobota JM, et al. A small RNA promotes siderophore production through transcriptional and metabolic remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(34):15223-15228. doi:10.1073/pnas.1007805107.
4. Desnoyers G, Masse E. Noncanonical repression of translation initiation through small RNA recruitment of the RNA chaperone Hfq. *Genes Dev.* 2012;26(7):726-739.

CONCLUSION ET DISCUSSION

1- Les riborégulateurs traductionnels modulent le niveau d'ARNm

1.1- Un paradigme

Chez les bactéries, l'efficacité de la traduction influe sur la quantité d'ARNm (Deana et Belasco, 2005; Dreyfus, 2009). Ainsi il existe une corrélation entre l'inhibition de la traduction et la diminution du niveau d'ARNm. Cet effet a été observé de nombreuses fois pour les mécanismes de contrôle impliquant des petits ARN (Prévost *et al.*, 2011; Massé *et al.*, 2003; Morita *et al.*, 2005; Guillier et Gottesman, 2008). En revanche, très peu d'études se sont intéressées au devenir de l'ARNm contrôlé par des riborégulateurs traductionnels.

Au début de cette étude, sept riborégulateurs étaient connus chez l'organisme modèle *E. coli* (Raghavan *et al.*, 2011). Tous étaient prédits ou bien montrés pour contrôler l'initiation de la traduction du gène localisé en aval (Nahvi *et al.*, 2002; Rentmeister *et al.*, 2007; Nou et Kadner, 2000; Winkler, Nahvi, et Breaker, 2002; Barrick et Breaker, 2007). Les données exposées ici indiquent que de surcroît à une régulation traductionnelle, les sept riborégulateurs d'*E. coli* modulent le niveau d'ARNm.

Les résultats exposés dans le chapitre 1 démontrent clairement que les riborégulateurs *thiM* et *lysC* contrôlent à la fois l'initiation de la dégradation et la terminaison prématurée de la transcription Rho-dépendante suite à leur liaison au ligand. Les expériences de ChIP de l'ARNp suggèrent que les riborégulateurs *thiB*, *thiC* ainsi que *ribB* modulent la terminaison prématurée de la transcription Rho-dépendante. Cette régulation a été caractérisée antérieurement dans le cas de *ribB* (Hollands *et al.*, 2012). Des données non publiées du laboratoire confirment que le riborégulateur *thiC* module la terminaison Rho-dépendante et indiquent que *thiB* contrôle le niveau d'ARNm (travaux de A. Chauvier et M. Simoneau-Roy). Des expériences sont en cours pour déterminer l'importance de Rho dans la régulation exercée par *thiB*. D'après d'autres analyses, le riborégulateur *thiC* (mais pas *thiB*) contrôlerai l'initiation de la dégradation de l'ARNm par le dégradosome ARN (travaux d'A. Dubé).

Actuellement, aucune évidence ne permet d'assumer que *thiB* et *ribB* agissent aussi au niveau de la dégradation de l'ARNm.

Limitées par le contexte expérimental, nos données de ChIP présentées dans le chapitre 1 ne sont pas concluantes quant à une quelconque régulation transcriptionnelle exercée par le riborégulateur *btuB*. Cependant, nous montrons dans le chapitre 2 que certaines régions de l'ARNm *btuB* induiraient la terminaison Rho-dépendante en fonction du ligand AdoCbl. En plus de cette régulation transcriptionnelle, Franklund et Kadner ont précédemment établi que suite à la liaison du ligand, l'ARNm *btuB* est rapidement dégradé (Franklund et Kadner, 1997). La ou les endoribonucléases impliquées dans ce processus sont encore méconnues.

Contrairement au riborégulateur *mgtA* de *S. typhimurium*, nos données de ChIP suggèrent que, chez *E. coli*, *mgtA* contrôle la terminaison transcriptionnelle indépendamment du facteur Rho (Hollands *et al.*, 2012). Des recherches plus poussées tendent à confirmer ce résultat et indiquent que le dégradosome ARN n'est pas impliqué dans cette régulation (travaux de M. Geffroy, non publié).

L'ensemble des observations montre que le contrôle du niveau d'ARNm est commun aux riborégulateurs traductionnels d'*E. coli*. Ce mécanisme serait répandu à travers les espèces bactériennes puisqu'il a été retrouvé chez le riborégulateur FMN de *Corynebacterium glutamicum* (Takemoto *et al.*, 2014). Toutefois, nos résultats indiquent que les mécanismes spécifiques de régulation de l'ARNm diffèrent d'un riborégulateur à l'autre. En effet, *thiM*, *lysC*, *btuB* et *thiC* contrôlent à la fois la terminaison de la transcription et la dégradation tandis que *thiB*, *ribB* et *mgtA* agiraient uniquement au niveau de la terminaison transcriptionnelle. Les facteurs déterminant le mode de régulation sont discutés dans la section 1.3 de cette discussion. Ensuite, la position des éléments régulateurs de l'ARN (site *rut* et site de clivage) varie aussi d'un riborégulateur à l'autre. Alors que dans le cas de *thiM* et *btuB* ils sont localisés dans la région codante, pour *lysC* ces éléments sont positionnés dans la plateforme d'expression du riborégulateur. L'impact de la localisation des éléments contrôlant le niveau d'ARNm sur la régulation est abordé dans la section 1.2 de cette discussion. Le tableau 1 présenté ci-dessous résume les différentes propriétés des riborégulateurs d'*E. coli*.

Tableau 1 : Résumé des mécanismes de contrôle des riborégulateurs d'*E. coli*

| Riborégulateur | Traduction | Transcription | Dégradation | Localisation |
|----------------|------------|-----------------|-------------|--------------|
| <i>lysC</i> | Confirmé | Rho-dépendant | Dégradosome | 5'UTR |
| <i>ribB</i> | Prédit | Rho-dépendant | ND | 5'UTR |
| <i>btuB</i> | Confirmé | Rho-dépendant | RNase ND | ORF |
| <i>mgtA</i> | Prédit | Rho-indépendant | ND | 5'UTR |
| <i>thiM</i> | Confirmé | Rho-dépendant | Dégradosome | ORF |
| <i>thiC</i> | Confirmé | Rho-dépendant | Dégradosome | 5'UTR |
| <i>thiB</i> | Prédit | Rho-dépendant | ND | ORF |

Les sept riborégulateurs d'*E. coli*, prédits ou montrés pour contrôler l'initiation de la traduction, modulent le niveau d'ARNm. Régulation de la traduction (prédite ou confirmé) de la transcription (Rho-dépendante ou indépendante) et de la dégradation (RNase impliquée ou ND pour non déterminé). La localisation des éléments régulateurs de l'ARNm est soit dans le 5'UTR ou dans la région codante (ORF pour open reading frame)

1.2- Un contrôle direct ou indirect du niveau d'ARNm

La section précédente indique que les sept riborégulateurs d'*E. coli* contrôleraient à la fois l'initiation de la traduction et le niveau d'ARNm. Bien que le mécanisme général semble similaire, nous pouvons distinguer un mode de régulation indirect ou bien direct du niveau d'ARNm (Fig. 24).

1.2.1- Contrôle indirect

Le mode de régulation indirect est une conséquence du blocage de la traduction (Fig. 1A). Comme détaillé en introduction, l'absence de ribosome sur l'ARNm facilite l'accès du facteur Rho au site *rut* ainsi que la dégradation non nucléolytique (voir introduction B.1.2 et B.2.4). Dans ce cas, les sites *rut* ainsi que les sites de clivages des RNases sont localisés dans la région codante de l'ARNm. Les riborégulateurs *thiM* et *btuB* utilisent ce mode de régulation (Tableau 1). Dans les études présentées dans le chapitre 1 et 2 nous avons identifié des éléments modulant le niveau d'ARNm positionnés au début de la région codante de *thiM* et *btuB*. Cette localisation pourrait servir de point de détection de l'efficacité de la traduction dès

l'initiation ou lors des premières étapes de l'élongation. Le processus de transcription serait bloqué suffisamment tôt pour éviter la perte d'énergie associée à la synthèse d'un transcrit pleine longueur. De la même façon, une telle localisation assurerait la dégradation rapide de l'ARNm non fonctionnel. Cependant, nos résultats indiquent que les éléments régulateurs positionnés au début de la région codante ne sont pas limitants pour le contrôle du niveau d'ARNm. Plusieurs éléments régulateurs indépendants seraient ainsi présents tout au long de l'ARNm de *thiM* et *btuB*.

1.2.2- Contrôle direct

Dans le cas d'un mode de régulation direct, le site *rut*, ou bien, le site de clivage d'une RNase, sont localisés dans la plateforme d'expression du riborégulateur (Fig. 24B). Le riborégulateur contrôle directement l'accès à ces sites en fonction de sa liaison au ligand. C'est le cas du riborégulateur *lysC* qui en plus du contrôle traductionnel, module directement la terminaison Rho dépendante et l'initiation de la dégradation (chapitre1; Caron *et al.*, 2012). L'étude de Caron *et al.* montre que la régulation du niveau d'ARNm par le riborégulateur *lysC* peut être indépendante du processus d'initiation de la traduction. La dégradation est donc nucléolytique (voir introduction B.2.4) et la terminaison transcriptionnelle Rho-dépendante aurait lieu lorsque la structure du riborégulateur libère l'accès au site *rut* (donnée du laboratoire non publiée de Turcotte P.). D'après les travaux de Hollands *et al.* le riborégulateur *ribB* contrôlerait aussi de façon directe la terminaison Rho-dépendante (Hollands *et al.*, 2012). Des données du laboratoire démontrent que le riborégulateur *thiC* agit similairement puisque l'accessibilité d'un site *rut* localisé dans sa plateforme d'expression est dépendante du TPP (travaux de A. Chauvier). Enfin, bien que *mgtA* agisse indépendamment du facteur Rho, des essais β -galactosidase montrent que le domaine riborégulateur est suffisant pour moduler le niveau d'ARNm ce qui reflète un contrôle direct (travaux de M. Geffroy).

Initialement, les riborégulateurs étaient connus pour moduler l'expression génique sans l'intervention de facteur *trans*. Or, des acteurs protéiques interviennent dans le contrôle direct de l'initiation de la dégradation et de la terminaison de la transcription. D'un point de vue

évolutif, nous pouvons envisager que le contrôle de l'initiation de la traduction soit le mécanisme originel employé par les riborégulateurs d'*E. coli*. Des événements sélectifs ont ensuite favorisé l'apparition d'éléments de contrôle de l'ARNm au sein de la plateforme d'expression du riborégulateur. Pour appuyer cette théorie, il serait nécessaire de vérifier que les riborégulateurs *ribB*, *thiC* et *mgtA* contrôlent l'initiation de la traduction.

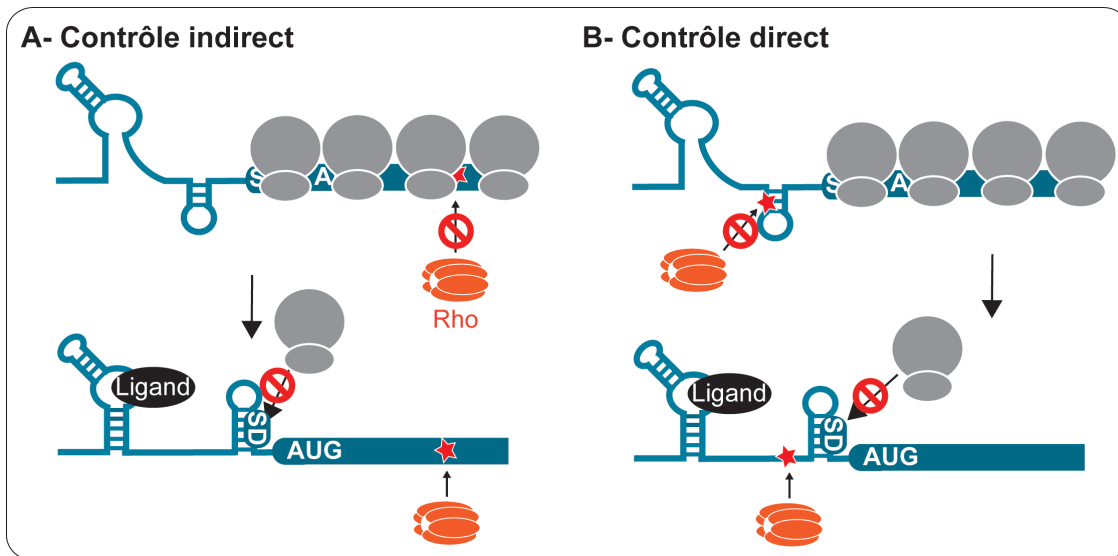


Figure 24 : Mécanisme direct et indirect de contrôle de l'ARNm par les riborégulateurs. L'étoile représente le site *rut*. Lorsque le mécanisme est indirect, le site *rut* est protégé par les ribosomes en absence de ligand. En présence de ligand, le site *rut* est accessible. Lorsque le mécanisme est direct, le site *rut* est séquestré dans une structure tige-boucle de l'ARN. Il devient accessible en présence de ligand. À des fins de simplicité, la figure présente uniquement le contrôle de la terminaison Rho-dépendante, mais le principe est identique pour le clivage par une RNase.

1.2.3- Les implications du contrôle direct et indirect

Les modes de contrôle direct et indirect présentés ci-dessus apportent une nuance fondamentale au principe de ces régulations. Dans l'absolu, la régulation directe du niveau de l'ARNm implique que le mécanisme soit strictement dépendant de la présence du ligand puisque le riborégulateur lui-même dicte l'accessibilité des éléments régulateurs. À l'inverse, une régulation indirecte sous-entend que les éléments régulateurs présents dans la région codante de l'ARNm peuvent être utilisés à d'autres fins que le contrôle médié par le

riborégulateur. Ainsi, n'importe quel évènement qui perturbe le processus de traduction devrait aboutir à la diminution rapide du niveau d'ARNm selon les mêmes mécanismes employés par le riborégulateur. Il est intéressant de noter ici que les riborégulateurs qui contrôlent de façon directe le niveau d'ARNm peuvent aussi exercer un contrôle indirect. Ainsi, lorsque l'élément régulateur de la plateforme d'expression de *lysC* est délété, nous pouvons encore observer une diminution importante du niveau d'ARNm induite par la lysine (Caron *et al.*, 2012). Cet effet serait dû à des éléments régulateurs localisés dans la région codante.

1.3- Un contrôle co- ou post-transcriptionnel, telle est la question.

1.3.1- Le principe

Quels sont les facteurs qui déterminent qu'un riborégulateur traductionnel contrôle la terminaison de la transcription et/ou la dégradation de l'ARNm? Ceci dépendrait de la capacité du riborégulateur à lier le ligand et modifier sa conformation de façon co- ou post-transcriptionnelle, mais aussi de son mode de régulation cinétique ou bien thermodynamique (voir introduction C.2.4).

Pour plus de clarté, nous devons distinguer ici trois catégories d'ARNm (Fig. 25): les ARNm dont la transcription débute (A); les ARNm en cours d'élongation pour lesquels la portion riborégulateur est déjà transcrite (A') et enfin les ARNm dont la transcription est complétée (B). Les riborégulateurs cinétiques contrôlent uniquement l'expression des ARNm (A) puisque ces derniers dépendent du processus de transcription pour adopter la conformation induite par le ligand (voir introduction C.2.4). Ce contrôle est strictement co-transcriptionnel. Ainsi, si le riborégulateur est cinétique, en présence de ligand, l'expression des ARNm (A) sera régulée tandis que les ARN (A') et (B) resteront fonctionnels jusqu'à ce qu'ils soient inactivés par un clivage nucléolytique (indépendant du riborégulateur). À l'inverse, les riborégulateurs thermodynamiques régulent l'expression des ARNm (A') et (B) puisque la

conformation induite par le ligand est adoptée une fois que le riborégulateur est complètement transcrit. Ce contrôle peut donc avoir lieu de façon co- et post-transcriptionnel.

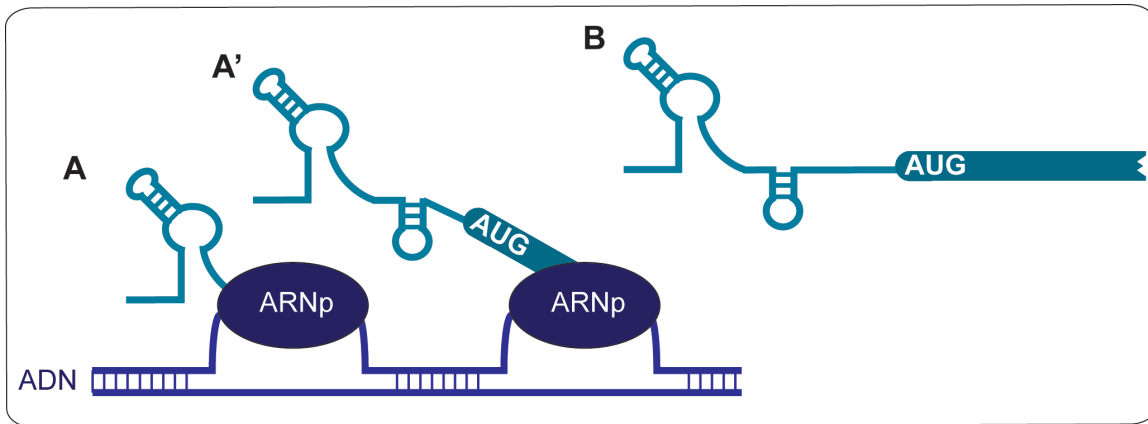


Figure 25 : Régulation co- et post-transcriptionnelle. Les catégories A et A' correspondent à un contrôle co-transcriptionnel. La catégorie B à un contrôle post-transcriptionnel. Un contrôle cinétique peut avoir lieu sur A mais pas A' et B pour lesquels le contrôle est uniquement thermodynamique.

Une étude précédente menée au laboratoire indique que la propriété d'un riborégulateur à agir de façon cinétique ou bien thermodynamique est corrélée à son mécanisme de régulation (Lemay *et al.*, 2011). Le riborégulateur adénine de *Bacillus subtilis* qui module la terminaison prématurée Rho-indépendante de la transcription est strictement cinétique. Bien qu'il soit théoriquement possible d'envisager un changement de conformation thermodynamique une fois l'ARNm transcrit, ceci serait inutile puisque la formation de la tige terminatrice n'aurait pas d'impact sur l'expression génique. Dans cette même étude, Lemay *et al.*, montrent que le riborégulateur adénine de *Vibrio vulnificus* qui agit au niveau traductionnel est thermodynamique. Ce mode de régulation est cohérent avec un mécanisme de contrôle de la traduction des ARNm déjà transcrits ou en cours de transcription. Dans les études présentées ici nous montrons que les riborégulateurs d'*E. coli* modulent à la fois la traduction, la terminaison de la transcription et la dégradation. Le mode de régulation pourrait être plus complexe que ce qui est présenté ci-dessus.

1.3.2- La terminaison Rho-dépendante : un contrôle cinétique ?

En toute vraisemblance, les riborégulateurs *thiM*, *lysC*, *btuB*, *ribB* et *thiC* agissent de façon co-transcriptionnelle car tous contrôlent la terminaison de la transcription Rho-dépendante. De là, nous ne pouvons pas inférer si le riborégulateur est cinétique ou bien thermodynamique. Cependant, de manière spéculative, la vitesse de l'ARNp est certainement importante au mécanisme d'action. En effet, il est difficile de concevoir que le facteur Rho puisse induire une terminaison de la transcription si des ribosomes font obstacle à sa progression sur l'ARNm (Fig. 26B). Ainsi, la tige séquestrant le SD doit se former dès son émergence de l'ARNp, sans quoi, un premier ribosome pourrait s'associer à l'ARNm (Fig. 26B). Comme le ribosome de tête interagit avec l'ARNp (voir introduction B.1.2), il empêchera le facteur Rho de provoquer la dissociation du complexe d'élongation de la transcription. Cette hypothèse est valable pour un site *rut* localisé dans la région codante ou dans le riborégulateur (à condition que le site *rut* soit à proximité du SD). Ceci justifie l'intérêt d'avoir un mécanisme couplé qui contrôle à la fois la traduction et la terminaison Rho-dépendante.

L'adoption d'une conformation inactive du riborégulateur sitôt que l'ARN est transcrit pourrait ainsi être un prérequis à la terminaison Rho-dépendante. Ce postulat laisse présager que les riborégulateurs contrôlant la terminaison Rho-dépendante agissent selon un mode cinétique. Dans le chapitre 1 de cette thèse, nous comparons l'efficacité du changement de conformation du riborégulateur *thiM* avant et après que le processus de transcription soit complété par des essais *in vitro*. Nos résultats indiquent que le TPP module la structure de *thiM* co- et post-transcriptionnellement. Néanmoins, le changement de conformation est plus efficace au cours du processus de transcription. Ces données suggèrent que *thiM* serait un riborégulateur thermodynamique et cinétique. Ceci abonde dans le sens de l'hypothèse exposée au-dessus.

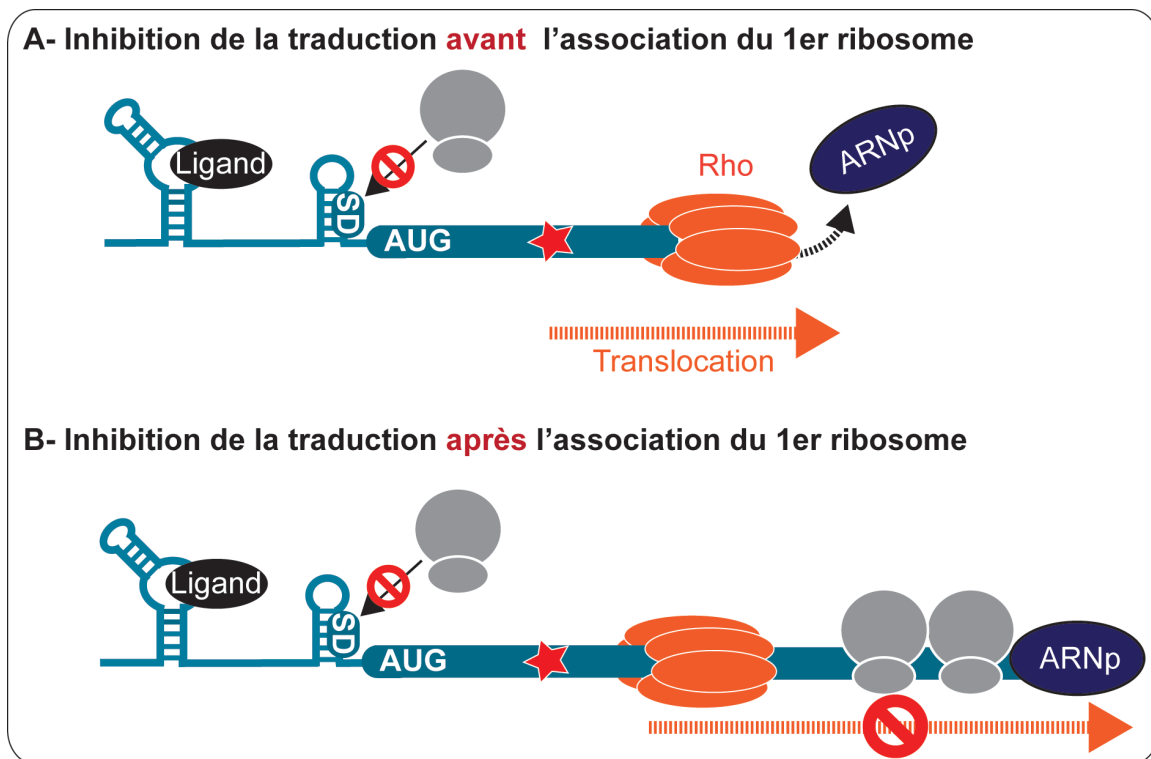


Figure 26 : Mécanisme de terminaison Rho-dépendante induit par un riborégulateur. L'étoile rouge représente le site rut. Si le SD est séquestré dès son émergence de l'ARNp ceci empêche l'association du ribosome de tête et Rho pourra rencontrer l'ARNp et provoquer sa dissociation (A). Si le SD est séquestré après qu'un ou plusieurs ribosomes aient initié la traduction, Rho peut théoriquement s'associer au site rut, mais il ne pourra pas rejoindre l'ARNp car des ribosomes lui font obstacle (B).

1.3.3- La dégradation : un contrôle thermodynamique ?

D'après l'étude présentée dans le chapitre 1, le contrôle thermodynamique aurait son importance pour la dégradation des ARNm déjà transcrits. Nos résultats indiquent que la dégradation de l'ARNm *thiMD* dépendante du TPP a lieu post-transcriptionnellement. Cette observation est cohérente avec la localisation du dégradosome ARN à la membrane interne de l'enveloppe bactérienne. Selon le modèle proposé par Mackie, les ARNm qui sont peu ou pas traduits diffusent vers la membrane pour y être dégradés (Mackie, 2013). Bien que nos résultats pour *thiM* indiquent un clivage post-transcriptionnel, ils n'excluent pas la possibilité que le dégradosome ARN cible aussi l'ARNm naissant. Ce phénomène a déjà été observé avec

l'ARNm *lacZ* (Cannistraro et Kennell, 1985). Afin de concilier la localisation de la dégradation avec celle de l'ARNm en cours de transcription, Dreyfus propose que l'ARNm naissant puisse directement contacter le dégradosome. Il justifie cette hypothèse par le fait que la longueur d'un ARNm peut être parfois plus grande que la longueur d'une cellule (Dreyfus, 2009).

1.3.4- Mode de contrôle des riborégulateurs d'*E. coli*

En théorie, les riborégulateurs *lysC*, *btuB* et *thiC* devraient fonctionner de façon similaire à *thiM* puisqu'ils contrôlent la terminaison de la transcription et la dégradation. L'efficacité du contrôle cinétique ou thermodynamique pourrait toutefois varier de l'un à l'autre des riborégulateurs et aboutir à un degré différent de régulation de l'ARNm. Dans le cas de *ribB*, *mgtA* et *thiB*, aucune évidence expérimentale n'indique qu'ils régulent la dégradation en revanche tous les trois semblent contrôler la terminaison de la transcription. Ainsi, il est possible que certains puissent être strictement cinétiques. Une comparaison plus approfondie des différents modes de contrôle de ces riborégulateurs aiderait à la compréhension des mécanismes de régulation de l'ARNm.

1.4- Les implications du contrôle du niveau d'ARNm

La corrélation entre le contrôle traductionnel et le niveau d'ARNm est d'une grande importance pour l'expression génique. En considérant le fait que les riborégulateurs traductionnels fonctionnent de façon thermodynamique, ceci suppose que la régulation puisse être réversible (Lemay *et al.*, 2011). L'initiation de la dégradation de l'ARNm ou bien la terminaison prématurée de la transcription rend la régulation traductionnelle de l'ARNm irréversible.

Un deuxième point important inhérent au contrôle de l'ARNm par des riborégulateurs traductionnels est relatif aux gènes organisés en opérons. En théorie, la régulation

traductionnelle influe uniquement sur l'expression du gène situé en aval du riborégulateur. Dans le cas d'un opéron, la traduction des gènes adjacents devrait être partiellement affectée considérant que la traduction du premier gène favorise la traduction des suivants. Néanmoins, la régulation du niveau de l'ARNm suite à la liaison du ligand au riborégulateur affecte drastiquement l'expression de l'ensemble des gènes d'un opéron. L'enjeu de la régulation traductionnelle par les riborégulateurs a donc ainsi davantage d'impact sur l'expression génique que ce qui était initialement pensé.

2- Riborégulateurs vs petit ARN: différences dans le contrôle de l'ARNm

2.1- Deux ARNnc contrôlent la traduction et le niveau d'ARNm

L'étude menée dans le chapitre 2 de cette thèse nous a permis d'établir une comparaison entre le contrôle de l'ARNm médié par un riborégulateur et un petit ARN. Nous montrons que le petit ARN régulateur *OmrA*, tout comme le riborégulateur, régule l'initiation de la traduction de l'ARNm *btuB*. Les mécanismes de contrôle du niveau d'ARNm reliés à l'inhibition de la traduction sont toutefois différents pour les deux ARNnc.

Dans notre modèle (Chapitre 2), *OmrA* s'apparie à la région codante de l'ARNm *btuB*. Cet appariement permettrait de guider la protéine chaperonne Hfq à son site de liaison qui chevauche la région d'initiation de la traduction de *btuB*. L'association d'Hfq à l'ARNm *btuB* serait responsable de l'inhibition de la traduction. L'arrêt de la traduction est accompagné d'une dégradation de l'ARNm *btuB* par le dégradosome ARN qui clive dans une région distale du site d'appariement. Le riborégulateur *btuB*, quant à lui, contrôle l'initiation de la traduction en modulant l'accessibilité des ribosomes au SD en fonction de l'AdoCbl. En conséquence de la répression traductionnelle, le niveau d'ARNm *btuB* diminue drastiquement. La régulation de l'ARNm s'effectue de façon co-transcriptionnelle par la terminaison Rho-dépendante et post-transcriptionnelle par l'induction de la dégradation.

2.2- Pourquoi OmrA ne contrôle pas la terminaison Rho-dépendante?

Bien qu'en toute logique, les sites *rut* sur l'ARNm *btuB* pourraient autant participer au contrôle de l'ARNm par OmrA que par le riborégulateur ceci n'est pas le cas. Comment expliquer alors cette disparité dans le contrôle du niveau d'ARNm ?

En théorie, afin d'induire la terminaison Rho-dépendante, OmrA devrait s'apparier à *btuB* avant que le premier ribosome accède au site d'initiation de la traduction de l'ARNm naissant. Selon les mêmes principes exposés dans la section 1.3 de cette discussion, le ribosome pourrait bloquer la progression de Rho jusqu'à l'ARNp. Or, le site d'appariement d'OmrA est localisé ~ 70 nt en aval du codon d'initiation de la traduction de *btuB*. Le ribosome devrait donc s'associer à l'ARNm *btuB* avant même que le site d'appariement d'OmrA n'ait pu être transcrit (Fig. 27). Dans le cas du riborégulateur, en présence de ligand le SD serait séquestré par la plateforme d'expression dès qu'il émerge de l'ARNp permettant ainsi la terminaison de la transcription Rho-dépendante (Fig. 26A). Récemment, Bossi *et al.* ont montré que le petit ARN ChiX inhibe la traduction de *chiP* et module la terminaison prématurée de la transcription de l'opéron *chiPQ* chez *Salmonella* (Bossi *et al.*, 2012). Il est important de souligner ici que le site d'appariement de ChiX est localisé dans la région 5' UTR du gène *chiP*. De façon cohérente avec l'hypothèse énoncée au-dessus, cette disposition alloue un délai au petit ARN pour s'apparier à sa cible avant que la région d'initiation de la traduction soit transcrite et que le complexe de préinitiation de la traduction s'assemble. La capacité d'un petit ARN à contrôler la terminaison Rho-dépendante dépendrait ainsi de sa région d'appariement à l'ARNm cible. L'étude d'autre cas de petits ARN agissant sur la terminaison Rho-dépendante permettrait de vérifier cette hypothèse.

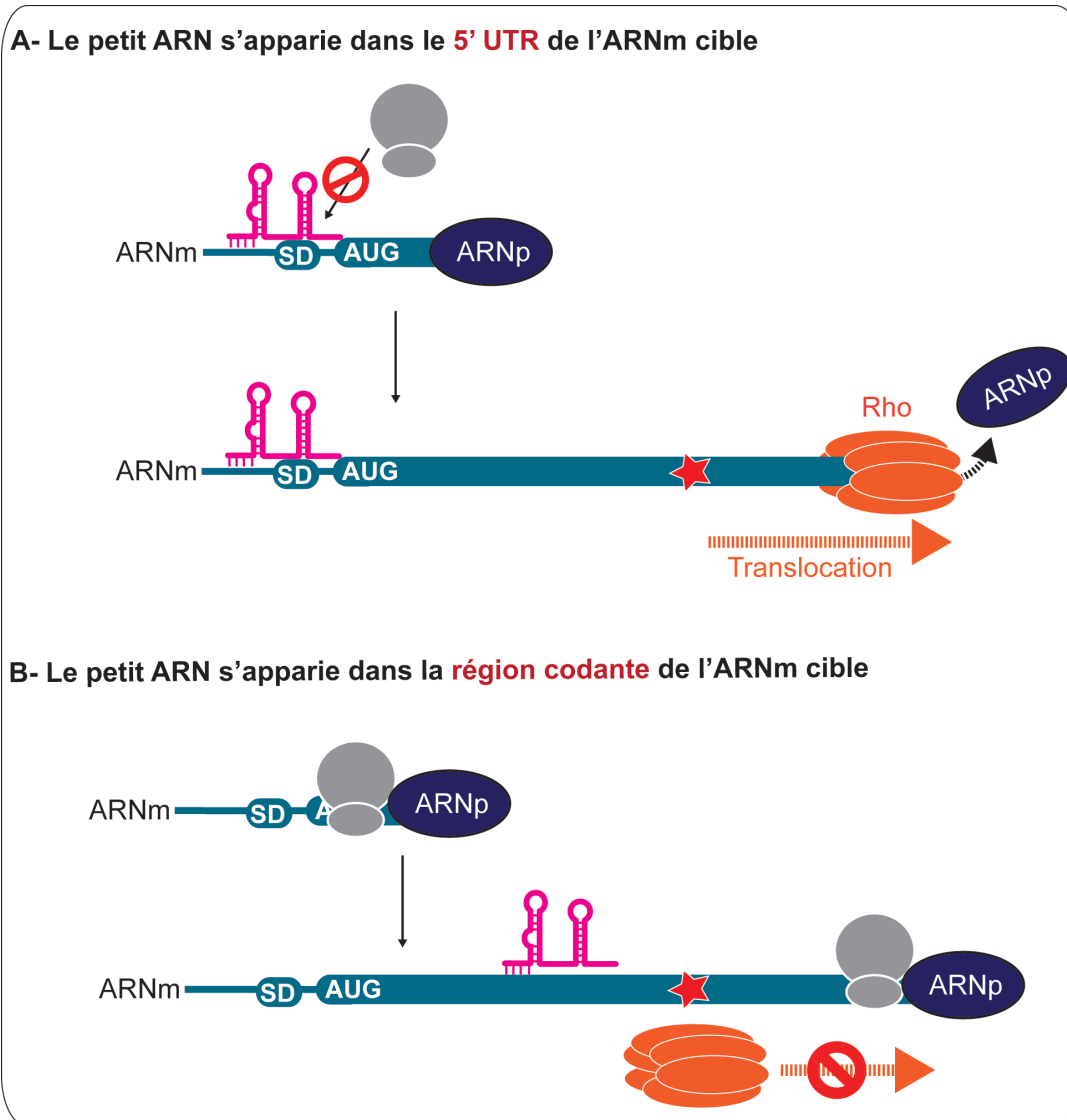


Figure 27 : Mécanisme de terminaison Rho-dépendante induit par les petits ARN. L'étoile rouge représente le site rut. Si le petit ARN s'apparie au 5'UTR et bloque l'accès du 1^{er} ribosome au SD de l'ARNm naissant, alors la terminaison Rho-dépendante pourra avoir lieu (A). Si le petit ARN s'apparie dans la région codante, le 1^{er} ribosome pourra s'associer au SD de l'ARNm naissant, la terminaison Rho-dépendante ne pourra pas avoir lieu (B).

2.3- La dégradation non nucléolytique: riborégulateurs vs petit ARN

Contrairement à la régulation par OmrA, le dégradosome ARN ne semble pas avoir un effet majeur sur le contrôle de l'ARNm *btuB* relatif au riborégulateur. Cependant, il est possible que similairement à *thiM*, Rho et le Dégradosome ARN agissent de façon conjointe dans la

régulation de l'ARNm *btuB*. Ceci est d'autant plus probable que des résultats de northern blot montrent l'accumulation de fragments intermédiaires d'ARNm *btuB* dans une souche mutée pour le dégradosome ARN (données non montrées). Des expériences sont en cours afin d'évaluer l'implication du dégradosome dans le contrôle relatif au riborégulateur. Bien que dans les deux cas, la dégradation serait non nucléolytique (l'arrêt de la traduction précéderait la dégradation), il est fort plausible que les mécanismes induits par OmrA et le riborégulateur reposent sur des principes bien distincts.

Cette assertion est fondée sur le fait que la protéine Hfq interagit directement avec la RNase E (Ikeda *et al.*, 2011). Nous pouvons étayer le modèle proposé par Tsai *et al.* où le petit ARN s'apparie à l'ARNm cible avec Hfq (Fig. 28A). La chaperonne Hfq guide alors l'ARNm à la membrane par son interaction avec la RNase E. La RNase E s'associe au polysome et « scanne » l'ARNm jusqu'à rencontrer son site de clivage. L'ARNm est ainsi dégradé (Tsai *et al.*, 2012; Strahl *et al.*, 2015). Ce modèle explique la localisation du site de clivage du dégradosome ARN dans une région distale du site d'appariement (Fig. 28A). Bien que le principe repose sur le recrutement actif du dégradosome ARN, il s'agirait d'une dégradation non nucléolytique, car l'arrêt de la traduction serait un prérequis au clivage par la RNase E. Dans le cas du riborégulateur, le mécanisme serait relatif au modèle de Mackie présenté dans la section 1.3.3 de cette discussion (Mackie, 2013). Suite à l'arrêt traductionnel induit par le ligand, l'ARNm dépourvu de ribosomes diffuserait jusqu'à la membrane pour y être dégradé (Fig. 28B). Le mécanisme de dégradation non nucléolytique serait dans ce cas un processus passif.

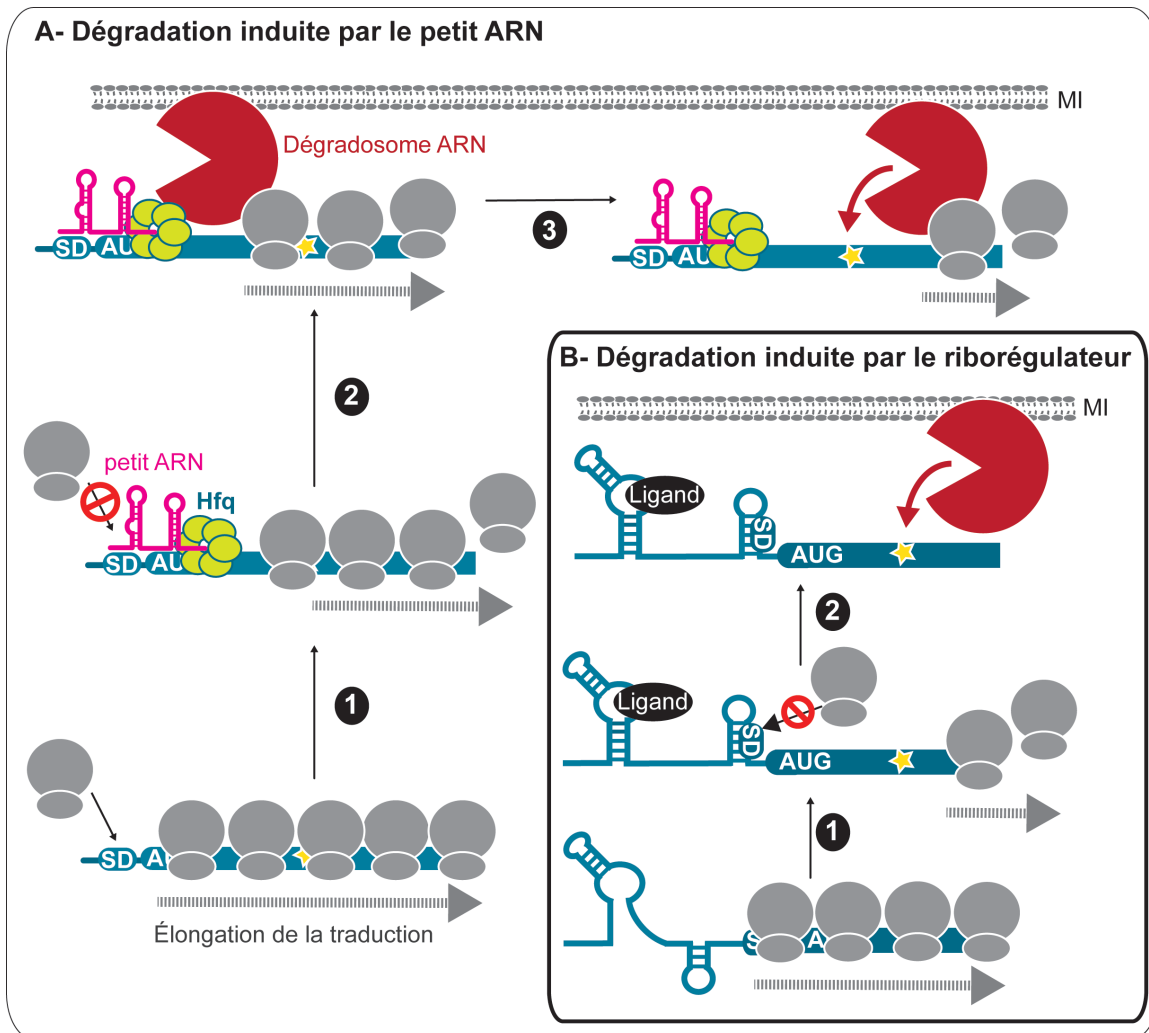


Figure 28 : Mécanisme de dégradation de l'ARNm induit par les petits ARN et les riborégulateurs. L'étoile jaune représente le site de clivage du dégradosome ARN. Lors de la dégradation médiée par le petit ARN (A), Le petit ARN, aidé d'Hfq, s'apparie à l'ARNm cible et inhibe l'initiation de la traduction (A.1); Hfq interagit avec le dégradosome ARN qui est localisé à la membrane (A.2). Le dégradosome peut alors interagir avec le polysome et scanner l'ARNm jusqu'à trouver son site de clivage (A.3). Lors de la dégradation médiée par les riborégulateurs (B), le ligand induit l'inhibition de la traduction (B.1). La diminution du « ombre » de ribosomes facilite la diffusion de l'ARNm à la membrane (B.2). L'ARNm est ainsi dégradé par le dégradosome ARN.

Outre l'association Hfq/RNase E, une étude récente suggère que l'état de phosphorylation du 5' des petits ARN peut directement stimuler le clivage de l'ARNm cible par la RNase E (Bandyra *et al.*, 2012). Comme stipulé dans l'introduction (B.2.2.2) la RNase E a une préférence pour les ARNm qui arborent une extrémité 5' monophosphate. Bandyra *et al.* ont

montré que le petit ARN MicC de *Salmonella enterica* active de la sorte le clivage de l'ARNm *ompD* par la RNase E à proximité du site d'appariement. Si un tel mécanisme est impliqué dans le contrôle de *btuB* par OmrA, cela nécessiterait probablement un rapprochement spatial du site d'appariement et du site de clivage de la RNase E qui sont normalement éloignés l'un de l'autre. L'ARNm dépourvu de tout ribosome pourrait former une structure suffisamment compacte qui joindrait les deux sites. Cependant, contrairement à OmrA qui agit au niveau traductionnel, MicC s'apparie dans la région codante et contrôle uniquement la dégradation de l'ARNm. L'utilisation du 5' monophosphate pourrait être indispensable dans le cas spécifique de MicC afin de contourner la présence de ribosomes sur l'ARNm et accélérer la dégradation.

3- Intérêt général de l'étude

Les processus de traduction et de dégradation sont étroitement liés. La traduction inefficace d'un ARNm provoque souvent une dégradation non nucléolytique ou bien la terminaison prématurée de la transcription. Ainsi, à première vue les mécanismes de contrôle de l'ARNm relatifs aux riborégulateurs traductionnels pouvaient être relativement attendus. Alors qu'apporte cette étude par rapport à ce qui était déjà connu?

La dégradation non nucléolytique est généralement le résultat d'un répresseur qui bloque l'accès de la région d'initiation de la traduction aux ribosomes. Les premières études qui ont constaté ce phénomène ont permis d'établir une corrélation entre l'efficacité de la traduction et la dégradation (Kearney et Nomura, 1987; Vecerek *et al.*, 2005; Nogueira *et al.*, 2001; Nou et Kadner, 1998; Desnoyers *et al.*, 2009). Hormis pour les petits ARN, très peu d'informations étaient cependant disponibles concernant les mécanismes reliés à la modulation du niveau d'ARNm. Les riborégulateurs étant une catégorie importante de répresseurs traductionnels, ils se prêtaient parfaitement à cette étude.

De façon générale, notre étude montre que la répression traductionnelle affecte à la fois la terminaison prématurée de la transcription Rho-dépendante et la dégradation de l'ARNm. Ces mécanismes dépendent de la capacité du répresseur à agir de façon co- ou post-transcriptionnelle et de son site d'action sur l'ARNm. De manière plus spécifique, nous avons

identifié lors de l'étude de *thiM* (chapitre 1) une seule et même région qui est à la fois responsable de la terminaison Rho-dépendante et de la dégradation par le dégradosome ARN. En plus de contrôler finement l'expression de l'ARNm *thiMD*, cette région assure la dégradation des fragments générés par la terminaison Rho-dépendante. Puisque cet élément est retrouvé dans le riborégulateur *lysC* il est fortement probable que celui-ci soit davantage répandu à travers les ARNm bactériens. Aussi, le site de clivage du dégradosome ARN que nous avons identifié chez *thiM* correspondrait à un site d'entrée interne de la RNase E (chapitre 1). Bien que celui-ci soit le principal mode d'entrée de la RNase E, le mécanisme n'a pas encore été caractérisé (Clarke *et al.*, 2014). Nous montrons qu'une structure tige boucle pourrait jouer un rôle important dans la reconnaissance et le clivage de ce site par la RNase E. L'ensemble des résultats présentés dans cette thèse contribue grandement à l'enrichissement des connaissances relatives à la régulation de l'ARNm.

Certaines lignes de recherche actuelles visent à créer des riborégulateurs synthétiques (Groher et Suess 2014). Ces derniers contrôlent soit la terminaison de la transcription soit l'initiation de la traduction. Considérant nos résultats, nous pouvons nous attendre à ce qu'une régulation traductionnelle soit beaucoup plus efficace qu'un contrôle transcriptionnel. L'expression du gène régulé sera affectée autant au niveau de la biosynthèse protéique que de l'ARNm. Toujours à des fins appliquées, les riborégulateurs sont des cibles de choix pour de nouveaux antibiotiques. Notre étude indique qu'un antibiotique qui cible un riborégulateur traductionnel situé en amont d'un opéron pourra affecter l'expression de l'ensemble des gènes de façon rapide et efficace. Il ne s'agira plus ici d'inhiber la biosynthèse d'une seule protéine, mais de plusieurs protéines impliquées dans toute une voie métabolique. Notre étude contribue ainsi à l'avancé des connaissances relatives au domaine des riborégulateurs et de ses applications.

*Begin at the beginning," the King said, very gravely,
"and go on till you come to the end: then stop."*

— Lewis Carroll, *Alice in Wonderland*

BIBLIOGRAPHIE

- Abeles, R.H. & Lee Jr., H.A., 1961. An intramolecular oxidation reduction requiring a vitamin B12 coenzyme. *J Biol Chem*, 236, p.PCI.
- Adhya, S. & Gottesman, M., 1978. Control of transcription termination. *Annu Rev Biochem*, 47, pp.967–996.
- Andrade, J.M. et al., 2009. The poly(A)-dependent degradation pathway of rpsO mRNA is primarily mediated by RNase R. *Rna*, 15(2), pp.316–326.
- Argaman, L. et al., 2001. Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of Escherichia coli. *Curr Biol*, 11(12), pp.941–950.
- Artsimovitch, I. & Landick, R., 2000. Pausing by bacterial RNA polymerase is mediated by mechanistically distinct classes of signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(13), pp.7090–7095.
- Bandyra, K.J. et al., 2012. The Seed Region of a Small RNA Drives the Controlled Destruction of the Target mRNA by the Endoribonuclease RNase E. *Molecular Cell*, 47(6), pp.943–953.
- Barnhart, M.M. & Chapman, M.R., 2006. Curli biogenesis and function. *Annual review of microbiology*, 60, pp.131–47.
- Barrick, J.E. & Breaker, R.R., 2007. The distributions, mechanisms, and structures of metabolite-binding riboswitches. *Genome Biol*, 8(11), p.R239.
- Belasco, J.G., 2010. All things must pass: contrasts and commonalities in eukaryotic and bacterial mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(7), pp.467–478.
- Bernstein, J.A. et al., 2004. Global analysis of Escherichia coli RNA degradosome function using DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(9), pp.2758–2763.
- Bossi, L. et al., 2012. A role for Rho-dependent polarity in gene regulation by a noncoding small RNA. *Genes Dev*, 26(16), pp.1864–1873.
- Bouvier, M. & Carpousis, A.J., 2011. A tale of two mRNA degradation pathways mediated by RNase E. *Molecular Microbiology*, 82(6), pp.1305–1310.
- Bradbeer, C., 1965. The clostridial fermentations of choline and ethanolamine. II. Requirement for a cobamide coenzyme by an ethanolamine deaminase. *J Biol Chem*, 240(12), pp.4675–4681.

- Breaker, R.R., 2012. Riboswitches and the RNA world. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(2).
- Burmann, B.M. et al., 2010. A NusE:NusG complex links transcription and translation. *Science*, 328(5977), pp.501–504.
- Callaghan, A.J. et al., 2005. Structure of Escherichia coli RNase E catalytic domain and implications for RNA turnover. *Nature*, 437(7062), pp.1187–1191.
- Cannistraro, V.J. & Kennell, D., 1985. Evidence that the 5' end of lac mRNA starts to decay as soon as it is synthesized. *J Bacteriol*, 161(2), pp.820–822.
- Caron, M.P. et al., 2012. Dual-acting riboswitch control of translation initiation and mRNA decay. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(50), pp.E3444–53.
- Carpousis, A.J., 2007. The RNA degradosome of Escherichia coli: an mRNA-degrading machine assembled on RNase E. *Annu Rev Microbiol*, 61, pp.71–87.
- Celesnik, H., Deana, A. & Belasco, J.G., 2007. Initiation of RNA decay in Escherichia coli by 5' pyrophosphate removal. *Mol Cell*, 27(1), pp.79–90.
- Chalissery, J. et al., 2011. Interaction surface of the transcription terminator Rho required to form a complex with the C-terminal domain of the antiterminator NusG. *J Mol Biol*, 405(1), pp.49–64.
- Chandran, V. & Luisi, B.F., 2006. Recognition of enolase in the Escherichia coli RNA degradosome. *J Mol Biol*, 358(1), pp.8–15.
- Clarke, J.E. et al., 2014. Direct entry by RNase E is a major pathway for the degradation and processing of RNA in Escherichia coli. *Nucleic Acids Res*, 42(18), pp.11733–11751.
- Coburn, G.A. et al., 1999a. Reconstitution of a minimal RNA degradosome demonstrates functional coordination between a 3' exonuclease and a DEAD-box RNA helicase. *Genes Dev*, 13(19), pp.2594–2603.
- Coburn, G.A. et al., 1999b. Reconstitution of a minimal RNA degradosome demonstrates functional coordination between a 3' exonuclease and a DEAD-box RNA helicase. *Genes Dev*, 13(19), pp.2594–2603.
- Coppins, R.L., Hall, K.B. & Groisman, E.A., 2007. The intricate world of riboswitches. *Curr Opin Microbiol*, 10(2), pp.176–181.
- Corbino, K.A. et al., 2005. Evidence for a second class of S-adenosylmethionine riboswitches and other regulatory RNA motifs in alpha-proteobacteria. *Genome Biol*, 6(8), p.R70.

- Deana, A. & Belasco, J.G., 2005. Lost in translation: the influence of ribosomes on bacterial mRNA decay. *Genes Dev*, 19(21), pp.2526–2533.
- Deana, A., Celesnik, H. & Belasco, J.G., 2008. The bacterial enzyme RppH triggers messenger RNA degradation by 5' pyrophosphate removal. *Nature*, 451(7176), pp.355–358.
- Desnoyers, G. & Masse, E., 2012. Noncanonical repression of translation initiation through small RNA recruitment of the RNA chaperone Hfq. *Genes Dev*, 26(7), pp.726–739.
- Dreyfus, M., 2009. Killer and protective ribosomes. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 85, pp.423–466.
- Emory, S.A., Bouvet, P. & Belasco, J.G., 1992. A 5'-terminal stem-loop structure can stabilize mRNA in *Escherichia coli*. *Genes Dev*, 6(1), pp.135–148.
- Ferre-D'Amare, A.R. & Scott, W.G., 2010. Small self-cleaving ribozymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(10), p.a003574.
- Franklund, C. V & Kadner, R.J., 1997. Multiple transcribed elements control expression of the *Escherichia coli* *btuB* gene. *J Bacteriol*, 179(12), pp.4039–4042.
- Fuchs, R.T., Grundy, F.J. & Henkin, T.M., 2006. The S(MK) box is a new SAM-binding RNA for translational regulation of SAM synthetase. *Nat Struct Mol Biol*, 13(3), pp.226–233.
- Ghora, B.K. & Apirion, D., 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(3), pp.1055–1066.
- Ghosh, S. & Deutscher, M.P., 1999. Oligoribonuclease is an essential component of the mRNA decay pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(8), pp.4372–4377.
- Gong, F. & Yanofsky, C., 2003. A transcriptional pause synchronizes translation with transcription in the tryptophanase operon leader region. *J Bacteriol*, 185(21), pp.6472–6476.
- Groher, F. & Suess, B., 2014. Synthetic riboswitches - A tool comes of age. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*.
- Guest, J.R. et al., 1960. Cobalamin and the synthesis of methionine by ultrasonic extracts of *Escherichia coli*. *Biochem J*, 76, pp.396–405.
- Guillier, M. & Gottesman, S., 2006. Remodelling of the *Escherichia coli* outer membrane by two small regulatory RNAs. *Mol Microbiol*, 59(1), pp.231–247.

- Guillier, M. & Gottesman, S., 2008. The 5' end of two redundant sRNAs is involved in the regulation of multiple targets, including their own regulator. *Nucleic Acids Research*, 36(21), pp.6781–6794.
- Hajnsdorf, E. et al., 1995. Polyadenylation destabilizes the rpsO mRNA of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(9), pp.3973–3977.
- Henkin, T.M., 2008. Riboswitch RNAs: using RNA to sense cellular metabolism. *Genes Dev*, 22(24), pp.3383–3390.
- Hollands, K. et al., 2012. Riboswitch control of Rho-dependent transcription termination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(14), pp.5376–5381.
- Holmqvist, E. et al., 2010. Two antisense RNAs target the transcriptional regulator CsgD to inhibit curli synthesis. *Embo J*, 29(11), pp.1840–1850.
- Hsieh, P.K. et al., 2013. Specificity of RppH-dependent RNA degradation in Bacillus subtilis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(22), pp.8864–8869.
- Huntzinger, E. et al., 2005. Staphylococcus aureus RNAPIII and the endoribonuclease III coordinately regulate spa gene expression. *Embo J*, 24(4), pp.824–835.
- Ikeda, Y. et al., 2011. Hfq binding at RhlB-recognition region of RNase E is crucial for the rapid degradation of target mRNAs mediated by sRNAs in Escherichia coli. *Mol Microbiol*, 79(2), pp.419–432.
- Irani, M. & Maitra, P.K., 1974. Isolation and characterization of Escherichia coli mutants defective in enzymes of glycolysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 56(1), pp.127–133.
- Johnson Jr., J.E. et al., 2012. B12 cofactors directly stabilize an mRNA regulatory switch. *Nature*, 492(7427), pp.133–137.
- Kalamorz, F. et al., 2007. Feedback control of glucosamine-6-phosphate synthase GlmS expression depends on the small RNA GlmZ and involves the novel protein YhbJ in Escherichia coli. *Mol Microbiol*, 65(6), pp.1518–1533.
- Kearney, K.R. & Nomura, M., 1987. Secondary structure of the autoregulatory mRNA binding site of ribosomal protein L1. *Mol Gen Genet*, 210(1), pp.60–68.
- Khemici, V. et al., 2008. The RNase E of Escherichia coli is a membrane-binding protein. *Mol Microbiol*, 70(4), pp.799–813.
- Komissarova, N. & Kashlev, M., 1997. RNA polymerase switches between inactivated and activated states By translocating back and forth along the DNA and the RNA. *J Biol Chem*, 272(24), pp.15329–15338.

- Kudla, G. et al., 2009. Coding-sequence determinants of gene expression in *Escherichia coli*. *Science*, 324(5924), pp.255–258.
- Kushner, S.R., 2002. mRNA decay in *Escherichia coli* comes of age. *J Bacteriol*, 184(17), pp.4658–65; discussion 4657.
- Lalaouna, D. et al., 2013. Regulatory RNAs and target mRNA decay in prokaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(6-7), pp.742–747.
- Landick, R., 2009. Transcriptional pausing without backtracking. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(22), pp.8797–8798.
- Landick, R., Carey, J. & Yanofsky, C., 1985. Translation activates the paused transcription complex and restores transcription of the *trp* operon leader region. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(14), pp.4663–4667.
- Lau, L.F., Roberts, J.W. & Wu, R., 1982. Transcription terminates at lambda tR1 in three clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79(20), pp.6171–6175.
- De Lay, N. & Gottesman, S., 2012. A complex network of small non-coding RNAs regulate motility in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 86(3), pp.524–538.
- De Lay, N., Schu, D.J. & Gottesman, S., 2013. Bacterial small RNA-based negative regulation: Hfq and its accomplices. *Journal of Biological Chemistry*, 288(12), pp.7996–8003.
- Lemay, J.F. et al., 2011. Comparative study between transcriptionally- and translationally-acting adenine riboswitches reveals key differences in riboswitch regulatory mechanisms. *PLoS Genet*, 7(1), p.e1001278.
- Li, Z. & Deutscher, M.P., 2002. RNase E plays an essential role in the maturation of *Escherichia coli* tRNA precursors. *RNA (New York, N.Y.)*, 8(1), pp.97–109.
- Li, Z., Pandit, S. & Deutscher, M.P., 1999. RNase G (CafA protein) and RNase E are both required for the 5' maturation of 16S ribosomal RNA. *EMBO Journal*, 18(10), pp.2878–2885.
- Link, T.M., Valentin-Hansen, P. & Brennan, R.G., 2009. Structure of *Escherichia coli* Hfq bound to polyriboadenylate RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(46), pp.19292–19297.
- Liu, J.D. & Parkinson, J.S., 1989. Genetics and sequence analysis of the *pcnB* locus, an *Escherichia coli* gene involved in plasmid copy number control. *J Bacteriol*, 171(3), pp.1254–1261.

- Lu, F. & Taghbalout, A., 2014. The Escherichia coli major exoribonuclease RNase II is a component of the RNA degradosome. *Biosci Rep*, 34(6), p.e00166.
- Lundberg, U. & Altman, S., 1995. Processing of the precursor to the catalytic RNA subunit of RNase P from Escherichia coli. *RNA (New York, N.Y.)*, 1(3), pp.327–334.
- Mackie, G.A., 1998. Ribonuclease E is a 5'-end-dependent endonuclease. *Nature*, 395(6703), pp.720–723.
- Mackie, G.A., 2013. RNase E: at the interface of bacterial RNA processing and decay. *Nat Rev Microbiol*, 11(1), pp.45–57.
- Massé, E., Escorcía, F.E. & Gottesman, S., 2003. Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in Escherichia coli. *Genes and Development*, 17(19), pp.2374–2383.
- Meyer, M.M. et al., 2008. Confirmation of a second natural preQ1 aptamer class in Streptococcaceae bacteria. *Rna*, 14(4), pp.685–695.
- Mika, F. & Hengge, R., 2014. Small RNAs in the control of RpoS, CsgD, and biofilm architecture of Escherichia coli. *RNA Biol*, 11(5), pp.494–507.
- Mikulecky, P.J. et al., 2004. Escherichia coli Hfq has distinct interaction surfaces for DsrA, rpoS and poly(A) RNAs. *Nat Struct Mol Biol*, 11(12), pp.1206–1214.
- Moller, T. et al., 2002. Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction. *Mol Cell*, 9(1), pp.23–30.
- Morita, T. et al., 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(4), pp.1063–1075.
- Morita, T., Maki, K. & Aiba, H., 2005. RNase E-based ribonucleoprotein complexes: Mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. *Genes and Development*, 19(18), pp.2176–2186.
- Nahvi, A. et al., 2002. Genetic control by a metabolite binding mRNA. *Chem Biol*, 9(9), p.1043.
- Narberhaus, F., Waldminghaus, T. & Chowdhury, S., 2006. RNA thermometers. *FEMS Microbiol Rev*, 30(1), pp.3–16.
- Nechooshtan, G. et al., 2009. A pH-responsive riboregulator. *Genes Dev*, 23(22), pp.2650–2662.

- Nogueira, T. et al., 2001. The relationship between translational control and mRNA degradation for the Escherichia coli threonyl-tRNA synthetase gene. *Journal of molecular biology*, 310(4), pp.709–722.
- Nou, X. & Kadner, R.J., 2000. Adenosylcobalamin inhibits ribosome binding to btuB RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(13), pp.7190–7195.
- Nou, X. & Kadner, R.J., 1998. Coupled changes in translation and transcription during cobalamin- dependent regulation of btuB expression in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, 180(24), pp.6719–6728.
- Nudler, E. & Mironov, A.S., 2004. The riboswitch control of bacterial metabolism. *Trends Biochem Sci*, 29(1), pp.11–17.
- Osterman, I.A. et al., 2012. Comparison of mRNA features affecting translation initiation and reinitiation. *Nucleic Acids Res*, 41(1), pp.474–486.
- Otaka, H. et al., 2011. PolyU tail of rho-independent terminator of bacterial small RNAs is essential for Hfq action. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(32), pp.13059–13064.
- Papenfert, K. & Vanderpool, C.K., 2015. Target activation by regulatory RNAs in bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 39(3), pp.362–378.
- Peano, C. et al., 2015. Characterization of the Escherichia coli σ (S) core regulon by Chromatin Immunoprecipitation-sequencing (ChIP-seq) analysis. *Scientific reports*, 5, p.10469.
- Perdrizet 2nd, G.A. et al., 2012. Transcriptional pausing coordinates folding of the aptamer domain and the expression platform of a riboswitch. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(9), pp.3323–3328.
- Peselis, A. & Serganov, A., 2012. Structural insights into ligand binding and gene expression control by an adenosylcobalamin riboswitch. *Nat Struct Mol Biol*, 19(11), pp.1182–1184.
- Peters, J.M. et al., 2014. Rho and NusG suppress pervasive antisense transcription in Escherichia coli. *Genes Dev*, 26(23), pp.2621–2633.
- Peters, J.M. et al., 2009. Rho directs widespread termination of intragenic and stable RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(36), pp.15406–15411.
- Peters, J.M., Vangeloff, A.D. & Landick, R., 2011. Bacterial transcription terminators: the RNA 3'-end chronicles. *J Mol Biol*, 412(5), pp.793–813. Available at:
- Pfeiffer, V. et al., 2009. Coding sequence targeting by MicC RNA reveals bacterial mRNA silencing downstream of translational initiation. *Nature structural & molecular biology*, 16(8), pp.840–846.

- Prevost, K. et al., 2007. The small RNA RyhB activates the translation of shiA mRNA encoding a permease of shikimate, a compound involved in siderophore synthesis. *Mol Microbiol*, 64(5), pp.1260–1273.
- Prévost, K. et al., 2011. Small RNA-induced mRNA degradation achieved through both translation block and activated cleavage. *Genes and Development*, 25(4), pp.385–396.
- Proshkin, S. et al., 2010. Cooperation between translating ribosomes and RNA polymerase in transcription elongation. *Science*, 328(5977), pp.504–508.
- Prud'homme-Genereux, A. et al., 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(5), pp.1409–1421.
- Raghavan, R., Groisman, E.A. & Ochman, H., 2011. Genome-wide detection of novel regulatory RNAs in E. coli. *Genome Research*, 21(9), pp.1487–1497.
- Rentmeister, A. et al., 2007. Conformational changes in the expression domain of the Escherichia coli thiM riboswitch. *Nucleic Acids Res*, 35(11), pp.3713–3722.
- Roth, J.R., Lawrence, J.G. & Bobik, T.A., 1996. Cobalamin (coenzyme B12): synthesis and biological significance. *Annu Rev Microbiol*, 50, pp.137–181.
- Schumacher, M.A. et al., 2002. Structures of the pleiotropic translational regulator Hfq and an Hfq-RNA complex: a bacterial Sm-like protein. *Embo J*, 21(13), pp.3546–3556.
- Serganov, A. et al., 2006. Structural basis for gene regulation by a thiamine pyrophosphate-sensing riboswitch. *Nature*, 441(7097), pp.1167–1171.
- Serganov, A. & Nudler, E., 2013. A decade of riboswitches. *Cell*, 152(1-2), pp.17–24.
- Sevostyanova, A. & Artsimovitch, I., 2010. Functional analysis of Thermus thermophilus transcription factor NusG. *Nucleic Acids Res*, 38(21), pp.7432–7445.
- De Smit, M.H. et al., 2008. Intracistronic transcriptional polarity enhances translational repression: a new role for Rho. *Mol Microbiol*, 69(5), pp.1278–1289.
- Stead, M.B. et al., 2011. Analysis of Escherichia coli RNase E and RNase III activity in vivo using tiling microarrays. *Nucleic Acids Res*, 39(8), pp.3188–3203.
- Strahl, H. et al., 2015. Membrane recognition and dynamics of the RNA degradosome. *PLoS Genet*, 11(2), p.e1004961.
- Sudarsan, N., Barrick, J.E. & Breaker, R.R., 2003. Metabolite-binding RNA domains are present in the genes of eukaryotes. *RNA (New York, N.Y.)*, 9(6), pp.644–647.

- Takemoto, N., Tanaka, Y. & Inui, M., 2014. Rho and RNase play a central role in FMN riboswitch regulation in *Corynebacterium glutamicum*. *Nucleic Acids Res*, 43(1), pp.520–529.
- Thomason, M.K. & Storz, G., 2010. Bacterial antisense RNAs: how many are there, and what are they doing? *Annual review of genetics*, 44, pp.167–188.
- Toraya, T., Honda, S. & Fukui, S., 1979. Fermentation of 1,2-propanediol with 1,2-ethanediol by some genera of Enterobacteriaceae, involving coenzyme B12-dependent diol dehydratase. *J Bacteriol*, 139(1), pp.39–47.
- Tsai, Y.C. et al., 2012. Recognition of the 70S ribosome and polysome by the RNA degradosome in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 40(20), pp.10417–10431.
- Urban, J.H. et al., 2007. A conserved small RNA promotes discoordinate expression of the *glmUS* operon mRNA to activate GlnS synthesis. *J Mol Biol*, 373(3), pp.521–528.
- Vanzo, N.F. et al., 1998. Ribonuclease E organizes the protein interactions in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Genes Dev*, 12(17), pp.2770–2781.
- Vecerek, B., Moll, I. & Blasi, U., 2005. Translational autocontrol of the *Escherichia coli* *hfq* RNA chaperone gene. *Rna*, 11(6), pp.976–984.
- Viegas, S.C. et al., 2011. Regulation of the small regulatory RNA MicA by ribonuclease III: a target-dependent pathway. *Nucleic Acids Res*, 39(7), pp.2918–2930.
- Vogel, J. & Luisi, B.F., 2011. Hfq and its constellation of RNA. *Nature reviews. Microbiology*, 9(8), pp.578–589.
- Vytvytska, O. et al., 2000. Hfq (HF1) stimulates *ompA* mRNA decay by interfering with ribosome binding. *Genes Dev*, 14(9), pp.1109–1118.
- Wassarman, K.M. & Storz, G., 2000. 6S RNA regulates *E. coli* RNA polymerase activity. *Cell*, 101(6), pp.613–623.
- Winkler, W., Nahvi, A. & Breaker, R.R., 2002. Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature*, 419(6910), pp.952–956.
- Zhang, A. et al., 2003. Global analysis of small RNA and mRNA targets of Hfq. *Mol Microbiol*, 50(4), pp.1111–1124.