

Université de Sherbrooke

**Découverte de nouveaux mécanismes d'actions des petits ARNs régulateurs bactériens**

Par  
Guillaume Desnoyers  
Département de biochimie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention  
du grade de *Philosophiae Doctor* (Ph.D.) en biochimie

Sherbrooke, Québec, Canada  
Septembre 2012

Membre du jury d'évaluation  
Dr Eric Massé (Biochimie)  
Dr François Bachand (Biochimie)  
Dr François Malouin (Biologie, Faculté des Sciences)  
Dre Pascale Romby (Université de Strasbourg)



Library and Archives  
Canada

Published Heritage  
Branch

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*ISBN: 978-0-494-94435-6*

*Our file Notre référence*

*ISBN: 978-0-494-94435-6*

#### NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

#### AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

# Découverte de nouveaux mécanismes d'actions des petits ARNs régulateurs bactériens

Par  
Guillaume Desnoyers  
Département de Biochimie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du grade *Philosophiae Doctor* (Ph.D.) en biochimie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Le concept d'opéron, défini en 1960 par Jacob et Monod comme étant un groupe de gènes transcrits ensemble et dont les produits concourent à la réalisation d'une même fonction physiologique, est resté jusqu'à tout récemment pratiquement inchangé. Selon ce modèle, toute régulation génétique a lieu au niveau transcriptionnel et est médiée par des facteurs protéiques. Cependant, au cours de la dernière décennie, une révolution a eu lieu alors qu'il fut démontré que des petites molécules d'ARN, appelés sRNAs (small RNAs), sont capables de réprimer de manière post-transcriptionnelle l'expression d'ARN messagers (ARNm) chez les procaryotes. Leur mécanisme d'action consiste généralement à inhiber la traduction d'un ARNm en compétitionnant avec la liaison des ribosomes sur le site de liaison des ribosomes (SLR) situé dans la région 5' non traduite d'un ARNm. Cette inhibition de la traduction s'accompagne généralement d'une dégradation rapide de l'ARNm cible.

Les recherches que j'ai effectuées au cours de mes études de 2e et 3e cycle ont permis de découvrir des mécanismes alternatifs par lesquels les sRNAs peuvent réprimer l'expression d'ARNm cibles. J'ai tout d'abord démontré que l'expression du petit ARN RyhB lors d'une carence en fer entraîne la dégradation seulement partielle de l'ARNm polycistronique *iscRSUA*.

De plus, j'ai participé à l'élucidation du mécanisme de dégradation d'un ARNm par l'action d'un sRNA. En effet, nous démontrons que le site de clivage de la RNase E se situe plusieurs centaines de nucléotides en aval dans le cadre de lecture de la cible et que l'arrêt de la traduction n'est pas suffisant à l'obtention d'une dégradation rapide d'un ARNm cible.

Finalement, j'ai caractérisé un nouveau mécanisme par lequel un sRNA peut réprimer la traduction d'un ARNm en s'appariant loin en amont du SLR par le recrutement de la protéine chaperon Hfq. Nous démontrons que c'est la protéine qui joue le rôle principal dans la compétition avec les ribosomes.

Mots-clés : *Escherichia coli*, régulation post-transcriptionnelle, petit ARN régulateur, dégradation de l'ARN, répression de la traduction.

## TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES .....	1
LISTE DES FIGURES.....	5
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	6
CHAPITRE 1: INTRODUCTION.....	7
1. La réponse aux stress chez <i>Escherichia coli</i> .....	7
1.1 La carence de fer .....	7
1.2 La répression catabolique.....	10
2. Régulation génétique au niveau traductionnel chez <i>E. coli</i> .....	12
2.1 Aperçu de l'initiation de la traduction.....	13
2.2 Mécanismes de régulation de la traduction .....	15
2.2.1 Les protéines liant l'ARN .....	15
2.2.2 La régulation ARN-dépendante .....	16
3. Dégradation de l'ARNm chez <i>Escherichia coli</i> .....	17
3.1 Le dégradosome ARN.....	18
3.1.1 La RNase E .....	19
3.1.2 La PNPase .....	21
3.1.3 L'ARN hélicase RhlB .....	22
3.1.4 L'énolase .....	22
3.2 Autres facteurs impliqués dans la dégradation de l'ARN .....	23
3.2.1 La poly(A)-polymérase .....	23
3.2.2 RppH .....	24
3.3 Vue d'ensemble de la dégradation des ARNm .....	24
4. Les petits ARNs régulateurs.....	26
4.1 Historique de leurs découvertes .....	26
4.2 Caractéristiques générales et fonctions .....	28
4.2.1 Hfq .....	29
4.3 Mécanismes d'actions .....	31
4.3.1 Mécanismes alternatifs de répression traductionnelle.....	33
4.4 RyhB .....	34
4.5 Spot42 .....	37



5. Hypothèses et objectifs de recherche .....	38
CHAPITRE 2 .....	40
Résumé.....	41
Small RNA-induced differential degradation of the polycistronic mRNA <i>iscRSUA</i> .....	42
ABSTRACT.....	43
INTRODUCTION .....	44
RESULTS .....	47
DISCUSSION .....	64
MATERIALS AND METHODS.....	71
ACKNOWLEDGEMENTS .....	76
REFERENCES.....	77
CHAPITRE 3 .....	81
Résumé.....	82
Small RNA-induced mRNA degradation achieved through both translation block and activated cleavage.....	83
ABSTRACT.....	84
INTRODUCTION .....	85
RESULTS .....	88
DISCUSSION .....	103
ACKNOWLEDGMENTS.....	114
MATERIALS AND METHODS.....	115
REFERENCES.....	120
Supporting Online Materials for .....	124
CHAPITRE 4 .....	132
Résumé.....	133
Non-canonical repression of translation initiation through small RNA-recruitment of the RNA chaperone Hfq.....	134
ABSTRACT.....	135
INTRODUCTION .....	136
RESULTS .....	139
DISCUSSION .....	162
MATERIAL AND METHODS .....	166
ACKNOWLEDGMENTS.....	170
REFERENCES.....	171

Supplemental Material .....	176
CHAPITRE 5 : DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....	186
1. Répression de la traduction par les petits ARNs.....	186
1.1 Rôle direct de Hfq dans la répression traductionnelle.....	187
1.2 Hfq n'est pas essentielle à l'appariement sRNA-mRNA <i>in vivo</i> .....	192
1.3 Effet polaire d'un sRNA sur la traduction d'un ARN polycistronique.....	194
2. Mécanisme de dégradation de l'ARNm par un petit ARN bactérien.....	196
2.1 Dégradation active sRNA-dépendante d'un ARNm .....	196
2.2 Dégrader ou pas un ARNm? .....	199
2.3 Dégradation partielle d'un ARNm par un sRNA .....	201
2.3.1 Conservation du mécanisme de dégradation partielle d'un ARNm .....	204
3. Conclusions.....	207
REMERCIEMENTS.....	209
LISTE DES PUBLICATIONS .....	211

## **LISTE DES TABLEAUX**

### **Introduction**

Tableau 1. Cibles potentielles de RyhB identifiées par étude génomique.....	35
---	----

## LISTE DES FIGURES

### Introduction

Figure 1. Régulation de l'homéostasie du fer. ....	9
Figure 2. Régulation de la formation des groupements Fe-S. ....	10
Figure 3. Mécanismes de la répression catabolique. ....	12
Figure 4. Principaux signaux de l'initiation de la traduction. ....	14
Figure 5. Structure schématisée du dégradosome ARN. ....	19
Figure 6. Représentation schématique de la RNase E. ....	21
Figure 7. Mécanisme général de dégradation de l'ARNm. ....	25
Figure 8. Structure de Hfq et son interaction avec l'ARN. ....	30

### Discussion et conclusion

Figure 9. Effet de Hfq sur la répression traductionnelle médiée par RyhB et RybB. ....	189
Figure 10. Répression traductionnelle de <i>sdhC</i> par RyhB en absence du site de liaison à Hfq. ....	191
Figure 11. Recrutement de Hfq par RyhB et Spot42 au SLR de <i>sdhC</i> . ....	192
Figure 12. Appariement de RyhB à <i>sdhC</i> en absence de Hfq. ....	193
Figure 13. Effet de Spot42 sur la traduction de <i>sdhC</i> , <i>sdhD</i> et <i>sdhA</i> . ....	195
Figure 14. Conservation de la séquence intergénique située entre les gènes <i>iscR</i> et <i>iscS</i> . ....	205
Figure 15. Présence potentielle d'une séquence REP dans l'ARNm <i>nanAT</i> . ....	206

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

3' RACE	«Rapid Amplification of cDNA 3' Ends»
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPc	Adenosine monophosphate cyclique
antiSD	Anti-Shine-Dalgarno (séquence)
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transfert
CRP	«cAMP receptor protein»
Fe	Fer
[Fe-S]	Groupement Fer-Soufre
miRNA	«micro-RNA»
PAP1	Poly(A) polymérase 1
PNPase	Polynucléotide phosphorylase
RCC	Répression catabolique du carbone
RNase	Ribonucléase
RNT 5'	Région non-traduite en 5'
SD	Shine-Dalgarno (séquence)
SLR	Site de liaison du ribosome
sRNA	«small RNA»

## CHAPITRE 1: INTRODUCTION

### 1. La réponse aux stress chez *Escherichia coli*

Pour survivre, tout organisme vivant doit être en mesure de s'adapter à son environnement. C'est pourquoi des mécanismes d'adaptation aux stress sont présents chez les organismes de tous les domaines de la vie. Ces mécanismes sont particulièrement importants pour des microorganismes comme les *Enterobacteriaceae* (p. ex. *Escherichia coli*, *Salmonella sp*) qui peuvent vivre dans une multitude d'environnements différents. En effet, ces bactéries pouvant être pathogènes pour l'Homme doivent être en mesure de s'adapter rapidement à l'environnement dans leur hôte ainsi qu'à l'extérieur. Par exemple, les souches pathogènes d'*E. coli* doivent survivre aux conditions de pH acide de l'estomac, aux sels biliaires et aux acides organiques de l'intestin pour finalement compétitionner efficacement avec la flore intestinale pour les nutriments qui sont présents en quantités limitantes (Croxen et Finlay, 2010).

Pour survivre et causer des infections, plusieurs bactéries ont donc développé différents mécanismes pour détecter ces différentes conditions et s'y adapter rapidement en altérant l'expression de leurs gènes. Traditionnellement, on pensait que ces changements d'expression s'effectuaient uniquement au niveau de la transcription (Jacob et Monod, 1961). Cependant, au cours des dernières années, plusieurs mécanismes de régulation post-transcriptionnelle ont été découverts, notamment la régulation par des petits ARN régulateurs (voir chapitre 4).

#### 1.1 La carence de fer

Le fer (Fe) est un élément essentiel à pratiquement tous les organismes vivants. Grâce à son grand pouvoir d'oxydoréduction, l'ion de fer est un cofacteur nécessaire à un grand nombre d'enzymes. Cette utilisation du fer en tant que cofacteur se fait souvent sous la forme de groupement fer-soufre (Fe-S). Les groupement Fe-S sont considéré comme étant parmi les plus anciens groupements prosthétiques sur Terre en raison de la grande abondance du fer et du soufre à l'époque prébiotique et de la présence de protéines utilisant les groupements

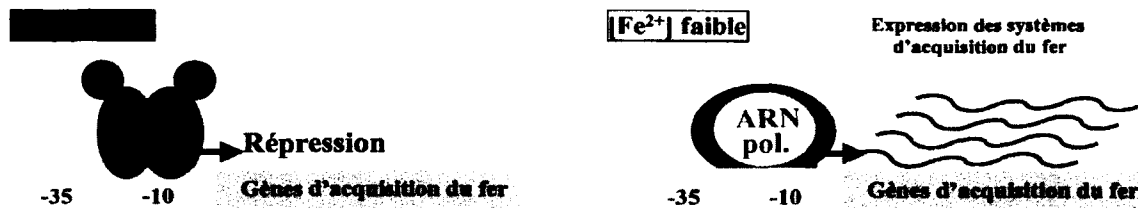
Fe-S comme cofacteur dans tous les domaines de la vie et dans des processus cellulaires essentiels et diversifiés, telles la respiration cellulaire, la régulation génétique, les modifications à l'ARN et la réplication et la réparation de l'ADN (Fontecave, 2006; Py et Barras, 2010). Pour cette raison, il n'est pas surprenant de retrouver des protéines liant les groupements Fe-S chez tous les organismes vivants (Beinert, 2000).

Même si le fer est l'un des éléments les plus abondants sur terre, sa biodisponibilité est très faible puisqu'en présence d'oxygène et à pH neutre, le fer se retrouve sous forme oxydée non soluble. De plus, chez les mammifères, la présence de protéines séquestrant le fer comme la transferrine et la lactoferrine maintiennent une concentration très faible en fer, constituant une première barrière de défense importante contre les invasions bactériennes (Fischbach *et al.*, 2006). Pour cette raison, plusieurs bactéries ont développé des systèmes d'acquisition du fer très performant. Chez *E. coli*, plusieurs molécules possédant une très haute affinité pour les ions  $Fe^{3+}$ , appelées sidérophores, sont synthétisées (Miethke et Marahiel, 2007). Ces molécules sont excrétées par la cellule pour aller capter le fer libre et sont ensuite importées dans la cellule par des transporteurs spécifiques.

Malgré le fait que le fer soit essentiel, il peut aussi devenir toxique lorsque présent en concentration trop élevée. En effet, le fer sous forme réduite peut réagir avec le peroxyde ( $H_2O_2$ ) pour générer des ions hydroxyles ( $OH^-$ ) et des radicaux hydroxyles ( $\bullet OH$ ) par une réaction dite de Fenton (Halliwell et Gutteridge, 1992). Les radicaux hydroxyles produits font partis de la famille des espèces réactives à l'oxygène (ROS) et possèdent un grand pouvoir d'oxydation pouvant endommager plusieurs molécules biologiques comme les acides nucléiques, les protéines et les acides gras.

En raison de la nécessité du fer, mais aussi de sa toxicité à grande concentration, les organismes doivent réguler son homéostasie de manière très stricte. La régulation de l'homéostasie du fer chez *E. coli* est illustrée à la figure 1. Le joueur principal en est la protéine Fur (ferric uptake regulator), qui régule l'expression de plus de 90 gènes en réponse à des variations dans les niveaux intracellulaires de  $Fe^{2+}$  (McHugh *et al.*, 2003). Fur, présent dans la cellule sous forme homodimérique, utilise les ions  $Fe^{2+}$  comme cofacteur pour réprimer l'expression de gènes encodant pour les différents systèmes d'importation et d'entreposage du fer (Hantke, 2001). Plus spécifiquement, le complexe

Fur-Fe<sup>2+</sup> reconnaît une séquence de 19 paires de bases, appelé «boîte fer» ou «boîte Fur», et empêche la liaison de l'ARN polymérase au promoteur. Ainsi, lorsque les quantités intracellulaires de fer augmentent, Fur réprime l'expression des protéines responsable de l'importation du métal. Au contraire, lors d'une carence de fer, Fur perd sa capacité à lier l'ADN et les transporteurs de fer sont donc exprimés.



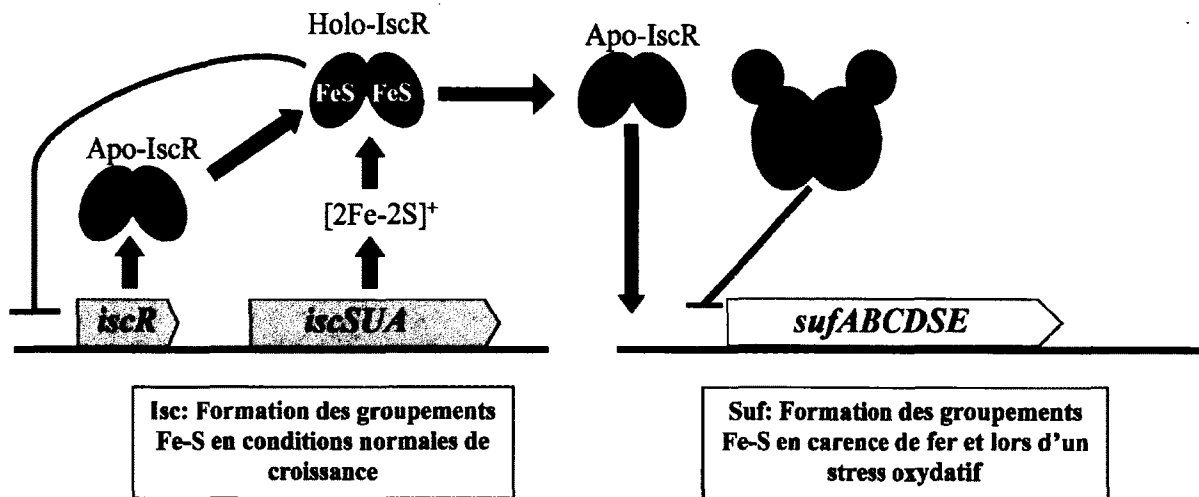
**Figure 1. Régulation de l'homéostasie du fer.**

Lorsque les concentrations intracellulaires de Fe<sup>2+</sup> augmentent, le complexe Fur-Fe lie les promoteurs de plusieurs gènes encodant des protéines responsables de l'acquisition du fer pour empêcher leur transcription. Conséquemment, lorsque les concentrations intracellulaires de Fe<sup>2+</sup> diminuent, Fur perd sa capacité à lier l'ADN et les systèmes d'acquisition du fer sont exprimés.

Une autre facette importante de l'homéostasie du fer est la régulation de la formation des groupements fer-soufre. Chez *E. coli*, deux systèmes sont présents. Le système Isc, encodé par l'opéron *iscRSUA*, est responsable de la biogenèse des groupements Fe-S en conditions normales de croissances (Schwartz *et al.*, 2000; Tokumoto et Takahashi, 2001). Cette machinerie comprend un régulateur transcriptionnel (IscR), une cystéine désulfurase (IscS) et deux protéines d'échafaudage (IscU et IscA). Des souches dans lesquelles les gènes *iscR* ou *iscS* sont inactivés sont viables (Schwartz *et al.*, 2000; Schwartz *et al.*, 2001). Cependant, le rôle important joué par le système Isc chez *E. coli* est illustré par d'importants défauts de croissance suivant l'inactivation du gène *iscS* (Schwartz *et al.*, 2000). Ainsi, une souche  $\Delta$ *iscS* montre une croissance ralentie dans un milieu LB et est auxotrophe pour la thiamine et l'acide nicotinique lors de croissance aérobique. Cependant, contrairement à ce qui est observé chez la bactérie *Azotobacter vinelandii* et la levure *Saccharomyces cerevisiae* chez qui les enzymes responsables de l'activité cystéine désulfurase sont essentielle, une souche  $\Delta$ *iscS* est toujours viable chez *E. coli*. Ceci s'explique par la présence du système Suf chez *E. coli* (Takahashi et Tokumoto, 2002) qui est lui aussi impliqué dans la biogenèse de groupements Fe-S, en conditions de carence de fer et/ou de stress oxydatif (Outten *et al.*, 2004). La machinerie Suf est encodée par



l'opéron *sufABCDSE* et comprend une cystéine désulfurase hétérodimérique (SufS et SufE) et une série de protéines chaperons (SufA, SufB, SufC et SufD). La régulation de la formation des groupements Fe-S s'effectue principalement par l'action des facteurs de transcription IscR (Schwartz *et al.*, 2001) et Fur (Outten *et al.*, 2004) et est décrite dans la figure 2.



**Figure 2. Régulation de la formation des groupements Fe-S.**

La protéine IscR peut se retrouver sous deux formes : holo (sans groupement Fe-S) et apo (lié à un groupement Fe-S). En présence de fer, holo-IscR exerce une rétroaction négative sur l'opéron *iscRSUA* en réprimant sa transcription, assurant une quantité optimale de groupement Fe-S dans la cellule (Schwartz *et al.*, 2001). En carence de fer et/ou lors d'un stress oxydatif, IscR se retrouve sous sa forme apo qui agit comme activateur de la transcription de l'opéron *sufABCDSE* (Lee *et al.*, 2008). La protéine Fur joue aussi un rôle dans ce système en réprimant l'expression de l'opéron *sufABCDSE* en présence de fer (Lee *et al.*, 2008).

Récemment, un autre joueur important dans l'homéostasie du fer fut découvert, le petit ARN RyhB (voir section 4.4 de l'introduction). Ce sRNA réprime l'expression de plusieurs gènes encodant des protéines utilisant le fer ce qui libère le fer pour des réactions essentielles. De plus, des données de micropuce à ADN indique que RyhB serait aussi impliqué dans la régulation de la formation des groupements Fe-S en réprimant l'expression des gènes *iscS*, *iscU* et *iscA* (Masse *et al.*, 2005).

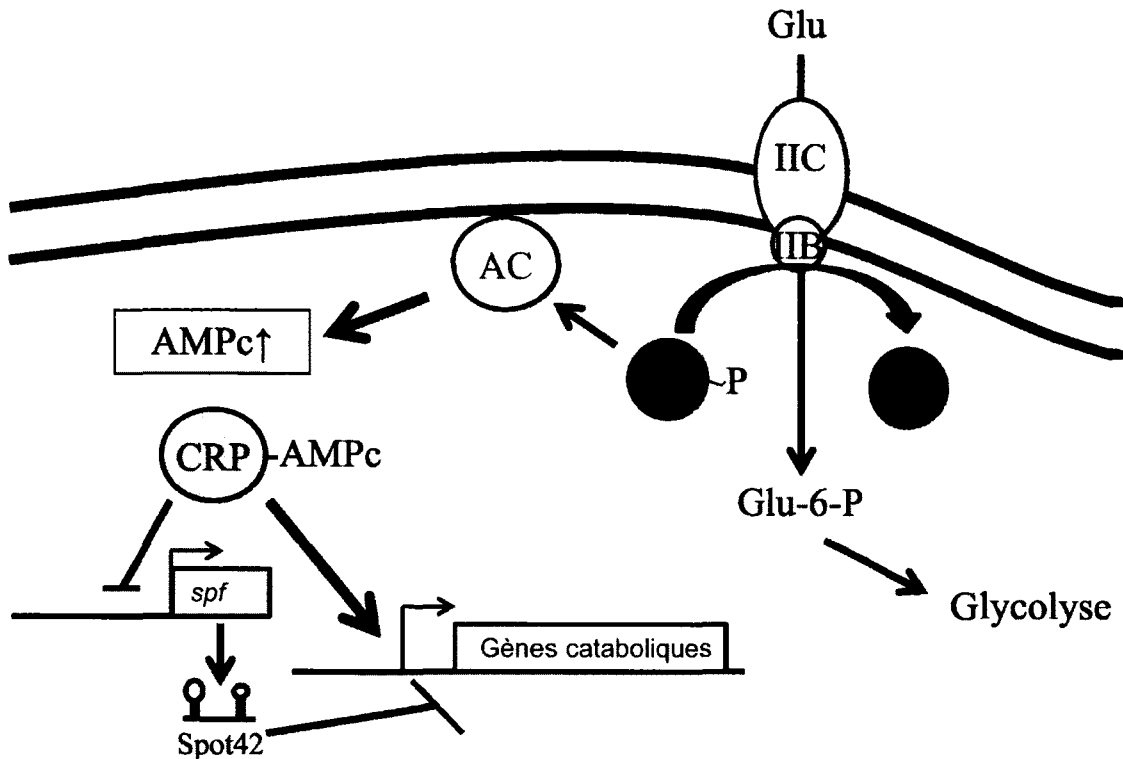
## 1.2 La répression catabolique

Les différentes espèces bactériennes ont habituellement la capacité d'utiliser plusieurs sources de carbone pour assurer leur croissance. Pour compétitionner efficacement dans un environnement, une bactérie doit être en mesure d'utiliser la source de carbone la plus énergétique tout en réprimant l'utilisation des sources de carbones énergiquement pauvres. L'exemple le plus célèbre d'utilisation sélective d'une source de carbone a été caractérisé en 1942 par Jacques Monod qui a démontré l'utilisation séquentielle du glucose et du lactose chez *E. coli* (Monod, 1942). Des études subséquentes ont démontré que l'utilisation préférentielle du glucose était une caractéristique présente chez de nombreuses espèces procaryotes et eucaryotes. De plus, il fut démontré que la présence de glucose dans le milieu empêchait l'utilisation de sources de carbone secondaires par un mécanisme se nommant répression catabolique du carbone (RCC). La RCC a été largement étudiée chez *E. coli* chez qui il s'agit de l'un des mécanismes de régulation génétique les plus importants, environ 10 % des gènes y étant assujettis (Liu *et al.*, 2005).

Le mécanisme général de la RCC chez *E. coli* est illustré à la Figure 3. Les acteurs principaux en sont la protéine CRP (cAMP receptor protein) qui agit comme activateur de transcription lorsque complexé à l'AMP cyclique (AMPc), l'adénylate cyclase qui produit l'AMPc et la sous-unité EIIA du transporteur spécifique au glucose  $EII^{Glc}$  (Gorke et Stulke, 2008). La régulation de la RCC dépend du niveau de phosphorylation du transporteur  $EII^{Glc}$ . En absence de glucose dans le milieu,  $EII^{Glc}$  est majoritairement phosphorylé.  $EII^{Glc}$ -P active la synthèse d'AMPc par l'adénylate cyclase (Harwood *et al.*, 1976). Le complexe CRP-AMPc agit ensuite comme activateur de la transcription des gènes impliqués dans le catabolisme. Au contraire, lorsqu'il y a présence de glucose dans le milieu, celui-ci pénètre dans la cellule par le transporteur  $EII^{Glc}$  et il y a transfert du groupement phosphate de  $EII^{Glc}$  vers le glucose.  $EII^{Glc}$  perd alors la capacité de lier l'adénylate cyclase pour l'activer.

Comme indiqué plus haut, l'expression d'environ 10 % des gènes chez *E. coli* serait contrôlée par la RCC. Cependant, tous ces gènes ne sont pas tous régulés directement par le complexe CRP-AMPc (Polayes *et al.*, 1988). En effet, le sRNA Spot42, dont la transcription est réprimée par le complexe CRP-AMPc, a récemment été identifié comme joueur lors de la RCC alors qu'il réprime l'expression de plusieurs ARNm encodant pour

des gènes cataboliques de manière à amplifier l'action du complexe CRP-AMPc (Beisel et Storz, 2011). La section 4.5 de l'introduction traite plus en profondeur de ce sRNA.



**Figure 3. Mécanismes de la répression catabolique.**

En carence de glucose, les niveaux d'AMPc augmentent et le complexe active la transcription de plusieurs gènes impliqués dans le catabolisme tout en réprimant l'expression du sRNA Spot42. La présence de glucose entraîne une diminution d'AMPc et une perte d'activité de CRP. Il est à noter que le mécanisme présenté ici est une simplification. Pour plus de détails, voir (Gorke et Stulke, 2008).

## 2. Régulation génétique au niveau traductionnel chez *E. coli*

Les bactéries doivent pouvoir s'adapter rapidement à des conditions environnementales changeantes en modifiant l'expression de leurs gènes. Traditionnellement, on croyait que cette régulation s'effectuait exclusivement au niveau de l'initiation de la transcription par l'action de facteurs protéiques (facteurs de transcription) (Jacob et Monod, 1961). Cependant, au cours des dernières années, il fut démontré que plusieurs stratégies pour

réguler l'expression des gènes de manière post-transcriptionnelle sont aussi utilisées. Parmi celles-ci, la régulation de l'initiation de la traduction est l'un des plus utilisés.

La traduction est divisée en quatre grandes étapes : l'initiation, l'élongation, la terminaison et le recyclage des ribosomes. Comme elle constitue l'étape limitante de la traduction, l'initiation est de loin la plus régulée (Boni, 2006). Pour bien en comprendre les différents mécanismes de régulation, il est essentiel de d'abord connaître les grands principes de l'initiation de la traduction.

## 2.1 Aperçu de l'initiation de la traduction

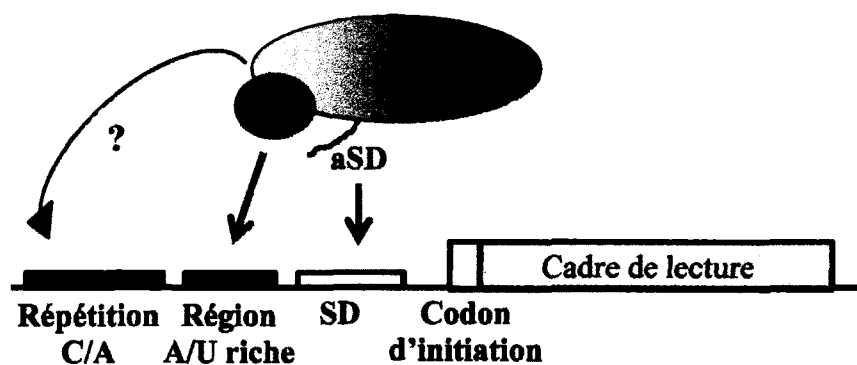
Chez les procaryotes, la traduction et la transcription sont des mécanismes couplés, c'est-à-dire que la traduction s'amorce en même temps que la transcription s'effectue. Ainsi, dès que les signaux d'initiation de la traduction sont transcrits, les ribosomes s'y associent. C'est la sous-unité 30S du ribosome qui amorce la traduction alors qu'elle se lie à une région appelée site de liaison des ribosomes (SLR). Cette région comprend la région de l'ARNm nécessaire à la liaison de la sous-unité 30S du ribosome. Il fût démontré, par des expériences de protection aux ribonucléases (RNases), que les limites physiques du complexe d'initiation 30S s'étendraient des nucléotides -20 à +15, relatif au premier nucléotide du codon d'initiation (Beyer *et al.*, 1994; Huttenhofer et Noller, 1994).

Le principal signal reconnu par la sous-unité 30S du ribosome la séquence Shine-Dalgarno (SD) sur l'ARNm situé de 7 à 10 nucléotides en amont de codon d'initiation. Cette séquence est reconnue par la séquence anti-Shine-Dalgarno (antiSD) présente sur l'ARN ribosomal (ARNr) 16s contenue dans la sous-unité ribosomale 30S (Shine et Dalgarno, 1974; Steitz et Jakes, 1975). L'interaction SD-antiSD dirige ensuite le codon d'initiation de la traduction au site P de la sous-unité 30S du ribosome. Le complexe d'initiation 30S est alors stabilisé par l'arrivée de l'ARN de transfert (ARNt) initiateur au site P qui forme une interaction codon-anticodon avec l'ARNm. Comme les deux premières étapes de l'initiation de la traduction dépendent d'appariement ARN-ARN (SD-antiSD et codon-anticodon), l'initiation est très sensible à la présence de structure secondaire dans l'ARNm pouvant empêcher ces interactions (de Smit et van Duin, 1990).

En addition de la séquence SD et du codon d'initiation, d'autres séquences présentes sur l'ARNm ont été démontrées comme étant importantes lors de l'initiation de la traduction.

C'est le cas des séquences riches en nucléotides A et U (région A/U riche) (Zhang et Deutscher, 1992; Komarova *et al.*, 2005; Hook-Barnard *et al.*, 2007). Il fut démontré que ces séquences A/U riches sont reconnues et liées par la protéine ribosomale S1 (Komarova *et al.*, 2002), constituante intégrale de la sous-unité 30S du ribosome. S1 est composé d'une portion N-terminale qui est responsable de son incorporation à la sous-unité 30S du ribosome et une portion C-terminale qui possède une activité de liaison à l'ARN (Subramanian, 1983). Il est important de noter que la protéine S1 est hautement spécifique pour des séquences d'ARN simples brins (Draper et Reynaldo, 1999). La protéine S1 a été démontrée comme étant essentielle à la traduction d'ARNm ne possédant pas de séquence SD, (Tzareva *et al.*, 1994) mais est aussi importante pour la traduction des ARNm canoniques (Tedin *et al.*, 1997; Sorensen *et al.*, 1998; Komarova *et al.*, 2002).

Un autre type de séquences qui furent démontrées comme agissant à titre d'activateur de la traduction sont les répétitions de nucléotides C et A (répétitions C/A). En effet, il fut démontré que ces répétitions peuvent augmenter la traduction d'un ARNm, lorsque présent dans sa région non traduite en 5' (RNT 5') (Martin-Farmer et Janssen, 1999; Sharma *et al.*, 2007). Cependant, le mécanisme exact par lequel ces répétitions C/A activent la traduction d'un ARNm n'est pas connu. Les principaux signaux dans l'ARNm nécessaire à l'initiation de la traduction sont présentés dans la figure 4.



**Figure 4. Principaux signaux de l'initiation de la traduction.**

La reconnaissance initiale entre la sous-unité 30S du ribosome se fait par une interaction SD-aSD ce qui permet d'accommoder le codon d'initiation au site P du ribosome. Des séquences A/U riches, reconnues par la protéine ribosomale S1, facilitent aussi la traduction. Finalement, la présence de répétitions C/A au SLR a aussi un effet positif sur l'initiation de la traduction, par un mécanisme méconnu.

Il est aussi important de noter que chez les procaryotes, la traduction de cadres de lectures adjacents est très souvent couplée, permettant à la cellule de conserver des quantités équimolaires de différentes protéines encodées par un même ARNm polycistronique (Oppenheim et Yanofsky, 1980). Ce mécanisme est basé sur le fait que les ribosomes traduisant un cistron en amont peuvent sauter directement sur le deuxième cistron une fois la traduction du premier peptide terminée. L'initiation de traduction du deuxième cistron est aussi favorisée par l'activité ARN hélicase des ribosomes traduisant le premier cistron peuvent défaire des structures inhibitrices présentes dans la région d'initiation de la traduction du deuxième cistron.

## 2.2 Mécanismes de régulation de la traduction

Comme mentionné dans la section précédente, l'initiation de la traduction dépend d'interactions ARN-ARN (appariements SD-antiSD et codon-anticodon) et protéine-ARN simple brin (S1-séquence A/U riche). Ainsi, tout facteur agissant en *cis* ou en *trans* et pouvant interférer avec ces interactions a le potentiel d'inhiber l'initiation de la traduction. Sans surprise, la bactérie a développé de nombreuses stratégies pour réguler l'initiation de la traduction, utilisant à la fois des protéines et l'ARN pour séquestrer les signaux d'initiation de la traduction.

### 2.2.1 Les protéines liant l'ARN

Les protéines liant l'ARN peuvent réguler l'initiation de la traduction de plusieurs manières. Premièrement, elles peuvent compétitionner directement avec la liaison de la sous-unité ribosomale 30S, comme c'est le cas avec le gène de la thréonyl-tRNA synthétase (Romby et Springer, 2003). Dans ce cas, il fut démontré que la liaison de l'enzyme à son propre SLR peut empêcher la liaison de la sous-unité 30S du ribosome par un mécanisme d'encombrement stérique, et ce même si les sites de liaison de la thréonyl-tRNA synthétase et de la sous-unité 30S sur l'ARNm ne se chevauchent pas directement (Jenner *et al.*, 2005).

Il fut aussi démontré que certaines protéines peuvent inhiber la traduction en favorisant la liaison à l'ARNm de la sous-unité ribosomale 30S dans une conformation inactive qui ne permet pas la liaison de l'ARNt initiateur. C'est le cas pour les protéines ribosomales S15

(Philippe *et al.*, 1993) et S4 (Schlax *et al.*, 2001) qui exercent une autorépression de leur traduction. Dans les deux cas, les protéines agissent comme des facteurs allostériques qui induisent un changement conformationnel dans l'ARNm vers la forme inactive. Ainsi, lorsqu'il y a trop de protéines ribosomales pour la quantité d'ARNr disponible, il y a inhibition de l'initiation de la traduction (Zengel et Lindahl, 1994). Cette autorégulation de la traduction des protéines ribosomale est un mécanisme hautement conservé à travers l'évolution (Geissmann *et al.*, 2009).

Finalement, un exemple intéressant de protéine réprimant la traduction est Hfq (voir la section 4.2.1 pour plus de détails sur cette protéine). En effet, il fut démontré que Hfq réprime la traduction de la protéine membranaire OmpA et celle de son propre ARNm. (Vytvytska *et al.*, 2000; Vecerek *et al.*, 2005). Dans le cas de l'auto-répression de sa traduction, il a été montré que cela s'effectue en liant une séquence qui chevauche avec la séquence SD, suggérant une compétition directe avec la liaison de la sous-unité 30S du ribosome (Vecerek *et al.*, 2005).

## 2.2.2 La régulation ARN-dépendante

Au cours des dernières années, de nombreux mécanismes de régulation traductionnelle impliquant des molécules d'ARNs ont été découverts. Qu'ils agissent en *cis* ou en *trans*, ces ARNs utilisent leur capacité à former des interactions ARN-ARN pour moduler la traduction. Une des premières classes d'ARN régulateurs à avoir été découvert sont les petits ARNs agissant en *trans*, appelés sRNAs. Ces derniers seront discutés plus en détail au chapitre 4.

Plus récemment, des structures d'ARN situées dans les SLR de certains ARNm et capables de réguler l'expression des gènes ont été caractérisées. Le plus simple de ces mécanismes est appelé le thermomètre ARN (Johansson *et al.*, 2002). Le principe en est qu'à basse température, la région RNT 5' de certains ARNm adopte une structure secondaire en tige-boucle qui obstrue les signaux d'initiation de la traduction (séquence SD et/ou codon d'initiation). Cependant, à plus haute température, cette structure n'est pas formée et la liaison de la sous-unité ribosomale 30S peut avoir lieu. Les thermomètres ARN sont habituellement situés dans la RNT 5' d'ARNm encodant des protéines de réponse au choc

thermique ou des facteurs de virulence (Kortmann et Narberhaus, 2012). Dans le cas des facteurs de virulence, le thermomètre ARN permet leurs expressions seulement lorsque la bactérie se trouve à l'intérieur de l'hôte (température plus chaude).

Une autre classe d'ARN agissant en *cis* sont nommés riborégulateurs (Mironov *et al.*, 2002; Winkler *et al.*, 2002). Les riborégulateurs utilisent eux aussi des changements structuraux dans la RNT 5' d'ARNm pour réguler l'expression des gènes. Le principe est que deux structures secondaires d'ARN sont en compétition. Dans l'une des conformations, les signaux d'initiation de la traduction sont séquestrés dans une tige-boucle alors que dans l'autre conformation ils sont libres. Les riborégulateurs sont liés spécifiquement par des métabolites cellulaires et cette liaison fait basculer la structure de la RNT 5' vers l'une ou l'autre des conformations. Ainsi, la liaison d'un métabolite peut activer ou réprimer la traduction d'un ARNm en liant un riborégulateur.

### 3. Dégradation de l'ARNm chez *Escherichia coli*

En plus du taux de traduction, le niveau d'expression des gènes dépend en grande partie de la quantité d'ARNm disponible dans la cellule. Cette quantité d'ARNm est quant à elle dépendante de deux facteurs : les niveaux de transcription et de dégradation de l'ARNm. Les facteurs qui influencent la transcription sont connus. Cependant, les mécanismes de dégradation de l'ARN ne sont étudiés que depuis quelques années et nous commençons seulement à saisir leur rôle dans l'expression des gènes.

Chez *E. coli*, la demi-vie moyenne de l'ARNm total est de 2.4 minutes (à 37 °C). Cette instabilité relative permet aux cellules de cesser rapidement l'expression d'une protéine pour s'adapter à de nouvelles conditions. Cependant, la demi-vie des ARNm varie beaucoup d'un ARN à l'autre et d'une condition à l'autre. De plus, certains gènes contenus sur un même ARNm polycistronique peuvent avoir des demi-vies complètement différentes. Ces observations indiquent que la dégradation des ARNm est un processus hautement régulé qui dépend à la fois de l'expression de plusieurs ribonucléases (RNases) et de caractéristiques intrinsèques à l'ARNm.

D'une manière générale, il existe trois classes d'enzymes capables de dégrader l'ARN (RNase) : les endonucléases qui effectuent un clivage interne de l'ARN, les 5' exonucléases



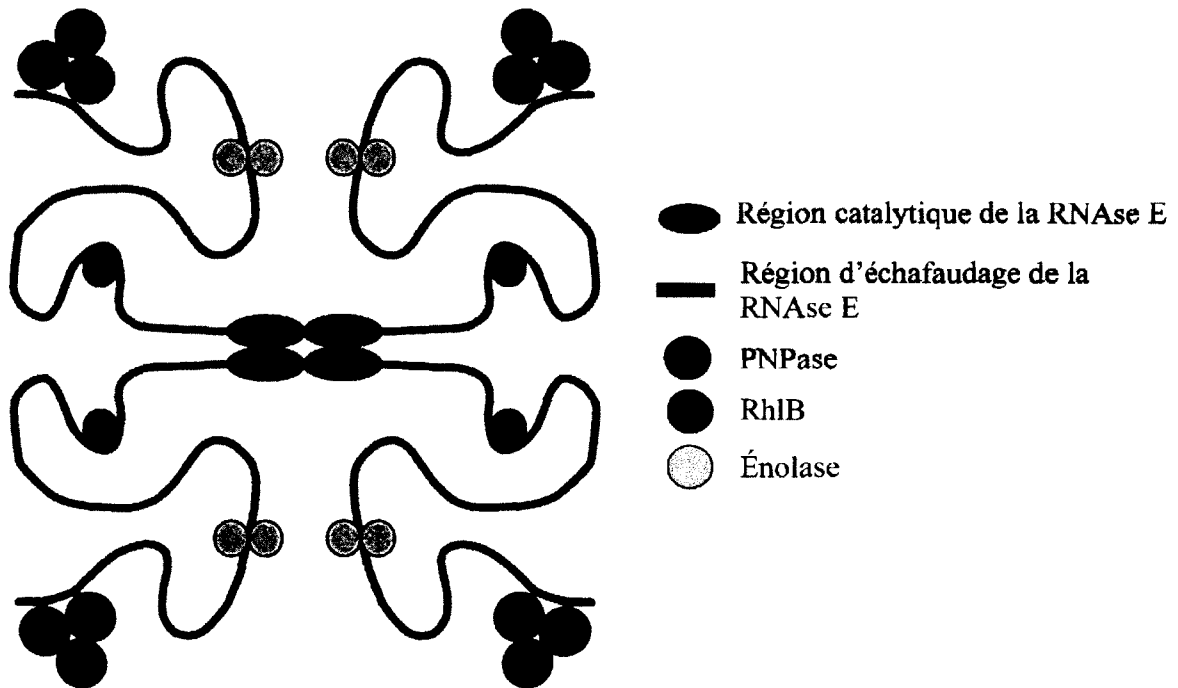
qui dégradent l'ARN à partir de l'extrémité 5' et les 3' exonucléases qui dégradent l'ARN à partir de l'extrémité 3' de l'ARN. Cependant, chez *E. coli*, seulement les activités endonucléases et 3' exonucléases sont retrouvées qui sont à la fois impliqués dans la dégradation des ARNm et dans la maturation d'ARN stables comme les ARNt et les ARNr. Les trois principales endonucléases présentes chez *E. coli* sont la RNase III, la RNase P et la RNase E. La RNase III est spécifique à l'ARN double-brin et est connue comme étant impliqué dans la maturation des ARNr 16S et 23S. Elle régule aussi l'expression de plusieurs ARNm. Ces ARNm sont déstabilisés suite à un clivage par la RNase III dans la RNT 5' ou 3' (Portier *et al.*, 1987; Bardwell *et al.*, 1989; Regnier et Grunberg-Manago, 1990). La RNase P est quant à elle un ribozyme impliqué dans la maturation des ARNt en générant les 5'. Cette enzyme est aussi impliquée dans la maturation de certains ARNm (Alifano *et al.*, 1994; Seif et Altman, 2008). Finalement, la RNase E semble être la principale enzyme impliquée dans la dégradation de l'ARN chez *E. coli*. En effet, dans une souche thermosensible dans laquelle la RNase E est inactivée, la grande majorité des ARNm sont stabilisés (Cohen et McDowall, 1997). Cette enzyme fait aussi partie du dégradosome ARN, un complexe dédié à la dégradation des ARNm (voir chapitre 3.1).

Du côté des 3' exonucléases, on en retrouve deux chez *E. coli*. Il s'agit de la polynucléotide phosphorylase (PNPase) et de la RNase II. Ces deux enzymes dégradent l'ARN de manière processive dans une direction 3' vers 5'. Des mutants simples pour les deux enzymes sont viables alors qu'un double mutant pour les deux exonucléases ne l'est pas, indiquant que les deux RNases ont des activités redondantes (Donovan et Kushner, 1986). De plus, les deux exonucléases sont inhibées par la présence de structures secondaires dans l'ARN qui empêchent leur progression. Cependant, l'association de la PNPase au dégradosome ARN (voir section 3.1) lui permet de dégrader les ARN structurés plus efficacement que la RNase II.

### 3.1 Le dégradosome ARN

Chez *E. coli*, le dégradosome est la machinerie principale de dégradation de l'ARNm. Le cœur de cette machinerie est la RNase E. En effet, la région C-terminale de la RNase E agit comme échafaudage sur lequel viennent se lier les autres constituants du dégradosome, soit la PNPase, l'ARN hélicase RhlB et l'é nolase (voir figure 5). Lorsque purifiés par des

méthodes biochimiques classiques, les différents constituants du dégradosome sont présents en quantité stœchiométrique (Carpousis *et al.*, 1994; Py *et al.*, 1996). Cependant, il semble impossible de déterminer un poids moléculaire précis pour le dégradosome qui est probablement dû à une hétérogénéité quant à sa composition (Carpousis *et al.*, 1994). De plus, il est à noter que la constitution du dégradosome peut changer selon les conditions environnementales. Par exemple, il fut démontré qu'à basse température, l'ARN hélicase RhIB est remplacé par les hélicases CsdA et SrmB (Khemici *et al.*, 2004; Prud'homme-Genereux *et al.*, 2004). Ces hélicases seraient plus efficaces pour défaire les ARN structurés à basse température. L'assemblage du dégradosome n'est pas essentiel à *E. coli*, mais la dégradation de l'ARN et la croissance de la bactérie sont ralenties en son absence (Leroy *et al.*, 2002).



**Figure 5. Structure schématisée du dégradosome ARN.**

La région catalytique de la RNase E forme un tétramère alors que les autres constituants du dégradosome s'associent à la région non structurée de la RNase E. La stœchiométrie des différents constituants semble variable. Adapté de (Carpousis, 2007).

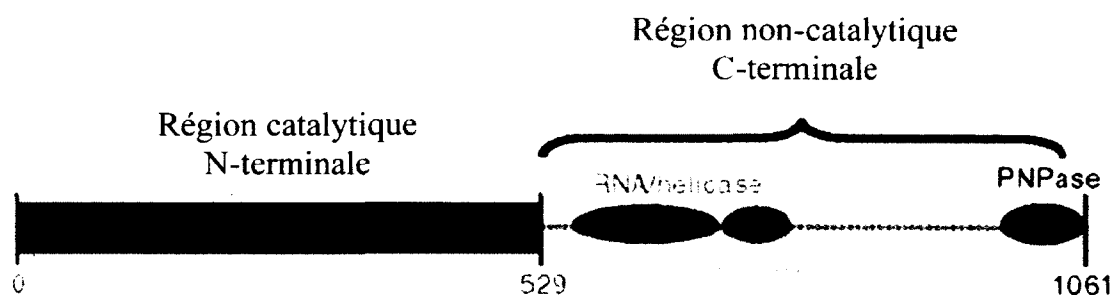
### 3.1.1 La RNase E

La RNase E est une des enzymes clés de la dégradation de l'ARN et est essentielle à la croissance chez *E. coli* (Ono et Kuwano, 1979). La RNase E est une protéine de 1061 acides aminés qui est composée de deux régions : une région N-terminale qui comprend l'activité catalytique essentielle et une région C-terminale non essentielle qui sert d'échafaudage au dégradosome ARN. Ainsi, un allèle de la RNase E dans lequel les 477 résidus situés en C-terminale sont retirés est viable (allèle *rne131*) (Lopez *et al.*, 1999). Une souche contenant l'allèle *rne131* a d'ailleurs été utilisée à plusieurs reprises lors de mes recherches (chapitre 2, 3 et 4).

La RNase E semble préférer cliver les régions A/U riches simple brin, (McDowall *et al.*, 1994) mais sa spécificité n'est pas totalement comprise. En effet, d'autres facteurs semblent être impliqués dans la sélection du site de clivage, notamment le contexte structural du site de clivage (Mackie *et al.*, 1997). La structure au rayon X de la région catalytique de la RNase E complexée à de l'ARN a récemment été élucidée (Callaghan *et al.*, 2005). Cette structure a révélé que l'enzyme forme un homotétramère essentiel à l'action de la RNase E. En effet, il fut démontré que des protomères seuls de RNase E sont incapables de dégrader l'ARN. Le domaine catalytique comprend aussi un site de liaison à l'ARN S1 et une pochette de liaison aux 5' monophosphates de l'ARN. La présence de cette pochette explique pourquoi l'activité de la RNase E est stimulée de 20 à 30 fois par la présence de 5' monophosphates sur l'ARN cible (Mackie, 1998), et ce même si la liaison de la RNase E à l'ARN n'est pas affectée par le statut en phosphate du 5' (Jiang et Belasco, 2004). La pochette de liaison aux 5' monophosphates permettrait plutôt à l'enzyme de positionner le squelette de l'ARN au niveau du site catalytique de l'enzyme (Callaghan *et al.*, 2005). De plus, la structure de la RNase E a révélé la présence d'un canal qui permet le passage d'ARN simple brin, mais pas double brin, expliquant la préférence de l'enzyme pour l'ARN non structuré.

Contrairement à la région N-terminale, la région C-terminale de la RNase E ne possède pas d'activité catalytique. Elle comprend néanmoins différents domaines permettant la liaison d'autres facteurs (voir figure 6). On y retrouve des sites de liaison à la PNPase, RhlB et l'énolase permettant l'assemblage du dégradosome ARN (Carpousis, 2007). La région C-terminale de la RNase E semble être non structurée (Callaghan *et al.*, 2004), expliquant

probablement pourquoi la liaison des constituants du dégradosome se fait de manière indépendante (Carpousis, 2007).



**Figure 6. Représentation schématique de la RNase E.**

Les composants du dégradosome ARN s'associent à la région C-terminale non structurée de la RNase E. Tiré de (Callaghan *et al.*, 2005).

### 3.1.2 La PNPase

Comme indiqué précédemment, la PNPase est une 3' exonucléase dégradant l'ARN de manière processive dans la direction 3' vers 5'. Comme son nom l'indique, la PNPase est une phosphorylase qui utilise le phosphate pour cliver les liens phospho-diester de l'ARN. Contrairement à l'hydrolyse, la phosphorylation est une réaction proche de l'équilibre, expliquant pourquoi la PNPase fut originalement caractérisée (de manière *in vitro*) comme une enzyme allongeant l'extrémité 3' de l'ARN (Grunberg-Manago *et al.*, 1955). Cependant, dans des conditions physiologiques, les concentrations intracellulaires de phosphate favorisent nettement la phosphorylation et la PNPase agit principalement comme une enzyme de dégradation de l'ARN (Carpousis, 2007).

La PNPase forme un homotrimer en forme de beigne qui est homologue à l'exosome eucaryote (Symmons *et al.*, 2002). Chaque protomère contient quatre domaines : deux domaines PH, formant le site catalytique, et deux domaines de liaison à l'ARN. La structure cristalline de la PNPase chez *Streptomyces antibioticus* révèle que les six domaines PH se positionnent de manière à former un anneau hexamérique, le site catalytique de l'enzyme se trouvant au centre (Symmons *et al.*, 2000). Les sites de liaison à l'ARN se trouvent quant à eux d'un à l'une des deux faces de l'anneau et contrôlent l'accès de l'ARN au site catalytique. La PNPase nécessite d'ailleurs une extrémité saillante simple brin de 7 à 10 nucléotides pour dégrader un ARN (Coburn *et al.*, 1999). Son association

avec l'ARN hélicase RhlB dans le dégradosome ARN facilite donc son action sur les ARNs structurés (Liou *et al.*, 2002).

### 3.1.3 L'ARN hélicase RhlB

Chez *E. coli*, RhlB est l'une des cinq représentantes de la famille des ARN hélicases DEAD-box. Ces enzymes ATP dépendantes sont impliquées dans plusieurs facettes du métabolisme de l'ARN (Linder, 2006). Elles sont caractérisées par la présence du motif conservé D-E-A-D impliqué dans la liaison et l'hydrolyse de l'ATP. Le rôle de ces enzymes est de déplier des structures secondaires d'ARN en utilisant l'ATP comme énergie. Une interaction fonctionnelle entre la PNPase et l'ARN hélicase a été élucidée (Liou *et al.*, 2002). Puisque la PNPase est incapable de dégrader l'ARN que lorsque sous forme simple-brin, les structures secondaires dans l'ARN freinent sa progression. L'activité ARN hélicase de RhlB faciliterait donc la progression de la PNPase alors que l'interaction fonctionnelle entre la PNPase et RhlB dépendrait à leur liaison à la région d'échafaudage de la RNase E (Coburn *et al.*, 1999). De plus, une interaction fonctionnelle entre la RNase E et RhlB a aussi été caractérisée (Khemici *et al.*, 2005). Dans cette étude, il fut démontré que l'activité ARN hélicase de RhlB faciliterait l'action de la RNase E sur l'ARNm *lacZ*. Comme la RNase E est spécifique envers l'ARN simple brin, il est suggéré que RhlB faciliterait l'accès de du site catalytique de la RNase E à l'ARN.

De manière intéressante, il fut aussi démontré que la liaison au dégradosome de RhlB stimule grandement l'activité de cette dernière (Py *et al.*, 1996; Vanzo *et al.*, 1998). De plus, des expériences de reconstitutions *in vitro* indiquent que les sites de liaison à l'ARN présent sur la région d'échafaudage de la RNase E participent à l'activité de déroulement de l'ARN effectué par RhlB (Chandran *et al.*, 2007).

### 3.1.4 L'énolase

L'énolase est une enzyme glycolytique donc le rôle dans le dégradosome ARN n'est pas encore totalement compris. Cette enzyme hautement abondante chez *E. coli* catalyse la réaction réversible de déshydratation du 2-phosphoglycérate en phosphoénolpyruvate (Spring et Wold, 1971). Il semblerait cependant que seule une petite proportion de l'énolase soit attachée à la RNase E et au dégradosome ARN (Py *et al.*, 1996).

Plusieurs fonctions de l'énolase dans le dégradosome ont été suggérées. Par exemple, l'énolase pourrait jouer le rôle de détecteur pour coordonner le statut énergétique de la cellule avec la dégradation de l'ARN (Carpousis, 2007). Des études génomiques ont aussi démontré que l'énolase influence la dégradation d'ARNm encodant des enzymes impliquées dans des réactions cataboliques (Bernstein *et al.*, 2002; Bernstein *et al.*, 2004). De plus, il fut démontré que la liaison de l'énolase au dégradosome ARN est nécessaire à la dégradation rapide de l'ARNm *ptsG*, encodant un transporteur du glucose (Morita *et al.*, 2004). Cependant, l'importance physiologique de l'interaction de l'énolase au dégradosome reste toujours incertaine.

### 3.2 Autres facteurs impliqués dans la dégradation de l'ARN

En plus des différentes RNases et du dégradosome ARN, d'autres facteurs sont impliqués dans la dégradation de l'ARN chez *E. coli*. Les plus importants sont la poly(A)-polymérase et l'ARN pyrophosphohydrolase RppH.

#### 3.2.1 La poly(A)-polymérase

Contrairement à son rôle cytoplasmique chez les eucaryotes, la queue poly (A) agit comme agent destabilisateur de l'ARN chez les procaryotes (Dreyfus et Regnier, 2002). En effet, puisque les exonucléases sont incapables d'amorcer la dégradation de l'ARN au pied d'une structure tige-boucle (Deutscher, 2006), le fait d'y ajouter une queue poly (A) en 3' facilite sa dégradation. Cette queue poly (A) servirait de point d'ancrage pour les exonucléases qui pourraient ensuite dégrader l'ARN avec l'aide des ARN hélicases. Ainsi, plusieurs organismes possèdent des enzymes dont la fonction est d'ajouter des séquences d'ARN simple brin en 3' des ARN. Chez *E. coli*, la poly(A)-polymérase PAP 1 ajoute des résidus adénine en 3' d'ARNs structurés pour faciliter leurs dégradations (Hajnsdorf *et al.*, 1995). Cette enzyme a la capacité d'ajouter des queues poly (A) à tout ARN, qu'il s'agisse de transcrits primaires ou de fragments de dégradation. Il est à noter que tout comme celle de la RNase E, l'activité de PAP 1 est stimulée par la présence d'un ARN 5' monophosphorylé accessible et qu'elle est donc inactivée par la présence de structure dans la région 5' d'un ARN (Feng et Cohen, 2000).

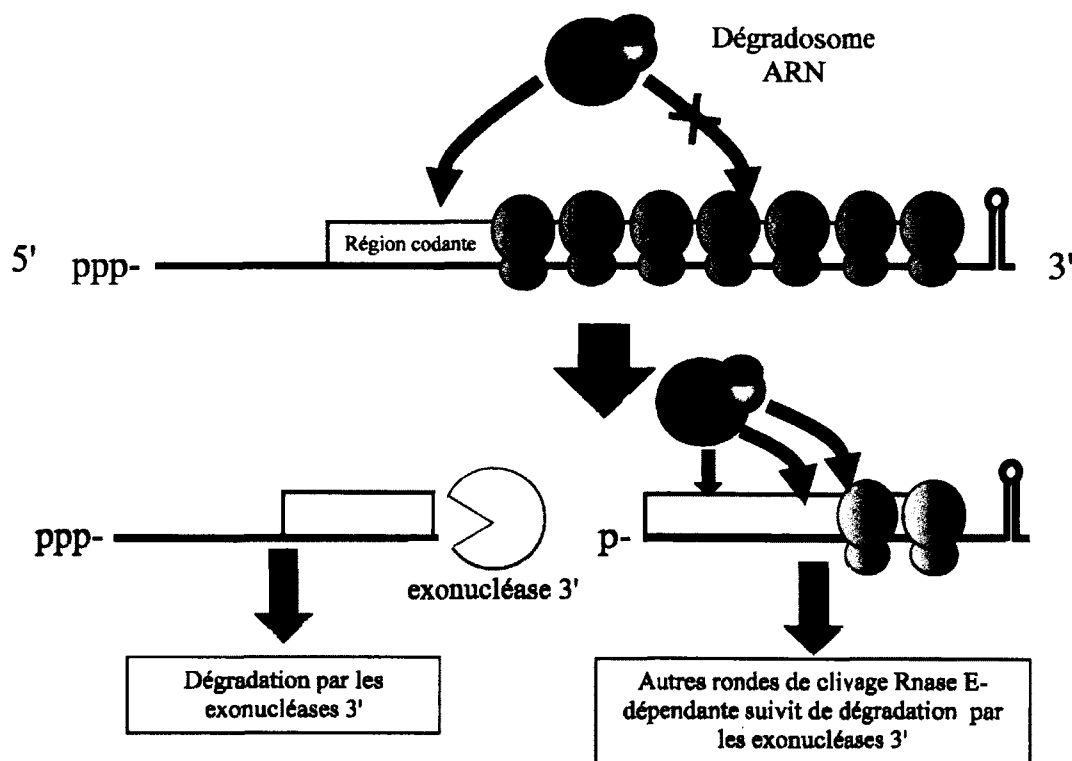
De plus, il fut observé que PAP 1 s'associe physiquement, de façon faible, à la RNase E suggérant une association au dégradosome ARN (Raynal et Carpousis, 1999). Cependant, une interaction fonctionnelle entre les deux enzymes n'a toujours pas été caractérisée.

### 3.2.2 RppH

Lorsque transcrit, le 5' des ARNm bactériens est triphosphatés, donnant aux ARNs une protection face à la RNase E et à l'ajout de queues poly (A) par l'action de PAP 1 (Mackie, 1998; Feng et Cohen, 2000). Le 5' triphosphate d'un ARN agit donc comme une barrière contre la dégradation, de la même manière que la structure coiffe chez les eucaryotes. Récemment, l'enzyme RppH, capable de catalyser la déphosphorylation de l'ARN, fut découverte (Celesnik *et al.*, 2007; Deana *et al.*, 2008). L'action de RppH déstabilise des centaines d'ARNm chez *E. coli* et a été démontrée pour activer la dégradation RNase E dépendante. De plus, il fut démontré que des structures dans le 5' d'un ARN le protégeaient contre l'action de RppH (Deana *et al.*, 2008).

### 3.3 Vue d'ensemble de la dégradation des ARNm

Maintenant que nous avons > les principaux joueurs impliqués dans la dégradation de l'ARN chez *E. coli*, il est intéressant de présenter un modèle de la dégradation de l'ARNm.



**Figure 7. Mécanisme général de dégradation de l'ARNm.**

Voir le texte pour les détails.

Lorsque fraîchement transcrits, les ARNm sont protégés en 5' par la présence d'un triphosphate et d'une tige-boucle en 3' créée lors de la terminaison de la transcription Rho-indépendante. Ainsi, la dégradation de la majorité des ARNm chez *E. coli* s'amorce par un clivage endonucléolytique par la RNase E, et plus rarement par la RNase III. C'est ce clivage initial qui détermine la demi-vie d'un ARNm. Suite à ce clivage, la portion 5' de l'ARNm sera dégradée rapidement par l'action d'exonucléases (PNPase et RNase II). Quant à elle, la portion 3' sera aussi dégradée rapidement puisqu'elle possède maintenant une extrémité 5' monophosphate activant l'activité de la RNase E et de la poly(A)-polymérase (Mackie, 1998; Feng et Cohen, 2000). Il est important de noter que les exonucléases ne sont cependant pas capables de dégrader les fragments d'ARN de longueurs plus petites que 2 à 5 nucléotides. Cette tâche revient à l'oligoribonucléase qui termine la digestion de l'ARN (Ghosh et Deutscher, 1999).

Suite au clivage initial RNase E-dépendant, la dégradation s'effectue en quelques secondes ce qui explique que les intermédiaires de dégradation ne sont pratiquement jamais visibles



expérimentalement. Cependant, il existe des structures dans l'ARN qui sont connues pour avoir la capacité de freiner la progression des exonucléases. Ces séquences, appelées REP (repetitive extragenic palindrome), seraient présentes à plus de 600 endroits dans le génome d'*E. coli*, majoritairement dans les régions intercistroniques (Bachellier *et al.*, 1999). Lorsque transcrites, les séquences REP se replient en structures secondaires d'ARN très stables capables de protéger les cistrons se trouvant en amont contre l'action des exonucléases (Newbury *et al.*, 1987; Py *et al.*, 1996). La dégradation des séquences REP nécessite l'action concertée de la poly(A)-polymérase et de l'ARN hélicase RhlB attaché au dégradosome ARN (Khemici et Carpousis, 2004).

Finalement, il est aussi important de souligner l'effet qu'a la traduction sur la dégradation de l'ARNm. En effet, les ribosomes possèdent un effet protecteur sur l'ARNm. Cette protection s'effectue à deux niveaux : au site de liaison des ribosomes et lors de l'élongation de la traduction dans le cadre de lecture. Ainsi, des mutations au SLR d'un ARNm qui diminuent la liaison des ribosomes ont un effet négatif sur la demi-vie de l'ARN. Cette déstabilisation semble médiée principalement par la RNase E (Jain et Kleckner, 1993; Arnold *et al.*, 1998). L'effet protecteur des ribosomes au niveau du site de liaison des ribosomes s'explique par une protection du 5' de l'ARNm contre la déphosphorylation RppH-dépendante. Quant à l'effet protecteur lors de l'élongation de la traduction, il est dû à un encombrement stérique de l'ARNm par les ribosomes qui empêchent ainsi l'accès à la RNase E aux sites de clivage.

#### 4. Les petits ARNs régulateurs

##### 4.1 Historique de leurs découvertes

L'existence de molécules d'ARN abondantes et de petite taille (entre 70 et 400 nucléotides de longs) chez *E. coli* est connue depuis plusieurs décennies. Leurs premières observations s'ont faites suite à des expériences de radiomarquage métabolique suivies de séparation sur gel de polyacrylamide (Ikemura et Dahlberg, 1973). Une des petites molécules d'ARN identifiées lors de cette étude pionnière est le sRNA Spot42 (voir section 4.5), sans qu'aucune fonction ne lui soit attribuée. Il fallut attendre jusqu'en 1984 pour qu'un rôle dans la régulation génétique soit attribué aux sRNAs. En effet, le groupe de Masayori

Inouye identifiait un fragment d'ADN, situé en amont du gène *ompC*, capable de causer la répression de l'expression de la protéine OmpF lorsque présent sur un plasmide (Mizuno *et al.*, 1984). Les chercheurs ont ensuite réalisé que ce fragment d'ADN contenait une unité de transcription de 93 nucléotides étant transcrite en une molécule d'ARN détectable par buvardage Northern. Les auteurs de cette étude ont aussi réalisé que la séquence de cet ARN est complémentaire à 70 % avec la séquence de la région d'initiation de la traduction de OmpF et émirent l'hypothèse qu'il agirait en bloquant l'initiation de la traduction de OmpF. Le petit ARN découvert fut nommé MicF (mRNA-interfering complementary RNA) et constitue le premier exemple de régulation en *trans* par un ARN non codant. Un mécanisme semblable de régulation post-transcriptionnel par des petits ARNs fut aussi découvert chez les eucaryotes quelques années plus tard. (Lee *et al.*, 1993; Wightman *et al.*, 1993)

Malgré la découverte de MicF et celle de quelques autres petits ARNs de manière fortuite au cours des années suivantes (Sledjeski et Gottesman, 1995; Altuvia *et al.*, 1997; Majdalani *et al.*, 1998), ce n'est qu'à partir de l'année 2001 que l'on a vraiment commencé à pouvoir apprécier le nombre élevé et les rôles physiologiques primordiaux des sRNAs. À ce moment, 4 équipes ont utilisé la bio-informatique pour effectuer l'identification à grande échelle de plusieurs dizaines de ses sRNAs. Trois de ces groupes ont effectué l'identification en cherchant dans les régions intergéniques du génome d'*E. coli* la présence de séquences hautement conservées entre les espèces bactériennes phylogénétiquement rapprochées et la présence de séquences correspondantes à des promoteurs de l'ARN polymérase  $\sigma^{70}$  et des tiges-boucles d'arrêt de transcription Rho indépendant (Argaman *et al.*, 2001; Wassarman *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002). La quatrième équipe a quant à elle utilisé la conservation de structures secondaire potentielle dans l'ARN comme facteur de recherche (Rivas *et al.*, 2001). Ces études ont mené à l'identification de plusieurs centaines de candidates potentielles parmi lesquelles 150 ont été soumis à une validation expérimentale (Livny et Waldor, 2007). Au final, 42 nouveaux sRNAs ont été confirmés par ces quatre études comme étant exprimés *in vivo* chez *E. coli* (Altuvia, 2007).

Par la suite, des approches expérimentales à grandes échelles ont été utilisées pour trouver d'autres sRNAs. Des micropuces à ADN à haute densité permettant la détection de

séquences sur les 2 brins d'ADN et dans les régions intergéniques (Selinger *et al.*, 2000) ont été utilisées. L'identification de nouveaux sRNAs a été effectuée à partir d'une extraction d'ARN totale (Tjaden *et al.*, 2002) ou d'ARN co-immunoprécipité avec la protéine Hfq (voir section 4.3.1) (Zhang *et al.*, 2003). Finalement, une approche de clonage à haut débit suivi de séquençage a été utilisée par deux groupes (Vogel *et al.*, 2003; Kawano *et al.*, 2005). Cette approche consiste à enrichir une population d'ARNs de la taille désirés et de cloner les ADN complémentaire à ces ARNs pour finalement les séquencer.

De façon intéressante, les résultats obtenus par les différentes études bio-informatiques et expérimentales ne se chevauchent que très peu. Elles ont permis d'augmenter à plusieurs centaines les sRNAs potentiels parmi lesquels l'expression de plus de 80 a été confirmée chez *E. coli* (Waters et Storz, 2009). Les sRNAs représentent donc près de 2 % de tous les gènes chez cette bactérie. De plus, des approches similaires à ceux décrits ci-haut ont permis d'identifier quelques dizaines de sRNAs chez d'autres espèces bactériennes comme *Bacillus subtilis* (Silvaggi *et al.*, 2006), *Vibrio cholerae* (Lenz *et al.*, 2004), *Pseudomonas aeruginosa* (Livny *et al.*, 2006), *Listeria monocytogenes* (Mandin *et al.*, 2007) et *Staphylococcus aureus* (Pichon et Felden, 2005).

#### 4.2 Caractéristiques générales et fonctions

Les sRNAs bactériens varient considérablement en longueur et en structure, mais ils sont généralement d'une longueur allant de 50 à 300 nucléotides et sont exprimés sous forme de transcrit primaire ne nécessitant que rarement une maturation post-transcriptionnelle. Les sRNAs sont tous exprimés lors des conditions physiologiques particulières, par exemple en carence de fer, de magnésium ou de glucose, lors d'un stress oxydatif ou membranaire ou lors de l'accumulation de glucose-6-phosphate. L'expression des sRNAs se retrouve souvent sous le contrôle de facteurs de transcriptions important dans la cellule. Ainsi, les sRNAs font partie intégrante des réseaux de régulation qui permettent à la bactérie de s'adapter aux stress environnementaux.

Une caractéristique importante des sRNAs est qu'ils ne nécessitent pas une homologie très élevée avec leurs cibles ARNm pour s'y appairer et les réguler. En effet, cet appariement nécessite au minimum une région de nucléation de seulement 6 à 8 nucléotides (Kawamoto

*et al.*, 2006; Papenfort *et al.*, 2010). Cette faible complémentarité permet aux sRNAs de réguler plusieurs dizaines d'ARNm différents. Cependant, des appariements potentiels à l'extérieur de la région seed sont souvent prédits, mais leur importance pour la régulation est incertaine. Pour faciliter l'appariement entre un sRNA et sa cible, une protéine importante joue le rôle de chaperon, Hfq (voir section 4.2.1). Celle-ci aiderait aussi à la spécificité d'appariement entre un sRNA et un ARNm.

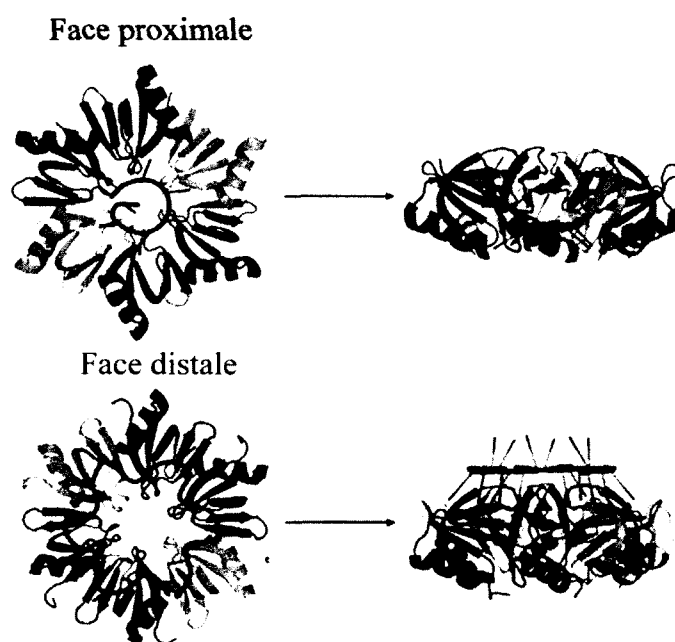
Le résultat de l'appariement entre un sRNA et un ARNm est le plus souvent une répression de la traduction, parfois accompagné d'une dégradation rapide de l'ARNm. Cependant, les sRNAs sont aussi capables d'activer la traduction d'un ARNm. Les différents mécanismes d'actions des sRNAs sont discutés dans la section 4.3.

#### 4.2.1 Hfq

La protéine Hfq fut originalement caractérisée chez *E. coli* comme un facteur de l'hôte nécessaire à la répllication du bactériophage Q $\beta$  (Franze de Fernandez *et al.*, 1968), d'où son nom (Hfq : host factor Q $\beta$ ). Des analyses phylogénétiques ont par la suite démontré qu'il existe des orthologues de cette protéine dans environ la moitié des bactéries dont le génome est séquencé (Sun *et al.*, 2002). Hfq est membre de la famille des protéines Sm qui sont caractérisées par une structure quaternaire en forme d'anneau composée de 6 ou 7 unités (Wilusz et Wilusz, 2005). Ces protéines, présentes dans tous les domaines de la vie, ont la capacité de lier l'ARN et sont conséquemment impliquées dans différents mécanismes liés à l'ARN tels que l'épissage alternatif et la dégradation de l'ARNm (Wilusz et Wilusz, 2005).

Chez *E. coli*, Hfq est présente en grande quantité, avec une abondance d'environ 50 000 copies par cellule (Brennan et Link, 2007) et forme un homo-hexamère composé de six sous-unités identiques de 11.2 kDa (Moller *et al.*, 2002). Plusieurs structures cristallines de la protéine Hfq ont été résolues au cours des dernières années chez *E. coli* et d'autres bactéries. Ces structures montrent une grande conservation au niveau de la structure des protomères de même que de l'arrangement quaternaire. La structure en forme d'anneau expose 2 faces disponibles pour lier l'ARN. Comme indiqué dans la figure 8, elles ont été désignées face proximale et face distale. De manière intéressante, chacune de ces faces

possède une spécificité différente pour l'ARN. Selon des données de cristallographie, la face proximale de Hfq lierait préférentiellement les séquences d'ARN riches en U (Schumacher *et al.*, 2002) alors que la face distale aurait une préférence pour des séquences possédant le motif «ARN» (où A signifie adénine, R purine et N n'importe lequel des nucléotides) (Link *et al.*, 2009). Ces données de cristallographie sont confirmées par des résultats de mutagenèse systématique de la protéine Hfq qui démontrent eux aussi la spécificité des deux faces de Hfq pour la liaison à l'ARN (Mikulecky *et al.*, 2004). Le fait de posséder deux faces pour lier l'ARN permet à Hfq de recruter plusieurs ARNs à la fois pour faciliter l'appariement entre ces deux ARNs.



**Figure 8. Structure de Hfq et son interaction avec l'ARN.**

Les deux faces d'interaction de Hfq avec l'ARN (en orange) sont représentées. Tiré de (Vogel et Luisi, 2011).

Au niveau physiologique, Hfq joue plusieurs rôles primordiaux dans la cellule. Ceci est démontré par l'observation qu'une souche *hfq* négative montre un taux de croissance diminué, une sensibilité accrue aux rayons ultraviolets et aux oxydants, de même qu'une forme cellulaire différente (Tsui *et al.*, 1994). Ces effets sont dus en grande majorité aux rôles clés que joue Hfq dans la régulation post-transcriptionnelle médiée par les sRNAs (Vogel et Luisi, 2011). En effet, Hfq a la capacité de stabiliser les sRNAs dans la cellule

(Sledjeski *et al.*, 2001; Moller *et al.*, 2002). Cette action est probablement due à une protection contre l'action de la RNase E et des exonucléases. En effet, Hfq est reconnu pour lier les séquences A/U riches (Schumacher *et al.*, 2002; Link *et al.*, 2009) et pourrait donc empêcher l'accès à la RNase E à ces sites de clivages favoris. Il a aussi été démontré *in vitro* que Hfq agit dans le rôle chaperon en facilitant les interactions entre un sRNA et sa cible ARNm (Moller *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002; Geissmann et Touati, 2004; Kawamoto *et al.*, 2006). Finalement, Hfq est impliqué dans la dégradation des ARNm induite par les sRNAs. En effet, il fut démontré que Hfq interagit *in vivo* avec la RNase E et qu'il y avait présence de complexes RNase E-Hfq-sRNA dans la cellule (Morita *et al.*, 2005). Ainsi, Hfq recruterait la RNase E sur un ARNm ciblé par un sRNA pour entraîner sa dégradation rapide (Masse *et al.*, 2003). Il est intéressant de rappeler que Hfq est connu comme étant capable de réprimer la traduction de son propre ARNm en compétitionnant avec la liaison des sous-unités ribosomale 30S (Vecerek *et al.*, 2005). Cependant, un rôle direct de Hfq dans la répression de la traduction sRNA-dépendante n'est pas encore établi. En plus de son rôle dans la régulation sRNA-dépendante, Hfq joue aussi d'autres rôles dans le métabolisme de l'ARN. Il est impliqué dans la dégradation poly(A)-dépendante de l'ARN (Hajnsdorf et Regnier, 2000; Folichon *et al.*, 2003; Mohanty *et al.*, 2004), dans la terminaison de la transcription Rho dépendante (Rabhi *et al.*, 2011) et dans la transposition (Ross *et al.*, 2010).

#### 4.3 Mécanismes d'actions

La majorité des sRNAs qui ont été identifiés jusqu'ici s'apparient directement sur le SLR de leurs ARNm cibles (Waters et Storz, 2009). Cela a pour résultat de cacher les signaux d'initiation de la traduction et d'y empêcher la liaison de la sous-unité ribosomale 30S. En effet, comme indiqué dans la section 2, l'initiation de la traduction est très sensible à la présence de structures secondaires dans l'ARN au niveau du SLR. Ainsi, la grande majorité des ARNm ciblés par un sRNA voient l'initiation de leur traduction bloquée. Récemment, une «fenêtre de 5 codons» dans laquelle un sRNA peut s'apparier pour inhiber l'initiation de la traduction a été caractérisée (Bouvier *et al.*, 2008), signifiant qu'un sRNA peut s'apparier au début de la région codante d'un ARNm jusqu'au 5<sup>e</sup> codon et tout de même empêcher la liaison de ribosomes. Cette fenêtre de 5 codons est en accord avec

l'observation auparavant effectuée de manière *in vitro* indiquant que les limites physiques du SLR sur l'ARNm s'étend des nucléotides -20 à +15 relativement au premier nucléotide du codon d'initiation de la traduction (Beyer *et al.*, 1994; Huttenhofer et Noller, 1994). Même si cette possibilité n'a pas été vérifiée explicitement, il est convenu qu'un sRNA s'appariant jusqu'à 20 nucléotides en amont du codon d'initiation peut lui aussi réprimer la traduction efficacement (Waters et Storz, 2009).

Dans la majorité des cas, la répression de la traduction d'un ARNm par un sRNA est accompagnée par la dégradation rapide des deux ARNs (Masse *et al.*, 2003; Morita *et al.*, 2005). Ce processus est semblable à ce qui est observé chez les eucaryotes alors que certains miRNAs entraînent un arrêt de la traduction et une dégradation rapide de l'ARNm cible (Bazzini *et al.*, 2012). Chez *E. coli*, la dégradation de l'ARNm suivant l'arrivée d'un sRNA est effectuée par le recrutement de la RNase E par l'action de Hfq. En effet, Hfq est capable d'interagir avec la région C-terminale de la RNase E permettant le recrutement de cette dernière sur un ARNm ciblé par un sRNA. Comme indiqué dans la section 3, la RNase E est l'enzyme qui effectue le clivage initial lors de la dégradation des ARNm. Ceci active ensuite une dégradation très rapide de l'ARNm par l'action concertée de la RNase E, des exonucléases (PNPase, RNase II) et des facteurs accessoires à la dégradation de l'ARN. De plus, il semble que la répression de la traduction soit l'élément majeur responsable de la diminution du niveau protéique, alors que la dégradation de l'ARNm servirait à assurer l'irréversibilité de la répression et permettrait de recycler les ARNm inactivés (Morita *et al.*, 2006). Cependant, il existe un exemple où un sRNA entraîne une dégradation de l'ARNm sans inhiber la traduction (Pfeiffer *et al.*, 2009). Dans cet exemple, le sRNA MicC s'apparie près de 100 nucléotides en aval du codon d'initiation de la traduction de l'ARNm *ompD* et provoque une dégradation RNase E-dépendante de l'ARNm, sans y affecter la liaison des ribosomes.

Le fait que plusieurs ARNm sont rapidement dégradés suivant l'expression d'un sRNA a été énormément utilisé au cours des dernières années comme outil d'identification de nouvelles cibles pour un sRNA. La méthode consiste à mesurer les niveaux cellulaires d'ARNm suivant l'induction de l'expression d'un sRNA en utilisant des techniques

génomiques comme les micropuces à ADN et le séquençage à haut débit (Masse *et al.*, 2005; Guillier et Gottesman, 2006; Papenfort *et al.*, 2006; Beisel et Storz, 2011; Sharma *et al.*, 2011).

Il est intéressant de noter que les sRNAs peuvent aussi activer la traduction d'un ARNm cible en empêchant la formation d'une structure inhibitrice de la traduction dans la RNT 5' (Morfeldt *et al.*, 1995; Majdalani *et al.*, 1998; Prevost *et al.*, 2007). La liaison du sRNA entraîne une restructuration de la RNT 5' de l'ARNm cible et permet de libérer les signaux d'initiation de la traduction (SD, codon d'initiation). Comme il ne nécessite pas une compétition avec la liaison des ribosomes, la liaison d'un sRNA sur un ARNm activé peut s'effectuer loin en amont du codon d'initiation.

#### 4.3.1 Mécanismes alternatifs de répression traductionnelle

Au cours des dernières années, quelques études ont démontré que les sRNAs ont la capacité de réprimer la traduction d'un ARNm en utilisant des mécanismes alternatifs qui n'impliquent pas une compétition directe avec la liaison de la sous-unité ribosomale 30S.

Le premier exemple de ce genre est l'ARN antisens IstR-1 qui réprime la traduction de l'ARNm *tisB*. Même si IstR-1 est un ARN qui agit en *cis* et qui ne nécessite pas Hfq pour son action, la répression traductionnelle qu'il effectue sur *tisB* est intéressante, car elle n'implique pas une compétition directe avec la liaison des ribosomes, mais plutôt une compétition avec un site d'attente des ribosomes (ribosomes standby site) situé environ 100 nucléotides en amont du codon d'initiation (Darfeuille *et al.*, 2007). Les sites d'attentes des ribosomes sont utilisés par les ribosomes pour lier un ARNm lorsque le SLR est séquestré dans une structure secondaire. La sous-unité ribosomale 30S se lie au site d'attente et se délocalise au SLR lorsque la structure y bloquant l'accès s'ouvre de manière transitoire (Unoson et Wagner, 2007). En s'appariant au site d'attente des ribosomes de *tisB*, IstR-1 empêche la sous-unité ribosomale 30S de s'y lier et diminue le taux d'initiation de la traduction.

Il fut aussi démontré récemment que le sRNA RyhB est capable de réprimer indirectement la traduction du facteur de transcription Fur en ciblant un petit cadre de lecture nommé *uof* (upstream of *fur*) situé en amont de *fur* (Vecerek *et al.*, 2007). En effet, comme indiqué précédemment, la traduction chez les procaryotes de cadre de lectures adjacents est souvent



couplée (voir section 2). Ainsi, le fait d'inhiber la traduction d'*uof* entraîne une diminution de la traduction de *fur*. De manière intéressante, *uof*, qui encode un petit peptide de 27 acides aminés, ne semble pas avoir de fonction outre de permettre la régulation RyhB-dépendante de la traduction de *fur*.

Finalement, un exemple de sRNAs ciblant des séquences activatrices de la traduction en dehors du SLR a été caractérisé récemment. Ces séquences, décrites dans la section 2.1, sont situées dans la RNT 5' d'ARNm et facilitent l'initiation de la traduction. En ciblant ses séquences, des sRNAs peuvent donc inhiber la traduction. Le premier exemple de ce genre est le sRNA GcvB qui réprime l'expression de plusieurs transporteurs membranaires ABC (ATP-binding-cassette) en ciblant des répétitions C/A situées dans leurs RNT 5' (Sharma *et al.*, 2007). De manière intéressante, il semble que GcvB a évolué pour cibler ces séquences C/A particulièrement abondantes dans les RNT 5' des ARNm encodant pour des protéines périplasmiques. En effet, le sRNA possède une région A/U riche particulièrement conservée qui lui permet de cibler plusieurs dizaines d'ARNm (Sharma *et al.*, 2011).

#### 4.4 RyhB

RyhB est un sRNA mesurant 90 nucléotides de longs qui fut initialement identifié dans deux études à grandes échelles (Argaman *et al.*, 2001; Wassarman *et al.*, 2001). Il fut alors démontré que l'expression de RyhB interférait avec la croissance sur milieu succinate (Wassarman *et al.*, 2001). Par la suite, RyhB a été démontré comme étant régulé par Fur, régulateur central dans l'homéostasie du fer chez *E. coli* (Masse et Gottesman, 2002). Le promoteur du gène *ryhB* comprend en effet une séquence de liaison à Fur permettant à la protéine de réprimer son expression en présence de fer (Vassinova et Kozyrev, 2000; Masse et Gottesman, 2002).

RyhB réprime l'expression de plusieurs protéines utilisant le fer en conditions où cet élément limitant (Masse et Gottesman, 2002). Les premières cibles de RyhB caractérisées furent deux enzymes du cycle de Krebs (succinate déshydrogénase, fumarase et aconitase) et la superoxyde dismutase fer-dépendante. Le point qu'ont en commun ces trois enzymes est qu'elles nécessitent le fer pour leur activité catalytique. Il est à noter que la répression de l'opéron *sdhCDAB*, encodant les 4 sous-unités de la succinate déshydrogénase, fut

démontrée *in vivo* et qu'un d'appariement potentiel entre RyhB et *sdhD*, le deuxième cistron de l'ARNm, fut suggéré. Cependant, cet appariement ne fut pas prouvé expérimentalement.

Par la suite, il fut démontré que RyhB entraîne la dégradation rapide de ses cibles ARNm par le recrutement du dégradosome ARN (Masse *et al.*, 2003). Cette caractéristique permit quelques années plus tard une étude à grande échelle qui démontra que RyhB régule l'expression d'au moins 18 transcrits encodant 56 protéines (Masse *et al.*, 2005). Ces cibles furent identifiées en mesurant les variations dans les niveaux d'ARNm total par micropuce à ADN suivant l'expression de RyhB pendant 10 minutes. Le court temps d'expression du sRNA a permis aux auteurs de l'étude de suggérer que les cibles identifiées sont directement régulées par RyhB (Masse et Arguin, 2005) . Le tableau 1 présente un échantillon des cibles potentielles identifiées.

Nom du gène	Niveau d'expression en présence de RyhB	Description du gène
<i>acnB</i>	-4.4 X	Aconitase B, Lie [4Fe-4S]
<i>sdhC</i>	-6.1 X	Sous-unité de la succinate déshydrogénase
<i>sdhD</i>	-6.1 X	Sous-unité de la succinate déshydrogénase
<i>sdhA</i>	-4.0 X	Sous-unité de la succinate déshydrogénase
<i>sdhB</i>	-5.1 X	Sous-unité de la succinate déshydrogénase
		Lie [Fe-S]
<i>iscR</i>	-1.6 X	Régulateur de transcription IscR
<i>iscS</i>	-6.1 X	Cystéine désulfurase
<i>iscU</i>	-4.9 X	Protéine d'échafaudage, formation des [Fe-S]
<i>iscA</i>	-3.5 X	Protéine d'échafaudage, formation des [Fe-S]
<i>sodB</i>	-19.3 X	Superoxyde dismutase
<i>shiA</i>	+ 5.1 X	Transporteur de shikimate

**Tableau 1. Cibles potentielles de RyhB identifiées par étude génomique.**

Tiré de (Masse *et al.*, 2005).

De manière intéressante, la plupart de ces ARNm encodent des protéines utilisant le fer ou impliquées dans le métabolisme du fer. Il est intéressant de noter que RyhB a un effet sur tous les gènes du polycistron *sdhCDAB* alors qu'il a un effet sur seulement une partie du polycistron *iscRSUA*. En effet, l'expression d'*iscR* ne semble pas affectée par l'expression de RyhB alors que l'expression de la portion 3' du polycistron (*iscS*, *iscU* et *iscA*) l'est.

Le rôle physiologique de RyhB est de permettre à la cellule de conserver le fer pour les enzymes fer-dépendantes essentielles à la survie lorsque cet élément est en quantités limitantes. En fait, il fût démontré par notre équipe que l'expression de RyhB en condition de carence de fer permet une augmentation d'environ 50 % des niveaux intracellulaires de fer libre et qu'une souche *ryhB*<sup>-</sup> montre un retard de croissance important comparativement à une souche sauvage lorsque cultivé dans un milieu carencé en fer (Jacques *et al.*, 2006).

Récemment, il fut démontré que RyhB réprime aussi la traduction de la protéine Fur par un mécanisme décrit dans la section 4.3 (Vecerek *et al.*, 2007). Cette boucle de rétroaction négative entre Fur et RyhB permettrait de garder les niveaux de Fur bas en carence de fer et ainsi éviter une répression non désirée des gènes d'acquisition du fer.

RyhB est aussi impliqué dans la production des sidérophores (Salvail *et al.*, 2010). Premièrement, il fut démontré que RyhB active la traduction de l'ARNm *shiA*, encodant pour une perméase du shikimate (Prevost *et al.*, 2007). Or, le shikimate est un composé essentiel à la biosynthèse de l'entérobactine, sidérophore principal chez *E. coli*. Plus tard, il fut démontré que RyhB dirige le flux métabolique de la sérine vers la production d'entérobactine en réprimant la traduction de l'ARNm *cysE* (Salvail *et al.*, 2010). Cet ARNm encode la sérine acétyltransférase, qui transforme la sérine en O-acétyl-L-sérine, première étape dans la voie de biosynthèse de la cystéine. Comme la sérine est un composant essentiel à la biosynthèse de l'entérobactine, la répression de la traduction de *cysE* dirige le métabolisme de la sérine vers la synthèse d'entérobactine plutôt que de la cystéine.

De manière intéressante, RyhB n'est pas seulement présent chez *E. coli*. En effet, basé sur la conservation de sa séquence, des homologues du sRNA sont présents chez des bactéries pathogènes telles que *Shigella dysenteria*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia pestis* et *Vibrio*

*cholerae* (Masse et Gottesman, 2002). Même si les mécanismes et rôles de RyhB ont surtout été étudiés chez *E. coli*, certains rôles sont tout de même attribués aux homologues de RyhB chez ses bactéries pathogènes. Par exemple, RyhB est impliqué dans la virulence de *Shigella dysenteria* en réprimant l'expression du facteur de transcription VirB. Ceci entraîne une suppression de plusieurs facteurs de virulences (Murphy et Payne, 2007). De plus, RyhB est impliqué dans le chemo-taxisme et la formation du biofilm chez *Vibrio cholerae* (Davis *et al.*, 2005; Mey *et al.*, 2005).

#### 4.5 Spot42

Comme indiqué dans la section 4.1, Spot42 fut l'un des premiers sRNAs à être identifié dans les années 1970 (Ikemura et Dahlberg, 1973). Dans les années qui suivirent, une quantité importante de travail fut effectuée dans le but de trouver un rôle physiologique à Spot42. Le gène *spf* (*s*pot *f*orty-two) encodant le sRNA de 109 nucléotides fut identifié dans la région intergénique *polA-yihA* (Rice et Dahlberg, 1982). Même si la délétion du gène *spf* n'entraîna aucun phénotype notable (Hatfull et Joyce, 1986), il fut observé qu'une surproduction de Spot42 augmente le temps de génération de la bactérie poussant dans un milieu contenant le succinate comme source de carbone et diminue la capacité d'adaptation lors de changement de type de milieu de culture. Il fut aussi démontré que l'expression de Spot42 est soumise à la répression catabolique par le complexe CRP-AMPc (Polayes *et al.*, 1988). Même si ces premières études ne réussirent pas à trouver un rôle physiologique à Spot42, il fut quand même suggéré que Spot42 serait un ARN régulateur (Rice *et al.*, 1987).

Le mystère de la fonction de Spot42 fut élucidé en 2002 lorsque l'équipe de Valentin-Hansen réalisa que Spot42 possède une séquence hautement complémentaire à la région d'initiation de la traduction du gène *galK*, faisant partie de l'opéron *galETKM*. Les auteurs avaient aussi observé que l'expression de Spot42 et *galK* réagissent de manière opposée à la présence de glucose. En effet, les niveaux du sRNA augmentent de 3 à 5 fois en présence de glucose alors que les niveaux de la protéine GalK diminuent de 4 fois dans les mêmes conditions. Il fut ensuite démontré que Spot42 s'apparie à la région d'initiation de la traduction de *galK*, inhibant sa traduction. De manière intéressante, les niveaux des

protéines GalE et GalT ne sont pas affectés par la présence de Spot42, démontrant pour la première fois une discoordination de l'expression des gènes d'un opéron par l'action d'un sRNA (Moller *et al.*, 2002).

La même année, la même équipe démontra que la protéine Hfq est essentielle à l'activité de Spot42 (Moller *et al.*, 2002). Cette protéine s'associe avec Spot42 *in vivo* et lie trois courtes régions A/U riches de Spot42 *in vitro* tout en stimulant de 150 fois la liaison de Spot42 à *galK*.

Finalement, il fallut attendre jusqu'à 2011 pour qu'on puisse vraiment apprécier l'importance physiologique de Spot42 (Beisel et Storz, 2011). Il fut alors démontré que Spot42 est un joueur clé dans la répression catabolique alors qu'il régule l'expression d'environ 15 gènes encodant majoritairement des protéines impliqués dans l'utilisation et le transport de sources de carbone non préférentielles (galactose, fucose, lactose, xylose, sorbitol, acide N-acétylneuraminic). Il est important de noter que ces cibles furent identifiées en mesurant les niveaux d'ARNm par micropuce à ADN suivant l'expression durant 7 minutes du sRNA signifiant que des ARNm dont seule la traduction est affectée n'ont pu être identifiés. Le rôle physiologique de Spot42 serait d'amplifier la régulation par le complexe CRP-AMPc pour faciliter la transition lors de changement nutritionnel dans l'environnement (Beisel et Storz, 2011).

## 5. Hypothèses et objectifs de recherche

Au cours des dernières années, plusieurs dizaines de sRNAs ont été identifiés avec, pour chacun des sRNAs, des dizaines de cibles potentielles. La plupart de ces cibles semblent régulées par le mécanisme canonique décrit dans la section 4.3. Cependant, certaines données semblent indiquer que des mécanismes alternatifs de régulation post-transcriptionnelle par les sRNAs existeraient. L'objectif principal de ma thèse est de caractériser de nouveaux mécanismes par lesquels un sRNA peut réguler l'expression génétique.

Le premier cas étudié est la régulation de l'opéron *iscRSUA* par le sRNA RyhB. En effets, des données de micropuce à ADN (voir tableau 1) indiquent que l'expression de RyhB

entraîne une diminution des niveaux d'ARN de la région 3' de l'ARNm, mais non que la région 5' encodant le facteur de transcription IscR. L'objectif du premier article présenté dans cette thèse (chapitre 2) est de caractériser le mécanisme par lequel un sRNA pourrait entraîner la dégradation partielle d'un ARNm polycistronique et qu'elles en sont les conséquences physiologiques.

Le second objectif de mes études graduées a été d'approfondir le mécanisme de dégradation d'*iscS* et d'autres cibles de RyhB (chapitre 3).

Finalement, j'ai étudié la régulation post-transcriptionnelle de l'opéron *sdhCDAB* par les petits ARNs RyhB et Spot42. Des données préliminaires m'indiquaient que les 2 sRNAs régulent la traduction de *sdhC*, le premier gène du polycistron, par des mécanismes différents. En effet, alors que RyhB semble s'apparier directement sur le SLR de *sdhC*, le site d'appariement potentiel de Spot42 se situe loin en amont ce qui exclurait une compétition directe avec la sous-unité ribosomale 30S. L'objectif de cette étude, présenté au chapitre 4, est donc de caractériser le mécanisme par lequel Spot42 réprime la traduction de *sdhC*.

## CHAPITRE 2

### **Small RNA-induced differential degradation of the polycistronic mRNA *iscRSUA***

**Auteurs de l'article :** Guillaume Desnoyers, Audrey Morissette, Karine Prévost, et Eric Massé

Département de Biochimie, Groupe ARN, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4.

**Statut de l'article :** Publié

The EMBO Journal, volume 28, pages 1551-1561, 2009.

**Avant-propos :** Au niveau de l'écriture, j'ai rédigé une version de chacune des sections (introduction, résultats, discussion et matériel & méthodes) que j'ai soumise à mon superviseur Eric Massé qui a apporté certaines modifications.

Au niveau expérimental, j'ai effectué la planification des expériences avec l'aide d'Eric Massé et j'ai effectué la totalité des expériences présentée dans l'article. Audrey Morissette a obtenu des résultats préliminaires et quelques résultats présents dans les figures supplémentaires.

## Résumé

La répression de la traduction d'un ARNm par un sRNA bactérien est habituellement suivie par la dégradation rapide de l'ARNm dû à un recrutement du dégradosome ARN. Dans cette étude, nous montrons pour la première fois qu'un sRNA induit une dégradation seulement partielle d'un ARNm lorsqu'il s'y apparie. En effet, nos données indiquent que le petit ARN RyhB, exprimé lors d'une carence en fer, s'apparie sur le SLR du gène *iscS*, deuxième cistron de l'ARNm polycistronique *iscRSUA*. Le résultat de cet appariement est une dégradation partielle de l'ARNm *iscRSUA*. La région 3' de l'ARNm, encodant les protéines IscS, IscU et IscA, est dégradé alors que la région 5', encodant pour le facteur de transcription IscR, ne l'est pas. Nous avons démontré que cette dégradation est causée par le dégradosome ARN et que la protéine chaperon Hfq est essentiel au phénomène. De manière intéressante, nous avons identifié une région dans l'ARNm *iscRSUA* responsable pour la protection du gène *iscR*. En effet, il y a une séquence non traduite de 111 nucléotides située entre les cistrons *iscR* et *iscS* qui forme une structure secondaire très forte dans l'ARNm qui pourrait empêcher la progression de la PNPase, présente dans le complexe du dégradosome ARN. La séquence et la structure de cette région non traduite sont hautement conservées entre plusieurs espèces bactériennes, suggérant un rôle répandu dans le monde des procaryotes.

Physiologiquement, le mécanisme de dégradation partielle du polycistron *iscRSUA* est explicable. Les protéines IscS, IscU et IscA sont impliquées dans la biogenèse des groupements fer souffre (Fe-S) alors que IscR est un régulateur transcriptionnel régulant une centaine de gènes impliqués dans des voies métaboliques variées. Lorsque RyhB est exprimé en réponse à une carence en fer, il est profitable de réprimer la machinerie impliquée dans la biogenèse des groupements Fe-S puisque le fer n'est plus disponible pour la réaction. Cependant, IscR doit toujours être exprimé puisque son activité de régulation transcriptionnelle est nécessaire même en carence de fer. Le mécanisme caractérisé dans cet article permettrait à la bactérie d'exprimer dans un cas les quatre gènes d'un polycistron, mais d'en exprimer seulement une partie en réponse à un stress environnemental (une carence en fer dans ce cas-ci).



**Small RNA-induced differential degradation of the polycistronic mRNA *iscRSUA***

Running title: sRNA-directed polarity

Guillaume Desnoyers, Audrey Morissette, Karine Prévost, and Eric Massé\*

Département de Biochimie, Groupe ARN, Université de Sherbrooke, Sherbrooke,  
Québec, Canada, J1H 5N4.

54 808 characters

\*Corresponding author : Université de Sherbrooke, Département de Biochimie,  
3001 12e avenue, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Tel. 819-346-1110 ext. 15475

Fax. 819-564-5340

E-mail : [eric.masse@usherbrooke.ca](mailto:eric.masse@usherbrooke.ca)

## ABSTRACT

Most polycistronic genes are expressed in a single transcript in which each cistron produces a fixed amount of protein. In this report, we demonstrate the first example of differential degradation of a polycistronic gene induced by a small RNA (sRNA). Our data show that the iron-responsive sRNA RyhB binds to the second cistron of the polycistronic mRNA *iscRSUA*, which encodes the necessary machinery for biosynthesis of Fe-S clusters, and promotes the cleavage of the downstream *iscSUA* transcript. This cleavage gives rise to the remaining 5' section of the transcript encoding IscR, a transcriptional regulator responsible for activation and repression of several genes depending on the cellular Fe-S level. Our data indicate that the *iscR* transcript is stable and that translation is active. The stability of the *iscR* transcript depends on a 111 nucleotide-long non-translated RNA section located between *iscR* and *iscS*, which forms a strong REP secondary structure and may protect against ribonucleases degradation. This novel regulation demonstrates how sRNAs and mRNA structures can work together to modulate the transcriptional response to a specific stress.

Keywords: *iscRSUA*/mRNA polarity/ REP sequence/RNA degradosome/small RNA

## INTRODUCTION

Numerous proteins such as enzymes, metabolite transporters, and gene regulators depend on prosthetic groups to achieve their normal functions. One important and probably the most ancient prosthetic group are Fe-S clusters, which regulate many metabolic functions, allow electron transport, control gene expression, and act as sensors of intracellular conditions. Virtually all cells depend on Fe-S cofactors as they are biosynthesized by Eubacteria, Archaea, and mitochondria in eukaryotes. Biosynthesis of Fe-S clusters is closely linked to heme synthesis and regulation of cellular iron homeostasis by the iron regulatory protein 1 (IRP1) in eukaryotes (reviewed in (Lill & Muhlenhoff, 2006)). Because it shows remarkable similarities to the bacterial system, it appears that the eukaryotic Fe-S biosynthesis has probably been inherited from eubacteria.

Formation of Fe-S clusters in bacteria depends on three distinct and highly conserved protein machineries. The first machinery to be discovered, the nitrogen fixation system, NIF, is exclusive to the Fe-S cluster assembly of nitrogenase, which converts  $N_2$  into  $NH_3$  (reviewed in (Ayala-Castro et al, 2008, Dos Santos et al, 2004, Rees & Howard, 2000)). The second machinery, termed ISC (iron-sulphur cluster), is responsible for most of the cellular Fe-S proteins and, as such, performs the housekeeping Fe-S biosynthesis (Outten et al, 2004, Takahashi & Nakamura, 1999, Zheng et al, 1998). In *E. coli*, the ISC components are encoded on the *iscRSUA* polycistronic transcript. The IscS product is responsible for providing selenium and sulphur for several modified tRNAs (Lauhon, 2002). Inactivation of *iscS* produces severe growth defects, demonstrating its biological importance (Schwartz et al, 2000, Takahashi & Nakamura, 1999). IscS is also extensively involved in the synthesis and repair of the Fe-S cluster (Schwartz et al, 2000, Takahashi & Nakamura, 1999). The third Fe-S cluster synthesis machinery, designated SUF (sulphur mobilization), performs similar functions to the ISC system although specifically under iron starvation and oxidative stress (Outten et al, 2004, Takahashi & Tokumoto, 2002). Interestingly, while the single inactivation of the *isc* or of the *suf* operon does not impair viability, inactivation of both *isc* and *suf* operons is lethal in *E. coli*. This indicates that these systems share similar essential functions (Outten et al, 2004, Takahashi & Tokumoto, 2002, Tokumoto et al, 2004).

Although both *isc* and *suf* operons are expressed during iron starvation, each operon responds to a different activation mechanism. During normal growth, in the presence of sufficient iron, transcription of the *suf* operon is directly repressed by the Fur (ferric uptake regulator) protein attached to the *suf* promoter (Outten et al, 2004). Under low iron conditions however, Fur releases the transcriptional repression, which allows expression of the *suf* operon. Contrary to *suf*, the *isc* operon is not regulated by Fur but by IscR, a transcriptional repressor encoded as part of the *iscRSUA* polycistron (Giel et al, 2006, Schwartz et al, 2001). This *iscRSUA* autorepression depends on IscR loaded with Fe-S clusters (holo-IscR), which are synthesized by IscS, IscU, and IscA (Schwartz et al, 2001). Therefore when Fe is scarce, or when IscSUA activity is limited, the IscR regulator, now free of Fe-S cluster (apo-IscR), relieves its repression on the *isc* promoter, thus allowing transcription (Outten et al, 2004, Schwartz et al, 2000). Furthermore, it was demonstrated recently that apo-IscR could function as a transcriptional activator of the *suf* operon (Giel et al, 2006, Lee et al, 2008, Yeo et al, 2006).

A recently characterized regulator of the *isc* polycistronic transcript is the small regulatory RNA (sRNA) RyhB (Massé et al, 2005). RyhB is a Fur-regulated sRNA that binds on target mRNAs to induce their degradation through the concerted action of the RNA degradosome (composed of RNase E, an RNA helicase, and the polynucleotide phosphorylase PNPase) and the RNA chaperone Hfq (Massé & Gottesman, 2002, Massé et al, 2003, Morita et al, 2005). The RNA chaperone Hfq is critical for RyhB stability, function, and pairing with its mRNA targets (Massé & Gottesman, 2002, Massé et al, 2003, Geissmann & Touati, 2004). In addition to this, Hfq is part of a complex with RNase E, and RyhB, which initiates the target mRNA degradation (Morita et al, 2005). A previous microarray study indicated that RyhB provoked the degradation of at least 18 transcripts, encoding a total of 56 proteins (Massé et al, 2005). In this microarray study, the RyhB-induced repression was observable on the entire full-length transcripts (mono and polycistronic alike), except for the *iscRSUA* transcript, which showed an unusual repression pattern. Indeed, RyhB represses the downstream part of the *isc* polycistron, *iscSUA*, without affecting the upstream part, *iscR*. This surprising observation suggests that RyhB induces a discoordination in the *iscRSUA* polycistronic transcript, which results in specific

*iscR* expression during iron starvation. However, the mechanism of this sRNA-induced discoordination was not understood.

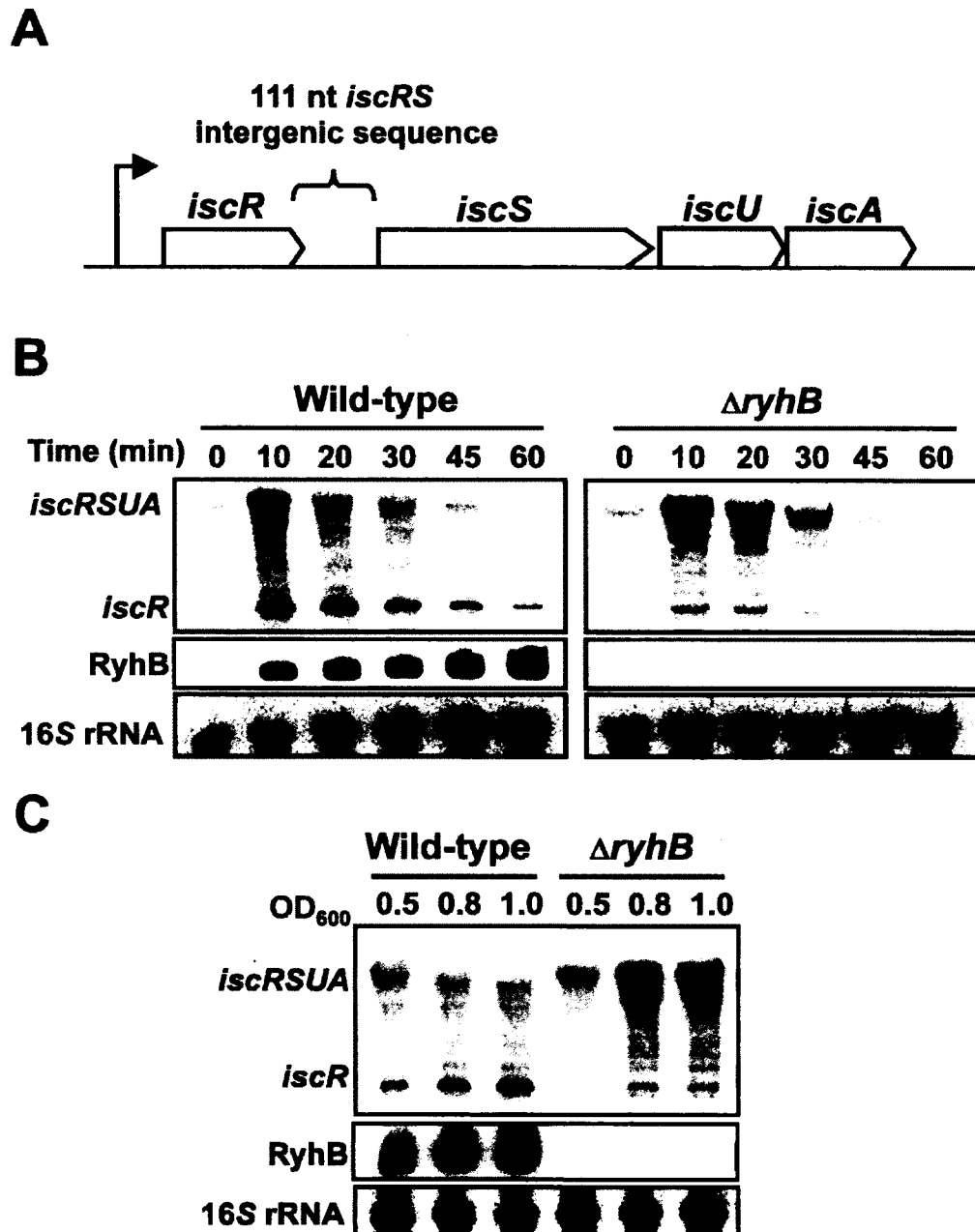
At least two polycistronic transcripts whose expressions are discoordinated by sRNAs have been described recently, each with a different mechanism. In the first mechanism, the sRNA Spot42 blocks the initiation of translation of the third gene in the polycistronic *galETKM* mRNA (Moller et al, 2002). This regulation is purely translational since the levels of *galETKM* polycistron are unaffected by the action of Spot42 sRNA (Moller et al, 2002). The second mechanism of polycistronic discoordination relies on GlmY sRNA, which activates both the stability and the translation of *glmS*, a transcript that originates from a sRNA-independent RNase E cleavage between the ORFs of the polycistronic *glmUS* mRNA (Kalamorz et al, 2007, Reichenbach et al, 2008, Urban & Vogel, 2008). In this example, however, the sRNA does not act on the polycistronic mRNA, but on the previously cleaved monocistronic *glmS* mRNA product.

We describe here a previously uncharacterized mechanism of sRNA-induced discoordination of genes within the polycistronic *iscRSUA* transcript. Through direct RyhB action, the downstream section encoding the Fe-S cluster formation machinery, *iscSUA*, is degraded, giving rise to the remaining fragment encoding IscR, a transcriptional regulator. We demonstrate that RyhB pairs to the ribosome-binding site (RBS) of *iscS* to promote the degradation of the *iscSUA* section through the RNA degradosome action. While the *iscSUA* section decreases, the upstream *iscR* section remains protected by a strong secondary structure located between the *iscR* and *iscS* genes. This intergenic secondary structure is reminiscent of Repetitive Extragenic Palindromic (REP) sequences (see Discussion for details). The 3' end of *iscR* fragment, generated after the RyhB-induced cleavage, has been mapped several nucleotides upstream of the RyhB pairing site on *iscS*. As expected, while the expression of IscS protein is significantly reduced, the expression of IscR remains intact. This novel mechanism of posttranscriptional processing, which modulates the activity and promoter specificity of the IscR transcription factor, demonstrates the synergy between a sRNA and a REP sequence for optimal usage of polycistronic mRNAs.

## RESULTS

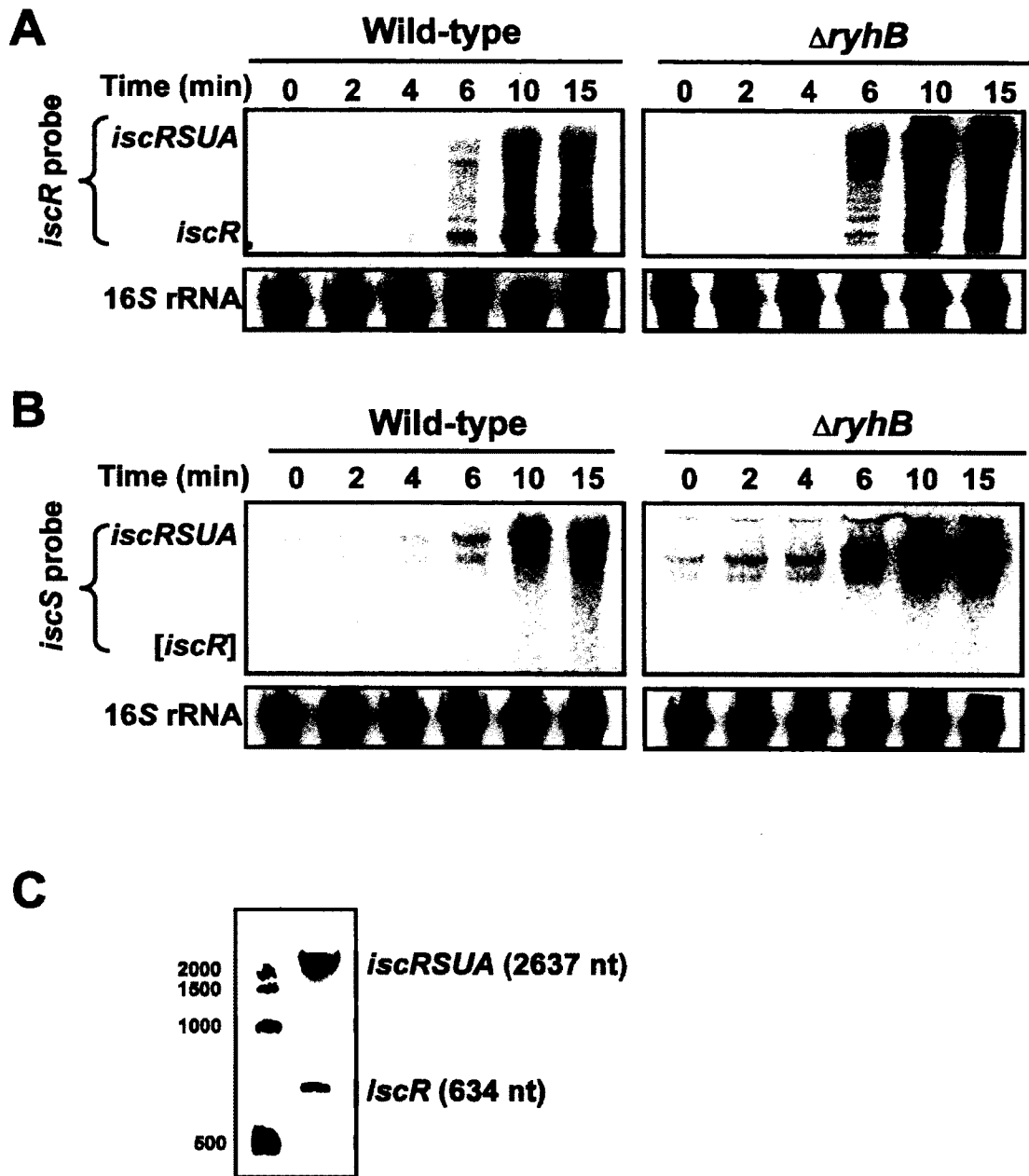
### **Expression of the sRNA RyhB reduces *iscSUA* transcript level and increases *iscR* transcript under iron starvation**

The sRNA RyhB promotes the degradation of a group of mRNAs encoding Fe-using proteins (Massé & Gottesman, 2002, Massé et al, 2003, Massé et al, 2005). In a previous experiment designed to determine new mRNAs targeted by the sRNA, we observed that RyhB down-regulated the 3' section of the *iscRSUA* polycistronic mRNA (pictured in Fig 1A), *iscSUA*, while leaving the upstream *iscR* section intact (Massé et al, 2005). We confirmed these results with quantitative real-time PCR in which RyhB expression significantly decreased *iscS* transcript levels without affecting *iscR* transcript levels (data not shown). To investigate this mechanism of RyhB-induced *iscRSUA* polycistron discoordination, we extracted the total RNA from wild-type and  $\Delta$ *ryhB* cells grown in LB media in the presence of the iron chelator 2,2'-dipyridyl (dip), which induces both RyhB and *iscRSUA* expression (see Introduction, Massé & Gottesman, 2002, Schwartz et al, 2001). We then performed Northern blots with probes specific to *iscR* and RyhB transcripts. As shown in Fig 1B middle panels, the sRNA RyhB is strongly expressed in wild-type cells after the addition of dip. In the Northern blots performed with the *iscR*-specific probe (Fig 1B, upper panels), two distinct bands are detected. The first is a low-molecular weight band corresponding to *iscR* alone and a second band of higher molecular weight corresponding to the full-length *iscRSUA*. Co-migration with an RNA molecular weight marker demonstrates the length difference between the two observed bands (Fig S1C). While the *iscR* band is quite significant in the wild-type cells, it is weak in the  $\Delta$ *ryhB* cells (compare left panel with right panel in Fig 1B). Whether in wild-type or  $\Delta$ *ryhB* cells, the level of *iscRSUA* transcript declines after 10-20 min, presumably due to the recovery of intracellular iron homeostasis and activated Holo-IscR repression (see Discussion for details). When we used the same RNA samples to perform a Northern blot with an *iscS*-specific probe, only the full-length *iscRSUA* fragment was detected (as shown in Fig S1B). This demonstrates that both *iscR* and *iscRSUA* mRNAs exist as individual molecules in the cell.



**Figure 1. RyhB sRNA induces a polarity in the *iscRSUA* polycistronic transcript.**

(A) Genomic organisation of the *iscRSUA* polycistronic operon. (B) Northern blots on total RNA extracted from wild-type and  $\Delta$ *ryhB* cells, hybridized with an *iscR*-specific or RyhB-specific probe. Cells were grown in LB medium until an OD<sub>600</sub> of 0.5 and dip was added (200  $\mu$ M final) at time 0 to induce the expression of RyhB and the *isc* operon. Total RNA was extracted at the indicated times. (C) Northern blots on total RNA extracted from wild-type and  $\Delta$ *ryhB* cells, hybridized with an *iscR*-specific or RyhB-specific probe. Cells were grown in M63 medium (without iron) and total RNA was extracted at the indicated OD<sub>600</sub>. 16S rRNA was used as a loading control.



**Figure S1. Northern blot with an *iscR*-specific probe (A) and *iscS*-specific probe (B).** Cells were grown in LB media to an OD600 of 0.5 and 2,2'-dipyridyl (200 mM) was added at time 0 to simulate iron starvation. Total RNA was extracted at indicated times. [*iscR*] represent where an *iscR* transcript should appear with an *iscR*-specific probe. 16S rRNA was used as a loading control. (C) Comparison of *iscR* and *iscRSUA* transcripts with an RNA molecular weight marker.

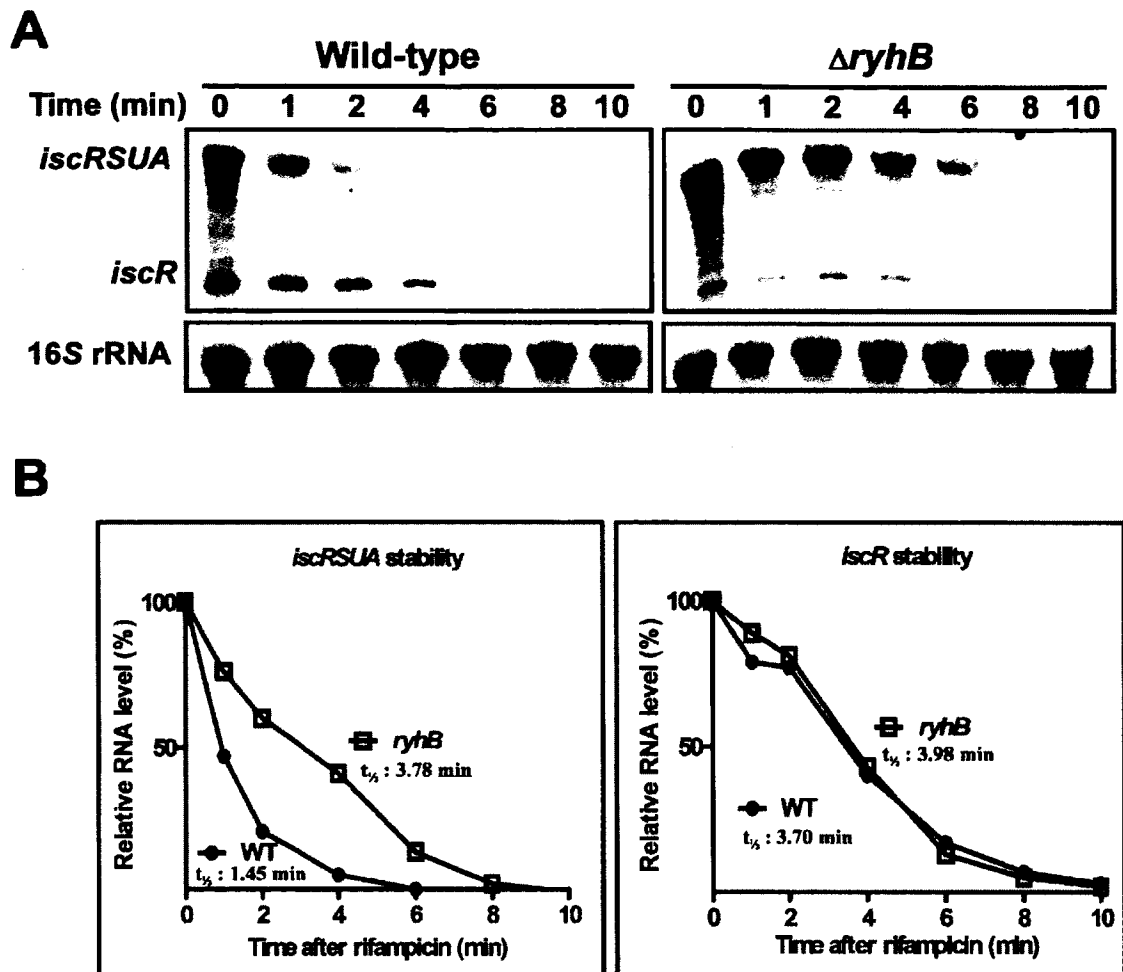
We then investigated the steady state expression of the *iscRSUA* transcript in WT and  $\Delta ryhB$  cells grown in minimal M63 media without iron, which allows constitutive RyhB



expression in wild-type cells (Fig 1C, middle panel). Figure 1C upper panel shows that, while the *iscR* transcript is more abundant in the wild type strain (left panel), the full-length *iscRSUA* transcript becomes dominant in the  $\Delta$ *ryhB* mutant (right panel). Contrary to the results obtained in LB medium, *iscRSUA* expression is very stable in  $\Delta$ *ryhB* cells grown in M63 without iron (compare Fig 1B and C). This suggests that IscR remains under the Apo-form and does not repress the *isc* operon. Taken together, these results indicate that RyhB promotes the specific expression of the *iscR* transcript and significantly reduces the full-length *iscRSUA* transcript level.

### **The stability of the *iscRSUA* transcript is decreased by the sRNA RyhB**

RyhB promotes the full degradation of many target mRNAs (Massé et al, 2003, Massé et al, 2005). However, our results with *iscRSUA* indicate that RyhB triggers the specific degradation of the downstream cistrons *iscS*, *iscU* and *iscA*, without affecting the *iscR* fragment. To investigate this, we determined the specific stability of the *iscRSUA* and the *iscR* mRNAs in the absence or presence of RyhB. In the experiment shown in Figure 2, we added dip in the culture for 10 min to induce *ryhB* and *iscRSUA* expression, followed by addition of rifampicin to stop transcription. Total RNA was then extracted at different time points and the RNA was hybridized with an *iscR*-specific probe (Fig 2A). As shown in Figure 2B the half-life of the *iscR* mRNA is almost the same whether RyhB is expressed (wild type strain: 3.70 min) or not ( $\Delta$ *ryhB* mutant : 3.98 min). However, the half-life of the *iscRSUA* mRNA is significantly shorter in the wild type strain (1.45 min) than in the  $\Delta$ *ryhB* mutant (3.78 min). This results indicates that RyhB decreases the stability of the *iscRSUA* mRNA without affecting *iscR* mRNA.



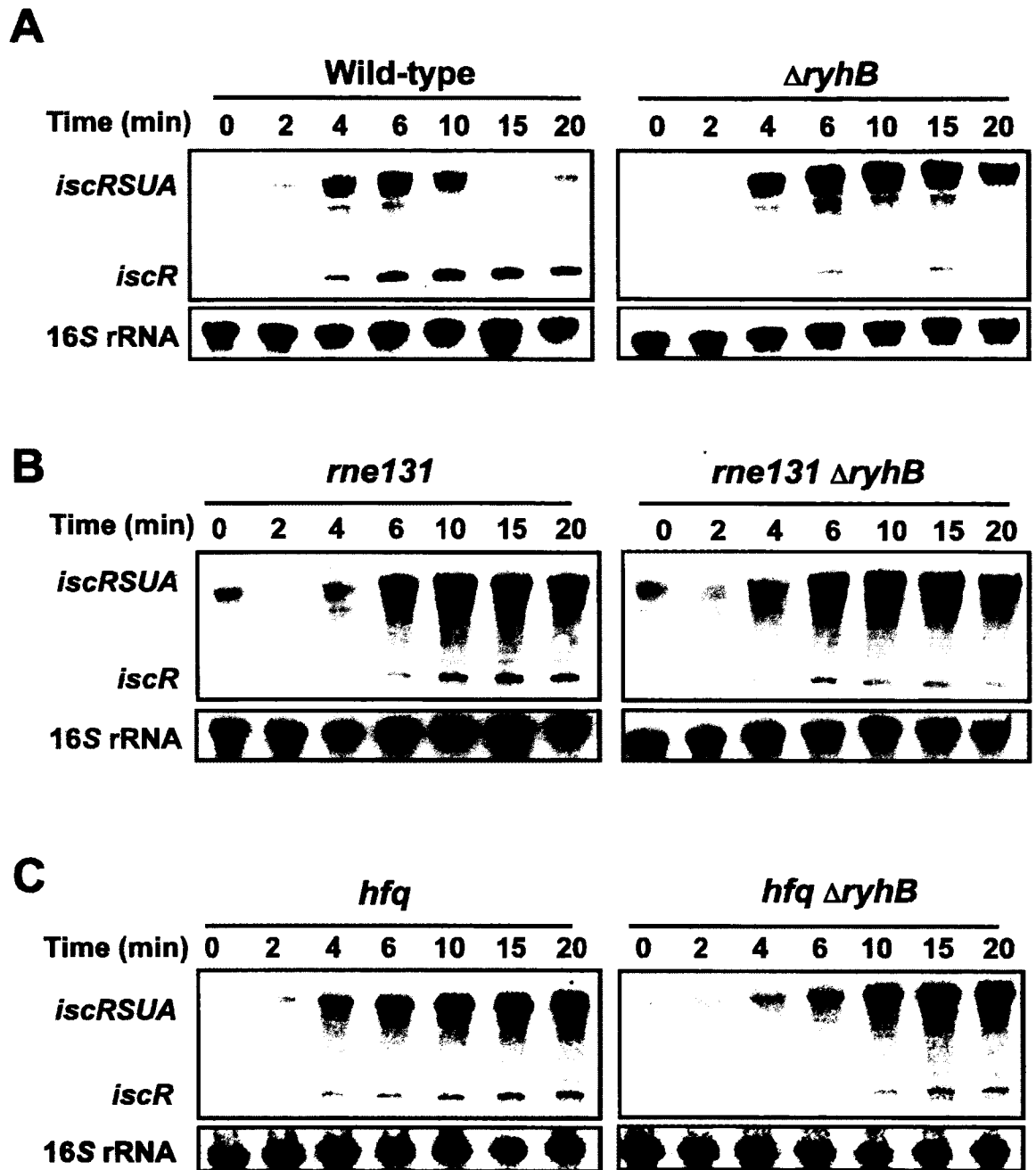
**Figure 2.** RyhB decreases the stability of the *iscRSUA* transcript, not *iscR* transcript. (A) Northern blots on total RNA extracted from wild-type and  $\Delta ryhB$  cells, hybridized with an *iscR* probe. Cells were grown in LB media to an  $OD_{600}$  of 0.5, at which point dip was added (200  $\mu$ M final) for 10 min to induce the expression of RyhB and *isc*. Rifampicin was added (250  $\mu$ g/ml final) at time 0 to block transcription. Total RNA was extracted at indicated times. 16S rRNA was used as a loading control. (B) Densitometry analysis of three Northern blots performed as in (A).

### The RNA degradosome and the RNA chaperone Hfq are essential for the RyhB-induced *isc* polarity

We previously demonstrated that RNase E and the RNA degradosome are involved in the RyhB-mediated degradation of target mRNAs (Massé et al, 2003). We tested for the potential role of the RNA degradosome in the RyhB-induced discoordination of the *iscRSUA* operon during iron starvation. As shown in Figure 3B, the inactivation of the

RNA degradosome (*rne131* mutant) results in increased *iscRSUA* mRNA level (compare with wild-type in Fig 3A). Interestingly, the *iscR* fragment does not accumulate significantly in the *rne131* mutant. This indicates that RyhB-dependent *iscR* accumulation depends upon partial degradation of the *iscRSUA* fragment and not blocked transcription. We do not observe a notable difference between the *rne131* mutant and the *rne131*  $\Delta$ *ryhB* double mutant, indicating that the sRNA has no effect without the RNA degradosome.

The RNA chaperone Hfq is essential for both RyhB stability and function (Massé & Gottesman, 2002, Massé et al, 2003, Geissmann & Touati, 2004, Morita et al, 2005). To investigate the role of Hfq in the *iscRSUA* regulation, we compare the effect of RyhB induction between wild-type and *hfq* cells. As shown in Fig 3C, the absence of Hfq results in reduced *iscR* transcript level as compared to wild-type (Fig 3A). Notably, the level of *iscRSUA* full-length (at time-points 15-20 min) is significantly more in *rne131* and *hfq* cells (independently from *ryhB*) as compared to wild-type demonstrating the critical effect of these factors on the differential degradation of the *iscRSUA* polycistron. In addition, these results indicate that when RyhB is absent ( $\Delta$ *ryhB*) or non-functional (*rne131* and  $\Delta$ *hfq*) the *isc* operon does not self-repress efficiently as in wild-type. This suggests that RyhB promotes the formation of Holo-IsCR through iron-sparing. Eventually, this will result in transcriptional repression of the *isc* operon (see Discussion for details).



**Figure 3.** The RNA degradosome and the RNA chaperone Hfq are essential for RyhB induced differential degradation of the *iscRSUA* polycistron. (A) Northern blots on total RNA extracted from wild-type and  $\Delta ryhB$  cells, hybridized with an *iscR*-specific probe. Cells were grown in LB media to an  $OD_{600}$  of 0.5, at which point dip was added (200  $\mu$ M final) at time 0 to induce the expression of RyhB and *iscRSUA*. Total RNA was extracted at indicated times. (B) Same as in (A) but total RNA extracted from RNA degradosome mutant (*rne131*) and  $\Delta ryhB$  *rne131* double mutant. (C) Same as in (A) but total RNA extracted from *hfq* mutant and *hfq*  $\Delta ryhB$  double mutant. 16S rRNA was used as a loading control.

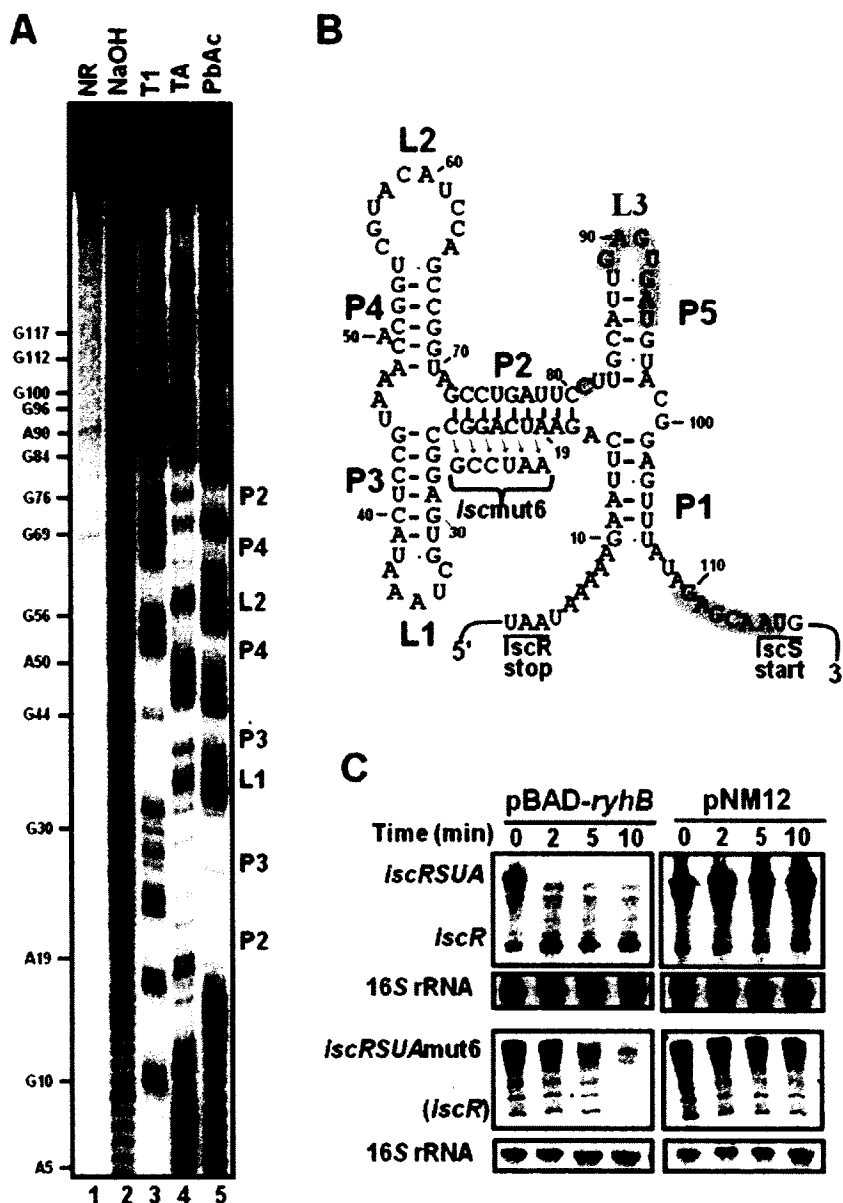
**The intergenic region between *iscR* and *iscS* forms a strong secondary structure that is responsible for the RyhB-dependant accumulation of *iscR***

To explain the accumulation of *iscR* mRNA following the expression of RyhB, we sought for potential secondary structure in the 111 nucleotides-long intergenic region between *iscR* and *iscS*. Using the mfold software ([www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold](http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold)), we found that this intergenic region can form a strong secondary structure (Figure 4B), which is very well conserved among *Enterobacteriaceae* as shown in Figure 5. This conservation of secondary structure suggests an important physiological role. The secondary structure was also determined *in vitro* by lead acetate (PbAc) probing (Figure 4A), which cleaves single-strand RNA molecule. We note that stems P2, P3 and P4 are protected against cleavage by Pb<sup>+</sup> ions (Figure 4A and B), indicating that they are double stranded. Stems P1 and P5 are cleaved, suggesting they form weaker interactions. This structure is reminiscent of repetitive extragenic palindromic (REP) sequence (see Discussion for details).

To assess the potential role of this secondary structure, we constructed a mutant (*iscmut6*; see Fig 4B for description) in which we disrupted the main stem (P2). We then analysed the effect of RyhB on the *iscmut6* mutant by using the pBAD-*ryhB* vector, which expresses RyhB from an arabinose-inducible promoter (Massé et al, 2003). Cells carrying either the pBAD-*ryhB* or control pNM12 plasmids (described in Materials and Methods) were grown in minimal M63 medium, which allows the constitutive expression of the *isc* operon. While the induction of RyhB (pBAD-*ryhB*) leads to a decrease of the full-length *iscRSUA* and *iscmut6* transcripts, as shown in Fig 4C (left panels), accumulation of *iscR* fragments only occurs from the *iscRSUA* transcript. These results indicate that the secondary structure between *iscR* and *iscS* is necessary for the accumulation of an *iscR* fragment following the expression of RyhB.

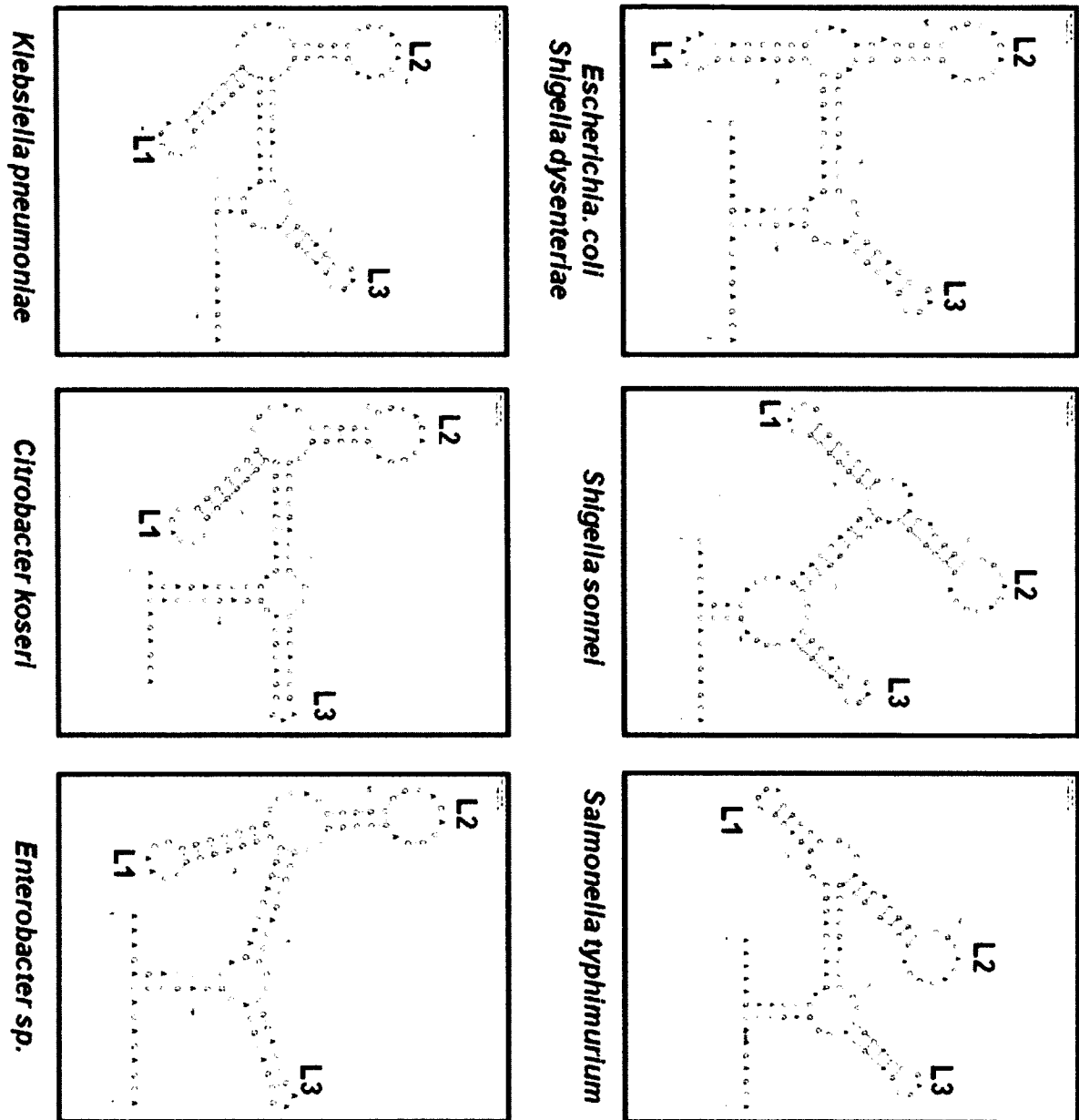
We then characterized the 3'-end of the accumulating *iscR* RNA fragment following the expression of RyhB, by performing a 3'-RACE experiment (described in Materials and Methods). To do this, we used the total RNA extracted from cells in which RyhB has been expressed for 30 minutes (see Figure S6; pBAD-*ryhB*; 30 min). As shown in Figure 4B, the 3'-end of the *iscR* fragment is situated in the untranslated region between *iscR* and *iscS*,

upstream of the pairing with RyhB (see below). Hence, the *iscR* RNA fragment resulting from RyhB expression contains the entire open reading frame of *iscR* and thus is likely to be translated. Notably, the 3' end of the *iscR* fragment is situated just downstream of the stronger stem (P2) of the structure described above.



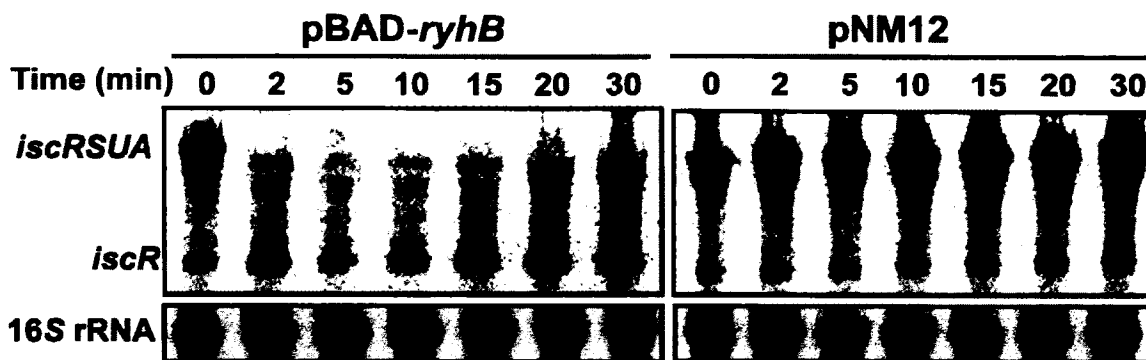
**Figure 4.** The *iscRS* intergenic region harbours a strong secondary structure (A) Secondary structure probing of the intergenic *iscRS* region (5' end-labeled). The *iscS* fragment used contains the intergenic region between *iscR* and *iscS* and the first 100 nucleotides of *iscS* coding sequence. Probing was performed in denaturing conditions (lanes 3, 4, and 5) or in native conditions (lanes 6, 7, 8 and 9). The position of several G and A residues are given. C, control RNA; OH, alkaline ladder; T1, RNase T1; TA, RNase TA; PbAc, lead acetate. (B) Secondary structure of the intergenic region between *iscR* and *iscS* cistrons as determined by the mfold software (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/>). The P2, P3, and P4 stems and the L1 and L2 loops are visible by secondary structure probing in A. The C81 (grey circle) is the last nucleotide in the RyhB-induced *iscR* transcript as determined by 3'-RACE (see text for details). (C) Northern blots on total RNA extracted from wild-type strain and *iscRSUAmut6* mutant (mutation shown in B), hybridized with an

*iscR* probe. Both strains carry a plasmid allowing arabinose-dependent RyhB expression (pBAD-*ryhB*) or a control vector (pNM12). Cells were grown in M63 media to an OD<sub>600</sub> of 0.5 and arabinose was added at time 0 (final concentration of 0.01%). Total RNA was extracted at the indicated time. 16S rRNA was used as a loading control.



**Figure 5.** Conservation of sequence and structure in the intergenic region between *iscR* and *iscS* among *Enterobacteriaceae*. Sequence homologies were found using NCBI BLAST tool and the secondary structure was determined using the mfold software. All structures shown are localized in the intergenic region between *iscR* and *iscS* or their putative homologues in each bacterium. Localisation of loops L1, L2 and L3 are also indicated.



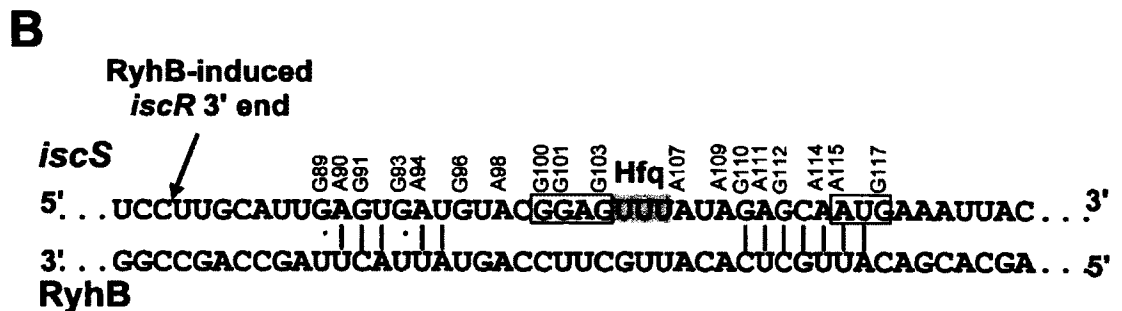
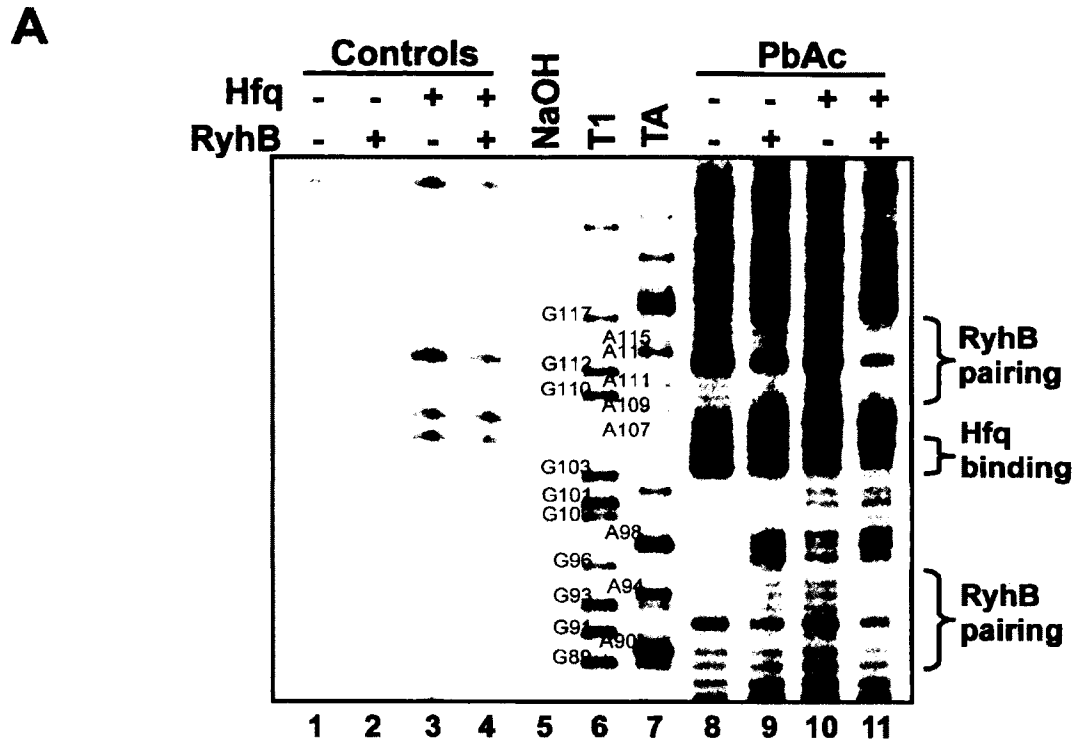


**Figure S2.** Effect of RyhB expressed from pBAD-ryhB construct on the *iscRSUA* polycistronic mRNA. Arabinose was added at time 0 at a final concentration of 0.01%, which expresses RyhB to a level similar to wild-type expression (data not shown).

### Direct pairing of RyhB at the 5' UTR of the *iscS* mRNA

To investigate the effect of RyhB on the *iscRSUA* polycistron, we sought for a possible pairing site between both RNAs. Using bioinformatics tools, we found a putative pairing between RyhB and the 5'-UTR of *iscS* (Fig 4B and 6B), which covers from the region upstream of the ribosome binding site (RBS) to the first codon of the target mRNA, a hallmark of negatively regulating sRNAs (Gottesman, 2004). To investigate the pairing between RyhB and *iscS* 5'-UTR, we performed footprinting assays with a 5'-end radiolabeled *iscS* RNA in the absence and presence of RyhB RNA and the RNA chaperone Hfq. We used PbAc probing to visualize the pairing between both RNAs as Pb<sup>+</sup> ions specifically cleave single stranded RNA. As shown in Figure 6A, the addition of RyhB to *iscS* decreases the cleavage in the region of the start codon of *iscS* (compare lanes 8 and 9), indicating a pairing between both *iscS* and RyhB RNAs. The effect of the RNA chaperone Hfq was also addressed in this experiment. In the presence of Hfq, the protecting effect of RyhB on *iscS* is increased (compare lanes 9 and 11), indicating that the chaperone facilitates the pairing between both RNAs. The addition of Hfq alone protects the nucleotides between G103 and A107 (compare lanes 8 and 10), suggesting it binds to the three Us located downstream of the *iscS* Shine-Dalgarno sequence. All these results are consistent with the predicted pairing shown in Figure 6B. Although it is likely that the region between G100 and U104 of *iscS* interacts with RyhB, there is no such evidence as this region seems resistant to Pb<sup>+</sup> cleavage (Fig 6A).

We also tested the RyhB-*iscS* pairing *in vivo* using an *iscRS'-lacZ* transcriptional fusion inserted in single copy at the phage  $\lambda$  integration site of the chromosome (illustrated in Fig S2; see Materials and methods for details). As shown in Fig S3, the  $\beta$ -galactosidase activity is decreased in the wild-type fusion following the expression of RyhB from an arabinose-inducible promoter. We constructed several mutants of *iscS* to disrupt the pairing between RyhB and *iscS* and we measured the  $\beta$ -galactosidase activity in the absence or presence of RyhB. We had to mutate at least 7 nucleotides in the *iscS* 5'-UTR region to disrupt the RyhB effect (*iscRS'mut7-lacZ*). However, the RyhB mutant that is compensatory to *iscRS'mut7-lacZ* could not restore the wild-type effect. This suggests that, because the mutated region is close to the Hfq binding site determined for RyhB (Geissmann & Touati, 2004), the compensatory RyhB mutant becomes ineffective. Together, the *in vitro* and *in vivo* results indicate that RyhB pairs at the 5'-UTR of *iscS*, which is the first step to a decrease in full length *iscRSUA* transcript and accumulation of an *iscR* transcript. The pairing is particularly strong on the *iscS* initiation codon region, correlating with our footprinting assays above (see Fig 6A). These results suggest that RyhB pairing could disturb translation initiation.



**Figure 6.** Analysis of the RyhB pairing site on *iscS*. (A) Secondary structure probing of the 5' end-labeled *iscS* mRNA in the presence or not of RyhB and Hfq. The position of several G and A residues are given. NaOH, alkaline ladder; T1, RNase T1; TA, RNase TA; PbAc, lead acetate. All experiments were performed in native conditions except for NaOH, T1 and TA ladders. (B) Pairing between RyhB and the 5' UTR of *iscS*. This pairing overlaps the putative ribosome binding site and the translation start codon of *iscS* (boxed area). The 3' end of the *iscR* mRNA that accumulates following the expression of RyhB was determined by 3'-RACE and is shown in B. It is situated in the 111 nucleotides long intergenic region between *iscR* and *iscS* cistrons.

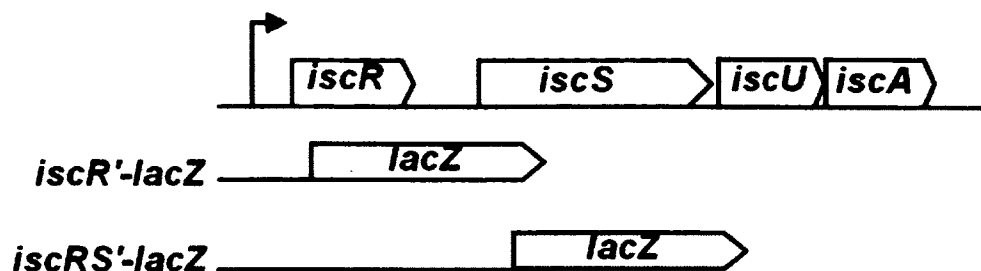
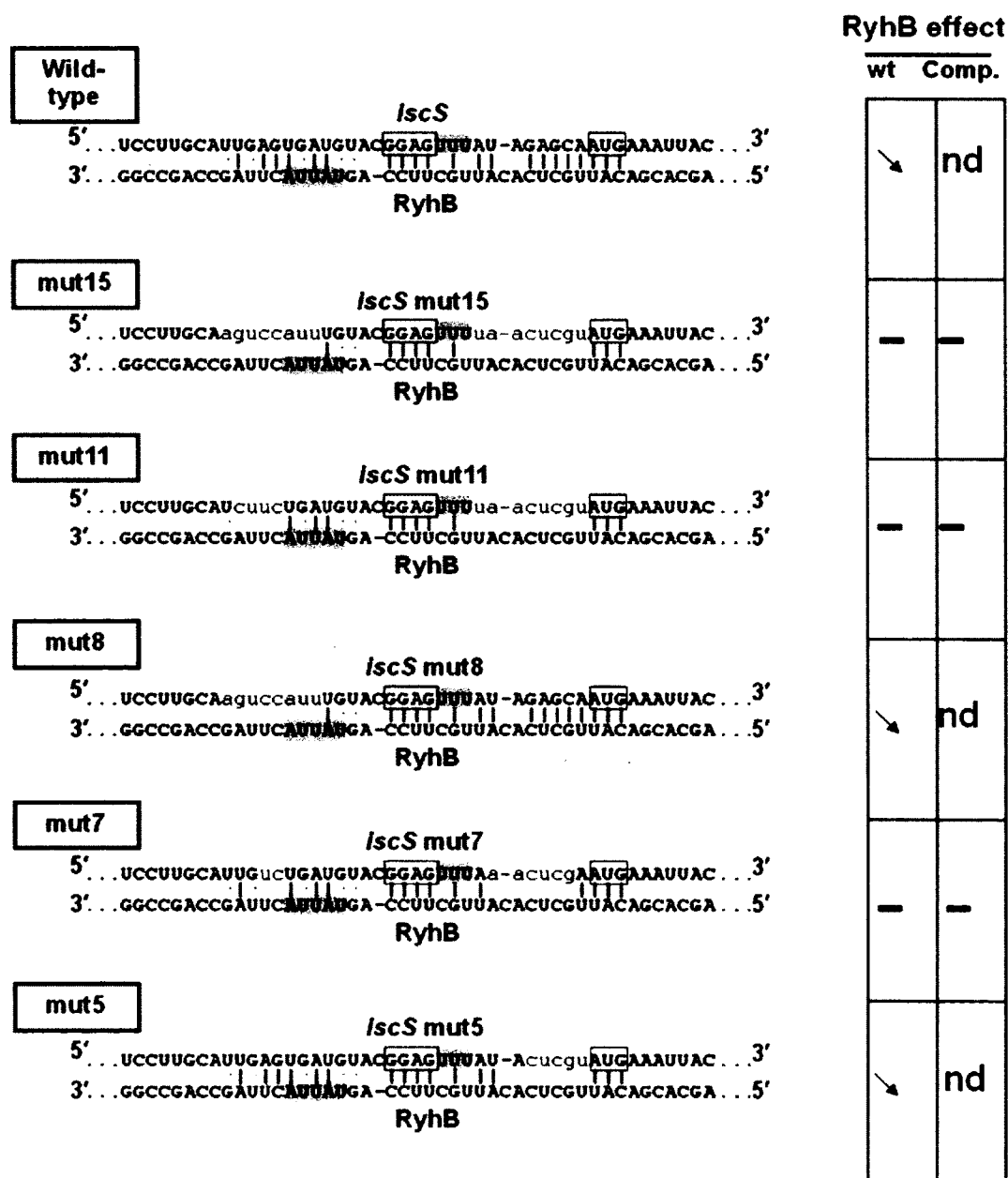


Figure S3. Schematic of the *lacZ* fusion used in this work.



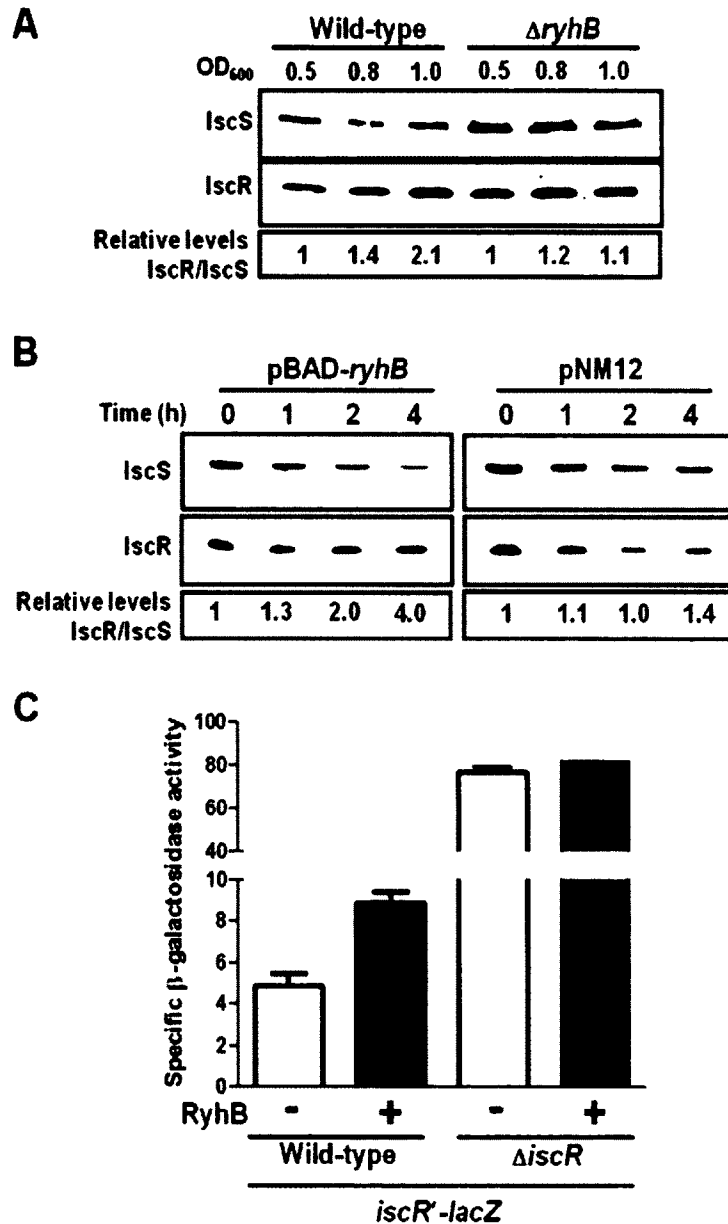
**Figure S4.** . Effect of RyhB expression on different *iscRS'-lacZ* constructs. Mutations in *iscS* are in light lowercase. The effect of RyhB (in either wild-type RyhB or RyhB compensatory to *isc* mutant) on the cognate *iscRS'-lacZ* construct is indicated in the box at right. The grey boxes represent Hfq binding on *iscS* (see Fig 6B) and RyhB (Geissmann & Touati, 2004). The empty boxes represent the Shine-Dalgarno sequences or the first AUG codon. nd: not determined.

### **Physiological significance of the RyhB-induced discoordination of *iscRSUA* polycistron**

Our 3'-RACE experiment (Figure 4B) showed that the RyhB-dependent *iscR* fragment contains the entire ORF of *iscR*. However, it is unclear if translation remains active or not. To address this question, we used quantitative Western blots to measure the levels of IscR and IscS proteins following RyhB expression. We first measured the steady-state level from wild-type and  $\Delta ryhB$  cells grown in minimal M63 medium (similar to Fig 1C). The results in Fig 7A indicate a significant increase (over 2-fold) in the IscR/IscS ratio as cells reached an OD<sub>600</sub> of 1.0. We also performed a similar experiment but with RyhB expressed from the pBAD-*ryhB* vector. As shown in Figure 7B, the expression of RyhB (pBAD-*ryhB*) leads to a significant decrease in the protein levels of IscS. However, in the same conditions, IscR levels remain stable even in the presence of RyhB. These results show a 4-fold increase in the IscR/IscS ratio after 4 h of RyhB expression as compared to the control experiment with an empty vector (pNM12), in which the IscR and IscS levels are not significantly affected.

IscS, IscU, and IscA are responsible for Fe-S clusters biogenesis and are thought to transfer these clusters to IscR (Schwartz et al, 2001). When IscR is bound to a Fe-S cluster (holo-IscR), it represses the *isc* promoter as a feed-back control (Schwartz et al, 2001; see Introduction for details). However, because the IscS level decreases following RyhB expression, we hypothesized that the IscR protein produced in these conditions is under the apo form (without a Fe-S cluster). To test this, we measured the expression of the *isc* promoter using an *iscR'-lacZ* transcriptional fusion (illustrated in Fig S7) inserted at the  $\lambda$  attachment site in a strain harbouring the endogenous *iscRSUA* operon. As shown in Figure 7C, the expression of RyhB from a pBAD-*ryhB* plasmid leads to a 2-fold increase in  $\beta$ -galactosidase activity as compared with the control plasmid (pNM12). However, if we delete the endogenous copy of the polycistron ( $\Delta iscR$ ), there is no significant difference in

the  $\beta$ -galactosidase activities with or without RyhB. These results suggest that while RyhB down-regulates IscS, the IscR transcriptional regulator remains expressed, however under the apo-IscR form.

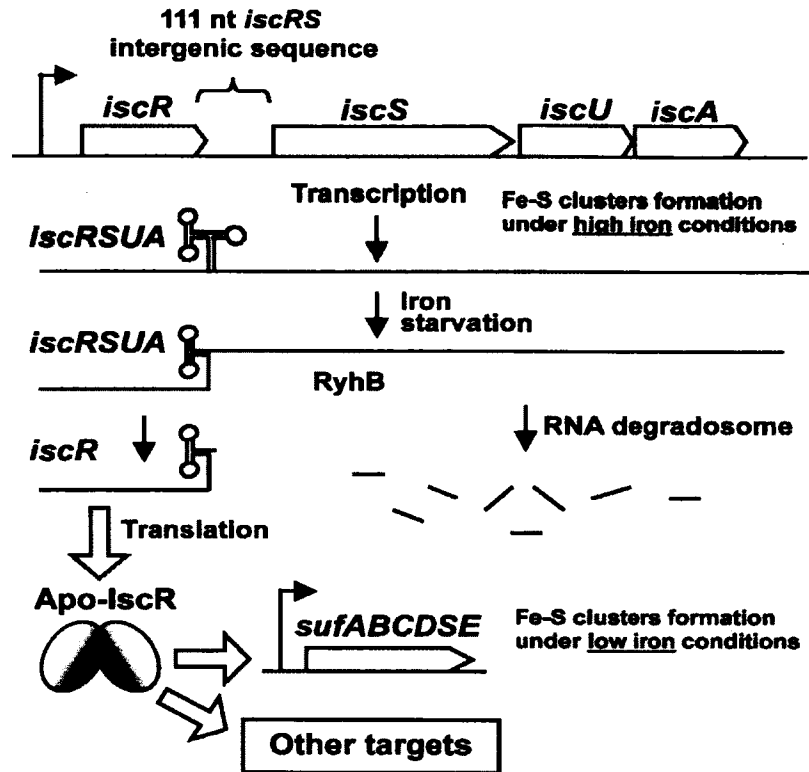


**Figure 7.** Effect of RyhB on IscS and IscR proteins. (A) Quantitative Western blots using IscR- and IscS-specific antibodies on total protein extracted from wild-type and  $\Delta$ *ryhB* cells. Cultures were grown in M63 media (without iron) and total proteins were extracted at the indicated OD<sub>600</sub>. (B) Quantitative Western blots using IscR- and IscS-specific antibodies on total proteins extracted from cells carrying pNM12 or pBAD-*ryhB* plasmids. Cells were grown in LB media to an OD<sub>600</sub> of 0.5 and arabinose was added at time 0. Total

proteins were extracted at indicated times. In both Western blots experiments (A and B), IRDye 800CW conjugated secondary antibodies were used, allowing quantification. (C) The activity of the *isc* promoter was measured by  $\beta$ -galactosidase assay using the transcriptional *iscR'*-*lacZ* fusion. Wild-type and  $\Delta$ *iscR* cells carrying either pNM12 (-) or pBAD-*ryhB* (+) were grown in LB media in which arabinose was added at an OD<sub>600</sub> of 0.1.

## DISCUSSION

This work demonstrates a novel sRNA-induced mechanism of transcript polarity through differential degradation of a polycistronic mRNA. In this mechanism, the sRNA RyhB initiates the degradation of a specific section of a target mRNA. Our working model (Figure 8) suggests that when RyhB is expressed during iron starvation, it pairs to the RBS and the translation start codon of *iscS*. This model is supported by data indicating that the pairing of RyhB with *iscS* results in a rapid (< 2 min, Fig 4C) degradation of the 3' region of the polycistron encoding IscS, IscU and IscA. However, unlike any other sRNA target, the 5' region of the *iscRSUA* polycistron is protected from the action of the RNA degradosome. We identified a REP sequence (Higgins et al, 1982, Newbury et al, 1987b) in the 111-nucleotides-long intergenic region between *iscR* and *iscS*, which forms a strong secondary structure that likely protects the upstream *iscR* cistron from degradation. To our knowledge, this is the first time that a REP sequence is linked to the action of a sRNA.



**Figure 8.** Working model of RyhB-induced partial degradation of the *iscRSUA* polycistron in *Enterobacteriaceae* and its physiological significance. Under high iron conditions, RyhB is not expressed and the *iscRSUA* polycistron can be translated and assure the house-keeping Fe-S cluster biogenesis. When iron becomes scarce, RyhB is expressed and pairs to the 5'-UTR of *iscS*. This leads to the recruitment of the RNA degradosome and the rapid degradation of *iscS*, *iscU* and *iscA* cistrons. However, a strong secondary structure in the intergenic region between *iscR* and *iscS* protects the *iscR* cistron from degradation. The IscR protein produced under these conditions is likely to be under the apo form (lacking Fe-S) and may activate the expression of the *suf* operon, which would then overtake the Fe-S cluster biogenesis.

REP sequences occupy up to 1% of the *E. coli* genome mostly on non-translated RNA (Stern et al, 1984). When located downstream of an RNA, REP sequences have been shown to stabilize the transcript (Newbury et al, 1987b) and to be responsible for a differential rate of decay among parts of a polycistron (Belasco et al, 1985). While it is not induced by a sRNA, a previously demonstrated mechanism of discoordination based on REP sequence has been described for the polycistronic mRNA *rxcA*, expressed in the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata* (*R. capsulata*). Although *rxcA* is expressed as a single transcript encoding 5 ORFs, the 3'-end of the mRNA is rapidly degraded while the upstream RNA section encoding 2 ORFs remains stable (Belasco et al, 1985). This



differential stability between both sections of the transcript results in a 10 to 30-fold excess in the polypeptides originating from the stable upstream section as compared to the rapidly decaying downstream section (Kaufmann et al, 1982, Schumacher & Drews, 1978). A REP sequence located in the intercistronic region is thought to be responsible for the protection of the upstream section of the mRNA (Belasco et al, 1985). Thus, the location of the REP structure and its effect on the discoordination of the *rxcA* mRNA is reminiscent of the *iscRSUA* mRNA described in this work.

Furthermore, the REP-dependent discoordination of the *rxcA* mRNA explains the generation of a small amount of *iscR* fragment in the absence of RyhB (Fig 1B and C and Fig 3A and B). As the normal turnover of the *iscRSUA* transcript (independently from RyhB) may start downstream of the REP sequence, in the *iscSUA* section, the progression of the 3'-5' exonuclease of the RNA degradosome will stop at the REP structure, thereby generating an *iscR* fragment. Indeed, we have mapped an *iscR* fragment, extracted from  $\Delta$ *ryhB* cells, with the same 3' end as the one described in Fig 4B. Thus, this suggests that although the 3' end of *iscR* is not absolutely dependent on RyhB, it requires RyhB to accumulate to a significant amount.

An additional point to consider is the negative effect of RyhB on *iscS* translation initiation, which could be sufficient to initiate cleavage or transcriptional stop through the transcriptional terminator Rho. Indeed, RyhB was shown to block translation in the absence of the RNA degradosome (Morita et al, 2006). However, our results in Fig 3B demonstrate that even though RyhB is expressed, there is no accumulation of the *iscR* fragment in the absence of the RNA degradosome. Therefore, while RyhB may block the translation initiation of *iscS*, it is not sufficient to induce a transcript cleavage (or termination) that would generate an *iscR* fragment.

While the mechanism protecting *iscR* from degradation is fairly clear, we can speculate on two different pathways that explain the RyhB-initiated *iscSUA* degradation. First, RyhB pairs with *iscRSUA* and induces an endonucleolytic cleavage at the site identified by 3'-RACE (3' end of *iscR* mRNA; Figure 4B). Such a cleavage close to the P2 stem would leave the P2, P3, and P4 stems intact, which would help stabilizing the 3'-end of *iscR*. Because the sequence CU situated between stems P2 and P3 is perfectly conserved

among *Enterobacteriaceae* (Figure 5), this suggests that it may contribute to recruit or help in determining a specific cleavage site.

The second potential pathway implies that RyhB pairing induces an RNase E-dependent endonucleolytic cleavage within the *iscS* ORF, which is followed by 3'-5' exonucleolytic degradation by the PNPase. This suggests that RyhB-induced degradation depends on a sequence within the *iscS* ORF recognized by the RNase E. To address this question, we developed an assay based on RyhB-sensitivity of the *iscS* gene containing various deletions within the ORF. Our preliminary results suggest that the RyhB-induced initial cleavage occurs within the *iscS* ORF, downstream of RyhB pairing, and not in the *iscRS* intergenic structure, upstream of the RyhB pairing (G. Desnoyers and E. Massé, manuscript in preparation). Thus, in light of these results, we favour the second mechanism in which the *iscRS* intergenic REP structure blocks the upstream progression (3'-5') of PNPase following an RNase E-dependent cleavage in the *iscS* ORF. Because we mapped the 3' end of the *iscR* fragment close to (one nucleotide downstream) the P2 stem, we believe that the P2 stem is key to prevent the 3'-5' exonucleolytic activity of PNPase to progress further upstream. This structure seems essential to protect the *iscR* cistron because in the case of disruption of the P2 stem (Fig 4B and C) or complete deletion of the intergenic region (data not shown), *iscR* RNA does not accumulate. Because RyhB acts downstream of the REP sequence, this also explains the similar stabilities measured for the *iscR* fragment in the presence or absence of RyhB (Fig 2).

As suggested in our model, the intergenic REP sequence between *iscRS* is critical to stabilize *iscR* transcript. Nevertheless, the RNA degradosome contains a DEAD-box RNA helicase (RhlB) that unfolds structured RNA and potentially REP sequences. Indeed, RhlB has been shown to help *in vitro* degradation of REP-stabilized RNAs by an ATP dependent mechanism (Py et al, 1996). However, it also has been reported that RhlB has no effect on accumulation of REP-stabilized mRNA *in vivo* (Khemici & Carpousis, 2004). This difference between *in vitro* and *in vivo* data suggests that a yet uncharacterized factor binds to the intergenic structure to stabilize it or to block the RNA helicase activity. We believe that the loop L2, which is perfectly conserved among *Enterobacteriaceae* (Figure 5, S4, and S5), is potentially involved in binding such a factor. More generally, because REP

sequences can be found within intergenic region of several polycistronic mRNAs (Bachelier et al, 1999), it seems likely that other sRNA-regulated polycistron, with similar regulation as *iscRSUA*, will be characterized.

As mentioned in the Introduction, a similar yet mechanistically different example of discoordination of the polycistronic *glmUS* mRNA has been reported lately (Kalamorz et al, 2007, Reichenbach et al, 2008, Urban & Vogel, 2008). In this case, the *glmUS* polycistron mRNA is first cleaved by RNase E in the intergenic region, resulting in the appearance of *glmS* transcript. Then, in conditions of low glucosamine 6-phosphate (GlcN-6-P) concentration, the sRNA GlmZ is expressed and pairs to the newly formed *glmS* monocistronic RNA. This pairing of GlmZ activates *glmS* translation by freeing the RBS from an inhibitory secondary structure. The resulting increase in GlmS protein allows the expression of glucosamine 6-phosphate synthase GlmS, which replenishes the intracellular GlcN-6-P pool. Although this mechanism results in differential expression of a cistron, which originates from a polycistronic mRNA, it is fundamentally different from the RyhB-*iscRSUA* mechanism described in this work.

Another RyhB target, the *sdhCDAB* mRNA, has some analogy with the *iscRSUA* mRNA. The *sdhCDAB* transcript encodes four proteins and is down-regulated through RyhB pairing at the translation start of the second cistron *sdhD* (Massé & Gottesman, 2002). However, an attempt to detect the *sdhC* transcript, located upstream to the RyhB pairing, demonstrated that *sdhC* was barely detectable in the presence of RyhB and thus unlikely to be physiologically relevant (Massé & Gottesman, 2002). This observation reinforces the role of the *iscRS* intergenic structure for stabilizing the upstream *iscR* transcript. An additional polycistronic gene with similarities to *iscRSUA* is *malEGF*, which encode maltose binding receptor and transport proteins. The *malEFG* transcript harbours a REP sequence between *malE* and *malF* that was shown to stabilize *malE* against the RNA degradosome attack (Newbury et al, 1987a). While no sRNA is known to regulate the *malEFG* transcript, we cannot rule out a similar mechanism as the *iscRSUA* regulated by RyhB sRNA.

### Physiological significance

Physiologically, the mechanism described in this work may be important for the adaptation to iron starvation. Previously, it has been suggested that *iscRSUA* expression increases during iron starvation (Outten et al, 2004). Our results demonstrate that it is mostly the level of *iscR*, and not that of *iscS*, *iscU* and *iscA*, which is increased, due to the posttranscriptional action of RyhB (Fig 1B, C, and 4C). In conditions of dip treatment, there are two distinct mechanisms that contribute to *iscR* increase. The first is reduced Fe-S clusters, which contributes to generate apo-IscR and the subsequent derepression of the *isc* operon. The second mechanism is accumulation of the *iscR* section consequently to the RyhB-induced cleavage of *iscRSUA*. To our knowledge, this is the first description of a system where the expression of both the sRNA and its target mRNA increases in the same conditions (iron starvation), although with distinct mechanisms.

We notice that when dip is used to induce the expression of both RyhB and *isc* operon, the expression of *iscRSUA* reaches a peak after 10 min, which is followed by a rapid decrease (Fig 1B and 3A). In contrast to this, in the absence of RyhB ( $\Delta ryhB$ ) or its protein partners ( $\Delta hfq$ , *rne131*), the *iscRSUA* transcript accumulates significantly for a longer time period (Fig 1B and 3A, B, and C). Aside from the direct effect of RyhB on the *iscRSUA* transcript, a second mechanism can partly explain the decrease in *iscRSUA* transcript in wild-type cells. When expressed, RyhB generates free intracellular iron through iron-sparing (Massé et al 2005; Jacques et al 2006), which would help the formation of Holo-IscR. In wild-type cells treated with dip, RyhB expression reduces the expression of non-essential iron-using proteins, leaving the available iron to essential proteins (such as IscR, repressing the *iscRSUA* transcription after 15-20 min). In the *rne131* and  $\Delta hfq$  mutants however, even though it is expressed, RyhB cannot function normally. We believe that in the absence of functional RyhB, the intracellular iron will be sequestered by non-essential proteins, which results in iron shortage for essential iron-dependent proteins, such as IscR. Contrary to wild-type cells, where IscR becomes active after 15-20 min of dip addition, the  $\Delta ryhB$ , *rne131* and  $\Delta hfq$  mutants still express the *isc* operon because IscR lacks sufficient iron to act as a repressor (Apo-IscR).

The most important observation in our work is that through sRNA-induced differential degradation of the *iscRSUA* polycistron, the IscR protein is still produced even when iron is depleted. Recent work demonstrated that IscR regulates about 40 genes involved in anaerobic respiration, oxidative stress response, Fe-S biogenesis, and other metabolic pathways (Giel et al, 2006). Because *iscR* mRNA is protected from degradation during iron starvation, it suggests that the regulatory activity of IscR must be conserved during this stress. Interestingly, it has been reported that one of the promoters regulated by IscR is the *suf* promoter (Giel et al, 2006, Lee et al, 2008, Yeo et al, 2006). IscR contributes to the activation of the *suf* operon, but only under the apo-IscR form. In addition to the fact that iron is limited when RyhB is expressed, our results suggest that the down regulation of *iscS*, *iscU* and *iscA* by RyhB increases the ratio of apo-IscR. This is confirmed in the experiments shown in Figure 7A and B. It is likely that under conditions of RyhB expression and *iscSUA* repression, the *suf* machinery becomes the main machinery for biogenesis of Fe-S clusters. Indeed, proteins encoded by the *suf* mRNA are similar in role to IscS, IscU and IscA, but are thought to be more important during iron starvation (Outten et al, 2003). This hypothetical mechanism remains to be addressed in future work as it is of interest to understand the global regulatory network of iron homeostasis.

## MATERIALS AND METHODS

### *Strains and plasmids*

Strains used in this work are described in Table 1. Derivatives of EM1055 were used in all experiments. Strains made by P1 transduction were selected for the appropriate antibiotic-resistant marker. Strain EM1451 was selected for growth on media without leucine and was screened for inability to grow with arabinose as the only carbon source. Strain GD114 was generated by three-step PCR mutagenesis. Briefly, a first PCR reaction was performed using oligos EM359 and EM619 as primers (see Table 2 for oligonucleotides description). A second PCR reaction was performed using EM361 and EM618 as primers. The two PCR products were mixed to serve as the template for the third PCR reaction (primers EM359-EM361). The resulting PCR product was digested by *Bam*H1 and ligated into *Bam*H1-digested pFRΔ. The fusion was delivered in single copy into the bacterial chromosome at the  $\lambda$  *att* site as described previously (Simons et al, 1987). Stable lysogens were screened for single insertion of recombinant  $\lambda$  by PCR (Powell et al, 1994).

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

<b>Strain number</b>	<b>Relevant markers</b>	<b>Reference/source</b>
EM1055	MG1655 $\Delta lac$ X174	(Massé & Gottesman, 2002)
EM1238	EM1055 $\Delta ryhB::cat$	(Massé & Gottesman, 2002)
EM1377	EM1055 <i>rne-131 zce-726</i> ::Tn10	(Massé et al, 2003)
GD010	EM1055 <i>rne-131 zce-726</i> ::Tn10 $\Delta ryhB::cat$	EM1377 + P1 (EM1238)
EM1265	EM1055 <i>hfq-1</i> :: $\Omega(kan;Bcl1)$	(Massé et al, 2003)
KP111	EM1055 <i>hfq-1</i> :: $\Omega(kan;Bcl1)$ $\Delta ryhB::cat$	EM1265 + P1 (EM1238)
EM1059	EM1055 $\Delta ara714 leu$ ::Tn10	(Massé et al, 2003)
EM1451	EM1055 $\Delta ara714 leu^+$	EM1059 + P1 (EM1055)
EM1455	EM1055 $\Delta ara714 leu^+ \Delta ryhB::cat$	EM1451 + P1 (EM1238)
PK5956	BW25113 $\Delta iscR::kan$	(Schwartz et al, 2001)
PK6364	RZ4500 $\lambda iscR'-lacZ$	(Schwartz et al, 2001)
GD175	EM1055 $\Delta ara714 leu^+ \Delta ryhB::cat$ $\Delta iscR::kan$	EM1455 + P1 (PK5956)
GD020	EM1055 $\Delta ara714 leu^+ \Delta ryhB::cat \lambda iscR'-lacZ$	EM1455 + $\lambda$ PK6364
GD021	EM1055 $\Delta ara714 leu^+ \Delta ryhB::cat$	GD175 + $\lambda$ PK6364

	<i>ΔiscR ::kan λiscR'-lacZ</i>	
GD114	EM1055 $\Delta$ ara714 <i>leu</i> <sup>+</sup> $\Delta$ ryhB:: <i>cat</i> <i>ΔiscR ::kan λiscRSUAmut6</i>	GD175 + $\lambda$ pFR $\Delta$ - <i>iscRSUAmut6</i>
<b>Plasmids</b>	<b>Description</b>	<b>Reference/source</b>
pNM12	pBAD24 derivative	(Majdalani et al, 1998)
pBAD- <i>ryhB</i>	pBAD24 + RyhB (arabinose inducible promoter)	(Massé et al, 2003)
pFR $\Delta$ - <i>iscRSUAmut6</i>	Mutated intergenic <i>iscRS</i> region	This work

Table 2. Oligo used in this study

Oligo number	Sequence 5'-3'
EM138	TAATACGACTCACTATAGGGAGACTGTTTCAGATCCACGCCCTGC
EM139	CTGAACGGTGACCTGGAACAC
EM144	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGCTGACGACCAGACACATCC
EM145	ACAACGTGTTTTCCCGTCTGCG
EM190	TAATACGACTCACTATAGGGAGACAGCACCCGGCTGGCTAAG
EM191	CGATCAGGAAGACCCTCGC
EM293	TAATACGACTCACTATAGGGAGACGCTTTACGCCCAGTAATTCC
EM294	CTCCTACGGGAGGCAGCAGT
EM359	TCAGCGGATCCCCGAATAACAGCCGTTGC
EM361	AACTCGGATCCACGGTGGGGTTATC
EM385	CAAAGGTTCCGTCCATCGTC
EM408	TGTAATACGACTCACTATAGGGCACCCGCACACAAGACG
EM618	TTAATAAAAAGATTCAGAAAATCCGCGGAGTGCTAAATACTCCGTA
EM619	ACGGAGTATTTAGCACTCCGCGGATTTTCTGAATTCTTTTTATTAA

### RNA extraction and Northern blot analysis

Cells were grown at 37°C on Luria-Bertani (LB) or M63 media and total RNA was extracted using hot phenol procedure (Aiba et al, 1981). When using M63, cells were washed prior extraction. Ampicillin was used at 50  $\mu$ g/ml in the culture when cells carried plasmids. 0.01% arabinose and 200  $\mu$ M 2,2'-dipyridyl were added when indicated. Half-life determination of RNA was performed by addition of 250  $\mu$ g/ml rifampicin. After total RNA extraction, 5  $\mu$ g of total RNA were loaded on a polyacrylamide gel (4 % acrylamide 29:1, 8M urea). After migration, the RNA was transferred to a Hybond-XL membrane (Amersham Biosciences) and crosslinked with UV (1200 J). The membrane was

prehybridized with 50% formamide, 5x SSC, 5x Denhardt reagent, 1% SDS and 100 µg/ml sheared salmon sperm DNA for 4h at 60°C. Then, the radiolabeled probe was added directly in the prehybridization buffer with the membrane and incubated 16h at 60°C. Before exposure on a phosphor screen, the membrane was washed three times with 1x SSC/0.1% SDS and once with 0.1X SSC/0.1% SDS. The phosphor screen was revealed on a Storm 860 (Molecular Dynamics) and quantification was performed with ImageQuant software (Molecular Dynamics).

### *3'-RACE*

3'-RACE assays were carried out essentially as described before (Argaman et al, 2001). Briefly, RNA was dephosphorylated with calf intestine alkaline phosphatase (New England Biolab) and ligated with a 3' RNA adapter (5'-uucacuguucuuagcgggccgcaugcucidT-3' [Dharmacon Research, Chicago, IL]). Reverse transcription was performed with 100 pmol of a single primer complementary with the RNA adapter. The reverse transcription products were amplified by PCR and separated on agarose gels. Bands of interest were excised, purified on GFX Gel Band purification kit (GE Healthcare), cloned with Zero Blunt TOPO kit (Invitrogen) and sequenced (DNA Landmarks, Canada). At least 3 independent assays were performed.

### *Radiolabeled RNAs generated by in vitro RNA synthesis*

The radiolabeled probes used for Northern blot analysis were transcribed with T7 RNA polymerase (Roche, Germany) from a polymerase chain reaction (PCR) product to generate the antisense transcript of the gene of interest. Transcription was performed in T7 transcription buffer (40 mM Tris-HCL at pH 8.0, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dithiothreitol, 2 mM spermidine), 400 µM NTPs (A, C and G), 10 µM UTP, 3 µL of α-<sup>32</sup>P-UTP (3000 Ci/mmol), 20 units RNA guard, 20 units T7 RNA polymerase and 0.5 µg DNA template. After 4 h of incubation at 37°C, the mixture was treated with 2 units of Turbo DNase (Ambion) and extracted once with phenol-chloroform. Non-incorporated nucleotides were removed with a G-50 Sephadex column. The primers used for generating DNA templates for *in vitro* RNA synthesis were EM144-EM145 (*iscR*), EM138-EM139 (*iscS*), EM190-EM191 (*ryhB*) and EM293-EM294 (16S rRNA). For the 5' end-labeling of *iscRS* RNA, we



transcribed with T7 RNA polymerase from a PCR product (EM385-EM408) as described above. Transcripts were dephosphorylated with calf intestine phosphatase (New England Biolabs) and 5' labeled with  $\gamma$ - $^{32}$ P-ATP using T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs) according to the manufacturer's protocol.

#### *RNA secondary structure probing*

Secondary structure probing was performed on 5' end-labeled *iscRS* RNA (see above). RyhB RNA was transcribed with T7 RNA polymerase from a PCR product (EM88-EM89). Hfq was purified as described before (Prévost et al, 2007). Final concentration of 0.25  $\mu$ M *iscRS*, 1  $\mu$ M RyhB and 1  $\mu$ M Hfq were used. Ribonucleases T1 (0.1 U) (Ambion) and TA (2.5 U) (Jena Biosciences) were used for 5 min at 37 °C in Sequence Buffer (Ambion). Alkaline ladder was performed in Alkaline Buffer (Ambion) for 5 min at 90°C. Lead acetate cleavages were performed with 2.5 mM PbAc (Sigma-Aldrich) in Structure Buffer (Ambion) with 0.1 mg/ml of yeast RNA (Ambion). Reactions were stopped by adding 10  $\mu$ l of Loading Buffer II (Ambion). Samples were heated at 90°C for 1 min and separated on 5% polyacrylamide/ 7 M urea gel. Gels were dried and exposed on phosphor screen (see above).

#### *Western blot analysis*

Cells were grown at 37°C in M63 media. When using pBAD-*ryhB* or pNM12 plasmids, ampicillin was used at a final concentration of 50  $\mu$ g/ml and arabinose was added at mid-log phase at a final concentration of 0.01%. Total proteins were harvested by precipitation with trichloroacetic acid. Ice-cold trichloroacetic acid was added to 1 ml of culture at a final concentration of 10% and incubated on ice for 10 min. Proteins were spun down and pellets washed with ice-cold 80% acetone. Dried pellets were resuspended in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis buffer at volume normalized to the OD<sub>600</sub> of cultures. The equivalent volume for 0.025 OD<sub>600</sub> unit of culture was separated on a 12% bis-Tris gel and transferred to nitrocellulose membrane. The anti-IscS (kind gift from Larry Vickery) and anti-IscR (kind gift from Patricia Kiley) were used at dilutions of 1:1000 and 1:10 000, respectively. The IRDye 800CW conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (Li-Cor Biosciences) was used at a dilution of 1:15 000. Western blots

were revealed on an Odyssey Infrared Imaging System (Li-Cor Biosciences) and quantification was performed using Odyssey Application Software.

#### *Beta-galactosidase assays*

Kinetic assays for  $\beta$ -galactosidase activity were performed as described previously (Prévost et al, 2007) using a SpectraMax 250 microtitre plate reader (Molecular Devices). Briefly, overnight bacterial culture were incubated in LB media with ampicillin at a final concentration of 50  $\mu\text{g/ml}$  at 37°C and diluted 1000-fold into 50 ml of fresh LB media with ampicillin at 37°C. Cultures were grown with agitation to an  $\text{OD}_{600}$  of 0.1 before inducing RyhB expression by adding arabinose to a final concentration of 0.01% (strains carrying pBAD-*ryhB* or the control vector pNM12). Specific  $\beta$ -galactosidase activities were calculated using formula  $V_{\text{max}}/\text{OD}_{600}$ . The results reported represent data of at least three experimental trials.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Susan Gottesman, Peter D. Pawelek, Szabolcs Semsey, and Cari Vanderpool for discussion and suggestions throughout this work. We would like to acknowledge Patricia Kiley for helpful discussions and IscR antibodies and Larry Vickery for IscS antibodies. We are grateful to all members of the laboratory for useful comments and discussions on the manuscript. This work was funded by an operating grant MOP69005 from the Canadian Institute for Health Research (CIHR). E.M. is a Canadian Institutes for Health Research (CIHR) new investigator scholar.

**REFERENCES**

- Aiba H, Adhya S, & de Crombrughe B (1981) Evidence for two functional *gal* promoters in intact *Escherichia coli* cells. *J Biol Chem* **256**: 11905-11910
- Argaman L, Hershberg R, Vogel J, Bejerano G, Wagner EG, Margalit H, & Altuvia S (2001) Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*. *Curr Biol* **11**: 941-950
- Ayala-Castro C, Saini A, & Outten FW (2008) Fe-S cluster assembly pathways in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **72** : 110-25
- Bachelier S, Clement JM, & Hofnung M (1999) Short palindromic repetitive DNA elements in enterobacteria : a survey. *Res Microbiol* **150**: 627-639
- Belasco JG, Beatty JT, Adams CW, von Gabain A, & Cohen SN (1985) Differential expression of photosynthesis genes in *R. capsulata* results from segmental differences in stability within the polycistronic *rxcA* transcript. *Cell* **40** : 171-181
- Dos Santos PC, Smith AD, Frazzon J, Cash VL, Johnson MK, & Dean DR (2004) Iron-sulfur cluster assembly : NifU-directed activation of the nitrogenase Fe protein. *J Biol Chem* **279**: 19705-19711
- Geissmann TA & Touati D (2004) Hfq, a new chaperoning role: binding to messenger RNA determines access for small RNA regulator. *EMBO J* **23**: 396-405
- Giel JL, Rodionov D, Liu M, Blattner FR, & Kiley PJ (2006) IscR-dependent gene expression links iron-sulphur cluster assembly to the control of O-regulated genes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **60**: 1058-1075
- Gottesman S (2004) The small RNA regulators of *Escherichia coli*: roles and mechanisms. *Annu Rev Microbiol* **58**: 303-328
- Higgins CF, Ames GF, Barnes WM, Clement JM, & Hofnung M (1982) A novel intercistronic regulatory element of prokaryotic operons. *Nature* **298**: 760-762
- Kalamorz F, Reichenbach B, Marz W, Rak B, & Gorke B (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** : 1518-1533
- Kaufmann N, Reidl H, Golecki J.R., Garcia A.F., & Drews G (1982) Differentiation of the membrane system in cells of *Rhodospseudomonas capsulata* after transition from chemotrophic to phototrophic growth conditions. *Arch Microbiol* **131**: 313-322
- Khemici V & Carpousis AJ (2004) The RNA degradosome and poly(A) polymerase of *Escherichia coli* are required in vivo for the degradation of small mRNA decay intermediates containing REP-stabilizers. *Mol Microbiol* **51**: 777-790

- Lauhon CT (2002) Requirement for IscS in biosynthesis of all thionucleosides in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**: 6820-6829
- Lee KC, Yeo WS, & Roe JH (2008) Oxidant-responsive induction of the *suf* operon, encoding a Fe-S assembly system, through Fur and IscR in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **190**: 8244-8247
- Lill R & Muhlenhoff U (2006) Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: components and mechanisms. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**: 457-486
- Majdalani N, Cuning C, Sledjeski D, Elliott T, & Gottesman S (1998) DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 12462-12467
- Massé 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
- Massé 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
- Massé E, Vanderpool CK, & Gottesman S (2005) Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**: 6962-6971
- Moller T, Franch T, Udesen C, Gerdes K, & Valentin-Hansen P (2002) Spot 42 RNA mediates discoordinate expression of the *E. coli* galactose operon. *Genes Dev* **16**: 1696-1706
- Morita T, Maki K, & Aiba H (2005) RNase E-based ribonucleoprotein complexes: mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. *Genes Dev* **19**: 2176-2186
- Morita T, Mochizuki Y, & Aiba H (2006) Translational repression is sufficient for gene silencing by bacterial small noncoding RNAs in the absence of mRNA destruction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 4858-4863.
- Newbury SF, Smith NH, & Higgins CF (1987a) Differential mRNA stability controls relative gene expression within a polycistronic operon. *Cell* **51**: 1131-1143
- Newbury SF, Smith NH, Robinson EC, Hiles ID, & Higgins CF (1987b) Stabilization of translationally active mRNA by prokaryotic REP sequences. *Cell* **48**: 297-310
- Outten FW, Djaman O, & Storz G (2004) A *suf* operon requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **52**: 861-872
- Outten FW, Wood MJ, Munoz FM, & Storz G (2003) The SufE protein and the SufBCD complex enhance SufS cysteine desulfurase activity as part of a sulfur transfer pathway for Fe-S cluster assembly in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **278**: 45713-45719

- Powell BS, Rivas MP, Court DL, Nakamura Y, & Turnbough CL, Jr (1994) Rapid confirmation of single copy lambda prophage integration by PCR. *Nucleic Acids Res* **22**: 5765-5766
- Prévost K, Salvail H, Desnoyers G, Jacques JF, Phaneuf E, & Massé E (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**: 1260-1273
- Py B, Higgins CF, Krisch HM, & Carpousis AJ (1996) A DEAD-box RNA helicase in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Nature* **381**: 169-172
- Rees DC & Howard JB (2000) Nitrogenase: standing at the crossroads. *Curr Opin Chem Biol* **4**: 559-566
- Reichenbach B, Maes A, Kalamorz F, Hajnsdorf E, & Gorke B (2008) The small RNA GlmY acts upstream of the sRNA GlmZ in the activation of *glmS* expression and is subject to regulation by polyadenylation in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **36**: 2570-2580
- Schumacher A & Drews G (1978) The formation of bacteriochlorophyll-protein complexes of the photosynthetic apparatus of *Rhodospseudomonas capsulata* during early stages of development. *Biochim Biophys Acta* **501**: 183-194
- Schwartz CJ, Djaman O, Imlay JA, & Kiley PJ (2000) The cysteine desulfurase, IscS, has a major role in in vivo Fe-S cluster formation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 9009-9014
- Schwartz CJ, Giel JL, Patschkowski T, Luther C, Ruzicka FJ, Beinert H, & Kiley PJ (2001) IscR, an Fe-S cluster-containing transcription factor, represses expression of *Escherichia coli* genes encoding Fe-S cluster assembly proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 14895-14900
- Simons RW, Houman F, & Kleckner N (1987) Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* **53**: 85-96
- Stern MJ, Ames GF, Smith NH, Robinson EC, & Higgins CF (1984) Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell* **37** : 1015-1026
- Takahashi Y & Nakamura M (1999) Functional assignment of the ORF2-*iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx*-ORF3 gene cluster involved in the assembly of Fe-S clusters in *Escherichia coli*. *J Biochem* **126**: 917-926
- Takahashi Y & Tokumoto U (2002) A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. *J Biol Chem* **277**: 28380-28383
- Tokumoto U, Kitamura S, Fukuyama K, & Takahashi Y (2004) Interchangeability and distinct properties of bacterial Fe-S cluster assembly systems: functional replacement of the *isc* and *suf* operons in *Escherichia coli* with the *nifSU*-like operon from *Helicobacter pylori*. *J Biochem* **136**: 199-209

Urban JH & Vogel J (2008) Two seemingly homologous noncoding RNAs act hierarchically to activate *glmS* mRNA translation. *PLoS Biol* **6**: e64

Yeo WS, Lee JH, Lee KC, & Roe JH (2006) IscR acts as an activator in response to oxidative stress for the *suf* operon encoding Fe-S assembly proteins. *Mol Microbiol* **61**: 206-218

Zheng L, Cash VL, Flint DH, & Dean DR (1998) Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an *iscSUA-hscBA-fdx* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J Biol Chem* **273**: 13264-13272

## CHAPITRE 3

**Small RNA-induced mRNA degradation achieved through both translation block and activated cleavage**

**Auteurs de l'article :** Karine Prévost, Guillaume Desnoyers, Jean-François Jacques, François Lavoie, et Eric Massé

Département de Biochimie, Groupe ARN, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4.

**Statut de l'article :** Publié

Genes & developments, volume 25, pages 385-396, 2011.

**Avant-propos :** Au niveau de l'écriture, j'ai participé à la révision avant la soumission alors que l'article a été écrit par Eric Massé.

Au niveau expérimental, j'ai effectué la figure 2B et S2, en plus de participer à la planification de plusieurs figures.



## Résumé

Les sRNAs bactériens sont exprimés en réponse aux stress environnementaux et aident la cellule à retourner à l'homéostasie en régulant l'expression de gènes de manière post-transcriptionnelle. Cette régulation s'effectue par une répression de la traduction qui est souvent accompagnée par une dégradation rapide de l'ARNm ciblé par un recrutement du dégradosome ARN. Les étapes de la répression traductionnelle étaient assez bien connues, mais les événements menant à la dégradation de l'ARNm restaient obscurs.

Dans cet article, nous avons d'abord déterminé la séquence minimale d'ARNm de certaines cibles (*sodB*, *iscS* et *fumA*) nécessaires à la dégradation induite par le sRNA RyhB en construisant fusion transcriptionnelle de différentes longueurs avec le gène rapporteur *lacZ*. Ces fusions, qui couvraient la longueur des cadres de lectures, ont ensuite été vérifiées quant à leur sensibilité à la dégradation induite par RyhB. De manière inattendue, nous avons trouvé que la dégradation induite par RyhB nécessite un site dans l'ARNm *sodB* situé entre les nucléotides 400 et 430 (relatif au +1 transcriptionnel). Cette observation corrèle avec le site de clivage de la RNase E que nous avons caractérisé *in vitro* se trouvant au nucléotide 407. De plus, lorsque nous changeons la séquence du site de clivage sur l'ARNm *sodB*, elle devient résistante à la dégradation RyhB-dépendante. Finalement, nous montrons que l'arrêt de la traduction n'est pas suffisant pour expliquer la dégradation RyhB-dépendante, car une fusion *sodB-lacZ* contenant un codon d'arrêt de la traduction précoce est toujours dépendante envers RyhB pour la dégradation rapide.

En conclusion, les données présentées dans ce chapitre montrent que le site de clivage initial lors de la dégradation sRNA-dépendante s'effectue loin en aval dans le cadre de lecture. Nous démontrons aussi que l'effet du sRNA n'est pas entièrement dépendant de l'arrêt de la traduction, suggérant que le sRNA est nécessaire au recrutement du dégradosome ARN.

**Small RNA-induced mRNA degradation achieved through both translation block and activated cleavage**

Running title: sRNA-induced mRNA degradation

Karine Prévost, Guillaume Desnoyers, Jean-François Jacques, François Lavoie, and Eric Massé\*

University of Sherbrooke, Department of Biochemistry, RNA Group, Sherbrooke, Québec, Canada.

Keywords : RyhB, small RNA, RNase E, RNA degradosome, mRNA decay, translation initiation, Hfq.

\*Corresponding author : Université de Sherbrooke, Département de Biochimie, 3001 12e avenue, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Tel. 819-346-1110 ext. 15475

Fax. 819-564-5340

E-mail : [eric.masse@usherbrooke.ca](mailto:eric.masse@usherbrooke.ca)

## ABSTRACT

Small-RNA (sRNA) induced mRNA degradation occurs through binding of a small RNA to a target mRNA with the concomitant action of the RNA degradosome, which induces an RNase E-dependent cleavage and degradation of the targeted mRNA. Because many sRNAs bind at the ribosome-binding site (RBS), it is possible that the resulting translation block is sufficient to promote the rapid degradation of the targeted mRNA. Contrary to this mechanism, we report here that the pairing of the sRNA RyhB to the target mRNA *sodB* initiates mRNA degradation even in absence of translation on the mRNA target. Remarkably, even though it pairs at the RBS, the sRNA RyhB induces mRNA cleavage in vivo at a distal site located more than 350 nts downstream of the RBS, ruling out local cleavage near the pairing site. Both the RNA chaperone Hfq and the RNA degradosome are required for efficient cleavage at the distal site. Thus, beyond translation initiation block, sRNA-induced mRNA cleavage requires several unexpected steps, many of which are determined by structural features of the target mRNA.

## INTRODUCTION

The degradation of mRNAs in bacteria has been exhaustively studied for more than four decades. It is now well established that mRNA stability depends on several factors such as, but not limited to, translation initiation and elongation, secondary structures in the 5'- and 3'-UTR, and polyadenylation (Reviewed in (Coburn, Mackie 1999, Belasco 2010, Carpousis, Luisi & McDowall 2009, Kushner 2004)). In the bacterium *E. coli*, the main pathway of mRNA degradation depends on the RNA degradosome, which is a protein complex composed of endoribonuclease E (RNase E), a 3'-5' polynucleotide phosphorylase (PNPase), an RNA helicase (RhlB), and enolase. Though many enzymes can initiate mRNA decay, the most important is RNase E, which cleaves within accessible RNA structures such as the 5'-UTR or the intercistronic region of polycistronic messages (Carpousis 2007). Following initial mRNA cleavage by RNase E, the resulting RNA fragments are degraded by exoribonucleases, such as PNPase. When the RNA fragments are highly structured, exoribonucleases depends on the ATP-dependent RNA helicase RhlB to efficiently remove these structures (Py et al. 1996). Interestingly, RNase E is an enzyme that lacks sequence specificity and, while it cleaves generally in AU-rich single-strand regions, it is dependent of the region adjacent to the cleavage site (Mackie, Genereaux 1993, McDowall et al. 1995). Although several RNase E cleavage sites have been identified so far (Kaberdin 2003), it has been impossible to predict RNase E cleavage sites based on RNA sequences or structures.

Whereas each step of mRNA decay is important for normal turn-over, the initial cleavage of mRNA by RNase E is considered to be the limiting factor (Kushner 2002). This is explained by the fact that RNase E becomes more active in the presence of monophosphorylated 5'-ends, which are generated by the initial cleavage (Mackie 1998, Mackie 2000). Until recently, RNase E was thought to induce the first attack on the RNA to be degraded. However, a newly discovered pyrophosphatase, named RppH, was demonstrated in *E. coli* to dephosphorylate the 5'-end triphosphate of the first nucleotide in the mRNA, similarly to decapping of mRNAs in eukaryotes (Deana, Celesnik & Belasco 2008, Celesnik, Deana & Belasco 2007). Therefore, it is likely that some mRNAs becomes dephosphorylated first, thus creating a monophosphorylated 5'-end that stimulates RNase E cleavage within the mRNA.

Although RNase E is the central component of the RNA degradosome, the composition of this protein complex can vary considerably. Recently, the RNA degradosome was shown to interact with the protein Hfq, an RNA chaperone involved in mRNA and sRNA interaction (Morita, Maki & Aiba 2005). The same study also demonstrated that two sRNAs, SgrS and RyhB, involved in rapid degradation of specific target mRNAs, were bound to Hfq in the complex formed by Hfq and RNA degradosome (Morita, Maki & Aiba 2005). These observations suggested that the RNA degradosome, the RNA chaperone Hfq, and the sRNA form a ribonucleoprotein specialized in sRNA-induced mRNA degradation.

sRNA-induced mRNA degradation was first demonstrated by the *trans*-expressed sRNA RyhB acting on target mRNAs such as *sodB*, *acnB*, *fumA*, and *sdhCDAB* (Masse, Gottesman 2002, Masse, Escorcia & Gottesman 2003). A follow-up of these experiments indicated that RyhB triggered the degradation of at least 18 transcripts, which made RyhB the sRNA with the most target mRNAs (Masse, Vanderpool & Gottesman 2005). The role of the RNA degradosome and the RNA chaperone Hfq was shown to be essential in this mechanism (Morita, Maki & Aiba 2005, Masse, Gottesman 2002, Masse, Majdalani & Gottesman 2003, Kawamoto et al. 2005). We also demonstrated that removal of the C-terminal region of RNase E resulted in inhibition of sRNA-induced mRNA degradation (Masse, Escorcia & Gottesman 2003). It was later shown that the C-terminal region of RNase E was responsible for binding to Hfq RNA chaperone (Morita, Maki & Aiba 2005). A recent study has shown that RyhB alone was sufficient to silence the mRNA translation in the absence of mRNA degradation (Morita, Mochizuki & Aiba 2006). Because these experiments were performed in the absence of mRNA degradation, when the RNA degradosome is inactivated, these results suggested that the target mRNA degradation was only secondary to the sRNA action.

A previous attempt at describing the RyhB-induced cleavage *in vitro* suggested the presence of two RNase E sites in the upstream part of *sodB* target mRNA (Afonyushkin et al. 2005). Remarkably, the addition of RyhB did not induce significant cleavage of *sodB* during *in vitro* cleavage assays (Afonyushkin et al. 2005). The interpretation of these puzzling results suggested that RyhB did not act as an inducer of cleavage but merely as blocking initiation of translation. Recently, another sRNA, SgrS, has been shown to act, to some extent, similarly to RyhB. The sRNA SgrS regulates the levels of the glucose

transporter *ptsG* mRNA according to glucose availability (Morita, Maki & Aiba 2005). Notably, the target mRNA *ptsG* must be localized at the membrane for the SgrS sRNA to act (Kawamoto et al. 2005). While it is still unclear why SgrS action depends on membrane localization, one likely explanation is the observation that the RNA degradosome is associated with the cytoplasmic membrane (Liou et al. 2002). However, all these studies did not indicate how and where the initial sRNA-induced cleavage occurred on target mRNAs. Beside RyhB and SgrS, additional sRNAs such as RybB (Papenfort et al. 2006), SraD or MicA (Rasmussen et al. 2005, Udekwu et al. 2005), OmrA, and OmrB (Guillier, Gottesman 2008) use RNase E to promote the decay of their respective targets. Similar sRNAs have been characterized in *Vibrio sp.* (Lenz et al. 2004). Notably, all these sRNAs regulate their target by binding at the ribosome-binding site. The bulk of these observations suggests that, at least for these sRNAs, blocking translation initiation is a prerequisite to the efficient mRNA degradation.

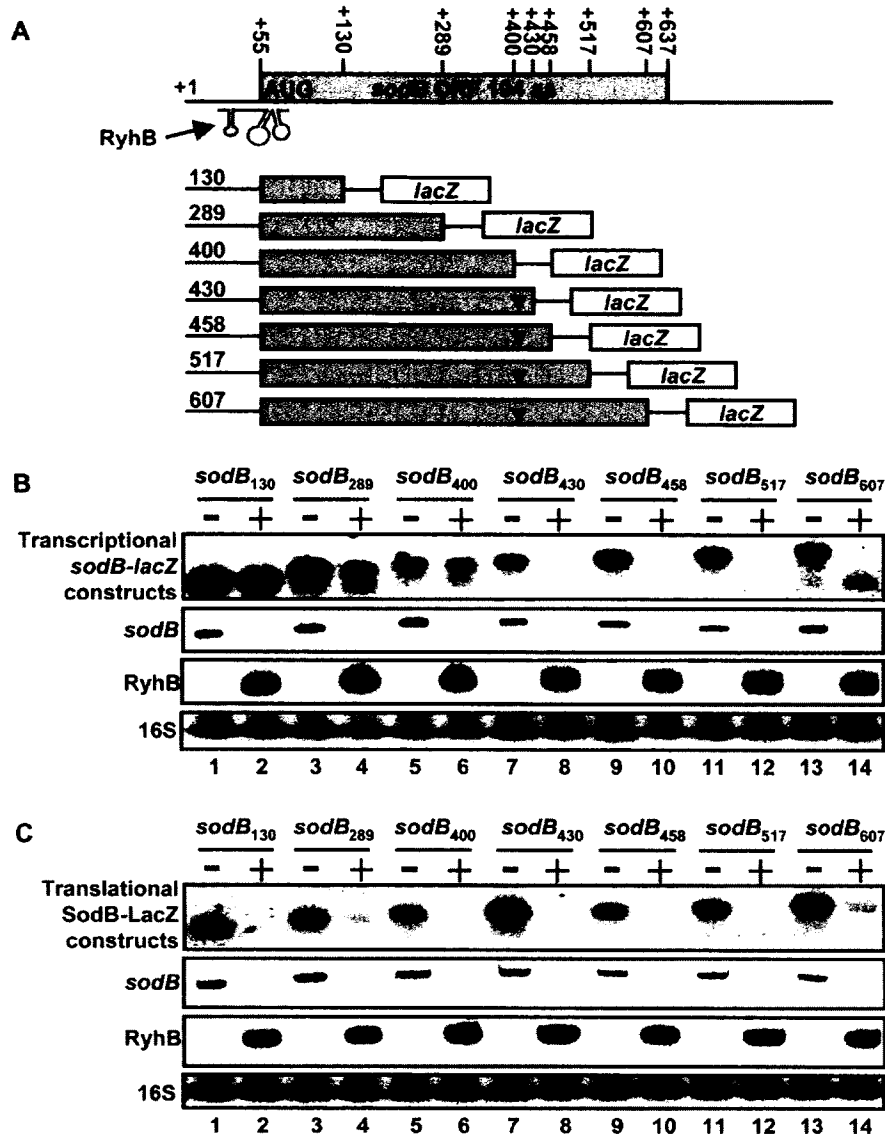
Here, we report that RyhB induces mRNA degradation by promoting a distal downstream RNase E-dependent cleavage site within the ORF of the target mRNA *sodB*. Using in vivo and in vitro techniques, we have mapped a prominent cleavage site located 350 nts downstream of *sodB* pairing site with RyhB. Mutagenesis of this cleavage site protects the target mRNA *sodB* from RyhB-induced cleavage. Using a modified *sodB* mRNA with prematurely stopped translation, we still observed a RyhB-induced mRNA cleavage within *sodB*, at the same cleavage site. Thus, blocking translation alone is not sufficient for sRNA-induced degradation of a target mRNA. These results shed light on some long-standing questions on the mechanism of sRNA-induced mRNA degradation.

## RESULTS

### Minimal sequence requirement for sRNA-induced mRNA degradation *in vivo*.

The RyhB sRNA pairs with its target mRNAs at the ribosome-binding site, thereby blocking initiation of translation (Morita, Mochizuki & Aiba 2006). Whereas the effect of RyhB pairing on translation is well established, the subsequent steps leading to initiation of mRNA degradation still remain obscure. Thus, we sought to determine the minimal target mRNA sequence necessary for RyhB-induced mRNA degradation. We designed several transcriptional *sodB-lacZ* fusions (Fig 1A), with various lengths that spanned the *sodB* transcript from nts +130 to +607 (relative to the transcriptional +1). Each fusion was tested for RyhB sensitivity as shown in Fig 1B. While the fusions of 430 nts and longer were sensitive to RyhB expression, fusions of 400 nts and shorter demonstrated resistance to RyhB expression. As a control, the endogenous *sodB* mRNA was monitored under the same conditions (Fig 1B, second panel). These data indicate that the region between +400 and +430 of *sodB* mRNA encompasses a region that is required for RyhB-dependent mRNA degradation (Fig 1A).

We then performed a similar experiment on translational SodB-LacZ fusions. Contrary to transcriptional fusions, in which both *sodB* and *lacZ* ORFs have independent translation initiation starts, the corresponding translation fusions contained a single translation initiation site (from *sodB* RBS) and produced single hybrid SodB-LacZ peptides. These SodB-LacZ fusions were assayed under the same conditions as described above for sensitivity to RyhB. Results showed that each SodB-LacZ fusion assayed, from +130 to +607, was sensitive to RyhB expression (Fig 1C). Even though constructs shorter than *sodB*<sub>430</sub> (*sodB*<sub>130</sub>, *sodB*<sub>289</sub>, and *sodB*<sub>400</sub>) did not harbor a putative cleavage site within *sodB*, they remained sensitive to RyhB-induced cleavage. These results suggest the presence of additional cleavage sites downstream of nt 430 of *sodB*, most likely in the *lacZ* section of the fusion (see Discussion for details).

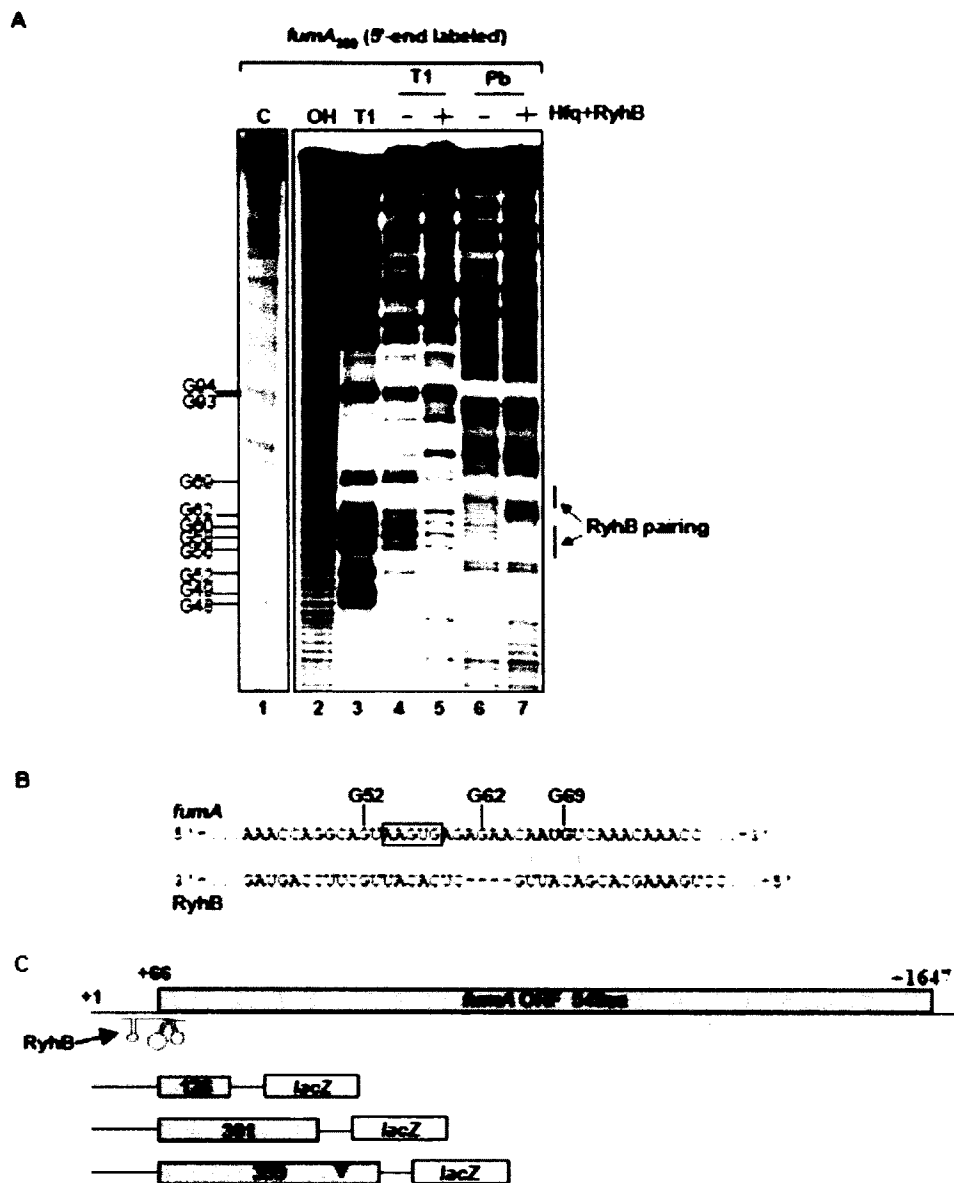


**Figure 1.** Minimal sequence requirement for sRNA-induced mRNA degradation in vivo. (A) Description of the different constructs used to determine the minimal *sodB* to generate RyhB-induced mRNA degradation. (B) Northern blots with a *lacZ* probe showing the effect of RyhB expression (for 10 min) on various transcriptional *sodB-lacZ* constructs and endogenous *sodB* transcript. The expression of endogenous *sodB* transcript and RyhB is also shown. 16S ribosomal RNA was used as a loading control. (C) Northern blots using a *lacZ* probe showing the effect of RyhB expression (for 10 min) on various translational SodB-LacZ constructs. The expression of endogenous *sodB* transcript and RyhB is also shown. 16S ribosomal RNA was used as a loading control.

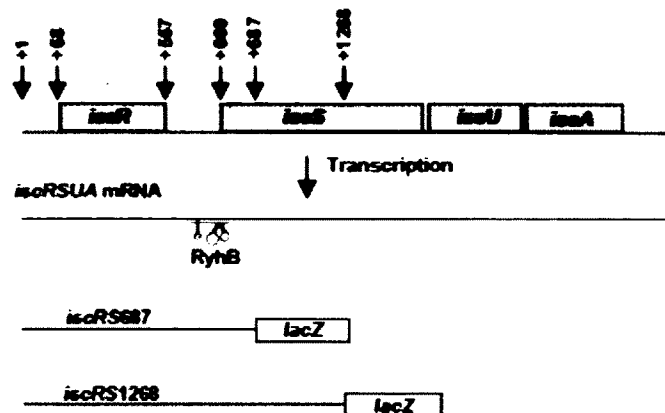


### **RyhB-dependent degradation of other target mRNAs**

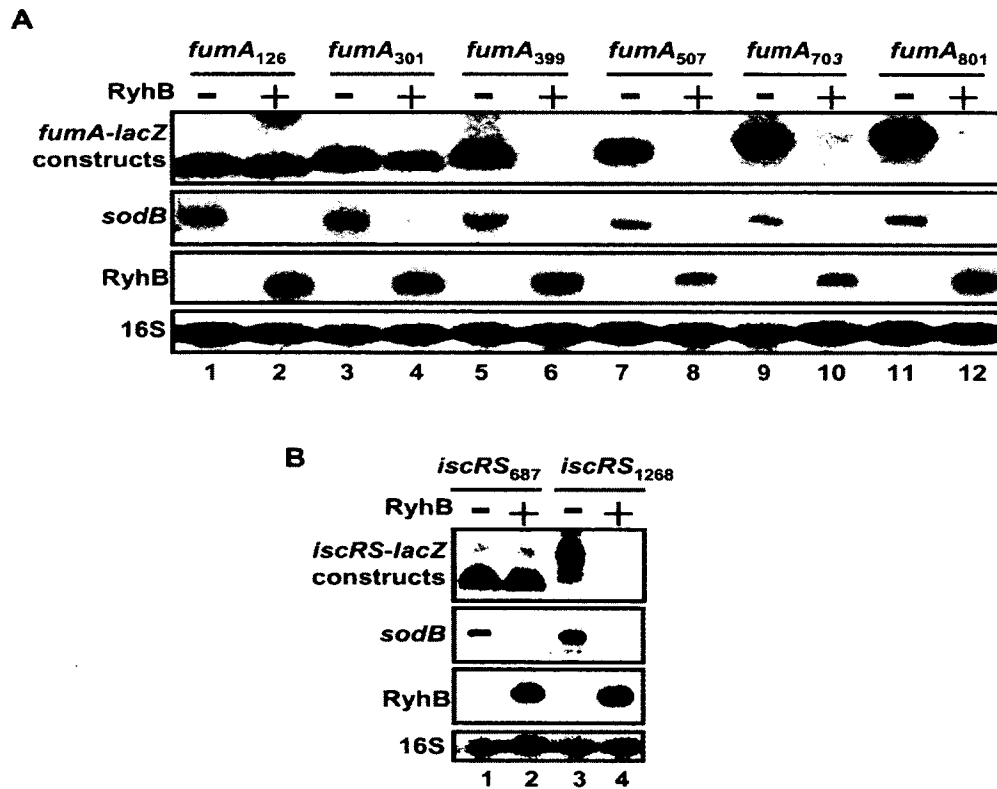
Results shown in Fig 1 suggested that RyhB induced a cleavage at a distal site in the target mRNA *sodB*. We then addressed the question whether these observations were strictly specific to *sodB* or could be applied to other RyhB target mRNAs in general. To verify this, we monitored the effect of RyhB on other target mRNAs such as *fumA* and *iscRSUA* (Masse, Gottesman 2002, Masse, Vanderpool & Gottesman 2005, Desnoyers et al. 2009). We used constructs similar to *sodB* displaying various mRNA lengths fused to *lacZ*. Figure 2 demonstrates the effect of RyhB on *fumA* target mRNA (see Fig S1 for RyhB-*fumA* pairing determination). A sequence between +301 and +399 was required to induce cleavage (Fig 2A). This result indicated that the cleavage site was located at least 230 nts downstream of the RyhB pairing site. In addition, we tested the *iscRSUA* transcript, which was demonstrated to interact with RyhB at the RBS of *iscS* (see Fig S2 for schematic description of RyhB-*iscS* pairing)(Desnoyers et al. 2009). In this study, whereas the *iscRS*<sub>1268</sub> fused to *lacZ* was sensitive, the shorter *iscRS*<sub>687</sub> was resistant to RyhB. Thus, we concluded that the *iscRSUA* polycistronic mRNA required the sequence located more than 19 nts downstream of the RyhB pairing site to promote cleavage (Fig 2B). The combined results of Fig 1 and Fig 2 suggest that RyhB-induced mRNA cleavage is a general mechanism requiring a sequence further downstream of the RyhB pairing site.



**Figure S1.** RyhB interacts with the 5'-UTR of *fumA* to promote a cleavage between nucleotides 301 and 399. (A) Enzymatic and chemical probing of the 5'-end labelled *fumA*<sub>399</sub> mRNA in the presence or absence of RyhB and Hfq. The positions of several G residues are given. C, control RNA alone; NaOH, alkaline ladder; T1, RNase T1 (cleaves at G residues); PbAc, lead acetate (cleaves all accessible residues). All experiments were carried out in native conditions except for NaOH and T1 ladders, performed in denaturing conditions. (B) Pairing between RyhB and the 5'-UTR of *fumA* mRNA. RyhB pairing overlaps *fumA* RBS (boxed) translation start codon (bold). (C) Description of the different constructs used to determine the minimal *fumA* transcript to investigate RyhB-induced mRNA degradation.



**Figure S2.** Schematic description of RyhB interaction with the RBS of *iscS* (from nt 643 to nt 671) to promote a cleavage between nucleotides 687 and 1268 in the *iscS* ORF. RyhB pairing has been previously determined in (Desnoyers et al. 2009).



**Figure 2.** RyhB-induced mRNA degradation of various target mRNAs. Northern blots with *lacZ* probe showing the effect of RyhB expression (for 10 min) on various (A) transcriptional *fumA-lacZ* constructs and (B) transcriptional *iscRS-lacZ* constructs. RyhB pairs at nts 664-670 of *iscRS*, which corresponds to the RBS of *iscS*. Whereas the *iscRS*<sub>687</sub> fusion extends 19 nts into the *iscS* ORF, the *iscRS*<sub>1268</sub> fusion extend 600 nts into *iscS* ORF.

Expression of endogenous *sodB* transcript and RyhB are also shown. 16S ribosomal RNA was used as loading control.

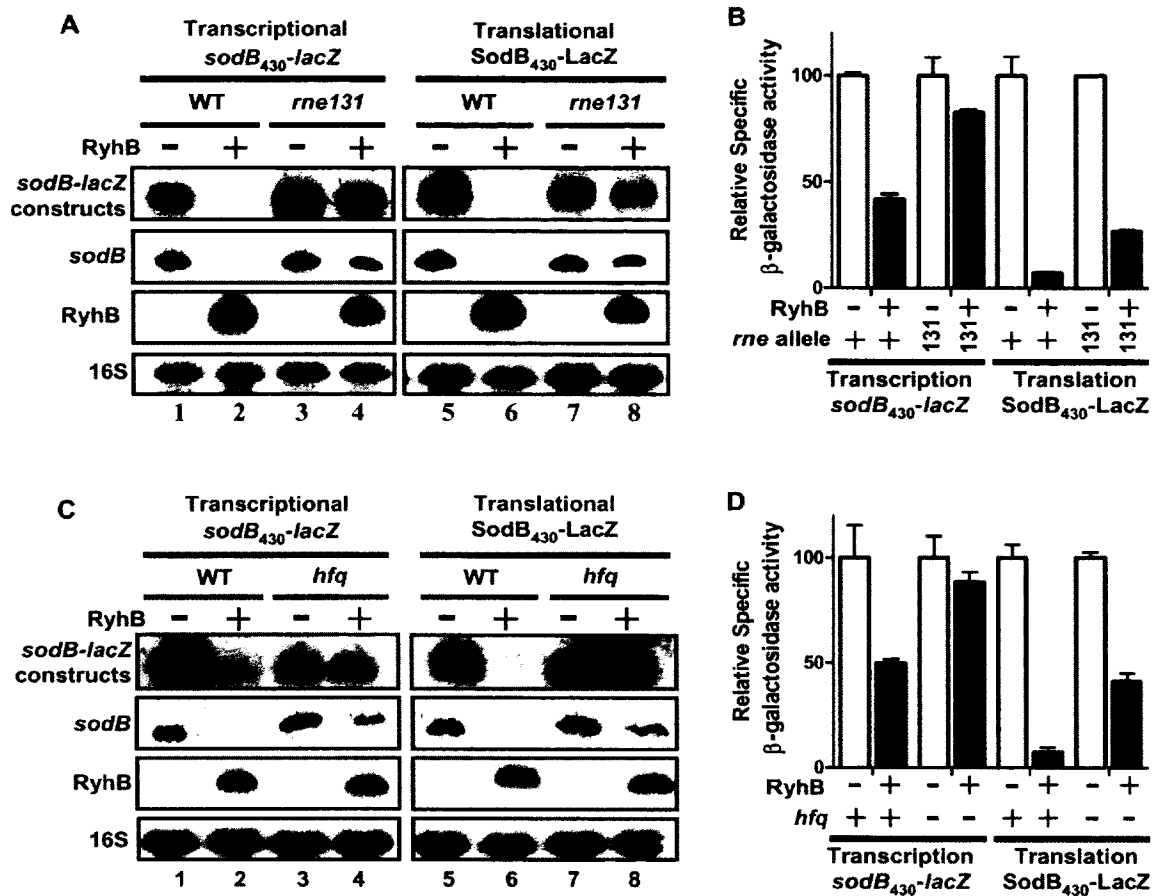
**Both the RNA degradosome and RNA chaperone Hfq are essential for the RyhB-induced degradation of the minimal target *sodB*<sub>430</sub>-*lacZ***

We have previously demonstrated that the RNA degradosome is an essential factor in RyhB-mediated mRNA degradation (Masse, Escorcía & Gottesman 2003). To test if this were the case in our minimal *sodB*<sub>430</sub>-*lacZ* construct, we tested the effect of RyhB expression in the RNA degradosome mutant *rne131*, which lacks residues 586 to 1061 that constitute the C-terminus of RNase E (Vanzo et al. 1998, Kido et al. 1996). As shown in Fig 3A, the C-terminal domain of RNase E is essential for RyhB-mediated degradation of both transcriptional and translational *sodB*<sub>430</sub>-*lacZ* fusions (compare lanes 2 and 4, and lanes 6 and 8).

In addition, we tested whether the inactivation of the RNA degradosome allowed RyhB to block translation by measuring the  $\beta$ -galactosidase activity. Whereas there was only a slight reduction of  $\beta$ -galactosidase activity from the transcriptional fusion (25% reduction), RyhB strongly reduced the translational fusion (75% reduction) (Fig 3B). Although translation was strongly repressed, this condition was not sufficient to initiate the degradation of the *sodB*<sub>430</sub>-*lacZ* construct. These observations are in agreement with previous results (Morita, Mochizuki & Aiba 2006) and indicates that RyhB can efficiently block translation even in the absence of RNA degradation.

Because the RNA chaperone Hfq is involved in RyhB activity and stability, as well as sRNA transactions in general, we tested the effect of the *hfq* mutation on both transcriptional and translational *sodB*<sub>430</sub>-*lacZ* fusions. As shown in Fig 3C, the *hfq* mutation prevented RyhB-induced degradation of the minimal transcriptional *sodB*<sub>430</sub>-*lacZ* construct. In contrast to the transcriptional fusion, RyhB slightly repressed the mRNA level of the translational fusion even in the absence of Hfq (Fig 3C, right panel). In addition, we tested the effect of RyhB on  $\beta$ -galactosidase activities of both transcriptional and translational *sodB* fusions. As demonstrated in Fig 3D, the effect of RyhB on the  $\beta$ -galactosidase translational SodB-LacZ fusion was similar to the decreased mRNA level (Fig 3C, lanes 7

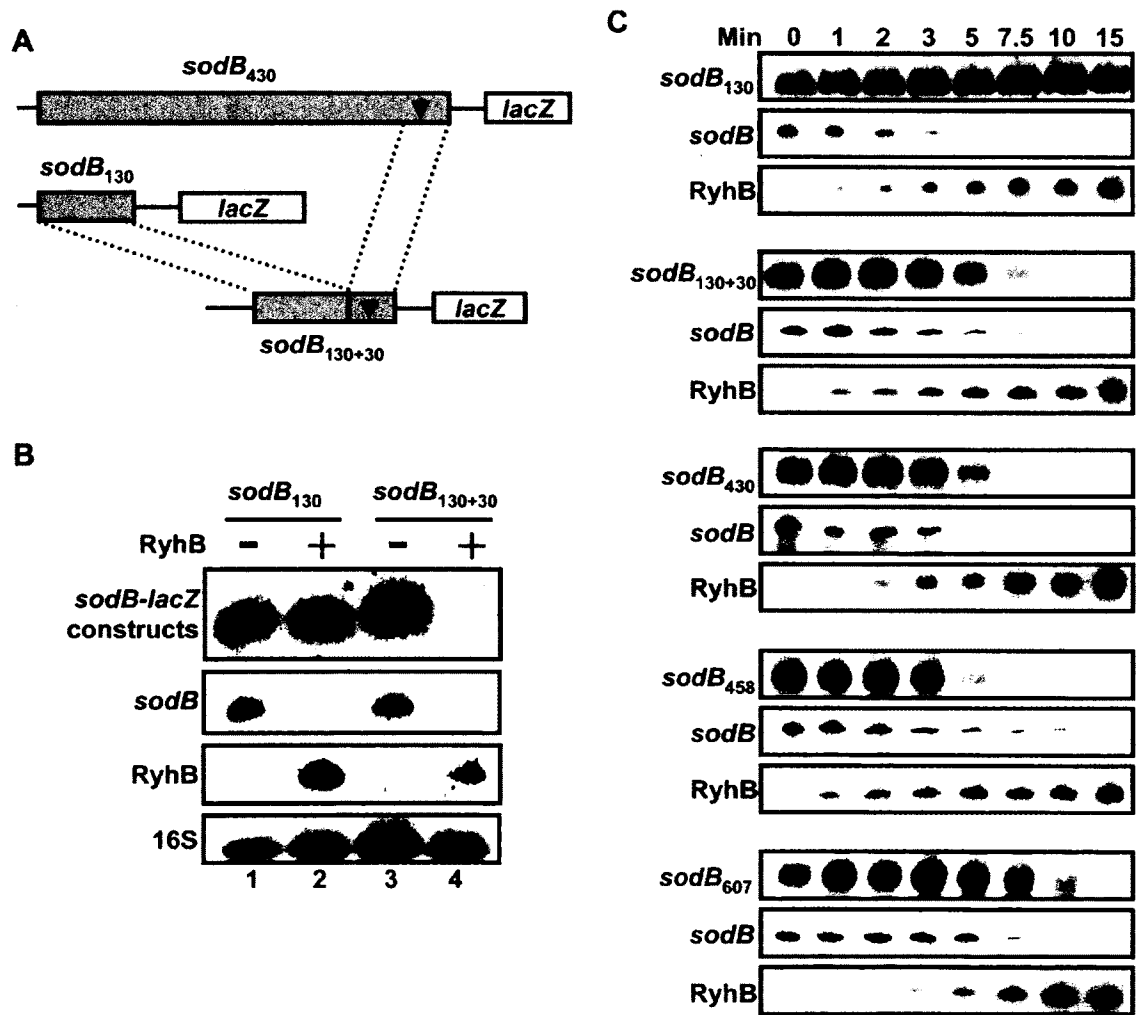
and 8). These results suggest that in absence of Hfq, RyhB can still pair with *sodB* and partly block translation initiation.



**Figure 3.** Both the RNA degradosome and RNA chaperone Hfq are essential for the RyhB-induced degradation of the minimal target *sodB*<sub>430</sub>-*lacZ*. (A) Northern blots using a *lacZ* probe showing the effect of RyhB expression (for 10 min) on transcriptional *sodB*<sub>430</sub>-*lacZ* (left panel) in WT cells (lanes 1 and 2) and *rne131* cells (lanes 3 and 4); and translational *sodB*<sub>430</sub>-*lacZ* (right panel) fusions in WT cells (lanes 5 and 6) and *rne131* cells (lanes 7 and 8). (B) Effect of RyhB expression on  $\beta$ -galactosidase activity of transcriptional *sodB*<sub>430</sub>-*lacZ* in WT and *rne131* cells; and translational SodB<sub>430</sub>-LacZ fusions in WT and *rne131* cells. (C) Northern blots using a *lacZ* probe showing the effect of RyhB expression (for 10 min) on transcriptional *sodB*<sub>430</sub>-*lacZ* (left panel) in WT cells (lanes 1 and 2) and *hfq* cells (lanes 3 and 4); and translational SodB<sub>430</sub>-LacZ (right panel) fusions in WT cells (lanes 5 and 6) and *rne131* cells (lanes 7 and 8). (D) Effect of RyhB expression on  $\beta$ -galactosidase activity of transcriptional *sodB*<sub>430</sub>-*lacZ* (left panel) in WT and *hfq* cells; and translational SodB<sub>430</sub>-LacZ (right panel) fusions in WT cells and *hfq* cells.

## The putative cleavage site of *sodB*<sub>430</sub> promotes the degradation of a RyhB-resistant *sodB*<sub>130</sub> construct

Results in Fig 1B and 3A suggest that RyhB induces an RNA degradosome-dependent mRNA repression that requires the region encompassing nts 400 and 430 of *sodB* mRNA. We sought to determine if this RNA region was sufficient for a RyhB-resistant *sodB*<sub>130</sub>-*lacZ* construct to become sensitive to RyhB. We created a *sodB*<sub>130+30</sub> construct by fusing the 30 nt-long region that was essential for RyhB-mediated mRNA repression of *sodB*<sub>430</sub> into *sodB*<sub>130</sub> (Fig 4A). We then expressed RyhB in cells carrying the *sodB*<sub>130</sub> or *sodB*<sub>130+30</sub> constructs. Data showed that the *sodB*<sub>130+30</sub> construct became sensitive to RyhB expression as compared to *sodB*<sub>130</sub> (Fig 4B, top panel). This observation suggests that even when the repression site is out of its endogenous context, it still responds efficiently to RyhB.



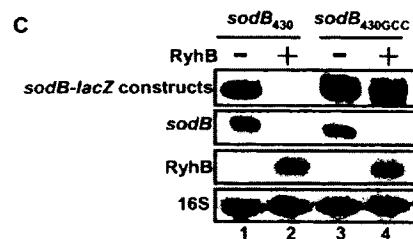
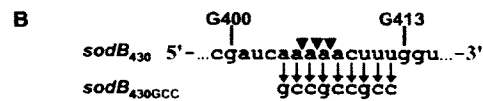
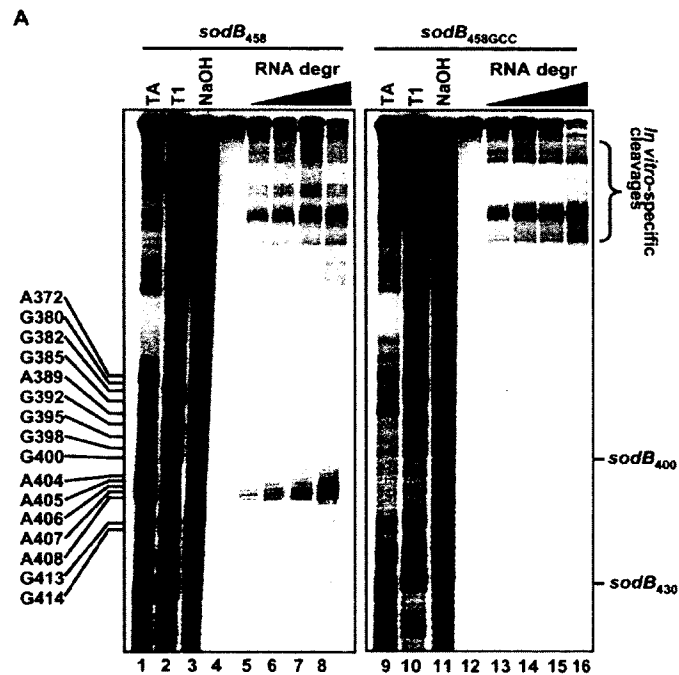
**Figure 4.** The putative cleavage site of *sodB*<sub>430</sub> promotes the degradation of a RyhB-resistant *sodB*<sub>130</sub> construct. (A) Schematic description of *sodB*<sub>430</sub> and *sodB*<sub>130+30</sub> with the putative cleavage site represented by the black triangle. (B) Northern blots using a *lacZ* probe showing the effect of RyhB expression (for 10 min) on *sodB*<sub>130</sub>-*lacZ* and *sodB*<sub>130+30</sub>-*lacZ* transcriptional fusions. (C) Northern blots using a *lacZ* probe showing the effect of RyhB during a time-course expression on *sodB*<sub>130</sub>-*lacZ*; *sodB*<sub>130+30</sub>-*lacZ*; *sodB*<sub>430</sub>-*lacZ*; *sodB*<sub>458</sub>-*lacZ*; and *sodB*<sub>607</sub>-*lacZ*.

The sRNA RyhB pairs at the RBS and the first AUG codon of *sodB* mRNA. Because the closest RyhB-induced cleavage site (between *sodB*<sub>400</sub> and *sodB*<sub>430</sub>) is approximately 350 nts downstream of the interaction site, we sought to determine if a shorter distance downstream of the RyhB-*sodB* pairing site would modify the kinetic of cleavage. To address this, we monitored the mRNA levels of various *sodB-lacZ* constructs. As shown in Fig 4C, we did not observe any significant difference in the time-course of degradation whether the putative cleavage site was close to RyhB pairing site (*sodB*<sub>130+30</sub>) or located further downstream (*sodB*<sub>430</sub>). The fact that larger fusions (*sodB*<sub>458</sub>, *sodB*<sub>607</sub>) did not exhibit faster cleavage kinetics suggests that the minimal *sodB*<sub>430</sub> construct was already optimal for sRNA-mediated mRNA degradation.

#### **In vitro mapping and mutagenesis of the minimal *sodB*<sub>430</sub> cleavage site**

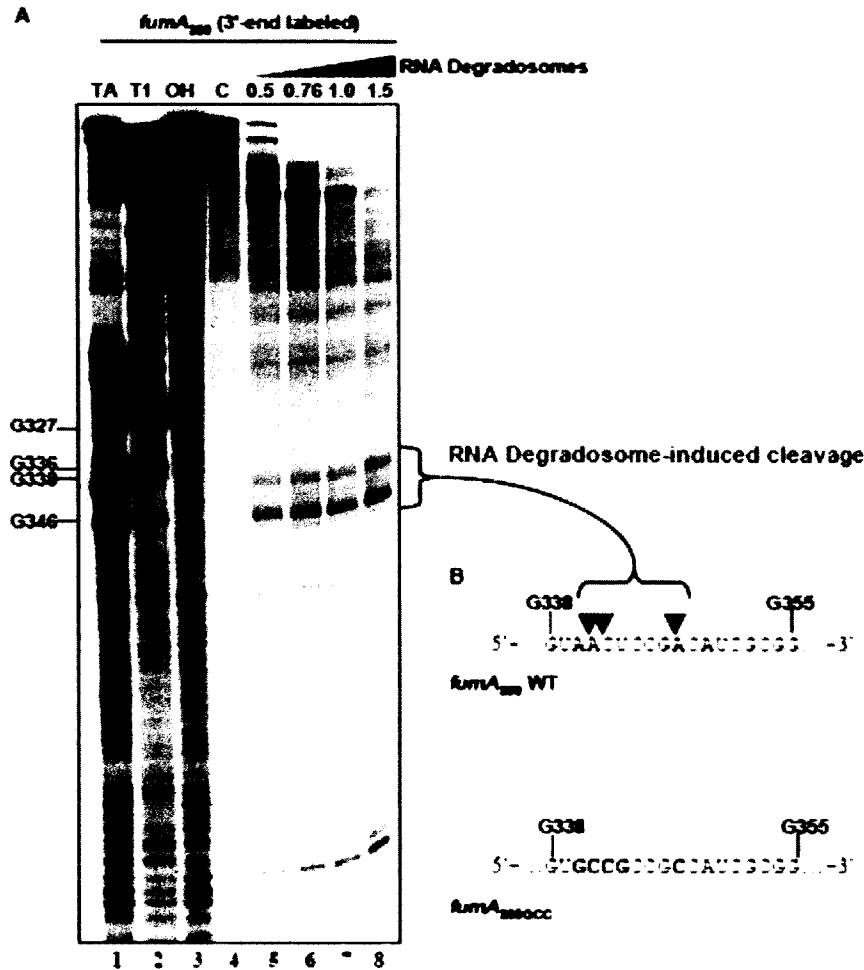
Data from Fig 1B and 4B suggest the presence of a putative cleavage site within the region between nts 400 and 430 of *sodB* mRNA. We aimed to map the precise site by an in vitro cleavage reaction using purified RNA degradosomes. Notably, these experiments were performed in the absence of RyhB. As demonstrated in Fig 5A left panel, the addition of purified RNA degradosomes to a 3'-end radiolabelled *sodB*<sub>458</sub> transcript induced a cleavage in the region near position 407 of *sodB* mRNA (see Fig S3 for in vitro determination of the cleavage site in *fumA*). This result correlates with in vivo data suggesting the presence of a cleavage site between nts 400 and 430 of *sodB*. The nucleotide sequence of the cleavage site at *sodB*<sub>407</sub> correlates with previously characterized AU-rich RNase E and RNA degradosome cleavage sites on various RNA substrates (Belasco 2010, Carpousis 2007). The RNA degradosome also catalyzed additional cleavages towards the 5'-end of the *sodB* transcript (denoted by the bracket in the right margin of Fig 5A).

To determine the importance of the cleavage site at the position 407 within the context of RyhB-induced mRNA degradation, we introduced a 9 nt-long mutation at this site, keeping the *sodB* ORF intact (see Fig 5B). This construct was designated as *sodB*<sub>430GCC</sub>. The *sodB*<sub>430GCC</sub> construct was assayed for its sensitivity to RNase E in the RNA degradosome. Data showed that cleavages towards the 5'-end of this transcript are virtually identical to those in the *sodB*<sub>430</sub> transcript (Fig 5A, right panel). However, no cleavage occurred in the 407 region of the altered transcript at any concentration of enzyme tested. We next monitored the in vivo effect of RyhB on the *sodB*<sub>430GCC</sub> construct. Whereas RyhB clearly destroyed the *sodB*<sub>430</sub>-*lacZ* construct within 10 min of expression (Fig 5C, lane 2), it had little effect on the *sodB*<sub>430GCC</sub>-*lacZ* construct (Fig 5C, lane 4). This clearly indicates that the cleavage site at *sodB*<sub>407</sub> is essential for RyhB-induced mRNA degradation in vivo.





**Figure 5.** In vitro mapping and mutagenesis of the minimal *sodB*<sub>430</sub> cleavage site. (A) Effect of increasing amounts of purified RNA Degradosomes (0.5; 0.76; 1.0; and 1.5 ng/ $\mu$ l final) on <sup>32</sup>P-pCp 3'-end radiolabelled *sodB*<sub>458</sub> (left panel, lane 4 to 8) and *sodB*<sub>458GCC</sub> (right panel, lane 12 to 16). RNase TA ladder (lane 1 and 9), RNase T1 ladder (lane 2 and 10), NaOH ladder (lane 3 and 11), radiolabelled RNA alone (lane 4 and 12). (B) Local nucleotide sequence (between G400 and G413) of the cleavage site from *sodB*<sub>430</sub> (top line) and the mutated *sodB*<sub>430GCC</sub> (bottom). (C) Northern blots using a *lacZ* probe on *sodB*<sub>430-lacZ</sub> and *sodB*<sub>430GCC-lacZ</sub> transcriptional fusions in the absence or presence of RyhB expression (for 10 min).

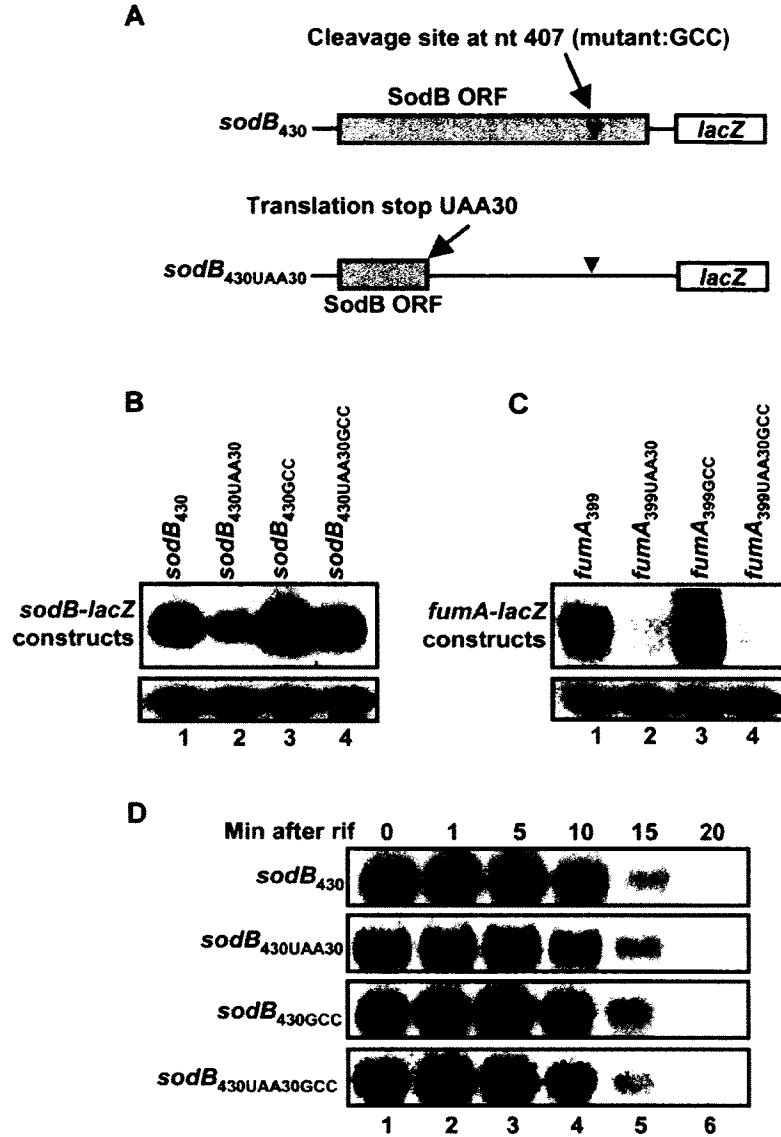


**Figure S3.** Mapping of the RNA degradosome cleavage site at position 340 of *fumA* mRNA. In vitro mapping and mutagenesis of the minimal *fumA*<sub>399</sub> cleavage site. (A) Effect of increasing amounts of purified RNA degradosomes (0.5; 0.76; 1.0; and 1.5 ng/ $\mu$ l final) on <sup>32</sup>P-pCp 3'-end radiolabelled *fumA*<sub>399</sub> (lane 5 to 8). RNase TA ladder (lane 1), RNase T1 ladder (lane 2), NaOH ladder (lane 3), radiolabelled *fumA*<sub>399</sub> RNA alone (lane 4). (B) Local nucleotide sequence (between G338 and G355) of the cleavage sites from wild-type *fumA*<sub>399</sub> and the mutated *fumA*<sub>399GCC</sub> where mutations are shown in bold.

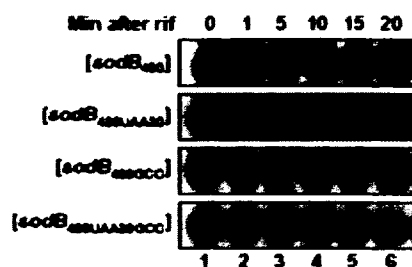
### **Translational block alone is not sufficient to induce full degradation of *sodB*<sub>430</sub> mRNA in the absence of RyhB**

Because our previous results indicated that a RyhB-induced cleavage site was present within the ORF of *sodB*, we asked whether active translation could protect the cleavage site from ribonuclease attack. To address this, we introduced a UAA stop codon at the 30<sup>th</sup> amino acid in the ORF of *sodB*<sub>430</sub>, thus creating the *sodB*<sub>430UAA30</sub> fusion (see Fig 6A). Northern blots assays were used to determine the steady-state mRNA levels, in absence of RyhB expression. Results suggested that blocking translation reduced the mRNA levels but this was not sufficient to cause full degradation of *sodB*<sub>430</sub> transcripts (Fig 6B, compare lanes 1 and 2). Furthermore, in the case of constructs with prematurely-terminated translation, the RNA levels of *sodB*<sub>430UAA30GCC</sub> (without cleavage site) contained slightly more mRNA than *sodB*<sub>430UAA30</sub> (with cleavage site). These observations suggested that the cleavage site at position 407 was partially responsible for turnover in the absence of translation (see Discussion for details). This result is in marked contrast to that observed in the case of the *fumA*<sub>399</sub>-*lacZ* construct, which was totally degraded when translation was blocked ahead of the RyhB-induced cleavage site by adding a UAA stop at the 30<sup>th</sup> codon (Fig 6C, lanes 1 and 2). These results suggest that, at least in the case of *sodB*, translation block by a sRNA such as RyhB is not sufficient to fully account for the observed mRNA degradation.

We also assessed the half-life (in absence of RyhB expression) of various constructs displaying active translation beyond the cleavage site (*sodB*<sub>430</sub>, *sodB*<sub>430GCC</sub>) or with translation prematurely stopped (*sodB*<sub>430UAA30</sub>, *sodB*<sub>430UAA30GCC</sub>). All constructs displayed roughly the same stability with a half-life of approximately 12 min (Fig 6D). This is significantly longer than the RyhB-induced degradation kinetic of the *sodB*<sub>430</sub> construct, which was fully degraded after 5-7 min of RyhB expression (Fig 4C). These data strongly suggest that blocking translation cannot fully explain RyhB-induced mRNA degradation (see Discussion for details).



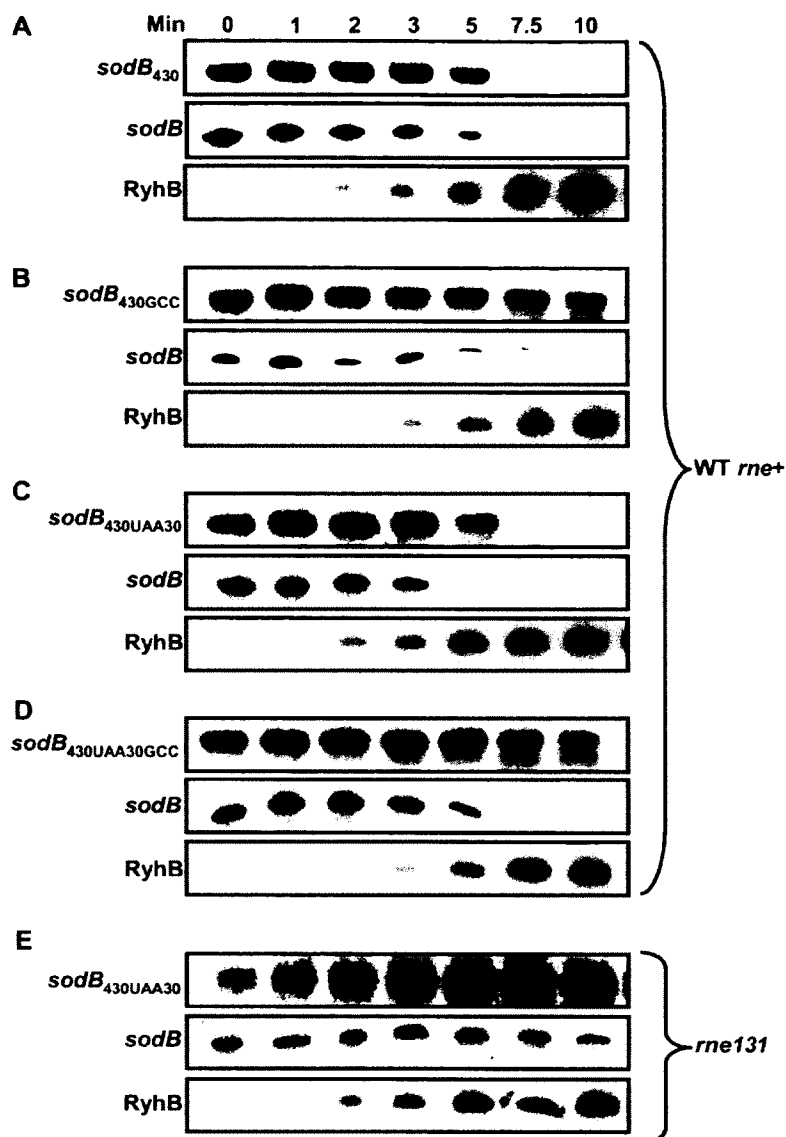
**Figure 6.** Translation block alone in the absence of RyhB is not sufficient to cause full degradation of *sodB* mRNA. (A) Schematic description of the different *sodB* constructs used to monitor the effect of translation on mRNA steady-state level and stability. The grey bar represents *sodB* ORF. The arrowhead is the cleavage site at position 407. UAA30 is the stop codon introduced to prematurely terminate translation. The GCC represents the mutation introduced to inactivate the cleavage site at position 407. (B) Northern blots using a *lacZ* probe showing the steady-state levels of *sodB*<sub>430</sub>, *sodB*<sub>430UAA30</sub>, *sodB*<sub>430GCC</sub>, *sodB*<sub>430UAA30GCC</sub> constructs. (C) Northern blots using a *lacZ* probe showing the steady-state level of *fumA*<sub>399</sub>, *fumA*<sub>399UAA30</sub>, *fumA*<sub>399GCC</sub>, and *fumA*<sub>399UAA30GCC</sub> constructs. (D) Northern blots using a *lacZ* probe showing the stability of *sodB*<sub>430</sub>, *sodB*<sub>430UAA30</sub>, *sodB*<sub>430GCC</sub>, *sodB*<sub>430UAA30GCC</sub> constructs. Rifampicin (250  $\mu$ g/ml) was added at time 0 before total RNAs were extracted at the indicated time points. Control 16S are shown in Fig S8.



**Figure S8.** Loading controls 16S for Figure 6D where the corresponding constructs are in brackets.

### **RyhB-induced mRNA cleavage of the target mRNA *sodB*<sub>430</sub>-*lacZ* in absence of translation**

While the previous data (Fig 6B) indicated that prematurely-stopped translation contributed to destabilization of *sodB*<sub>430</sub> construct, this was not sufficient to fully degrade the construct. This observation suggests that RyhB could promote degradation of the *sodB*<sub>430</sub> construct even in the absence of translation. To further address this, we expressed RyhB in strains containing the construct *sodB*<sub>430</sub>UAA30, which harbors a stop signal at the 30<sup>th</sup> codon. As shown in Fig 7C, the expression of RyhB promoted rapid degradation of *sodB*<sub>430</sub>UAA30, which was still dependent on the cleavage site at residue 407 (compare *sodB*<sub>430</sub>UAA30 (Fig 7C) with *sodB*<sub>430</sub>UAA30GCC (Fig 7D)). Although the translation was blocked far upstream of the cleavage site, the construct *sodB*<sub>430</sub>UAA30 was nevertheless sensitive to RyhB with a degradation kinetics similar to the WT *sodB*<sub>430</sub> construct (Fig 7A, half-life  $\leq 7.5$  min) or the endogenous *sodB* mRNA. This rapid degradation kinetic of the *sodB*<sub>430</sub>UAA30 construct by RyhB suggests an active mechanism of degradation as compared to passive degradation. Indeed, when we monitored the effect of RyhB on *sodB*<sub>430</sub>UAA30 in *rne131* cells (Fig 7E), the transcript was not degraded. These data demonstrate that both the sRNA RyhB and the RNA degradosome promote mRNA cleavage in absence of translation elongation at the cleavage site.

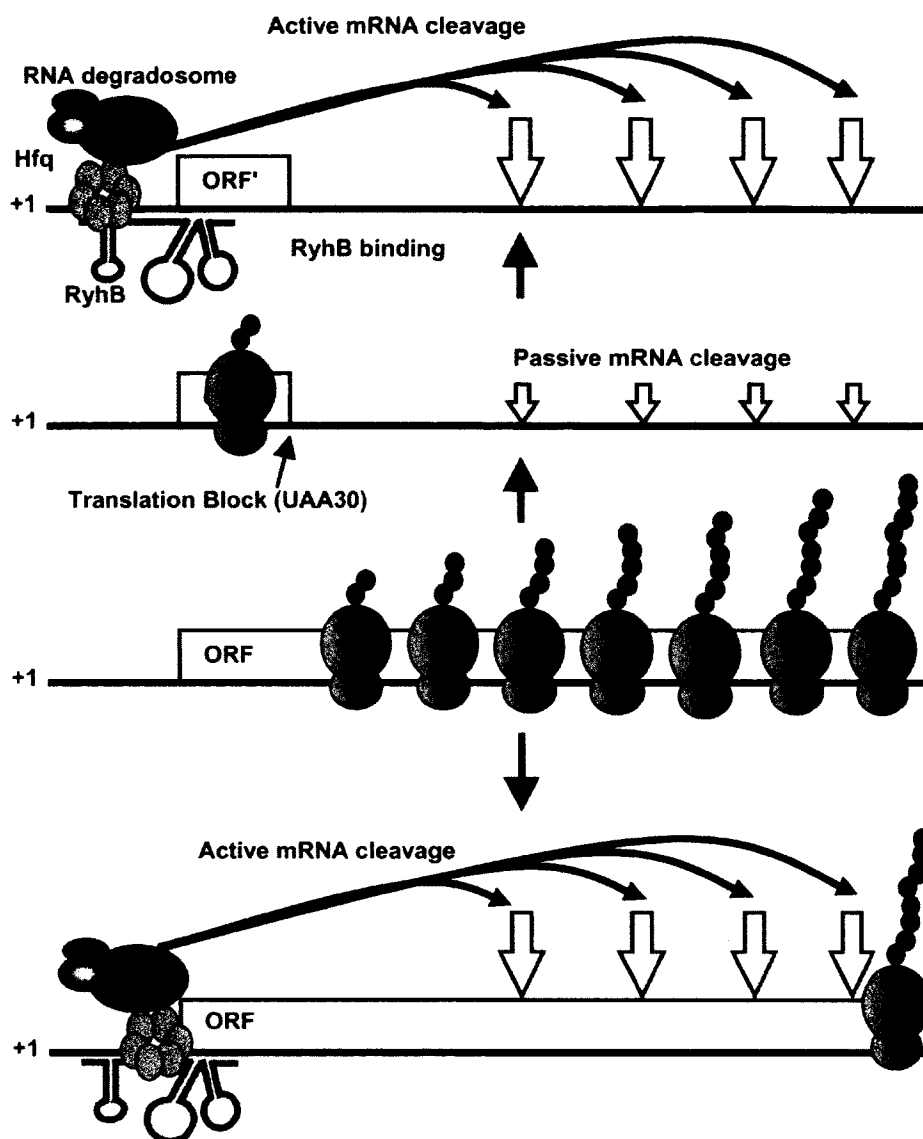


**Figure 7.** RyhB-induced mRNA cleavage in prior absence of translation on the target mRNA *sodB*<sub>430</sub>-*lacZ*. Northern blots using a *lacZ* probe showing the effect of RyhB expression in WT cells on (A) *sodB*<sub>430</sub>; (B) *sodB*<sub>430GCC</sub>; (C) *sodB*<sub>430UAA30</sub>; and, (D) *sodB*<sub>430UAA30GCC</sub>. Northern blots using a *lacZ* probe showing the effect of RyhB expression in *rne131* cells on (E) and *sodB*<sub>430UAA30</sub>.

## DISCUSSION

Our work unveils key determinants in the mechanism of sRNA-induced mRNA degradation. First, we demonstrate that the sRNA pairing promotes the cleavage at a distal site, sometimes hundreds of nucleotides downstream within the target mRNA. Second, prematurely terminated translation of a target mRNA is not sufficient to induce the full degradation of a target mRNA. Third, the sRNA-induced cleavage can initiate in prior absence of translation on the target mRNA. We propose a model (Fig 8) where RyhB and Hfq act first on the target mRNA by competing with 30S ribosome sub-units and blocking translation initiation. The following steps include the recruitment of the RNA degradosome and cleavage at the distal site deep within the ORF. Surprisingly, the cleavage site is located as far as 350 nts downstream of the RyhB pairing site. This suggests a mechanism that allows translating ribosomes to clear off the ORF before the RNA degradosome proceeds to cleave the mRNA (see model in Fig 8). This way, the mRNA cleavage happens after the passage of elongating ribosomes, thereby preventing accumulation of cleaved transcripts harboring stalled ribosomes. Such a mechanism seems widely distributed since we described three different target mRNAs (*sodB*, *fumA*, and *iscRSUA*) where RyhB induces a distal mRNA degradation (Fig 1 and 2). We assume that a significant fraction of sRNAs that binds at the RBS of their target mRNAs will function similarly to RyhB.

In fact, a large number of Hfq-binding sRNAs, such as MicA (Rasmussen et al. 2005, Udekwu et al. 2005), SgrS (Morita, Maki & Aiba 2005), RybB (Papenfort et al. 2006), OmrA, and OmrB (Guillier, Gottesman 2008), binds to the RBS of their specific target mRNAs to repress translation and the mRNA level. We assume that these sRNAs share, at least partly, the same mechanism as the one described here for RyhB. The effects of RyhB-induced target mRNA degradation have been widely investigated (Morita, Maki & Aiba 2005, Masse, Escorcía & Gottesman 2003, Masse, Vanderpool & Gottesman 2005, Afonyushkin et al. 2005, Desnoyers et al. 2009, Geissmann, Touati 2004). Still, none of these studies have defined whether RyhB sRNA acts solely by blocking translation initiation, which induces mRNA degradation (passive degradation model), or whether RyhB promotes the cleavage and degradation of the target mRNA, independently of translation (Fig 8, active cleavage model).



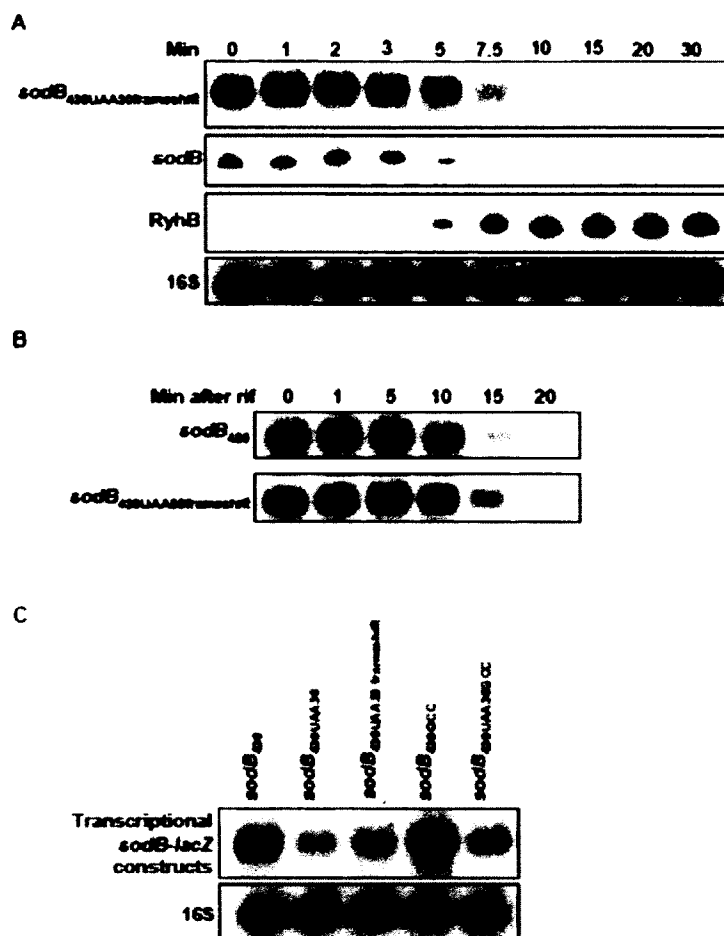
**Figure 8.** Model for sRNA-induced mRNA degradation (see text for details).

The distant location of downstream cleavage sites may contribute to optimal sRNA-induced mRNA decay. Indeed, when RyhB pairs with a target mRNA and blocks translation initiation, the last translating ribosome can reach and pass the cleavage site before the degradosome initiates mRNA cleavage. Once the mRNA is cleaved, the resulting generation of a 5'-P (monophosphorylated) end accelerates by a 30-fold factor the RNase E activity towards the 3'-end of the transcript (Mackie 1998, Jiang, Belasco 2004, Garrey et al. 2009). Consequently, the cleaved mRNA will be fully degraded more rapidly. When the mRNA is cleaved once, the following rapid RNase E cleavages, concomitantly with exonucleases action, fully destroy the remaining RNA (Belasco 2010, Carpousis

2007). In this context, if RNase E cleavage sites are located upstream of the ORF, the activated RNase E could cleave within the ORF before ribosomes have completed translation, thus trapping ribosomes in a prematurely terminated ORF. If this were the case, the tmRNA (SsrA) would likely help such a stalled ribosome (Keiler, Waller & Sauer 1996). In contrast, a distal cleavage site may prevent RNase E cleavage before ribosomes have cleared the upstream part of the mRNA.

We show here that even with a prematurely terminated translation of the mRNA (Fig 7C, construct *sodB*<sub>430UAA30</sub>), the sRNA RyhB promoted a RNA degradosome-dependent cleavage. The UAA stop codon was used because it is the natural stop codon of *sodB* ORF as well as being the most abundant and strongest termination signal in *E. coli* (Poole, Brown & Tate 1995, Crawford et al. 1999). By terminating translation at the 30<sup>th</sup> codon, we prevented any bias in the sequence and structure of *sodB* mRNA at both the RyhB pairing site (at the RBS) and the cleavage site at position 407. It could have been possible that the AUU codon at the 30<sup>th</sup> aa of *sodB*<sub>430UAA30</sub> was leaky. If this were the case, then ribosomes reading through the stop codon would contribute to stabilize the mRNA. To verify this possibility, we introduced a stop codon followed by a frameshift, which would fully prevent any ribosome read-through. As shown in Fig S4, we observed the same results as presented in Fig 6 with the single AUU stop at the 30<sup>th</sup> codon. Thus, both the *sodB* constructs with blocked translation were most likely free of ribosomes at the position 407. Furthermore, even though translation was terminated upstream, the cleavage site at position 407 of *sodB* was still critical for efficient RyhB-induced degradation (Fig 7D).

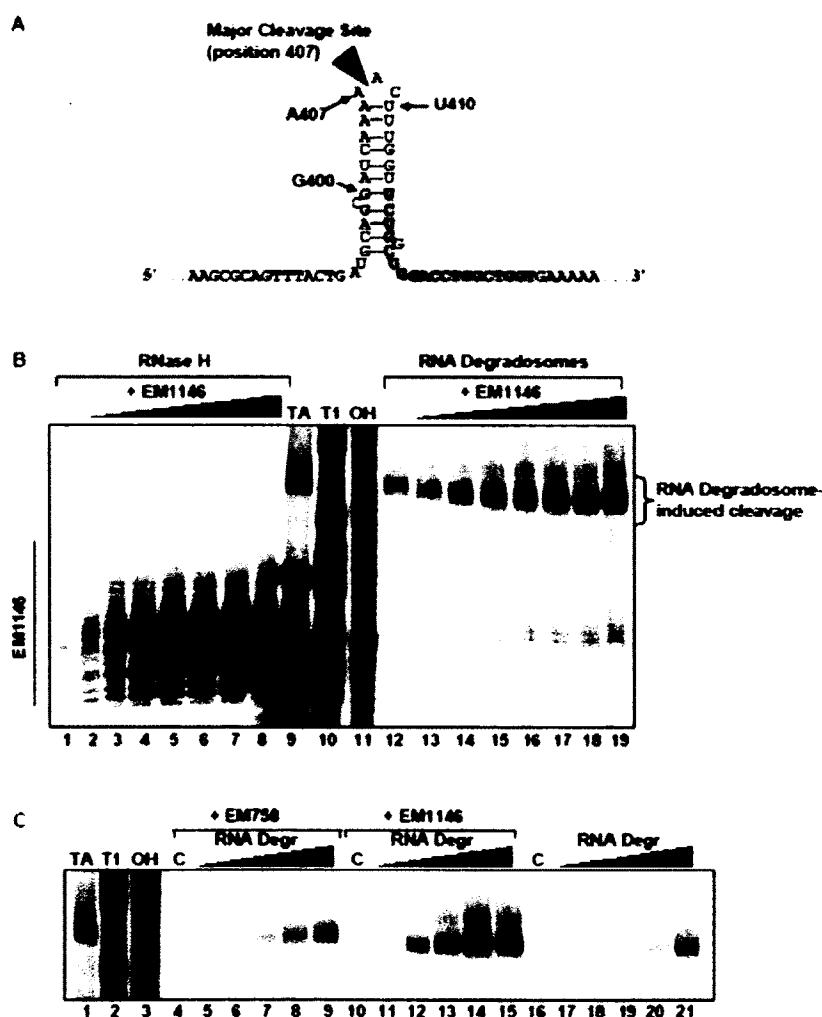




**Figure S4.** RyhB-induced mRNA cleavage in absence of translation on the target mRNA *sodB*<sub>430UAA30frameshift</sub>. (A) Northern blots using a *lacZ* probe showing the effect of RyhB expression in WT cells on *sodB*<sub>430UAA30frameshift</sub>. The expression of endogenous *sodB* transcript and RyhB is also shown. (B) Northern blots using a *lacZ* probe showing the half-life of *sodB*<sub>430</sub> and *sodB*<sub>430UAA30frameshift</sub> constructs. Rifampicin (250  $\mu$ g/ml) was added at time 0 before total RNAs were extracted at the indicated time points. (C) Northern blots using a *lacZ* probe showing the steady-state mRNA levels of *sodB*<sub>430</sub>, *sodB*<sub>430UAA30</sub>, *sodB*<sub>430UAA30frameshift</sub>, *sodB*<sub>430GCC</sub>, *sodB*<sub>430UAA30GCC</sub> constructs.

An argument suggesting the importance of the cleavage site at residue 407 was the significant effect that inactivating the *sodB*<sub>407</sub> cleavage site had on the steady-state level of *sodB*, whether the transcript was translated (compare *sodB*<sub>430</sub> with *sodB*<sub>430GCC</sub>, Fig 6B) or not (compare *sodB*<sub>430UAA30</sub> with *sodB*<sub>430UAA30GCC</sub>, Fig 6B). Nonetheless, in the absence of translation, the *sodB*<sub>430UAA30</sub> transcript was present to a significant level, which was in contrast to the fully degraded *fumA*<sub>399UAA</sub> construct (Fig 6C). One reason to explain why

the non-translated *sodB*<sub>430UAA30</sub> construct was not fully degraded is the presence of secondary structures in the RNA in the vicinity of residue 407 (Fig S5). Because RNase E requires single-strand RNA, the presence of secondary structures may hinder the ribonuclease attack. To test this, we performed in vitro RNA degradosome cleavage using an oligonucleotide located 5 nts downstream of the cleavage site to remove the RNA structure. The presence of the oligonucleotide clearly improved the specific cleavage at position 407 (Fig S5), which suggests that local RNA structures hinder the action of the RNA degradosome. Thus, the presence of inhibitory RNA structures in the vicinity of position 407 in *sodB* may explain why this site was not fully attacked in the absence of translation as compared to *fumA*.



**Figure S5.** Disruption of a secondary structure close to the position 407 of *sodB* mRNA stimulates the RNA-degradosome cleavage. (A) Local secondary structure in the vicinity of

position 407 of *sodB* mRNA. The major cleavage site characterized is shown by an arrowhead. The grey zone represents the pairing region of oligonucleotide EM1146. (B) The presence of oligonucleotide EM1146 stimulates RNA degradosome-dependent cleavage at position 407 of *sodB*. Lane 1 to 8, 5 nM of 3'-end radiolabelled *sodB*<sub>458</sub> in the presence of increasing amount of oligonucleotide EM1146 (0 ; 5; 50; 125; 250; 375; 500; 1000 nM), treated with 1 unit of RNase H. RNase TA ladder (lane 9), RNase T1 ladder (lane 10), NaOH ladder (lane 11). Lane 12 to 19, 5 nM of 3'-end radiolabelled *sodB*<sub>458</sub> in the presence of increasing amount of oligonucleotide EM1146 (0 ; 5; 50; 125; 250; 375; 500; 1000 nM), treated with purified RNA Degradosomes at 0.5 ng/μl final. (C) Stimulation of RNA degradosome cleavage is specific to oligonucleotide EM1146. RNase TA ladder (lane 1), RNase T1 ladder (lane 2), NaOH ladder (lane 3). Lanes 4 to 9, 5 nM of 3'-end radiolabelled *sodB*<sub>458</sub> with 500 nM oligonucleotide EM758 (which does not pair with *sodB*) in the presence of increasing amount of RNA degradosomes (0; 0.05; 0.1; 0.25; 0.50; 1.0 ng/μl final). Lanes 10 to 15, 5 nM of 3'-end radiolabelled *sodB*<sub>458</sub> with 500 nM oligonucleotide EM1146 in the presence of increasing amount of RNA degradosomes (0; 0.05; 0.1; 0.25; 0.50; 1.0 ng/μl final). Lanes 16 to 21, 5 nM of 3'-end radiolabelled *sodB*<sub>458</sub> without oligonucleotide in the presence of increasing amount of RNA degradosomes (0; 0.05; 0.1; 0.25; 0.50; 1.0 ng/μl final).

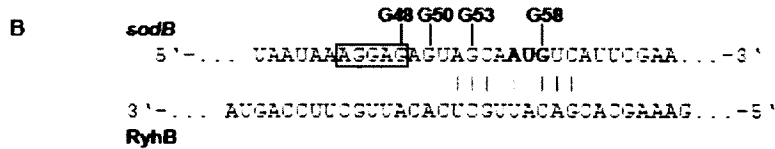
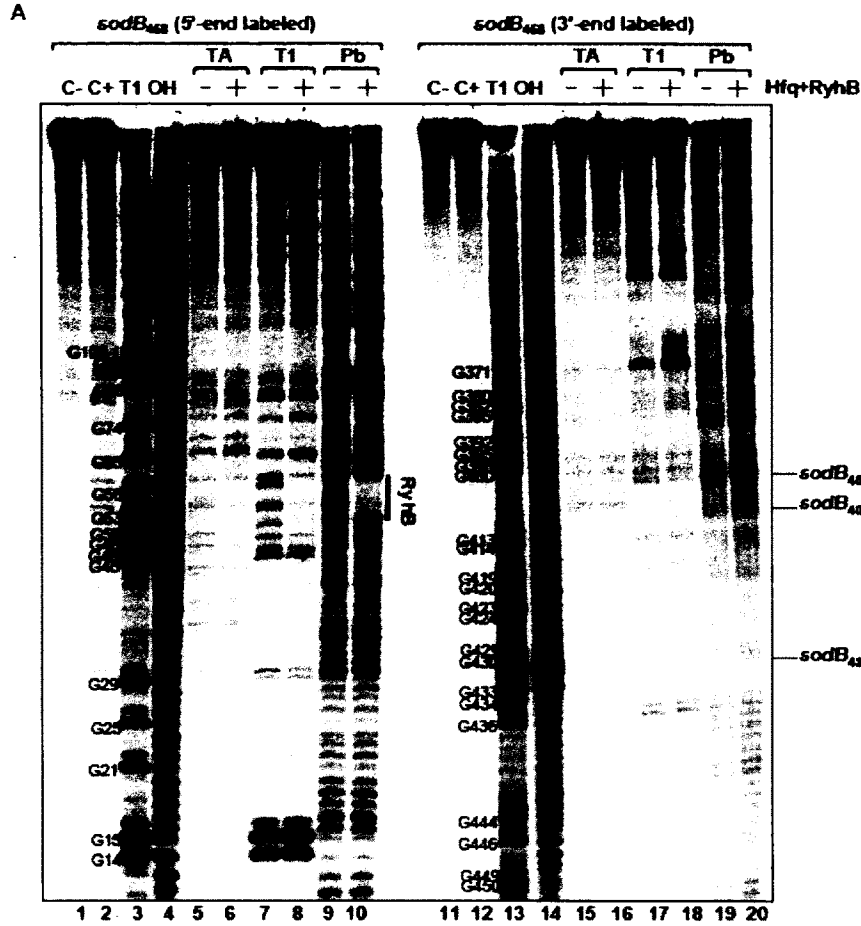
Surprisingly, while the steady-state levels of the constructs varied significantly (Fig 6B), they all displayed the same stability (Fig 6D). To explain this, we suggest that the construct with prematurely terminated translation (*sodB*<sub>430UAA30</sub>) comprised two distinct populations of transcripts; a first population of transcripts with a rapid turnover (<1 min) and a second population that is more stable. The rapid decay of the first population of transcripts likely depends on cleavage at nt 407 since the construct *sodB*<sub>430UAA30GCC</sub> displayed a steady-state level similar to that of the wild-type *sodB*<sub>430</sub>. This suggests that when translation is prematurely stopped (*sodB*<sub>430UAA30</sub>), the cleavage site at nt 407 is exposed and cleavage occurs rapidly. Indeed, when the cleavage site is absent (*sodB*<sub>430UAA30GCC</sub>), no rapid cleavage occurs and the steady-state level becomes similar to the wild-type *sodB*<sub>430</sub>.

While the group of short transcriptional *sodB-lacZ* fusions (*sodB*<sub>130</sub>, *sodB*<sub>289</sub>, and *sodB*<sub>400</sub>) displayed resistance to RyhB (Fig 1B), the equivalent *sodB-lacZ* translational fusions were all RyhB-sensitive. These results suggest that the RyhB-induced cleavage within *sodB-lacZ* translational fusions occurs in *lacZ* gene regardless of the *sodB* length. Thus, these data indicate that the sRNA pairs to an RNA sequence and promotes cleavage within a foreign gene other than the original target mRNA. In addition, it is very likely that

the sRNA-induced translation block alone is sufficient to destabilize the *lacZ* transcript as previously observed (Iost, Dreyfus 1995).

Earlier studies with *sodB-lacZ* fusions suggested that RyhB triggered degradation of *sodB* within the region upstream of nt 192 (Geissmann, Touati 2004). Our data are in disagreement with this observation. We explain these previous results by the use of a *lacZ* transcriptional fusion that contained a potential RNase E-dependent cleavage site in the linker region between the *sodB* and *lacZ* mRNAs. Here, the use of a shorter linker (pFRA $\Delta$  construct) that did not contain a RNase E-dependent cleavage provided a tool to focus on the sequence in *sodB* mRNA.

In another study performed by a different group, the authors attempted to reproduce RyhB-induced mRNA degradation in vitro (Afonyushkin et al. 2005). The authors used a *sodB* transcript identical to the transcript used by Geissmann et al. (*sodB*<sub>192</sub>) to characterize a RyhB-induced cleavage site at nt +67, which is just 6 nts downstream of RyhB pairing site. These in vitro results do not corroborate our findings. Whereas we also detect cleavage within the 5'-end of the *sodB*<sub>458</sub> substrate (Fig 5A, in vitro-specific cleavages), we did not consider them significant as these cleavages did not correlate with the RyhB-induced in vivo cleavage. Our results indicate that cleavages in the 5'-end of *sodB* are not significant in vivo, at least within the context of RyhB-induced cleavage. To test whether RyhB was pairing at the position 407 to induce local cleavage, we tested in vitro pairing between *sodB* and RyhB. Results clearly showed (Fig S6) that whereas RyhB bound to the previously known pairing site (left panel), there was no evidence suggesting RyhB pairing at the position 407 (right panel).

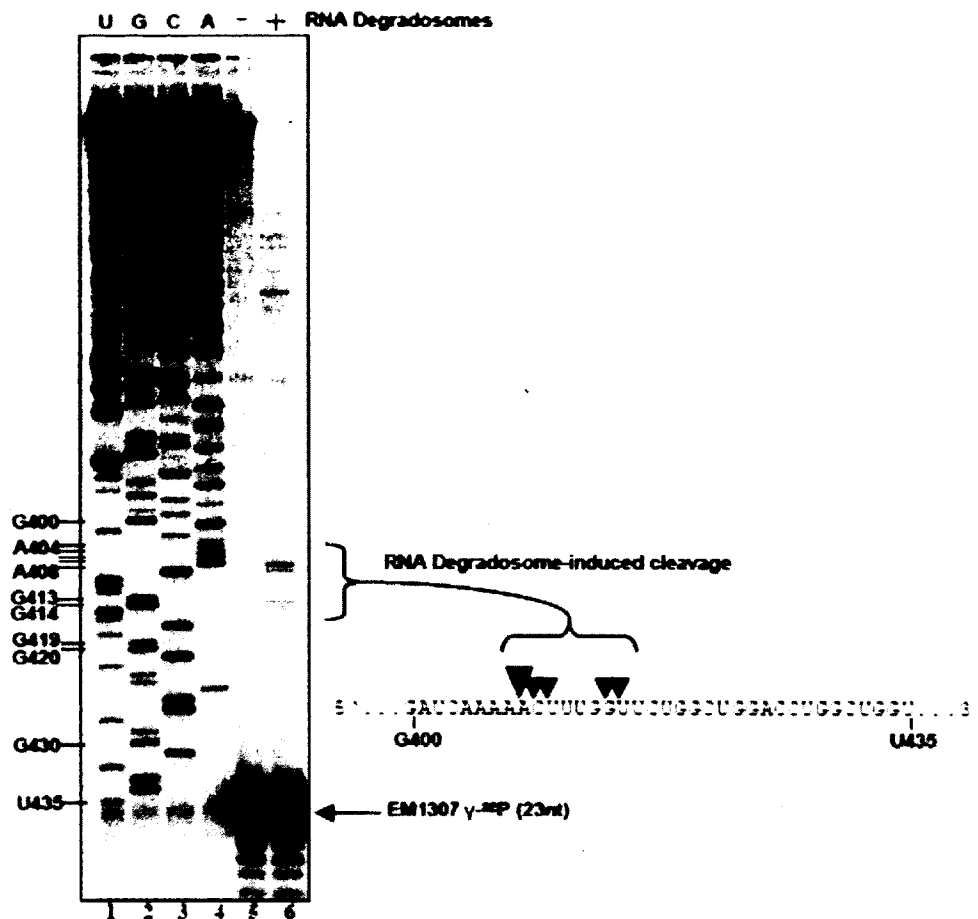


**Figure S6.** RyhB interacts with the 5'-UTR of *sodB* and not close to the cleavage site at position 407. (A) Enzymatic and chemical probing of the 5'-end labelled *sodB*<sub>458</sub> (lanes 1 to 10) and 3'-end labelled *sodB*<sub>458</sub> (lanes 11 to 20) mRNA in the presence or absence of RyhB and Hfq. The positions of several G residues are given. NaOH, alkaline ladder; T1, RNase T1 (cleaves at G residues); TA, RNase TA (cleaves at A residues); PbAc, lead acetate (cleaves all accessible residues). C-, control RNA; C+, control RNA with Hfq. All experiments were carried out in native conditions except for NaOH and T1 ladders, performed in denaturing conditions. (B) Pairing between the sRNA RyhB and the 5'-UTR of *sodB*. RyhB pairing overlaps *sodB* translation start codon (bold). The ribosome-binding site of *sodB* is boxed.

Another possible reason to explain the RyhB-induced cleavage of *sodB*<sub>192</sub> in vitro (Afonyushkin et al. 2005) is the use of a 5'-monophosphate labelled target mRNA, which

differs from the in vivo 5'-triphosphate substrate. As mentioned above, 5'-monophosphate substrate has been shown to promote significantly RNase E-dependent cleavage (Mackie 1998, Mackie 2000). In contrast to this, the in vitro mRNA substrates used here were labelled at their 3'-end (pCp, see Materials and Methods), which keeps the 5'-triphosphate intact as well as preventing degradation by the 3'-5' PNPase of the RNA degradosome. Thus, we believe that this type of in vitro target mRNA probably reproduces more closely the in vivo substrate that is cleaved through RNase E (Masse, Escorcia & Gottesman 2003). To confirm the cleavage site at *sodB*<sub>407</sub>, we performed one additional in vitro approach. We incubated a T7 RNAP-generated *sodB*<sub>458</sub> transcript with purified RNA degradosome followed by primer extension, which will stop at any RNase E-generated cleavage. As shown in Fig S7, whereas the absence of RNA degradosome prevented any cleavage, incubation of *sodB*<sub>458</sub> in the presence of the RNA degradosome resulted in a major cleavage at the *sodB*<sub>407</sub> site. Although, this approach still did not prevent in vitro-specific cleavage in the upstream region of the mRNA, it confirmed our data on the specific cleavage at *sodB*<sub>407</sub>.

Whereas RyhB and all other previously mentioned sRNAs bind on their targets at or close to the RBS, a recent study has provided evidence that pairing at the RBS was not a universal step in the mechanism of sRNA-dependent mRNA silencing. Indeed, the sRNA MicC in *Salmonella typhimurium* induces an RNase E-dependent mRNA cleavage in the *ompD* mRNA even though the sRNA pairs within the ORF, far downstream from the RBS (Pfeiffer et al. 2009). Hfq binds in vitro to the target *ompD* close to MicC pairing, within the ORF. This is similar to a previous study, where the RNA chaperone Hfq was shown to bind close to the sRNA pairing site to melt the mRNA structure and promote sRNA pairing (Geissmann, Touati 2004). In contrast to previously described sRNA systems, MicC does not alter translation of the target (Pfeiffer et al. 2009). These results may be explained by the low translation rate of the target mRNA *ompD*, which would allow the sRNA MicC to pair at the ORF without competing with ribosomes.



**Figure S7.** Mapping of the RNA degradosome cleavage site at position 407 of *sodB* by primer extension. The in vitro-transcribed *sodB*<sub>458</sub> transcript was incubated in the absence (lane 5) and presence (lane 6) of purified RNA degradosomes (1.0 ng/ul final) for 30 min. Then the resulting RNA was used for primer extension with the radiolabelled oligonucleotide EM1307. The cleavage sites shown in this figure are equivalent to those demonstrated in Fig 5A and B.

Our study has uncovered many critical determinants of sRNA-induced mRNA degradation. However, additional steps have to be elucidated to reproduce the complete reaction in vitro. Additional factors such as protein components or RNA structures still need to be characterized to provide a comprehensive view of the whole process. This is not surprising given the complexity of the system so far. A major question that remained to be addressed is whether the sRNA must block translation in order to induce mRNA degradation. This question is of importance in view of the recent description of the sRNA MicC, which promotes degradation of *ompC* mRNA without blocking its translation

(Pfeiffer et al. 2009). Further work is needed to unravel the relationship between the activity of sRNAs and translation activity of their target mRNAs. Studies along these lines of research are currently ongoing in our laboratory.



## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank George Mackie, François Bachand, Sherif Abou-Elela, Daniel Lafontaine, Frederieke Brouwers, and Gilles Dupuis for helpful suggestions throughout the course of this work. This work was funded by an operating grant MOP69005 to E.M. from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR). G.D. is a PhD scholar from the FQRNT (Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies). E.M. is a CIHR New Investigator and FRSQ (Fonds de la Recherche en Santé du Québec) Junior II scholar.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and plasmids.** Derivatives of *E. coli* MG1655 were used in all experiments. The DH5 $\alpha$  bacterial strain was used for routine cloning procedures. Strains constructed by P1 transduction were selected for the appropriate antibiotic-resistant marker. Except as otherwise indicated, for cells carrying pFR $\Delta$ , pRS1551, pNM12 and pBAD-*ryhB*, ampicillin was used at a final concentration of 50  $\mu$ g/ml. See Table I and Table II for a complete description of strains and oligonucleotides used in this study.

For the construction of *sodB-lacZ* transcriptional and translational fusions, a polymerase chain reaction (PCR) fragment made with the following oligonucleotides, EM423 (forward for all *sodB* constructions) and EM424 (*sodB*<sub>130</sub>), EM516 (*sodB*<sub>289</sub>), EM515 (*sodB*<sub>400</sub>), EM527 (*sodB*<sub>430</sub>), EM528 (*sodB*<sub>458</sub>), EM514 (*sodB*<sub>517</sub>), EM511 (*sodB*<sub>607</sub>), was digested by *EcoRI* and *BamHI* and ligated into *EcoRI/BamHI*-digested pFR $\Delta$  (for transcriptional fusions) and *EcoRI/BamHI*-digested pRS1551 (for in-frame translational fusions). The vector pFR $\Delta$  is a derivative of the original transcriptional vector, pRS1553 (Simons, Houman & Kleckner 1987), which harbors a transcriptional terminator in the linker between the cloned gene and the *lacZ* reporter gene (Repoila, Gottesman 2001). All the transcriptional fusions are constructed from the pFR $\Delta$  vector (without transcriptional terminator) and are in-frame with a TAA translation stop (gatccGGCATTTTAA), which is located 26 nucleotides upstream of the RBS of *lacZ*.

To generate *sodB*<sub>130+30</sub>, a PCR product of 30 nts was made with oligonucleotides EM625-EM626, then digested with *BamHI* and ligated into *EcoRI/BamHI*-digested pFR $\Delta$ -*sodB*<sub>130</sub>. To produce *sodB*<sub>430</sub> modifications, two independent PCR reactions were performed using the *sodB*<sub>430</sub> or *sodB*<sub>430GCC</sub> (to construct *sodB*<sub>430UAA30GCC</sub>) fusion as template with these oligonucleotides, *sodB*<sub>430UAA30</sub> (EM1050-EM195 and EM194-EM1051), *sodB*<sub>430GCC</sub> (EM630-EM195 and EM194-EM631), *sodB*<sub>430UAA30frameshift</sub> (EM1411-EM195 and EM194-EM1412). The two PCR products were then mixed to serve as the template for a third PCR (EM194-EM195, oligonucleotides in the pFR $\Delta$ ). The resulting PCR product was then digested by *BamHI* and *EcoRI* and ligated into *EcoRI/BamHI*-digested pFR $\Delta$  (for transcriptional fusions).

For the construction of *fumA-lacZ* transcriptional fusions, a PCR fragment made with the following oligonucleotides, EM533 (forward for all *fumA* constructions) and EM534 (*fumA*<sub>126</sub>), EM560 (*fumA*<sub>301</sub>), EM559 (*fumA*<sub>399</sub>), EM558 (*fumA*<sub>507</sub>), EM556 (*fumA*<sub>703</sub>), EM555 (*fumA*<sub>801</sub>). A PCR fragment for the *iscRS-lacZ* fusion was made with EM359 (forward for *iscRS* constructions) and EM629 (*iscRS*<sub>687</sub>), EM587 (*iscRS*<sub>1268</sub>). These PCR products were digested by *EcoRI* and *BamHI* and ligated into *EcoRI/BamHI*-digested pFRΔ. To generate *fumA*<sub>399</sub> modifications, two independent PCR reactions were performed using the *fumA*<sub>399</sub> or *fumA*<sub>399GCC</sub> (to construct *fumA*<sub>399UAA30GCC</sub>) fusion as template with the following oligonucleotides, *fumA*<sub>399UAA30</sub> (EM1028-EM195 and EM194-EM1029), *fumA*<sub>399GCC</sub> (EM1114-EM195 and EM194-EM1115). The two PCR products were then mixed to serve as the template for a third PCR (EM194-EM195, oligonucleotides in the pFRΔ sequence). The resulting PCR product was then digested by *BamHI* and *EcoRI* and ligated into *EcoRI/BamHI*-digested pFRΔ (for transcriptional fusions).

The transcriptional and the translational fusions were delivered in a single copy into the bacterial chromosome of different strains, EM1455 (*Δara714 leu+* *ΔryhB::cat*) or JF133 (*rne131 zce-726::Tn10 ΔryhB::cat*) at the  $\lambda$  *att* site as described previously (Simons, 1987). Stable lysogens were screened for single insertion of recombinant  $\lambda$  by PCR (Powell et al. 1994).

*E. coli* strains KP604 [BL21 (DE3) pLysS/pET21b-*rne*-FLAG] was used for purification of RNase E-FLAG degradosomes. The plasmid pET21b-*rne*-FLAG was constructed by PCR amplification of GM402 (harboring pGM102 with the complete *rne* gene; a gift from George Mackie) with primers EM476 and EM478, and then digested with *NdeI-XhoI*. The resulting fragment containing the *rne* gene was then inserted into pET21b digested with *NdeI-XhoI*.

**Purification of RNase E-FLAG degradosomes.** RNase E-FLAG degradosomes were prepared as described previously (Regonesi et al. 2006), with some modifications. *E. coli* KP604 [BL21 (DE3) pLysS/pET21b-*rne*-Flag] culture was grown in 500 ml of LB broth with ampicillin (50  $\mu$ g/ml) and chloramphenicol (30  $\mu$ g/ml) at 30°C until it reached an

OD<sub>600</sub> value of 0.5-0.6. Expression of RNase E-Flag was induced with 1mM IPTG for 3 h at 30°C.

**RNA extraction and Northern blot analysis.** Cells were grown at 37°C on Luria-Bertani (LB) medium and total RNA was extracted using hot phenol procedure (Aiba, Adhya & de Crombrughe 1981). Arabinose (0.1%) was added when indicated. Half-life determination of RNA was performed by addition of 250 µg/ml rifampicin. After total RNA extraction, 5 µg of total RNA were loaded on a polyacrylamide gel (5-10% acrylamide 29:1, 8M urea) and 20-30 µg were loaded on an agarose gel (1 %, MOPS 1x). After migration, the RNA was transferred to a Hybond-XL membrane (Amersham Biosciences) or a Biodyne B membrane (Pall) and crosslinked by UV (1200 J). The membrane was prehybridized with 50% formamide, 5X SSC, 5X Denhardt's reagent, 1% SDS and 100 µg/ml sheared salmon sperm DNA for 4h at 60°C. Then, the radiolabelled RNA probe was added directly in the prehybridization buffer with the membrane and incubated 16 h at 60°C. Before exposure to a phosphor screen, the membrane was washed three times with 1X SSC/0.1 % SDS and once with 0.1X SSC/0.1 % SDS. The phosphor screen was analyzed on a Storm 860 (Molecular Dynamics) or on a Typhoon Trio (GE Healthcare) and quantification was performed using the ImageQuant software (Molecular Dynamics).

**Internally radiolabelled RNAs generated by *in vitro* RNA synthesis.** The radiolabelled probes used for Northern blot analysis were transcribed with a purified T7 RNA polymerase from a PCR product to generate the antisense transcript of the gene of interest. Transcription was performed in T7 transcription buffer (80 mM HEPES-KOH pH 7.5, 24 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM DTT, 2 mM spermidine), 400 µM NTPs (A, C and G), 10 µM UTP, 3 µl of α-<sup>32</sup>P-UTP (3000 Ci/mmol), 20 units RNase OUT (Invitrogen), 5 µg T7 RNA polymerase and 1 µg DNA template. After 4 h of incubation at 37°C, the mixture was treated with 2 units of Turbo DNase (Ambion) and extracted once with phenol-chloroform.

Non-incorporated nucleotides were removed with a G-50 Sephadex column. The primers used for generating DNA templates for *in vitro* RNA synthesis were EM470-EM471 (*lacZ*), EM188-EM189 (*sodB*), EM190-EM191 (*ryhB*), and EM293-EM294 (16S rRNA).

**RNAs generated by *in vitro* RNA synthesis.** Unlabelled RNAs were transcribed *in vitro* with purified T7 RNA polymerase from a PCR product. Transcription was performed in T7 transcription buffer (80 mM HEPES-KOH pH 7.5, 24 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM DTT, 2 mM spermidine), 500 μM NTPs (A, C, G and U), 40 units RNase OUT (Invitrogen), 2 units inorganic pyrophosphatase (Roche), 10 μg T7 RNA polymerase and 2 μg DNA template. After 4 h of incubation at 37°C, the mixture was treated with 2 units of Turbo DNase (Ambion), and the RNA was extracted once with phenol-chloroform and precipitated with isopropanol. The RNA products were purified from a denaturing 6 % polyacrylamide, 8 M urea gel and precipitated before use. The primers used for generating DNA templates for *in vitro* RNA synthesis were EM90-EM528 (*sodB*<sub>458</sub>) then digested with *Bam*HI. To produce *sodB*<sub>458GCC</sub>, two independent PCR reactions were performed using the *sodB*<sub>458</sub> DNA as template with the following oligonucleotides EM630-EM528 and EM90-EM631. The two PCR products were then mixed to serve as the template for a third PCR (EM90-EM528). The resulting PCR product was then digested by *Bam*HI.

**3'-end labelling of RNA.** For the 3' end-labelling of RNA with pCp, we transcribed with T7 RNA polymerase from a PCR product as described above. Then, 60 pmol of *in vitro*-transcribed RNA was mixed with 10 % DMSO, 20 units of RNase OUT (Invitrogen), 1 mM ATP (Fermentas), 20 units of T4 RNA Ligase (Fermentas), 1X T4 RNA Ligase buffer (Fermentas), and 4 μl of cytidine 3', 5'-bis(phosphate) (5'-<sup>32</sup>P), 3000 Ci/mmol in a final volume of 40 μl. The mixture was incubated at 37°C for 60 min. The reaction was stopped by addition of 1 volume of loading buffer II (Ambion: 95% formamide, 18 mM EDTA, 0.025% SDS, xylene cyanol, bromophenol blue). The labelled RNA was then purified from a denaturing 6% polyacrylamide, 8 M urea gel and precipitated before use.

**RNA degradosome degradation assay.** To determine the RNase E cleavage sites on a RNA transcript, 5 nM of 3'end-labelled *sodB* and 0.0066  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  of tRNAs were mixed and heated for 2 min at 90°C. Then, the mixture was slowly cooled until it reached 37°C before adding the degradation buffer (13.3 mM Tris-Cl, 0.33 mM DTT, 73.34 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 3.33 mM magnesium acetate, 0.1 mM EDTA, 0.7% glycerol), followed by incubation at 37°C for 40 min. Then, purified RNase E-FLAG Degradosomes (0.5; 0.76; 1.0; and 1.5  $\text{ng}/\mu\text{l}$  final) or RNA degradosome buffer only (5 mM Tris-Cl, 50 % glycerol, 75 mM NaCl) was added, followed by incubation at 37 °C for 30 min. The reaction was stopped with 1 volume phenol and samples were separated on an 8% polyacrylamide, 8 M urea gel.

**Ribonuclease-generated RNA ladder.** Ribonucleases T1 (0.1 U) (Ambion) and TA (0.5 U) (Jena Biosciences) were used respectively for 5 min and 0.5 min at 37°C in the sequence buffer (Ambion). The alkaline ladder was performed in the alkaline buffer (Ambion) for 5 min at 90°C.

**$\beta$ -galactosidase assays.** Kinetic assays for  $\beta$ -galactosidase activity were performed as described previously (Prevost et al. 2007) using a SpectraMax 250 microtitre plate reader (Molecular Devices). Briefly, overnight bacterial culture were incubated at 37°C in LB medium with ampicillin at a final concentration of 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and diluted 1000-fold into 50 ml of fresh LB medium with ampicillin at 37°C. Cultures were grown with agitation to an  $\text{OD}_{600}$  of 0.1 before inducing RyhB expression by adding arabinose to a final concentration of 0.1% (strains carrying pBAD-*ryhB* or the control vector pNM12). Specific  $\beta$ -galactosidase activities (around  $\text{OD}_{600}$  of 0.8 and 1.0) were calculated using formula  $V_{\text{max}}/\text{OD}_{600}$ . The reported results represent data of at least three independent experiments.

## REFERENCES

- Afonyushkin, T., Vecerek, B., Moll, I., Blasi, U. and Kaberdin, V.R. 2005. Both RNase E and RNase III control the stability of *sodB* mRNA upon translational inhibition by the small regulatory RNA RyhB. *Nucleic Acids Res.* 33: 1678-1689.
- Aiba, H., Adhya, S. and de Crombrughe, B. 1981. Evidence for two functional gal promoters in intact *escherichia coli* cells. *J. Biol. Chem.* 256: 11905-11910.
- Belasco, J.G. 2010. All things must pass: Contrasts and commonalities in eukaryotic and bacterial mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 467-478.
- Carpousis, A.J. 2007. The RNA degradosome of *escherichia coli*: An mRNA-degrading machine assembled on RNase E. *Annu. Rev. Microbiol.* 61: 71-87.
- Carpousis, A.J., Luisi, B.F. and McDowall, K.J. 2009. Endonucleolytic initiation of mRNA decay in *escherichia coli*. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 85: 91-135.
- Celesnik, H., Deana, A. and Belasco, J.G. 2007. Initiation of RNA decay in *escherichia coli* by 5' pyrophosphate removal. *Mol. Cell.* 27: 79-90.
- Coburn, G.A. and Mackie, G.A. 1999. Degradation of mRNA in *escherichia coli*: An old problem with some new twists. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 62: 55-108.
- Crawford, D.J., Ito, K., Nakamura, Y. and Tate, W.P. 1999. Indirect regulation of translational termination efficiency at highly expressed genes and recoding sites by the factor recycling function of *escherichia coli* release factor RF3. *EMBO J.* 18: 727-732.
- Deana, A., Celesnik, H. and Belasco, J.G. 2008. The bacterial enzyme RppH triggers messenger RNA degradation by 5' pyrophosphate removal. *Nature.* 451: 355-358.
- Desnoyers, G., Morissette, A., Prevost, K. and Masse, E. 2009. Small RNA-induced differential degradation of the polycistronic mRNA *iscRSUA*. *EMBO J.* 28: 1551-1561.
- Garrey, S.M., Blech, M., Riffell, J.L., Hankins, J.S., Stickney, L.M., Diver, M., Hsu, Y.H., Kunanithy, V. and Mackie, G.A. 2009. Substrate binding and active site residues in RNases E and G: Role of the 5'-sensor. *J. Biol. Chem.* 284: 31843-31850.
- Geissmann, T.A. and Touati, D. 2004. Hfq, a new chaperoning role: Binding to messenger RNA determines access for small RNA regulator. *EMBO J.* 23: 396-405.
- Guillier, M. and Gottesman, S. 2008. 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.
- Iost, I. and Dreyfus, M. 1995. The stability of *escherichia coli lacZ* mRNA depends upon the simultaneity of its synthesis and translation. *EMBO J.* 14: 3252-3261.

- Jiang, X. and Belasco, J.G. 2004. Catalytic activation of multimeric RNase E and RNase G by 5'-monophosphorylated RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 9211-9216.
- Kaberdin, V.R. 2003. Probing the substrate specificity of escherichia coli RNase E using a novel oligonucleotide-based assay. *Nucleic Acids Res.* 31: 4710-4716.
- Kawamoto, H., Morita, T., Shimizu, A., Inada, T. and Aiba, H. 2005. Implication of membrane localization of target mRNA in the action of a small RNA: Mechanism of post-transcriptional regulation of glucose transporter in escherichia coli. *Genes Dev.* 19: 328-338.
- Keiler, K.C., Waller, P.R. and Sauer, R.T. 1996. Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. *Science.* 271: 990-993.
- Kido, M., Yamanaka, K., Mitani, T., Niki, H., Ogura, T. and Hiraga, S. 1996. RNase E polypeptides lacking a carboxyl-terminal half suppress a mukB mutation in escherichia coli. *J. Bacteriol.* 178: 3917-3925.
- Kushner, S.R. 2004. mRNA decay in prokaryotes and eukaryotes: Different approaches to a similar problem. *IUBMB Life.* 56: 585-594.
- Kushner, S.R. 2002. mRNA decay in escherichia coli comes of age. *J. Bacteriol.* 184: 4658-65; discussion 4657.
- Lenz, D.H., Mok, K.C., Lilley, B.N., Kulkarni, R.V., Wingreen, N.S. and Bassler, B.L. 2004. The small RNA chaperone hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in vibrio harveyi and vibrio cholerae. *Cell.* 118: 69-82.
- Liou, G.G., Chang, H.Y., Lin, C.S. and Lin-Chao, S. 2002. DEAD box RhlB RNA helicase physically associates with exoribonuclease PNPase to degrade double-stranded RNA independent of the degradosome-assembling region of RNase E. *J. Biol. Chem.* 277: 41157-41162.
- Mackie, G.A. 2000. Stabilization of circular rpsT mRNA demonstrates the 5'-end dependence of RNase E action in vivo. *J. Biol. Chem.* 275: 25069-25072.
- Mackie, G.A. 1998. Ribonuclease E is a 5'-end-dependent endonuclease. *Nature.* 395: 720-723.
- Mackie, G.A. and Genereaux, J.L. 1993. The role of RNA structure in determining RNase E-dependent cleavage sites in the mRNA for ribosomal protein S20 in vitro. *J. Mol. Biol.* 234: 998-1012.
- Masse, E., Escorcía, F.E. and Gottesman, S. 2003. Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in escherichia coli. *Genes Dev.* 17: 2374-2383.



- Masse, E. and 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.
- Masse, E., Majdalani, N. and Gottesman, S. 2003. Regulatory roles for small RNAs in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 120-124.
- Masse, E., Vanderpool, C.K. and Gottesman, S. 2005. Effect of RyhB small RNA on global iron use in escherichia coli. *J. Bacteriol.* 187: 6962-6971.
- McDowall, K.J., Kaberdin, V.R., Wu, S.W., Cohen, S.N. and Lin-Chao, S. 1995. Site-specific RNase E cleavage of oligonucleotides and inhibition by stem-loops. *Nature.* 374: 287-290.
- Morita, T., Maki, K. and Aiba, H. 2005. RNase E-based ribonucleoprotein complexes: Mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. *Genes Dev.* 19: 2176-2186.
- Morita, T., Mochizuki, Y. and Aiba, H. 2006. Translational repression is sufficient for gene silencing by bacterial small noncoding RNAs in the absence of mRNA destruction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 4858-4863.
- Papenfort, K., Pfeiffer, V., Mika, F., Lucchini, S., Hinton, J.C. and Vogel, J. 2006. Sigma(E)-dependent small RNAs of salmonella respond to membrane stress by accelerating global omp mRNA decay. *Mol. Microbiol.* 62: 1674-1688.
- Pfeiffer, V., Papenfort, K., Lucchini, S., Hinton, J.C. and Vogel, J. 2009. Coding sequence targeting by MicC RNA reveals bacterial mRNA silencing downstream of translational initiation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16: 840-846.
- Poole, E.S., Brown, C.M. and Tate, W.P. 1995. The identity of the base following the stop codon determines the efficiency of in vivo translational termination in escherichia coli. *EMBO J.* 14: 151-158.
- Powell, B.S., Rivas, M.P., Court, D.L., Nakamura, Y. and Turnbough, C.L., Jr 1994. Rapid confirmation of single copy lambda prophage integration by PCR. *Nucleic Acids Res.* 22: 5765-5766.
- Prevost, K., Salvail, H., Desnoyers, G., Jacques, J.F., Phaneuf, E. and Masse, E. 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: 1260-1273.
- Py, B., Higgins, C.F., Krisch, H.M. and Carpousis, A.J. 1996. A DEAD-box RNA helicase in the escherichia coli RNA degradosome. *Nature.* 381: 169-172.
- Rasmussen, A.A., Eriksen, M., Gilany, K., Udesen, C., Franch, T., Petersen, C. and Valentin-Hansen, P. 2005. Regulation of ompA mRNA stability: The role of a small regulatory RNA in growth phase-dependent control. *Mol. Microbiol.* 58: 1421-1429.

Regonesi, M.E., Del Favero, M., Basilico, F., Briani, F., Benazzi, L., Tortora, P., Mauri, P. and Deho, G. 2006. Analysis of the escherichia coli RNA degradosome composition by a proteomic approach. *Biochimie*. 88: 151-161.

Repoila, F. and Gottesman, S. 2001. Signal transduction cascade for regulation of RpoS: Temperature regulation of DsrA. *J. Bacteriol.* 183: 4012-4023.

Simons, R.W., Houman, F. and Kleckner, N. 1987. Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene*. 53: 85-96.

Udekwu, K.I., Darfeuille, F., Vogel, J., Reimegard, J., Holmqvist, E. and Wagner, E.G. 2005. Hfq-dependent regulation of OmpA synthesis is mediated by an antisense RNA. *Genes Dev.* 19: 2355-2366.

Vanzo, N.F., Li, Y.S., Py, B., Blum, E., Higgins, C.F., Raynal, L.C., Krisch, H.M. and Carpousis, A.J. 1998. Ribonuclease E organizes the protein interactions in the escherichia coli RNA degradosome. *Genes Dev.* 12: 2770-2781.

## Supporting Online Materials for

### **Small RNA-induced mRNA degradation achieved through both translation block and activated cleavage**

Karine Prévost, Guillaume Desnoyers, Jean-François Jacques, François Lavoie, and Eric Massé\*

\*To whom correspondence should be addressed. E-mail : [eric.masse@usherbrooke.ca](mailto:eric.masse@usherbrooke.ca)

#### **This file includes**

Supplementary Materials and Methods

Supplementary Table S1 and S2

Supplementary References

## SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

**5'-end labelling of RNA.** For the 5'-end labelling of RNA, the transcripts were dephosphorylated with calf intestine phosphatase (New England Biolabs) and 5' labelled with  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP using T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs) according to the manufacturer's protocol.

**Enzymatic and chemical probing of sRNA-mRNA interaction.** Enzymatic and chemical probing experiments were performed as described earlier (Desnoyers et al. 2009). Briefly, 50 pmoles of *fumA*<sub>399</sub> mRNA (transcribed from a PCR product - oligonucleotides EM127-EM559 digested with *Bam*HI) or *sodB*<sub>458</sub> mRNA (transcribed from a PCR product - oligonucleotides EM90-EM528 digested with *Bam*HI) were 5'-end labelled (as describe above) or 3'-end labelled (as described in Materials and Methods). Then, 0.1  $\mu\text{M}$  of (5'- or 3'-end) radiolabelled *fumA*<sub>399</sub> or *sodB*<sub>458</sub> RNA was incubated at 37 °C for 15 min in the absence or in the presence of 1.6  $\mu\text{M}$  of RyhB RNA (transcribed from a PCR product – oligonucleotides EM88-EM89) and 1.6  $\mu\text{M}$  of Hfq protein. Then, RNase T1 (0.05U, from Ambion), or RNase TA (0.025U, from Jena Bioscience), or PbAc (10 mM, from Sigma-Aldrich) were added to the reaction and the incubation continued for 2 minutes. Reactions were stopped by adding 10  $\mu\text{l}$  of loading buffer II (Ambion). Samples were then separated on an 8% polyacrylamide/8 M Urea gel.

**Determination of RNA degradosome cleavages with primer extension assay.** Primer extension was performed to determine the cleavage site on *sodB*<sub>458</sub> mRNA by the RNA degradosome. Degradation of *sodB*<sub>458</sub> RNA was made as described in the Materials and Methods with RNA Degradosomes at a final concentration of 1.0 ng/ $\mu\text{l}$ . The *sodB*<sub>458</sub> RNA was then precipitated by ethanol followed by phenol extraction and was then resuspended in 10  $\mu\text{l}$  water. The 10  $\mu\text{l}$  of *sodB*<sub>458</sub> was mixed with 1  $\mu\text{l}$  of the  $^{32}\text{P}$ -radiolabelled EM1307 oligonucleotide. Then, reverse transcription was performed with 50 units of SuperScript II (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. The reaction was stopped with the Toeprint Stop solution (50 mM Tris-Cl, 0.1% SDS, 10 mM EDTA). After a phenol-chloroform, the supernatant was treated with 150 mM KOH at 90°C for 5 min. Samples

were then ethanol precipitated and subsequently dissolved in water and loading buffer II (Ambion). Then, the samples were separated on an 8% polyacrylamide, 8 M Urea gel.

**RNA degradosome assay in the presence of an oligonucleotide.** Prior to the degradation, 5 nM of 3'-end radiolabelled *sodB*<sub>458</sub> were either incubated without oligonucleotide, with oligonucleotide EM1146 (0; 5; 50; 125; 250; 375; 500; 1000 nM), or EM758 (500 nM) at 37°C for 30 min. Degradation of the complex *sodB*<sub>458</sub> RNA and oligonucleotide was performed as described in the Materials and Methods with RNA Degradosomes at a final concentration of 0.5 ng/μl. For RNase H degradation, 1 unit was used to treat *sodB*<sub>458</sub> RNA with oligonucleotides at 37°C for 15 min. Reactions were stopped by adding EDTA (0.03 M), then followed by a phenol-chloroform extraction and then mixed with the loading buffer II (Ambion). Samples were separated on an 8 % polyacrylamide, 8 M Urea gel.

Table S1 Strains and Plasmids

Strain number	Relevant markers	Reference/source
EM1055	MG1655 $\Delta lacZ X174$	(Masse, Gottesman 2002)
EM1238	EM1055 $\Delta rylhB ::cat$	(Masse, Gottesman 2002)
EM1377	EM1055 <i>rne-131 zce-726 ::Tn10</i>	(Masse, Escorcía & Gottesman 2003)
EM1265	EM1055 <i>hfq-1 ::Ω(kan;BclI)</i>	(Masse, Escorcía & Gottesman 2003)
EM1266	EM1055 <i>hfq-2 ::Ω(kan;KpnI)</i>	(Masse, Escorcía & Gottesman 2003)
EM1455	EM1055 $\Delta ara714 leu^+ \Delta rylhB ::cat$	(Desnoyers et al. 2009)
JF133	EM1055 <i>rne-131 zce-726 ::Tn10 ΔryhB ::cat</i>	EM1377 + P1 (EM1238)
GD175	EM1055 $\Delta ara714 leu^+ \Delta rylhB ::cat \Delta iscR ::kan$	(Desnoyers et al. 2009)
KP601	EM1055 $\Delta ara714 leu^+ \Delta rylhB ::cat \lambda sodB_{130}'-lacZ$	EM1455 + $\lambda pFR\Delta-sodB_{130}$
KP651	EM1055 $\Delta ara714 leu^+ \Delta rylhB ::cat \lambda sodB_{289}'-lacZ$	EM1455 + $\lambda pFR\Delta-sodB_{289}$
KP686	EM1055 $\Delta ara714 leu^+ \Delta rylhB ::cat \lambda sodB_{400}'-lacZ$	EM1455 + $\lambda pFR\Delta-sodB_{400}$
KP662	EM1055 $\Delta ara714 leu^+ \Delta rylhB ::cat \lambda sodB_{430}'-lacZ$	EM1455 + $\lambda pFR\Delta-sodB_{430}$
KP664	EM1055 $\Delta ara714 leu^+ \Delta rylhB ::cat \lambda sodB_{458}'-lacZ$	EM1455 + $\lambda pFR\Delta-sodB_{458}$
KP647	EM1055 $\Delta ara714 leu^+ \Delta rylhB ::cat \lambda sodB_{517}'-lacZ$	EM1455 + $\lambda pFR\Delta-sodB_{517}$
KP620	EM1055 $\Delta ara714 leu^+ \Delta rylhB ::cat \lambda sodB_{607}'-lacZ$	EM1455 + $\lambda pFR\Delta-sodB_{607}$
KP955	EM1055 $\Delta ara714 leu^+ \Delta rylhB ::cat \lambda sodB_{130+30}'-lacZ$	EM1455 + $\lambda pFR\Delta-sodB_{130+30}$
FL161	EM1055 $\Delta ara714 leu^+ \Delta rylhB ::cat \lambda sodB_{430UAA30}'-lacZ$	EM1455 + $\lambda pFR\Delta-sodB_{430UAA30}$
KP952	EM1055 $\Delta ara714 leu^+ \Delta rylhB ::cat \lambda sodB_{430GCC}'-lacZ$	EM1455 + $\lambda pFR\Delta-sodB_{430GCC}$
FL175	EM1055 $\Delta ara714 leu^+ \Delta rylhB ::cat \lambda sodB_{430UAA30GCC}'-lacZ$	EM1455 + $\lambda pFR\Delta-sodB_{430UAA30GCC}$
KP1060	EM1055 $\Delta ara714 leu^+ \Delta rylhB ::cat \lambda sodB_{430UAA30frameshift}'-lacZ$	EM1455 + $\lambda pFR\Delta-sodB_{430UAA30frameshift}$
KP931	EM1055 $\Delta ara714 leu^+ \Delta rylhB ::cat \lambda sodB_{130}'-lacZ$	EM1455 + $\lambda pRS1551-sodB_{130}$
KP652	EM1055 $\Delta ara714 leu^+ \Delta rylhB ::cat \lambda sodB_{289}'-lacZ$	EM1455 + $\lambda pRS1551-sodB_{289}$
KP687	EM1055 $\Delta ara714 leu^+ \Delta rylhB ::cat \lambda sodB_{400}'-lacZ$	EM1455 + $\lambda pRS1551-sodB_{400}$
KP663	EM1055 $\Delta ara714 leu^+ \Delta rylhB ::cat \lambda sodB_{430}'-lacZ$	EM1455 + $\lambda pRS1551-sodB_{430}$
KP665	EM1055 $\Delta ara714 leu^+ \Delta rylhB ::cat \lambda sodB_{458}'-lacZ$	EM1455 + $\lambda pRS1551-sodB_{458}$
KP648	EM1055 $\Delta ara714 leu^+ \Delta rylhB ::cat \lambda sodB_{517}'-lacZ$	EM1455 + $\lambda pRS1551-sodB_{517}$
KP621	EM1055 $\Delta ara714 leu^+ \Delta rylhB ::cat \lambda sodB_{607}'-lacZ$	EM1455 + $\lambda pRS1551-sodB_{607}$
KP929	EM1055 <i>rne-131 zce-726 ::Tn10 ΔryhB ::cat λsodB<sub>430</sub>'-lacZ</i>	JF133 + $\lambda KP662(\lambda sodB_{430}'-lacZ)$
KP930	EM1055 <i>rne-131 zce-726 ::Tn10 ΔryhB ::cat λsodB<sub>430</sub>'-lacZ</i>	JF133 + $\lambda KP663(\lambda sodB_{430}'-lacZ)$
KP925A	EM1055 $\Delta ara714 leu^+ \Delta rylhB ::cat hfq-1 ::Ω(kan;BclI) \lambda sodB_{430}'-lacZ$	KP662 + P1 (EM1265)
KP926	EM1055 $\Delta ara714 leu^+ \Delta rylhB ::cat hfq-2 ::Ω(kan;KpnI) \lambda sodB_{430}'-lacZ$	KP662 + P1 (EM1266)
KP927A	EM1055 $\Delta ara714 leu^+ \Delta rylhB ::cat hfq-1 ::Ω(kan;BclI)$	KP663 + P1 (EM1265)

	$\lambda$ sodB <sub>430</sub> '-lacZ	
KP928	EM1055 $\Delta$ ara714 leu <sup>-</sup> $\Delta$ ryhB ::cat hfq-2 :: $\Omega$ (kan;KpnI) $\lambda$ sodB <sub>430</sub> '-lacZ	KP663 + P1 (EM1266)
KP712	EM1055 $\Delta$ ara714 leu <sup>-</sup> $\Delta$ ryhB ::cat $\lambda$ fumA <sub>126</sub> '-lacZ	EM1455 + $\lambda$ pFR $\Delta$ -fumA <sub>126</sub>
KP801	EM1055 $\Delta$ ara714 leu <sup>-</sup> $\Delta$ ryhB ::cat $\lambda$ fumA <sub>301</sub> '-lacZ	EM1455 + $\lambda$ pFR $\Delta$ -fumA <sub>301</sub>
KP799	EM1055 $\Delta$ ara714 leu <sup>-</sup> $\Delta$ ryhB ::cat $\lambda$ fumA <sub>399</sub> '-lacZ	EM1455 + $\lambda$ pFR $\Delta$ -fumA <sub>399</sub>
KP797	EM1055 $\Delta$ ara714 leu <sup>+</sup> $\Delta$ ryhB ::cat $\lambda$ fumA <sub>507</sub> '-lacZ	EM1455 + $\lambda$ pFR $\Delta$ -fumA <sub>507</sub>
KP793	EM1055 $\Delta$ ara714 leu <sup>+</sup> $\Delta$ ryhB ::cat $\lambda$ fumA <sub>703</sub> '-lacZ	EM1455 + $\lambda$ pFR $\Delta$ -fumA <sub>703</sub>
KP791	EM1055 $\Delta$ ara714 leu <sup>+</sup> $\Delta$ ryhB ::cat $\lambda$ fumA <sub>801</sub> '-lacZ	EM1455 + $\lambda$ pFR $\Delta$ -fumA <sub>801</sub>
JF272	EM1055 $\Delta$ ara714 leu <sup>+</sup> $\Delta$ ryhB ::cat $\lambda$ fumA <sub>399</sub> UAA30'-lacZ	EM1455 + $\lambda$ pFR $\Delta$ -fumA <sub>399</sub> UAA30
JF252	EM1055 $\Delta$ ara714 leu <sup>+</sup> $\Delta$ ryhB ::cat $\lambda$ fumA <sub>399</sub> GCC'-lacZ	EM1455 + $\lambda$ pFR $\Delta$ -fumA <sub>399</sub> GCC
JF273	EM1055 $\Delta$ ara714 leu <sup>+</sup> $\Delta$ ryhB ::cat $\lambda$ fumA <sub>399</sub> UAA30GCC'-lacZ	EM1455 + $\lambda$ pFR $\Delta$ -fumA <sub>399</sub> UAA30GCC
GD138	EM1055 $\Delta$ ara714 leu <sup>+</sup> $\Delta$ ryhB ::cat $\Delta$ iscR ::kan $\lambda$ iscRS <sub>687</sub> '-lacZ	GD175 + $\lambda$ pFR $\Delta$ -iscRS <sub>687</sub>
GD103	EM1055 $\Delta$ ara714 leu <sup>+</sup> $\Delta$ ryhB ::cat $\Delta$ iscR ::kan $\lambda$ iscRS <sub>1268</sub> '-lacZ	GD175 + $\lambda$ pFR $\Delta$ -iscRS <sub>1268</sub>
<b>Plasmids</b>	<b>Description</b>	<b>Reference/source</b>
pNM12	pBAD24 derivative	(Majdalani et al. 1998)
pBAD-ryhB	pBAD24 + RyhB (arabinose inducible promoter)	(Masse, Escorcia & Gottesman 2003)
pFR $\Delta$	pRS1553 derivative (for transcriptional fusions)	(Repoila, Gottesman 2001)
pRS1551	Plasmid for construction of translational fusions	(Simons, Houman & Kleckner 1987)

**Table S2 Oligonucleotides used in this study**

<b>Oligonucleotide number</b>	<b>Sequence 5'-3'</b>
EM90	TGTAATACGACTCACTATAGGATACGCACAATAAGGCTATTGTAC
EM127	TGTAATACGACTCACTATAGGGCTTTTAACAGGGCAACGGAAC
EM188	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCAGGCAGTTCAGTAGAAAG
EM189	GCTAAAGATGCTCTGGCACCG
EM190	TAATACGACTCACTATAGGGAGACAGCACCCGGCTGGCTAAG
EM191	CGATCAGGAAGACCTCGC
EM194	GCCATAAACTGCCAGGAATTGG
EM195	CGGGCCTCTTCGCTA
EM293	TAATACGACTCACTATAGGGAGACGCTTTACGCCAGTAATTCC
EM294	CTCCTACGGGAGGCAGCAGT
EM359	TCAGCGGATCCCCGAATAACAGCCGTTGC
EM423	CAGTTGAATTCGGCGTGTATGTCGGCAACGG
EM424	GCTAGGGATCCTCGATGGTTTCCGCAGAAATG
EM470	TAATACGACTCACTATAGGGAGACGTCCTCCAACGCAGCACC
EM471	GGTCAATCCGCCGTTTGTTC
EM476	GGAATTCATATGAAAAGAATGTTAATCAACGCAAC
EM478	CCGCTCGAGTTATTTATCGTCATCGTCTTTGTAGTCTCAACAGGTTGCGGACGC
EM511	GCTAGGGATCCAGTTCACCAGCGCCCAAG
EM514	GCTAGGGATCCAGCAGCGGAGTCGCATCG
EM515	GCTAGGGATCCGCTGCATCAGTAAACTGCG
EM516	GCTAGGGATCCAGTAGAAAGTATGGTTCCAG
EM527	GCTAGGGATCCAGGTCCAGCCAGAACCAAG
EM528	GCTAGGGATCCAGTTTGCCATCGCTGTTTTTC
EM533	CAGTTGAATTCCTATTAAGCAAGAATCCTACGG
EM534	GCTAGGGATCCTCAGTATCATCTTTTTTGAGTG
EM555	GCTAGGGATCCACCGTTTTAAGGTTTCGTTTCTG
EM556	GCTAGGGATCCAGGTAATTTTTTCAGTTTCCCCG
EM558	GCTAGGGATCCGAGTAGCGCAGATTATCTTCG
EM559	GCTAGGGATCCGCGGTGCCGGTATCCTGAC
EM560	GCTAGGGATCCTCCGGGTCACGCAGAATGTC
EM587	CAGTTGAATTCCTGTTTCTGCGTGGCG
EM625	GCTAGGGATCCGATCAAAAACCTTTGGTTCTGGC
EM626	GCTAGGGATCCCCAGGTCCAGCCAGA
EM629	GCTAGGGATCCGTGGTTGCGGAGTAGTCGA
EM630	ACTGATGCAGCGATCGCCGCCCGGTTCTGGCTGGACCTGGCTG
EM758	TGAAGCTATCGCCGCATCTT
EM631	CAGCCAGGTCCAGCCAGAACCAGGCGGGCGGCGATCGCTGCATCAGT



EM1028	GCGAACACGTTTAAGTATCTGAATT
EM1029	AATTCAGATACTTAAACGTGTTTCGC
EM1050	CACTACGGCTAACACCATCAGAC
EM1051	GTCTGATGGTGTAGCCGTAGTG
EM1114	GCTGCAATTCCTGCGGCCGCCGCCATCGCGGCGAAAGGCGTTC
EM1115	GAACGCCTTTCGCCGCGATGGGCGGGCGGCCGCAGGAATTGCAGC
EM1146	ACCAGCCAGGTCCAGCCAGA
EM1149	CGCAGTAAACTGATGCAGCG
EM1150	CGCTGCATCAGTTTACTGCG
EM1151	GCTAGGGATCCCAGGTCCAGCCTTAACCAAAG
EM1307	CCAGTTTGCCATCGCTGTTTTTC
EM1411	ATCGAGTATCACTACGGCTAAGCACCATCAGACTTATGT
EM1412	ACATAAGTCTGATGGTGCTTAGCCGTAGTGATACTCGAT

## Supplementary References

Desnoyers, G., Morissette, A., Prevost, K. and Masse, E. 2009. Small RNA-induced differential degradation of the polycistronic mRNA iscRSUA. *EMBO J.* 28: 1551-1561.

Majdalani, N., Cunning, C., Sledjeski, D., Elliott, T. and Gottesman, S. 1998. DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 12462-12467.

Masse, E., Escorcia, F.E. and Gottesman, S. 2003. Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in escherichia coli. *Genes Dev.* 17: 2374-2383.

Masse, E. and 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.

Repoila, F. and Gottesman, S. 2001. Signal transduction cascade for regulation of RpoS: Temperature regulation of DsrA. *J. Bacteriol.* 183: 4012-4023.

Simons, R.W., Houman, F. and Kleckner, N. 1987. Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene.* 53: 85-96.

## CHAPITRE 4

### **Non-canonical repression of translation initiation through small RNA-recruitment of the RNA chaperone Hfq**

**Auteurs de l'article :** Guillaume Desnoyers et Eric Massé

Département de Biochimie, Groupe ARN, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4.

**Statut de l'article :** Publié

Genes & developments, volume 26, pages 726-739, 2012.

**Avant-propos :** J'ai effectué toutes les expériences présentes dans cet article. J'ai aussi écrit l'article en entier, avec quelques modifications mineures apportées par Eric Massé.

## Résumé

Les sRNAs régulent l'expression de leurs cibles d'ARNm principalement de deux manières : (i) inhibition de la traduction et (ii) déstabilisation de l'ARN par le recrutement du dégradosome à ARN. Le modèle canonique de répression de la traduction consiste en une compétition directe du sRNA avec la liaison de la sous-unité 30S du ribosome. Pour ce faire, le sRNA doit s'apparier directement sur le site de liaison des ribosomes.

Dans cette étude, nous démontrons que la traduction du gène *sdhC*, encodant une sous-unité de la succinate déshydrogénase, est sous le contrôle des trois sRNAs Spot42, RyhB et RybB, tous exprimés en réponse à des stress environnementaux différents. De manière intéressante, nous démontrons aussi qu'ils répriment la traduction de *sdhC* par des mécanismes différents. En effet, alors que RyhB et RybB répriment la traduction par le mécanisme canonique décrit ci-haut, Spot42 s'apparie plus de 50 nucléotides en amont du codon d'initiation de la traduction, excluant la possibilité de compétitionner directement avec l'initiation de la traduction. Nos résultats indiquent aussi une différence majeure quant à l'effet qu'ont les trois sRNAs sur la dégradation de l'ARNm *sdhCDAB*. En effet, l'expression de RyhB et RybB entraîne une dégradation rapide de l'ARNm par le recrutement du dégradosome ARN. Cependant, l'expression de Spot42 entraîne plutôt une dégradation passive indépendante du dégradosome ARN.

Nous avons aussi élucidé le mécanisme par lequel Spot42 réprime la traduction de *sdhC*. Mes résultats indiquent que Spot42 recrute la protéine chaperon Hfq dans la RNT 5' de *sdhC* et que c'est cette protéine qui a le rôle de compétitionner avec la liaison de la sous-unité ribosomale 30S. Ce mécanisme constitue une manière auparavant inconnue qu'ont les sRNAs pour réguler l'expression d'ARNm en s'appariant à l'extérieur de la région d'initiation de la traduction.

**Non-canonical repression of translation initiation through small RNA-recruitment of the RNA chaperone Hfq**

Guillaume Desnoyers and Eric Massé\*

University of Sherbrooke, Department of Biochemistry, RNA Group, Sherbrooke, Quebec, Canada, J1H 5N4.

Running head: Translation repression through Hfq recruitment

Keywords : Spot42, Hfq, small RNA, translation initiation, non-canonical sRNA mechanism, translation block

\*Corresponding author : Université de Sherbrooke, Département de Biochimie, 3001 12<sup>e</sup> Avenue Nord, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Tel. 819-346-1110 ext. 15475

Fax. 819-564-5340

E-mail : [eric.masse@usherbrooke.ca](mailto:eric.masse@usherbrooke.ca)

**ABSTRACT**

The RNA chaperone Hfq is mostly known to help small regulatory RNAs (sRNAs) interact with target mRNAs to block initiating ribosomes. In this model whereas the sRNA is directly competing with initiating 30S ribosomal subunits, Hfq only plays an indirect role allowing optimal sRNA-mRNA pairing. Here we report that Hfq is recruited by a sRNA, Spot42, to bind to a precise AU-rich region in the vicinity of the translation-initiation region (TIR) of *sdhC* mRNA and competes directly with 30S ribosomal subunits. We show that the sRNA Spot42 binds *sdhC* too far upstream of the TIR to directly repress translation initiation in vitro and in vivo. Contrary to the canonical model of sRNA regulation, this suggests a new mechanism where Hfq is directly involved in the translational repression of the target mRNA and where the sRNA only acts as a recruitment factor.

## INTRODUCTION

Bacterial *trans*-encoded small RNAs (sRNAs) are a class of regulatory molecules that are widespread in *Enterobacteriaceae* species such as *Escherichia coli* and *Salmonella sp.* sRNAs are usually expressed in response to environmental stresses to maintain cell homeostasis (Waters and Storz. 2009). A common feature among sRNAs is the requirement of the RNA chaperone Hfq for their activity (Vogel and Luisi. 2011). This Sm-like RNA binding protein was first discovered four decades ago as a host factor essential for bacteriophage Q $\beta$  replication (Franze de Fernandez et al. 1968). In the last decade, elucidation of the role of Hfq in sRNA-mediated gene regulation has been an area of increasing interest. In most cases, sRNA-mediated regulation is decreased or abolished in a  $\Delta hfq$  deletion strain (Masse and Gottesman. 2002; Moller et al. 2002a; Valentin-Hansen et al. 2004; Zhang et al. 1998). Although Hfq is not thought to be directly involved in the repression of translation (Maki et al. 2008), it is critical for sRNA stability and has been shown to facilitate the pairing between sRNAs and their target mRNAs (Geissmann and Touati. 2004; Moller et al. 2002a). Hfq is also known to interact with and recruit RNase E to target mRNAs, allowing rapid and stoichiometric degradation of both sRNA and mRNA (Masse et al. 2003; Morita et al. 2005). The role of Hfq is not restricted to sRNA-mediated gene regulation. Indeed, Hfq has been reported to be a translational repressor that competes *in vitro* with initiating 30S ribosomes for accessibility to the ribosome binding site (RBS) on mRNA (Vytvytska et al. 2000). This behavior is explained by Hfq preference to bind to AU-rich regions close to RBS (Franze de Fernandez et al. 1972; Senear and Steitz. 1976), which are known to act as translational enhancers (Hook-Barnard et al. 2007; Zhang and Deutscher. 1992). In addition, Hfq is involved in RNA processing as it regulates polyadenylation-dependent mRNA decay (Hajnsdorf and Regnier. 2000; Mohanty et al. 2004).

One of the best characterized Hfq-associated sRNAs is RyhB, which is expressed under conditions of iron (Fe) starvation (Masse and Gottesman. 2002) and which regulates many mRNAs encoding non-essential Fe-using proteins. This post-transcriptional regulation allows the cell to preserve sufficient intracellular Fe for essential cellular functions (Jacques et al. 2006; Masse et al. 2005; Salvail et al. 2010). One of the first

described targets of RyhB was the polycistronic mRNA *sdhCDAB* (Masse and Gottesman, 2002) that encodes the four subunits of Fe-dependent succinate dehydrogenase of the tricarboxylic acid (TCA) cycle. Although the negative effect of RyhB on *sdhCDAB* mRNA levels is clear, the direct interaction between both RNAs has not yet been demonstrated. Other examples of sRNAs interacting with Hfq include Spot42 (encoded by the *spf* gene), which responds to glucose availability (Moller et al. 2002 b) and which plays an important role in catabolic repression (Beisel, 2011), and RybB, which is expressed following a membrane stress and known to repress several outer membrane proteins (OMPs) (Johansen et al. 2006; Papenfort et al. 2010; Papenfort et al. 2006).

In general, sRNAs target the translation initiation region (TIR) of mRNAs by pairing with the Shine-Dalgarno (SD) sequence and/or the start codon, resulting in a direct competition with initiating 30S ribosomal subunits. Because 30S initiating ribosomes are known to cover the region spanning nucleotide -20 to nucleotide +19 relative to the initiation codon (Beyer et al. 1994; Huttenhofer and Noller. 1994), it is believed that sRNAs must pair within this window to inhibit translation. In recent years, however, many cases of translation-repressing sRNAs binding outside of this canonical region have been reported, involving a different mechanism in each case. For example, IstR-1, a Hfq-independent antisense RNA has been shown to pair to a putative ribosome standby site located roughly 100 nucleotides (nt) upstream of the start codon of the *tisB* mRNA, to repress standby ribosomes (Darfeuille et al. 2007). Another example is GcvB sRNA that targets C/A rich regions in the 5'-untranslated region (UTR) of many mRNAs (Sharma et al. 2007). These C/A-rich regions are thought to act as translation enhancers. More recently, OmrA and OmrB sRNAs have been shown to repress *csgD* mRNA by targeting its 5'-UTR more than 60 nts upstream of the translation initiation codon. In this case, the mechanism is not fully understood but is known to involve a phylogenetically conserved RNA motif in the 5' UTR (Holmqvist et al. 2010). Furthermore, examples of sRNAs targeting the coding region to repress translation or to destabilize mRNA have also been reported (Bouvier et al. 2008; Pfeiffer et al. 2009).

In this study, we addressed the regulation of the *sdhCDAB* mRNA by three sRNAs: Spot42, RyhB, and RybB. We present evidence that each one of the sRNAs paired at



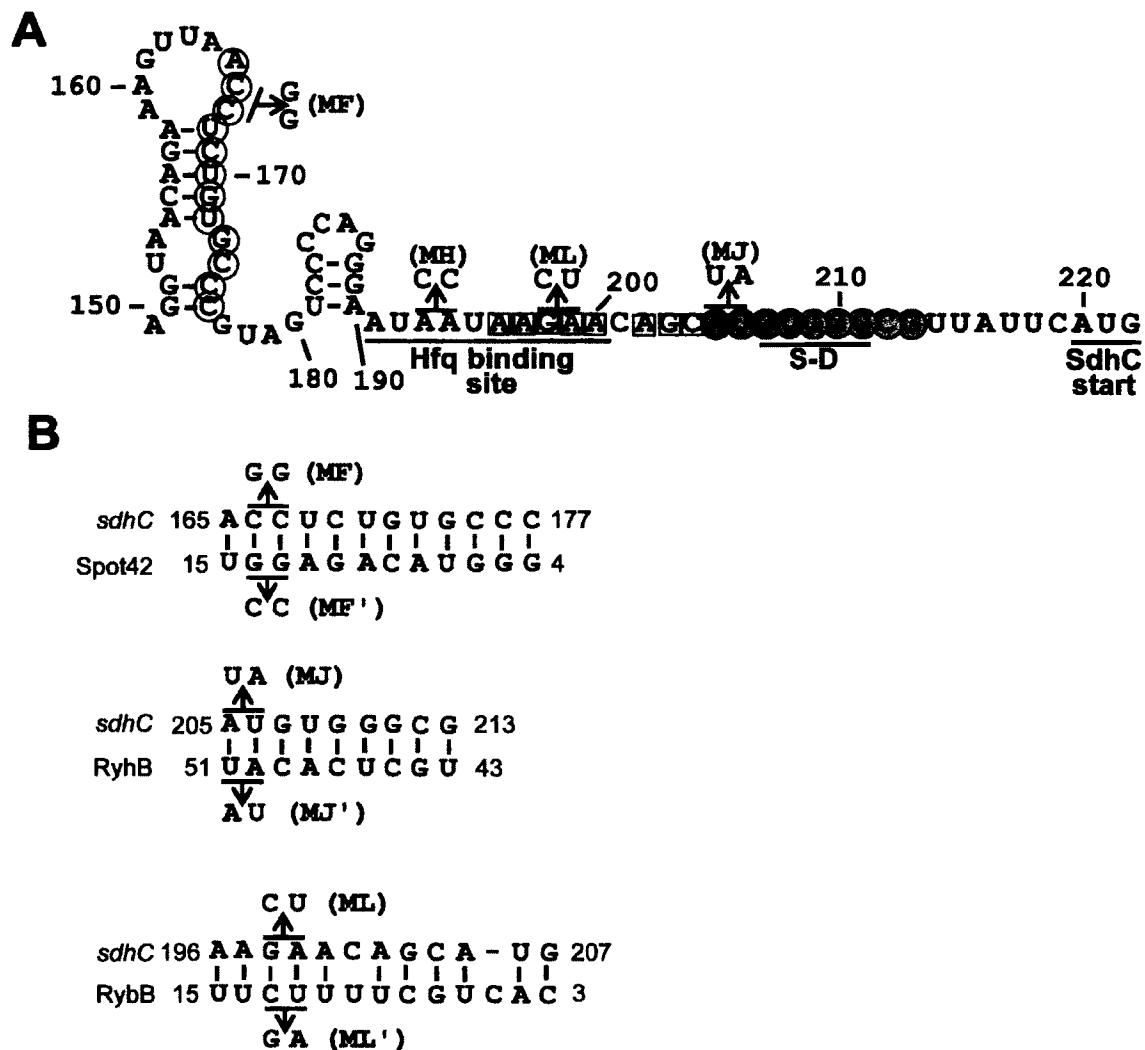
different regions within the 5'-UTR of *sdhC* mRNA to repress the initiation of translation. Whereas both RyhB and RybB paired canonically at the translation initiation region and recruited RNase E to actively degrade *sdhCDAB* mRNA, Spot42 paired far upstream of TIR without promoting the rapid degradation of the mRNA. Surprisingly, affinity purification data clearly showed that Spot42 pairing alone had no observable effect on mRNA *in vivo*, although it bound to *sdhC* in the absence of Hfq. This result combined to additional *in vitro* data suggested that Spot42 acted expressly to recruit Hfq at TIR of *sdhC* mRNA, which inhibits the binding of 30S ribosomal subunits. We propose a novel mechanism where, contrary to the canonical model, the sRNA is not the main effector but rather an intermediary factor for the recruitment of Hfq, which directly modulates translation initiation.

## RESULTS

### Spot42, RyhB and RybB regulate *sdhC* expression post-transcriptionally

We have previously identified *sdhCDAB* mRNA as a target of sRNA RyhB in *E. coli* (Masse and Gottesman. 2002). One of the physiological outcomes of this regulation is the inability of strains overproducing RyhB to grow on a medium containing succinate as the sole carbon source. Notably, the same phenotype was also observed by another group in a bacterial strain overproducing sRNA Spot42 (Rice and Dahlberg. 1982). In addition, a recent genomic study in *Salmonella sp.* has revealed that the expression of RybB sRNA led to a decrease in *sdhCDAB* mRNA level (Papenfort et al. 2006). This result suggested that, in addition to RyhB, sRNAs Spot42 and RybB could also be post-transcriptional regulators of the *sdhCDAB* transcript.

Although RyhB, Spot42, and RybB may regulate *sdhCDAB* mRNA expression, a direct pairing between these sRNAs and *sdhCDAB* mRNA has not yet been reported. Using the bioinformatics tool TargetRNA (Tjaden et al. 2006), we found putative pairing sites for the three sRNAs in the 5'-UTR region of *sdhC* that corresponded to the first cistron of the mRNA. Whereas RyhB and RybB were predicted to pair at the Shine-Dalgarno sequence region, Spot42 was predicted to pair 47 nts upstream of the translational start codon of *sdhC* (Fig 1). Of note, one additional putative RyhB pairing site has also been predicted in the TIR of *sdhD* (Masse and Gottesman. 2002) but was not addressed in the present study.



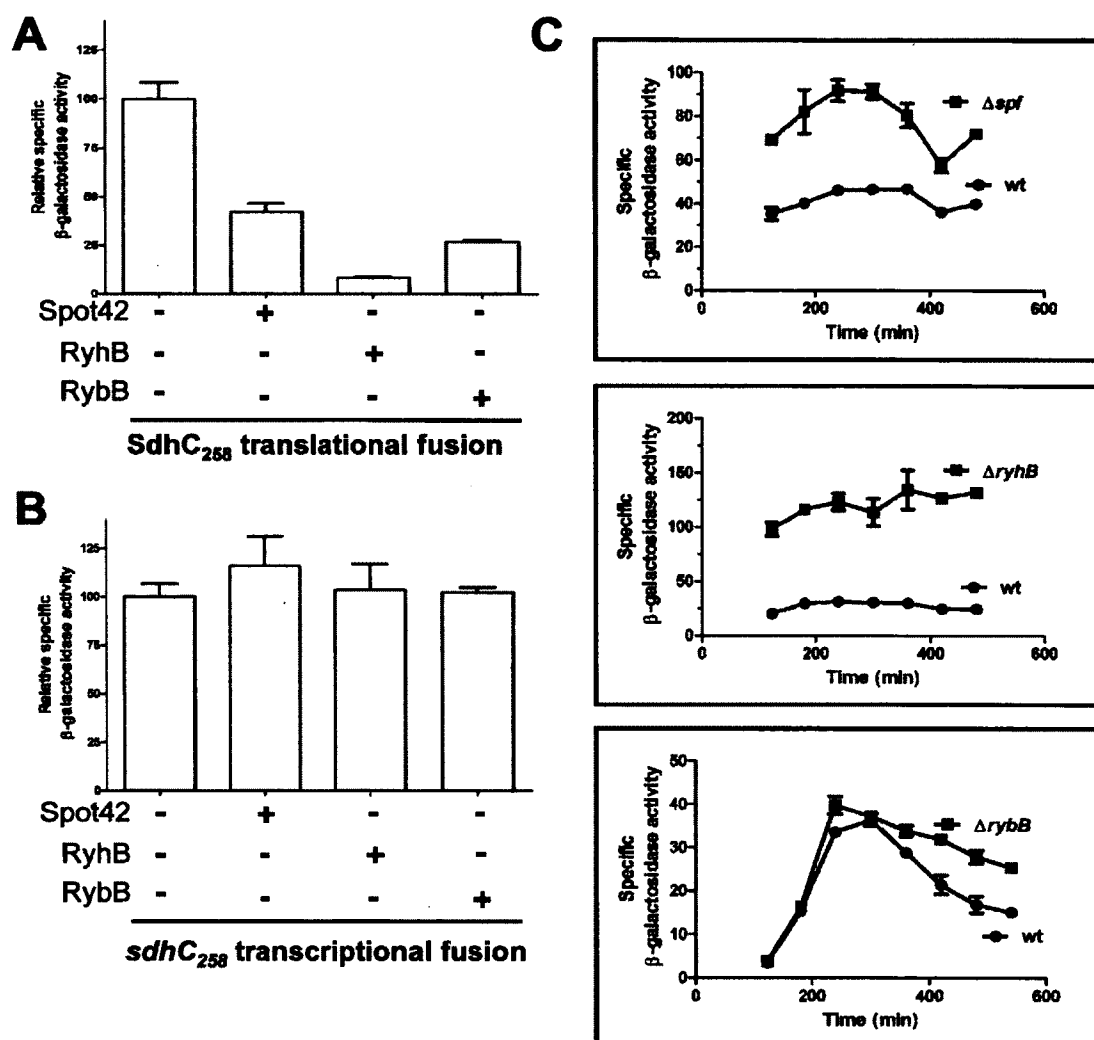
**Figure 1.** Putative pairing sites of Spot42, RyhB and RybB sRNAs on *sdhC* mRNA 5' UTR. (A) Schematic representation of the 5' UTR of *sdhC*. Nucleotides 1-148 are omitted from this representation. The secondary structure represented has been obtained by the mfold software (<http://snowwhite.wellesley.edu/targetRNA/index.html>). Putative pairing sites for Spot42 (○), RyhB (●) and RybB (□), and Hfq binding site are indicated. Hfq binding site mutant (MH) is also indicated. (B) Predicted pairing sites for Spot42, RyhB and RybB on *sdhC* 5' UTR. Pairing of RyhB and RybB sRNAs overlap the TIR of *sdhC* while pairing of Spot42 is situated 48 nt upstream of the start codon. Mutations used in Fig. 4B are also indicated.

To validate the regulation of *sdhC* by RyhB, Spot42 and RybB, we designed a translational reporter construct (termed SdhC<sub>258</sub>-LacZ) harboring the complete 5'-UTR of *sdhCDAB* mRNA (219 nts) and the first 39 nts of *sdhC* ORF fused to the  $\beta$ -galactosidase-

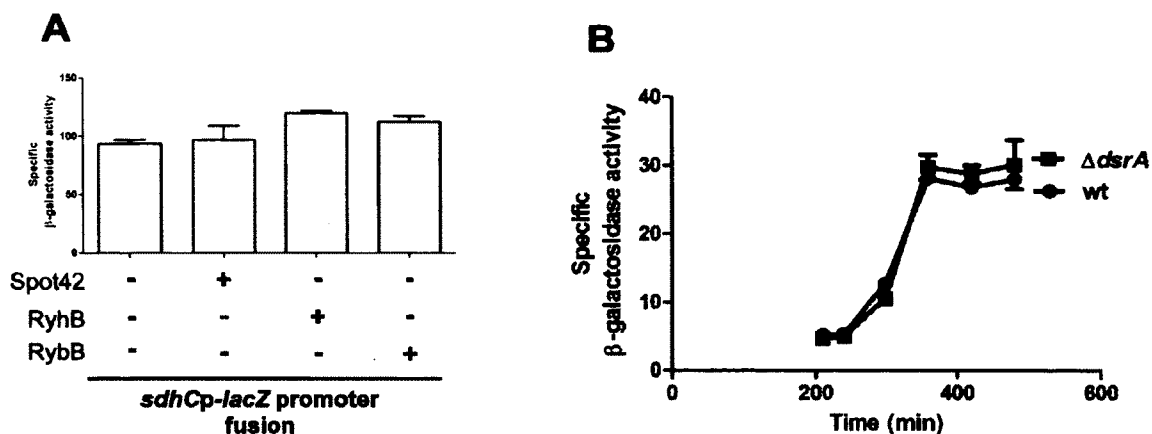
encoding *lacZ* gene (see Material & Methods for details). Strains were constructed carrying the SdhC<sub>258</sub>-LacZ fusion (inserted as a single copy in the chromosome) and harboring plasmids producing each sRNA from an arabinose-inducible promoter (termed pBAD-*spf*, pBAD-*ryhB*, and pBAD-*rybB*). Next, each sRNA was expressed individually and  $\beta$ -galactosidase activity was monitored for two hours following addition of arabinose (Fig 2A). We observed that each sRNA was able to repress SdhC<sub>258</sub>-LacZ fusion expression, thus confirming that each one of the 3 sRNAs was a negative regulator of *sdhC*. We also tested the effect of the 3 sRNAs on a *sdhC* transcriptional fusion (termed *sdhC*<sub>258</sub>-*lacZ*, Fig 2B) in which the  $\beta$ -galactosidase gene harbored its own TIR. In this case, sRNAs expression had no effect on  $\beta$ -galactosidase activity, indicating that the effects observed on SdhC<sub>258</sub>-LacZ translational fusion were due only to translational repression and not to a mRNA destabilization or a transcriptional repression. We have also confirmed that none of the 3 sRNAs had an effect on the *sdhC* promoter (Fig S1A).

We next investigated the effect of the three sRNAs on SdhC<sub>258</sub>-LacZ fusion regulation under physiological conditions. Because Spot42 is expressed in the presence of glucose (Moller et al. 2002 b), we monitored SdhC<sub>258</sub>-LacZ fusion in wild-type (WT) and  $\Delta$ *spf* strains grown in M63-glucose medium. Results showed a two-fold increase in SdhC<sub>258</sub>-LacZ fusion activity in the  $\Delta$ *spf* strain as compared to the wild-type strain (Fig 2C). An experiment was then carried out to study RyhB regulation. Wild-type and  $\Delta$ *ryhB* strains were grown in M63-glucose medium in the absence of Fe, as RyhB is highly expressed under these conditions (Desnoyers et al. 2009). Results showed a 3-fold increase in SdhC<sub>258</sub>-LacZ fusion activity in the  $\Delta$ *ryhB* strain as compared to wild-type (Fig 2C). RybB regulation was investigated with cells in the stationary phase, since RybB is mainly expressed under these conditions (Johansen et al. 2006; Vogel et al. 2003; Wassarman et al. 2001). Wild-type and  $\Delta$ *rybB* strains were grown in LB media and monitored for expression of SdhC<sub>258</sub>-LacZ fusion during the late stationary phase. As expected, the RybB effect (1.8-fold) was observed only at O.D.<sub>600</sub> greater than 2.0 (time > 300 min.). Also, as a control, we looked at the effect of knocking-out the DsrA sRNA, which is not known to regulate *sdhC* expression. Accordingly, we compared wild-type and  $\Delta$ *dsrA* strains grown at 30°C in LB media, a condition in which DsrA is expressed (Sledjeski et al. 1996). As seen in Fig S1B, there is no significant difference in the expression of the SdhC<sub>258</sub>-LacZ fusion between the

two strains. Taken together, these results indicated that RyhB, Spot42 and RybB were all translational repressors of *sdhC* mRNA.



**Figure 2.** Spot42, RyhB and RybB sRNAs post-transcriptionally regulate *sdhC* mRNA.  $\beta$ -galactosidase assays using *sdhC*<sub>258</sub>-lacZ translational (A) and transcriptional fusion (B) were performed. Expression of each sRNA was individually induced at an OD<sub>600</sub> of 0.1 and specific  $\beta$ -galactosidase activity was measured two h later. The empty vector pNM12 was used as a control. (C)  $\beta$ -galactosidase assays using SdhC<sub>258</sub>-LacZ translational fusion under conditions of natural expression of Spot42 (M63 glucose), RyhB (M63 glucose without Fe) and RybB (LB). Wild-type strains are compared to the corresponding sRNA knockout strains.



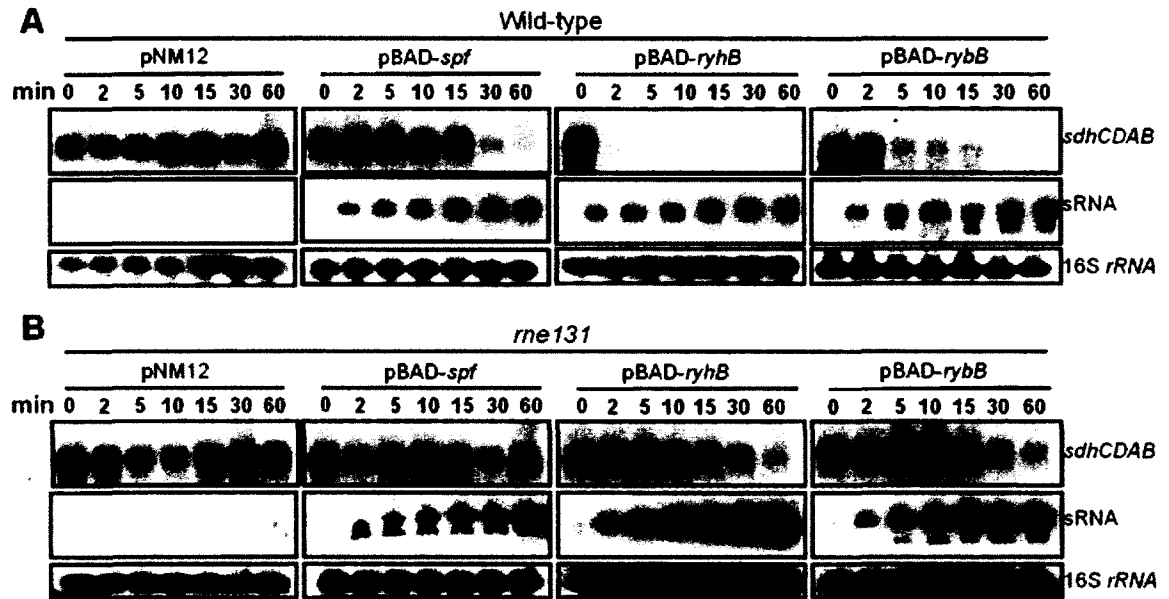
**Figure S1.**  $\beta$ -galactosidase assays with *sdhCp-lacZ* (*sdhC* promoter fused to the  $\beta$ -galactosidase gene) transcriptional fusion showing that Spot42, RyhB and RybB sRNAs have no effect on *sdhC* promoter. The expression of each sRNA was individually induced at an OD<sub>600</sub> of 0.1 and specific  $\beta$ -galactosidase activity was measured two h later. The empty vector pNM12 was used as a control. **(B)**  $\beta$ -galactosidase assays using SdhC<sub>258</sub>-LacZ translational fusion in conditions of natural expression of DsrA (LB, 30°C). The wild-type strain is compared to the DsrA knockout strains.

#### Effects of Spot42, RyhB and RybB on *sdhCDAB* mRNA levels *in vivo*

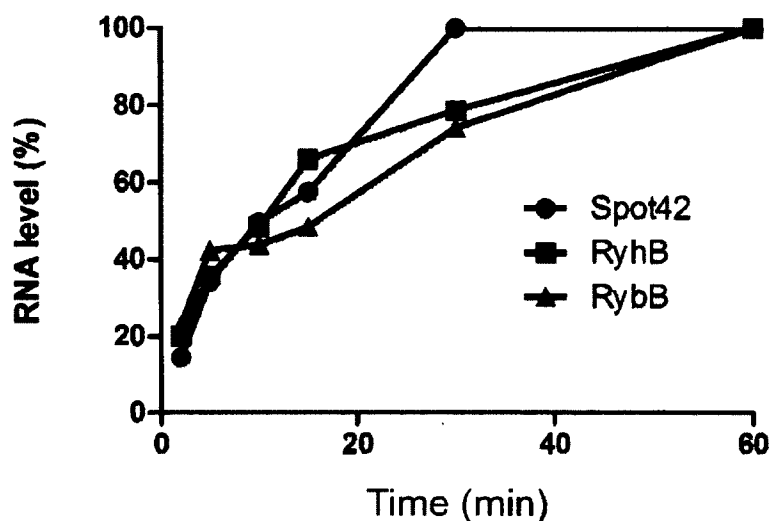
Translational repression by sRNAs is often associated with the recruitment of RNase E and a rapid degradation of the target mRNA (Masse et al. 2003). To determine whether RyhB, Spot42, and RybB promoted the rapid degradation of *sdhCDAB* mRNA, we determined the levels of *sdhCDAB* mRNA in a time-course manner following the expression of the three sRNAs. As shown in Fig 3A, the expression of both RyhB and RybB sRNA led to a very fast (less than 2 min to 5 min) decrease of *sdhCDAB* mRNA levels, suggesting an active degradation of *sdhCDAB*. In marked contrast, the effect of Spot42 on *sdhCDAB* mRNA was only observed 30 min after sRNA expression, suggesting that no RNase was actively recruited to promote mRNA degradation. These differences in degradation kinetics could not be attributed to variation in sRNA induction kinetics (Fig S2), as all three sRNAs were expressed similarly.

To further investigate the potential role of RNase E and RNA degradosome in sRNA-mediated degradation of *sdhCDAB* mRNA, we used a mutant (*rne131*) in which the scaffold region of RNase E required for the assembly of the RNA degradosome was absent (Leroy et al. 2002). This region of RNase E has also been shown to be essential for Hfq-

dependent recruitment of RNase E for sRNA-induced mRNA decay (Ikeda et al. 2011). Results showed an absence of rapid degradation of *sdhCDAB* mRNA following RyhB and RybB expression in the *rne131* mutant (Fig 3B) as compared to wild-type strain (Fig 3A). Remarkably, there was a striking similarity in mRNA turnover of *sdhCDAB* whether Spot42 was expressed in *rne131* or wild-type backgrounds. Taken together, these results reinforced the notion that RNase E was recruited following both RyhB and RybB expression, but not Spot42, to rapidly degrade *sdhCDAB* mRNA.



**Figure 3.** RyhB and RybB, but not Spot42, induce an active degradation of *sdhCDAB* mRNA. Northern blots were performed on total RNA extracted from strain GD372 (A) or GD527 (*rne131* mutant) (B) harboring the indicated plasmids. Cells were grown on LB medium containing ampicillin to an OD<sub>600</sub> of 0.5, at which point arabinose was added at time 0 to induce sRNA expression. Total RNA was extracted at the indicated times. Probes complementary to *sdhC*, Spot42, RyhB, RybB, and 16S rRNA were used. The control plasmid (pNM12) panel was probed with all three sRNAs probes.



**Figure S2.** Densitometry analysis of sRNA expression from Fig 3A. The normalized level of expression is set to be 100% and corresponds to the sRNA level after 60 min of induction.

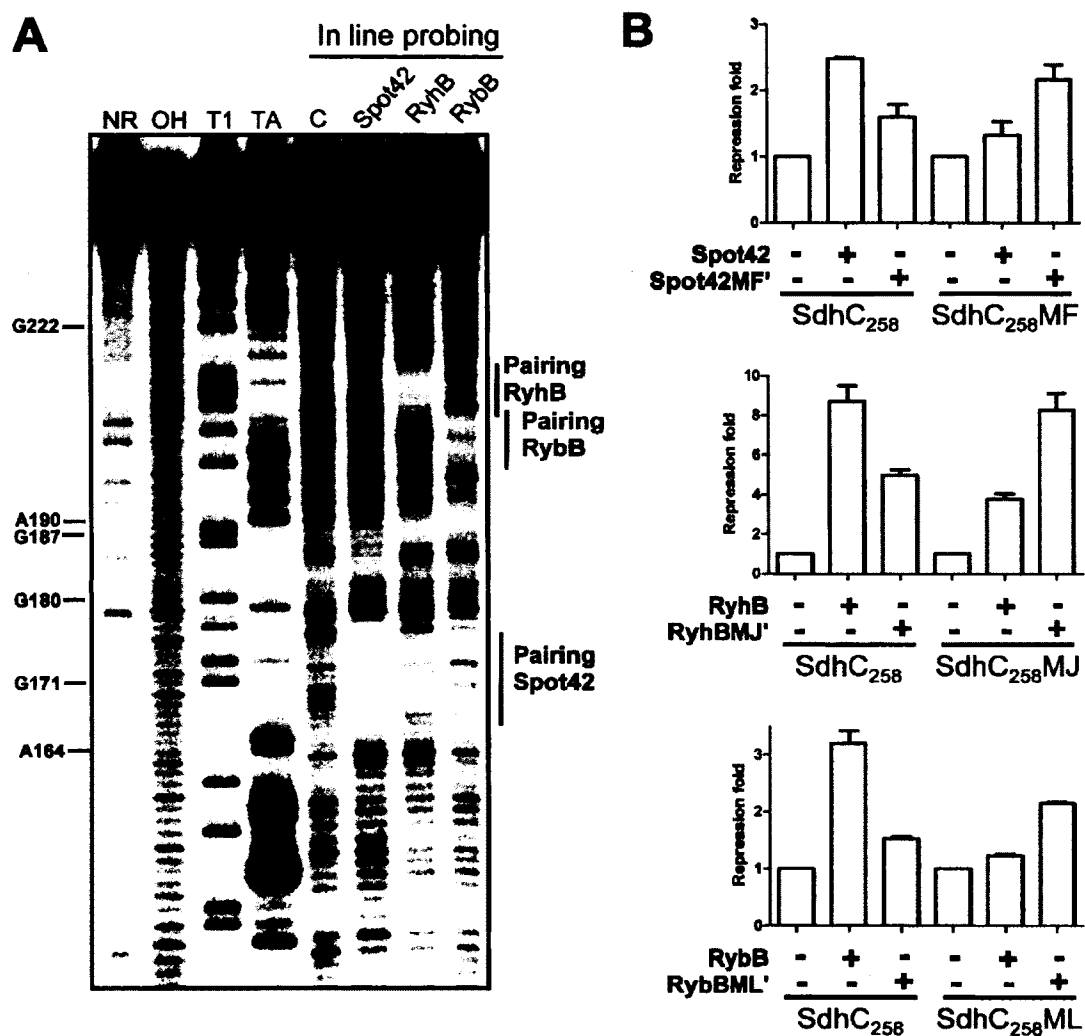
#### **Spot42 pairs with *sdhC* far upstream of the translation initiation region**

We first carried out in-line probing using radiolabeled *sdhC* RNA in presence or absence of Spot42, RyhB, or RybB to verify *in vitro* the putative pairing sites suggested by bioinformatics data (Fig 1). In-line probing exploits the natural ability of unstructured and unpaired nucleotides in RNA molecules to spontaneously cleave in solution (Regulski and Breaker, 2008). Results showed that cleavage in *sdhC* was significantly reduced from nts A165 to C177 in the presence of Spot42 (Fig 4A). A similar observation was made in the presence of RyhB which afforded protection from nts A205 to G213 and, RybB which protected from nts A196 to G208 (Fig 4A). These results were consistent with *in silico* pairing data (Fig 1).

In addition, we performed *in vivo* co-variation mutagenesis using SdhC<sub>258</sub>-LacZ translational fusion as template. The three mutant constructs SdhC<sub>258</sub>MF-LacZ, SdhC<sub>258</sub>MJ-LacZ, and SdhC<sub>258</sub>ML-LacZ (illustrated in Fig 1B) were designed to weaken the pairing with Spot42, RyhB, and RybB, respectively. Each one of these mutations reduced the repression activity of the corresponding sRNA (Fig 4B). We also constructed mutants of



Spot42, RyhB and RybB harboring the compensatory mutations that restored the pairing with mutant constructs SdhC<sub>258</sub>MF, SdhC<sub>258</sub>MJ, and SdhC<sub>258</sub>ML. These mutants, called Spot42MF', RyhBMJ', and RybBML' were all able to fully, or at least significantly, restore wild-type regulation (Fig 4B). Taken together, *in vitro* and *in vivo* data confirmed the *in silico* prediction that both RyhB and RybB bind to the TIR of *sdhC* and that the Spot42 binding site was located far upstream of TIR.



**Figure 4.** Analysis of Spot42, RyhB, and RybB pairing sites on *sdhC* mRNA. (A) In-line probing of the 5'-end labeled *sdhC* mRNA in the presence or absence of Spot42, RyhB, and RybB. The position of several G and A residues, relative to the transcriptional start, are indicated. NR, Non Reacted control; OH, alkaline ladder; T1, RNase T1 ladder; TA, RNase TA ladder. Except for the ladders, all experiments were carried out under native conditions. (B) Wild-type SdhC<sub>258</sub>-LacZ translational fusion is specifically repressed by wild-type Spot42, RyhB, and RybB whereas the mutated versions of the SdhC<sub>258</sub>-LacZ translational

fusion are specifically repressed by the corresponding mutated sRNAs. See Fig 1B for drawing of the mutations used in this panel. Expression of each sRNA (Spot42MF', RyhBMJ', and RybBML') was individually induced by the addition of arabinose at an OD<sub>600</sub> of 0.1 and specific  $\beta$ -galactosidase activity was measured two h later. The empty pNM12 was used as a control.

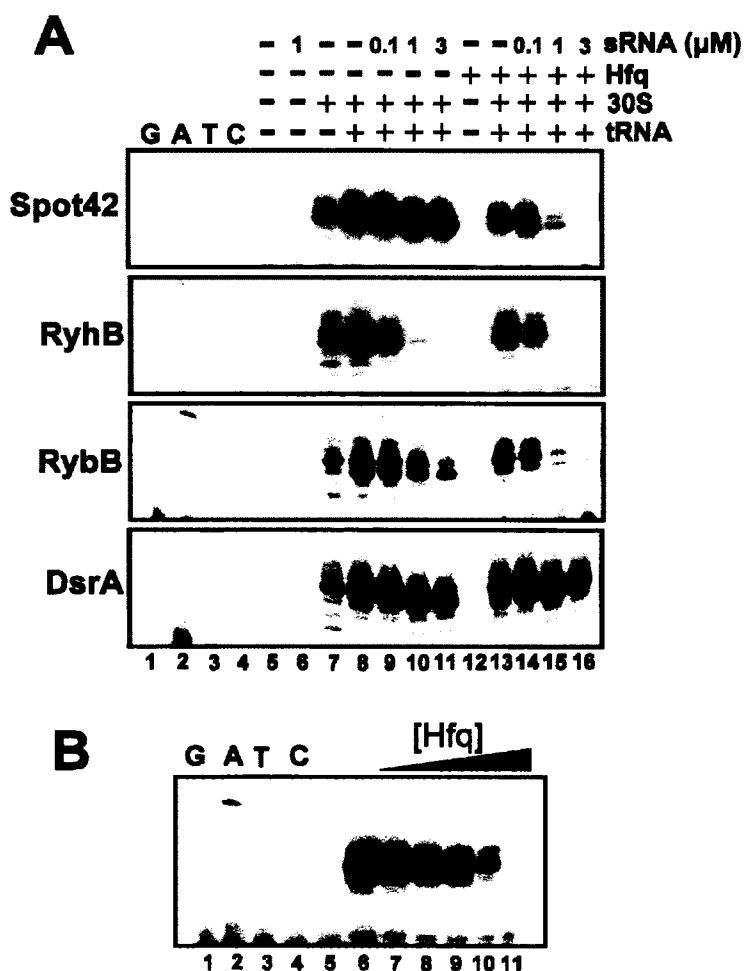
### **Spot42, but not RyhB or RybB, fully depends on Hfq for repression of translation**

Next, we addressed the question whether Spot42, RyhB, and RybB sRNAs were directly inhibiting *sdhC* translation initiation. We used toeprinting assays which detect the formation of the 30S translation initiation complex bound to mRNA. Results in Fig 5A showed that addition of purified 30S ribosomal subunits and initiator tRNA (lane 8) to *sdhC* mRNA created a strong block of reverse transcription 15 nt downstream of the AUG codon. These observations were consistent with the formation of a translation initiation complex on mRNA. When increasing amount of sRNAs Spot42, RyhB, RybB, or DsrA (Majdalani et al. 1998) (used as a negative control) were used, we observed that only RyhB and RybB were able to repress formation of the initiation complex (Fig 5A, lane 11, sRNA:*sdhC* ratio of 15:1). However, the addition of Spot42 or DsrA even at a 15-fold excess over *sdhC* had no effect on the formation of the initiation complex (Fig 5A, lane 11). As a control we confirmed by performing PbAc probing (Fig S3) that at the same concentrations and in the same buffer than the toeprint experiment, Spot42 is able to pair to the *sdhC* RNA *in vitro*. These results suggested that, contrary to RyhB and RybB, Spot42 alone could not repress the initiation of translation of *sdhC*, even if it pairs to the region characterized in Fig 4.

We next examined the effect of Hfq under these experimental conditions. To address this, Hfq and *sdhC* were mixed in a 1:1 ratio and then we monitored the capacity of Spot42, RyhB, RybB, or DsrA to repress the formation of the translation initiation complex. Results showed that the presence of Hfq barely affected the binding of 30S ribosomal subunits (Fig 5A, compare lanes 8 and 13). As expected, the presence of Hfq increased the efficiency of RyhB- and RybB-mediated repression (lanes 13 to 16). Surprisingly, the presence of Hfq allowed Spot42 to significantly repress 30S ribosomal subunits binding starting at a 5-fold excess of Spot42 with respect to *sdhC* (Fig 5A, lane 15). However, DsrA was still unable to repress the formation of the initiation complex in the presence of Hfq. Together, these

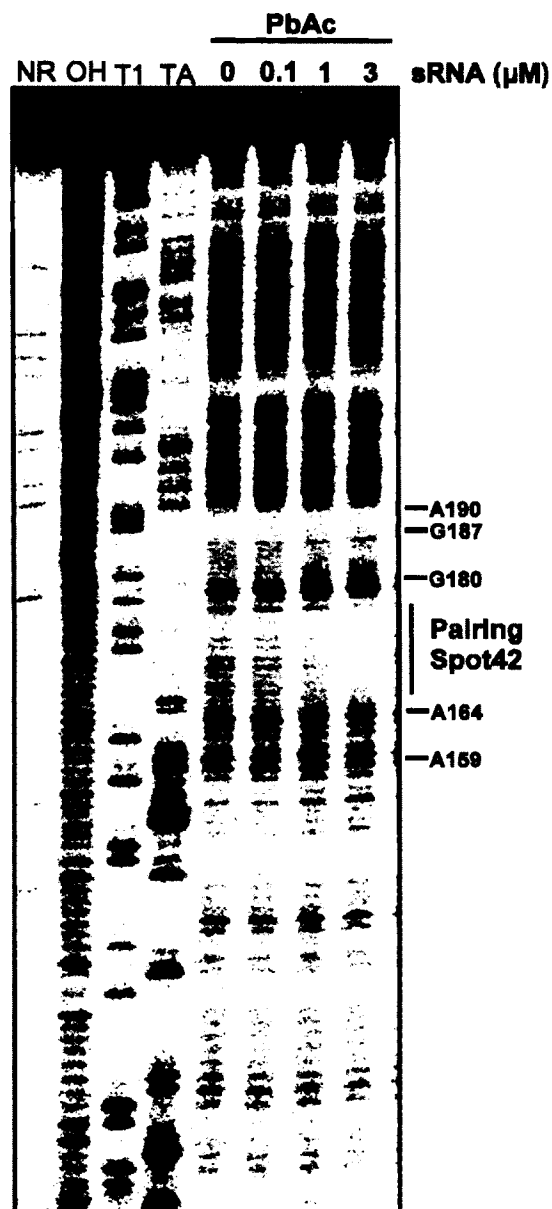
results provided evidence that Spot42 absolutely required Hfq to repress the binding of the 30S ribosomal subunits to *sdhC*.

Next, we tested the effect of Hfq alone on the binding of 30S ribosomal subunits to *sdhC*. As shown in Fig 5B, the addition of increasing amounts of Hfq led to partial inhibition of translation initiation complex at a 2.5-fold excess (lane 10) with respect to *sdhC* mRNA and to a complete inhibition at a 5-fold excess (lane 11). These *in vitro* result suggested that a moderately high molar ratio of Hfq was able to directly repress the binding of 30S ribosomal subunits to *sdhC* mRNA. This finding was in marked contrast to results shown in Fig 5A where even high molar ratio (15-fold) of Spot42 alone could not repress *sdhC*.



**Figure 5.** Repression of the *sdhC* translation initiation complex formation by Spot42, RyhB, RybB and Hfq. (A) Toeprint assay indicating that RyhB and RybB were able to

prevent translation initiation complex formation in absence of Hfq, whereas Spot42 was able to perform repression only in presence of Hfq. The DsrA sRNA was used as a negative control. **(B)** Toeprint assay indicating that Hfq was able to prevent translation initiation complex formation on the *sdhC* mRNA. Increasing amount of Hfq were added (0  $\mu\text{M}$ ; 0.01  $\mu\text{M}$ ; 0.1  $\mu\text{M}$ ; 0.2  $\mu\text{M}$ ; 0.5  $\mu\text{M}$ ; 1.0  $\mu\text{M}$ ). GATC refers to sequencing ladders generated with the same oligonucleotide (EM1262) used for toeprint.



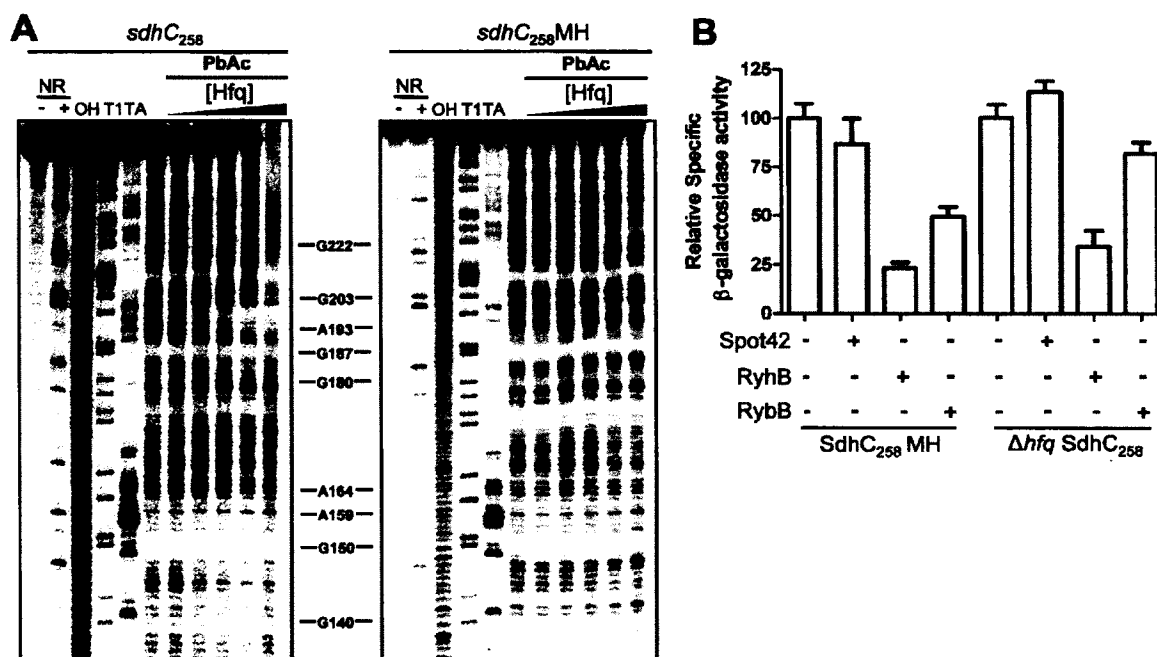
**Figure S3.** Analysis of Spot42 pairing on *sdhC* under toeprinting conditions. PbAc probing of the 5'-end labeled *sdhC* mRNA in the presence of increasing concentration of Spot42. The assay was performed in the toeprinting buffer. NR, Non-Reacted control; OH (NaOH), alkaline ladder; T1, RNase T1 ladder; TA, RNase TA ladder. Except for the ladders, all experiments were carried out under native conditions.

### **A Hfq binding site on the 5'-UTR of *sdhC* is essential for Spot42-induced repression of translation**

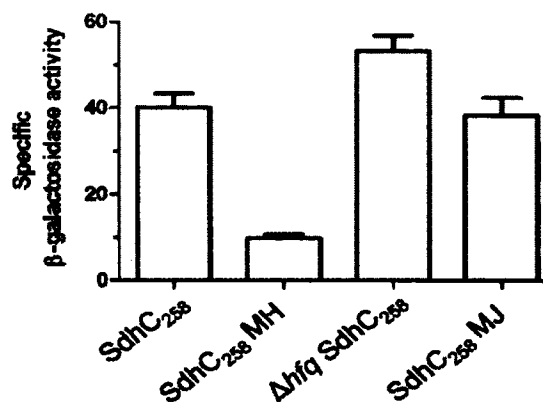
The results reported above indicated that, although Spot42 could bind to *sdhC* (Fig 4A, lane 6), it was not able to affect 30S ribosomal subunits binding to *sdhC* (Fig 5A, lane 11), even at a high molar ratio (15:1). However, when Spot42 was in 5-fold excess compared to *sdhC*, the presence of stoichiometric amount of Hfq (5:1:1) efficiently repressed the binding of 30S ribosomal subunits (Fig 5A, lane 15). These results suggested that Hfq, with the help of Spot42, could bind directly and repress the translation of *sdhC*. If this possibility were true, one should be able to map a binding site of Hfq at, or close to, the TIR of *sdhC* 5'-UTR. A series of experiments were therefore carried out to investigate this possibility. We used *in vitro* chemical (lead acetate, which cleaves single-stranded RNA) footprinting assays using radiolabeled *sdhC* RNA and purified Hfq. Results showed that addition of Hfq at a 1:1 Hfq:*sdhC* ratio clearly protected *sdhC* against cleavage from nucleotides A192-A201 (Fig 6A, left panel). This region is highly AU-rich, consistent with previously described Hfq binding sites (Franze de Fernandez et al. 1972; Senear and Steitz. 1976). It also fits a previously identified A-R-N motif that was shown to be preferentially bound by Hfq (Link et al. 2009). To validate the importance of this AU-rich region for Hfq binding, we designed a *sdhC* mutant that would prevent Hfq binding (termed *sdhCMH*) by replacing two adenine residues (A194-A195) by two cytosine residues (Fig 1A). Results showed that addition of Hfq to *sdhCMH* did not protect RNA from lead acetate cleavages, indicating that Hfq did not efficiently bind to *sdhCMH* (Fig 6A).

We next tested the effect of Hfq binding to *sdhC* *in vivo* by introducing the MH mutation into the SdhC<sub>258</sub>-LacZ translational fusion, thus creating SdhC<sub>258</sub>MH-LacZ fusion. Results showed the basal levels of translation for the SdhC<sub>258</sub>MH-LacZ allele was decreased by a 4-fold factor (Fig S4), suggesting that the AU-rich region recognized by Hfq had an important role in the translation activation of *sdhC*. We also tested the effect of each sRNA on SdhC<sub>258</sub>MH-LacZ translational fusion. Results showed that RyhB and RybB were still able to repress SdhC<sub>258</sub>MH-LacZ fusion expression by a factor of at least 2-fold (Fig 6B). In addition, we found that, even if Spot42 could potentially pair with *sdhC*<sub>258</sub>MH RNA

(Fig S5A), Spot42 had no effect on SdhC<sub>258</sub>MH-LacZ fusion *in vivo*. This observation strongly suggested that the Hfq binding site in the vicinity of *sdhC* TIR was essential for Spot42-mediated repression of translation. We also monitored the effect of all 3 sRNAs on the SdhC<sub>258</sub>-LacZ fusion in a  $\Delta hfq$  background (Fig 6B). In these experiments, RyhB was still able to strongly repress *sdhC* translation whereas RybB had a slight but reproducible negative effect on translation. Spot42 did not repress translation of *sdhC* in the absence of Hfq. Of interest, basal expression levels of SdhC<sub>258</sub>-LacZ fusion in the  $\Delta hfq$  background was slightly higher than wild-type strain (Fig S4), further suggesting that Hfq acted as a translational repressor of *sdhC* mRNA *in vivo*.

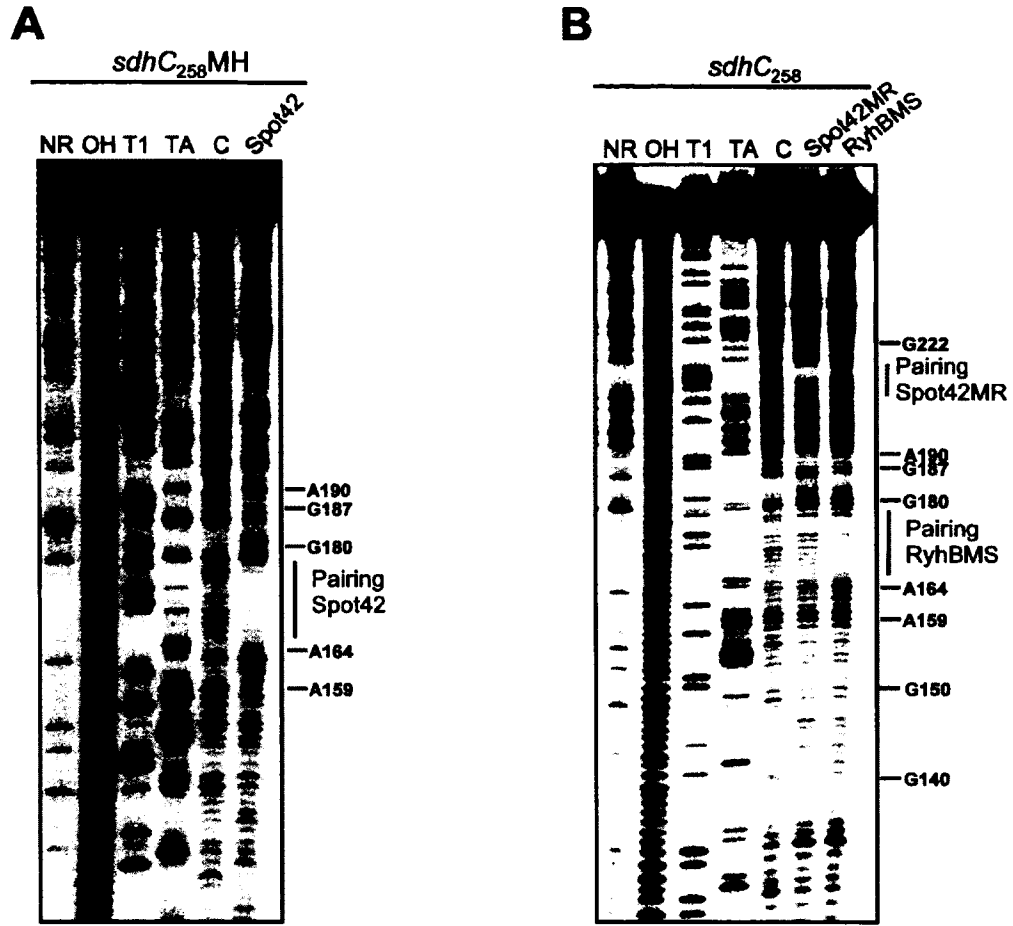


**Figure 6.** Hfq binding to *sdhC* is essential for Spot42-mediated repression. (A) Lead acetate probing of the 5'-end labeled *sdhC* or *sdhCMH* mRNA in presence of increasing amount of Hfq (0  $\mu$ M; 0.01  $\mu$ M; 0.1  $\mu$ M; 0.2  $\mu$ M; 0.5  $\mu$ M; 1.0  $\mu$ M). The *sdhCMH* mutation is pictured in Fig 1A. Non reacted controls were performed in absence (-) or presence (+) of 1  $\mu$ M Hfq. The position of several G and A residues, relative to the transcriptional start, are given. NR, Non Reacted control; OH, alkaline ladder; T1, RNase T1 ladder; TA, RNase TA ladder; PbAc, lead acetate. Except for the ladders, all experiments were carried out under native conditions. (B)  $\beta$ -galactosidase assays with SdhC<sub>258</sub>MH-LacZ or SdhC<sub>258</sub>-LacZ translational fusion in wild-type or  $\Delta hfq$  strains. Expression of each sRNA (pBAD-*spot42*, pBAD-*ryhB* or pBAD-*rybB*) was individually induced by the addition of arabinose at an OD<sub>600</sub> of 0.1 and specific  $\beta$ -galactosidase activity was measured two h later. The empty vector pNM12 was used as a control.

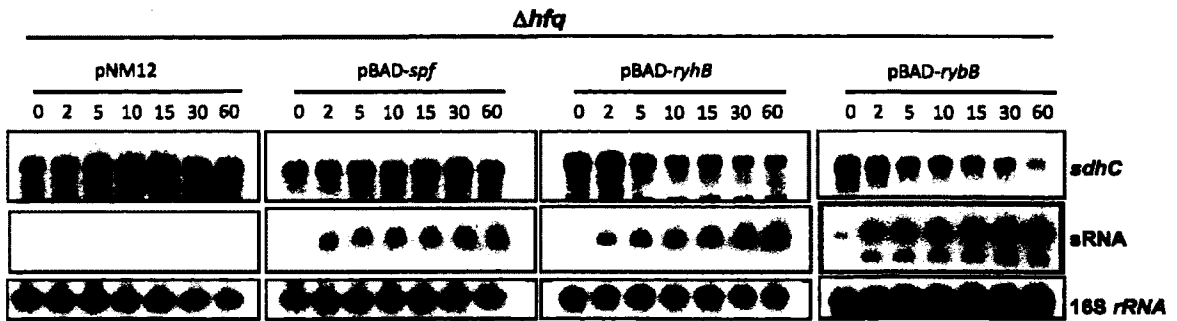


**Figure S4.** Basal expressions of various *sdhC*<sub>258</sub>-*lacZ* fusions in absence of sRNA expression. Strains harboring the indicated  $\beta$ -galactosidase fusions and pNM12 (empty vector) plasmid were grown to an OD<sub>600</sub> of 0.1 and arabinose was added to a final concentration of 0.1%. Specific  $\beta$ -galactosidase activity was measured two hours later. The *sdhCMJ*<sub>258</sub>-*lacZ* fusion was included to show that this mutation does not disturb translation initiation, although it disrupts a putative alternative upstream AUG site (nt 205) in frame with the *sdhC* ORF. These results suggest the putative AUG at nt 205 is not functional.

We next monitored the effect of Spot42, RyhB, and RybB on *sdhCDAB* mRNA in the  $\Delta$ hfq background. Results of Northern blot analysis revealed that RyhB and RybB had a moderate effect on mRNA degradation whereas Spot42 had no effect (Fig S6). Because Hfq is thought to recruit RNase E to a mRNA targeted by a sRNA (Ikeda et al. 2011; Morita et al. 2005), it was expected that each one of the three sRNAs had a reduced effect on mRNA levels in a  $\Delta$ hfq null strain. However, the fact that RyhB and RybB were still able to induce degradation of *sdhCDAB* mRNA whereas Spot42 was not suggested an additional role for Hfq in the context of sRNA Spot42. Taken together, these results suggested that, in contrast to RyhB and RybB, Spot42 was unable to inhibit *sdhC* expression in absence of Hfq protein or the Hfq-binding site (nts 191 to 200) on *sdhC*.



**Figure S5.** Analysis of Spot42, Spot42MR, and RybBMS pairing sites on *sdhC*<sub>258</sub>MH (A) or *sdhC*<sub>258</sub> (B) RNAs. In-line probing of the 5'-end labeled *sdhC*<sub>258</sub>/*sdhC*<sub>258</sub>MH mRNAs in the presence or absence of Spot42, Spot42MR, and RybBMS was performed as indicated in the main text. The position of several G and A residues, relative to the transcriptional start, are given. NR, Non-Reacted control; OH (NaOH), alkaline ladder; T1, RNase T1 ladder; TA, RNase TA ladder. Except for the ladders, all experiments were carried out under native conditions.



**Figure S6.** RyhB and RybB, but not Spot42, induced degradation of *sdhCDAB* mRNA in the absence of Hfq. A Northern blot was performed on total RNA extracted from strain



GD379 ( $\Delta hfq$  mutant) harboring the indicated plasmids. Cells were grown in LB medium containing ampicillin to an  $OD_{600}$  of 0.5, at which point 0.1% of arabinose was added at time 0 to induce sRNA expression. Total RNA was extracted at the indicated times. Probes complementary to *sdhC*, Spot42, RyhB, RyhB, and 16S rRNA were used. The control plasmid (pNM12) panel was probed with all three sRNAs probes.

### Interchanging sRNA pairings sites also interchanges Hfq dependency

Our data suggested that Spot42 binds to the 5'-UTR too far upstream of TIR to compete directly with 30S ribosomal subunits. Therefore, it appeared likely that Spot42 used Hfq as a bridge to compete with initiating ribosomes on *sdhC* TIR. This interpretation suggests that recruitment of Hfq, regardless of the recruiting sRNA, should be sufficient to repress *sdhC*. To test this hypothesis, we interchanged the pairing sites of both Spot42 and RyhB sRNAs with *sdhC*. In this experimental design, the RyhB mutant (RyhBMS) would now pair at the original Spot42 pairing site far upstream of RBS and, Spot42 mutant (Spot42MR) would pair with RBS of *sdhC* (Fig S7). We first confirmed that both mutant sRNAs paired with *sdhC* 5'-UTR (Fig S5B) and then monitored their effects *in vivo* on SdhC<sub>258</sub>-LacZ fusion. Results showed that both Spot42MR and RyhBMS expressed from a pBAD promoter were able to repress SdhC<sub>258</sub>-LacZ activity (Fig 7A). Of significance, Spot42MR repressed translation to similar extent as wild-type RyhB, and RyhBMS repressed as much as wild-type Spot42 (Fig 7A). These data confirmed that direct pairing (by either Spot42MR or RyhB) to TIR was more efficient than binding far upstream (such as RyhBMS and Spot42) to repress translation.

```

Spot42  GTAGGTTACAGAGSTAAAGTGTTCATCTTTTCAGACCTTTTACTTCACGTAATCGGATTTGGCTGAATATTTAGCCGCCCCAGTCAGTAATGACTGGGGCGTTTTTTA
Spot42MR GTAGCCCCACATSCATAAGATGTTCATCTTTTCAGACCTTTTACTTCACGTAATCGGATTTGGCTGAATATTTAGCCGCCCCAGTCAGTAATGACTGGGGCGTTTTTTA

RyhB    GCGAUCAGGAAGACCCUCGCGGAAGAACCUGAAAGCAGCAGACAJUGCUCACAUUGCUUCCAGUAUUACUUAGCCAGCCGGGCGGUCUGGCUUUUUUUUU
RyhBMS  GCGAUCAGGAAGACCCUCGCGGAAGAACCUGAAAGCAGCAGAGGGUACAGAGGUCUCCAGUAUUACUUAGCCAGCCGGGCGGUCUGGCUUUUUUUUU
RyhB-LS4U GCGAUCAGGAAGACCCUCGCGGAAGAACCUGAAAGCAGCAGACAJUGCUCACAUUGCUUCCAGUAUUACUUAGCCAGCCCGGGGUGGGCUGGCUUUU
RyhBMS-LS4U GCGAUCAGGAAGACCCUCGCGGAAGAACCUGAAAGCAGCAGAGGGUACAGAGGUCUCCAGUAUUACUUAGCCAGCCCGGGGUGGGCUGGCUUUU

```

**Figure S7.** Primary sequence of Spot42, Spot42MR, RyhB, RyhBMS, RyhB-LS4U and RyhBMS-LS4U sRNAs. Underlined are the nucleotides different from the wt sRNA.

We next tested the importance of Hfq by analyzing the effect of Spot42MR and RyhBMS on mutant SdhC<sub>258</sub>MH-LacZ fusion and on wild-type SdhC<sub>258</sub>-LacZ fusion in a

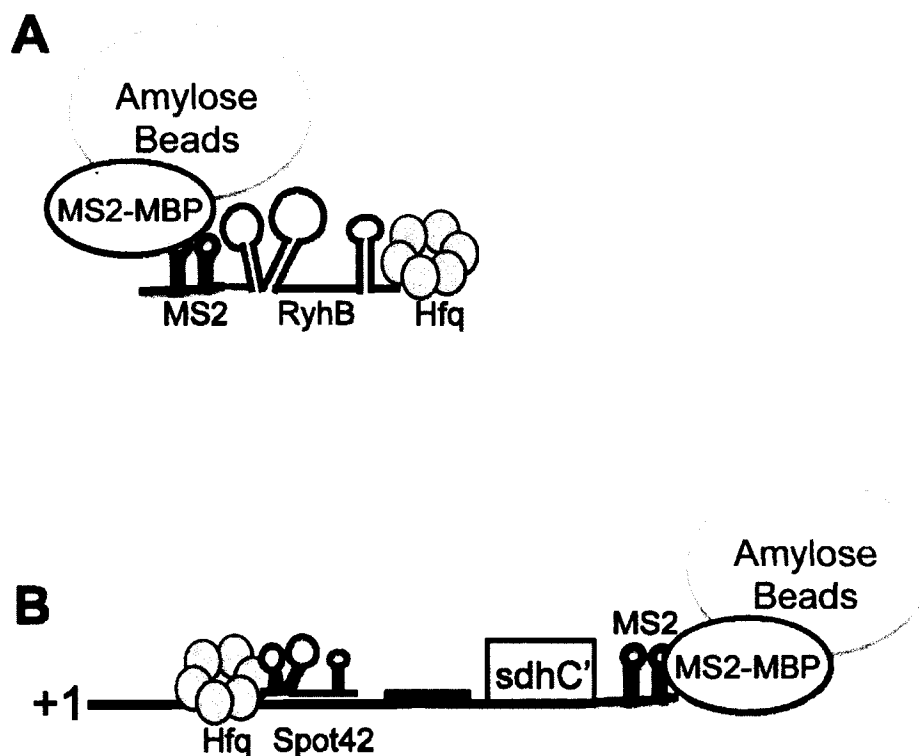
$\Delta hfq$  background. Results showed that Spot42MR was still able to repress  $\beta$ -galactosidase activity in both cases whereas RyhBMS had no effect, regardless of the cellular backgrounds (Fig 7A). We interpreted these data to suggest that Hfq binding to *sdhC* was necessary for RyhBMS mechanism, although this was not the case for Spot42MR repression mechanism of *sdhC* translation.

We next studied the effect of both mutated sRNAs Spot42MR and RyhBMS on *sdhCDAB* mRNA levels *in vivo*. Results of Northern blot analysis showed that the expression of Spot42MR led to a rapid (< 5min) decrease in *sdhCDAB* mRNA levels, RyhBMS required more than 15 min to reduce the mRNA levels (Fig 7B). Interestingly, a comparison of the kinetic of mRNA decay between wild-type and mutant sRNAs revealed that both sRNAs pairing directly to TIR (RyhB and Spot42MR) were acting very fast (< 5 min) whereas both sRNAs pairing upstream of TIR (Spot42 and RyhBMS) acted at a much slower rate (> 15 min). These observations suggested that sRNA pairing site may also have an effect on *sdhCDAB* mRNA rate of decay. Furthermore, experiments using Spot42 and RyhB probes confirmed that the two mutant sRNAs were expressed at levels comparable to wild-type sRNAs (data not shown).

A recent study has shown that the 3'-end poly-U tail of RyhB is essential for Hfq binding (Otaka et al. 2011).. We took the opportunity of this finding to test whether or not the Hfq protein involved in translation repression is recruited by the sRNA. Accordingly, we constructed RyhB-LS4U and RyhBMS-LS4U sRNAs (shorter poly-U tails, see Fig S7), which should have lost their abilities to bind Hfq, and then tested the effect of these constructs on our translational SdhC<sub>258</sub>-LacZ fusion. Whereas the RyhB-LS4U construct induced a 50% decrease in the expression of SdhC<sub>258</sub>-LacZ, the RyhBMS-LS4U construct failed to repress the fusion (Fig 7C). This suggested that, to repress translation of *sdhC*, the chaperone Hfq must be recruited by the poly-U tail of the sRNA binding at the upstream site of TIR.

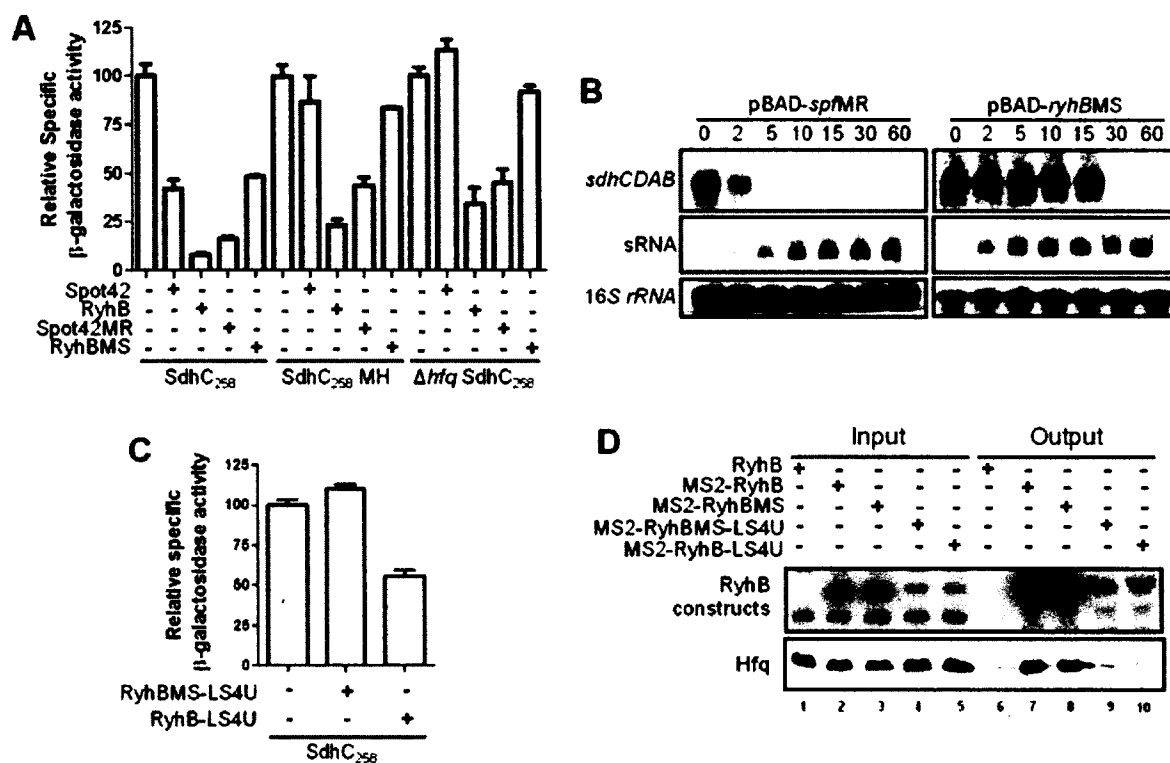
Next, we determined the *in vivo* capability of both RyhB-LS4U and RyhBMS-LS4U constructs to bind to Hfq. To address this question, we developed an assay based on affinity purification of MS2 RNA stemloops-tagged sRNA (see Fig S8A for a schematic view of the MS2-tagged construct). This approach has been used successfully to demonstrate Hfq

binding on MS2-tagged sRNAs (Said, 2009). Each constructs were cloned downstream of an arabinose-inducible promoter carried on a low-copy number plasmid (see Material & Methods for details). After induction during 10 min with arabinose, total RNAs and proteins were extracted. As shown by Northern and Western blots (Fig 7D, Input), all RNAs of interest (RyhB, MS2-RyhB, MS2-RyhB-LS4U, and MS2-RyhBMS-LS4U) as well as Hfq were detected before loading on the MS2 affinity column. Although they were expressed at lower levels than MS2-RyhB and MS2-RyhBMS, both MS2-RyhB-LS4U and MS2-RyhBMS-LS4U constructs were expressed at comparable level before purification (Fig 7D, lanes 3 and 4).



**Figure S8.** Schematic representation of the MS2-tagged constructs used to perform affinity purification. **(A)** The MS2 RNA stemloops were fused at the 5' of RyhB sRNA (or its derivative) and placed under the control of an arabinose-inducible promoter. **(B)** The MS2 stemloops were fused at the 3' of the *sdhC*<sub>258</sub> RNA and cloned in a plasmid harbouring the natural *sdhCDAB* promoter.

After purification of the cellular extracts, the constructs MS2-RyhB and MS2-RyhBMS strongly bound to Hfq chaperone as expected (Fig 7D, lane 7). In contrast, both MS2-tagged RyhB-LS4U and RyhBMS-LS4U constructs have lost their ability to strongly bind Hfq *in vivo* (Fig 7D, lanes 7 and 8). Together with the results in Fig 7C, this strongly suggests that sRNA constructs pairing upstream of the RBS region must bind directly to the Hfq protein for translation repression of *sdhC*.



**Figure 7.** Effect of interchanging Spot42 and RyhB pairing sites on the *sdhC* mRNA. (A)  $\beta$ -galactosidase assays with SdhC<sub>258</sub>-LacZ or SdhC<sub>258</sub>MH-LacZ translational fusions in wild-type and  $\Delta hfq$  strains. Expression of each sRNA (pBAD-*spot42MR* or pBAD-*ryhBMS*) was individually induced by the addition of arabinose at an OD<sub>600</sub> of 0.1 and specific  $\beta$ -galactosidase activity was measured two h later. The plasmid pNM12 was used as a control. (B) Northern blot analysis of total RNA extracted from triple knock-out  $\Delta spf/\Delta ryhB/\Delta ryhB$  strains harboring the indicated plasmids, hybridized with *sdhC* and sRNA specific probes. Cells were grown on LB medium in the presence of ampicillin to an OD<sub>600</sub> of 0.5, at which point arabinose was added at time 0 to induce sRNA expression. Total RNA was extracted at indicated times. 16S rRNA was used as a loading control. (C)  $\beta$ -galactosidase assay using SdhC<sub>258</sub>-LacZ translational fusion. sRNA mutated for their Hfq binding sites (LS4U; poly-U tail shortened) were individually induced by the addition of arabinose at an OD<sub>600</sub> of 0.1 and specific  $\beta$ -galactosidase activity was measured two h later. The empty pNM12 was used as a control. (D) Affinity purification from strain expressing

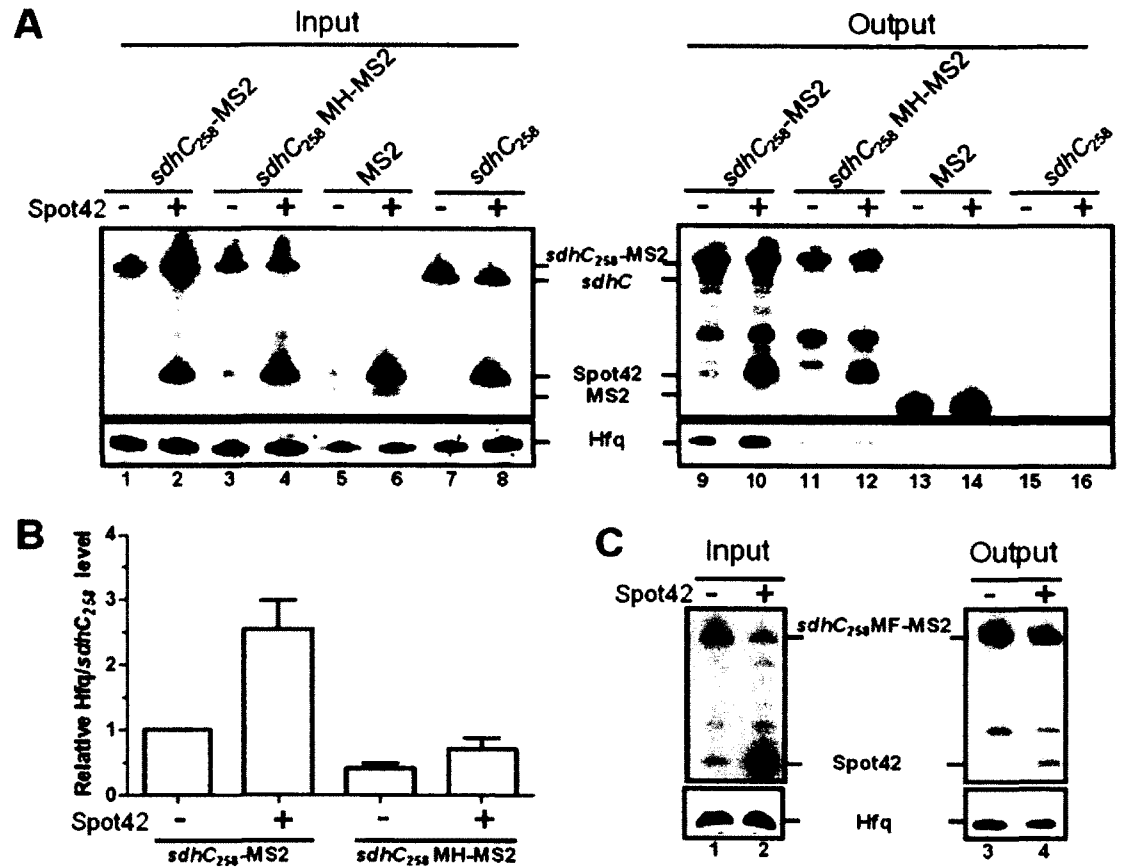
different RyhB variant. Cells were grown in LB medium in the presence of ampicillin to an OD<sub>600</sub> of 0.5, at which point arabinose was added at time 0 to induce sRNA expression. Total RNA was extracted 10 min later. Northern blots (RyhB probe) and Western blots (Hfq antibody) were performed on samples taken before (Input) and after (Output) affinity purification.

### **Spot42 pairing on *sdhC* catalyses the recruitment of Hfq *in vivo***

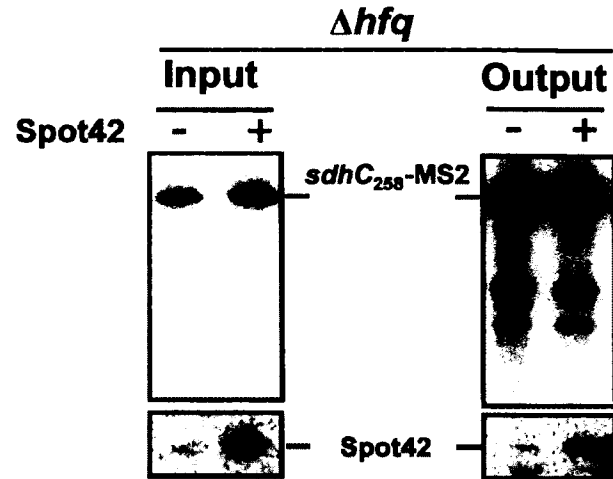
Our results indicated that Spot42 was fully dependent on Hfq to repress *sdhC* translation. Thus, we asked whether Spot42 was able to promote the recruitment of Hfq to 5' UTR of *sdhC* mRNA *in vivo*. We designed an approach based on affinity purification of *sdhC* transcript tagged with a MS2 RNA stemloops (see Fig S8B for a schematic view of the construct). A plasmid (termed pFRΔ-*sdhC*<sub>258</sub>-MS2) harboring the promoter, the 5'-UTR of *sdhCDAB* mRNA, and the first 39 nt of *sdhC* ORF fused to the MS2 RNA stemloops (see Material & Methods for details) was engineered for that purpose. As controls, we included a vector expressing the MS2 tag only and a second vector expressing the *sdhC*<sub>258</sub> transcript only, both under the control of the *sdhCDAB* promoter. Strains carrying pFRΔ-*sdhC*<sub>258</sub>-MS2, pFRΔ-MS2, or pFRΔ-*sdhC*<sub>258</sub> plasmids and arabinose-inducible pGD3-*spf*, or the empty pGD3 vector were treated with arabinose for 20 min before total RNAs and proteins were extracted. As shown by Northern and Western blots (Fig 8A, Input), all RNAs of interest (*sdhC*<sub>258</sub>-MS2; MS2; and *sdhC*<sub>258</sub>) as well as Hfq were detected before loading on the MS2 affinity column. Next, we performed affinity purification of *sdhC*<sub>258</sub>-MS2, MS2, and *sdhC*<sub>258</sub> by loading the cellular lysate on the MS2 affinity column. Total RNAs and proteins were collected and analyzed by Northern and Western blots. Results showed that equal amounts of the *sdhC*<sub>258</sub>-MS2 construct were retrieved whether Spot42 was absent or expressed (Fig 8A, lanes 9 and 10, Output). However, we noted that Spot42 was recovered exclusively from the strain expressing *sdhC*<sub>258</sub>-MS2 (lane 10) and not from strains expressing either MS2 (lane 14) or *sdhC*<sub>258</sub> (lane 16) only. These experiments confirmed that sRNA Spot42 paired with *sdhC* 5'-UTR RNA *in vivo*. Importantly, expression of Spot42 correlated with a 2.6-fold increase in the Hfq signal (Fig 8A, compare lanes 9 and 10, Western blots and, Fig 8C, densitometry). There was no recovery of Hfq from strains expressing MS2 or *sdhC*<sub>258</sub> constructs (Fig 8A, lanes 13 to 16).

We next inserted the MH (mutated Hfq binding site) mutation in *sdhC*<sub>258</sub>-MS2 construct to generate the pFRΔ-*sdhC*<sub>258</sub>MH-MS2 plasmid. After performing affinity purification, we observed considerably less (50 %) Hfq protein recovered from *sdhC*<sub>258</sub>MH-MS2 RNA, as compared to wild-type *sdhC*<sub>258</sub>-MS2 construct (compare lane 9 and 11 of Fig 8A, Output). These findings corroborated *in vitro* results (Fig 6A) and strongly suggested that the Hfq binding site on *sdhC* was functional *in vivo*. Interestingly, expression of Spot42 also led to a small but reproducible Hfq recovery in the case of *sdhC*<sub>258</sub>MH-MS2 RNA (Fig 8A, compare lanes 11 and 12). In addition, Spot42 sRNA was also retrieved to a level comparable to pFRΔ-*sdhC*<sub>258</sub>-MS2 construct (compare lanes 10 and 12), indicating that Hfq binding site mutation on *sdhC* 5'-UTR did not interfere with the pairing with Spot42 and that the results of Fig 6B were not due to a reduced sRNA binding.

We also inserted the MF (mutated Spot42 pairing site) mutation in *sdhC*<sub>258</sub>-MS2 construct and performed affinity purification with a pFRΔ-*sdhC*<sub>258</sub>MF-MS2 plasmid. As shown in Fig 8C, disruption of Spot42 pairing with *sdhC*<sub>258</sub>MF prevents Hfq recruitment. This confirms that pairing of Spot42 to *sdhC* mRNA is essential for the recruitment of Hfq. Finally, we performed affinity purification in Δ*hfq* cells carrying the pFRΔ-*sdhC*<sub>258</sub>-MS2 plasmid. As seen in Fig S9, we were able to affinity purify Spot42 in absence of Hfq, indicating that the chaperone is not necessary for the pairing of Spot42 to *sdhC*. Together, these results indicated that expression and pairing of Spot42 to *sdhC* 5'-UTR led to a recruitment of Hfq. They also suggested that the Hfq binding site located in the TIR region was essential for optimal Hfq recruitment.



**Figure 8.** Spot42 binds to *sdhCDAB* *in vivo* and recruits Hfq to *sdhC* TIR. (A) Affinity purification was performed on strain EM1451 harboring pFRΔ-*sdhC<sub>258</sub>-MS2*, pFRΔ-*sdhC<sub>258</sub>MH-MS2*, pFRΔ-MS2 or pFRΔ-*sdhC<sub>258</sub>* in combination with pGD3 (control plasmid) or pGD3-*spot42*. Northern blots (MS2, *sdhC*, and Spot42 probes) and Western blots (Hfq antibody) were performed on samples taken before (Input) and after (Output) affinity purification. (B) Densitometry from the “Output” signal of the level of Hfq protein relative to the levels of *sdhC<sub>258</sub>-MS2* or *sdhC<sub>258</sub>MH-MS2* RNAs. Data are representative of 3 independent experiments. (C) Affinity purification was performed on strain EM1451 harboring pFRΔ-*sdhCMF<sub>258</sub>-MS2* in combination with pGD3 or pGD3-*spot42*. Northern blots (MS2 and Spot42 probes) and Western blots (Hfq antibody) were performed on samples taken before (Input) and after (Output) affinity purification.

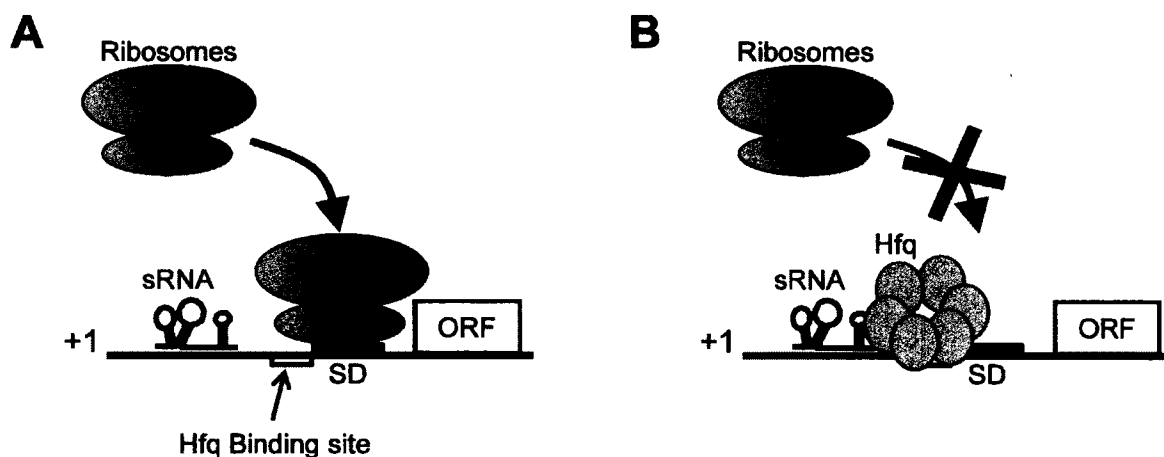


**Figure S9.** Spot42 binds to *sdhCDAB* *in vivo* in absence of Hfq. (A) Affinity purification was performed on  $\Delta hfq$  strain harboring pFR $\Delta$ -*sdhC<sub>258</sub>*-MS2 in combination with pGD3 (control plasmid) or pGD3-*spf*. Northern blots (MS2 and Spot42 probes) were performed on samples taken before (Input) and after (Output) affinity purification.



## DISCUSSION

Our data indicate that sRNA Spot42 binds to target mRNA *sdhCDAB* only to recruit the RNA chaperone Hfq, which in turn binds to a precise region of TIR to directly inhibit translation initiation by the 30S ribosomal subunits. This suggests a new mechanism that went against the traditional roles of the canonical model where Hfq recruits sRNA that blocks translation. In our model (Fig 9), the function of the sRNA was only to recruit Hfq, the major contribution of which was to block translation. Indeed, except for the pairing sequence, the specific nature of the sRNA did not seem to be of critical importance as we showed that Spot42 and RyhB pairing sites could be functionally exchanged (Fig 7). This observation suggested that sRNA pairing sites on the target mRNA, whether at TIR (direct repression by sRNAs) or far upstream (direct repression by Hfq), was the key event to trigger the repression mechanism of *sdhCDAB*.



**Figure 9.** Working model for sRNA-mediated repression of *sdhC* translation and role of Hfq (see text for details).

In addition to Spot42, RyhB, and RybB were also involved in post-transcriptional regulation of *sdhCDAB* mRNA by directly pairing with the 5' UTR of *sdhC*. Whereas RyhB and RybB directly paired with TIR of *sdhC*, Spot42 paired 48 nt upstream of the start codon. Furthermore, RyhB and RybB induced the rapid turnover of *sdhCDAB* mRNA by recruiting the RNA degradosome but Spot42 did not. Finally, Spot42 absolutely required Hfq binding to an AU-rich region in the vicinity of *sdhC* TIR region to repress translation but RyhB and RybB could function, at least partially, without Hfq.

Because RyhB and RybB paired directly with the SD sequence of *sdhC*, they were able to directly compete with initiating 30S ribosomes. Thus, Hfq seemed not to be essential for these sRNAs to repress translation. On the other hand, because Spot42 basepaired far upstream of TIR, it was unable to compete directly with initiating 30S ribosomes (Fig 9A). Based on the fact that Hfq was able to compete *in vitro* with initiating ribosomes on *sdhC* (Fig 5B) and, that the AU-rich site that was bound by Hfq seemed to be important for normal *sdhC* translation *in vivo* (Fig 6B), we hypothesized that the effect seen on *sdhC* translation when Spot42 is expressed was achieved through recruitment of Hfq to the *sdhC* TIR (Fig 9B).

The observation that Hfq was able to repress translation by itself has been reported before (Vytvytska et al. 2000). However, to our knowledge, it is the first time that Hfq has been shown to be directly involved in 30S ribosomes competition in the context of sRNA-mediated gene regulation. Given the marked preference of Hfq for AU-rich regions and the fact that these regions are known to act as translational enhancers (Hook-Barnard et al. 2007; Komarova et al. 2005; Zhang and Deutscher. 1992), we believe that Hfq may play a similar role in the action of many other sRNAs that are not pairing directly to the TIR and are therefore not able to directly compete with initiating ribosomes. Even if it was not essential for RyhB- and RybB-mediated *sdhC* translational repression, Hfq remained involved in this regulation through previously identified roles of Hfq as being important for the stability of many sRNAs and for facilitating sRNA-mRNA pairing (Geissmann and Touati. 2004; Moller et al. 2002a; Zhang et al. 2002). Accordingly, all three sRNAs were less effective in repressing *sdhC* translation in the  $\Delta hfq$  null strain (Fig 6B). In addition, results (Fig S6) indicated that Hfq was essential for sRNA-mediated active mRNA degradation, as shown previously by other studies (Ikeda et al. 2011; Masse et al. 2003; Morita et al. 2005; Prevost et al. 2011).

The Hfq binding site on *sdhC* not only acted to recruit Hfq but also functioned as a translational enhancer. When *sdhCMH* was used, not only Hfq did not bind to the mRNA but the 30S ribosomes could also bind less efficiently. In the absence of Spot42, Hfq could still bind to *sdhC*, thereby slightly reducing the initiation of translation, but with decreased efficiency.

An intriguing finding of our study was the more rapid mRNA turnover induced by sRNAs binding directly to TIR (RyhB, RybB, and Spot42MR) than sRNAs binding far upstream of TIR (Spot42 and RyhBMS). This observation correlated with the observed efficiency of translational repression as measured with a SdhC<sub>258</sub>-LacZ translational fusion. Indeed, whereas RyhB, RybB and Spot42MR repressed *sdhC* translation by at least 3.5-fold (Figs 2A and 7A), Spot42 and RyhBMS induced repression only 2-fold (Figs 2A and 7A). It is possible that, contrary to RyhB or RybB, the 2-fold translational repression induced by Spot42 was insufficient to induce rapid cleavage by RNase E. Interestingly, *sdhCDAB* was not among the new Spot42 targets recently characterized by pulse-expression of Spot42 for 15 min, followed by microarray analysis (Beisel and Storz. 2011). These data suggested that Spot42 as well as other well-characterized sRNAs may have more targets than those revealed solely by microarray-based data.

Whereas the *sdhC*<sub>258</sub>-*lacZ* fusion was resistant to degradation by any of the sRNAs (Fig 2B), the full length mRNA was not (Fig 3A). Thus, we hypothesized that the initial cleavage site was located downstream of the 39<sup>th</sup> nt of *sdhC* ORF. Indeed, our results suggested that the initial cleavage site on *sdhC* mRNA following sRNAs expression was located downstream of the 39<sup>th</sup> nt of the ORF (Fig 2B). This finding was reminiscent of a recent study from our laboratory that showed that RyhB induced an initial cleavage into *sodB* target mRNA more than 350 nt downstream of the pairing site (Prevost et al. 2011).

In terms of physiological significance, it is quite remarkable that three sRNAs, each expressed under different physiological conditions, repressed the same mRNA. Because succinate dehydrogenase is a Fe-dependent enzyme, regulation by RyhB was expected since this sRNA is expressed when Fe is not available (Masse and Gottesman. 2002). With respect to Spot42, the only known transcription regulator is the Catabolic Repressor Protein (CRP) which represses Spot42 expression when cAMP levels are high (Moller et al. 2002 b). It has been known for some time that the expression of *sdhCDAB* mRNA is repressed in the presence of glucose (Park et al. 1995; Takeda et al. 1999). A role for the CRP-cAMP complex in regulation of *sdhCDAB* transcription has been reported (Nam et al. 2005). In addition to transcription regulation, our results suggest that Spot42 adds an additional layer of regulation which may help to increase the strength and the rapidity of

catabolic repression in the presence of glucose, as it was recently shown for other targets of Spot42 (Beisel and Storz. 2011). Finally, the RybB sRNA has been recently characterized as a regulator of mRNAs encoding OMPs (Bouvier et al. 2008; Johansen et al. 2006; Papenfort et al. 2010; Papenfort et al. 2006). In contrast, succinate dehydrogenase is an inner membrane-located protein. RybB transcription is controlled by the alternative sigma factor  $\sigma^e$ , whose activity is modulated by a signal transduction pathway (Ades. 2008) induced by the recognition of a conserved YxF peptide situated in the C-terminus of OMPs (Walsh et al. 2003). However, because the SdhC protein is not an OMP, it is unclear why it is involved in  $\sigma^e$  response. Thus, the variety of signals which affect the regulation of *sdhCDAB* mRNA, such as intracellular Fe, cAMP, and misfolded proteins, underline the importance of modulating succinate dehydrogenase accordingly to extremely diverse environmental conditions.

## MATERIAL AND METHODS

### *Strains and plasmids*

Strains used in this study are listed in Table S1. Their constructions are described in Supplemental experimental procedures. Derivatives of EM1055 were used in all experiments. The DH5 $\alpha$  bacterial strain was used for routine cloning procedures. Cells were grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) medium. Cells carrying pFRA, pRS1551, and pNM12 derivatives were grown in LB medium containing ampicillin at a final concentration of 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Cells carrying pGD3 derivatives were grown in the presence of chloramphenicol at a final concentration of 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### *Beta-galactosidase assays*

Kinetic assays for  $\beta$ -galactosidase activity were performed as described (Prévost et al, 2007), using a SpectraMax 250 microtitre plate reader (Molecular Devices). Briefly, overnight bacterial cultures were incubated in LB medium at 37°C and diluted 1000-fold into 50 ml of fresh LB medium and grown under mechanical shaking at 37°C. sRNA expression was induced when OD<sub>600</sub> reached a value of 0.1 by addition of arabinose to a final concentration of 0.1%. Specific  $\beta$ -galactosidase activity was calculated using the formula  $V_{\text{max}}/\text{OD}_{600}$ . Results reported here correspond to data of a minimum of three independent experiments.

### *RNA extraction and Northern blot analysis*

Total RNA was extracted using the hot phenol procedure (Aiba et al, 1981). Cells were grown to an OD<sub>600</sub> of 0.5 and 0.1% arabinose was added. In the case of *sdhC* Northern blots, 20  $\mu\text{g}$  of total RNA were loaded on an agarose gel (1% agarose in MOPS buffer). In the case of sRNAs Northern blots, 5  $\mu\text{g}$  of total RNA were loaded on polyacrylamide gel (5% acrylamide, 8 M urea). After migration, the RNA was transferred by capillarity (agarose gel) or electro-transferred (acrylamide gel) to a Hybond-XL membrane (Amersham Biosciences) and UV crosslinked. Prehybridization, hybridization and washes were done as described (Desnoyers et al. 2009). To analyze RNA retrieved from affinity purification (below), RNA equivalent to 1 OD<sub>600</sub> (input) or 18 OD<sub>600</sub> (output)

of culture were sized on polyacrylamide gels (10 % bottom/5% top, 8 M urea) and electro-transferred on a Hybond-XL membrane. Prehybridization and hybridization were done in Church buffer (Church and Gilbert. 1984). DNA probes were 5' end-labeled with 50  $\mu$ Ci of [ $^{32}$ P]- $\gamma$ -ATP by using T4 polynucleotide kinase (NEB), according to the manufacturer's protocol. Oligonucleotides used as probes were : *sdhC* (EM1696), MS2 (EM1662) and *spot42* (EM1679). Washes were done in 2 $\times$ SSC/0.1% SDS and 0.1 $\times$ SSC/0.1% SDS. Membranes were exposed to phosphor storage screens and analyzed using a Typhoon Trio (GE healthcare) instrument. Quantification was performed using the ImageQuant software (Molecular Dynamics).

#### *In vitro RNA synthesis and radiolabeling*

Oligonucleotides used to generate DNA template for *in vitro* transcription are indicated in Table S3. The radiolabeled probes used for Northern blot analysis were transcribed using T7 RNA polymerase (Roche, Germany) to generate the antisense transcript of the gene of interest and detection performed as described (Desnoyers et al. 2009). For the RNA used in secondary structure probing and toeprinting, transcription was performed in T7 transcription buffer, 5 mM NTPs (A, C, G and U), 40 units RNaseOut (Invitrogen), 20 units T7 RNA polymerase and 0.5  $\mu$ g DNA templates. After 4 h of incubation at 37°C, the mixture was treated with 2 units of Turbo DNase (Ambion), extracted once with phenol-chloroform and purified on denaturing acrylamide gel. To perform 5' end-labeling, transcripts were dephosphorylated with calf intestine phosphatase (New England Biolabs) and 5' labeled with [ $^{32}$ P]- $\gamma$ -ATP using T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs), according to the manufacturer's protocol. Radiolabeled transcripts were purified on denaturing acrylamide gels before use.

#### *RNA secondary structure probing*

Secondary structure probing was performed on 5' end-labeled *sdhC*<sub>258</sub> or *sdhC*<sub>258</sub>MH RNA (as above). Hfq was purified as described (Prévost et al, 2007). In-line probing was performed as described (Regulski and Breaker. 2008). A final concentration of 0.2  $\mu$ M *sdhC*<sub>258</sub> RNA and 1  $\mu$ M Spot42, RyhB or RybB were used. Lead acetate probing, ribonuclease T1/TA ladder and alkaline (OH) ladder were performed as described

(Desnoyers et al. 2009). A final concentration of 0.2  $\mu$ M *sdhC*<sub>258</sub> or *sdhC*<sub>258</sub>MH RNA was used. After reactions, samples were heated to 90°C for 1 min and separated on 8% polyacrylamide/7 M urea sequencing gel.

### *Toeprinting assays*

Toeprinting assays and 30S ribosomal subunit purification were carried out as described (Fechter et al. 2009). In each condition, annealing mixture contained 2 pmol of unlabeled *sdhC*<sub>258</sub> RNA and 0.4 pmol of 5'-end-labeled EM1262 primer in toeprint buffer (20 mM Tris.HCl pH 7.5, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT). Annealing mixtures were heated for 1 min at 90°C and chilled on ice for 1 min. MgCl<sub>2</sub> and dNTPs were added to final concentrations of 10 and 1 mM, respectively. When needed, Hfq was added and the incubation continued for 10 min at 37°C. Spot42, RyhB, RybB or DsrA RNA was added afterward and the incubation continued for 10 min at 37°C. Two pmol of 30S ribosomal subunits were then added and incubation continued for 5 min. Thirteen pmol of tRNA fmet (Sigma-Aldrich) were added and, 15 min later, cDNA was synthesized using SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) for 15 min at 37°C. Reactions were stopped and phenol-chloroform extracted. cDNA was ethanol precipitated and subsequently dissolved in water and loading buffer II (Ambion). cDNA products were analyzed on 8% polyacrylamide/7M urea sequencing gel. Toeprint signals were identified by comparison with sequences generated with the same 5' end-labeled primer.

### *Affinity purification of MS2-tagged RNA*

Affinity purification assays were performed as described (Said et al. 2009), with some modifications. The MS2-MBP protein was purified as described in Supplemental data. The bacterial strains were grown to an OD<sub>600</sub> of 0.5 at which point arabinose was added to a final concentration of 0.1 % to induce the expression of pBAD-RyhB, pBAD-MS2-RyhB, pBAD-MS2-RyhB-LS4U, pBAD-MS2-RyhBMS-LS4U (10 min) or pGD3-*spot42* (20 min). Cells equivalent to 50 OD<sub>600</sub> were chilled on ice for 20 min. At this point, RNA was extracted (input) as described above from 600  $\mu$ l of culture. The remaining of the cells was then centrifuged, resuspended in 1 mL of buffer A (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT) and centrifuged again. Cells were resuspended in 2 mL of

buffer A and were lysed using a French Press (8000 psi, 3 times). Lysate was then cleared by centrifugation (30 min, 17,000 x g, 4 °C). At this step, 20 µl of the soluble fraction was mixed with 20 µl of protein sample buffer (Input). The remaining soluble fraction was subjected to affinity chromatography (all steps performed at 4°C). The column was prepared by adding 75 µl of amylose resin (NEB) to Bio-Spin disposable chromatography columns (Bio-Rad). The column was washed with 3 mL of buffer A. Next, 100 pmol of MS2-MBP protein (diluted in 1 mL of buffer A) was immobilized on the amylose resin and the column was washed with 1 mL of buffer A. The cleared lysate was then loaded onto the column which was washed with 5 mL of buffer A. RNA and proteins were eluted from the column with 900 µl of buffer A containing 12 mM maltose. Eluted RNA was extracted with phenol-chloroform, followed by ethanol (3 volumes) precipitation of the aqueous phase in the presence of 20 µg of glycogen. For protein isolation, the organic phase was subjected to acetone precipitation. RNA samples were analyzed by Northern blots as described above and protein samples were analyzed by Western blots (below).

#### *Western blot analysis*

Proteins were resuspended in protein loading gel electrophoresis buffer. An equivalent volume corresponding to 0.1 OD<sub>600</sub> (input) or 20 OD<sub>600</sub> (output) units of cell cultures was separated on a 12 % SDS-PAGE gel and transferred to nitrocellulose membrane. The anti-Hfq (kind gift of Gisela Storz, National Institutes of Health) was used at dilutions of 1:10,000. The IRDye 800CW-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (Li-Cor Biosciences) was used at a dilution of 1:15,000. Western blots were revealed on an Odyssey Infrared Imaging System (Li-Cor Biosciences) and quantification was performed using the Odyssey Application Software.



## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Karine Prévost, Julie Bergeron, and Kathy Doyon for excellent technical assistance, and Gilles Dupuis for editorial comments. We thank Robert Batey (University of Colorado) for MBP-MS2 constructs. This work was funded by an operating grant MOP69005 to E.M. from the Canadian Institute for Health Research (CIHR). G.D. is a PhD scholar from the FQRNT (Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies). E.M. is a Fonds de Recherche Santé Québec (FRSQ) Junior II scholar.

**REFERENCES**

- Ades SE. 2008. Regulation by destruction: design of the sigmaE envelope stress response. *Curr Opin Microbiol* **11**: 535-540
- Beisel CL, Storz G. 2011. The base-pairing RNA spot 42 participates in a multioutput feedforward loop to help enact catabolite repression in Escherichia coli. *Mol Cell* **41** : 286-297
- Beyer D, Skripkin E, Wadzack J, Nierhaus KH. 1994. How the ribosome moves along the mRNA during protein synthesis. *J Biol Chem* **269**: 30713-30717
- Bouvier M, Sharma CM, Mika F, Nierhaus KH, Vogel J. 2008. Small RNA binding to 5' mRNA coding region inhibits translational initiation. *Mol Cell* **32** : 827-837
- Church GM, Gilbert W. 1984. Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 1991-1995
- Darfeuille F, Unoson C, Vogel J, Wagner EG. 2007. An antisense RNA inhibits translation by competing with standby ribosomes. *Mol Cell* **26** : 381-392
- Desnoyers G, Morissette A, Prevost K, Masse E. 2009. Small RNA-induced differential degradation of the polycistronic mRNA iscRSUA. *EMBO J* **28** : 1551-1561
- Fechter P, Chevalier C, Yusupova G, Yusupov M, Romby P, Marzi S. 2009. Ribosomal initiation complexes probed by toeprinting and effect of trans-acting translational regulators in bacteria. *Methods Mol Biol* **540**: 247-263
- Franze de Fernandez MT, Eoyang L, August JT. 1968. Factor fraction required for the synthesis of bacteriophage Qbeta-RNA. *Nature* **219** : 588-590
- Franze de Fernandez MT, Hayward WS, August JT. 1972. Bacterial proteins required for replication of phage Q ribonucleic acid. Purification and properties of host factor I, a ribonucleic acid-binding protein. *J Biol Chem* **247**: 824-831
- Geissmann TA, Touati D. 2004. Hfq, a new chaperoning role: binding to messenger RNA determines access for small RNA regulator. *EMBO J* **23** : 396-405
- Hajnsdorf E, Regnier P. 2000. Host factor Hfq of Escherichia coli stimulates elongation of poly(A) tails by poly(A) polymerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 1501-1505
- Holmqvist E, Reimegard J, Sterk M, Grantcharova N, Romling U, Wagner EG. 2010. Two antisense RNAs target the transcriptional regulator CsgD to inhibit curli synthesis. *EMBO J* **29** : 1840-1850

- Hook-Barnard IG, Brickman TJ, McIntosh MA. 2007. Identification of an AU-rich translational enhancer within the *Escherichia coli* *fepB* leader RNA. *J Bacteriol* **189** : 4028-4037
- Huttenhofer A, Noller HF. 1994. Footprinting mRNA-ribosome complexes with chemical probes. *EMBO J* **13** : 3892-3901
- Ikeda Y, Yagi M, Morita T, Aiba H. 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** : 419-432
- Jacques JF, Jang S, Prevost K, Desnoyers G, Desmarais M, Imlay J, Masse E. 2006. RyhB small RNA modulates the free intracellular iron pool and is essential for normal growth during iron limitation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **62** : 1181-1190
- Johansen J, Rasmussen AA, Overgaard M, Valentin-Hansen P. 2006. Conserved small non-coding RNAs that belong to the sigmaE regulon: role in down-regulation of outer membrane proteins. *J Mol Biol* **364** : 1-8
- Komarova AV, Tchufistova LS, Dreyfus M, Boni IV. 2005. AU-rich sequences within 5' untranslated leaders enhance translation and stabilize mRNA in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187** : 1344-1349
- Leroy A, Vanzo NF, Sousa S, Dreyfus M, Carpousis AJ. 2002. Function in *Escherichia coli* of the non-catalytic part of RNase E: role in the degradation of ribosome-free mRNA. *Mol Microbiol* **45** : 1231-1243
- Link TM, Valentin-Hansen P, Brennan RG. 2009. Structure of *Escherichia coli* Hfq bound to polyriboadenylate RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 19292-19297
- Majdalani N, Cunning C, Sledjeski D, Elliott T, Gottesman S. 1998. DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 12462-12467
- Maki K, Uno K, Morita T, Aiba H. 2008. RNA, but not protein partners, is directly responsible for translational silencing by a bacterial Hfq-binding small RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 10332-10337
- 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
- Masse E, Vanderpool CK, Gottesman S. 2005. Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187** : 6962-6971

- Mohanty BK, Maples VF, Kushner SR. 2004. The Sm-like protein Hfq regulates polyadenylation dependent mRNA decay in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **54** : 905-920
- Moller T, Franch T, Hojrup P, Keene DR, Bachinger HP, Brennan RG, Valentin-Hansen P. 2002a. Hfq : a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction. *Mol Cell* **9** : 23-30
- Moller T, Franch T, Udesen C, Gerdes K, Valentin-Hansen P. 2002b. Spot 42 RNA mediates discoordinate expression of the E. coli galactose operon. *Genes Dev* **16**: 1696-1706
- Morita T, Maki K, Aiba H. 2005. RNase E-based ribonucleoprotein complexes: mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. *Genes Dev* **19**: 2176-2186
- Nam TW, Park YH, Jeong HJ, Ryu S, Seok YJ. 2005. Glucose repression of the Escherichia coli sdhCDAB operon, revisited: regulation by the CRP\*cAMP complex. *Nucleic Acids Res* **33**: 6712-6722
- Otaka H, Ishikawa H, Morita T, Aiba H. 2011. PolyU tail of rho-independent terminator of bacterial small RNAs is essential for Hfq action. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 13059-13064
- Papenfort K, Bouvier M, Mika F, Sharma CM, Vogel J. 2010. Evidence for an autonomous 5' target recognition domain in an Hfq-associated small RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 20435-20440
- Papenfort K, Pfeiffer V, Mika F, Lucchini S, Hinton JC, Vogel J. 2006. SigmaE-dependent small RNAs of Salmonella respond to membrane stress by accelerating global omp mRNA decay. *Mol Microbiol* **62** : 1674-1688
- Park SJ, Tseng CP, Gunsalus RP. 1995. Regulation of succinate dehydrogenase (sdhCDAB) operon expression in Escherichia coli in response to carbon supply and anaerobiosis: role of ArcA and Fnr. *Mol Microbiol* **15** : 473-482
- Pfeiffer V, Papenfort K, Lucchini S, Hinton JC, Vogel J. 2009. Coding sequence targeting by MicC RNA reveals bacterial mRNA silencing downstream of translational initiation. *Nat Struct Mol Biol* **16** : 840-846
- Prevost K, Desnoyers G, Jacques JF, Lavoie F, Masse E. 2011. Small RNA-induced mRNA degradation achieved through both translation block and activated cleavage. *Genes Dev* **25**: 385-396
- Regulski EE, Breaker RR. 2008. In-line probing analysis of riboswitches. *Methods Mol Biol* **419**: 53-67

- Rice PW, Dahlberg JE. 1982. A gene between *polA* and *glnA* retards growth of *Escherichia coli* when present in multiple copies: physiological effects of the gene for spot 42 RNA. *J Bacteriol* **152** : 1196-1210
- Said N, Rieder R, Hurwitz R, Deckert J, Urlaub H, Vogel J. 2009. In vivo expression and purification of aptamer-tagged small RNA regulators. *Nucleic Acids Res* **37** : e133
- Salvail H, Lanthier-Bourbonnais P, Sobota JM, Caza M, Benjamin JA, Mendieta ME, Lepine F, Dozois CM, Imlay J, Masse E. 2010. A small RNA promotes siderophore production through transcriptional and metabolic remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 15223-15228
- Senear AW, Steitz JA. 1976. Site-specific interaction of Qbeta host factor and ribosomal protein S1 with Qbeta and R17 bacteriophage RNAs. *J Biol Chem* **251**: 1902-1912
- Sharma CM, Darfeuille F, Plantinga TH, Vogel J. 2007. A small RNA regulates multiple ABC transporter mRNAs by targeting C/A-rich elements inside and upstream of ribosome-binding sites. *Genes Dev* **21**: 2804-2817
- Sledjeski DD, Gupta A, Gottesman S. 1996. The small RNA, DsrA, is essential for the low temperature expression of RpoS during exponential growth in *Escherichia coli*. *EMBO J* **15** : 3993-4000
- Takeda S, Matsushika A, Mizuno T. 1999. Repression of the gene encoding succinate dehydrogenase in response to glucose is mediated by the EIICB(Glc) protein in *Escherichia coli*. *J Biochem* **126** : 354-360
- Tjaden B, Goodwin SS, Opdyke JA, Guillier M, Fu DX, Gottesman S, Storz G. 2006. Target prediction for small, noncoding RNAs in bacteria. *Nucleic Acids Res* **34**: 2791-2802
- Valentin-Hansen P, Eriksen M, Udesen C. 2004. The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions. *Mol Microbiol* **51** : 1525-1533
- Vogel J, Bartels V, Tang TH, Churakov G, Slagter-Jager JG, Huttenhofer A, Wagner EG. 2003. RNomics in *Escherichia coli* detects new sRNA species and indicates parallel transcriptional output in bacteria. *Nucleic Acids Res* **31**: 6435-6443
- Vogel J, Luisi BF. 2011. Hfq and its constellation of RNA. *Nat Rev Microbiol* **9**: 578-589
- Vytvytska O, Moll I, Kaberdin VR, von Gabain A, Blasi U. 2000. Hfq (HF1) stimulates *ompA* mRNA decay by interfering with ribosome binding. *Genes Dev* **14**: 1109-1118
- Walsh NP, Alba BM, Bose B, Gross CA, Sauer RT. 2003. OMP peptide signals initiate the envelope-stress response by activating DegS protease via relief of inhibition mediated by its PDZ domain. *Cell* **113** : 61-71

Wassarman KM, Repoila F, Rosenow C, Storz G, Gottesman S. 2001. Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays. *Genes Dev* **15**: 1637-1651

Waters LS, Storz G. 2009. Regulatory RNAs in bacteria. *Cell* **136** : 615-628

Zhang A, Altuvia S, Tiwari A, Argaman L, Hengge-Aronis R, Storz G. 1998. The OxyS regulatory RNA represses rpoS translation and binds the Hfq (HF-I) protein. *EMBO J* **17** : 6061-6068

Zhang A, Wassarman KM, Ortega J, Steven AC, Storz G. 2002. The Sm-like Hfq protein increases OxyS RNA interaction with target mRNAs. *Mol Cell* **9** : 11-22

Zhang J, Deutscher MP. 1992. A uridine-rich sequence required for translation of prokaryotic mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 2605-2609

**Supplemental Material****Non-canonical repression of translation initiation through small RNA-recruitment of the RNA chaperone Hfq**

Guillaume Desnoyers and Eric Massé\*

\*To whom correspondence should be addressed. E-mail : [eric.masse@usherbrooke.ca](mailto:eric.masse@usherbrooke.ca)

**This file includes****Supplementary Materials and Methods****Supplementary Table S1 to S3****Supplementary References**

## Supplementary Materials and Methods

### *Strains and plasmids*

The deletions of genes *spf* ( $\Delta spf::cat$ ), *ryhB* ( $\Delta ryhB::tet$ ), and *rybB* ( $\Delta rybB::kan$ ) were constructed using a method described previously (Yu et al. 2000). The  $\Delta spf::cat$  mutant was obtained by amplifying the chloramphenicol-resistance cassette with oligonucleotides EM812 and EM813 (see Table S2 for oligonucleotides description). The  $\Delta ryhB::tet$  mutant was engineered by amplifying the tetracycline resistance-cassette with oligonucleotides EM1263 and EM1264. The  $\Delta rybB::kan$  mutant was constructed by amplifying the kanamycin-resistance cassette with oligonucleotides EM1530 and EM1531. The resulting PCR products were transformed into DY330 after induction of  $\lambda red$  and selecting for resistance. The integrity of the recombinant products was verified by sequencing and the constructs transferred to the indicated strains by P1 transduction.

For construction of *sdhC*<sub>258</sub>-*lacZ* transcriptional and translational fusions, a PCR fragment obtained from oligonucleotides EM107 and EM1035 was digested with *EcoRI* and *BamHI* and ligated into *EcoRI/BamHI*-digested pFRA $\Delta$  (for transcriptional fusions) and pRS1551 (for in-frame translational fusion). To generate *sdhC*<sub>258</sub> modifications, two independent PCR reactions were performed using *sdhC*<sub>258</sub> fusion as template with the following oligonucleotides: *sdhC*<sub>258</sub>MF (EM1291-EM195 and EM1292-EM194), *sdhC*<sub>39</sub>MJ (EM1415-EM195 and EM1416-EM194), *sdhC*<sub>258</sub>ML (EM1419-EM195 and EM1420-EM194), and *sdhC*<sub>258</sub>MH (EM1311-EM195 and EM1312-EM194). The two PCR products were then mixed to serve as template for a third PCR reaction (EM194-EM195). The resulting PCR product was then digested with *EcoRI* and *BamHI* and ligated into *EcoRI/BamHI*-digested pRS1551. The transcriptional and translational fusions were delivered as a single copy into the chromosome of different strains (see table S1) at the  $\lambda attI$  site, as described previously (Simons et al. 1987). Stable lysogens were screened for single insertion of recombinant  $\lambda$  by PCR (Powell et al. 1994).

Plasmids pFRA $\Delta$ -*sdhC*<sub>258</sub>-MS2, pFRA $\Delta$ -*sdhC*<sub>258</sub>MH-MS2 and pFRA $\Delta$ -*sdhC*<sub>258</sub>MF-MS2 contained the *sdhC*<sub>258</sub>, *sdhC*<sub>258</sub>MH or *sdhC*<sub>258</sub>MF RNA followed by the MS2 RNA aptamer and the T7 transcription terminator stemloop. The first control plasmid pFRA $\Delta$ -MS2 lacked *sdhC* RNA and the second control plasmid pFRA $\Delta$ -*sdhC*<sub>258</sub> lacked MS2 RNA aptamer.



Plasmids pFRΔ-*sdhC*<sub>258</sub>-MS2, pFRΔ-*sdhC*<sub>258</sub>MH-MS2 and pFRΔ-*sdhC*<sub>258</sub>MF-MS2 were generated by performing a PCR reaction using *sdhC*<sub>258</sub>-*lacZ*, *sdhC*<sub>258</sub>MH-*lacZ* and *sdhC*<sub>258</sub>MF-*lacZ* translational fusions as template with oligonucleotides EM194 and EM1651. The PCR product served as the template for a second PCR reaction with oligonucleotides EM194 and EM1576 which then served as template for a third PCR reaction with oligonucleotides EM194 and EM1577. Plasmid pFRΔ-MS2 was generated by performing a PCR reaction using *sdhC*<sub>258</sub>-*lacZ* transcriptional fusion as a template with oligonucleotides EM194 and EM1681. The PCR product served as template for a second PCR reaction with oligonucleotides EM194 and EM1576 which then served as template for a third PCR reaction with oligonucleotides EM194 and EM1577. Plasmid pFRΔ-*sdhC*<sub>258</sub> was generated by performing a PCR reaction using *sdhC*<sub>258</sub>-*lacZ* transcriptional fusion as template with oligonucleotides EM194 and EM1682 which then served as template for a second PCR reaction with oligonucleotides EM194 and EM1577. Resulting PCR products were digested with *EcoRI* and *BamHI* and ligated into *EcoRI/BamHI*-digested pFRΔ.

Plasmids pBAD-*spf* and pBAD-*rybB* were generated by a PCR reaction to produce promoter-less *spf* and *rybB* fragments with a *MscI* site upstream and an *EcoRI* site downstream with the following oligonucleotides, *spf* (EM468-EM469) and *rybB* (EM1384-EM1385). The PCR product was digested with *MscI* and *EcoRI* and ligated into *MscI/EcoRI*-digested pNM12. To generate *spot42*, *ryhB*, and *rybB* modifications, two independent PCR reactions were performed using pBAD-*spf*, pBAD-*ryhB*, pBAD-*ryhBMS* and pBAD-*rybB* plasmids as templates with the following oligonucleotides: *spot42*MF' (EM168-EM1310 and EM169-EM1309), *ryhB*MJ' (EM168-EM1439 and EM169-EM1438), *rybB*ML' (EM168-EM1443 and EM169-EM1442), *spf*MR (EM168-EM1497 and EM169-EM1496), *ryhBMS* (EM168-EM1499 and EM169-EM1498) and *ryhB*-LS4U/*ryhBMS*-LS4U (EM168-EM1778 and EM455-EM1777). The two PCR products were then mixed to serve as template for a third PCR reaction (EM168-EM169). The resulting PCR product was then digested with *MscI* and *EcoRI* and ligated into *MscI/EcoRI*-digested pNM12. pBAD-MS2 was generated by amplifying the MS2 RNA stemloops with oligonucleotides EM1738 (*MscI* restriction site) and EM1739 (*EcoRI* restriction site). The PCR product was then digested with *MscI* and *EcoRI* and ligated into *MscI/EcoRI*-digested pNM12. To generate MS2 tagged sRNA, PCR products were

generated with oligonucleotides EM1738-EM1739 using pBAD-*ryhB*, pBAD-*ryhBMS*, pBAD-*ryhB*-LS4U and pBAD-*ryhBMS*-LS4U plasmids as templates. The resulting PCR products were then digested with *EcoRI* and *SphI* and ligated into *EcoRI/SphI*-digested pBAD-MS2.

Plasmid pGD3 is a derivative of pBAD33 (Guzman et al. 1995) that has been mutagenized to insert a *XhoI* site at the -6 to -1 region of the +1 transcription start site. Two independent PCR reactions were performed using pGD3 plasmid as template with oligonucleotides EM168-EM1571 and EM455-EM1570. The two PCR products were then mixed to serve as template for a third PCR reaction (EM168-EM455). The resulting PCR product was then digested with *XhoI* and *EcoRI* and ligated into *XhoI/EcoRI*-digested pBAD33. Plasmid pGD3-*spf* was generated by a PCR reaction producing a promoter-less *spf* DNA fragment with a *XhoI* site upstream and an *EcoRI* site downstream (oligonucleotides EM1659-EM469). The PCR product was digested with *XhoI* and *EcoRI* and ligated into *XhoI/EcoRI*-digested pGD3.

#### *MS2-MBP protein purification*

Plasmid pHMM (Batey and Kieft. 2007) expressed a 59-kDa polypeptide His<sub>6</sub>-MS2-MBP which is composed of an N-terminal hexa-histidine tag, a central maltose-binding protein (MBP) domain, and a C-terminal MS2 coat protein. The construct was expressed in a BL21/pLysS strain and purification performed as described elsewhere (Batey and Kieft. 2007), with some modifications. His<sub>6</sub>-MS2-MBP fusion was first purified using a Ni-NTA agarose column (Qiagen) equilibrated with lysis buffer (50 mM sodium phosphate pH 8.0, 300 mM NaCl, 0.5% Tween-20, 10 mM imidazole, and 10% glycerol) and eluted with 250 mM imidazole. Protein-containing fractions were pooled and dialyzed against 25 mM Na<sup>+</sup>-MES (pH6.0) and 25 mM NaCl. His<sub>6</sub>-MS2-MBP fusion protein was further purified using an amylose column (NEB) equilibrated with column buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA) and eluted with 12 mM maltose. Protein-containing fractions were pooled and dialyzed against buffer A (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glycerol) prior to storage. Protein concentration was calculated using a molar extinction coefficient of 83,310 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> at a wavelength of 280 nm.

Table S1. strains and plasmids used in this study

Strain number	Relevant markers	Reference/source
EM1055	MG1655 $\Delta lac$ X174	(Masse and Gottesman. 2002)
EM1238	EM1055 $\Delta ryhB :: cat$	(Masse and Gottesman. 2002)
JAB023	EM1055 $\Delta spf :: cat$	This study
GD549	EM1055 $\Delta rybB :: kan$	This study
EM1057	EM1055 $\Delta dsrA :: cat$	(Sledjeski and Gottesman. 1995)
EM1451	EM1055 $\Delta ara714 leu^+$	(Desnoyers et al. 2009)
JB02	EM1055 $\Delta ara714 leu^+ \Delta spf :: cat$	EM1451 + P1 (JAB023)
GD524	EM1055 $\Delta araB :: kan \Delta spf :: cat rne131 zce-726 :: tn10$	This study
GD372	EM1055 $\Delta ara714 leu^+ \Delta spf :: cat \Delta ryhB :: tet$	This study
GD410	EM1055 $\Delta ara714 leu^+ \Delta spf :: cat \Delta ryhB :: tet \lambda SdhC_{258}$ -LacZ	GD372 + $\lambda pRS1551$ - <i>sdhC<sub>258</sub></i>
GD409	EM1055 $\Delta ara714 leu^+ \Delta spf :: cat \Delta ryhB :: tet \lambda sdhC_{258}$ -lacZ	GD372 + $\lambda pFR\Delta$ - <i>sdhC<sub>258</sub></i>
GD546	EM1055 $\lambda SdhC_{258}$ -LacZ	EM1055 + $\lambda pRS1551$ - <i>sdhC<sub>258</sub></i>
GD547	EM1055 $\Delta ryhB :: cat \lambda SdhC_{258}$ -LacZ	EM1238 + $\lambda pRS1551$ - <i>sdhC<sub>258</sub></i>
GD548	EM1055 $\Delta spf :: cat \lambda SdhC_{258}$ -LacZ	JAB023 + $\lambda pRS1551$ - <i>sdhC<sub>258</sub></i>
GD550	EM1055 $\Delta rybB :: kan \lambda SdhC_{258}$ -LacZ	GD549 + $\lambda pRS1551$ - <i>sdhC<sub>258</sub></i>
EM1265	EM1055 <i>hfq-1</i> :: $\Omega(kan;Bcl1)$	(Masse et al. 2003)
GD379	EM1055 $\Delta ara714 leu^+ \Delta spf :: cat \Delta ryhB :: tet hfq-1$ :: $\Omega(kan;Bcl1)$	GD372 + P1 (EM1265)
GD345	EM1055 $\Delta ara714 leu^+ \Delta spf :: cat \Delta ryhB :: tet \lambda SdhC_{258}mutF$ -LacZ	GD372 + $\lambda pRS1551$ - <i>sdhC<sub>258}mutF</sub></i>
GD482	EM1055 $\Delta ara714 leu^+ \Delta spf :: cat \Delta ryhB :: tet \lambda SdhC_{258}mutJ$ -LacZ	GD372 + $\lambda pRS1551$ - <i>sdhC<sub>258}mutJ</sub></i>
GD486	EM1055 $\Delta ara714 leu^+ \Delta spf :: cat \Delta ryhB :: tet \lambda SdhC_{258}mutL$ -LacZ	GD372 + $\lambda pRS1551$ - <i>sdhC<sub>258}mutL</sub></i>
GD394	EM1055 $\Delta ara714 leu^+ \Delta spf :: cat \Delta ryhB :: tet \lambda SdhC_{258}mutH$ -LacZ	GD372 + $\lambda pRS1551$ - <i>sdhC<sub>258}mutH</sub></i>
GD386	EM1055 $\Delta ara714 leu^+ \Delta spf :: cat \Delta ryhB :: tet hfq-1$ :: $\Omega(kan;Bcl1) \lambda SdhC_{258}$ -LacZ	GD410 + P1 (EM1265)
<b>Plasmids</b>	<b>Description</b>	<b>Reference/source</b>
pNM12	pBAD24 derivative	(Majdalani et al, 1998)
pBAD- <i>spf</i>	pNM12 + Spot42 (arabinose-inducible promoter)	This work

pBAD- <i>ryhB</i>	pNM12 + RyhB (arabinose-inducible promoter)	(Masse et al. 2003)
pBAD- <i>rybB</i>	pNM12 + RybB (arabinose-inducible promoter)	This work
pBAD- <i>spfMF'</i>	pNM12 + Spot42MF' (arabinose-inducible promoter)	This work
pBAD- <i>ryhBMJ'</i>	pNM12 + RyhBMJ' (arabinose-inducible promoter)	This work
pBAD- <i>rybBML'</i>	pNM12 + RybBML' (arabinose-inducible promoter)	This work
pBAD- <i>spfMR</i>	pNM12 + Spot42MR	This work
pBAD- <i>ryhBMS</i>	pNM12 + RyhBMS	This work
pBAD- <i>ryhB-LS4U</i>	pNM12 + RyhB-LS4U	This work
pBAD- <i>ryhBMS-LS4U</i>	pNM12 + RyhBMS-LS4U	This work
pBAD-MS2	pNM12 + MS2 RNA aptamer	This work
pBAD-MS2- <i>ryhB</i>	pBAD-MS2 + RyhB	This work
pBAD-MS2- <i>ryhBMS</i>	pBAD-MS2 + RyhBMS	This work
pBAD-MS2- <i>ryhB-LS4U</i>	pBAD-MS2 + RyhB-LS4U	This work
pBAD-MS2- <i>ryhBMS-LS4U</i>	pBAD-MS2 + RyhBMS-LS4U	This work
pFRA	pRS1553 derivative (for transcriptional fusions)	(Repoila and Gottesman. 2001)
pRS1551	Plasmid for construction of translational fusions	(Simons et al. 1987)
pGD3	pBAD33 derivative	This work
pGD3- <i>spf</i>	pGD3 + Spot42 (arabinose-inducible promoter)	This work
pFRA- <i>sdhC<sub>258</sub>-MS2</i>	pFRA + <i>sdhC<sub>258</sub></i> + MS2 RNA aptamer + T7 transcription terminator	This work
pFRA- <i>sdhC<sub>258</sub>MF-MS2</i>		
pFRA-MS2	pFRA + MS2 RNA aptamer + T7 transcription terminator	This work
pFRA- <i>sdhC<sub>258</sub></i>	pFRA + <i>sdhC<sub>258</sub></i> + T7 transcription terminator	This work

Table S2. Oligonucleotides used in this study.

Oligo number	Sequence 5' - 3'
EM88	TGTAATACGACTCACTATAGGGCGATCAGGAAGACCCTCGC
EM89	AAAAGCCAGCACCCGGCTGGC
EM107	CCGATGAATTCTAACTGTCCC GAATGAATTGGTC
EM131	TAATACGACTCACTATAGGGAGATTACCATACGAGGACTCCTG
EM132	TGTTAATCTGGACCTACAGACC
EM168	TCACACTTTGCTATGCCATAGC
EM169	CTGCAGGTCGACTCTAGAGG
EM190	TAATACGACTCACTATAGGGAGACAGCACCCGGCTGGCTAAG
EM191	CGATCAGGAAGACCCTCGC
EM194	GCCATAAACTGCCAGGAATTGG
EM195	CGGGCCTCTTCGCTA
EM293	TAATACGACTCACTATAGGGAGACGCTTTACGCCAGTAATTCC
EM294	CTCCTACGGGAGGCAGCAGT
EM311	TCTCTGAGATGTTTCGCAAGC
EM312	TAATACGACTCACTATAGGGAGATAAAAAACGCCCCAGTCATT
EM455	CAGGCTGAAAATCTTCTCTCATC
EM468	CCATGTAGGGTACAGAGGTAAGATG
EM469	GACTGAGAATTCCATTACGGATCTTTTCTTTCGC
EM635	TGTAATACGACTCACTATAGAACACATCAGATTTCTGGTG
EM636	AAATCCCGACCCTGAGGG
EM812	GTGCTTTCTGAACTGAACAAAAAAGAGTAAAGTTAGTCGCACCAGCAATAG ACATAAGCG
EM813	GGATCTTTTCTTTCGCCCAATAAAAAACGCCCCAGTCATTTGTGACGGAAGA TCACTTCG
EM1035	GCTAGGGATCCAGATTAACAGGTCTTTG
EM1037	TGTAATACGACTCACTATAGGGTCTCCGGAACACCCTGCAATCCCG
EM1262	CACGACGTTGTAAAACGACGGGATC
EM1263	ACATCATTGACTTTCAAATGCGAGTCAAATGCATTTTTTTTGCAAAAAGTGAC TCGACATCTTGGTTACCG
EM1264	TGGATAAATTGAGAACGAAAGATCAAAAAAAAAGCCAGCACCCGGCTGGCT CAAGAGGGTCATTATATTTCG
EM1291	AGAAAGTTAAGGTCTGTGCCCG
EM1292	CGGGCACAGACCTTAACTTTCT
EM1309	GTAGGGTACAGACCTAAGATGTTC
EM1310	GAACATCTTAGGTCTGTACCCTAC
EM1311	TCGCATCTGGTTCGAGTGTTTTGC
EM1312	GCAAAACACTCGAACCAGATGCGA
EM1382	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCCATCAACCTTGAACCGAA
EM1383	GCCACTGCTTTTCTTTGATG
EM1384	CCATGCCACTGCTTTTCTTTGATG

EM1385	GACTGAGAATTCGGGTTGCAGGGTAGTAGATA
EM1415	TAAGAACAGCTAGTGGGCGTTAT
EM1416	ATAACGCCCACTAGCTGTTCTTA
EM1419	GGAATAATAACTACAGCATGTG
EM1420	CACATGCTGTAGTTATTATTCC
EM1424	TGTAATACGACTCACTATAGGGCCACTGCTTTTCTTTGATG
EM1425	ACAAAAAACCCATCAACCTT
EM1438	CATTGCTCACTATGCTTCCAGT
EM1439	ACTGGAAGCATAGTGAGCAATG
EM1442	CCACTGCTTTAGTTTGATGTCCC
EM1443	GGGACATCAAATAAAGCAGTGG
EM1496	GTTAGTCGCGTACGCCACATGCTAAGATGTTCTAT
EM1497	ATAGAACATCTTAGCATGTGGGCGTACGCGACTAAC
EM1498	GAAAGCACGACAGGGUACAGAGGUUCTCCAGTATTAC
EM1499	GTAATACTGGAAGACCTCTGTACCCTGTCGTGCTTTC
EM1530	GGGCATCAGTCTTAATTAGTGCCACTGCTTTTCTTTGATGGTGTAGGCTGGA GCTGCTTC
EM1531	ACAAAAAACCCATCAACCTTGAACCGAAATGGCGGGGTTGCATATGAATAT CCTCCTTAG
EM1570	CTACTGTTTCTCGAGACCCG
EM1571	CGGGTCTCGAGAAACAGTAG
EM1576	CCCCAAGGGGTTATGCTAGCAGACCCTGATGGTGTCTGAAAAACGTACCCTG ATGGTGTACG
EM1577	GCTAGGGATCCCAAAAAACCCCTCAAGACCCGTTTAGAGGCCCAAGGGGT TATGCTAG
EM1651	CGTACCCTGATGGTGTACGTTACAGATTAACAGGTCTTTGTT
EM1659	GGGGCTCGAGGTAGGGTACAGAGGTAAGATG
EM1662	CAGACCCTGATGGTGTCTGAAAAACGTACCCTGATGGTGTACG
EM1679	GAAGTAAAAGGTCTGAAAGATAGAACATCTTACCTCTGTACCC
EM1681	CGTACCCTGATGGTGTACGTTACCTGGCGGCAGTATAGGCTGTTC
EM1682	CCCCAAGGGGTTATGCTAGTTACAGATTAACAGGTCTTTGTTTT
EM1696	GAATAACGCCACATGCTGTTCTTATTATTCCCTGGGGAC
EM1738	GACTGAGAATTCGCGATCAGGAAGACCCTCG
EM1739	ATGTATGGCATGCCGGATAAATTGAGAACGAAAGAT
EM1777	CAGTATTACTTAGCCAGCCCCCGGGTGGGGCTGGCTTTTGATCTTTCGTTCTC AATTTA
EM1778	TAAATTGAGAACGAAAGATCAAAAGCCAGCCCCACCCGGGGGCTGGCTAAG TAATACTG
EM1793	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTAGGGTACAGAGGTAAGATGTTCTATC
EM1794	TAAAAACGCCCCAGTCATTACTGACTGGG

**Table S3**

A list of all the RNA transcripts produced by T7 RNA polymerase *in vitro* transcription. Indicated are the final product (and its purpose), the oligonucleotides used to generate the DNA template by PCR and the DNA template used for the PCR.

<b>Final product</b>	<b>Oligonucleotides</b>	<b>DNA template</b>
<i>sdhC</i> (Northern blot probe)	EM131-EM132	Genomic DNA
<i>spot42</i> (Northern blot probe)	EM311-EM312	Genomic DNA
<i>ryhB</i> (Northern blot probe)	EM190-EM191	Genomic DNA
<i>rybB</i> (Northern blot probe)	EM1382-EM1383	Genomic DNA
16S rRNA (Northern blot probe)	EM293-EM294	Genomic DNA
<i>sdhC</i> <sub>258</sub> (PbAc probing/toeprinting)	EM1037-EM1262	<i>sdhC</i> <sub>258</sub> - <i>lacZ</i>
<i>sdhC</i> <sub>258</sub> MH (PbAc probing)	EM1037-EM1262	<i>sdhC</i> <sub>258</sub> MH- <i>lacZ</i>
Spot42 (PbAc probing/toeprinting)	EM1793-EM1794	Genomic DNA
RyhB (PbAc probing/toeprinting)	EM88-EM89	Genomic DNA
RybB (PbAc probing/toeprinting)	EM1424-EM1425	Genomic DNA
DsrA (PbAc probing/toeprinting)	EM635-EM636	Genomic DNA

## Supplementary References

Batey RT, Kieft JS. 2007. Improved native affinity purification of RNA. *RNA* **13** : 1384-1389

Desnoyers G, Morissette A, Prevost K, Masse E. 2009. Small RNA-induced differential degradation of the polycistronic mRNA iscRSUA. *EMBO J* **28** : 1551-1561

Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J. 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol* **177** : 4121-4130

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

Powell BS, Rivas MP, Court DL, Nakamura Y, Turnbough CL, Jr. 1994. Rapid confirmation of single copy lambda prophage integration by PCR. *Nucleic Acids Res* **22**: 5765-5766

Repoila F, Gottesman S. 2001. Signal transduction cascade for regulation of RpoS: temperature regulation of DsrA. *J Bacteriol* **183** : 4012-4023

Simons RW, Houman F, Kleckner N. 1987. Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* **53** : 85-96

Sledjeski D, Gottesman S. 1995. A small RNA acts as an antisilencer of the H-NS-silenced rcsA gene of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 2003-2007

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 5 : DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Au moment de leur découverte en 1984, les petits ARNs bactériens constituaient le premier exemple de régulation de la traduction en *trans* par un mécanisme antisens (Mizuno *et al.*, 1984). Depuis ce temps, il fut démontré que ce type de régulation joue des rôles cruciaux tant chez les bactéries que chez les plantes et les métazoaires. Même s'ils divergent quant aux mécanismes moléculaires qu'ils emploient pour réprimer post-transcriptionnellement l'expression des gènes, les petits ARNs procaryotes (sRNAs) et eucaryotes (microRNAs) ont tous deux comme action de bloquer la traduction ou d'entraîner la dégradation des ARNm ciblés.

Chez les procaryotes, les bases du mécanisme d'action canonique par lequel les sRNAs peuvent réprimer la traduction et induire une dégradation rapide de l'ARNm sont relativement bien connues (section 4.3, introduction). Cependant, depuis environ 5 ans, des indices nous suggèrent que des mécanismes alternatifs existent aussi. Plus particulièrement, plusieurs sRNAs ciblent des régions se trouvant à l'extérieur du SLR des ARNm.

En plus d'approfondir nos connaissances sur le mécanisme d'action canonique des sRNAs, les travaux que j'ai effectués au cours de mes études graduées ont permis de caractériser quelques-uns de ces mécanismes alternatifs. De manière intéressante, j'ai eu la chance de travailler sur les deux principaux aspects de la régulation sRNA-dépendante; la répression de la traduction et la dégradation des ARNm cibles. Dans la présente discussion, je discuterai des principales leçons que mes travaux et ceux d'autres groupes de recherche nous apprennent sur les mécanismes d'action utilisés par les sRNAs, nous permettant d'actualiser les modèles de répression traductionnelle et de dégradation de l'ARNm par les petits ARNs bactériens. Je discuterai aussi d'observations et conclusions qui peuvent être tirées à partir de mes résultats, mais dont nous n'avons pas discuté dans les chapitres 2, 3 et 4.

### 1. Répression de la traduction par les petits ARNs.

Au cours des dernières années, plusieurs études à grandes échelles ont permis de découvrir des dizaines de cibles potentielles pour certains sRNAs (Masse *et al.*, 2005; Papenfort *et*

*al.*, 2010; Beisel et Storz, 2011; Sharma *et al.*, 2011). La plupart de ces ARNm semblent régulés par le mécanisme canonique de répression traductionnelle décrit précédemment (voir section 4.3 de l'introduction). En effet, l'appariement des sRNAs est majoritairement prédit ou démontré pour s'effectuer sur le SLR des ARNm cibles. Cependant, il semble maintenant clair qu'un certain nombre de ces ARNm sont régulés par des mécanismes qui n'impliquent pas un appariement directement sur le SLR, suggérant des mécanismes alternatifs. Quelques-uns de ces mécanismes ont été décrits récemment (Darfeuille *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2007; Vecerek *et al.*, 2007) et sont présentés dans la section 4.3.1 de l'introduction.

### 1.1 Rôle direct de Hfq dans la répression traductionnelle

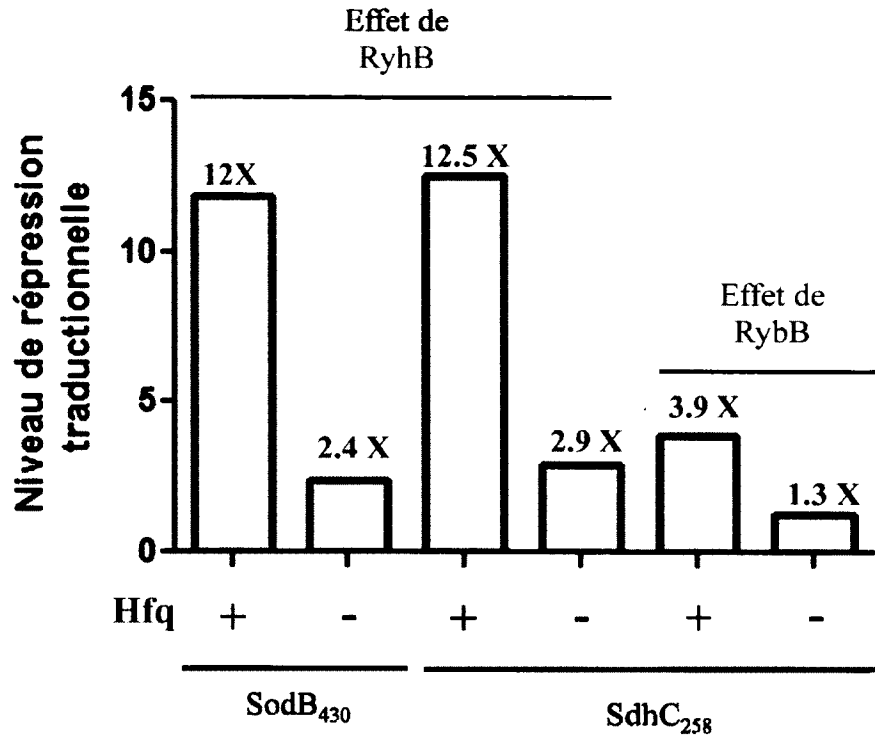
Mes travaux de recherche ont eux aussi permis la caractérisation d'un nouveau mécanisme de répression traductionnelle utilisé par un sRNA s'appariant loin en amont du SLR de sa cible (chapitre 4). Plus spécifiquement, je démontre que le petit ARN Spot42 réprime la traduction de l'ARNm *sdhC* en s'appariant quelque 45 nucléotides en amont du SLR, excluant toute possibilité de compétition directe avec la sous-unité 30S du ribosome. Conséquemment, mes résultats démontrent que le sRNA Spot42 est incapable de réprimer à lui seul la liaison de la sous-unité ribosomale 30S sur l'ARNm (Figure 5, chapitre 4). Ce rôle revient plutôt à la protéine Hfq qui est recrutée à proximité du SLR par Spot42 et qui agit comme répresseur de traduction (Figure 9, chapitre 4).

Il s'agit d'un nouveau rôle pour Hfq, qui n'avait jamais été démontré pour être directement impliqué dans la répression traductionnelle dans un contexte sRNA-dépendant. En effet, le seul rôles connus de Hfq étaient dans la stabilisation des petits ARNs (Sledjeski *et al.*, 2001; Moller *et al.*, 2002) alors qu'un rôle dans l'appariement sRNA-mRNA n'a été démontré que de manière *in vitro* (Moller *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002; Geissmann et Touati, 2004; Kawamoto *et al.*, 2006). De plus, il fût suggéré récemment qu'un autre sRNA s'appariant loin en amont du SLR de sa cible pourrait lui aussi réprimer la traduction en recrutant la protéine Hfq sur une séquence A/U riche situé à proximité du SLR (De Lay et Gottesman, 2012), indiquant que ce mécanisme pourrait être répandu. Dans ce cas, le petit ARN ArcZ, exprimé en conditions aérobiques, réprime l'expression du gène *flhD*, impliqué dans la biosynthèse des flagelles. De manière intéressante, le site d'appariement de ArcZ

sur *fhfD* se situe 47 nucléotides en amont du codon d'initiation de la traduction alors qu'un site potentiel d'appariement pour Hfq se situe à proximité du SLR. Malheureusement, le mécanisme précis de répression traductionnelle n'a pas été étudié dans cette étude.

Ce caractère essentiel de Hfq pour la répression traductionnelle médié par des sRNAs s'appariant à l'extérieur du SLR est différent de ce qui est connu dans le cas de petits ARNs s'appariant directement sur le SLR de leurs cibles ARNm. En effet, il semblerait que la protéine chaperon jouerait un rôle plus accessoire dans ce cas. Par exemple, il fut démontré que le sRNA SgrS, qui s'apparie directement sur le SLR de l'ARNm *ptsG*, est capable de réprimer la traduction de cet ARNm sans l'aide de la protéine Hfq *in vitro* (Maki *et al.*, 2008). Les résultats que j'ai obtenus avec les sRNAs RyhB et RybB, qui sont eux aussi capables de réprimer la liaison de la sous-unité ribosomale 30S sans l'aide de la protéine Hfq (Figure 5, chapitre 4), vont dans le même sens. Dans le cas de la régulation *in vivo*, plusieurs des résultats présentés dans cette thèse suggèrent eux aussi une non-essentialité de la protéine Hfq pour la répression traductionnelle médiée pour des sRNAs régulant leurs cibles par le modèle canonique. C'est le cas de la répression de *sodB* par RyhB (Figure 3D, chapitre 3) et de *sdhC* par RyhB et RybB (Figure 6B, chapitre 4). En effet, ces répressions restent toujours possibles dans des souches  $\Delta hfq$ .

Il est cependant important de noter que dans les trois cas de répression traductionnelle en absence de Hfq mentionnés ci-haut, les niveaux de répressions ne sont pas aussi importants que dans une souche sauvage (Figure 9). Cette diminution du niveau de répression en absence de Hfq est possiblement due aux rôles que joue la protéine dans la stabilisation des sRNAs ou dans la facilitation de l'appariement aux ARNm.



**Figure 9. Effet de Hfq sur la répression traductionnelle médiée par RyhB et RybB**

Niveau de répression traductionnelle exercé par RyhB et RybB sur les fusions traductionnelles SodB<sub>430</sub>-LacZ et SdhC<sub>258</sub>-LacZ en présence ou absence de Hfq mesuré par essai  $\beta$ -galactosidase. Ce graphique est fait à partir des données de la figure 3 du chapitre 3 et de la figure 6 du chapitre 4.

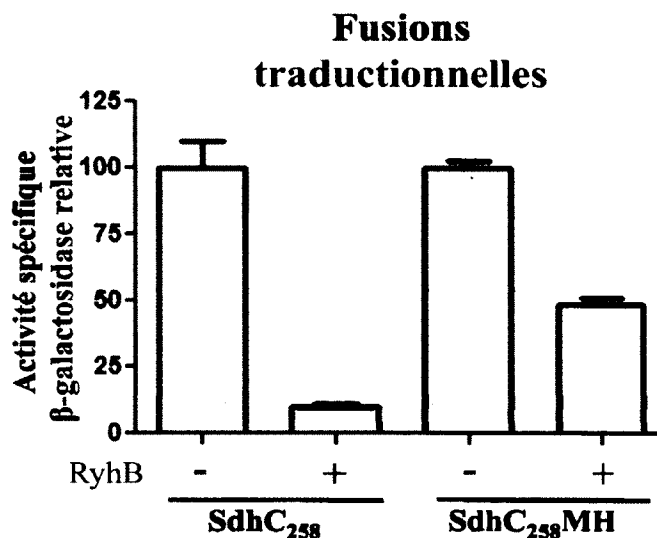
Cependant, je crois qu'il n'est pas exclu que Hfq participe aussi directement à la répression traductionnelle dans le cas de sRNAs s'appariant directement sur le SLR. Il pourrait y avoir un effet additif du petit ARN et de Hfq dans la compétition avec la liaison de la sous-unité ribosomale 30S ce qui permettrait une répression plus robuste de la traduction.

En effet, quelques données me permettent de penser qu'Hfq pourrait jouer un plus grand rôle que ce qui est actuellement connu dans la répression traductionnelle. Premièrement, la liaison de Hfq à proximité du SLR est connue pour réprimer la traduction dans au moins deux situations : la régulation sRNA-dépendante de l'ARNm *sdhC* (voir chapitre 4) et l'autorégulation de l'ARNm *hfq* (Vecerek *et al.*, 2005). Deuxièmement, des données de co-immunoprécipitation de Hfq combinées à du séquençage à haut débit indiquent que plus de 1000 ARNm sont liés par la protéine *in vivo* (Sittka *et al.*, 2008; Chao *et al.*, 2012). Troisièmement, un article publié récemment démontre la nécessité de la présence d'un site

de liaison de Hfq à proximité du site d'appariement du sRNA sur un ARNm pour obtenir une répression traductionnelle (Beisel *et al.*, 2012). En effet, le retrait d'un site de liaison pour la protéine Hfq a pour effet de rendre une cible ARNm résistant à l'action de sRNAs alors que l'ajout d'un tel site peut faire devenir sensible à l'expression d'un sRNA un ARNm précédemment non-cible.

De manière intéressante, la protéine Hfq lie préférentiellement les séquences A/U riches (Schumacher *et al.*, 2002). Or, ce type de séquence est aussi connu pour faciliter la traduction de plusieurs ARNm, probablement car elle est reconnue par la protéine ribosomale S1 (Section 2.1.1, introduction). Ainsi, en compétitionnant avec la protéine S1 pour les sites A/U riches présents dans la RNT 5' des ARNm, Hfq pourrait réprimer la traduction.

Comme mes résultats l'indiquent dans le cas de l'ARNm *sdhC*, la mutation de la séquence A/U riche lié par Hfq (SdhC<sub>258</sub>MH) a aussi pour effet de diminuer de 4 fois le niveau de base de traduction de la fusion traductionnelle avec le gène rapporteur lacZ (Figure S4, chapitre 4). Cela suggère fortement que cette séquence A/U riche agit aussi comme activateur de la traduction. Conséquemment, dans une souche  $\Delta hfq$ , nous observons une augmentation significative de l'activité de la fusion traductionnelle SdhC<sub>258</sub>MH en absence de sRNAs, suggérant que la protéine a un rôle répressif sur la traduction de *sdhC*. Il est donc permis de penser que même en s'appariant directement sur le SLR de *sdhC*, les petits ARNs RyhB et RybB pourraient utiliser la liaison de Hfq sur la séquence A/U riche pour augmenter la robustesse à de la répression traductionnelle. De manière intéressante, des résultats non publiés que j'ai obtenus vont dans ce sens et indiquent que la séquence A/U riche présente à proximité du SLR de *sdhC* est nécessaire pour obtenir une répression maximale par RyhB (Figure 10).

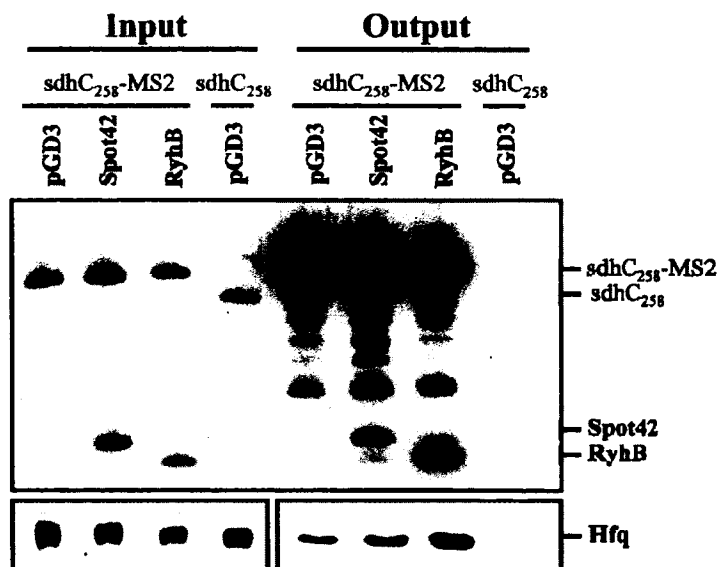


**Figure 10. Répression traductionnelle de *sdhC* par RyhB en absence du site de liaison à Hfq.**

Effet de RyhB sur l'activité des fusions traductionnelles SdhC<sub>258</sub>-LacZ et SdhCMH<sub>258</sub>-LacZ (site de liaison de Hfq muté, voir figure 1 du chapitre 4) mesuré par essai  $\beta$ -galactosidase relativisé à l'activité  $\beta$ -galactosidase en absence de RyhB. Voir la section «material & methods du chapitre 4 pour les détails expérimentaux.

De plus, le recrutement de Hfq à la RNT 5' d'un ARNm par un sRNA ne semble pas un phénomène unique aux sRNAs s'appariant à l'extérieur du SLR. En effet, des résultats de purification par affinité avec l'ARN *sdhC*<sub>258</sub>-MS2 indiquent que la liaison de RyhB entraîne elle aussi un recrutement de Hfq dans la RNT 5' de *sdhC* (Figure 11).

L'ensemble de ces résultats et observations suggèrent fortement que la protéine Hfq pourrait jouer un rôle actif dans la répression traductionnelle médié par les petits ARNs bactériens, comme je l'ai démontré dans le cas de la régulation de *sdhC* par Spot42. Ce rôle a cependant été difficile à prouver jusqu'à maintenant, car il est impossible dans une souche  $\Delta hfq$  de différencier des effets potentiels de la protéine sur la traduction des effets sur la stabilité et l'appariement sRNA-mRNA. L'utilisation de la purification par affinité avec un ARN fusionné à la séquence MS2 que nous avons développé pourrait cependant nous aider grandement (voir plus bas).



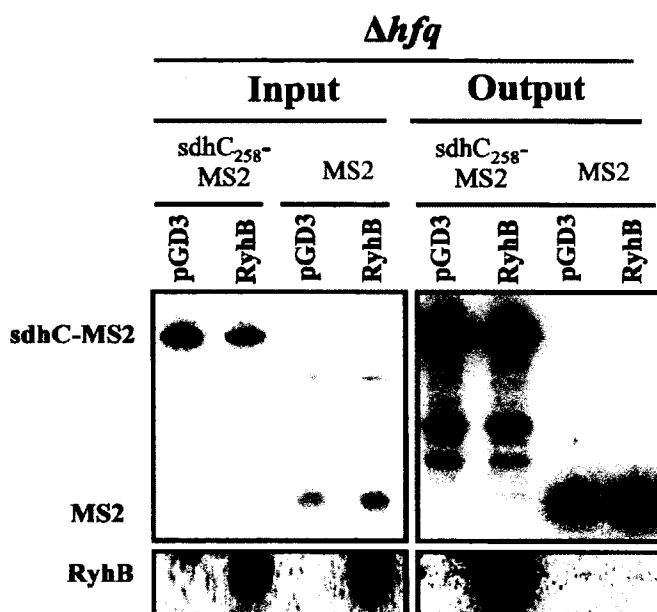
**Figure 11. Recrutement de Hfq par RyhB et Spot42 au SLR de *sdhC*.**

Purification d'affinité avec la construction *sdhC*<sub>258</sub>-MS2. Des buvardages de type Northern et Western ont été effectués sur des échantillons prélevés avant (Input) et après (Output) la purification d'affinité (voir la section «material & methods» du chapitre 4 pour des détails expérimentaux). Ce résultat démontre qu'à la fois Spot42 et RyhB entraînent un recrutement de la protéine Hfq à la RNT 5' de *sdhC* lorsqu'ils s'y appariaient. Une expérience contrôle a aussi été effectuée avec la construction *sdhC*<sub>258</sub> (sans MS2) pour démontrer la spécificité de la méthode.

### 1.2 Hfq n'est pas essentielle à l'appariement sRNA-mRNA *in vivo*

Selon moi, un des résultats les plus intéressants du chapitre 4 est la démonstration que Spot42 s'apparie à la RNT 5' de *sdhC* même en absence du site de liaison de Hfq ou dans une souche  $\Delta hfq$ . Avec les techniques de laboratoire qui étaient disponibles jusqu'à tout récemment, il était impossible de déterminer si la perte de répression par un sRNA dans une souche  $\Delta hfq$  était due à une instabilité accrue du sRNA, une diminution de l'appariement à sa cible ou à un rôle potentiel joué par Hfq dans la compétition avec la liaison des ribosomes. Cependant, avec la méthode de purification d'affinité d'un ARN fusionné à la séquence MS2 (Figure S8, chapitre 4) que nous avons mis au point au laboratoire, il est maintenant possible de s'attaquer à cette question. Il serait intéressant d'utiliser cette approche pour déterminer si Hfq joue aussi un rôle direct dans la répression de sRNAs s'appariant directement sur le SLR d'un ARNm.

Ainsi, un résultat non publié que j'ai obtenu au laboratoire va dans ce sens. En effet, je démontre que RyhB peut toujours s'apparier sur la RNT 5' de *sdhC* dans une souche  $\Delta hfq$  (Figure 12). Or, comme indiqué précédemment, l'effet de RyhB sur la traduction de SdhC est de 4 fois plus faible dans une souche  $\Delta hfq$  que dans une souche sauvage (Figure 9). Cette diminution d'efficacité dans la répression traductionnelle en absence de Hfq malgré un appariement efficace suggère fortement un rôle actif de la protéine chaperon dans la compétition avec les ribosomes.



**Figure 12. Appariement de RyhB à *sdhC* en absence de Hfq.**

Purification d'affinité avec la construction *sdhC*<sub>258</sub>-MS2 dans une souche  $\Delta hfq$ . Un buvardage Northern a été effectué sur des échantillons prélevés avant (Input) et après (Output) la purification d'affinité (voir la section «material & methods» du chapitre 4 pour des détails expérimentaux). Ce résultat démontre que le sRNA RyhB s'apparie fortement sur la région 5' de *sdhC* en absence de la protéine Hfq. Une expérience contrôle a aussi été effectuée avec la séquence MS2 seule pour démontrer la spécificité de la méthode.

Ce résultat et celui présenté à la figure S9 du chapitre 4 constituent les premières preuves que la protéine Hfq n'est pas nécessaire *in vivo* à l'appariement d'un sRNA à sa cible. Ceci est contraire à ce qui avait été suggéré sur la base de résultats *in vitro* (Moller *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002; Geissmann et Touati, 2004; Kawamoto *et al.*, 2006). Il est important de souligner que le fait que Hfq ne soit pas essentielle à l'appariement sRNA-mRNA ne signifie pas que la protéine ne facilite pas cet appariement.

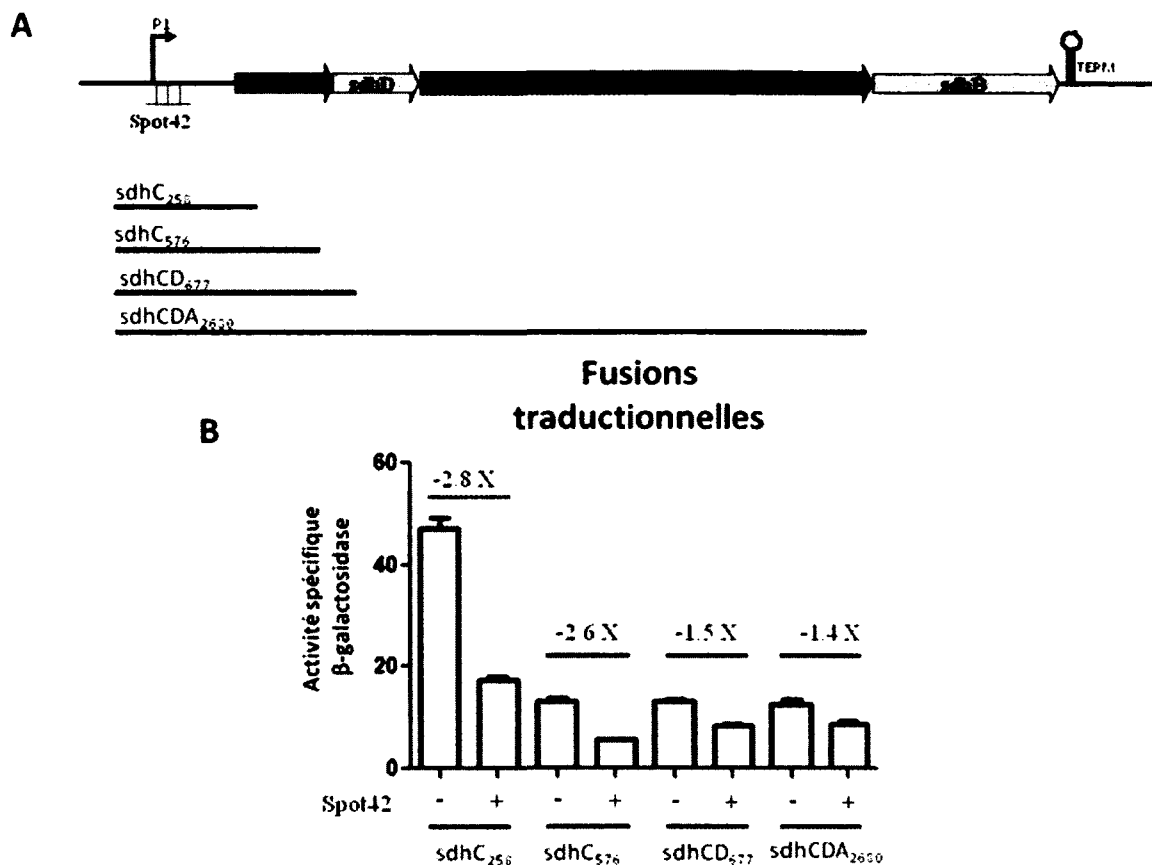


### 1.3 Effet polaire d'un sRNA sur la traduction d'un ARN polycistronique

Mes résultats démontrent la capacité qu'ont les petits ARNs bactériens à réguler l'expression d'ARNm polycistroniques. Dans le cas où le sRNA entraîne une dégradation active de sa cible, on peut s'attendre à voir une diminution de l'expression de tous les gènes contenus sur l'ARNm polycistronique. C'est le cas de RyhB et RybB qui entraînent une dégradation rapide et de l'ARNm *sdhCDAB* (Figure 3A du chapitre 4). En effet, des résultats de micropuce à ADN indiquent que l'expression de RyhB et de RybB entraîne une diminution des niveaux d'ARNm des quatre gènes de l'opéron *sdhCDAB* (Masse *et al.*, 2005; Papenfort *et al.*, 2006). C'est aussi en partie le cas de l'effet de RyhB sur l'opéron *iscRSUA*, qui provoque une diminution des niveaux d'ARNm des trois cistrons situés en 3' du site d'appariement du sRNA (Masse *et al.*, 2005; Desnoyers *et al.*, 2009).

Cependant, dans le cas d'un sRNA qui influence la traduction d'un ARNm sans entraîner sa dégradation rapide, il est permis de se demander si la répression sera observée sur tous les gènes du polycistron. Il existe chez les procaryotes un mécanisme de couplage traductionnel entre les différents cistrons d'un ARNm polycistronique dans le but d'assurer la présence en quantités équimolaires des différentes protéines encodées par un polycistron (Oppenheim et Yanofsky, 1980; Schumperli *et al.*, 1982). Ce mécanisme est basé sur le fait que les ribosomes terminant la traduction du premier cistron se retrouvent à proximité du SLR du deuxième cistron ce qui augmente de la concentration en ribosome à cet endroit. De plus, l'activité hélicase du ribosome traduisant le cistron situé en amont peut défaire des structures secondaires dans l'ARNm et faciliter l'accès au SLR du deuxième cistron.

Aucune donnée publiée n'est disponible quant à savoir si la traduction des différents cistrons de l'opéron *sdhCDAB* est couplée. Cependant, des résultats que j'ai obtenus semblent indiquer que la répression de la traduction observée sur *sdhC* par Spot42 se fait aussi sentir sur les cistrons situés en aval. En effet, j'ai construit des fusions traductionnelle de différentes longueurs entre l'opéron *sdhCDAB* et le gène rapporteur *lacZ* (voir la section *material & methods* du chapitre 4 pour les détails) qui nous permettent de mesurer l'effet qu'a Spot42 sur les cistrons *sdhC*, *sdhD* et *sdhA* (Figure 13).



**Figure 13. Effet de Spot42 sur la traduction de *sdhC*, *sdhD* et *sdhA*.**

(A) Représentation graphique de différentes constructions avec le gène de la β-galactosidase. Ces fusions, dites traductionnelles, permettent de mesurer indirectement les niveaux de traductions d'ARNm fusionnés. (B) Résultat d'essais β-galactosidase (voir material & methods, chapitre 4 pour les détails expérimentaux) démontrant l'effet de Spot42 sur les cistrons *sdhC*, *sdhD* et *sdhA*.

Même si Spot42 a été démontré pour s'apparier sur la RNT 5' de *sdhC*, nous pouvons constater que son effet sur la traduction se fait aussi sentir sur les cistrons *sdhD* et *sdhA*. Ceci est probablement expliqué par le fait que les cadres de lectures *sdhC* et *sdhD* se chevauchent de 7 nucléotides alors que les cadres de lectures *sdhD* et *sdhA* se chevauchent de 1 nucléotide, suggérant un couplage traductionnel.

Ainsi, il semble qu'en réprimant la traduction d'un cistron sur un ARNm polycistronique, un sRNA est capable d'influencer la traduction des cistrons situés en aval. Cependant, il est à noter que la force de la répression diminue à mesure que l'on s'éloigne du site

d'appariement de Spot42. La dégradation rapide de l'ARNm polycistronique permet quant à elle une régulation plus robuste sur toute la longueur du polycistron.

## 2. Mécanisme de dégradation de l'ARNm par un petit ARN bactérien.

La répression traductionnelle d'un ARNm par un sRNA est très souvent associée à la dégradation rapide de l'ARNm. Cependant, jusqu'à tout récemment, les étapes subséquentes menant à cette dégradation restaient grandement inconnues. Depuis environ 2 à 3 ans, quelques études ont jeté un éclairage nouveau sur le mécanisme de la dégradation de l'ARNm sRNA-dépendante. Entre autres, nos travaux ont démontré que les sites de clivage utilisés par la RNase E suivant son recrutement par un sRNA se situent souvent dans le cadre de lecture de l'ARNm (chapitre 3). De plus, nous avons démontré que certaines structures présentent dans l'ARNm peuvent permettre la protection de certaines régions d'un ARNm et permettre la dégradation partielle d'un ARNm polycistronique par un petit ARN (chapitre 2).

### 2.1 Dégradation active sRNA-dépendante d'un ARNm

Depuis plusieurs années, il est bien connu qu'une fois que sa traduction est inhibée par un sRNA, l'ARNm cible est souvent dégradé très rapidement (Masse *et al.*, 2003). Aussi, le rôle protecteur qu'à la traduction sur la stabilité des ARNm, dus au fait que les ribosomes empêchent aux RNases l'accès à l'ARNm, est bien caractérisé (Dreyfus, 2009). Ainsi, il était permis de se demander si l'effet de déstabilisation de l'ARNm par les sRNAs est simplement un effet secondaire de l'arrêt de la traduction ou s'il s'agit d'un mécanisme actif. Des résultats démontrant que la région N-terminale de la RNase E (essentielle à la formation du dégradosome ARN) est nécessaire à la dégradation rapide d'un ARNm par un sRNA suggéraient déjà qu'il s'agit d'un mécanisme actif (Masse *et al.*, 2003; Morita *et al.*, 2005). Cependant, les résultats présentés au chapitre 3 démontrent hors de tout doute que l'effet des sRNAs sur la stabilité des ARNm ne dépend pas seulement de l'arrêt de la traduction.

En effet, nos résultats *in vivo* et *in vitro* démontrent que le site de clivage initial de la RNase E dans l'ARNm de trois cibles de RyhB (*sodB*, *fumA* et *iscS*) se situe dans le cadre de lecture, loin en aval des sites de liaison du sRNA (figure 1 et 2 du chapitre 3). Les

résultats que j'ai obtenus sur la régulation de l'opéron *sdhCDAB* par RyhB et RybB vont aussi dans ce sens. En effet, une fusion transcriptionnelle contenant les 39 premiers codons du cadre de lecture *sdhC* est résistante à la dégradation sRNA-dépendante (Figure 2B, chapitre 4) alors que l'ARNm pleine longueur ne l'est pas (Figure 3A, chapitre 4). Ainsi, les sites de clivage présent dans tous ces ARNm se trouvent à être protégés par les ribosomes lorsqu'il y a traduction active et l'on pourrait croire que le fait d'arrêter la traduction serait suffisant pour entraîner une dégradation rapide de l'ARNm.

Cependant, nos résultats démontrent aussi, au moins dans le cas de RyhB, que l'action du sRNA n'est pas uniquement de bloquer la traduction. En effet, même si l'insertion d'un codon d'arrêt de traduction au début du cadre de lecture de *sodB* entraîne une diminution des niveaux d'ARNm, la présence de RyhB est nécessaire pour observer une dégradation rapide et totale de l'ARNm (Figure 6, chapitre 3). Additionné au fait que le dégradosome ARN et la protéine Hfq (Figure 3, chapitre 3) soient nécessaires pour obtenir une dégradation rapide de *sodB* par RyhB, il est permis de croire que le recrutement du dégradosome ARN sur une cible ARNm favorise une dégradation rapide de celle-ci lorsque les ribosomes ne camouflent plus le site de clivage de la RNase E. Ainsi, à la fois l'arrêt de la traduction et le recrutement du dégradosome ARN seraient nécessaires à la dégradation rapide d'un ARNm de façon sRNA-dépendante. Les résultats présentés au chapitre 4 (figure 4 et 6) indiquent que la demi-vie de l'ARNm *sodB*<sub>430UAA30</sub> dont la traduction est inhibée est d'environ 12 minutes alors que l'expression de RyhB entraîne une dégradation de *sodB* en 5 à 7 minutes. Le recrutement du dégradosome ARN par RyhB permet donc de diminuer deux fois plus rapidement les niveaux d'ARNm *sodB* comparativement à si il ne bloquait seulement que sa traduction. Mise à l'échelle d'*E.coli*, qui a un temps de dédoublement d'environ 20 minutes, cette différence de 5 à 7 minutes permet probablement à la cellule de récupérer les nucléotides plus rapidement et de conserver son énergie pour d'autres tâches métaboliques.

Dans la même direction, j'ai aussi démontré que la formation du dégradosome ARN et la protéine Hfq sont essentielles à la dégradation partielle de l'ARNm *iscRSUA* (Figures 3B et 3C, chapitre 2) et à la dégradation totale de l'ARNm *sdhCDAB* par RyhB et RybB (Figures 3B et S6, chapitre 4).

Il est cependant important de noter que l'arrêt de la traduction d'une autre cible de RyhB, *fumA*, est suffisant pour entraîner la disparition totale de l'ARNm (Figure 6C, chapitre 3). Cependant, la diminution dans les niveaux d'ARNm lorsque nous ajoutons un codon d'arrêt de la traduction ne dépend pas du site de clivage de la RNase E identifiée dans le cadre de lecture de *fumA* (figure 2, chapitre 3), suggérant un mécanisme différent de la déstabilisation RyhB-dépendante. Une possibilité intéressante est que l'arrêt de la traduction dans *fumA* par l'ajout du codon-stop entraînerait un arrêt de transcription Rho-dépendant. Ce mécanisme est utilisé par la cellule pour interrompre la transcription d'ARNm non traduits (Richardson, 1991). Nos résultats ne permettent pas de savoir si cette diminution RyhB-indépendante dans les niveaux d'ARNm de *fumA* s'effectue aussi rapidement que lorsqu'un sRNA recrute le dégradosome ARN sur sa cible. En effet, le fait que la traduction de la construction *fumA*<sub>399UAA30</sub> (codon-stop au début du cadre de lecture) soit inactive de manière constitutive rend impossible de faire des expériences de cinétique. Ainsi, le rôle de mécanismes comme l'arrêt de transcription Rho-dépendante dans le cas de répression traductionnelle accompagnée d'un recrutement du dégradosome ARN reste obscur. Cependant, l'arrêt de transcription Rho-dépendante a récemment été démontré comme étant impliqué dans la répression d'un ARNm par un sRNA (Bossi *et al.*, 2012). Dans cette étude, il fut démontré que le facteur Rho entraînait un arrêt de transcription de l'opéron *chiPQ* lorsque le petit ARN ChiX inhibe la traduction de *chiP*. Il serait intéressant d'étudier le rôle de Rho dans le cas de répression traductionnelle médiée par d'autres sRNAs en vérifiant les niveaux de l'ARNm cible dans une souche  $\Delta rho$ .

Finalement, il est important de souligner qu'un mécanisme alternatif de dégradation de l'ARNm par des sRNAs a récemment été caractérisé. En effet, il semblerait que certains sRNAs s'apparieraient directement dans le cadre de lecture de leurs cibles ARNm pour guider un clivage de la RNase E à quelques nucléotides de ce site d'appariement (Pfeiffer *et al.*, 2009; Bandyra *et al.*, 2012). Cette action nécessiterait que le 5' du petit ARN soit sous la forme monophosphorylée (5'-P) (Bandyra *et al.*, 2012). Le clivage serait stimulé grandement par la présence de ce 5'-P qui est connu pour activer l'action de la RNase E (Mackie, 1998). Quelques articles parus récemment suggèrent que plusieurs sRNAs cibleraient le cadre de lecture d'ARNm cible pour entraîner leurs dégradations (Papenfort *et al.*, 2010; Corcoran *et al.*, 2012; Frohlich *et al.*, 2012). Cependant, dans le cas de la

régulation de *sodB*, *iscS* et *sdhC*, il est bien établi que l'appariement des sRNAs s'effectue directement sur le SLR ou en amont de celui-ci et que le site de clivage de la RNase E se situe plusieurs nucléotides en aval, excluant le mécanisme de ciblage du cadre de lecture. La présence de deux mécanismes distincts pouvant mener à la dégradation d'un ARNm par un sRNA peut théoriquement permettre à un sRNA de cibler une plus grande variété d'ARNm. En effet, en raison des contraintes de séquences nucléotidiques liées aux signaux d'initiation de la traduction (séquence Shine-Dalgarno, codon d'initiation, site de liaison de la protéine S1), la séquence des RNT 5' n'offre peut-être pas une diversité de séquences suffisante pour satisfaire les besoins régulationnelles d'un sRNA. De plus, le fait de cibler le cadre de lecture permettrait de réguler des ARNm possédant des RNT 5' très courtes ou même inexistantes. Il est cependant important de noter qu'en raison de l'activité hélicase du ribosome, il est probablement nécessaire que le niveau de traduction d'un ARNm ciblé dans son cadre de lecture soit faible pour permettre la liaison du sRNA et le clivage initial.

## 2.2 Dégrader ou pas un ARNm?

Comme la répression traductionnelle médiée par un sRNA est habituellement accompagnée par une dégradation rapide de l'ARNm, la méthode par excellence pour découvrir des cibles potentielles d'un sRNA consiste à mesurer les variations dans les niveaux d'ARNm par des méthodes à grande échelle (micropuce à ADN, séquençage à haut débit) suivant l'expression d'un sRNA donné. Cette méthode a été utilisée pour de nombreux sRNAs et a permis de découvrir des centaines de cibles potentielles. Cependant, de par sa nature même, cette méthode ne permet pas de détecter des ARNm pour lesquelles seule la traduction serait affectée. Or, récemment, plusieurs exemples de cible dont seulement la traduction est modulée ont été découverts (Salvail *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2011; Beisel *et al.*, 2012). De plus, comme ces cibles ne sont pas identifiables par des méthodes mesurant les variations dans les niveaux d'ARNm, il est fort possible que leur importance soit sous-estimée. Pour trouver les cibles potentielles d'un sRNA donné qui seraient régulées seulement au niveau de la traduction, l'utilisation d'une méthode appelée «polysome profiling» pourrait s'avérer très utile (Melamed et Arava, 2007). Cette technique consiste à sédimenter sur un gradient de sucrose les ribosomes pour ensuite déterminer quels ARNs sont hautement traduits (fraction polysomale, plus lourde) ou moins traduits (fraction

monosomale, moins lourde) par micropuce à ARN ou séquence à haut débit. En mesurant les changements dans les populations d'ARNm hautement traduit ou peu traduit suivant l'expression d'un sRNA, il serait possible de trouver des cibles dont seulement la traduction est influencée par l'expression du sRNA. Pour s'assurer que les effets observés sont directs, il serait préférable d'effectuer ce genre d'expérience quelques minutes seulement après l'expression du sRNA.

Cependant, peu importe leur nombre, la présence d'ARNm ciblé uniquement au niveau de la traduction nous pousse à se demander ce qui les différencie des ARNm rapidement dégradés.

De manière intéressante, les résultats que j'ai obtenus sur la régulation de l'ARNm *sdhCDAB* nous permettent peut-être de répondre à cette question. Alors que RyhB et RybB sont capables de causer une dégradation rapide (moins de 2 min) de l'ARNm de manière dégradosome ARN-dépendante, Spot42 ne fait qu'entraîner une dégradation passive de l'ARNm (visible après 30 min) qui ne dépend pas du dégradosome ARN (voir figure 3 du chapitre 4). Or, ces trois sRNAs sont capables de réprimer la traduction de *sdhC* (figure 2, chapitre 4). Cette différence quant à l'effet sur la dégradation de l'ARNm n'est pas due à la nature même du sRNA. En effet, Spot42 est connu pour entraîner une dégradation rapide de certains ARNm ciblés (Beisel et Storz, 2011) alors que certaines cibles de RyhB sont réprimées seulement au niveau traductionnel (Salvail *et al.*, 2010). De plus, les petits ARNs chimériques Spot42MR et RyhBMS ont un effet inverse que leurs versions sauvages (figure 7, chapitre 4).

Je crois plutôt que ce qui explique la différence quant à la dégradation de l'ARNm est que certains sRNAs répriment la traduction plus faiblement que d'autres. Ainsi, les sRNAs ayant l'effet le plus fort sur la traduction (RyhB, RybB et Spot42MR) entraînent une dégradation rapide de l'ARNm alors que les sRNAs ayant un effet plus faible sur la traduction (Spot42 et RyhBMS) ne le font pas. Comme le site de clivage de la RNase E dans l'ARNm *sdhC* se trouve dans le cadre de lecture, une traduction résiduelle résultant d'une répression traductionnelle plus faible pourrait encore permettre la protection du site de clivage par les ribosomes.

Une autre raison pourrait elle aussi expliquer pourquoi certaines cibles ARNm sont rapidement dégradées suivant l'expression d'un sRNA alors que d'autres ne le sont pas. Nos résultats démontrent que les sites de clivage RNase E-dépendant ne se trouvent pas en grand nombre dans un ARNm. Par exemple, les 400 premiers nucléotides de *sodB* et les 300 premiers nucléotides de *fumA* n'en contiennent pas (Figure 1 et 2, chapitre 3). Plus important encore, le fait de changer la séquence d'un de ces sites de clivages rend résistant un ARNm à la dégradation rapide par un sRNA (Figure 5, chapitre 3) alors que l'ajout d'un tel site à un ARNm résistant le rend sensible (Figure 4, chapitre 3).

Ainsi, compte tenu de leur rareté relative et de leur rôle essentiel dans la dégradation sRNA-dépendante, nous pouvons penser que plusieurs ARNm chez *E. coli* ne contiennent pas de site de clivage de la RNase E dans leur séquence ce qui les rend insensible à la dégradation (mais non à la répression traductionnelle). Pour l'instant, tous les déterminants qui font qu'un site est reconnu par la RNase E et un autre pas ne sont pas connus. Nous savons seulement que l'enzyme a une préférence pour les sites A/U riches et que le contexte structurel autour de cette séquence est important. Lorsque nous aurons une idée précise de ce qu'est un site de clivage RNase E, nous pourrons probablement prédire quels ARNm seront sensibles à la dégradation rapide, lorsque ciblée par un sRNA.

### 2.3 Dégradation partielle d'un ARNm par un sRNA

Les résultats présentés au chapitre 2 mettent en lumière un nouveau moyen utilisé par les bactéries pour moduler l'expression des gènes en réponse à un stress environnemental. En effet, nous démontrons que l'expression du sRNA RyhB entraîne une dégradation partielle de l'ARNm polycistronique *iscRSUA*, permettant à la bactérie d'exprimer seulement une portion des gènes présents sur l'ARNm lors d'une carence en fer. Au niveau mécanistique, mes travaux de recherche démontrent la coordination possible entre un sRNA, la machinerie de dégradation de l'ARN et des structures intrinsèques à l'ARNm dans le but de moduler l'expression des gènes. Ainsi, les résultats que j'ai obtenus nous ont permis de proposer le modèle présenté à la figure 8 du chapitre 2. Le sRNA RyhB s'apparie directement sur le SLR de l'ARNm *iscS* ce qui entraîne une dégradation de la section 3' de l'ARNm, encodant les gènes *iscS*, *iscU* et *iscA*. Cependant, la région 5' de l'ARNm encodant pour le facteur de transcription *IscR* est protégée contre la dégradation par une



séquence REP située dans la région intergénique entre *iscR* et *iscS* qui forme une structure secondaire stable (voir figure 4A du chapitre 2). Même si le rôle dans la stabilisation de l'ARNm des structures REP était connu depuis plusieurs années (section 3.3, introduction), notre étude constitue la première démonstration du rôle que ses structures peuvent jouer dans la régulation post-transcriptionnelle médiée par les sRNAs. Il est intéressant de noter que l'ARNm contenant seulement *iscR* est aussi présent en petite quantité lorsque RyhB n'est pas exprimé (voir figure 1 du chapitre 2). Ceci est probablement dû au fait que lors de la dégradation de l'ARNm *iscRSUA* en conditions normales (en absence de RyhB), la structure REP se forme tout de même et stabilise la région 5' de l'ARNm, lui procurant une demi-vie plus longue. La formation de la structure REP en absence de RyhB (ou Hfq) est d'ailleurs soutenue par mes résultats de la figure 4A.

Au moment de la publication de mes résultats en 2009 (Desnoyers *et al.*, 2009), le mécanisme de dégradation de l'ARNm *iscRSUA* n'était pas entièrement résolu. Une des questions les plus importantes à résoudre était à savoir comment le fragment d'ARN contenant le cadre de lecture *iscR* est produit. Nos résultats de 3' RACE (technique permettant de caractériser le 3' d'un ARN *in vivo*) nous avaient permis d'apprendre que le fragment d'ARN *iscR* produit suite à l'expression de RyhB se termine immédiatement en aval de la tige P2 de la structure de la séquence intergénique entre *iscR* et *iscS* (voir figure 4 du chapitre 2). De manière intéressante, le 3' d'*iscR* se retrouve quelques nucléotides en amont du site d'appariement de RyhB sur le SLR d'*iscS*, tel que caractérisé à la figure 6.

Une des hypothèses possibles était que l'appariement de RyhB sur le SLR d'*IscS* entraîne un clivage local dans la RNT 5' d'*IscS*. En effet, comme indiqué précédemment, une étude publiée très récemment démontre que l'appariement d'un sRNA sur une cible peut guider la RNase E à effectuer un clivage au site de liaison du sRNA (Bandyra *et al.*, 2012).

Cependant, à la lumière de résultats que j'ai obtenus plus tard au laboratoire (Figure 2, chapitre 3), le mécanisme utilisé par RyhB pour déstabiliser la portion 3' de l'opéron en est un impliquant un clivage dans le cadre lecture d'*IscS*, en amont du site de liaison de RyhB. En effet, les résultats que j'ai obtenus indiquent qu'une fusion transcriptionnelle (voir la section material & methods du chapitre 3 pour les détails) entre les 687 premiers

nucléotides du polycistron *iscRSUA* et le gène rapporteur *lacZ* (appelé *iscRS<sub>687</sub>*) est insensible à la dégradation RyhB-dépendante (figure 2B du chapitre 3) alors qu'une fusion plus longue (*iscRS<sub>1268</sub>*) est sensible. Ceci suggère fortement que le clivage initial dans l'ARNm *iscS* se situe entre les nucléotides 687 et 1268, alors que l'appariement de RyhB se fait aux nucléotides 643 à (voir figure 6 du chapitre 2 et figure S2 du chapitre 3). Le clivage ne se fait donc pas localement, mais en amont dans le cadre de lecture par le mécanisme discuté à la section 2.1 du présent chapitre.

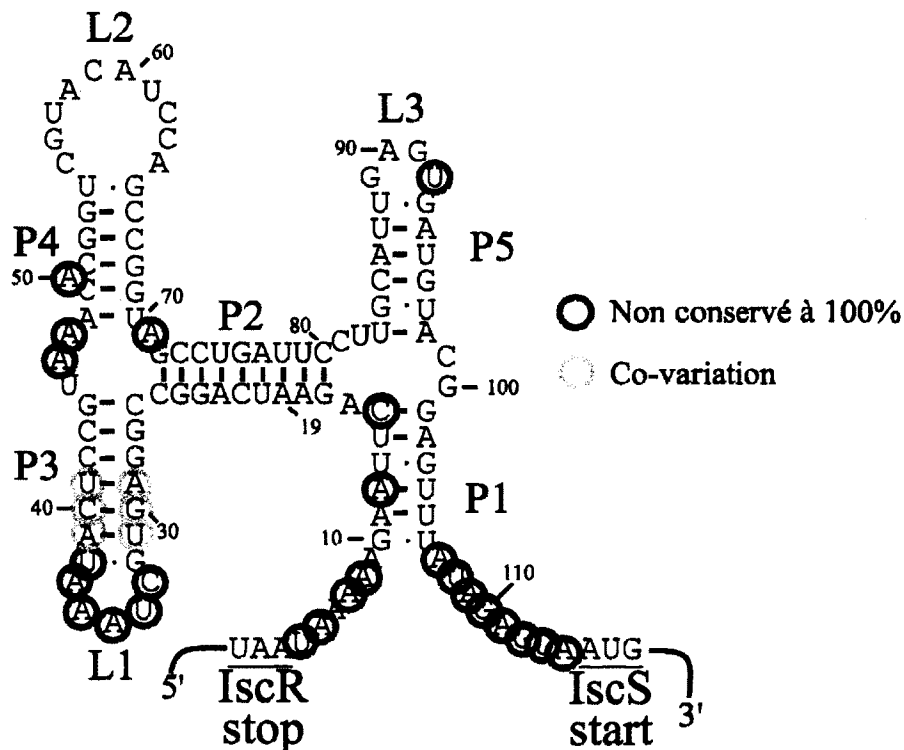
Un autre élément intéressant quant au mécanisme de dégradation de l'ARNm *iscRSUA* est la nécessité de ce mécanisme envers la portion N-terminale de la RNase E (Figure 3B, chapitre 2). En effet, lors de l'induction d'une carence en fer par l'addition de dipyridyl (chélateur de fer) dans une souche *rne131*, nous observons une accumulation importante de l'ARNm *iscRSUA*, mais peu d'accumulation de l'ARNm *iscR*. Plus intéressant encore, nous observons le même résultat dans une souche *rne131* que dans un double mutant *rne131/ΔryhB*, indiquant que le sRNA RyhB n'a pas d'effet sur l'ARNm *iscRSUA* en absence du dégradosome ARN. De manière intéressante, la portion N-terminale de la RNase E (absente dans l'allèle *rne131*) a aussi été démontrée récemment comme interagissant avec Hfq (Morita *et al.*, 2005), une interaction est essentielle au recrutement du dégradosome ARN par un sRNA sur sa cible d'ARNm (Ikeda *et al.*, 2011). Conséquemment, mes résultats démontrent que dans une souche *Δhfq*, RyhB perd son effet sur l'ARNm *iscRSUA* (figure 3B du chapitre 2). Il est donc plausible de penser qu'en s'appariant sur le SLR d'IscS, RyhB, en plus de bloquer la traduction, recrute le dégradosome ARN par la protéine chaperon Hfq.

Avec ces nouveaux résultats et observations, il est permis de penser que le mécanisme de dégradation partielle de l'ARNm polycistronique est le suivant : l'appariement de RyhB sur le SLR d'IscS entraîne une répression traductionnelle par le mécanisme canonique décrit à la section 4.3 de l'introduction. De plus, grâce à l'interaction Hfq-RyhB, il y a recrutement du dégradosome ARN permettant un clivage de la RNase E dans le cadre de lecture d'IscS, dénudé de ribosomes. La portion 3' de l'ARNm polycistronique est alors dégradée rapidement suite à la formation d'un 5'-P par le clivage de la RNase E. Cependant, l'action de la PNPase (enzyme du dégradosome ARN responsable de la dégradation de l'ARN dans

la direction 3'-5) est probablement arrêtée lorsqu'elle arrive au pied de la structure dans l'ARN de la séquence intergénique entre *iscR* et *iscS*. En effet, il est connu que la PNPase peut être inhibée par la présence de structures secondaires fortes dans l'ARN (Py *et al.*, 1996). Comme l'addition d'une queue poly(A) par l'enzyme PAP1 est nécessaire à la dégradation de structure d'ARN issus de séquences REP (Khemici et Carpousis, 2004), il est fort possible que cet enzyme soit requis pour dégrader l'ARNm *iscR*. Cependant, la structure REP cause un délai suffisant dans la dégradation d'*iscR* pour permettre l'accumulation de l'ARNm (Figure 1, chapitre 2) et de la protéine (Figure 7, chapitre 2).

### 2.3.1 Conservation du mécanisme de dégradation partielle d'un ARNm

Lorsque l'on regarde la conservation de la séquence intergénique située entre les gènes *iscR* et *iscS*, nous pouvons constater une très grande homologie de séquence parmi les espèces du genre *Enterobacteriaceae* (figure 14). Plus spécifiquement, il est facile de constater que la tige P2, au pied de laquelle la dégradation est arrêtée, est conservée à 100 % au niveau de sa séquence. Cette observation est aussi vraie pour les tiges P3, P4 et P5, qui sont conservées au niveau de leur séquence ou de leur structure.



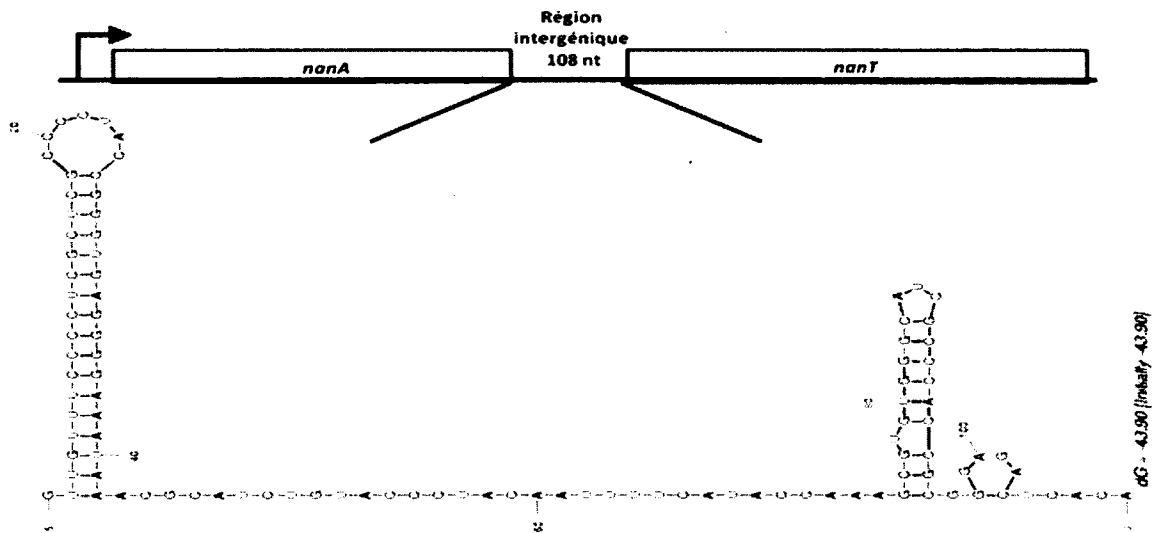
**Figure 14. Conservation de la séquence intergénique située entre les gènes *iscR* et *iscS*.**

La figure est une représentation de la structure prédite chez *E. coli*. La conservation entre les espèces bactériennes *E. coli*, *Shigella dysenteria*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter koseri* et *Enterobacter sp* est iniquée.

Chez toutes les espèces bactériennes mentionnées, la séquence présentée dans la figure 14 se trouve entre des homologues des gènes *iscR* et *iscS*, suggérant qu'elle pourrait jouer un rôle comparable de protection contre la dégradation. Cependant, excepté chez *E. coli*, la régulation de l'opéron *iscRSUA* (ou son homologue) n'a pas été étudiée et il est impossible de savoir si un mécanisme de dégradation partielle existe et si celui-ci est contrôlé par l'action d'un sRNA comme RyhB. Cependant, parmi les bactéries énumérées dans la figure 9, il est intéressant de noter que l'on retrouve des homologues de RyhB chez *S. dysenteria*, *S. sonnei* et *S. typhimurium* (chez qui il y a deux homologues de RyhB). La haute conservation de la structure intergénique située entre *iscR* et *iscS* et la présence de RyhB chez plusieurs bactéries suggèrent que l'on pourrait retrouver ce mécanisme ailleurs.

Maintenant, sortons du contexte de l'opéron *iscRSUA* et regardons la possibilité de retrouver d'autres exemples de dégradation partielle d'un ARNm polycistronique induit par un sRNA. Premièrement, il faut rappeler que mes recherches (Desnoyers *et al.*, 2009) constituaient le premier exemple de ce genre. À ce jour, aucun autre exemple n'a été caractérisé. Cependant, lorsque l'on sait que les séquences REP sont présentes sur environ 25 % de toutes les unités de transcriptions (Higgins *et al.*, 1982; Stern *et al.*, 1984), il est facile de penser que d'autres exemples de dégradation partielle d'un ARNm polycistronique par un sRNA existent. Par exemple, un article paru récemment démontre que le sRNA Spot42 entraîne une diminution de plus de 4X des niveaux d'ARNm de *nanT* (Beisel et Storz, 2011) alors que les niveaux du cistron situé en amont sur le même ARNm, *nanA*, ne sont pas affectés significativement. De manière intéressante, lorsque l'on regarde l'organisation de cet ARNm, on remarque la présence d'une région intergénique de 108 nucléotides qui possède des séquences palindromiques pouvant former une structure secondaire très forte dans l'ARNm (voir figure 15). Cette structure pourrait empêcher la progression des 3'exonucléases et expliquer pourquoi Spot42 ne semble pas avoir d'effet sur les niveaux d'ARNm de *nanA*.

Avec le nombre croissant d'ARNm qui sont démontrés comme étant régulés post-transcriptionnellement par des sRNAs et l'omniprésence de séquence REP dans les génomes d'*E. coli* et autres entérobactéries, on peut s'attendre à retrouver d'autres exemples de coopération entre ces éléments pour permettre la discoordination d'opérons.



**Figure 15. Présence potentielle d'une séquence REP dans l'ARNm *nanAT***

Représentation d'une portion de l'ARNm polycistronique *nanATEK* montrant la présence d'une région non traduite de 108 nucléotides entre les cistrons *nanA* et *nanT* formant possiblement des structures tige-boucles fortes. La structure secondaire de l'ARN est prédite avec le logiciel mfold.

### 3. Conclusions

Lorsque j'ai entrepris mes études supérieures en 2007, les mécanismes d'action canonique des petits ARN bactériens étaient relativement bien connus. En effet, il était bien établi que ceux-ci s'appariaient directement sur le SLR de leurs cibles, entraînant une répression de leur traduction. De plus, il avait été observé que cette répression traductionnelle était très souvent accompagnée par une dégradation rapide de l'ARNm.

Cependant, au cours 5 dernières années, une série d'études ont permis de démontrer que les sRNAs peuvent réguler l'expression de leurs gènes par des mécanismes alternatifs. Les travaux que j'ai effectués au cours de mes études graduées ont grandement contribué à la découverte de ces mécanismes non canoniques. Ainsi, il est maintenant clair que les sRNAs peuvent s'apparier loin en amont du SLR d'un ARNm pour réguler sa traduction. De plus, nous avons démontré que le site de clivage initial de la RNase E dans les ARNm cibles, nécessaire à la dégradation rapide de ceux-ci, se situe très souvent dans le cadre de lecture de la cible. Ainsi, en bloquant la traduction, les sRNAs rendent ce site de clivage accessible à la RNase E. Il semble cependant que le recrutement du dégradosome ARN par la protéine Hfq soit lui aussi nécessaire à une dégradation rapide de l'ARNm. De manière intéressante, nous avons aussi démontré qu'il est possible pour un sRNA d'entraîner une dégradation seulement partielle d'un ARNm. En effet, des structures intrinsèques à l'ARNm peuvent freiner l'action des RNases, protégeant ainsi certaines régions de l'ARNm. Ce mécanisme permet à la cellule de discoordoner l'expression d'un opéron en réponse aux stress environnementaux.

La caractérisation de ces mécanismes alternatifs révèle des facettes insoupçonnées de la régulation par les petits ARNs bactériens. En effet, il semble que des séquences et structures présentes dans l'ARNm, tels les séquences REP, les sites de clivage pour la RNase E et les sites de liaison de Hfq, ont une importance primordiale sur la régulation et peuvent en changer complètement l'issue.

Ainsi, à la lumière de ces nouvelles connaissances, je crois qu'il serait envisageable de créer des petits ARNs bactériens pouvant cibler un gène d'intérêt. Les composantes nécessaires à cette régulation sont la présence d'une complémentarité d'environ 7 à 10 nucléotides entre un sRNA et sa cible et la présence d'un site de liaison de la protéine Hfq sur le sRNA et dans la RNT 5' de l'ARNm. De plus, il est hautement préférable que l'appariement du sRNA s'effectue directement sur le SLR de la cible pour une répression plus robuste. La proximité du site de liaison de la protéine Hfq et du SLR devrait aussi grandement augmenter le niveau de répression. Finalement, la région ciblée par le petit ARN sur l'ARNm devrait être principalement simple brin pour faciliter l'appariement. La combinaison de ces connaissances pour désigner un petit ARN synthétique avec l'utilisation d'un promoteur inductible pourrait permettre d'étudier le rôle de gènes essentiels et s'avérer très utile en recherche fondamentale.

## REMERCIEMENTS

Premièrement, je tiens à remercier mon directeur de recherche, Eric Massé. Depuis mes débuts au laboratoire, j'ai progressé énormément en tant que scientifique et je le dois en grande partie à lui. Il a su me superviser lorsque c'était nécessaire et me laisser beaucoup d'autonomie lorsque j'étais prêt. De plus, la passion d'Eric pour la science est contagieuse. Elle a fait de mon temps au laboratoire une période très stimulante. Finalement, Eric a toujours été très disponible pour moi. Son influence sur ma formation aura été énorme et je l'en remercie beaucoup.

Je tiens aussi à remercier Karine Prévost et Jean-François Jacques, qui ont su faciliter mes études graduées grâce à leur travail acharné et leurs précieux conseils. Je remercie aussi Hubert Salvail, avec qui j'ai cheminé tout au long de mes études et avec qui s'est développé une saine compétition assortie d'entraide. Je veux aussi remercier tous les autres membres du laboratoire, plus particulièrement Mélina Arguin, Julie-Anna Benjamin, Marie-Pier Caron, François Lavoie, Audrey Morissette et Marie-Pier Bouchard, qui ont fait de mes études graduées une période des plus agréables. Merci aussi aux différents stagiaires qui m'ont aidé dans mes recherches (Julie Bergeron et Kathy Doyon).

Je remercie aussi les professeurs François Bachand, François Malouin et Pascale Romby qui ont accepté d'évaluer cette thèse.

Je remercie aussi ma conjointe, Geneviève Mallet, qui m'a soutenu tout au long de l'écriture de cette thèse.

Finalement, je tiens à remercier mes parents, Michel et Nicole, qui m'ont toujours soutenu au cours de mes études graduées, facilitant grandement mon cheminement.





## LISTE DES PUBLICATIONS

Alifano, P., F. Rivellini, C. Piscitelli, C. M. Arraiano, C. B. Bruni and M. S. Carlomagno (1994). "Ribonuclease E provides substrates for ribonuclease P-dependent processing of a polycistronic mRNA." Genes Dev **8**(24): 3021-3031.

Altuvia, S. (2007). "Identification of bacterial small non-coding RNAs: experimental approaches." Curr Opin Microbiol **10**(3): 257-261.

Altuvia, S., D. Weinstein-Fischer, A. Zhang, L. Postow and G. Storz (1997). "A small, stable RNA induced by oxidative stress: role as a pleiotropic regulator and antimutator." Cell **90**(1): 43-53.

Argaman, L., R. Hershberg, J. Vogel, G. Bejerano, E. G. Wagner, H. Margalit and S. Altuvia (2001). "Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*." Curr Biol **11**(12): 941-950.

Arnold, T. E., J. Yu and J. G. Belasco (1998). "mRNA stabilization by the ompA 5' untranslated region: two protective elements hinder distinct pathways for mRNA degradation." RNA **4**(3): 319-330.

Bachelier, S., J. M. Clement and M. Hofnung (1999). "Short palindromic repetitive DNA elements in enterobacteria: a survey." Res Microbiol **150**(9-10): 627-639.

Bandyra, K. J., N. Said, V. Pfeiffer, M. W. Gorna, J. Vogel and B. F. Luisi (2012). "The Seed Region of a Small RNA Drives the Controlled Destruction of the Target mRNA by the Endoribonuclease RNase E." Mol Cell.

Bardwell, J. C., P. Regnier, S. M. Chen, Y. Nakamura, M. Grunberg-Manago and D. L. Court (1989). "Autoregulation of RNase III operon by mRNA processing." EMBO J **8**(11): 3401-3407.

Bazzini, A. A., M. T. Lee and A. J. Giraldez (2012). "Ribosome profiling shows that miR-430 reduces translation before causing mRNA decay in zebrafish." Science **336**(6078): 233-237.

Beinert, H. (2000). "Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises." J Biol Inorg Chem **5**(1): 2-15.

Beisel, C. L. and G. Storz (2011). "The base-pairing RNA spot 42 participates in a multioutput feedforward loop to help enact catabolite repression in *Escherichia coli*." Mol Cell **41**(3): 286-297.

Beisel, C. L. and G. Storz (2011). "Discriminating tastes: Physiological contributions of the Hfq-binding small RNA Spot 42 to catabolite repression." RNA Biol **8**(5).

- Beisel, C. L., T. B. Updegrave, B. J. Janson and G. Storz (2012). "Multiple factors dictate target selection by Hfq-binding small RNAs." EMBO J **31**(8): 1961-1974.
- Bernstein, J. A., A. B. Khodursky, P. H. Lin, S. Lin-Chao and S. N. Cohen (2002). "Global analysis of mRNA decay and abundance in Escherichia coli at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(15): 9697-9702.
- Bernstein, J. A., P. H. Lin, S. N. Cohen and S. Lin-Chao (2004). "Global analysis of Escherichia coli RNA degradosome function using DNA microarrays." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(9): 2758-2763.
- Beyer, D., E. Skripkin, J. Wadzack and K. H. Nierhaus (1994). "How the ribosome moves along the mRNA during protein synthesis." J Biol Chem **269**(48): 30713-30717.
- Boni, I. V. (2006). "[Diverse molecular mechanisms for translation initiation in prokaryotes]." Mol Biol (Mosk) **40**(4): 658-668.
- Bossi, L., A. Schwartz, B. Guillemardet, M. Boudvillain and N. Figueroa-Bossi (2012). "A role for Rho-dependent polarity in gene regulation by a noncoding small RNA." Genes Dev **26**(16): 1864-1873.
- Bouvier, M., C. M. Sharma, F. Mika, K. H. Nierhaus and J. Vogel (2008). "Small RNA binding to 5' mRNA coding region inhibits translational initiation." Mol Cell **32**(6): 827-837.
- Brennan, R. G. and T. M. Link (2007). "Hfq structure, function and ligand binding." Curr Opin Microbiol **10**(2): 125-133.
- Callaghan, A. J., J. P. Aurikko, L. L. Ilag, J. Gunter Grossmann, V. Chandran, K. Kuhnel, L. Poljak, A. J. Carpousis, C. V. Robinson, M. F. Symmons and B. F. Luisi (2004). "Studies of the RNA degradosome-organizing domain of the Escherichia coli ribonuclease RNase E." J Mol Biol **340**(5): 965-979.
- Callaghan, A. J., M. J. Marcaida, J. A. Stead, K. J. McDowall, W. G. Scott and B. F. Luisi (2005). "Structure of Escherichia coli RNase E catalytic domain and implications for RNA turnover." Nature **437**(7062): 1187-1191.
- Carpousis, A. J. (2007). "The RNA degradosome of Escherichia coli: an mRNA-degrading machine assembled on RNase E." Annu Rev Microbiol **61**: 71-87.
- Carpousis, A. J., G. Van Houwe, C. Ehretsmann and H. M. Krisch (1994). "Copurification of E. coli RNAase E and PNPase: evidence for a specific association between two enzymes important in RNA processing and degradation." Cell **76**(5): 889-900.
- Celesnik, H., A. Deana and J. G. Belasco (2007). "Initiation of RNA decay in Escherichia coli by 5' pyrophosphate removal." Mol Cell **27**(1): 79-90.

- Chandran, V., L. Poljak, N. F. Vanzo, A. Leroy, R. N. Miguel, J. Fernandez-Recio, J. Parkinson, C. Burns, A. J. Carpousis and B. F. Luisi (2007). "Recognition and cooperation between the ATP-dependent RNA helicase RhlB and ribonuclease RNase E." J Mol Biol **367**(1): 113-132.
- Chao, Y., K. Papenfort, R. Reinhardt, C. M. Sharma and J. Vogel (2012). "An atlas of Hfq-bound transcripts reveals 3' UTRs as a genomic reservoir of regulatory small RNAs." EMBO J.
- Chen, S., E. A. Lesnik, T. A. Hall, R. Sampath, R. H. Griffey, D. J. Ecker and L. B. Blyn (2002). "A bioinformatics based approach to discover small RNA genes in the Escherichia coli genome." Biosystems **65**(2-3): 157-177.
- Coburn, G. A., X. Miao, D. J. Briant and G. A. Mackie (1999). "Reconstitution of a minimal RNA degradosome demonstrates functional coordination between a 3' exonuclease and a DEAD-box RNA helicase." Genes Dev **13**(19): 2594-2603.
- Cohen, S. N. and K. J. McDowall (1997). "RNase E: still a wonderfully mysterious enzyme." Mol Microbiol **23**(6): 1099-1106.
- Corcoran, C. P., D. Podkaminski, K. Papenfort, J. H. Urban, J. C. Hinton and J. Vogel (2012). "Superfolder GFP reporters validate diverse new mRNA targets of the classic porin regulator, MicF RNA." Mol Microbiol **84**(3): 428-445.
- Croxen, M. A. and B. B. Finlay (2010). "Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity." Nat Rev Microbiol **8**(1): 26-38.
- Darfeuille, F., C. Unoson, J. Vogel and E. G. Wagner (2007). "An antisense RNA inhibits translation by competing with standby ribosomes." Mol Cell **26**(3): 381-392.
- Davis, B. M., M. Quinones, J. Pratt, Y. Ding and M. K. Waldor (2005). "Characterization of the small untranslated RNA RyhB and its regulon in Vibrio cholerae." J Bacteriol **187**(12): 4005-4014.
- De Lay, N. and S. Gottesman (2012). "A complex network of small noncoding RNAs regulate motility in Escherichia coli." Mol Microbiol.
- de Smit, M. H. and J. van Duin (1990). "Secondary structure of the ribosome binding site determines translational efficiency: a quantitative analysis." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(19): 7668-7672.
- Deana, A., H. Celesnik and J. G. Belasco (2008). "The bacterial enzyme RppH triggers messenger RNA degradation by 5' pyrophosphate removal." Nature **451**(7176): 355-358.
- Desnoyers, G., A. Morissette, K. Prevost and E. Masse (2009). "Small RNA-induced differential degradation of the polycistronic mRNA iscRSUA." EMBO J **28**(11): 1551-1561.

- Deutscher, M. P. (2006). "Degradation of RNA in bacteria: comparison of mRNA and stable RNA." Nucleic Acids Res **34**(2): 659-666.
- Donovan, W. P. and S. R. Kushner (1986). "Polynucleotide phosphorylase and ribonuclease II are required for cell viability and mRNA turnover in Escherichia coli K-12." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(1): 120-124.
- Draper, D. E. and L. P. Reynaldo (1999). "RNA binding strategies of ribosomal proteins." Nucleic Acids Res **27**(2): 381-388.
- Dreyfus, M. (2009). "Killer and protective ribosomes." Prog Mol Biol Transl Sci **85**: 423-466.
- Dreyfus, M. and P. Regnier (2002). "The poly(A) tail of mRNAs: bodyguard in eukaryotes, scavenger in bacteria." Cell **111**(5): 611-613.
- Feng, Y. and S. N. Cohen (2000). "Unpaired terminal nucleotides and 5' monophosphorylation govern 3' polyadenylation by Escherichia coli poly(A) polymerase I." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(12): 6415-6420.
- Fischbach, M. A., H. Lin, D. R. Liu and C. T. Walsh (2006). "How pathogenic bacteria evade mammalian sabotage in the battle for iron." Nat Chem Biol **2**(3): 132-138.
- Folichon, M., V. Arluison, O. Pellegrini, E. Huntzinger, P. Regnier and E. Hajasdorf (2003). "The poly(A) binding protein Hfq protects RNA from RNase E and exoribonucleolytic degradation." Nucleic Acids Res **31**(24): 7302-7310.
- Fontecave, M. (2006). "Iron-sulfur clusters: ever-expanding roles." Nat Chem Biol **2**(4): 171-174.
- Franze de Fernandez, M. T., L. Eoyang and J. T. August (1968). "Factor fraction required for the synthesis of bacteriophage Qbeta-RNA." Nature **219**(5154): 588-590.
- Frohlich, K. S., K. Papenfort, A. A. Berger and J. Vogel (2012). "A conserved RpoS-dependent small RNA controls the synthesis of major porin OmpD." Nucleic Acids Res **40**(8): 3623-3640.
- Geissmann, T., S. Marzi and P. Romby (2009). "The role of mRNA structure in translational control in bacteria." RNA Biol **6**(2): 153-160.
- Geissmann, T. A. and D. Touati (2004). "Hfq, a new chaperoning role: binding to messenger RNA determines access for small RNA regulator." EMBO J **23**(2): 396-405.
- Ghosh, S. and M. P. Deutscher (1999). "Oligoribonuclease is an essential component of the mRNA decay pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(8): 4372-4377.
- Gorke, B. and J. Stulke (2008). "Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients." Nat Rev Microbiol **6**(8): 613-624.

- Grunberg-Manago, M., P. J. Oritz and S. Ochoa (1955). "Enzymatic synthesis of nucleic acidlike polynucleotides." Science **122**(3176): 907-910.
- Guillier, M. and S. Gottesman (2006). "Remodelling of the Escherichia coli outer membrane by two small regulatory RNAs." Mol Microbiol **59**(1): 231-247.
- Hajnsdorf, E., F. Braun, J. Haugel-Nielsen and P. Regnier (1995). "Polyadenylation destabilizes the rpsO mRNA of Escherichia coli." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(9): 3973-3977.
- Hajnsdorf, E. and P. Regnier (2000). "Host factor Hfq of Escherichia coli stimulates elongation of poly(A) tails by poly(A) polymerase I." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(4): 1501-1505.
- Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (1992). "Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update." FEBS Lett **307**(1): 108-112.
- Hantke, K. (2001). "Iron and metal regulation in bacteria." Curr Opin Microbiol **4**(2): 172-177.
- Harwood, J. P., C. Gazdar, C. Prasad, A. Peterkofsky, S. J. Curtis and W. Epstein (1976). "Involvement of the glucose enzymes II of the sugar phosphotransferase system in the regulation of adenylate cyclase by glucose in Escherichia coli." J Biol Chem **251**(8): 2462-2468.
- Hatfull, G. F. and C. M. Joyce (1986). "Deletion of the spf (spot 42 RNA) gene of Escherichia coli." J Bacteriol **166**(3): 746-750.
- Higgins, C. F., G. F. Ames, W. M. Barnes, J. M. Clement and M. Hofnung (1982). "A novel intercistronic regulatory element of prokaryotic operons." Nature **298**(5876): 760-762.
- Hook-Barnard, I. G., T. J. Brickman and M. A. McIntosh (2007). "Identification of an AU-rich translational enhancer within the Escherichia coli fepB leader RNA." J Bacteriol **189**(11): 4028-4037.
- Huttenhofer, A. and H. F. Noller (1994). "Footprinting mRNA-ribosome complexes with chemical probes." EMBO J **13**(16): 3892-3901.
- Ikeda, Y., M. Yagi, T. Morita and H. Aiba (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): 419-432.
- Ikemura, T. and J. E. Dahlberg (1973). "Small ribonucleic acids of Escherichia coli. I. Characterization by polyacrylamide gel electrophoresis and fingerprint analysis." J Biol Chem **248**(14): 5024-5032.

- Jacob, F. and J. Monod (1961). "Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins." J Mol Biol **3**: 318-356.
- Jacques, J. F., S. Jang, K. Prevost, G. Desnoyers, M. Desmarais, J. Imlay and E. Masse (2006). "RyhB small RNA modulates the free intracellular iron pool and is essential for normal growth during iron limitation in *Escherichia coli*." Mol Microbiol **62**(4): 1181-1190.
- Jain, C. and N. Kleckner (1993). "IS10 mRNA stability and steady state levels in *Escherichia coli*: indirect effects of translation and role of *rne* function." Mol Microbiol **9**(2): 233-247.
- Jenner, L., P. Romby, B. Rees, C. Schulze-Briese, M. Springer, C. Ehresmann, B. Ehresmann, D. Moras, G. Yusupova and M. Yusupov (2005). "Translational operator of mRNA on the ribosome: how repressor proteins exclude ribosome binding." Science **308**(5718): 120-123.
- Jiang, X. and J. G. Belasco (2004). "Catalytic activation of multimeric RNase E and RNase G by 5'-monophosphorylated RNA." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(25): 9211-9216.
- Johansson, J., P. Mandin, A. Renzoni, C. Chiaruttini, M. Springer and P. Cossart (2002). "An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*." Cell **110**(5): 551-561.
- Kawamoto, H., Y. Koide, T. Morita and H. Aiba (2006). "Base-pairing requirement for RNA silencing by a bacterial small RNA and acceleration of duplex formation by Hfq." Mol Microbiol **61**(4): 1013-1022.
- Kawano, M., A. A. Reynolds, J. Miranda-Rios and G. Storz (2005). "Detection of 5'- and 3'-UTR-derived small RNAs and cis-encoded antisense RNAs in *Escherichia coli*." Nucleic Acids Res **33**(3): 1040-1050.
- Khemici, V. and A. J. Carpousis (2004). "The RNA degradosome and poly(A) polymerase of *Escherichia coli* are required in vivo for the degradation of small mRNA decay intermediates containing REP-stabilizers." Mol Microbiol **51**(3): 777-790.
- Khemici, V., L. Poljak, I. Toesca and A. J. Carpousis (2005). "Evidence in vivo that the DEAD-box RNA helicase RhlB facilitates the degradation of ribosome-free mRNA by RNase E." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(19): 6913-6918.
- Khemici, V., I. Toesca, L. Poljak, N. F. Vanzo and A. J. Carpousis (2004). "The RNase E of *Escherichia coli* has at least two binding sites for DEAD-box RNA helicases: functional replacement of RhlB by RhlE." Mol Microbiol **54**(5): 1422-1430.
- Komarova, A. V., L. S. Tchufistova, M. Dreyfus and I. V. Boni (2005). "AU-rich sequences within 5' untranslated leaders enhance translation and stabilize mRNA in *Escherichia coli*." J Bacteriol **187**(4): 1344-1349.

- Komarova, A. V., L. S. Tchufistova, E. V. Supina and I. V. Boni (2002). "Protein S1 counteracts the inhibitory effect of the extended Shine-Dalgarno sequence on translation." RNA **8**(9): 1137-1147.
- Kortmann, J. and F. Narberhaus (2012). "Bacterial RNA thermometers: molecular zippers and switches." Nat Rev Microbiol **10**(4): 255-265.
- Lee, K. C., W. S. Yeo and J. H. Roe (2008). "Oxidant-responsive induction of the suf operon, encoding a Fe-S assembly system, through Fur and IscR in Escherichia coli." J Bacteriol **190**(24): 8244-8247.
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum and V. Ambros (1993). "The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14." Cell **75**(5): 843-854.
- Lenz, D. H., K. C. Mok, B. N. Lilley, R. V. Kulkarni, N. S. Wingreen and B. L. Bassler (2004). "The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in Vibrio harveyi and Vibrio cholerae." Cell **118**(1): 69-82.
- Leroy, A., N. F. Vanzo, S. Sousa, M. Dreyfus and A. J. Carpousis (2002). "Function in Escherichia coli of the non-catalytic part of RNase E: role in the degradation of ribosome-free mRNA." Mol Microbiol **45**(5): 1231-1243.
- Linder, P. (2006). "Dead-box proteins: a family affair--active and passive players in RNP-remodeling." Nucleic Acids Res **34**(15): 4168-4180.
- Link, T. M., P. Valentin-Hansen and R. G. Brennan (2009). "Structure of Escherichia coli Hfq bound to polyriboadenylate RNA." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(46): 19292-19297.
- Liou, G. G., H. Y. Chang, C. S. Lin and S. Lin-Chao (2002). "DEAD box RhlB RNA helicase physically associates with exoribonuclease PNPase to degrade double-stranded RNA independent of the degradosome-assembling region of RNase E." J Biol Chem **277**(43): 41157-41162.
- Liu, M., T. Durfee, J. E. Cabrera, K. Zhao, D. J. Jin and F. R. Blattner (2005). "Global transcriptional programs reveal a carbon source foraging strategy by Escherichia coli." J Biol Chem **280**(16): 15921-15927.
- Livny, J., A. Brencic, S. Lory and M. K. Waldor (2006). "Identification of 17 Pseudomonas aeruginosa sRNAs and prediction of sRNA-encoding genes in 10 diverse pathogens using the bioinformatic tool sRNAPredict2." Nucleic Acids Res **34**(12): 3484-3493.
- Livny, J. and M. K. Waldor (2007). "Identification of small RNAs in diverse bacterial species." Curr Opin Microbiol **10**(2): 96-101.
- Lopez, P. J., I. Marchand, S. A. Joyce and M. Dreyfus (1999). "The C-terminal half of RNase E, which organizes the Escherichia coli degradosome, participates in mRNA degradation but not rRNA processing in vivo." Mol Microbiol **33**(1): 188-199.



- Mackie, G. A. (1998). "Ribonuclease E is a 5'-end-dependent endonuclease." Nature **395**(6703): 720-723.
- Mackie, G. A., J. L. Genereaux and S. K. Masterman (1997). "Modulation of the activity of RNase E in vitro by RNA sequences and secondary structures 5' to cleavage sites." J Biol Chem **272**(1): 609-616.
- Majdalani, N., C. Cuning, D. Sledjeski, T. Elliott and S. Gottesman (1998). "DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(21): 12462-12467.
- Maki, K., K. Uno, T. Morita and H. Aiba (2008). "RNA, but not protein partners, is directly responsible for translational silencing by a bacterial Hfq-binding small RNA." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(30): 10332-10337.
- Mandin, P., F. Repoila, M. Vergassola, T. Geissmann and P. Cossart (2007). "Identification of new noncoding RNAs in *Listeria monocytogenes* and prediction of mRNA targets." Nucleic Acids Res **35**(3): 962-974.
- Martin-Farmer, J. and G. R. Janssen (1999). "A downstream CA repeat sequence increases translation from leadered and unleadered mRNA in *Escherichia coli*." Mol Microbiol **31**(4): 1025-1038.
- Masse, E. and M. Arguin (2005). "Ironing out the problem: new mechanisms of iron homeostasis." Trends Biochem Sci **30**(8): 462-468.
- Masse, E., F. E. Escorcia and S. Gottesman (2003). "Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*." Genes Dev **17**(19): 2374-2383.
- Masse, E. and S. Gottesman (2002). "A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(7): 4620-4625.
- Masse, E., C. K. Vanderpool and S. Gottesman (2005). "Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*." J Bacteriol **187**(20): 6962-6971.
- McDowall, K. J., S. Lin-Chao and S. N. Cohen (1994). "A+U content rather than a particular nucleotide order determines the specificity of RNase E cleavage." J Biol Chem **269**(14): 10790-10796.
- McHugh, J. P., F. Rodriguez-Quinones, H. Abdul-Tehrani, D. A. Svistunenko, R. K. Poole, C. E. Cooper and S. C. Andrews (2003). "Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. A new mechanism for iron homeostasis." J Biol Chem **278**(32): 29478-29486.
- Melamed, D. and Y. Arava (2007). "Genome-wide analysis of mRNA polysomal profiles with spotted DNA microarrays." Methods Enzymol **431**: 177-201.

- Mey, A. R., S. A. Craig and S. M. Payne (2005). "Characterization of *Vibrio cholerae* RyhB: the RyhB regulon and role of ryhB in biofilm formation." *Infect Immun* **73**(9): 5706-5719.
- Miethke, M. and M. A. Marahiel (2007). "Siderophore-based iron acquisition and pathogen control." *Microbiol Mol Biol Rev* **71**(3): 413-451.
- Mikulecky, P. J., M. K. Kaw, C. C. Brescia, J. C. Takach, D. D. Sledjeski and A. L. Feig (2004). "Escherichia coli Hfq has distinct interaction surfaces for DsrA, rpoS and poly(A) RNAs." *Nat Struct Mol Biol* **11**(12): 1206-1214.
- Mironov, A. S., I. Gusarov, R. Rafikov, L. E. Lopez, K. Shatalin, R. A. Kreneva, D. A. Perumov and E. Nudler (2002). "Sensing small molecules by nascent RNA: a mechanism to control transcription in bacteria." *Cell* **111**(5): 747-756.
- Mizuno, T., M. Y. Chou and M. Inouye (1984). "A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(7): 1966-1970.
- Mohanty, B. K., V. F. Maples and S. R. Kushner (2004). "The Sm-like protein Hfq regulates polyadenylation dependent mRNA decay in Escherichia coli." *Mol Microbiol* **54**(4): 905-920.
- Moller, T., T. Franch, P. Hojrup, D. R. Keene, H. P. Bachinger, R. G. Brennan and P. Valentin-Hansen (2002). "Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction." *Mol Cell* **9**(1): 23-30.
- Moller, T., T. Franch, C. Udesen, K. Gerdes and P. Valentin-Hansen (2002). "Spot 42 RNA mediates discoordinate expression of the E. coli galactose operon." *Genes Dev* **16**(13): 1696-1706.
- Monod, J. (1942). *Recherches sur la Croissance des Cultures Bactériennes*. Paris.
- Morfeldt, E., D. Taylor, A. von Gabain and S. Arvidson (1995). "Activation of alpha-toxin translation in Staphylococcus aureus by the trans-encoded antisense RNA, RNAIII." *EMBO J* **14**(18): 4569-4577.
- Morita, T., H. Kawamoto, T. Mizota, T. Inada and H. Aiba (2004). "Enolase in the RNA degradosome plays a crucial role in the rapid decay of glucose transporter mRNA in the response to phosphosugar stress in Escherichia coli." *Mol Microbiol* **54**(4): 1063-1075.
- Morita, T., K. Maki and H. Aiba (2005). "RNase E-based ribonucleoprotein complexes: mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs." *Genes Dev* **19**(18): 2176-2186.
- Morita, T., Y. Mochizuki and H. Aiba (2006). "Translational repression is sufficient for gene silencing by bacterial small noncoding RNAs in the absence of mRNA destruction." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(13): 4858-4863.

- Murphy, E. R. and S. M. Payne (2007). "RyhB, an iron-responsive small RNA molecule, regulates *Shigella dysenteriae* virulence." Infect Immun **75**(7): 3470-3477.
- Newbury, S. F., N. H. Smith, E. C. Robinson, I. D. Hiles and C. F. Higgins (1987). "Stabilization of translationally active mRNA by prokaryotic REP sequences." Cell **48**(2): 297-310.
- Ono, M. and M. Kuwano (1979). "A conditional lethal mutation in an *Escherichia coli* strain with a longer chemical lifetime of messenger RNA." J Mol Biol **129**(3): 343-357.
- Oppenheim, D. S. and C. Yanofsky (1980). "Translational coupling during expression of the tryptophan operon of *Escherichia coli*." Genetics **95**(4): 785-795.
- Outten, F. W., O. Djaman and G. Storz (2004). "A *suf* operon requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli*." Mol Microbiol **52**(3): 861-872.
- Papenfort, K., M. Bouvier, F. Mika, C. M. Sharma and J. Vogel (2010). "Evidence for an autonomous 5' target recognition domain in an Hfq-associated small RNA." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(47): 20435-20440.
- Papenfort, K., V. Pfeiffer, F. Mika, S. Lucchini, J. C. Hinton and J. Vogel (2006). "SigmaE-dependent small RNAs of *Salmonella* respond to membrane stress by accelerating global omp mRNA decay." Mol Microbiol **62**(6): 1674-1688.
- Pfeiffer, V., K. Papenfort, S. Lucchini, J. C. Hinton and J. Vogel (2009). "Coding sequence targeting by MicC RNA reveals bacterial mRNA silencing downstream of translational initiation." Nat Struct Mol Biol **16**(8): 840-846.
- Philippe, C., F. Eyermann, L. Benard, C. Portier, B. Ehresmann and C. Ehresmann (1993). "Ribosomal protein S15 from *Escherichia coli* modulates its own translation by trapping the ribosome on the mRNA initiation loading site." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(10): 4394-4398.
- Pichon, C. and B. Felden (2005). "Small RNA genes expressed from *Staphylococcus aureus* genomic and pathogenicity islands with specific expression among pathogenic strains." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(40): 14249-14254.
- Polayes, D. A., P. W. Rice, M. M. Garner and J. E. Dahlberg (1988). "Cyclic AMP-cyclic AMP receptor protein as a repressor of transcription of the *spf* gene of *Escherichia coli*." J Bacteriol **170**(7): 3110-3114.
- Portier, C., L. Dondon, M. Grunberg-Manago and P. Regnier (1987). "The first step in the functional inactivation of the *Escherichia coli* polynucleotide phosphorylase messenger is a ribonuclease III processing at the 5' end." EMBO J **6**(7): 2165-2170.
- Prevost, K., H. Salvail, G. Desnoyers, J. F. Jacques, E. Phaneuf and E. Masse (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): 1260-1273.

Prud'homme-Genereux, A., R. K. Beran, I. Iost, C. S. Ramey, G. A. Mackie and R. W. Simons (2004). "Physical and functional interactions among RNase E, polynucleotide phosphorylase and the cold-shock protein, CsdA: evidence for a 'cold shock degradosome'." Mol Microbiol **54**(5): 1409-1421.

Py, B. and F. Barras (2010). "Building Fe-S proteins: bacterial strategies." Nat Rev Microbiol **8**(6): 436-446.

Py, B., C. F. Higgins, H. M. Krisch and A. J. Carpousis (1996). "A DEAD-box RNA helicase in the Escherichia coli RNA degradosome." Nature **381**(6578): 169-172.

Rabhi, M., O. Espeli, A. Schwartz, B. Cayrol, A. R. Rahmouni, V. Arluison and M. Boudvillain (2011). "The Sm-like RNA chaperone Hfq mediates transcription antitermination at Rho-dependent terminators." EMBO J **30**(14): 2805-2816.

Raynal, L. C. and A. J. Carpousis (1999). "Poly(A) polymerase I of Escherichia coli: characterization of the catalytic domain, an RNA binding site and regions for the interaction with proteins involved in mRNA degradation." Mol Microbiol **32**(4): 765-775.

Regnier, P. and M. Grunberg-Manago (1990). "RNase III cleavages in non-coding leaders of Escherichia coli transcripts control mRNA stability and genetic expression." Biochimie **72**(11): 825-834.

Rice, P. W. and J. E. Dahlberg (1982). "A gene between polA and glnA retards growth of Escherichia coli when present in multiple copies: physiological effects of the gene for spot 42 RNA." J Bacteriol **152**(3): 1196-1210.

Rice, P. W., D. A. Polayes and J. E. Dahlberg (1987). "Spot 42 RNA of Escherichia coli is not an mRNA." J Bacteriol **169**(8): 3850-3852.

Richardson, J. P. (1991). "Preventing the synthesis of unused transcripts by Rho factor." Cell **64**(6): 1047-1049.

Rivas, E., R. J. Klein, T. A. Jones and S. R. Eddy (2001). "Computational identification of noncoding RNAs in E. coli by comparative genomics." Curr Biol **11**(17): 1369-1373.

Romby, P. and M. Springer (2003). "Bacterial translational control at atomic resolution." Trends Genet **19**(3): 155-161.

Ross, J. A., S. J. Wardle and D. B. Haniford (2010). "Tn10/IS10 transposition is downregulated at the level of transposase expression by the RNA-binding protein Hfq." Mol Microbiol **78**(3): 607-621.

Salvail, H., P. Lanthier-Bourbonnais, J. M. Sobota, M. Caza, J. A. Benjamin, M. E. Mendieta, F. Lepine, C. M. Dozois, J. Imlay and E. Masse (2010). "A small RNA promotes

siderophore production through transcriptional and metabolic remodeling." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(34): 15223-15228.

Schlax, P. J., K. A. Xavier, T. C. Gluick and D. E. Draper (2001). "Translational repression of the Escherichia coli alpha operon mRNA: importance of an mRNA conformational switch and a ternary entrapment complex." J Biol Chem **276**(42): 38494-38501.

Schumacher, M. A., R. F. Pearson, T. Moller, P. Valentin-Hansen and R. G. Brennan (2002). "Structures of the pleiotropic translational regulator Hfq and an Hfq-RNA complex: a bacterial Sm-like protein." EMBO J **21**(13): 3546-3556.

Schumperli, D., K. McKenney, D. A. Sobieski and M. Rosenberg (1982). "Translational coupling at an intercistronic boundary of the Escherichia coli galactose operon." Cell **30**(3): 865-871.

Schwartz, C. J., O. Djaman, J. A. Imlay and P. J. Kiley (2000). "The cysteine desulfurase, IscS, has a major role in in vivo Fe-S cluster formation in Escherichia coli." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(16): 9009-9014.

Schwartz, C. J., J. L. Giel, T. Patschkowski, C. Luther, F. J. Ruzicka, H. Beinert and P. J. Kiley (2001). "IscR, an Fe-S cluster-containing transcription factor, represses expression of Escherichia coli genes encoding Fe-S cluster assembly proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(26): 14895-14900.

Seif, E. and S. Altman (2008). "RNase P cleaves the adenine riboswitch and stabilizes pbuE mRNA in Bacillus subtilis." RNA **14**(6): 1237-1243.

Selinger, D. W., K. J. Cheung, R. Mei, E. M. Johansson, C. S. Richmond, F. R. Blattner, D. J. Lockhart and G. M. Church (2000). "RNA expression analysis using a 30 base pair resolution Escherichia coli genome array." Nat Biotechnol **18**(12): 1262-1268.

Sharma, C. M., F. Darfeuille, T. H. Plantinga and J. Vogel (2007). "A small RNA regulates multiple ABC transporter mRNAs by targeting C/A-rich elements inside and upstream of ribosome-binding sites." Genes Dev **21**(21): 2804-2817.

Sharma, C. M., K. Papenfort, S. R. Pernitzsch, H. J. Mollenkopf, J. C. Hinton and J. Vogel (2011). "Pervasive post-transcriptional control of genes involved in amino acid metabolism by the Hfq-dependent GcvB small RNA." Mol Microbiol **81**(5): 1144-1165.

Shine, J. and L. Dalgarno (1974). "The 3'-terminal sequence of Escherichia coli 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites." Proc Natl Acad Sci U S A **71**(4): 1342-1346.

Silvaggi, J. M., J. B. Perkins and R. Losick (2006). "Genes for small, noncoding RNAs under sporulation control in Bacillus subtilis." J Bacteriol **188**(2): 532-541.

- Sittka, A., S. Lucchini, K. Papenfort, C. M. Sharma, K. Rolle, T. T. Binnewies, J. C. Hinton and J. Vogel (2008). "Deep sequencing analysis of small noncoding RNA and mRNA targets of the global post-transcriptional regulator, Hfq." PLoS Genet **4**(8): e1000163.
- Sledjeski, D. and S. Gottesman (1995). "A small RNA acts as an antisilencer of the H-NS-silenced rcsA gene of Escherichia coli." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(6): 2003-2007.
- Sledjeski, D. D., C. Whitman and A. Zhang (2001). "Hfq is necessary for regulation by the untranslated RNA DsrA." J Bacteriol **183**(6): 1997-2005.
- Sorensen, M. A., J. Fricke and S. Pedersen (1998). "Ribosomal protein S1 is required for translation of most, if not all, natural mRNAs in Escherichia coli in vivo." J Mol Biol **280**(4): 561-569.
- Spring, T. G. and F. Wold (1971). "The purification and characterization of Escherichia coli enolase." J Biol Chem **246**(22): 6797-6802.
- Steitz, J. A. and K. Jakes (1975). "How ribosomes select initiator regions in mRNA: base pair formation between the 3' terminus of 16S rRNA and the mRNA during initiation of protein synthesis in Escherichia coli." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(12): 4734-4738.
- Stern, M. J., G. F. Ames, N. H. Smith, E. C. Robinson and C. F. Higgins (1984). "Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome." Cell **37**(3): 1015-1026.
- Subramanian, A. R. (1983). "Structure and functions of ribosomal protein S1." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **28**: 101-142.
- Sun, X., I. Zhulin and R. M. Wartell (2002). "Predicted structure and phyletic distribution of the RNA-binding protein Hfq." Nucleic Acids Res **30**(17): 3662-3671.
- Symmons, M. F., G. H. Jones and B. F. Luisi (2000). "A duplicated fold is the structural basis for polynucleotide phosphorylase catalytic activity, processivity, and regulation." Structure **8**(11): 1215-1226.
- Symmons, M. F., M. G. Williams, B. F. Luisi, G. H. Jones and A. J. Carpousis (2002). "Running rings around RNA: a superfamily of phosphate-dependent RNases." Trends Biochem Sci **27**(1): 11-18.
- Takahashi, Y. and U. Tokumoto (2002). "A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids." J Biol Chem **277**(32): 28380-28383.
- Tedin, K., A. Resch and U. Blasi (1997). "Requirements for ribosomal protein S1 for translation initiation of mRNAs with and without a 5' leader sequence." Mol Microbiol **25**(1): 189-199.

- Tjaden, B., R. M. Saxena, S. Stolyar, D. R. Haynor, E. Kolker and C. Rosenow (2002). "Transcriptome analysis of *Escherichia coli* using high-density oligonucleotide probe arrays." Nucleic Acids Res **30**(17): 3732-3738.
- Tokumoto, U. and Y. Takahashi (2001). "Genetic analysis of the *isc* operon in *Escherichia coli* involved in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins." J Biochem **130**(1): 63-71.
- Tsui, H. C., H. C. Leung and M. E. Winkler (1994). "Characterization of broadly pleiotropic phenotypes caused by an *hfq* insertion mutation in *Escherichia coli* K-12." Mol Microbiol **13**(1): 35-49.
- Tzareva, N. V., V. I. Makhno and I. V. Boni (1994). "Ribosome-messenger recognition in the absence of the Shine-Dalgarno interactions." FEBS Lett **337**(2): 189-194.
- Unoson, C. and E. G. Wagner (2007). "Dealing with stable structures at ribosome binding sites: bacterial translation and ribosome standby." RNA Biol **4**(3): 113-117.
- Vanzo, N. F., Y. S. Li, B. Py, E. Blum, C. F. Higgins, L. C. Raynal, H. M. Krisch and A. J. Carpousis (1998). "Ribonuclease E organizes the protein interactions in the *Escherichia coli* RNA degradosome." Genes Dev **12**(17): 2770-2781.
- Vassinova, N. and D. Kozyrev (2000). "A method for direct cloning of *fur*-regulated genes: identification of seven new *fur*-regulated loci in *Escherichia coli*." Microbiology **146 Pt 12**: 3171-3182.
- Vecerek, B., I. Moll and U. Blasi (2005). "Translational autocontrol of the *Escherichia coli* *hfq* RNA chaperone gene." RNA **11**(6): 976-984.
- Vecerek, B., I. Moll and U. Blasi (2007). "Control of *Fur* synthesis by the non-coding RNA *RyhB* and iron-responsive decoding." EMBO J **26**(4): 965-975.
- Vogel, J., V. Bartels, T. H. Tang, G. Churakov, J. G. Slagter-Jager, A. Huttenhofer and E. G. Wagner (2003). "RNomics in *Escherichia coli* detects new sRNA species and indicates parallel transcriptional output in bacteria." Nucleic Acids Res **31**(22): 6435-6443.
- Vogel, J. and B. F. Luisi (2011). "*Hfq* and its constellation of RNA." Nat Rev Microbiol **9**(8): 578-589.
- Vytvytska, O., I. Moll, V. R. Kaberdin, A. von Gabain and U. Blasi (2000). "*Hfq* (HF1) stimulates *ompA* mRNA decay by interfering with ribosome binding." Genes Dev **14**(9): 1109-1118.
- Wassarman, K. M., F. Repoila, C. Rosenow, G. Storz and S. Gottesman (2001). "Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays." Genes Dev **15**(13): 1637-1651.
- Waters, L. S. and G. Storz (2009). "Regulatory RNAs in bacteria." Cell **136**(4): 615-628.

- Wightman, B., I. Ha and G. Ruvkun (1993). "Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*." Cell **75**(5): 855-862.
- Wilusz, C. J. and J. Wilusz (2005). "Eukaryotic Lsm proteins: lessons from bacteria." Nat Struct Mol Biol **12**(12): 1031-1036.
- Winkler, W., A. Nahvi and R. R. Breaker (2002). "Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression." Nature **419**(6910): 952-956.
- Zengel, J. M. and L. Lindahl (1994). "Diverse mechanisms for regulating ribosomal protein synthesis in *Escherichia coli*." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **47**: 331-370.
- Zhang, A., K. M. Wassarman, J. Ortega, A. C. Steven and G. Storz (2002). "The Sm-like Hfq protein increases OxyS RNA interaction with target mRNAs." Mol Cell **9**(1): 11-22.
- Zhang, A., K. M. Wassarman, C. Rosenow, B. C. Tjaden, G. Storz and S. Gottesman (2003). "Global analysis of small RNA and mRNA targets of Hfq." Mol Microbiol **50**(4): 1111-1124.
- Zhang, J. and M. P. Deutscher (1992). "A uridine-rich sequence required for translation of prokaryotic mRNA." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(7): 2605-2609.