

Université de Sherbrooke

**Étude et modélisation des mécanismes de régulation des petits ARN régulateurs chez
*Escherichia coli***

Par
Julie-Anna Benjamin
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
Juin 2014

Membres du jury d'évaluation
Dr Eric Massé (Biochimie)
Dr François Bachand (Biochimie)
Dr Vincent Burrus (externe au programme)
Dr Hervé Le Moual (externe à l'UdeS)

Étude et modélisation des mécanismes de régulation des petits ARN régulateurs chez *Escherichia coli*

Par
Julie-Anna Benjamin
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, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

L'avancement des connaissances sur la biologie de l'ARN progresse à un rythme effréné. En effet, les découvertes des dernières années ont confirmé l'importance de l'ARN comme régulateur. Par exemple, de courtes molécules d'ARN, appelées sRNA (*small RNA*), ont été identifiées comme régulateurs post-transcriptionnels majeurs, capables de moduler l'expression des ARN messagers (ARNm) chez les procaryotes. Généralement, le mode d'action de ces sRNA consiste à s'attacher de manière anti-sens à leurs ARNm cibles, au site de la liaison du ribosome située dans la région 5' non traduite de l'ARNm. L'inhibition de la traduction par le sRNA conduit, dans la majorité des cas, à la dégradation rapide de l'ARNm.

Dans le cadre de mes travaux de recherche, j'ai participé à modéliser, à partir de données biologiques, certains mécanismes de régulation de cibles ARNm. Plus précisément, deux des sRNA, parmi les mieux caractérisés chez *E. coli*, soient RyhB et Spot42, ont été analysés. Cette étude a montré qu'un sRNA peut réguler ses cibles selon différents régimes (efficace ou modéré) en fonction du mode de régulation priorisé par le sRNA, et ce, indépendamment de son abondance relative. Ces résultats permettront d'améliorer notre compréhension et notre capacité à prédire l'efficacité d'un sRNA à réguler ses cibles ARNm.

Par des recherches subséquentes, il m'a été possible de démontrer que l'expression de l'ARNm encodant pour la protéine aconitase B était régulée de manière antagoniste à la fois par le sRNA RyhB et par la protéine aconitase B et ce, dans une condition de carence en fer. Par la suite, j'ai pu mettre en évidence un deuxième mécanisme de régulation similaire pour l'ARNm *grxD*, encodant pour la glutatharédoxine D. Jusqu'à ce jour, le sRNA RyhB démontrait une efficacité infaillible pour dégrader ses ARNm cibles. Les résultats obtenus durant ce projet démontrent sans équivoque une nouvelle voie de protection permettant à l'ARNm d'éviter la dégradation par un petit ARN régulateur. Ce mécanisme de protection de l'ARNm ouvre la porte à un tout nouveau processus cellulaire de régulation post-transcriptionnelle qui s'étend sûrement à un groupe plus important d'ARN.

Mots clés : *Escherichia coli*, petit ARN régulateur, modélisation, dégradation de l'ARN, aconitase B, régulation traductionnelle.

La vérité ne se possède pas, elle se cherche.

Albert Jacquard

TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE 1: INTRODUCTION.....	1
1 La régulation de l'ARN chez <i>Escherichia coli</i>	1
1.1 Les mécanismes déterminant la stabilité de l'ARNm	1
1.1.1 Un aperçu de l'activité ribonucléase	2
1.1.2 Le dégradosome ARN.....	6
1.2 La traduction procaryote et sa régulation	8
1.2.1 L'initiation de la traduction.....	9
1.2.2 La régulation de la traduction par l'ARN	11
1.2.3 La régulation de la traduction par les protéines	12
2 Les petits ARN régulateurs bactériens.....	13
2.1 Sommaire des mécanismes d'action.....	14
2.1.1 La chaperonne ARN Hfq	16
2.2 Le petit ARN RyhB.....	17
2.2.1 Le métabolisme du fer.....	18
2.2.2 Le rôle de RyhB dans l'homéostasie du fer	19
2.2.3 Les mécanismes de régulation du sRNA RyhB	21
2.3 Le petit ARN Spot 42	22
2.3.1 La répression catabolique du carbone	23
2.3.2 L'implication de Spot 42 dans la répression catabolique.....	25
2.3.3 Les mécanismes de régulation de Spot 42	26
2.3.4 Les avantages de la régulation par les petits ARN régulateurs	26
3 Les protéines régulatrices de l'homéostasie du fer	28
3.1 La protéine aconitase	28

3.1.1	La famille des déshydratases.....	28
3.1.2	Les caractéristiques générales des aconitases	30
3.1.3	Les mécanismes de régulation par la protéine aconitase	32
3.1.4	Les impacts physiologiques	34
3.2	La glutarédoxine monothiol GrxD	35
4	La modélisation comme outil d'analyse	37
4.1	Applications de la modélisation	38
4.2	La modélisation des petits ARN bactériens.....	39
5	Hypothèse et objectifs de recherche	40
CHAPITRE 2.....		42
Résumé.....		43
Dynamic features of gene expression control by small regulatory RNAs.....		44
Abstract.....		45
Introduction.....		46
Results.....		49
Summary and discussion		55
Materials and Methods.....		59
Acknowledgments		60
References.....		61
Supporting Information.....		65
Supplementary references.....		70
CHAPITRE 3.....		71
Résumé.....		72
The iron-sensing aconitase B binds its own mRNA to prevent sRNA-induced mRNA cleavage		73

Abstract.....	74
Introduction.....	75
Results.....	77
Discussion.....	96
Material and Methods.....	100
Acknowledgments.....	103
References.....	104
Supplemental Material.....	108
Supplementary References.....	116
CHAPITRE 4.....	117
Résumé.....	118
L'ARNm encodant la glutathione monothiol est régulé selon la condition en Fe par la protéine aconitase B et le sRNA RyhB.....	119
Résultats.....	120
Matériels et méthodes.....	134
Références.....	138
CHAPITRE 5 : DISCUSSION et CONCLUSIONS.....	140
6 Les mécanismes de répression de l'expression génique par un sRNA.....	141
6.1 La gradation de l'effet des sRNA.....	141
6.1.1 Les paramètres influençant la régulation par les petits ARN régulateurs.....	143
6.1.2 La multiplicité des régulations de RyhB et de Spot 42.....	146
6.2 La dégradation active de l'ARNm par un sRNA bactérien.....	148
6.3 La répression de l'expression des gènes par un sRNA.....	151
7 La régulation post-transcriptionnelle par la protéine apo-AcnB.....	156
7.1 La régulation par apo-AcnB : mécanismes et physiologie.....	157

7.1.1	Le rôle d'apo-AcnB dans l'homéostasie du Fe	159
7.2	La conservation de la région 3' de l'ARNm <i>acnB</i>	161
7.2.1	Le motif ARN impliqué dans la régulation d'apo-AcnB	164
8	Conclusions.....	166
	Remerciements.....	167
	Liste des publications.....	168

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Synthèse des différents mécanismes de régulation par les sRNA	15
--	----

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Le mécanisme général de la dégradation des ARN.....	4
Figure 2. La structure et les fonctions de la RNase E.....	7
Figure 3. L'initiation de la traduction (synthèse).....	10
Figure 4. La réaction de Fenton.....	18
Figure 5. Le modèle de régulation par le sRNA RyhB.....	20
Figure 6. La répression catabolique.....	24
Figure 7. Les groupements Fe-S.....	29
Figure 8. La structure des IRE.....	31
Figure 9. Le mécanisme de régulation post-transcriptionnel par les IRP.....	33
Figure 10. Le concept de la priorisation.....	145
Figure 11. La RNase E participe à la régulation d' <i>acnB</i> par RyhB.....	150
Figure 12. Les composantes du dégradosome ARN impliquées dans la dégradation de l'ARNm <i>acnB</i>	150
Figure 13. RyhB et apo-AcnB peuvent tous deux lier le même ARNm <i>acnB</i>	152
Figure 14. Modèle de régulation non canonique par un sRNA et une protéine.....	154
Figure 15. La double régulation d' <i>acnB</i> induite par le stress oxydatif.....	158
Figure 16. L'alignement de l'extrémité 3' de l'ARNm <i>acnB</i>	162
Figure 17. Un mutant de la boucle de l'ARNm <i>acnB</i> n'entrave pas sa régulation.....	165

LISTE DES ABRÉVIATIONS

5'-UTR	<i>5'-untranslated region</i> , région 5' non traduite
3'-UTR	<i>3'-untranslated region</i> , région 3' non traduite
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
fMet-ARNt ^{fMet}	Méthionyl-ARNt formyltransférase
AMPc	Adénosine 5'monophosphate cyclique
CRP	<i>cAMP receptor protein</i> , protéine de répression catabolique
DHB	2,3-dihydroxybenzoic acid
Fe	Fer
[Fe-S]	Groupement fer-souffre
Grx	Glutharédoxine
HEAT	Huntigtin-Elongation-A subunit-TOR
IRE	<i>Iron Responsive Element</i> , motif de reconnaissance des IRP
IRP	<i>Iron Responsive Protein</i> , protéine régulatrice du fer
Nt	Nucléotide
ORF	<i>Open reading frame</i> , cadre de lecture ouvert
PNPase	Polynucléotide phosphorylase
qRT-PCR	<i>Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i> , PCR quantitatif en temps réel
RNase	Ribonucléase
RppH	Pyrophosphohydrolase ARN
RCC	Répression catabolique du carbone
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SD	Shine-Dalgarno
SLR	Site de liaison au ribosome
sRNA	<i>Small Regulatory RNA</i> , petit ARN régulateur
tmARN	<i>Transfert-messenger RNA</i> , ARN messenger et de transfert

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

1 La régulation de l'ARN chez *Escherichia coli*

Toute cellule vivante est un système dynamique qui régule l'expression de ses gènes, autant pour sa survie, son adaptation aux stress, son homéostasie, que sa réponse aux signaux environnementaux. Pour ce faire, les cellules ont développé nombre de mécanismes servant à reprogrammer l'expression des gènes permettant de s'ajuster aux stimuli externes. Par exemple, les bactéries pathogènes sont un excellent modèle d'adaptation puisque, durant une infection, elles s'ajustent pour survivre aux conditions extrêmes imposées par leur hôte, comme le pH acide de l'estomac, les grandes variations de température et la variabilité de la disponibilité en fer (Fe).

Selon le dogme central de la biologie, la régulation de l'information génétique implique un processus complexe incluant deux niveaux principaux, soit la transcription de l'ADN en ARN messagers (ARNm) et leur traduction en protéines (Crick, 1970). Autrefois, l'étude de l'expression des gènes a souvent négligé les étapes de régulation des ARNm. Néanmoins, au cours des dernières années, plusieurs régulateurs post-transcriptionnels ont été identifiés, tels que des petits ARN régulateurs (ex. : sRNA, microARN) et des protéines liant l'ARN. En effet, les découvertes récentes démontrent que la stabilité des ARNm et la modulation de l'efficacité de la traduction sont deux facteurs clés de la régulation génique bactérienne.

1.1 Les mécanismes déterminant la stabilité de l'ARNm

Depuis quelques années, la dégradation de l'ARN n'est plus seulement considérée comme un processus constitutif de recyclage des nucléotides (nt) ou de dégradation des ARNm ne pouvant être traduits, mais aussi comme un facteur majeur de la régulation génique. La régulation par les ARN est dépendante à la fois de l'efficacité de la transcription et de leur dégradation. De plus, la stabilité d'un ARNm est influencée par l'efficacité de sa traduction puisqu'il est considéré protégé contre le clivage aux sites couverts par les ribosomes. Par exemple, un ARNm dont la traduction serait bloquée par l'action d'un sRNA deviendrait vulnérable et serait prédisposé au clivage endonucléolytique par une ribonucléase (RNase)

(Chevrier-Miller *et al.*, 1990). Puisque les mécanismes déterminant la dégradation de l'ARN ne sont étudiés que depuis quelques années, la possibilité de découvertes majeures est bien présente.

Il y a deux groupes principaux d'ARN chez *E. coli*. Le premier est majoritairement composé d'ARN stables, soit les ARNr, les ARNt et les sRNA. Il représente à lui seul plus de 95% des ARN totaux et la stabilité des composantes de ce groupe semble dépendre uniquement de stress environnementaux et de la disponibilité en éléments essentiels à la synthèse de l'ARN. Ce premier groupe est ainsi distinct du deuxième qui est formé des ARNm (Deutscher, 2006). En effet, les ARNm sont des facteurs métaboliques intrinsèquement instables qui ont une demi-vie généralement plus courte que le temps de doublement de la cellule, soit d'environ 5 minutes (Bernstein *et al.*, 2002).

Une particularité déterminant la stabilité des ARNm chez les procaryotes est l'agencement des gènes en opéron qui permet de synchroniser le contrôle de la stabilité d'un ensemble de gènes ayant des fonctions similaires. En réalité, la dégradation des gènes assemblés en opéron serait majoritairement coordonnée pour augmenter l'efficacité de modulation liée à une fonction physiologique donnée.

Un autre mécanisme influençant la stabilité se retrouve au niveau de la nature même de l'ARNm procaryote. En effet, le premier nucléotide à l'extrémité 5'-terminal d'un ARNm présente un motif triphosphate, offrant une protection contre la dégradation par les RNases. Aussi l'extrémité 3'-OH terminale de l'ARNm comporte généralement une structure tige-boucle suivie d'une séquence de polyuridines, permettant l'arrêt de la transcription Rho-indépendante et protégeant contre l'action d'exoribonucléases en direction 3'-5'.

1.1.1 Un aperçu de l'activité ribonucléase

La dégradation et la maturation de l'ARN chez *E. coli* sont accomplies par une vingtaine de ribonucléases de type endoribonucléase, exoribonucléase, parfois associée à des systèmes toxine-antitoxine. Les endoribonucléases clivent les liens phosphodiester internes alors que les exoribonucléases clivent les chaînes d'ARN de l'extrémité 3'-OH vers l'extrémité 5'. Chez cet organisme, les étapes menant à la dégradation d'un ARNm passent par plusieurs

étapes séquentielles de clivage par des RNases (Figure 1). Pour accomplir celles-ci, seules trois enzymes sont essentielles : la RNase P qui catalyse la maturation des extrémités 5' des pre-ARN de transfert (pre-ARNt) (Esakova et Krasilnikov, 2010; Guerrier-Takada *et al.*, 1983), l'oligo-RNase qui est l'enzyme recyclant les produits provenant des dernières étapes de la dégradation des ARNm en mononucléotides (Ghosh et Deutscher, 1999) et la RNase E qui a un rôle primordial dans la maturation des ARN ribosomiaux (ARNr) et des ARNt, mais également dans la dégradation des ARNm (Mackie, 2013; Ow et Kushner, 2002). D'autres enzymes importantes permettent de compléter la voie de dégradation des ARNm : la RNase G, la RNase III, la poly(A)-polymérase 1, la pyrophosphatase RppH, la PNPase, la RNase II et la RNase R.

La première enzyme essentielle, la RNase P, est l'une des rares ribonucléases dont le site catalytique est un ribozyme ARN, puisque celui-ci est couplé à une protéine aidant à la reconnaissance du substrat. Elle est retrouvée autant chez les procaryotes que les eucaryotes. En plus de participer à la maturation des pré-ARNt, la RNase P bactérienne reconnaît d'autres substrats incluant le précurseur de l'ARN 4.5S, le tmARN et certains ARN ayant des structures spécifiques.

La deuxième enzyme essentielle, l'oligo-RNase, entre en action à la toute fin du processus de dégradation des ARNm initiée par les endoribonucléases (RNase E, RNase G et RNase III) et poursuivi par l'action des autres exoribonucléases (RNase II, PNPase) (étape 6, Figure 1). Son rôle spécifique est de recycler sous forme de mononucléotides les intermédiaires de dégradation laissés sous forme de courts oligonucléotides, empêchant leur accumulation qui serait délétère pour la cellule.

La dernière enzyme, la RNase E, est centrale dans le métabolisme de l'ARN et est considérée comme la principale enzyme de dégradation des ARNm. Elle catalyse le clivage interne des ARNm de préférence simple brin, ce qui est une étape limitante du processus de dégradation (étapes 1-2, Figure 1). La RNase E est fonctionnellement assemblée en complexes multiprotéiques appelé dégradosome ARN. Les détails concernant l'activité de la RNase E et les caractéristiques du dégradosome ARN seront détaillés dans la prochaine section.

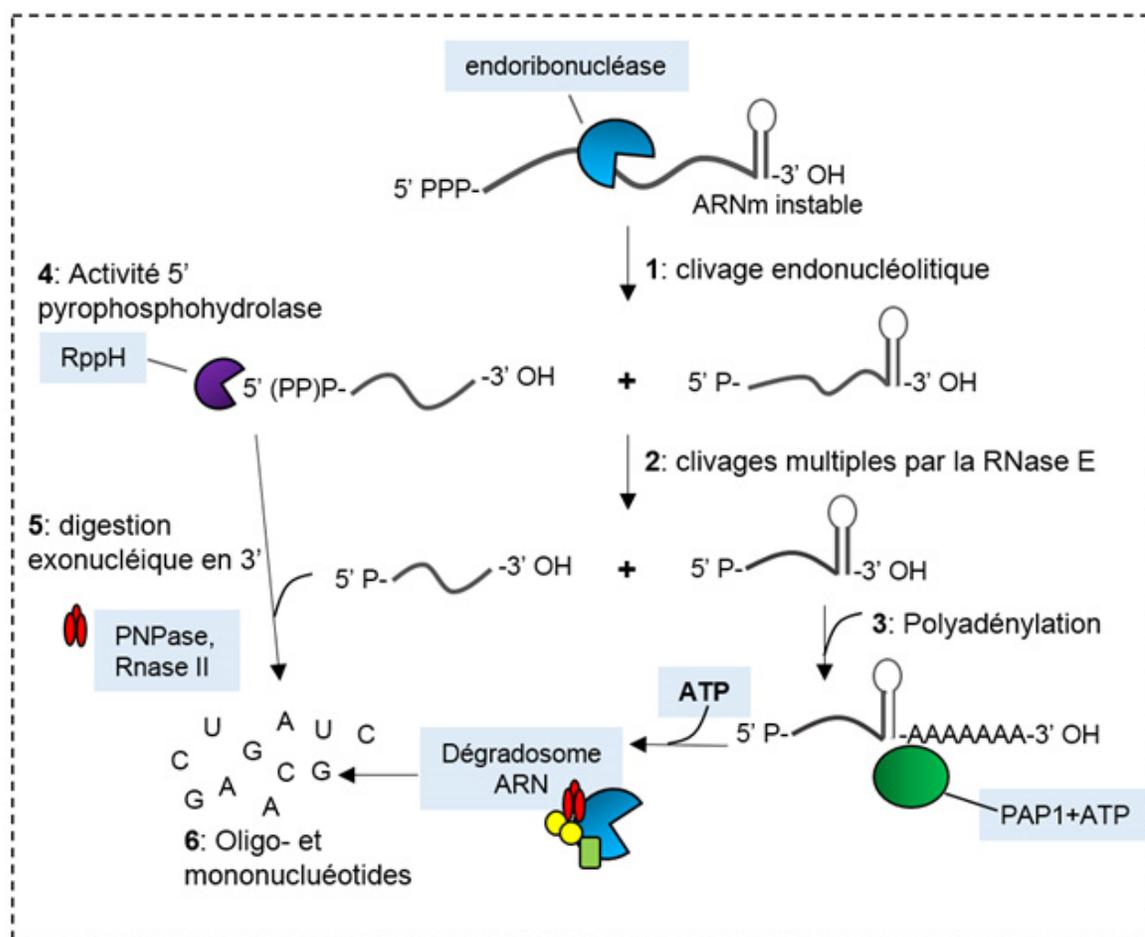


Figure 1. Le mécanisme général de la dégradation des ARN
 Voir le texte pour les détails. Inspirée de Mackie (Mackie, 2013).

La RNase G est un paralogue de la RNase E, toutes deux partageant un très haut degré d'identité de leurs régions catalytiques en N-terminal. Cependant, à l'inverse de la RNase E, la RNase G n'est pas connue pour s'assembler en complexe. Cette endoribonucléase remplit un rôle secondaire dans le clivage des ARNm et dans la maturation des ARNr (Li *et al.*, 1999).

Au même titre que la RNase E, la RNase III peut accomplir le clivage endonucléolytique initial d'ARNm, amorçant leur dégradation. Néanmoins, la RNase III, contrairement à la RNase E, a une plus grande affinité de clivage pour les ARN double brin. L'enzyme est aussi reconnue pour son rôle initiateur dans la maturation des pre-ARNr et la dégradation d'ARNm spécifiques (Bram *et al.*, 1980; Nicholson, 1999). L'endoribonucléase est conservée universellement des bactéries jusqu'aux eucaryotes supérieurs, qui ont un orthologue de la RNase III appelé Drosha, impliqué dans la maturation des microARN (Lee *et al.*, 2003).

Récemment, une nouvelle voie d'entrée en 5'-terminal dans la dégradation des ARNm a été mise en évidence chez *E. coli*. En effet, il a été démontré que la protéine RppH, avec son activité ARN pyrophosphohydrolase, peut initier la dégradation des ARNm en leur enlevant la structure protectrice que forment les trois phosphates de l'extrémité 5'-terminal (étape 4, Figure 1) (Deana *et al.*, 2008). Ce faisant, l'extrémité devenue monophosphate stimulera l'activité catalytique de la RNase E qui possède plus d'affinité pour ce substrat, augmentant ainsi la dégradation de ces ARN (Callaghan *et al.*, 2005; Mackie, 1998). *In vivo*, l'action de la pyrophosphatase RppH accélère la dégradation d'une centaine de transcrits. Toutefois, son activité n'est pas infaillible puisqu'elle peut être contrée par la présence d'une structure tige-boucle à l'extrémité 5' de l'ARN, augmentant ainsi la demi-vie de ces ARN (Emory *et al.*, 1992).

Une dernière étape de la dégradation de l'ARN avant son recyclage en mononucléotides est l'activité de digestion exonucléique dans la direction 3' au 5'. La PNPase et la RNase II sont les deux principales exoribonucléases impliquées dans la dégradation des ARNm et elles peuvent se substituer fonctionnellement (étape 5, Figure 1) (Donovan et Kushner, 1986; Mohanty et Kushner, 2000). Ce sont des enzymes processives dont l'activité peut être bloquée par des structures secondaires.

Tel que montré dans la Figure 1 (étape 3), lorsqu'une structure secondaire bloque l'activité exoribonucléique, l'ARN peut être polyadénylé à son extrémité 3' par la poly(A)-polymérase 1. L'ajout de cette queue poly (A) fournira un point d'ancrage simple brin nécessaire à la poursuite de la dégradation de l'ARN (Li *et al.*, 1998; Mohanty et Kushner, 2002). Chez *E. coli*, une séquence de poly-adénine peut être ajoutée à l'extrémité 3'-terminal des transcrits de tous types d'ARN, comprenant les transcrits primaires et les intermédiaires de dégradation. Autant la polyadénylation des ARNm en 3' offre une protection de l'ARN chez les eucaryotes, autant elle est synonyme d'instabilité chez les bactéries (Dreyfus et Régnier, 2002).

Enfin, la RNase R est une autre ribonucléase avec une fonction importante chez *E. coli*. La RNase R se caractérise comme l'exoribonucléase arrivant à dégrader les fortes structures secondaires d'ARN qui sont résistantes à la dégradation par la PNPase ou la RNase II (Cheng et Deutscher, 2005).

1.1.2 Le dégradosome ARN

Chez *E. coli*, le complexe protéique du dégradosome ARN est composé de plusieurs enzymes, dont la principale est la RNase E, et sur laquelle se rattache la PNPase, l'hélicase RhlB, l'énolase et la chaperonne ARN Hfq (Figure 2) (Carpousis, 2007; Mackie, 2013; Vanzo *et al.*, 1998). La RNase E peut former différents complexes multiprotéiques en plus du dégradosome ARN canonique, leurs compositions variant en fonction des conditions environnementales. La RNase E est une endoribonucléase de 1061 acides aminés pouvant être divisée grossièrement en deux parties distinctes. D'abord, la partie N-terminale compose le domaine catalytique de la RNase E et représente environ la moitié de la protéine (529 acides aminés). Puis, la partie C-terminale forme un domaine d'interaction macromoléculaire pour la liaison physique et fonctionnelle de la RNase E avec les autres protéines du complexe. Le domaine d'interaction est globalement non structuré et n'est pas essentiel à la survie cellulaire. Cette région non structurée comprend le segment A qui est le site de liaison à la membrane, le domaine de liaison à la DEAD-box hélicase RhlB, le domaine de liaison à l'énolase et celui de la PNPase en C-terminal. De plus, deux motifs riches en arginines appelés AR1 et AR2 joueraient un rôle dans la liaison à l'ARN.

La RNase E s'assemble en homotétramère formé de deux dimères et associée à la membrane plasmique (Callaghan *et al.*, 2005). La formation du complexe en tétramère serait importante pour l'activité catalytique de l'enzyme. La reconnaissance du substrat par la RNase E passe par deux modes. Le premier implique la liaison à l'extrémité 5' mono-phosphate de l'ARN, tandis que le second, l'entrée directe, ne nécessite pas cette reconnaissance avec l'extrémité 5'-terminale (Figure 2) (Callaghan *et al.*, 2005; Mackie, 1998). Le premier mode de reconnaissance a été caractérisé comme étant 30 fois plus efficace que l'entrée directe, la liaison d'un phosphate à la RNase E dirigeant l'ARN vers le cœur catalytique et accélérant le clivage. Tout en ne reconnaissant pas de séquence spécifique, la RNase E a une préférence pour les ARN simple brin, comprenant une séquence typiquement AU-riche et avec une purine à la position -2 (Mackie et Genereaux, 1993; McDowall *et al.*, 1995; McDowall *et al.*, 1994). La spécificité de la RNase E peut être modulée par la présence d'une structure secondaire de l'ARN, par la liaison de protéine à l'ARN et par l'efficacité de la traduction.

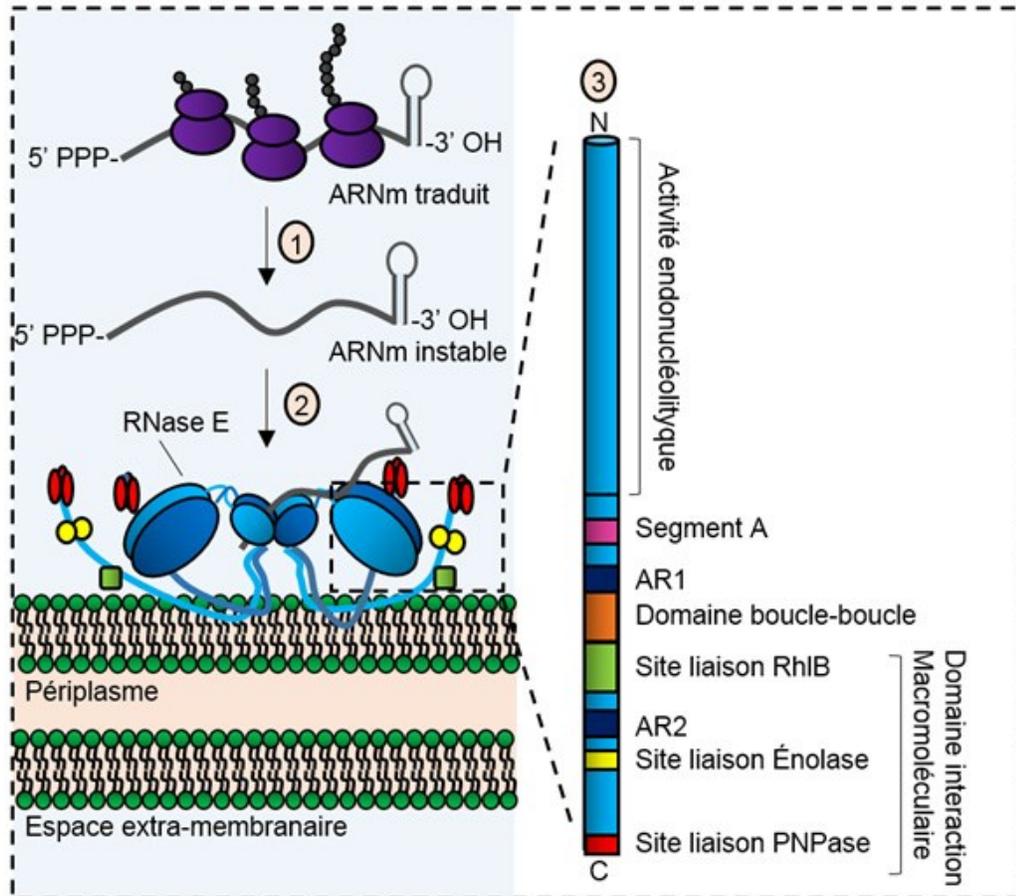


Figure 2. La structure et les fonctions de la RNase E

- 1- L'arrêt de la traduction peut être causé par la liaison de sRNA, par des protéines chaperonnes, par une carence en nutriments ou par un arrêt de transcription.
- 2- Le clivage primaire par la RNase E représente le mode d'entrée directe dans le processus de dégradation de l'ARN.
- 3- Schéma de la structure primaire d'un monomère de la RNase E.
Inspirée de Mackie (Mackie, 2013).

Le rôle et l'activité de la PNPase, une exoribonucléase 3'-5', ont été décrits dans la section précédente. La PNPase s'assemble dans le dégradosome ARN sous la forme d'un homotrimère (Symmons *et al.*, 2000). L'hélicase RhIB fait partie de la famille des DEAD-box hélicases, enzymes reconnues pour remodeler des interactions ARN-ARN et ARN-protéine (Py *et al.*, 1996). L'activité de l'hélicase ARN RhIB complète celle de la PNPase qui défait les structures d'ARN. RhIB peut être substituée dans le dégradosome ARN par d'autres hélicases comme CsdA, exprimée lors de stress de thermiques, l'hélicase RhIE ou la protéine Hfq (Ikeda *et al.*, 2011; Prud'homme-Généreux *et al.*, 2004; Vanzo *et al.*, 1998).

Subséquentement, il a été découvert que la chaperonne ARN Hfq s'attachait à la même région que l'hélicase sur le domaine C-terminal de la RNase E (Ikeda et al., 2011; Kawamoto *et al.*, 2006). Le rôle présumé de cette liaison serait d'aider au recrutement du dégradosome aux complexes sRNA-ARNm. Ainsi, la région C-terminale semble être impliquée dans le recrutement du dégradosome ARN pour plusieurs sRNA qui agissent de concert avec la chaperonne ARN Hfq (Morita *et al.*, 2005).

L'énolase, une enzyme glycolytique, catalyse l'interconversion du 2-phospho-D-glycerate et du phosphoénolpyruvate dans la voie de la glycolyse (Fraenkel, 1996). Bien que l'enzyme soit aussi recrutée dans le complexe du dégradosome ARN canonique, son rôle dans le complexe n'est pas encore bien défini (Nurmohamed *et al.*, 2010). Le groupe d'Aiba a émis une hypothèse suggérant que l'énolase, liée au dégradosome, pourrait être impliquée dans la réponse au stress au sucre-phosphate, régulé par le sRNA SgrS (Morita *et al.*, 2004). En outre, selon ces auteurs, la liaison de l'énolase, une protéine très abondante dans la cellule, pourrait permettre la stabilisation de la région C-terminale de la RNase E, nativement non structurée.

1.2 La traduction procaryote et sa régulation

Outre la dégradation des ARNm par les ribonucléases, la régulation de la traduction représente un moyen de moduler la stabilité de l'ARN. Les procaryotes et les eucaryotes ont des moyens différents pour réguler la traduction. Dans ce but, les bactéries vont généralement bloquer l'accès à la région d'initiation de la traduction par plusieurs mécanismes. Par exemple, les sRNA transcrits en *trans* de leurs cibles peuvent s'apparier à la région d'initiation de l'ARN et inhiber la traduction (voir section 2). Également, les structures secondaires, certaines protéines liant l'ARN et des éléments régulateurs en *cis* comme les riboswitches, aussi structurés, peuvent avoir le même effet. Pour leur part, les eucaryotes vont surtout moduler la traduction par des éléments structuraux de l'ARN, quoique les microARN puissent aussi accomplir cette fonction. Ces éléments comprennent la coiffe en 5', le contexte du codon d'initiation (position et séquence) et les structures secondaires de l'ARN. Cette section servira à mieux comprendre les facteurs déterminants et régulateurs de l'initiation de la traduction chez *E. coli*, facteurs conservés pour la plupart des bactéries.

1.2.1 L'initiation de la traduction

L'efficacité de l'initiation de la traduction est déterminée par des éléments structuraux qui aideront la sous-unité ribosomale 30S à reconnaître la région d'initiation et à former le complexe d'initiation (Ramakrishnan, 2002). Ce complexe est composé de l'ARNm, de la sous-unité ribosomale 30S et de l'ARNt initiateur fMet-ARNt^{fMet}. Le codon dont la séquence est AUG correspond au codon d'initiation majoritaire chez *E. coli*. Sa séquence est parfaitement complémentaire à l'anticodon (3'-UAC-5') retrouvé dans le fMet-ARNt^{fMet}, assurant ainsi une reconnaissance maximale. Plusieurs raisons structurelles et mécanistiques expliquent pourquoi le fMet-ARNt^{fMet} est le seul ARNt à pouvoir initier la traduction (Allen *et al.*, 2005). Entre autres, le fMet-ARNt^{fMet} serait le seul ARNt à être reconnu par les facteurs d'initiation IF2 et eIF-2, stabilisant sa liaison au site P de la sous-unité 30S. En plus, le fMet-ARNt^{fMet} ne serait pas reconnu par le facteur d'élongation, contrairement à tous les autres ARNt (Varshney *et al.*, 1991). Il existe deux autres codons alternatifs reconnus par le codon d'initiation, le GUG qui est utilisé dans une proportion de 14% et l'UUG, utilisé dans 3% des cas. Une étude montre que l'utilisation de l'un ou l'autre de ces deux codons en remplacement de l'AUG va occasionner une diminution d'environ 8 fois du niveau de traduction (Sussman *et al.*, 1996).

Une autre caractéristique déterminante de l'initiation de la traduction est la séquence Shine Dalgarno (SD) et son contexte dans le 5'-UTR de l'ARNm, appelé site de liaison au ribosome (SLR) (Figure 3). La séquence SD est généralement de 3 à 8 nt de long, riche en purines et se positionne normalement de 5 à 8 nt avant le codon initiateur. Pour être fonctionnel, le SD doit être complémentaire avec une séquence retrouvée à l'extrémité 3' de l'ARNr 16S, appelée anti-SD. La position optimale occupée par le SD dépendra de la séquence appariée avec l'anti-SD dans l'ARNr 16S afin d'établir un alignement optimal du site P du ribosome avec le codon initiateur (Chen *et al.*, 1994). Le site P est le site où l'ARNt forme le lien peptidique, le site A étant le site d'entrée des ARNt, sauf pour le fMet-ARNt^{fMet}, et le site E, la sortie.

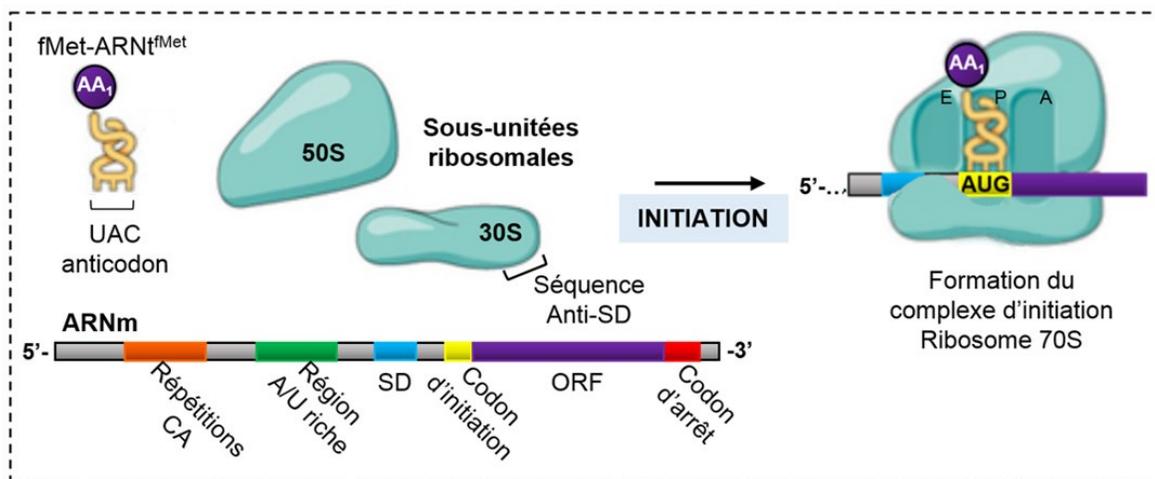


Figure 3. L'initiation de la traduction (synthèse)

Voir le texte pour les détails.

En plus d'être régulée par les paramètres entourant le codon initiateur et le SD, il existe d'autres séquences et structures régulatrices améliorant l'affinité du ribosome pour l'ARNm. Ces régions comprennent les séquences riches en adénines et en uraciles (Brock *et al.*, 2007; Komarova *et al.*, 2005), ainsi que le motif de répétitions CA (Martin-Farmer et Janssen, 1999), toutes situées en amont du SD dans le 5'-UTR (Figure 3). Cependant, le rôle exact de ces motifs n'est pas bien défini. Une hypothèse stipule que la richesse en adénines et en uraciles de ces motifs diminuerait la formation de structures secondaires stables (de Smit et Van Duin, 1990; de Smit et van Duin, 1994). Ce faisant, la protéine S1 pourrait se lier à la région A/U riche, favoriser la liaison du 30S à proximité avec le SLR et augmenter l'efficacité de l'initiation de la traduction (Roberts et Rabinowitz, 1989). La protéine S1 est facilité la traduction d'ARNm ayant une séquence SD non consensuelle ou débutant par le codon d'initiation (*leaderless*) (Moll *et al.*, 2002; Roberts et Rabinowitz, 1989).

1.2.2 La régulation de la traduction par l'ARN

La traduction est souvent modulée par des structures en *cis* dans le 5'-UTR de l'ARNm régulé, appelé riboswitch ou par la liaison au SD de sRNA transcrits en *trans*. Les particularités des sRNA seront discutées de manière détaillée dans la section traitant des sRNA. Pour leur part, les riboswitches sont des structures d'ARN généralement retrouvées dans les régions non codantes qui adoptent différentes conformations permettant de moduler l'expression des gènes suite à un signal environnemental. Ces signaux incluent la liaison d'un ligand, d'un métabolite, ou un arrêt de la traduction (Park *et al.*, 2010; Winkler et Breaker, 2005). Généralement, la liaison du ligand à une région appelée aptamère entraînera un changement de structure dans la plateforme d'expression. Cette modification de la structure peut mener à l'arrêt de la transcription par la formation d'une tige terminatrice ou causer l'inhibition de la traduction par la séquestration du SLR dans une structure secondaire (Blouin *et al.*, 2009).

Pour s'adapter à son environnement physique, les bactéries ont adopté différents moyens, comme les thermorégulateurs, qui sentent les variations de l'environnement et s'ajustent l'expression des gènes en conséquence. À l'image des riboswitches, les thermorégulateurs sont des structures ARN sensibles aux changements de températures qui réguleront l'expression d'un gène (Narberhaus *et al.*, 2006). Par exemple, chez *Listeria monocytogenes*, les gènes de virulence sont exprimés à leur niveau maximal à 37°C et sont éteints à 30°C. Un thermorégulateur devant le gène *pfrA*, exprimant un facteur de transcription impliqué dans l'activation de la virulence, assure son expression à 37°C, l'augmentation de température déstabilisant la structure ARN qui séquestre le SD et le codon initiateur (Johansson *et al.*, 2002).

1.2.3 La régulation de la traduction par les protéines

Les protéines sont des éléments régulateurs qui sont connus depuis longtemps pour réguler, généralement négativement, l'initiation de la traduction en liant directement l'ARN (Babitzke *et al.*, 2009). Un grand nombre de ces protéines régulatrices auront une fonction primaire différente que de réguler la traduction. Or, la régulation de la traduction par une protéine sera souvent liée à sa fonction primaire. C'est le cas de certaines protéines ribosomales dont l'expression est coordonnée avec le niveau cellulaire de l'ARNr, leur substrat principal. En effet, lorsque l'ARNr est saturé, ces protéines ribosomales vont inhiber la traduction de leur ARNm en s'y attachant avec une plus faible affinité. Les protéines régulatrices agiront en entrant directement en compétition avec la sous-unité 30S (Caillet *et al.*, 2003), en séquestrant la petite sous-unité ribosomale dans une forme inactive sur l'ARNm (Schlax *et al.*, 2001) ou en favorisant la formation de structures séquestrant le SLR (van Meerten *et al.*, 2001).

Dans de rares cas, les protéines régulatrices peuvent agir comme activateurs de la traduction en déstabilisant une structure séquestrant le SLR (Hattman, 1999). Les protéines liant l'ARN, à l'image de la régulation par l'ARN, sont des effecteurs avec des mécanismes de régulation post-transcriptionnels variés et complexes permettant de contrôler finement le niveau d'expression des protéines.

2 Les petits ARN régulateurs bactériens

Bien avant la découverte des micro-ARN chez les eucaryotes, les sRNA bactériens étaient déjà caractérisés et reconnus pour leur rôle de régulateur. Les ARN régulateurs bactériens (sRNA) composent un large groupe hétérogène de molécules aux fonctions variées accomplies par une multitude de mécanismes. Ils peuvent être encodés soit à distance de l'ARNm régulé, agissant en *trans*; soit être transcrits à partir du même locus que l'ARNm cible, mais dans le sens opposé, régulant en *cis* (Georg et Hess, 2011; Thomason et Storz, 2010). Également, un autre type de sRNA module l'activité de protéines régulatrices en mimant leur site de liaison et en les séquestrant, lorsqu'exprimé (Babitzke et Romeo, 2007; Wassarman, 2007). Les sRNA dont il sera question dans la présente section concernent les sRNA exprimés en *trans* par rapport à leurs cibles ARNm.

Chez *E. coli*, le premier petit ARN régulateur chromosomique découvert a été baptisé MicF, pour *mRNA interfering complementary RNA*, et régulait l'ARNm encodant la porine OmpF (Mizuno *et al.*, 1984). Malgré l'identification de quelques sRNA, leur importance physiologique est restée peu reconnue durant de nombreuses années. Toutefois, depuis 2001, nombre de sRNA ont été décelés et caractérisés, d'abord grâce à des études informatiques systématiques recherchant des séquences intergéniques conservées, puis en utilisant des techniques plus avancées comme la micropuce à ADN ou le séquençage à haut débit (Irnov *et al.*, 2010; Mann *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2010). Il est maintenant bien établi que les sRNA, généralement exprimés suite à des stress environnementaux, agissent comme régulateurs majeurs de l'homéostasie de la cellule. À ce jour, plus de 90 régulateurs ARN encodés en *trans* ont été identifiés chez *E. coli*, représentant un peu plus de 2% du génome. Ils sont généralement non codants, d'une longueur comprise entre 50 et 300 nt et s'apparient avec une complémentarité partielle à leurs cibles ARNm.

2.1 Sommaire des mécanismes d'action

Les sRNA exprimés en *trans* contrôlent l'expression de leurs cibles ARNm par divers mécanismes post-transcriptionnels. De manière canonique, la plupart réguleront négativement leurs cibles en bloquant l'initiation de la traduction par leur liaison au SLR et dans certains cas, en induisant activement la dégradation de l'ARNm cible (pour des exemples, voir Tableau 1). La répression traductionnelle serait le facteur principal responsable de la diminution de l'expression des protéines, alors que la dégradation stœchiométrique de l'ARNm et du sRNA renforcerait l'effet négatif et le rendrait irréversible (Morita *et al.*, 2006). La co-dégradation du duplex sRNA-ARNm semble être un mécanisme fréquent, généralement initiée par un clivage de la RNase E dans l'ARNm à distance du complexe (Massé *et al.*, 2003; Prevost *et al.*, 2011). Chez les Enterobacteriaceae, la grande majorité des exemples de régulation par un sRNA observé implique la protéine chaperonne Hfq.

Parfois, les sRNA activent l'expression de leurs cibles en s'appariant de manière anti-sens sur une structure inhibitrice séquestrant le SLR et ainsi augmenter l'initiation de la traduction de l'ARNm (Tableau 1) (Fröhlich et Vogel, 2009). Plus récemment, des mécanismes non canoniques de répression par les sRNA ont été identifiés. Par exemple, certains sRNA répriment l'initiation de la traduction par un mécanisme indirect, le sRNA ne s'appariant pas au SLR, et d'autres déstabilisent l'ARNm cible sans inhiber préalablement l'initiation de la traduction (Tableau 1). Ainsi, les sRNA agissant en *trans* chez les procaryotes ont été montrés réguler leurs cibles en utilisant une panoplie de mécanismes permettant la modulation de l'expression des gènes.

Types de régulation		sRNA	Cibles ARNm	Rôles	Détails du Mécanisme
Sans Hfq	Inhibition traduction (pas au RBS)	IstR	<i>tisB</i>	Dommage à l'ADN/réponse SOS	IstR induit le clivage du site de pause du 30S.
	Déstabilisation	IpeX	<i>ompC</i>	Infection phage	Mécanisme inconnu
Hfq dépendent	Induction dégradation	MicC*	<i>ompD</i>	Stress membranaire	MicC lie l'ORF et recrute la RNase E, sans bloquer la traduction.
	Inhibition traduction (au RBS)	RyhB	<i>uof-fur</i>	Homéostasie du Fe	Hfq facilite la liaison du sRNA au RBS et participe parfois à bloquer la traduction de l'ARNm.
		SgrS	<i>ptsG</i>	Stress glucose-phosphate	
		Spot 42	<i>galK, sdhC</i>	RCC	
	Inhibition traduction (indirecte)	OmrA/B	<i>csgD</i>	Stress membranaire	OmrA/B lie une structure dans le 5'-UTR causant la séquestration du RBS.
		RybB*	<i>ompN</i>	Stress membranaire	RybB lie l'ORF (codons 2 à 7) inhibant la formation du complexe d'initiation.
		GcvB*	<i>glfI, dppA, oppA</i>	Disponibilité des acides aminés	GcvB lie un motif de répétitions CA dans le 5'-UTR.
	Inhibition traduction + induction dégradation	SgrS	<i>manXYZ</i>	Stress glucose-phosphate	Le sRNA s'apparie au RBS et réprime la liaison du ribosome. L'ARNm cible est dégradé suite au recrutement du dégradosome ARN.
		RybB	<i>sdhC</i>	Stress membranaire	
		RyhB	<i>sodB, fumA, sdhCDAB</i>	Homéostasie du Fe	
		MicA	<i>ompA</i>	Stress membranaire	
Régulation positive	RprA/ArcZ /DsrA	<i>rpoS</i>	Choc osmotique/Phase stationnaire/ Froid	L'activation de la traduction stabilise l'ARNm.	
	RyhB	<i>cirA, shiA</i>	Homéostasie du Fe		

Tableau 1: Synthèse des différents mécanismes de régulation par les sRNA
(Balasubramanian et Vanderpool, 2013; Guillier *et al.*, 2006; Jousset *et al.*, 2009)

Les cibles ARNm présentées ne sont pas exhaustives et sont données à titre d'exemple.
*Mécanismes de régulation caractérisés chez *Salmonella Typhimurium*, les autres ont été montrés chez *E. coli*.

2.1.1 La chaperonne ARN Hfq

Découverte à la fin des années 1960 chez *E. coli*, la protéine chaperonne Hfq a été identifiée comme un facteur essentiel de l'hôte à la réplication du bactériophage Q β , d'où l'origine du nom Hfq pour *host factor* Q β . Elle est l'une des premières protéines reconnues de la grande famille des protéines de type Sm et LSm (*Sm-like*) liant l'ARN et présente dans les trois domaines de la vie. À la fois Hfq et les protéines Sm-LSm contribuent à la régulation post-transcriptionnelle de l'ARN en général. En effet, les protéines Sm-LSm comprennent, entre autres, des composantes majeures de l'épissage, de petites protéines nucléaires et des chaperonnes impliquées dans le décoiffage de l'ARN.

Typiquement, la protéine chaperonne Hfq s'assemble en hexamère et faciliter les interactions des sRNA avec leurs cibles ARNm encodées en *trans*. L'interaction d'Hfq avec l'ARN se fait par deux faces aux affinités distinctes, soit proximale et distale (Mikulecky *et al.*, 2004). Un cristal du complexe d'Hfq liant un ARN poly(A) sur sa face distale a mis en évidence un mécanisme de liaison où les deux premiers nucléotides d'un triplet interagissaient avec Hfq et où, le troisième nucléotide était exposé au solvant (Link *et al.*, 2009). Cette même étude révélait une préférence de liaison de la face distale pour des séquences présentant un motif A-R-N, où R est une purine et N représente n'importe lequel des nucléotides. La face proximale possède une affinité plus grande pour les séquences simple-brin et riches en uraciles, un motif retrouvé à l'extrémité 3' des terminateurs Rho-indépendant (Sauer et Weichenrieder, 2011). Récemment, les évidences indiquaient qu'Hfq lierait les sRNA sur sa face proximale à leur extrémité 3' terminale plutôt que sur une séquence AU-riche interne (Otaka *et al.*, 2011).

La protéine Hfq est connue depuis longtemps pour stabiliser les sRNA s'y attachant en diminuant l'accès des ribonucléases à l'ARN (Masse *et al.*, 2003; Møller *et al.*, 2002a). Par surcroît, la chaperonne aurait pour fonction de faciliter la formation du complexe intermoléculaire sRNA-ARNm, le stabiliser et même recruter d'autres composantes, comme le dégradosome ARN. Hfq peut influencer de plusieurs façons la traduction et la stabilité des ARNm, soit en aidant les sRNA à s'apparier à leurs cibles, soit en induisant elle-même les effets sur l'ARNm (Tableau 1). Par exemple, la protéine Hfq peut être recrutée par un sRNA au niveau du SLR et bloquer l'initiation de la traduction (Desnoyers et Massé, 2012;

Vytvytska *et al.*, 2000). Aussi, Hfq peut se lier plus en amont dans le 5'-UTR et ainsi, augmenter la traduction de l'ARNm en défaisant une structure secondaire, stabilisant l'ARNm par la même occasion (Soper *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2002). Aussi, la chaperonne accélérerait la dégradation par les exoribonucléases en direction 3'-5' en rendant l'ARN accessible à la polyadénylation (Hajnsdorf et Régnier, 2000; Mohanty *et al.*, 2004).

2.2 Le petit ARN RyhB

Le fer est un microélément essentiel pour l'activité catalytique de nombreuses enzymes impliquées dans divers processus cellulaires vitaux, tels la respiration cellulaire, le cycle du citrate, la photosynthèse, la régulation des gènes et la production de métabolites. Néanmoins, le Fe ferreux (Fe^{2+}) devient cytotoxique en présence de sous-produits du métabolisme cellulaire aérobique comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le superoxyde (O_2^-), dû à la réaction de Fenton. Ce faisant, il devient nécessaire de contrôler l'acquisition de ce microélément dans l'environnement et de limiter ces effets toxiques, lorsque retrouvés à fortes concentrations. Pour ces raisons, les organismes aérobies ont évolué vers l'utilisation de systèmes complexes de régulation de l'homéostasie du Fe intracellulaire dans le but de maintenir son niveau physiologique et ainsi, limiter ses effets cytotoxiques.

Au cours des dernières années, une meilleure compréhension des mécanismes de régulation post-transcriptionnels a permis de mettre en lumière de nouveaux systèmes de régulation du métabolisme du Fe. Par exemple, le sRNA RyhB, d'abord identifié chez *E. coli*, a été démontré comme jouant un rôle majeur dans la redistribution du Fe, lors d'une carence chez plusieurs bactéries, telles que *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Vibrio cholerae*, *Nisseria meningitidis*, *Shigella* spp, etc. De leur côté, les levures ont opté pour l'utilisation de protéines afin d'accomplir des fonctions similaires en carence de Fe.

2.2.1 Le métabolisme du fer

Malgré le fait que le Fe soit le quatrième élément le plus abondant de la croûte terrestre, il n'est que très peu biodisponible dans les habitats aérobies, en raison de sa faible solubilité à pH physiologique. Pour remédier à ce problème, les microorganismes ont développé nombre de mécanismes pour en diminuer la toxicité, l'extraire de l'environnement et survivre lors d'une carence.

L'évolution de la vie terrestre a débuté dans un environnement anaérobique dans lequel la formation de groupements Fe-souffre ([Fe-S]) offrait l'avantage de transférer efficacement les électrons et de lier les composés azotés et les oxanions, tels les acides aminés. Ce faisant, les [Fe-S] incarnent l'un des cofacteurs enzymatiques les plus utilisés par les protéines modernes. Au fil du temps, l'oxygénation de l'atmosphère par les organismes photosynthétiques a engendré un risque d'empoisonnement cellulaire causé par la réactivité de ces [Fe-S] exposés à l'oxygène. La toxicité du Fe relève de la réaction de Fenton : le Fe intracellulaire accessible est oxydé en contact d' H_2O_2 , engendrant des espèces réactives de l'oxygène (ROS) susceptibles d'endommager l'ADN, les lipides et les protéines (Imlay et Linn, 1988) (Figure 4).



Figure 4. La réaction de Fenton

Les espèces réactives de l'oxygène correspondent aux formes partiellement réduites: H_2O_2 , le peroxyde d'hydrogène et HO^\bullet , le radical hydroxyle et O_2^- , l'ion hydroxyle. La réaction de Fenton consiste en un transfert d'électron du Fe ferreux au peroxyde d'hydrogène, générant un radical hydroxyle réactif. Les ions hydroxyle, à l'image du peroxyde d'hydrogène, sont susceptibles de provoquer des dommages oxydatifs indirects en libérant un atome de Fe des [Fe-S] des protéines de la famille des déshydratases (Keyer et Imlay, 1996).

Un mécanisme crucial aux organismes aérobies, qui permet l'adaptation de leur mode de vie, consiste en une cascade de réactions qui permet aux enzymes de types superoxyde dismutase et catalase de transformer successivement les ions superoxydes en H_2O_2 , puis en molécules d'eau et d'oxygène. Chez *E. coli*, la régulation de l'expression de ces voies est indépendante, mais toutes deux sous le contrôle de régulateurs transcriptionnels (SoxR et OxyR) sensibles

à l'une ou l'autre de ces espèces réactives d'oxygène (Imlay, 2008). La double mutation catalase/peroxydase compromet la croissance d'*E. coli* en présence d'oxygène, illustrant l'importance de cette voie (Park *et al.*, 2005). Bien que ces voies métaboliques soient ubiquitaires, une exception se retrouve chez l'espèce *Lactobacillus plantarum* (Archibald et Fridovich, 1981) qui n'utilise pas l'activité de la superoxyde dismutase.

Ensuite, la régulation de l'homéostasie du Fe chez les bactéries Gram négatives passe par la protéine Fur, pour *ferric uptake regulator*. Fur encode un facteur de transcription réprimant l'expression de plus de 90 protéines impliquées dans l'acquisition du Fe (McHugh *et al.*, 2003). Lorsque le niveau en Fe de la cellule devient suffisamment élevé, Fur s'active en liant son cofacteur, le Fe ($K_d = 55\mu\text{M}$) sous forme ferreux, et va réprimer les promoteurs, en bloquant l'accès à la polymérase ARN (Neilands, 1993). L'expression de Fur est positivement régulée par les régulateurs du stress oxydatif, nécessaire étant donné la moins grande affinité de Fur pour le Fe dans cette condition (Zheng *et al.*, 1999). Les gènes régulés par Fur sont impliqués dans la synthèse de sidérophores et dans les systèmes de transport de molécules ayant une forte affinité pour le Fe ferrique. La fonction des sidérophores, de petites molécules appelées entre autres entérobactine et entérochéline, est de solubiliser le Fe, sinon inaccessible, et de le transporter dans la cellule bactérienne. Les transporteurs d'*E. coli* vont internaliser spécifiquement les sidérophores, mais aussi d'autres molécules liant le Fe comme le citrate, l'hème, la lactoferrine et la transferrine (Miethke et Marahiel, 2007). Par ailleurs, la protéine Fur régulerait négativement l'expression du sRNA RyhB, régulateur majeur de l'homéostasie du Fe (Masse et Gottesman, 2002).

2.2.2 Le rôle de RyhB dans l'homéostasie du fer

Le sRNA RyhB long de 90 nt a été découvert simultanément par deux études génomiques, lesquelles ont identifié et confirmé l'expression de gènes encodant des sRNA (Argaman *et al.*, 2001; Wassarman *et al.*, 2001). En carence de Fe, RyhB est exprimé et réprime l'expression de plus de 18 ARNm encodant pour 56 protéines (Masse *et al.*, 2005). Cette étude de micropuce à ADN a révélé que la plupart des cibles encodaient pour des enzymes du cycle du citrate (*acnB*, encodant pour l'aconitase; *sdhCDAB*, la succinate déshydrogénase et *fumA*, la fumarase A), pour deux ferritines (*bfr* et *ftnA*), pour la machinerie de synthèse des

ne possède pas de cible ARNm connue encodant des protéines essentielles dépendantes du Fe. Par exemple, les enzymes telles la ribonucléotide réductase ou la dihydroxyacide réductase, jouant respectivement un rôle dans la synthèse de l'ADN et des acides aminés ne sont pas régulées par le sRNA. Pour effectuer cette redistribution du Fe, RyhB induit la dégradation de nombre d'ARNm encodant des protéines abondantes, mais non essentielles utilisant le Fe.

Dernièrement, un mécanisme post-transcriptionnel distinct, permettant l'adaptation à la carence en Fe, a été identifié (Salvail et al., 2010). Le sRNA, par un mécanisme Fur indépendant, serait impliqué dans la synthèse du sidérophore appelé entérobactine. Pour ce faire, RyhB contribuerait par un mécanisme, encore à préciser, à l'expression normale de transcrits impliqués dans la synthèse de sidérophores (*entCEBAH*) et dans son import (*fepA*). Puis, un autre mécanisme impliquerait la répression traductionnelle par RyhB de l'ARNm *cysE*, la sérine acétyltransférase qui utilise la sérine dans les premières étapes de synthèse de la cystéine. Cette répression redirigerait l'utilisation de la sérine vers la voie de synthèse des sidérophores (Figure 5). Il est intéressant de constater que *cysE* est, jusqu'à présent, la seule cible ARNm connue n'encodant pas pour une protéine utilisant le Fe.

2.2.3 Les mécanismes de régulation du sRNA RyhB

Dans le cas d'une cible négative, le sRNA RyhB, comme plusieurs autres ARN régulateurs, active la dégradation de sa cible ARNm par un mécanisme impliquant le dégradosome ARN et la chaperonne ARN Hfq. Précédemment, il a été suggéré que la machinerie de dégradation était amenée à proximité du site de liaison du sRNA en formant un complexe avec la protéine chaperonne Hfq (Morita et al., 2005). Par ailleurs, il semble que RyhB ne soit pas impliqué directement dans la dégradation de la cible ARNm, mais aurait plutôt un rôle dans l'inhibition de l'initiation de la traduction, un prérequis pour la dégradation (Afonyushkin *et al.*, 2005). Une fois le complexe ribonucléoprotéique formé, le dégradosome ARN promeut la dégradation des cibles ARNm négatives (ex. : *sodB*, *fumA*, *iscRSUA*) par un clivage interne de la RNase E et ce, à distance du site d'attachement du sRNA (Prevost et al., 2011).

Un mécanisme atypique de répression par RyhB a été découvert pour le polycistron *iscRSUA*, encodant pour l'une des machineries de synthèse des [Fe-S]. En carence de Fe, RyhB

s'attache sur le 5'-UTR d'*iscS* (le deuxième cistron) et induit une dégradation différentielle du polycistron, ne dégradant que l'ARN en aval d'*iscR*. La présence d'une forte structure secondaire dans la région intergénique d'*iscRS*, protège le premier cistron de la dégradation, entraînant l'accumulation du transcrit *iscR* à l'extrémité 5' de l'ARNm. Ce dernier encode le facteur de transcription IscR qui module l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse des [Fe-S]. En conditions limitées en Fe, IscR sous sa forme Apo, active l'expression de l'opéron *suf*, système de synthèse de secours des [Fe-S] (Desnoyers *et al.*, 2009).

Bien que la majorité des mécanismes de régulation des sRNA exprimés en *trans* soit négatif, le sRNA RyhB arrive également à réguler positivement certaines cibles ARNm, telles *cirA* et *shiA* (Tableau 1) (Prevost *et al.*, 2007; Salvail *et al.*, 2013). L'appariement de RyhB entraîne la stabilisation et l'activation de la traduction de l'ARNm *cirA* en délocalisant Hfq du site d'initiation de la traduction. Ce faisant, la sous-unité 30S peut s'attacher au SLR et initier la traduction, protégeant ainsi la dégradation rapide de l'ARN par la RNase E. Puis, dans le cas de l'ARN *shiA*, il a été démontré que RyhB s'appariait en amont du SLR, défaisait une structure qui le séquestrait auparavant et ainsi, activait sa traduction. Nonobstant le fait que RyhB ait peu de cibles positives connues, il est intéressant de constater la grande variété de mécanismes par lesquels il régule l'expression de ses nombreuses cibles.

2.3 Le petit ARN Spot 42

Hautement conservé chez les entérobactéries, le petit ARN régulateur Spot 42 a été identifié il y a près de quatre décennies quand il a été observé sur un gel en deux-dimensions, après une extraction d'ARN de petite taille (Ikemura et Dahlberg, 1973). Déjà soupçonné pour ses fonctions régulatrices, il a rapidement été découvert que l'expression de cet ARN de courte taille était sous le contrôle négatif du facteur de transcription de la répression catabolique (CRP), lorsque couplé à l'Adénosine 5' monophosphate cyclique (AMPC) (Sahagan et Dahlberg, 1979a, b). Plus récemment, la fonction physiologique du sRNA Spot 42 comme modulateur post-transcriptionnel de plusieurs gènes relié au métabolisme du carbone a été mise en évidence dans la voie de régulation de la répression catabolique du carbone (RCC) (Beisel et Storz, 2011; Møller *et al.*, 2002b). En plus, d'autres études ont contribué à une meilleure compréhension des mécanismes utilisés par le sRNA dans la régulation de ces

gènes (Beisel *et al.*, 2012; Desnoyers et Massé, 2012). Toutefois, nombre de questions restent toujours à répondre par rapport au rôle exact de Spot 42, vu l'importance et la complexité de la RCC.

2.3.1 La répression catabolique du carbone

Chez de nombreux eucaryotes et procaryotes, le glucose exerce un effet répresseur sur les voies cataboliques des autres sources de carbones assimilables par des mécanismes sophistiqués. La RCC est définie comme la répression du métabolisme des sucres secondaires en présence d'un sucre privilégié du point de vue métabolique (ex. : glucose) (Görke et Stülke, 2008).

La voie métabolique de la RCC a été identifiée chez *E. coli* comme l'une des plus importantes, régulant un nombre aussi grand que 10% des gènes totaux (Liu *et al.*, 2005). Les premières évidences de l'utilisation sélective des sucres ont été faites par Jacques Monod en 1942 lorsqu'il présentait la diauxie du glucose et du lactose dans une culture d'*E. coli* contenant des concentrations limitantes de chaque sucre. Le glucose se distingue comme le sucre utilisé de manière privilégiée étant donné sa grande disponibilité et sa simplicité à être métabolisé. Les mécanismes régissant la RCC varient selon les bactéries, mais comprennent généralement une composante régulant la transcription (activation et répression) et un contrôle de la traduction par des sRNA ou des protéines liant l'ARN.

L'apport en glucose est métabolisable par le système de phosphotransférase des carbohydrates (PTS). Ce sucre inhibe complètement l'utilisation de sucres fermentables par la cellule (lactose, maltose, arabinose), évitant la duplication de système énergétique. Chez les entérobactéries, plus spécifiquement chez le modèle *E. coli*, le mécanisme de la RCC met en jeu un messenger secondaire, l'AMPc, qui lie la protéine activatrice de gènes cataboliques (CRP) pour l'activer (Figure 6). Ce faisant, le complexe CRP-AMPc va réguler l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans le catabolisme secondaire, mais aussi celle de sRNA comme Spot 42, CyaR ou FnrS.

Le régulateur central régissant la dynamique de l'interaction de CRP et AMPc est la protéine spécifique au glucose EIIA (EIIA^{Glc}), un domaine du transporteur du glucose. La forme phosphorylée de l'enzyme EIIA^{Glc}, présente en absence de glucose, interagirait avec

l'adénylate cyclase pour stimuler la production d'AMPc (Park *et al.*, 2006). À l'inverse, la forme déphosphorylée d'EIIA^{Glc}, interagit avec les protéines de plusieurs systèmes de transport de sources de carbone fermentable (ex. : LacY) et avec des enzymes métaboliques (ex. : GlpK) (Schweizer *et al.*, 1985). Les niveaux d'EIIA^{Glc}-phosphorylé et d'AMPc ont seulement été faiblement corrélés chez *E. coli* (Bettenbrock *et al.*, 2007; Epstein *et al.*, 1975), suggérant la possibilité que d'autres facteurs soient impliqués dans cette activation. La régulation du niveau de phosphorylation d'EIIA^{Glc} passe par une cascade de phosphorylation dépendante de l'apport en glucose, pouvant aussi être exprimée en terme de ratio de phosphoenolpyruvate par rapport au pyruvate, produits de la voie PTS (Hogema *et al.*, 1998).

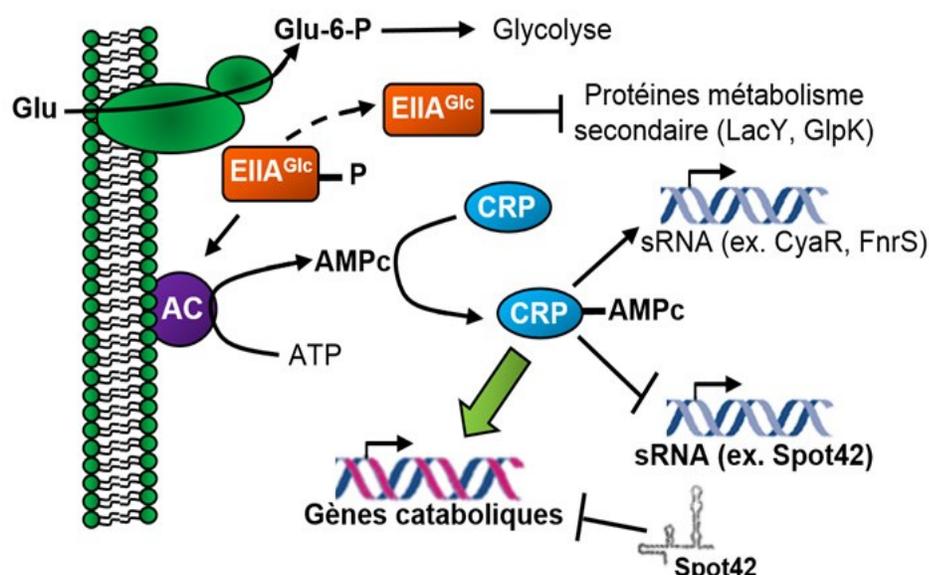


Figure 6. La répression catabolique

Schéma illustrant les principales réactions de la voie de régulation de la RCC chez *E. coli*. Illustration simplifiée tirée de Görke et Stülke (Görke et Stülke, 2008).

Dernièrement, des travaux suggéraient que les différentes voies de la RCC auraient évolué de manière divergente dans les groupes étudiés, les Actinobactéries, les firmicutes ou les pseudomonades. Pour de nombreuses bactéries pathogènes, la RCC tiendrait un rôle majeur dans la régulation de l'expression gènes de virulence, une adaptation aux sources de carbone retrouvées chez l'hôte. Par exemple, certaines bactéries, comme des souches pathogènes d'*E. coli* vont dépendre de la RCC pour exprimer des protéines d'adhésion, des cytotoxines et l'hémolysine, nécessaires à l'établissement de leur virulence. En plus, la RCC contribuerait à la résistance à certains antibiotiques, comme la résistance à la méthicilline et à l'oxacillin

chez *Staphylococcus aureus*. Toutefois, beaucoup reste encore à découvrir quant aux implications réelles de la RCC et à la diversité des mécanismes utilisés dans cette voie.

2.3.2 L'implication de Spot 42 dans la répression catabolique

La découverte que le complexe CRP-AMPc réprimait la transcription de Spot42 fut l'une des premières évidences de l'implication du sRNA dans la voie de la RCC. Par ailleurs, en absence de glucose, le niveau de CRP-AMPc diminue ce qui permet l'expression de Spot 42 (Figure 6). Le sRNA agit de concert avec le régulateur transcriptionnel et cible des ARNm impliqués dans nombre de facettes du métabolisme secondaire, tels le transport et le catabolisme des sucres ainsi que la balance redox (Beisel et Storz, 2011). Récemment, il a été démontré que Spot 42 était impliqué, avec le régulateur CRP, dans une boucle de régulation multivoie cohérente de type feedforward. Dans cette boucle de régulation, CRP-AMPc active les gènes du métabolisme secondaire alors qu'en parallèle, le sRNA réprime la plupart de ces mêmes cibles en absence du régulateur transcriptionnel. Cette boucle de régulation aurait pour rôle d'aider à la régulation négative des gènes lorsqu'une source de carbone préférentielle est disponible, accélérant l'utilisation du glucose. Aussi, l'hypothèse suggère que, dans les cas où la source de carbone privilégiée s'épuiserait, cette boucle de régulation permettrait de retarder l'activation des cibles, allouant une période tampon durant laquelle le glucose pourrait réapparaître (Beisel et Storz, 2011; Mangan *et al.*, 2003).

L'impact physiologique de Spot 42 pourrait être situé au niveau du mode de vie dans la colonisation du tractus intestinal par les souches commensales d'*E. coli*. Il a été démontré que le sRNA Spot 42 participait à la régulation de la consommation de trois des principaux sucres de la muqueuse gastro-intestinale des mammifères, l'acide N-acétylneuraminique, le L-fucose et le D-ribose (Autieri *et al.*, 2007). L'importance de la voie catabolique des sucres par rapport aux autres voies métaboliques a été établie dans la colonisation et la survie dans le mucus, ajoutant à la valeur potentielle du sRNA, co-régulateur avec CRP de la RCC (Chang *et al.*, 2004). Les mécanismes exacts expliquant pourquoi Spot 42 confère des avantages évolutifs dans l'adaptation aux environnements hostiles resteront à déterminer.

2.3.3 Les mécanismes de régulation de Spot 42

Le sRNA Spot 42 régule plus fréquemment ses cibles négatives au niveau traductionnel et plus rarement, en induisant activement la dégradation. En plus, Spot 42 régule préférentiellement ses cibles ARNm en étroite collaboration avec la chaperonne ARN Hfq, l'aidant souvent à réprimer l'initiation de la traduction (Beisel et al., 2012). Puis, comme pour bien d'autres petits ARN, Hfq serait aussi un facteur essentiel à la stabilité du sRNA.

L'étude de la régulation de l'ARNm *galETKM* par Spot 42 démontre bien l'importance d'Hfq (Møller et al., 2002b). Dans ce mécanisme, la protéine Hfq est nécessaire à l'appariement de Spot 42 sur le SLR de *galK* pour ensuite bloquer sa traduction, sans affecter celle des autres cistrons.

Un second exemple de régulation par Spot 42, en étroite coopération avec Hfq, est celui de l'opéron *sdhCDAB*. Une étude a démontré que l'appariement du sRNA dans le 5'-UTR de *sdhC* était trop en amont du SLR pour permettre, à lui seul, un arrêt traductionnel. Ainsi, Spot 42 nécessite le recrutement actif d'Hfq au SLR pour bloquer la liaison de la sous-unité 30S du ribosome (Desnoyers et Massé, 2012).

Les régions simple-brin de Spot 42 semblent être impliquées dans le mécanisme de régulation de plusieurs de ses cibles, en s'appariant avec plus d'une région de l'ARNm ciblé (Beisel et al., 2012). La possibilité d'un ARNm d'être apparié par plusieurs régions simple brin de Spot 42 pourrait accorder une plus grande flexibilité dans sa régulation en augmentant l'affinité pour sa cible ou en permettant à plusieurs sRNA de lier le même ARNm.

2.3.4 Les avantages de la régulation par les petits ARN régulateurs

Les sRNA ont démontré leur efficacité comme régulateurs globaux de la réponse aux stress environnementaux et du métabolisme cellulaire. Néanmoins, puisqu'ils occupent pratiquement la même fonction cellulaire que les facteurs de transcription, il est légitime de se questionner à propos des avantages réels qu'offrent les sRNA (Storz *et al.*, 2011; Waters et Storz, 2009).

D'abord, l'expression des sRNA aurait l'avantage d'avoir un coût métabolique réduit comparativement aux protéines régulatrices étant donné qu'ils sont, comme leur nom l'indique, de courts transcrits d'ARN généralement non codants et non traduits. En plus d'occuper une infime partie du génome (taille entre 50-300 nt), leur expression peut être très rapide puisqu'ils ne requièrent aucune traduction. En comparaison, un facteur de transcription sera généralement encodé par un gène de plus grande taille (une moyenne de 1000 nt chez *E. coli*) et mobilisera la machinerie de traduction pour son expression. En outre, les bactéries avec des génomes de petite taille pourraient tirer un gain en efficacité en priorisant l'utilisation des sRNA sur celle des facteurs de transcription.

Un autre des avantages de la régulation par les sRNA est la rapidité et l'efficacité de leur exécution. En effet, comme les sRNA agissent au niveau post-transcriptionnel, ils régulent directement le niveau d'expression des protéines. À l'inverse, les facteurs de transcription modulent l'expression de l'ARNm en liant le promoteur, laissant aux ARNm déjà exprimés de continuer à être traduits en protéines durant un certain temps, ce qui retarde la réponse au stress. Dans le cas où la répression rapide d'une protéine serait critique, les bénéfices d'une régulation par un sRNA sont encore plus marqués dans le cas où les ARNm régulés sont très stables, grâce à une longue demi-vie. C'est le cas, par exemple, de la régulation des protéines Omps chez *S. enterica* (Papenfort *et al.*, 2010).

Par ailleurs, l'utilisation complémentaire de facteurs de transcription et de sRNA dans une même voie métabolique s'est montrée essentielle dans les cas où l'expression d'un gène doit être fortement régulée, et ce, dans un grand nombre de réponses cellulaires. Notons que plusieurs ARNm sont à la fois contrôlés aux niveaux transcriptionnel, traductionnel et post-transcriptionnel. C'est le cas du facteur de transcription σ^s qui est ciblé par quatre sRNA (OxyS, AcrcZ, DsrA et RprA), tous induits par différents stress. Enfin, il faut mentionner que le contrôle de type hybride peut amener une diminution des fuites d'expression (Beisel et Storz, 2011).

3 Les protéines régulatrices de l'homéostasie du fer

À travers les régulateurs transcriptionnels (ex : Fur), les petits ARN régulateurs (ex : RyhB) et les protéines d'assemblage et de synthèse des [Fe-S] (ex : Isc, Suf), les protéines utilisant les [Fe-S], telles les déshydratases, sont aussi impliquées dans la régulation de l'homéostasie du Fe chez *E. coli*. Cette section permettra de clarifier les différentes caractéristiques et fonctions des aconitases. Subséquemment, les rôles et fonctions de la glutathione monothiol seront aussi discutés pour son rôle dans le métabolisme des [Fe-S].

3.1 La protéine aconitase

Retrouvées de manière ubiquitaire chez pratiquement tous les organismes vivants, les enzymes aconitases, de la famille des déshydratases, sont responsables de la conversion du citrate en isocitrate par l'intermédiaire *cis*-aconitate, dans le cycle du citrate. Ainsi, l'enzyme tient un rôle important du métabolisme central de plusieurs organismes. La plupart de ces enzymes ont aussi un rôle en tant que régulateurs post-transcriptionnels pour stabiliser des transcrits ou bloquer l'initiation de leur traduction. La transition d'un rôle à l'autre sera déterminée par la condition en Fe ou le niveau oxydatif de la cellule, puisque la déstabilisation du [Fe-S] de l'aconitase la fera passer d'une enzyme catalytique à un régulateur post-transcriptionnel.

3.1.1 La famille des déshydratases

Des bactéries aux mammifères, les protéines de la famille des déshydratases, dont la plus étudiée est l'aconitase, possèdent un [Fe-S] de type [3Fe-4S] (Figure 7A). Pour ces enzymes, seuls trois des quatre atomes de Fe forment un lien thiolate avec les atomes de soufre des résidus cystéines de la protéine, le quatrième atome de Fe étant exposé au solvant. Dans le cas de l'aconitase et de la majorité des déshydratases, le groupement [3Fe-4S] agit comme un acide de Lewis, un accepteur d'électrons, et favorise la polarisation du substrat lié.

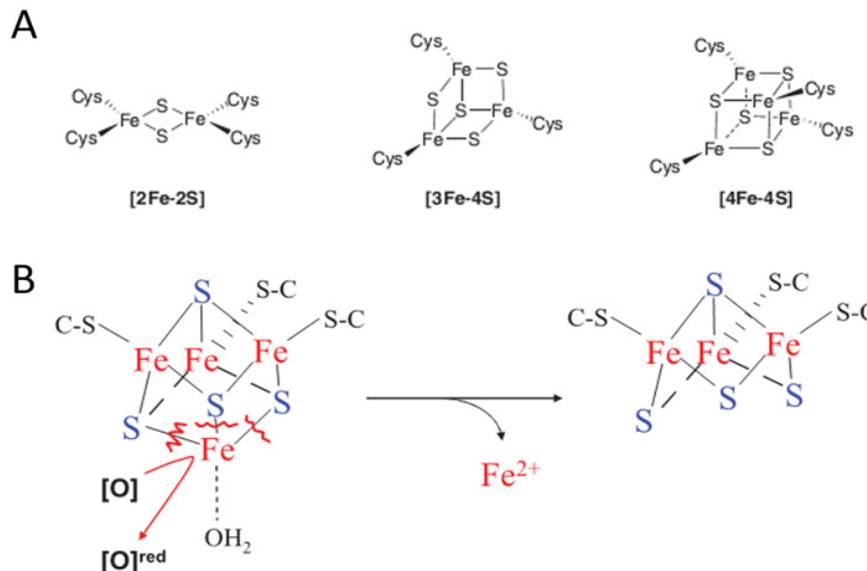


Figure 7. Les groupements Fe-S

(A) Les différentes formes de [Fe-S] chez *E. coli*. Il y a trois formes principales de [Fe-S]: le [2Fe-2S], le [3Fe-4S] et le [4Fe-4S]. Les deux premières sont les moins fréquentes (10% total), alors que [4Fe-4S] représente 90% des groupements retrouvés.

(B) Schéma de la déconstruction du groupement $[3\text{Fe-4S}]^{2+}$ de l'aconitase par l'oxydation.

Illustration tirée de Imlay (Imlay, 2006).

Il n'est pas surprenant que les ROS aient accès aux [Fe-S] situés au site catalytique des déshydratases, puisqu'ils sont conçus pour accommoder un ligand soluble. L'action d'oxydants monovalents engendre la perte d'un électron du groupement $[3\text{Fe-4S}]^{2+}$, provoquant le relâchement de l'atome de Fe catalytique et son inactivation (Figure 7B) (Gardner et Fridovich, 1991; Liochev et Fridovich, 1993). L'exposition subséquente au stress oxydatif *in vivo* causera la déconstruction totale et rapide du [3Fe-4S] oxydé. Le [Fe-S] des déshydratases peut être réparé par un mécanisme encore inconnu, mais soupçonné d'être accompli par des enzymes impliquées dans la synthèse *de novo* des [Fe-S] (Djaman *et al.*, 2004). L'aconitase est inactive sous forme $[3\text{Fe-4S}]^{2+}$ cependant, elle peut retrouver son activité par la liaison d'un atome de Fe libre.

3.1.2 Les caractéristiques générales des aconitases

La grande famille des aconitases (Acn) est divisée en 5 groupes phylogénétiques : (i) les aconitases mitochondriales, (ii); les aconitases cytoplasmiques, les IRP1 et 2 (*iron regulatory proteins*) des organismes supérieurs, et l'aconitase A des bactéries (AcnA) (iii); les homoaconitases (iv); les isopropylmalates bactériennes et des champignons et (v) les aconitases B bactériennes (AcnB) (Gruer *et al.*, 1997). Les aconitases cytoplasmiques (IRP), et les AcnA et B bactériennes, mais pas les aconitases mitochondriales, sont des protéines bifonctionnelles.

La structure caractéristique des aconitases comprend 3 domaines assemblés autour d'un groupement [4Fe-4S], et un quatrième domaine rattaché par une longue chaîne liante formant un site actif en tunnel (Williams *et al.*, 2002). Contrairement aux autres aconitases qui retrouvent leur domaine 4 en C-terminal de la protéine (1-2-3-lieur-4), l'architecture de l'AcnB présente le domaine 4 et un domaine additionnel (le domaine 5) en N-terminal, suivi des 3 autres domaines (5-4-lieur-1-2-3). Ce cinquième domaine de type HEAT-*like* est composé d'hélices- α antiparallèles superposées et ressemble au domaine HEAT (Huntigtin-Elongation-A subunit-TOR), observé entre autres chez la protéine phosphatase 2A (domaine PR65/A) (Groves *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 2002). Exceptionnellement, la réorganisation des domaines de la protéine AcnB n'affecte ni son activité ni sa spécificité au substrat comme c'est souvent le cas (Polekhina *et al.*, 1999). Précédemment, il a été suggéré que le domaine HEAT-*like* permettrait la dimérisation de la forme catalytique des protéines de la famille des AcnB (Tang *et al.*, 2005). Toutefois, bien que le domaine 5 des AcnB soit structurellement semblable au domaine de liaison à l'ARN Puf de la protéine Pumilio, il ne participerait pas à l'activité d'interaction à l'ARN (Edwards *et al.*, 2001). En effet, ce domaine ne comporte pas de charge positive nette pouvant participer à l'interaction avec l'ARN, sa séquence n'est pas conservée entre les AcnB et il est absent des autres types d'aconitases pouvant lier un motif d'ARN similaire (Williams *et al.*, 2002).

Les protéines mammifères IRP1 et IRP2 font toutes deux partie de la famille des aconitases, mais seule la protéine IRP1 est bifonctionnelle et a conservé son activité aconitase. Les deux aconitases cytosoliques ont une activité de protéine liant l'ARN, reconnaissant un motif IRE tige-boucle conservé (*Iron responsive element*), comprenant une boucle de 6 nt débutant

généralement par la séquence CAGUG et supportée par une tige avec une cytosine non appariée en 5' (Figure 8) (Address *et al.*, 1997; Constable *et al.*, 1992). Malgré la grande similarité entre les deux IRP, seule la stabilité d'IRP2 est régulée selon la condition en Fe par le système d'ubiquitination, ciblant IRP2 pour la dégradation au protéasome ou par d'autres voies de signalisation (Iwai *et al.*, 1998; Wallander *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2004). La dégradation d'IRP2 en condition riche en Fe en fait le senseur physiologique du Fe par excellence. Un autre facteur expliquant l'importance d'IRP2 dans le métabolisme du Fe provient du fait qu'elle a l'activité de liaison des IRE prédominante en concentrations faibles en oxygène (3-6% d'O₂), condition prévalente dans les tissus mammifères (Meyron-Holtz *et al.*, 2004). Dans ces mêmes conditions, IRP1 aurait surtout une activité catalytique.

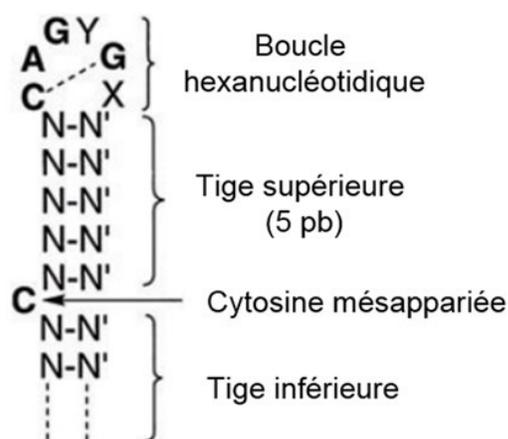


Figure 8. La structure des IRE

Structure consensus des IRE. Y représente les nt U ou C et X représente tous les nucléotides sauf G. La structure représente une structure IRE consensuelle dont les hélices inférieure et supérieure adoptent une conformation de forme A. La tige supérieure de 5 paires de base permet de distancer correctement la cytosine mésappariée de la boucle, permettant aux nucléotides flexibles de participer dans l'interaction spécifique du motif IRE avec les IRP1/2. Illustration adaptée de Roualt (Rouault, 2006).

L'organisme *E. coli* comprend deux aconitases principales, les AcnA et AcnB, qui sont exprimées de manière différentielle. L'AcnA est activée en phase stationnaire et en condition de stress (carence en Fe et stress oxydatif), alors que la protéine AcnB, l'enzyme principale, est exprimée en phase exponentielle (Cunningham *et al.*, 1997). Par un mécanisme encore inconnu, AcnA est résistante au stress oxydatif et à la carence en Fe *in vivo*, expliquant son rôle comme enzyme de stress. Toutefois, l'AcnA purifiée est sensible à ces mêmes stress, suggérant l'implication d'un facteur stabilisant la protéine *in vivo* (Varghese *et al.*, 2003).

L'AcnA a un degré d'identité élevé avec l'aconitase mitochondriale (29%) et avec l'IRP1 (53%) alors que l'AcnB n'a, environ, que 17% d'identité avec ces aconitases.

La bactérie Gram positif *Bacillus subtilis* exprime une seule aconitase (*citB*) faisant partie de la famille des AcnA (Alén et Sonenshein, 1999). La protéine est régulée au promoteur, favorisant son expression à l'entrée de la phase stationnaire et dans un milieu pauvre en nutriments (Kim *et al.*, 2003). Aussi bifonctionnelle, elle a souvent été comparée à l'IRP1 dans son activité de liaison à l'ARN.

Malgré l'utilisation du même domaine pour effectuer cette activité, l'affinité des aconitases cytoplasmiques (IRP1) pour le motif ARN IRE (K_d -5-50 pM) est plus grande que celle des aconitases bactériennes (K_d -1-8 μ M) (Alén et Sonenshein, 1999; Butt *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 2002). L'hypothèse suggérée étant que l'affinité moindre des aconitases bactériennes s'expliquerait par l'absence de compartimentalisation et par leur grande concentration cytoplasmiques (5-10 μ M chez *E. coli*), alors que l'IRP1 agit dans des tissus différenciés (Tang et Guest, 1999). La faible conservation de séquence entre les IRP et l'aconitase B pourrait aussi expliquer cette diminution de l'affinité d'apo-AcnB pour la séquence IRE.

3.1.3 Les mécanismes de régulation par la protéine aconitase

Le rôle de régulation des ARNm par une protéine aconitase a d'abord été reconnu et caractérisé pour les protéines mammifères IRP1/2 (Constable *et al.*, 1992). Un premier exemple type de régulation post-transcriptionnel par les IRP est celui des ARNm encodant pour la L- et la H-ferritine, une protéine permettant le stockage du Fe (Figure 9A). Dans une condition pauvre en Fe, les IRP pourront se lier au motif IRE situé à proximité de la coiffe en 5' de l'ARNm et prévenir le recrutement de la petite sous-unité ribosomale 40S permettant l'initiation de la traduction. Un second ARNm bien comme étant régulé par les IRP est celui encodant le récepteur de la transferrine, une protéine importante pour l'internalisation du Fe dans les cellules (Figure 9B). En carence de Fe, son ARNm (*tfr*) est stabilisé par la liaison d'IRP sur l'un ou plusieurs des motifs IRE retrouvés dans sa région 3' non codante, empêchant ainsi l'accès aux endoribonucléases à cette région. En agissant de la sorte, l'expression du récepteur de la transferrine est favorisée en carence de Fe, permettant d'augmenter le Fe intracellulaire.

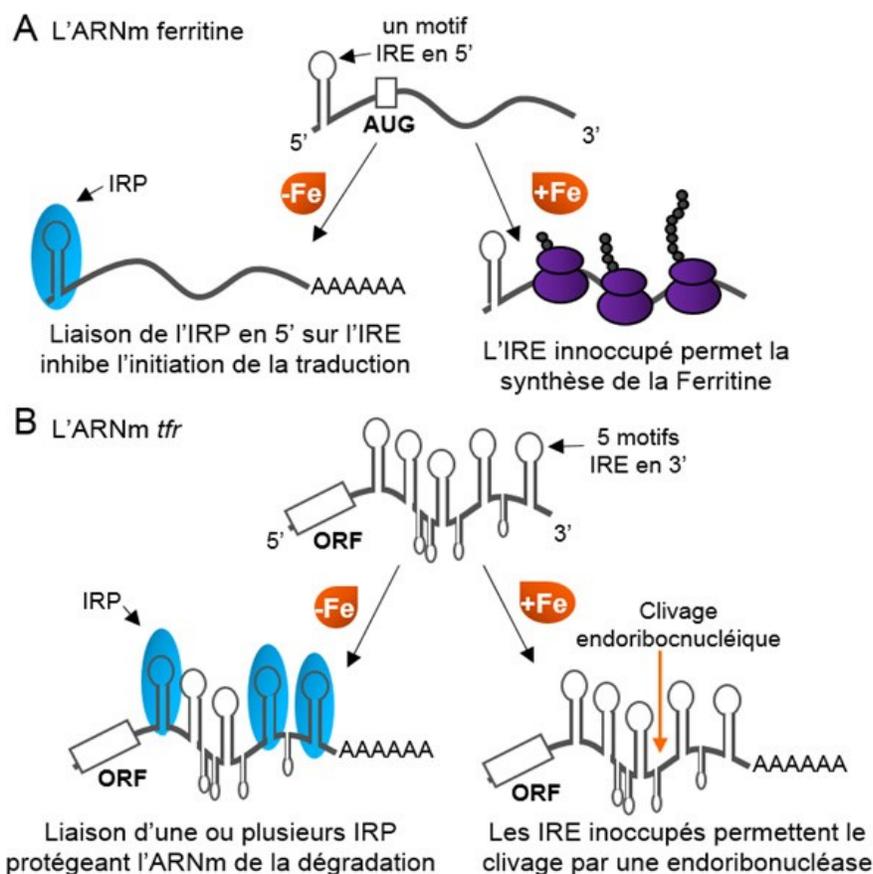


Figure 9. Le mécanisme de régulation post-transcriptionnel par les IRP

Exemple de régulation des ARNm par les protéines mammifères IRP1/2 au niveau traductionnel (A) ou de la stabilité de l'ARN (B). Illustration inspirée de Rouault (Rouault, 2006).

Les ARNm régulés par les aconitases d'*E. coli* ou de *Bacillus subtilis*, dont les mécanismes sont caractérisés, sont majoritairement modulés dans leur expression par des mécanismes similaires aux IRP mammifères. Par exemple, les ARNm encodant les aconitases chez ces bactéries ont été prédits pour être stabilisés par la liaison d'une aconitase sur une tige-boucle dans la région 3' non-codante et ce, par un mécanisme encore inconnu (Tang et Guest, 1999). Par après, l'ARNm *sodA* a été identifié chez *E. coli* comme une cible de l'apo-AcnB, régulée négativement, et ce, probablement au niveau traductionnel. En effet, il avait été démontré que le niveau de la protéine SodA, une superoxyde dismutase, diminuait en présence de l'apo-AcnB (Tang et al., 2002).

3.1.4 Les impacts physiologiques

En raison de leur fonction de régulateurs post-transcriptionnels, plusieurs exemples de régulation ont été décrits au cours des années reflétant la diversité de l'effet physiologique des aconitases.

L'aconitase chez *Bacillus subtilis*, CitB, serait nécessaire à sa sporulation, un mutant *citB* sporulant 40 fois moins efficacement qu'une souche de type sauvage (Dingman *et al.*, 1987). Cet effet serait dû à l'effet stabilisateur de la protéine CitB liant une tige-boucle hypothétique en 3'-UTR de l'ARNm *gerE*, une protéine régulatrice majeure de la sporulation (Serio *et al.*, 2006). En plus, il semblerait que dans un mutant *citB*, l'accumulation du citrate, agissant comme chélateur de Fe, nuirait à la phosphorylation (activation) de SpoA, le facteur transcriptionnel principal pour l'activation des gènes précoces de la sporulation (Craig *et al.*, 1997).

Un autre exemple de régulation s'illustre chez le phytopathogène *Xanthomonas campestris*, où le gène *rpfA* encodant une protéine avec une fonction aconitase, régulerait des facteurs de pathogénicité par un mécanisme inconnu (Wilson *et al.*, 1998). Entre autres, il a été montré que le mutant *rpfA* réduit l'abondance des polysaccharides extracellulaires (EPS) et d'enzymes extracellulaires. Plus spécifiquement, la transcription des enzymes extracellulaires *prtA*, une sérine protéase, et *exgXCA*, une endoglucanase, était réduite dans le mutant de l'aconitase. Toutefois, aucune régulation directe n'a été démontrée pour ces cibles. Enfin, *rpfA* jouerait un rôle dans l'homéostasie du Fe puisqu'un mutant de la protéine diminuait la résistance de la bactérie au streptinongrin, un antibiotique produisant des espèces réactives de l'oxygène en présence de Fe (Gregory et Fridovich, 1973). L'expression de *pfrA* dans un milieu carencé en Fe rétablissait une résistance comparable à celle de la souche sauvage, suggérant un effet de cette aconitase dans l'homéostasie du Fe.

Aussi, chez *Pseudomonas aeruginosa*, une corrélation a été faite entre la perte de l'activité catalytique de la protéine aconitase, induite par une carence en Fe par exemple, et l'accumulation de l'exotoxine A (*toxA*) (Somerville *et al.*, 1999). Il reste pourtant à confirmer la régulation directe par l'aconitase de l'exotoxine A, le plus toxique des facteurs de virulence qu'exprime cette bactérie opportuniste.

Puis, les travaux de l'équipe de Jeffrey Green ont montré que l'AcnB de *S. enterica* serovar Typhimurium LT2 agirait indirectement comme régulateur de la motilité, en déstabilisant l'ARNm encodant *ftsH*, une protéase. Ce faisant, la diminution de la protéase FtsH influencerait le niveau de la protéine flagellaire FliC par une cascade régulatrice (Tang *et al.*, 2004). Par ces mêmes travaux, il a été observé que l'altération de l'expression flagellaire affectait l'interaction de bactéries avec des cellules apparentées aux macrophages.

Chez les mammifères, le syndrome d'hyperferritinémie-cataracte héréditaire est causé par une mutation dans la chaîne IRE de l'ARNm encodant la L-ferritine, affectant la régulation de sa traduction par les IRPs (Beaumont *et al.*, 1995; Cazzola *et al.*, 1997). Ce dérèglement entraîne une accumulation de la ferritine dans le sérum, prédisposant au développement d'une cataracte précoce. D'autres études montrent que des souris mutantes pour la protéine IRP2 présentent des symptômes d'anémie et développent une neurodégénérescence cérébrale précoce causé par une inflammation affectant les axones (Galy *et al.*, 2005; LaVaute *et al.*, 2001).

3.2 La glutarédoxine monothiol GrxD

Initialement, la glutarédoxine (Grx) a été identifiée comme un donneur d'électron dépendant de la glutathione pour la ribonucléotide réductase chez *E. coli* (Holmgren, 1976). La Grx, retrouvée à la fois chez les procaryotes et les eucaryotes, est une protéine avec une activité redox et utilisant la glutathione comme cofacteur. Les Grx sont divisées en deux classes, les Grx monothiol et dithiol, structurellement semblables bien que leurs fonctions biochimiques soient distinctes. À l'image des thiorédoxines, les protéines dithiol assemblées en homodimères serviraient, en tant que réducteur des [Fe-S] disulfides, de senseur du stress oxydatif (Herrero et De La Torre-Ruiz, 2007). Autrement, le rôle physiologique exact des GRX de type monothiol demeure encore inconnu (Lillig *et al.*, 2008), bien qu'elles aient été suggérées pour tenir un rôle dans le stockage, le transport et le relargage des [Fe-S] (Iwema *et al.*, 2009).

La bactérie *E. coli* exprime quatre différentes Grx (Grx1, 2, 3 et 4), dont seulement une, la Grx 4, est une Grx de type monothiol (Gerdes *et al.*, 2003). Cette dernière, la Grx monothiol Grx4 (ou GrxD), peut aussi lier des groupements [2Fe-2S] en interagissant avec les cystéines

des domaines du site actif de deux Grx, formant un holodimère, et avec deux glutathiones (Fernandes *et al.*, 2005; Iwema *et al.*, 2009; Rouhier *et al.*, 2010). Toutefois, à la différence des trois autres glutathionyltransférases, la protéine GrxD ne possède pas d'activité glutathionyltransférase classique et a été identifiée transférer son [Fe-S] à l'apo-thiorédoxine, son substrat principal (Fernandes *et al.*, 2005).

Dans le but de montrer son importance dans le métabolisme du Fe, une étude récente a montré qu'un mutant *grxD*, à l'image d'un mutant de la machinerie Suf, serait hypersensible dans un milieu carencé en Fe (Yeung *et al.*, 2011). Aussi, des résultats montrant une augmentation du niveau de la protéine GrxD dans un mutant de la protéine Fur ou dans un milieu carencé en Fe (Fernandes *et al.*, 2005) supportent l'hypothèse que la protéine GrxD puisse être impliquée dans le métabolisme du Fe.

Au niveau mécanistique, il a été proposé que GrxD soit impliquée dans le transfert des [Fe-S] en coopération avec la machinerie de synthèse Suf. La protéine SufE est une sulfurtransférase qui coordonne le transfert d'atomes de soufre provenant de la protéine SufS, une cystéine désulfurase, à la protéine SufB, une protéine d'échafaudage hypothétique des [Fe-S] (Layer *et al.*, 2007). L'hypothèse était que l'interaction de l'holo-GrxD avec SufE pourrait aussi permettre le transfert du [Fe-S] de SufE à SufB. Ultérieurement, un autre article démontrait l'interaction de GrxD avec la protéine BolA, une protéine peu caractérisée qui influencerait la morphologie cellulaire, surtout en conditions de stress, en agissant comme régulateur transcriptionnel (Freire *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2002; Vieira *et al.*, 2004).

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, l'orthologue de GrxD, la protéine mitochondriale Grx5, ferait partie de la machinerie de biosynthèse et d'assemblage des [Fe-S], en participant au transfert du [Fe-S] aux protéines apo (Lill et Kispal, 2000; Stehling *et al.*, 2014). Chez cette espèce, il a été observé qu'un mutant de la Grx5 entraîne une perte de l'assemblage du [Fe-S] d'au moins deux protéines, les IRP et la succinate déshydrogénase. Le même mutant aurait une sensibilité au stress oxydatif accru causé par l'accumulation du Fe libre dans la cellule (Rodríguez-Manzaneque *et al.*, 2002). Chez l'humain, le dérèglement de l'expression de Grx5 a été associé au développement d'une anémie sidéroplastique, la diminution du niveau de Grx5 dérégulant le métabolisme du Fe mitochondrial et ce faisant, la synthèse de l'hème.

Malgré le peu de connaissance sur les fonctions et propriétés des glutathiones monothiol, la grande conservation de la machinerie de biosynthèse des [Fe-S] chez les eucaryotes, mais aussi chez les procaryotes, laisse croire que GrxD pourrait aussi jouer un rôle dans cette voie.

4 La modélisation comme outil d'analyse

En biologie, la complexité et la diversité des organismes vivants sont telles qu'elles ont obligé les scientifiques à utiliser une approche basée sur l'étude de modèles. Les modèles animaux, bactériens ou autres, sont choisis pour permettre une simplification de la réalité ou dans ce cas, d'un phénomène biologique. L'étude expérimentale de ces modèles a permis, et permet toujours, aux scientifiques d'élargir considérablement le bagage des connaissances en facilitant la démonstration de théories. En contrepartie, l'emploi de la modélisation devient nécessaire dès lors que la complexité d'un phénomène ne permet plus de déduire intuitivement son fonctionnement ou d'en prévoir l'évolution.

La modélisation consiste à concevoir une représentation simplifiée d'un problème donné dans les cas où l'expérimentation directe est irréalisable, en utilisant les mathématiques et les données expérimentales disponibles. Ainsi, elle permet d'analyser des phénomènes réels et de prévoir des résultats avec un certain degré d'approximation, en fonction des variables et des paramètres utilisés. Les valeurs attribuées aux paramètres seront fixées grâce aux données expérimentales. La pertinence du modèle sera souvent évaluée par une simulation dont les résultats sont comparés aux valeurs expérimentales.

Un bon modèle doit être construit à partir de données expérimentales solides et représenter une problématique qui est bien comprise. Les avantages d'un bon modèle sont nombreux : il permet de simplifier et de tester la dynamique d'un système, il participe à son analyse et à son interprétation puis, lorsque sa validité est confirmée, il permet d'extrapoler des conclusions (Palsson, 2000).

4.1 Applications de la modélisation

La modélisation peut être utilisée à plusieurs fins, soit pour prédire une hypothèse, soit pour interpréter des données ou pour les intégrer.

Un exemple de modélisation prédictif sert déjà à accélérer la découverte de médicaments en facilitant, par exemple, l'identification de molécules compétitrices ciblant une protéine de la voie ciblée. C'est par la modélisation des interactions optimales entre cette protéine et son compétiteur qu'on peut ensuite déterminer quelle(s) molécule(s) provenant d'une base de données remplacerait(ent) le plus favorablement le ligand (Noble, 2002). Aussi, un outil semblable pourrait simplifier l'obtention d'une vue d'ensemble des impacts causés par une molécule dans la voie de régulation ciblée, aidant grandement l'industrie pharmaceutique.

Un autre exemple d'application s'illustre, avec l'aide d'algorithmes bioinformatiques, par le repérage de nombreux sRNA bactériens dans différentes espèces ou par la prédiction de cibles ARNm. D'abord, la majorité des outils informatiques basent la recherche de sRNA sur des motifs typiques (ex. : tige terminatrice, conservation de séquences, séquence promotrice) de ceux-ci dans les régions intergéniques (sRNAPredict) (Livny *et al.*, 2008; Livny et Waldor, 2007). Puis, dans le cas de la recherche de cibles ARNm, les algorithmes (ex. : sRNATarget2, IntaRNA, sRNATarBase) s'inspirent des caractéristiques des interactions sRNA-ARNm déjà démontrées expérimentalement pour améliorer l'exactitude des prédictions (Busch *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2010; Tjaden *et al.*, 2006). En effet, les propriétés prépondérantes de l'interaction entre un sRNA et sa cible restent encore à définir (séquence – fonction). Ceci laisse place à l'optimisation des systèmes, contrairement aux microARN qui ont plus de succès dans leurs prédictions. Malgré tout, ces applications, sans être parfaites, permettent d'améliorer et de simplifier la résolution d'un problème complexe comprenant un grand nombre de données et de paramètres.

L'interprétation des données par la modélisation se retrouve dans les laboratoires de recherche sous forme de programmes informatiques divers, aidant l'analyse des données. Par exemple, une méthode mesurant le retour de la fluorescence après un photoblanchiment, souvent utilisée pour mesurer les dynamiques d'interactions entre protéines en microscopie, pourrait être ardue à analyser sans un programme, puisque la diffusion et d'autres variables sont souvent confondues avec le phénomène réel.

La modélisation de données visant le développement de modèles pouvant incorporer les interactions moléculaires d'une tumeur serait un exemple d'intégration des données. Ce type de modèle représente un défi puisque les paramètres nombreux, telles les contraintes physiques (nutriments) et les réponses physiologiques (prolifération, morphologie de la tumeur ou adhésion cellulaire), doivent être considérés pour l'obtention d'un modèle valable. Toutefois, le raffinement constant de ces modèles permettra aux biologistes de tester les impacts de changements moléculaires sur le développement d'une tumeur ou autres phénomènes biologiques complexes (Kreeger et Lauffenburger, 2010).

En conclusion, l'expérimentation en laboratoire et la modélisation sont entrelacées dans l'avancement des connaissances en biologie, le premier menant à l'élaboration de modèles et le second raffinant le modèle initial, conduisant ainsi à de nouvelles hypothèses à tester.

4.2 La modélisation des petits ARN bactériens

La meilleure compréhension des différents paramètres déterminant la fonction d'un ARN selon sa séquence demeure une question centrale dans la biologie de l'ARN. La nature d'une séquence d'ARN modulera sa capacité à former des structures secondaires et tertiaires et à interagir avec d'autres entités (ARN ou protéines). Les sRNA font l'objet d'études extensives dans le but d'approfondir notre compréhension des facteurs différenciant plusieurs paramètres. Par exemple, des travaux ont étudié les facteurs impliqués dans la distinction par le sRNA d'une cible d'une non-cible ARNm *in vivo* (région d'appariement, interaction avec Hfq, etc.).

Pour ce faire, des études de type qualitative ont souvent été employées, questionnant par exemple si une section définie d'un sRNA arrive à réprimer sa cible ARNm, mais des modèles mathématiques de type quantitatifs ont aussi été réalisés. Ces modèles avaient pour but de définir le seuil d'énergie optimal et la cinétique permettant une interaction entre un sRNA et sa cible (Hao *et al.*, 2011; Levine *et al.*, 2007a).

Aussi par des prédictions mathématiques, il a été proposé que l'efficacité d'un sRNA à réguler sa cible ARNm dépendrait du ratio sRNA/mRNA. Dans le cas où la production d'un sRNA surpasserait celles de ses cibles ($\text{sRNA/mRNA} > 1$), tous les ARNm seraient appariés et réprimés par le sRNA. À l'inverse, dans une situation où les cibles ARNm seraient plus

abondantes ($sRNA/mRNA < 1$), la production de protéines de ces cibles diminuerait de manière linéaire selon le niveau de sRNA (Beisel et Storz, 2010; Levine *et al.*, 2007b; Mehta *et al.*, 2008).

5 Hypothèse et objectifs de recherche

Depuis le tournant du siècle, de plus en plus de sRNA ont été découverts avec des fonctions physiologiques variées et pour chacun, des cibles ARNm nombreuses. Si la plupart d'entre eux semblent réguler leurs cibles par un mécanisme impliquant un mode de régulation canonique (voir section 2.1), certaines données semblent indiquer que des variations dans l'efficacité entre les sRNA et les mécanismes employés existeraient. L'objectif principal de mes travaux de doctorat était de modéliser et de caractériser de nouveaux mécanismes alternatifs de régulation post-transcriptionnelle des sRNA afin de mieux comprendre les facteurs modulant l'efficacité de la répression des gènes.

Les sRNA diffèrent par leur expression par rapport à celle de leurs cibles ARNm et par l'efficacité à laquelle ils inactivent l'expression des gènes. Le fait que la plupart des sRNA varient dans leurs critères permettait de se questionner sur les avantages sous-jacents de ces gradations dans l'efficacité des sRNA. Ainsi, le premier objectif présenté dans cette thèse était de faire une modélisation comparative du régime de régulation de deux sRNA (Spot 42 et RyhB) sur leurs cibles ARNm (Chapitre 2).

Ensuite, dans le but d'améliorer la compréhension des différents régimes de régulations utilisés par les sRNA, j'ai étudié le mécanisme de régulation d'un ARNm ciblé par un sRNA, réputé efficace et qui, dans ce cas spécifique, présentait une efficacité modérée. Plus précisément, des données préliminaires m'indiquaient que l'ARNm *acnB* n'était pas dégradé par le sRNA RyhB dans un milieu carencé en Fe, alors qu'il l'était dans un milieu riche. L'hypothèse selon laquelle la protéine apo-AcnB, déjà suggérée pour réguler son propre ARNm, serait le facteur protégeant l'ARNm de la dégradation par RyhB a été émise. Ainsi, le second objectif, présenté dans le chapitre 3, était de caractériser la double régulation de l'ARNm *acnB* par le sRNA RyhB et la protéine régulatrice apo-AcnB.

Enfin, le troisième et dernier objectif était d'analyser le mécanisme de régulation de l'ARNm *grxD*, qui semblait être régulé par un mécanisme similaire à celui de l'ARNm *acnB* (Chapitre 4).

CHAPITRE 2

Dynamic features of gene expression control by small regulatory RNAs

Auteurs de l'article: Namiko Mitarai^{a,b,1}, Julie-Anna M. Benjamin^{c,1}, Sandeep Krishna^b, Szabolcs Semsey^d, Zsolt Csiszovszki^e, Eric Massé^c, et Kim Sneppen^b

a Department of Physics, Kyushu University 33, Fukuoka 812-8581, Japan; *b* Niels Bohr Institute, Blegdamsvej 17, DK-2100 Copenhagen, Denmark; *c* Département de Biochimie, Groupe ARN, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1E 4K8, *d* Department of Genetics, Eötvös Loránd University, H-1117, Budapest, Hungary, and *e* Laboratory of Molecular Biology, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892-4264

1: contributed equally to this work.

Statut de l'article: Publié

Proceedings of the National Academy of Sciences, volume 106, pages 10655-10659, 2009.

Avant-propos: J'ai participé à la planification et à l'analyse des expériences avec Eric Massé, Kim Sneppen, Namiko Mitarai, Sandeep Krishna et Szabolcs Semsey. J'ai effectué les expériences se rapportant au petit ARN régulateur RyhB (Figure 4). La partie concernant les mathématiques dans la modélisation a été faite par Kim Sneppen, Namiko Mitarai, Sandeep Krishna et Szabolcs Semsey.

Au niveau de l'écriture de l'article, j'ai écrit le matériel et méthode se rapportant aux expérimentations avec RyhB (voir Supporting Information) et j'ai participé à la révision avant la soumission de l'article. Le reste de l'article a été écrit par Eric Massé, Kim Sneppen, Namiko Mitarai et Szabolcs Semsey.

RÉSUMÉ

Les sRNA régulent la réponse au stress en modulant l'expression des gènes par nombre de mécanismes, le principal étant la liaison directe au SLR de l'ARNm cible. La dynamique fonctionnelle de régulation des sRNA dépend de plusieurs propriétés déterminantes dans le mode de régulation choisi ainsi que l'efficacité et la vitesse de la réponse. Toutefois, ces paramètres, dépendant à la fois des caractéristiques du sRNA et de celles des cibles ARNm, sont souvent difficiles à déterminer expérimentalement.

L'article présenté dans ce chapitre tente de caractériser, par la modélisation de données expérimentale, la dynamique de régulation de deux des sRNA bactériens parmi les plus étudiés, les sRNA RyhB et Spot 42. Ceux-ci régulent leurs cibles en s'appariant de manière complémentaire au SLR de leurs cibles ARNm et ainsi, inhibent l'initiation de la traduction et/ou promeuvent la dégradation rapide de l'ARNm ciblé. L'efficacité de la régulation par les sRNA est déterminée par plusieurs paramètres, dont les principaux sont le potentiel du sRNA à être exprimé en excès par rapport à ces cibles ARNm (α) et la vitesse à laquelle le sRNA entraîne l'inactivation irréversible d'une cible ARNm (γ). La mesure expérimentale directe de l'expression du sRNA et de ses cibles ARNm (α) peut se faire relativement aisément en déterminant l'activité promotrice de chacun. À l'opposé, l'efficacité du sRNA (γ) se calcule en mesurant (i) la vitesse de la dégradation du complexe sRNA-ARNm et (ii) la stabilité de l'ARNm et du sRNA.

La détermination de ces paramètres et leur modélisation a mis en évidence qu'un sRNA peut réguler ses cibles selon différents régimes : efficace pour RyhB (γ élevé et α faible) et modéré dans le cas de Spot 42 (γ faible et α élevé). La diversité des modes de régulation utilisée par les sRNA serait avantageuse pour mieux moduler la réponse aux stress, une propriété profitable permettant l'adaptation à un plus grand nombre de stress.

**DYNAMIC FEATURES OF GENE EXPRESSION CONTROL BY SMALL
REGULATORY RNAS**

Namiko Mitarai^{a,b,1,*}, Julie-Anna M. Benjamin^{c,1}, Sandeep Krishna^b, Szabolcs Semsey^d,
Zsolt Csiszovszki^e, Eric Massé^{c*}, et Kim Sneppen^b

a Department of Physics, Kyushu University 33, Fukuoka 812-8581, Japan; *b* Niels Bohr Institute, Blegdamsvej 17, DK-2100 Copenhagen, Denmark; *c* Département de Biochimie, Groupe ARN, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1E 4K8, *d* Department of Genetics, Eötvös Loránd University, H-1117, Budapest, Hungary, and *e* Laboratory of Molecular Biology, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892-4264

1: contributed equally to this work.

28 690 characters

*Corresponding author:

Département de Biochimie, Groupe ARN, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1E 4K8

Tel.

Fax.

E-mail:

Department of Physics, Kyushu University 33, Fukuoka 812-8581, Japan; Niels Bohr Institute, Blegdamsvej 17, DK-2100 Copenhagen, Denmark.

E-mail:

ABSTRACT

Small regulatory RNAs (sRNAs) in eukaryotes and bacteria play an important role in the regulation of gene expression either by binding to regulatory proteins or directly to target mRNAs. Two of the best-characterized bacterial sRNAs, Spot42 and RyhB, form a complementary pair with the ribosome binding region of their target mRNAs, thereby inhibiting translation or promoting mRNA degradation. To investigate the steady-state and dynamic potential of such sRNAs, we examine the 2 key parameters characterizing sRNA regulation: the capacity to overexpress the sRNA relative to its target mRNA and the speed at which the target mRNA is irreversibly inactivated. We demonstrate different methods to determine these 2 key parameters, for Spot42 and RyhB, which combine biochemical and genetic experiments with computational analysis. We have developed a mathematical model that describes the functional properties of sRNAs with various characteristic parameters. We observed that Spot42 and RyhB function in distinctive parameter regimes, which result in divergent mechanisms.

Keywords: gene regulation, mRNA silencing, RyhB, small RNA, Spot 42

INTRODUCTION

Small regulatory RNAs (sRNAs) play numerous roles in stress adaptation and development in eubacteria, archeabacteria, and eukaryotes (Gottesman, 2004; Gottesman, 2005). These molecules are generally noncoding and <300 nt. Today, \approx 70 sRNA genes have been identified in *Escherichia coli* (Argaman *et al.*, 2001; Rivas et Eddy, 2001; Wassarman *et al.*, 2001). Those characterized are involved in diverse cellular functions such as initiation of DNA replication (Eguchi, 1991), regulation of transcription (Wassarman and Storz, 2000), regulation of translation (Altuvia *et al.*, 1998; Majdalani *et al.*, 2001; Majdalani *et al.*, 1998; Møller *et al.*, 2002; Udekwu *et al.*, 2005), and mRNA stability (Massé *et al.*, 2003; Morita *et al.*, 2005). Such sRNAs are usually expressed in response to a specific stimulus that signals the cell about a possible threat to survival.

A critical stimulus to which growing cells must respond rapidly is the level of glucose, which regulates genes involved in carbon metabolism such as those belonging to the galactose operon (*galETKM*). In the absence of glucose, D-galactose can induce transcription of all 4 genes of the *galETKM* operon in equimolar fashion, which is required for catabolism of D-galactose. In contrast, when cells grow in the presence of glucose, mainly the first 2 genes of the operon are expressed, which are necessary for providing substrates for biosynthetic glycosylation reactions (Ullman *et al.*, 1979; Semsey *et al.*, 2006a; Lee *et al.*, 2008). Spot42, a 109-nt-long sRNA, is involved in this glucose-dependent regulation. When glucose is used as a carbon source, Spot42 represses the translation of *galk*, the third gene of the galactose operon that is unnecessary when glucose is present (Møller *et al.*, 2002; Sahagan and Dahlberg, 1979). However, when cells grow in the absence of glucose, Spot42 levels decrease significantly, allowing translation of *galk*. It has been suggested that the sRNA only acts at the translation level, because Spot42 expression does not inhibit GalE and GalT synthesis (Møller *et al.*, 2002).

Another important cellular response mediated by a sRNA is the adaptation to iron (Fe) starvation (Massé *et al.*, 2005). The sRNA RyhB, normally repressed by the transcriptional regulator Fur (ferric uptake regulator) in presence of sufficient Fe, is expressed in the bacterium *E. coli* specifically during Fe depletion (Massé and Gottesman, 2002). Thus, in

conditions of low Fe, RyhB induces the rapid degradation of at least 18 mRNAs, all of which encode nonessential Fe-using proteins, to redirect the metal into essential parts of the cell (Massé *et al.*, 2005; Massé *et al.*, 2007). The rapidity of this sRNA-mediated mRNA degradation (within 2–3 min) suggests that the target mRNAs have to be silenced as soon as possible under low Fe conditions. We recently confirmed this hypothesis by demonstrating an inhibitory growth phenotype of a *ryhB* mutant during Fe starvation (Jacques *et al.*, 2006). Furthermore, data from our group indicates that RyhB plays a role in the regulation of intracellular Fe homeostasis (Jacques *et al.*, 2006; Semsey *et al.*, 2006b). Because Fe is an essential factor that is carefully distributed among the Fe-using proteins, it is likely why many organisms share a RyhB-like mechanism of Fe regulation (Massé *et al.*, 2007; Massé and Arguin, 2005).

Despite the importance of sRNAs, their regulatory features are not yet fully understood. Here, we analyze quantitative properties of regulation where a sRNA binds to target mRNAs, which is the mechanism of action of a large family of sRNAs in bacteria. The pairing between the sRNA and a target mRNA facilitates irreversible inactivation of both RNAs in the complex (in the case of RyhB both the sRNA and mRNA are actively degraded, as illustrated in Fig. 1. sRNA regulation can exhibit ultrasensitivity (Lenz *et al.*, 2004), hierarchy of action (Urban and Vogel, 2008), cross-talk between downstream targets (Massé *et al.*, 2005; Semsey *et al.*, 2006b; Levine *et al.*, 2007), prioritization of targets (Mitarai *et al.*, 2007), fast response against sudden environmental changes (Massé *et al.*, 2003; Mitarai *et al.*, 2007; Shimoni *et al.*, 2007), and discoordination of translation in a polycistronic mRNA (Møller *et al.*, 2002; Adhya, 2003). Most of these abilities, except discoordination, are constrained by 2 key parameters: the system's capacity to overexpress the sRNA relative to its target (α) and the speed at which the target is irreversibly inactivated (γ). By performing a computational analysis of the potential functional properties of sRNA regulation, covering all parameters, we show which functions can be achieved for which parameter values. Using 2 well-known sRNA systems, Spot42 and RyhB, we demonstrate different methods for the determination of the above 2 key parameters by combining biochemical and genetic experiments with computational analysis.

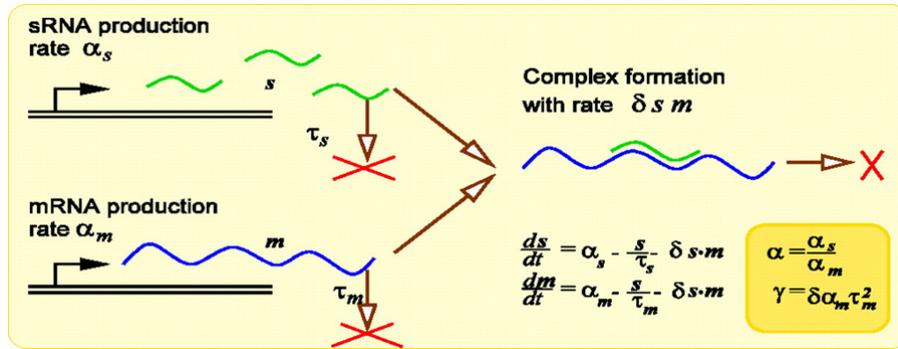


Figure 1. Schematic mechanism of sRNA regulation.

The formation of the sRNA–mRNA complex irreversibly inactivates both RNAs. The behavior is entirely determined by 3 parameters (see *SI Text*): the ratio of the sRNA production rate to mRNA production rate, $\alpha = \alpha_s/\alpha_m$; the dimensionless rate of inactivation of the mRNA via sRNA–mRNA complex formation, $\gamma = \delta\alpha_m\tau_s^2$; and the ratio of the mRNA lifetime to the sRNA lifetime, $\tau = \tau_m/\tau_s$.

RESULTS

Ultrasensitivity and Graded Regulation

Fig. 2B shows the steady-state concentration of the target mRNA, m , as a function of α for different values of the degradation rate γ (the units were chosen as described in *SI Text*). For $\alpha < 1$ there is insufficient sRNA to inactivate much mRNA, whereas when $\alpha > 1$ the mRNA levels are significantly reduced. This reduction is much sharper for a larger γ value, i.e., a small change of α results in a large difference in mRNA concentration m . Such switch-like regulation has been termed “ultrasensitivity” (Lenz *et al.*, 2004). At lower γ values, m declines in a more “graded” manner.

Speed of Response.

In addition to steady-state regulation, the speed of the response is also important. Perturbations in the external stimuli sensed by a sRNA will result in changes in the value of α . When α is abruptly increased from 0.01 to a higher value (which we vary from $\alpha = 2$ to 10), then the mRNA level decreases rapidly in response. Fig. 2C shows that the time required for m to reach its new steady state is smaller for larger α and larger γ , because less time is needed to produce more sRNA for large α , whereas a large γ results in quick degradation of m . Because increasing α can compensate for lower γ , and vice versa, the behavior of m with $\alpha = 10$ and $\gamma = 10$ looks very similar to the case of $\alpha = 2$ and $\gamma = 100$. Note, however, that the former has a much higher sRNA level in the new steady state.

When α is abruptly decreased from a starting value (which we vary from $\alpha = 2$ to 10) to 0.01, the response is slower than in the case of increasing α , as shown in Fig. 2D (note the larger span on the x axis relative to Fig. 2C). This difference is because recovery of m level begins only after all of the sRNAs (which are not being produced any more) present are degraded. The larger α is, the larger this initial pool of sRNA, and therefore the longer the time delay before recovery of mRNA level.

In both scenarios (increasing or decreasing α), however, a larger value of γ results in relatively sharper regulation and faster response.

Measurement of α and Estimation of γ for RyhB and Target mRNA Using Degradation Kinetics.

For the Fe–Fur system in *E. coli*, it has been observed that 1 of the RyhB targets, *sodB*, is depleted ≈ 5 -fold within 3 min after full induction of the P_{ryhB} promoter (Massé *et al.*, 2003), which constrains the value of α and γ . We numerically calculated the time required to deplete mRNA 5-fold, T , by changing the value of α from ≈ 0 to higher values (see Fig. 3). T strongly depends on α and γ . The contour line of $T = 3$ min is the solid green line in Fig. 3. Further, we measured the value of promoter activity of RyhB and major target mRNAs (see Fig. 4) from which we calculate α , the ratio of sRNA production to sum of the production of all its target mRNAs, to be ≈ 4 . For $\alpha = 4$, the $T = 3$ -min contour in Fig. 3 leads to an estimate of ≈ 400 for the γ value for *sodB*. Therefore, this system represents the low- α , high- γ case, which is consistent with our previous predictions (Semsey *et al.*, 2006b). Note that we use one single α , as if all target mRNAs have similar γ values. The effect of this assumption in determination of γ for *sodB* is discussed in *SI Text*. More careful analysis requires detailed knowledge of the variation of γ across the target mRNAs, as outlined in Mitarai *et al.* (2007).

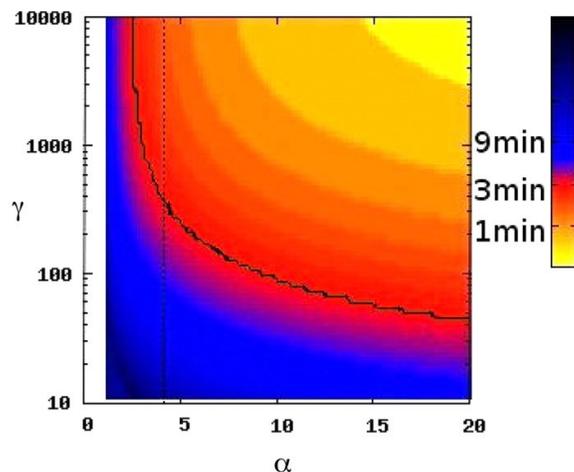


Figure 3. Measurement of γ from dynamics of target degradation.

The color indicates the time T required, in model simulations, to deplete mRNA levels by 5-fold in response to a sudden increase of α from near 0 to the value on the x axis. The solid line shows the contour corresponding to 3 min, the time observed in RyhB degradation of *sodB* mRNA (Massé *et al.*, 2003). In the simulation, the lifetimes of *sodB* $\tau_m = 5/\ln 2$ min and RyhB $\tau_s = 25/\ln 2$ min were used. The dotted line indicates $\alpha = 4$, the value obtained from our measurements of promoter activities. To calculate α , we assume to have measured all of the target mRNAs of RyhB in Fig. 4. If there are more targets, the computed α value will be less, hence γ will be higher. That is, 4 is an upper bound for α , and 400 is a lower bound for γ . Therefore, our conclusion that RyhB is characterized by low α and high γ is true for *sodB*.

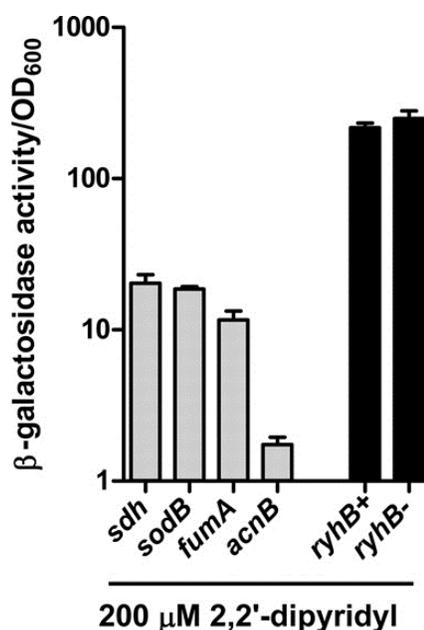


Figure 4. Specific β -galactosidase activities of promoter fusions of the Fe–Fur system without Fe (in the presence of 200 μ M the Fe chelator 2,2'-dipyridyl).

In these conditions, the promoter of *ryhB* is fully active. Promoter activities of 4 target mRNAs are indicated by the gray bars, and their sum gives $\alpha_m \approx 20 + 19 + 12 + 2 = 53$. The promoter activity of P_{ryhB} is $\alpha_s \approx 217$ (left black bar, *ryhB*⁺), therefore $\alpha = \alpha_s/\alpha_m \approx 4$. See *SI Text* and Table S1 for experimental details.

Measurement of α and Estimation of γ for Spot42 and Target mRNA Using in Vitro Transcription Assays.

The Spot42 sRNA specifically binds the *galK* Shine-Dalgarno region of the *galETKM* mRNA and inhibits production of GalK by blocking ribosome binding. Because translation of the upstream regions is not affected, Spot42 action results in discoordinated translation of the *gal* operon genes (Møller *et al.*, 2002). Transcription of the *spf* gene encoding the Spot42 sRNA is reduced 3- to 5-fold in the presence of cAMP-CRP (Polayes *et al.*, 2007). The *galETKM* operon is transcribed from 2 promoters, $P1_{galE}$ and $P2_{galE}$. Both promoters are repressed in the absence of galactose by GalR. D-galactose inhibits GalR-mediated repression of both promoters. When D-galactose is present, cAMP-CRP can activate $P1_{galE}$ and repress $P2_{galE}$ (Weicket et Adhya, 1993). To determine the relative intensities of sRNA and mRNA transcription we measured the intrinsic activities of the P_{spf} (for sRNA) and $P1_{galE}$ and $P2_{galE}$ (for mRNAs) promoters in the absence of regulators (Fig. 5). Quantitation of band intensities (see *SI Text*) resulted in $\alpha = 18$. The promoter activities measured

approximate the conditions in Møller *et al.*, (2002) when Spot42 sRNA is expressed at full strength (not repressed by cAMP–CRP) and the *gal* operon is transcribed at the maximum rate possible in the absence of cAMP–CRP and GalR. In cells grown in glucose-rich media the unrepressed P_{spf} promoter activity, approximated in the in vitro transcription assay, results in ≈ 200 copies of Spot42 sRNA per cell with a half-life of 12–13 min (Sahagan and Dahlberg, 1979). Therefore, by our calculations, the sRNA is produced at a rate of 11 per min and the mRNA, which has a half-life of 4–5 min (Beirnsstein *et al.*, 2002), is produced at a rate of 0.6 per min. This level of Spot42 sRNA reduces the amount of the GalK protein to $\approx 30\%$ of the level observed in Δspf or glycerol-grown (high cAMP–CRP) cells (Møller *et al.*, 2002). Because the GalK level is not affected by the 3- to 5-fold reduced Spot42 level in the presence of cAMP–CRP (Møller *et al.*, 2002), we assume that mRNA–sRNA pairing is negligible when the Spot42 sRNA is present at < 50 copies per cell.

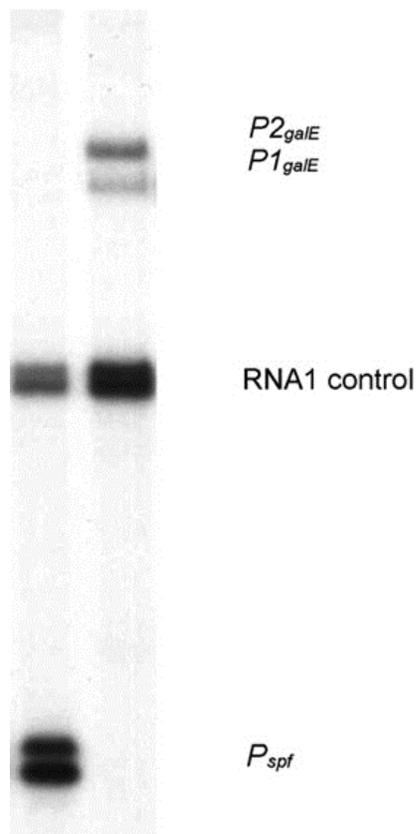


Figure 5. In vitro transcription assays were performed on pSA850spf (P_{spf} , *Left*) and pSA850 ($P1_{galE}$ and $P2_{galE}$, *Right*) supercoiled plasmid DNA templates in the presence of $\sigma 70$ RNA polymerase. The *RNA1* transcript was used as an internal control between lanes. See *SI Text* for experimental details.

In this case, the degradation kinetics is not known, but the amount of sRNA for different values of α and the according fold change of mRNA level has been measured. As can be seen in the plot of the steady state in Fig. 2B, for a given value of α , the mRNA level (and also the sRNA level) varies depending on γ , thus once the fold change of mRNA by changing α is known, γ can be calculated. Let m_1 (s_1) denote the concentration of mRNA (sRNA) with P_{spf} unrepressed and m_2 (s_2) denote the concentration of mRNA (sRNA) with P_{spf} repressed. Assuming steady state in both cases, we find, from the equations of Fig. 1, that

$$\frac{m_1}{m_2} = \frac{1/\tau_m + \delta s_2}{1/\tau_m + \delta s_1} \quad [1]$$

from which γ can be determined:

$$\gamma = \delta \alpha_m \tau_s^2 = \alpha_m \tau_s^2 \left[\frac{1 - (m_1/m_2)}{[(m_1/m_2)s_1 - s_2]\tau_m} \right]. \quad [2]$$

Inserting $(m_1/m_2) = 0.3$, $s_1 = 200$ copies per cell, and $s_2 = 50$ copies per cell, we get $\gamma \approx 2$. This system thus represents a high- α , low- γ case.

SUMMARY AND DISCUSSION

Many features of sRNA-mediated mRNA regulation are determined by 2 key parameters: the system's capacity to overexpress the sRNA relatively to its target mRNA (α) and the speed at which the target mRNA is irreversibly inactivated (γ). In this article, we used a mathematical model to analyze how the regulatory behavior changes depending on these parameters. We then determined α experimentally in 2 sRNA systems, RyhB and Spot42, using 2 different approaches to estimate γ . For the sRNA RyhB, we used the time course of depletion of target mRNA upon sudden derepression of the sRNA promoter, from Massé *et al.* (2003). Using our model simulations of the depletion process and our measurement of α to be 4 or less, we estimate that γ is at least 400 for the target *sodB*. For Spot42, we measured α to be ≈ 18 . From the relation between concentrations and model parameters at 2 different steady states, we estimated γ to be ≈ 2 . The results indicate that sRNA–mRNA systems can function in different parameter regimes.

We suggest that evolution of sRNA–mRNA systems functioning at different parameter regimes has a physiological significance. In our description of sRNA–mRNA systems, RyhB represents sRNAs that recognize target mRNAs very efficiently (high γ) but where sRNA excess (α) is low. According to our model predictions, this parameter regime optimizes the system for efficient and fast inactivation of target mRNAs in case of stress and, at the same time, a slightly time-delayed recovery of target mRNA levels after the sRNA synthesis is stopped (when stress is removed). Indeed, the RyhB system is responsible for the quick rearrangement of the intracellular channeling of available Fe. RyhB inhibits translation of nonessential Fe-using proteins, allowing a larger fraction of the limited Fe to be available for essential Fe proteins (Jacques *et al.*, 2006). To achieve recovery in the absence of stress, the sRNA expression is rapidly stopped, making the sRNA level decline, which after some time results in production of target genes, coding for nonessential Fe-using proteins. The length of the associated delay depends on how much α exceeds 1 and could be seen as buffering time to confirm that stress is persistently absent. However, because of high γ , the mRNA level quickly recovers after the time-delay period is over. Our results are in agreement with the previously observed in vivo expression of RyhB (Massé *et al.*, 2003). This type of

regulation demonstrates a “dual” response where the cell adapts rapidly to substrate deprivation and more slowly when the substrate becomes newly available.

As opposed to RyhB, the sRNA Spot42 is expressed at higher levels relative to the target mRNA (α large). Nevertheless, the pairing between Spot42 and the *gal* mRNA is inefficient (γ small). Modeling predicts that the activation of Spot42 gives similar fast decline of its target gene. However, turning off of the Spot42 system should give a more graded response with a long time delay. In a recent article by Mehta *et al.* (2008) in which the stochastic response of sRNA regulation was characterized, they suggest that graded response by sRNAs may be limited by transcriptional noise (transcriptional burst). Nevertheless in the case of Spot42, our data indicate that having a low γ would allow filtering of the noise. Thus, even though transcriptional bursts may occur for Spot42, the effect is reduced by the low binding capacity of Spot42 on the target mRNA. Unlike RyhB, Spot42 modulates the amphibolic utilization of the sugar D-galactose by discoordinating the synthesis of the enzymes involved in galactose metabolism (Møller *et al.*, 2002; Semsey *et al.*, 2007). Theoretically, partial regulation can be achieved by having low α (even <1) and high γ or having high α and low γ . In the case of Spot42, we observed the latter case presumably implemented by weak pairing between Spot42 and *galK* mRNA. The possible advantage of this parameter regime is that the mRNA level is less sensitive to any noise in the sRNA level. If Spot42 were expressed at a lower abundance than the *galETKM* message (≈ 0.6 per min), however, the noise level would be quite significant and might interfere with efficient functioning.

In principle γ can be regulated by global changes in the cellular physiology (e.g., affecting the level or activity of the RNA chaperone Hfq). However, because those changes are difficult to quantify we did not consider them in our equations. Nevertheless, our analysis does indicate ways in which global changes can affect the system, especially through the parameter α , which can be specifically regulated by changes in gene expression of the sRNA and/or the target mRNA. For example, in the galactose utilization network of *E. coli*, transcription of both the *spf* gene and the *gal* operon is simultaneously regulated by cAMP–CRP (Møller *et al.*, 2002; Semsey *et al.*, 2007). When cAMP–CRP level is increased, *spf* transcription is inhibited, while *gal* transcription is activated, therefore removal of Spot42 sRNA can be facilitated, resulting in a faster but still graded recovery of GalK.

In this work although we focused on 2 particular sRNAs, we assume that our findings can be extended to most, if not all, sRNAs using antisense pairing to regulate their target mRNAs. As demonstrated with RyhB and Spot42, the determination of both α and γ parameters in other sRNAs would indicate the type of physiological response corresponding best to a specific signal. One could imagine a sRNA that acts with a high α and γ , both parameters being necessary high for a rapid and efficient inactivation of a highly expressed target mRNA. Another example is low α and low γ , which would only slightly modulate the target mRNA expression, thus allowing a more graded response. In such a case however, a protein regulator, which allows greater quantitative adjustments than sRNAs, may be more appropriate (Metha *et al.*, 2008). Indeed unlike protein regulators, the regulation by sRNAs was shown to work best in a situation where a large change in signals is observed (Metha *et al.*, 2008).

In addition to silencing target mRNAs, some sRNAs activate their target mRNAs by making a complex that can be readily translated into proteins. For example, the sRNAs RyhB, DsrA, and GlmY bind to the 5' UTR of *cis*-repressed mRNAs such as *shiA*, *rpoS*, and *glmS*, respectively, to activate translation initiation (Majdalani *et al.*, 2001; Urban and Vogel, 2008; Kamorz *et al.*, 2007; Prévost *et al.*, 2007; Reichenbach *et al.*, 2008). In such cases, the sRNA–mRNA complex formation is also considered irreversible, and the response speed will depend on the lifetime of this complex and α and γ . The model can be easily extended to such an activation scenario, which in addition opens for regulation with α substantially smaller than 1.

Our findings are also applicable to synthetic RNA molecules that are engineered to regulate gene expression *in vivo* (reviewed in Isaacs *et al.*, 2006). Indeed, the rational design of synthetic base-pairing RNAs with specific α and γ will help to achieve tunable and programmable effects on the cell. For example, a single RNA molecule combining multiple binding domains, each with a different γ , could allow a concerted and complex response. This type of molecule could also be used as a tool to disrupt several genes at once to study a complex genetic network.

The combined use of genetic experiments and mathematical calculation allowed us to determine fundamental differences in the regulatory mechanisms of 2 well-characterized sRNAs. We showed that the RyhB system has an ultrasensitive response, whereas the response in the Spot42 system is more graded. It would be of interest to investigate similar parameters for other sRNAs, which may open up additional perspectives on these sophisticated regulatory molecules.

MATERIALS AND METHODS

Mathematical Model of sRNA and mRNA Dynamics.

We model the coupling between an sRNA (s) and its target mRNA (m) using the equations in Fig. 1 (Semsey *et al.*, 2006b; Lenz *et al.*, 2004; Levine *et al.*, 2007; Mitarai *et al.*, 2007; Shimoni *et al.*, 2007). In *SI Text* we describe how the number of parameters can be decreased by appropriately choosing units of time and concentrations. Three dimensionless parameters then determine the model behavior. The 2 most important are: the sRNA production rate relative to the mRNA production rate, $\alpha = \alpha_s/\alpha_m$, and the mRNA inactivation rate $\gamma = \delta\alpha_m\tau s^2$. Each individual sRNA–mRNA pair would have a specific value of γ ; in general, one would expect that more base pair matching between the sRNA and its target would correlate with a higher value of γ . The third parameter, τ , is the passive degradation time of the mRNA relative to the sRNA. Typically, sRNAs have longer natural half-lives than mRNAs, i.e., $\tau < 1$, partly because Hfq can protect the sRNAs (Møller *et al.*, 2002; Massé *et al.*, 2003; Moll *et al.*, 2003). For *sodB*, a target of RyhB, $\tau = 0.2$ (Massé and Gottesman, 2002), and we use this as a default value, unless otherwise specified.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Karine Prévost and Takácsné Botond Judit for excellent technical assistance. This work was supported by Canadian Institute for Health Research Grant MOP69005, the Intramural Research Program of the National Institutes of Health, National Cancer Institute, Center for Cancer Research, the Danish National Research Foundation, and Hungarian Scientific Research Fund Grant PD75496. E.M. is a Canadian Institute for Health Research New Investigator Scholar. S.S. is supported by a János Bolyai fellowship from the Hungarian Academy of Sciences.

REFERENCES

- Adhya, S. (2003). Suboperonic regulatory signals. Signal Transduction Knowledge environment: *Science* (2003), pe22.
- Altuvia, S., Zhang, A., Argaman, L., Tiwari, A., and Storz, G. (1998). The *Escherichia coli* OxyS regulatory RNA represses *fhlA* translation by blocking ribosome binding. *EMBO Journal* (17), 6069–75.
- Argaman, L., Hershberg, R., Vogel, J., Bejerano, G., Wagner, E.G.H., Margalit, H., and Altuvia, S. (2001). Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*. *Current Biology* (11), 941–50.
- Bernstein, J.A., Khodursky, A.B., Lin, P.H., Lin-Chao, S., and Cohen, S.N. (2002). Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (99): 9697–02.
- Eguchi, Y., Itoh, T., and Tomizawa, J. (1991). Antisense RNA. *Annual Review Biochemistry* (60), 631–52.
- Gottesman, S. (2004). The small RNA regulators of *Escherichia coli*: Roles and mechanisms. *Annual Review Microbiology* (58), 303–28.
- Gottesman, S. (2005). Micros for microbes: Noncoding regulatory RNAs in bacteria. *Trends Genetics* (21), 399–04.
- Isaacs, F.J., Dwyer, D.J., Collins, J.J. (2006). RNA synthetic biology. *Nature Biotechnology* (24), 545–54.
- Jacques, J.F., Jang, S., Prévost, K., Desnoyers, G., Desmarais, M., Imlay, J., and Massé, E. (2006). RyhB small RNA modulates the free intracellular iron pool and is essential for normal growth during iron limitation in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* (62), 1181–90.
- Kalamorz, F., Reichenbach, B., Marz, W., Rak, B., and 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*. *Molecular Microbiology* (65), 1518–33.
- Lee, H.J., Jeon, H.J., Ji, S.C., Yun, S.H., and Lim, H.M. (2008). Establishment of an mRNA gradient depends on the promoter: An investigation of polarity in gene expression. *Journal Molecular Biology* (378), 318–27.

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.

Levine, E., Zhang, Z., Kuhlman, T., and Hwa, T. (2007). Quantitative characteristics of gene regulation by small RNA. *PLoS Biology* (5), e229.

Majdalani, N., Chen, S., Murrow, J., St John, K., and Gottesman, S. (2001). Regulation of RpoS by a novel small RNA: The characterization of RprA. *Molecular Microbiology* (39), 1382–94.

Majdalani, N., Cunning, C., Sledjeski, D., Elliott, T., and Gottesman, S. (1998). DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (95), 12462–67.

Massé, E., and Arguin, M. (2005). Ironing out the problem: New mechanisms of iron homeostasis. *Trends in Biochemical Science* (30), 462–68.

Massé, E., Escorcía, F.E., and Gottesman, S. (2003). Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes and Development* (17), 2374–83.

Massé, E., and Gottesman, S. (2002). A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (99), 4620–25.

Massé, E., Salvail, H., Desnoyers, G., and Arguin, M. (2007). Small RNAs controlling iron metabolism. *Current Opinion Microbiology* (10), 140–45.

Massé, E., Vanderpool, C.K., and Gottesman, S. (2005). Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* (187), 6962–71.

Mehta, P., Goyal, S., and Wingreen, N.S. (2008). A quantitative comparison of sRNA-based and protein-based gene regulation. *Molecular System Biology* (4), 221.

Mitarai, N., Andersson, A.M., Krishna, S., Semsey, S., and Sneppen, K. (2007). Efficient degradation and expression prioritization with small RNAs. *Physical Biology* (14), 164–71.

Moll, I., Leitsch, D., Steinhauser, T., and Blasi, U. (2003). RNA chaperone activity of the Sm-like Hfq protein. *EMBO Report* (4), 284–89.

Møller, T., Franch, T., Højrup, P., Keene, D.R., Bächinger, H.P., Brennan, R.G., and Valentin-Hansen, P. (2002). Spot 42 RNA mediates discoordinate expression of the *E. coli* galactose operon. *Genes and Development* (16), 1696–06.

- Morita, T., Maki, K., and Aiba, H. (2005). RNase E-based ribonucleoprotein complexes: Mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. *Genes and Development* (19), 2176–86.
- Polayes, D.A., Rice, P.W., Garner, M.M., and Dahlberg, J.E. (1988). Cyclic AMP-cyclic AMP receptor protein as a repressor of transcription of the *spf* gene of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* (170), 3110–14.
- Prévost, K., Salvail, H., Desnoyers, G., Jacques, J.F., Phaneuf, E., and Massé, E. (2007). The small RNA RyhB activates the translation of *shiA* mRNA encoding a permease of shikimate, a compound involved in siderophore synthesis. *Molecular Microbiology* (64), 1260–73.
- Reichenbach, B., Maes, A., Kalamorz, F., Hajnsdorf, E., and 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 Research* (36), 2570–80.
- Rivas, E., and Eddy, S.R. (2001). Noncoding RNA gene detection using comparative sequence analysis. *BMC Bioinformatics* (2), 8.
- Sahagan, B.G., and Dahlberg, J.E. (1979). A small, unstable RNA molecule of *Escherichia coli*: Spot 42 RNA. II. Accumulation and distribution. *Journal Molecular Biology* (131), 593–05.
- Semsey, S., Andersson, A.M.C., Krishna, S., Jensen, M.H., Massé, E., and Sneppen, K., (2006 b). Genetic regulation of fluxes: Iron homeostasis of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* (34), 4960–67.
- Semsey, S., Krishna, S., Sneppen, K., and Adhya, S. (2007). Signal integration in the galactose network of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* (65), 465–76.
- Semsey, S., Virnik, K., and Adhya, S. (2006 a). Three-stage regulation of the amphibolic gal operon: From repressosome to GalR-free DNA. *Journal Molecular Biology* (358), 355–63.
- Shimoni, Y., Friedlander, G., Hetzroni, G., Niv, G., Altuvia, S., Biham, O., and Margalit, H. (2007). Regulation of gene expression by small noncoding RNAs: A quantitative view. *Molecular Systems Biology* (3), 138.
- Udekwi, K.I., Darfeuille, F., Vogel, J., Reimegård, J., Holmqvist, E., and Wagner, E.G.H. (2005). Hfq-dependent regulation of OmpA synthesis is mediated by an antisense RNA. *Genes and Development* (19):2355–66.
- Ullmann, A., Joseph, E., and Danchin, A. (1979). Cyclic AMP as a modulator of polarity in polycistronic transcriptional units. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (76), 3194–97.

Urban, J.H., and Vogel, J. (2008). Two seemingly homologous noncoding RNAs act hierarchically to activate glmS mRNA translation. *PLoS Biology* (6), e64.

Wassarman, K.M., Repoila, F., Rosenow, C., Storz, G., and Gottesman, S. (2001). Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays. *Genes and Development* (15), 1637–51.

Wassarman, K.M., and Storz, G. (2000). 6S RNA regulates *E. coli* RNA polymerase activity. *Cell* (101), 613–23.

Weickert, M.J., and Adhya, S. (1993). The galactose regulon of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* (10), 245–51.

Supporting Information

Dynamic features of gene expression control by small regulatory RNAs

Namiko Mitarai^{a,b,1,*}, Julie-Anna M. Benjamin^{c,1}, Sandeep Krishna^b, Szabolcs Semsey^d,
Zsolt Csiszovszki^e, Eric Massé^{c*}, et Kim Sneppen^b

a Department of Physics, Kyushu University 33, Fukuoka 812-8581, Japan; *b* Niels Bohr Institute, Blegdamsvej 17, DK-2100 Copenhagen, Denmark; *c* Département de Biochimie, Groupe ARN, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1E 4K8, *d* Department of Genetics, Eötvös Loránd University, H-1117, Budapest, Hungary, and *e* Laboratory of Molecular Biology, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892-4264

1: contributed equally to this work.

*To whom correspondence should be addressed. E-mail:

E-mail:

This file includes

Supplementary Materials and Methods

Supplementary References

Mathematical Model of sRNA and mRNA Dynamics.

The coupling between an sRNA (s) and its target mRNA (m) is described through the coupled equations (Mitarai *et al.*, 2007; Levine *et al.*, 2007; Semsey *et al.*, 2006; Shimoni *et al.*, 2007):

$$\frac{ds}{dt} = \alpha_s - \frac{s}{\tau_s} - \delta \cdot s \cdot m, \quad (1)$$

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m - \frac{m}{\tau_m} - \delta \cdot s \cdot m, \quad (2)$$

where α_s and α_m set the production rates for the 2 RNAs, and τ_s and τ_m define the background degradation times. The reaction rate of the coupled degradation is given by the parameter δ . By measuring time in units of the background sRNA degradation time, $t \rightarrow t/\tau_s$ and measuring concentrations in units of $\alpha_m \tau_s$, we rescale $s \rightarrow s/(\alpha_m \tau_s)$ $m \rightarrow m/(\alpha_m \tau_s)$ and obtain Eqs.3 and 4:

$$\frac{ds}{dt} = \alpha - s - \gamma \cdot s \cdot m, \quad (3)$$

$$\frac{dm}{dt} = 1 - \frac{m}{\tau} - \gamma \cdot s \cdot m, \quad (4)$$

where $\alpha = \alpha_s/\alpha_m$, $\gamma = \delta \alpha_m \tau_s^2$, and $\tau = \tau_m/\tau_s$. The behavior of the system is thus entirely determined by the values of these 3 dimensionless parameters.

The regulatory input via small RNA is typically done through transcriptional regulation of α , as for example seen in the Fur–RyhB system in *E. coli*, or the CRP–Spot 42 coupling in the galactose system in *E. coli*. For example in case of a single repressor R acting with Hill coefficient one, then $\alpha \propto 1/(1+R)$, where the repressor concentration R is measured in units of its binding constant. To understand the importance of α , notice that if $\alpha < 1$, then it will be impossible to produce enough sRNA to degrade all targets. As a consequence, the target will not be repressed completely. In contrast to this, a value of $\alpha > 1$ allows efficient active degradation of the target, which can be nearly completely eliminated. In real systems, the

dynamics of regulation will be associated with a change in α that will produce a response on a time scale that will also depend on the parameter γ .

In contrast to α , γ is not easily changed, as it is related to the irreversible association of sRNA to a given mRNA. This process is mediated by the abundant protein Hfq. Not much is understood about the details of this reaction, but it is likely that each individual sRNA–mRNA pair would have a specific value of γ . In general, one would expect that a higher degree of base-pair matching between the sRNA and its target would correlate with higher value of γ .

In the above equation there is a third parameter, τ , which sets the passive degradation time of the mRNA in the absence of sRNA. In most of the cases, sRNAs have a longer natural half-life than mRNAs, partly because Hfq often protects the sRNAs (Massé *et al.*, 2003; Moll *et al.*, 2003; Møller *et al.*, 2002). Accordingly, we mostly expect τ to be < 1 . The value of τ determines the steady-state level ($m = \tau$ in dimensionless units) of mRNAs in the absence of sRNA. In the following, we use $\tau = 0.2$ unless otherwise specified, as this value reflect the *sodB* target degradation in units of the relative stable RyhB (Massé and Gottesman, 2002).

Effect of Multiple Targets in Estimation of γ for RyhB–*sodB* System.

In the estimation, we used the degradation data of *sodB* by induction of RyhB, but we do not have the degradation data for other target mRNAs. Therefore, we cannot estimate the differences in γ between targets. Our computation in Fig. 3 assumed that γ values for all target mRNAs are in a similar range. To see how much this assumption affect the result, we simulated degradation kinetics in the cases where γ for *sodB* is 400 but the other targets have 10-fold higher or lower γ ; the difference in degradation time T for *sodB* in these simulations was within 1 min.

Measurement of Promoter Activities in the Gal Operon/Spot42 System.

Promoter activities were measured by quantitation of RNA band intensities obtained by in vitro transcription assays. Transcription reactions were performed as described (Geacopoulos *et al.*, 1999) using pSEM2008 and pSEM2008spf plasmid DNA templates. The pSEM2008 plasmid was obtained by inserting the DNA fragment containing the

rrnBT1T2 terminators (nucleotides 4141–4559) from pKK223–3 (Amersham Pharmacia; GenBank M77749) between the KpnI and EcoRI sites of pSA850 (Lewis and Adhya, 2002), upstream of the *P1_{galE}* and *P2_{galE}* promoters. Transcription of *P1_{galE}* and *P2_{galE}* is terminated by the *rpoC* terminator 125 nt downstream of the *P2_{galE}* start site. The pSEM2008spf plasmid was created by the insertion of the -147 to +33 region (using +1 as a transcription start site in the numbering) of the *spf* gene between the EcoRI and PstI sites of pSEM2008. The in vitro transcription reaction mixture (50 μ L) contained 20 mM Tris acetate (pH 7.8), 10 mM magnesium acetate, 200 mM potassium glutamate, and 2 nM supercoiled plasmid DNA template. RNA polymerase (20 nM) was added before incubating the reactions at 37 °C for 5 min. Transcription was started by the addition of 1.0 mM ATP, 0.1 mM GTP, 0.1 mM CTP, 0.01 mM UTP, and 5 mCi of [α -³²P] UTP (3,000 Ci/mmol). Reactions were terminated after 10 min by addition of an equal volume of transcription loading buffer (0.025% bromophenol blue, 0.025% xylene cyanol, 0.01 M EDTA and 90% deionized formamide). After heating at 90 °C for 3 min, the samples were loaded onto 7% polyacrylamide-urea DNA sequencing gels. RNA bands were quantified by using the ImageQuant PhosphorImager (Molecular Dynamics). Band intensities were normalized to the RNA1 transcript level and corrected with the background and the number of uracils incorporated into the different RNA species.

Measurement of Promoter Activities by β -Galactosidase in the RyhB System.

Derivatives of *E. coli* MG1655 were used in all experiments. DH5 α strain was used for routine cloning procedures. EM1055 (MG1655 Δ_{lac}) and EM1238 (EM1055 *ryhB::cat*) strains have been described (Massé and Gottesman, 2002). Transcriptional *lacZ* fusions were constructed by inserting a PCR product (chromosomal DNA as template) into pFRA as described (Repoila and Gottesman, 2003). PCR products containing the promoter region of selected genes were generated by using oligos (see Table S1 for sequences) EM423 and EM424 (*sodB*), EM107 and EM117 (*sdh*), EM531 and EM551 (*acnB*), EM533 and EM534 (*fumA*), and EM487 and EM488 (*ryhB*). PCR products were digested by EcoRI and BamHI and ligated into EcoRI/BamHI-digested pFRA to generate *sodB-lacZ*, *sdh-lacZ*, *acnB-lacZ*, *fumA-lacZ*, and *ryhB-lacZ*, respectively. Transcriptional *lacZ* fusions were delivered in single copy into the bacterial chromosome at the λ *att* site as described (Simons *et al.*, 1987). Stable lysogens were screened for single insertion of recombinant λ by PCR (Powell *et al.*, 1994).

Kinetic assays for β -galactosidase activity were performed as described (Prévost *et al.*, 2007) by using a SpectraMax 250 microtiter plate reader (Molecular Devices). Briefly, overnight bacterial cultures incubated in LB media at 37 °C were diluted 1,000-fold into 50 mL of fresh LB media at 37 °C. Cultures were grown with agitation to an O.D.₆₀₀ of 0.5 before inducing RyhB expression by adding 200 μ M of 2,2'-dipyridyl (for strains EM1055 or EM1238). Specific β -galactosidase activities were calculated by using the formula $V_{\max}/O.D._{600}$. The results reported represent data typical of at least 3 experimental trials.

SUPPLEMENTARY REFERENCES

- Geanacopoulos, M., Vasmatazis, G., Lewis, D.E.A., Roy, S., Lee, B., and Adhya, S. (1999). GalR mutants defective in repressosome formation. *Genes and Development* (13), 1251–62.
- Levine, E., Zhang, Z., Kuhlman, T., and Hwa, T. (2007). Quantitative characteristics of gene regulation by small RNA. *PLoS Biology* (5), e229.
- Lewis, D.E., and Adhya, S. (2002). In vitro repression of the *gal* promoters by GalR and HU depends on the proper helical phasing of the two operators. *Journal of Biological Chemistry* (277), 2498–04.
- Massé, E., Escorcia, F.E., and Gottesman, S. (2003). Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes and Development* (17), 2374–83.
- Massé, E., and Gottesman, S. (2002). A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (99), 4620–25.
- Mitarai, N., Andersson, A.M., Krishna, S., Semsey, S., and Sneppen, K. (2007). Efficient degradation and expression prioritization with small RNAs. *Physical Biology* (14), 164–171.
- Moll, I., Leitsch, D., Steinhauser, T., and Blasi, U. (2003). RNA chaperone activity of the Sm-like Hfq protein. *EMBO Report* (4), 284–89.
- Møller, T., Franch, T., Højrup, P., Keene, D.R., Bächinger, H.P., Brennan, R.G., and Valentin-Hansen, P. (2002). Spot 42 RNA mediates discoordinate expression of the *E. coli* galactose operon. *Genes and Development* (16), 1696–06.
- 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 Research* (22), 5765–66.
- Prévost, K., Salvail, H., Desnoyers, G., Jacques, J.F., Phaneuf, E., and Massé, E. (2007). The small RNA RyhB activates the translation of *shiA* mRNA encoding a permease of shikimate, a compound involved in siderophore synthesis. *Molecular Microbiology* (64), 1260–73.
- Repoila, F., and Gottesman, S. (2003). Temperature sensing by the *dsrA* promoter. *Journal of Bacteriology* (185), 6609–14.
- Semsey, S., Andersson, A.M.C., Krishna, S., Jensen, M.H., Massé, E., and Sneppen, K., (2006). Genetic regulation of fluxes: Iron homeostasis of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* (34), 4960–67.
- Shimoni, Y., Friedlander, G., Hetzroni, G., Niv, G., Altuvia, S., Biham, O., and Margalit, H. (2007). Regulation of gene expression by small noncoding RNAs: A quantitative view. *Molecular Systems Biology* (3), 138.
- 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 3

The iron-sensing aconitase B binds its own mRNA to prevent sRNA-induced mRNA cleavage

Auteurs de l'article: Julie-Anna M. Benjamin and Eric Massé*

Département de Biochimie, Groupe ARN, Université de Sherbrooke, Sherbrooke,
Québec, Canada.

Statut de l'article: Soumis

Nucleic Acid Research

Avant-propos: En ce qui concerne la rédaction, j'ai écrit une version de chacune des sections (introduction, résultats, discussion et matériel & méthodes) qui a été soumise à mon directeur de recherche Eric Massé, qui a apporté certaines modifications.

La planification des expériences a été faite avec Eric Massé et j'ai réalisé toutes les manipulations présentées dans cet article, incluant les figures supplémentaires.

RÉSUMÉ

Dans un milieu pauvre en Fe, la protéine aconitase passe de sa forme catalytique, transformant le citrate en isocitrate, à sa forme apo agissant comme un régulateur post-transcriptionnel. Chez *E. coli*, l'aconitase B sous forme apo lierait le 3'-UTR de son propre ARNm et le stabiliser. Aussi, dans les mêmes conditions, le sRNA RyhB réprime l'expression de plusieurs ARNm en carence de Fe en s'appariant sur leur SLR, bloquant ainsi l'initiation de la traduction, et en recrutant la machinerie de dégradation.

Classiquement, RyhB induisait la dégradation de ces cibles ARNm de manière infaillible. Or, une étude montrait une exception à ce modèle général par la caractérisation du mécanisme de régulation de l'ARNm *acnB* par le sRNA RyhB en carence de Fe. En effet, dans cette condition, l'étude démontrait que la protéine aconitase B passait sous forme apo et s'attachait à son ARNm pour empêcher la dégradation induite par le sRNA. Plus précisément, le mécanisme mettait en lumière la protection de l'ARNm *acnB* conféré par l'attachement de la protéine apo-AcnB à proximité du site de clivage de la RNase E, en empêchant l'accès de l'endoribonucléase au site de clivage. Ainsi, même si RyhB peut dégrader efficacement l'ARNm *acnB* lorsqu'il est exprimé dans un milieu riche en Fe, il n'y arrive pas dans les conditions physiologiques où il est exprimé.

Ce mécanisme suggère que la dégradation induite par les sRNA serait reliée à l'état métabolique dans lequel il serait exprimé, optimisant l'adaptation au stress.

The iron-sensing aconitase B binds its own mRNA to prevent sRNA-induced mRNA cleavage

Julie-Anna M. Benjamin and Eric Massé*

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

20 019 characters

*Corresponding author. Department of Biochemistry, University of Sherbrooke, 3201 Jean-
Mignault Street, Sherbrooke, Qc, J1E 4K8, Canada

Phone ; E-mail

ABSTRACT

Aconitase is an iron-sulfur protein and a major enzyme of the TCA cycle that catalyses the conversion of citrate to isocitrate under iron-rich conditions. In *E. coli*, aconitase B (AcnB) is a typical moonlighting protein that can switch to its apo form (apo-AcnB) which favors binding its own mRNA 3' and stabilise it when intracellular iron become scarce. The small regulatory RNA (sRNA) RyhB has previously been shown to promote RNase E-dependent degradation of *acnB* mRNA when it was expressed from an ectopic arabinose-dependent promoter, independently of intracellular iron levels. In marked contrast, we report here that expression of RyhB under low-iron conditions resulted in stabilisation of *acnB* mRNA even when RyhB was bound to *acnB* ribosome binding site (RBS). Genetic and biochemical evidence suggested that, under low-iron conditions, apo-AcnB bound to *acnB* 3'UTR close to a RNase E cleavage site that is essential for RyhB-induced *acnB* mRNA degradation. Whereas RyhB can block *acnB* translation initiation, RNase E-dependent degradation of *acnB* was prevented by apo-AcnB binding close to the cleavage site. This previously uncharacterised regulation suggests an intricate post-transcriptional mechanism that represses protein expression while insuring mRNA stability.

Keywords: aconitase B; RyhB; small RNA; Hfq, RNA-binding protein; translation; RNase E; RNA degradosome; mRNA degradation

INTRODUCTION

Aconitases are iron-sulfur proteins and major enzymes of the tricarboxylic acid (TCA) cycle that catalyse the reversible conversion of citrate to isocitrate. The bacterium *E. coli* possesses two isoforms of aconitases, AcnA and AcnB, whose expression varies according to environmental conditions. For instance, AcnA is expressed during stress and stationary phase whereas AcnB is the major TCA enzyme expressed during exponential growth under aerobic conditions (1). However, AcnB is unstable under certain conditions of environmental stress. For example, AcnB contains a 4Fe-4S group that participates in catalysis but this essential structure becomes disassembled when cells are exposed to oxidative stress or low intracellular iron and that results in loss of activity (2-4).

AcnB is not only sensitive to environmental conditions but it also acts as a moonlighting or bifunctional protein. Whereas AcnB functions as a catalytic enzyme under iron-rich conditions in *E. coli*, it becomes a regulatory RNA-binding protein when intracellular iron becomes scarce (apo-AcnB). Indeed, under low iron conditions AcnB can bind its own mRNA 3'UTR, which increases *acnB* mRNA stability (2,3,5). This dual function was first described in higher organisms where it was shown that cytoplasmic apo-aconitase could bind mRNAs (6,7). Subsequent investigations in eukaryotes revealed that aconitase mRNAs carried iron-responsive elements (IREs) motifs (8,9). Oxidative stress and iron starvation induce aconitases expression to maintain iron homeostasis, thus classifying aconitases as iron-regulatory proteins (IRPs) (10,11). Acn-IRPs can bind to IREs located in the 5' or 3' end of mRNA UTRs to either protect mRNAs from degradation or to prevent translation, respectively. IREs are also found in the 3'UTR of the transferrin receptor mRNA (*trf1*), where they induce mRNA stabilisation by protecting mRNA from cleavage by an as yet uncharacterised endonuclease (12). In contrast, IREs found in the 5'UTR of ferritin lead to translational inhibition of the Fe-storage protein, similarly to many others Fe-metabolism genes (13-14).

The small regulatory RNA (sRNA) RyhB that is strongly expressed in response to low iron condition has been reported to be an additional factor of regulation of *acnB* mRNA in *E. coli* (15). Small RNAs (sRNAs) in bacteria are important regulators of cellular functions by modulating gene expression in response to changes in the environment. More than 80 sRNAs

have been identified so far in *E. coli* (16). A majority of these sRNAs regulate mRNAs by direct base-pairing, which affect either positively or negatively their translation and stability (17,18). In many cases, sRNAs require the RNA chaperone Hfq for optimal regulation by promoting sRNA-mRNA pairing and by stabilizing sRNAs against degradation *in vivo* (19,20). The chaperone Hfq can also act as a direct translational repressor by competing with initiating 30S ribosomal subunit for accessibility to AU-rich sequences in the vicinity of the ribosome binding site (RBS) (21,22). Such AU-rich sequences have been shown to act as translational enhancers by increasing interactions with ribosomal protein S1 and by stabilizing mRNA (23,28).

RyhB is one of the most extensively studied Hfq-dependent sRNAs. When cells grow under iron-rich conditions, the transcriptional regulator Fur (Fe^{2+} -Fur) represses *ryhB* promoter. In contrast, Fur becomes inactive and relieves repression of *ryhB* under conditions of iron starvation (15,19). When iron is depleted, RyhB represses approximately 20 different mRNAs, which encode iron-dependent proteins. When bound to those mRNAs, RyhB shuts down translation and promotes their degradation through recruitment of the RNA degradosome, a protein complex that includes endoribonuclease E (RNase E), a 3'-5' polynucleotide phosphorylase (PNPase), an RNA helicase (RhlB), and enolase (15,22,30-33). By regulating iron-using proteins, RyhB contributes actively to increase the levels of free intracellular Fe^{2+} (iron sparing) during iron starvation by reducing the expression of iron-dependent proteins (34).

Previous work from our group has shown that RyhB represses *acnB* mRNA under defined conditions (31). Here, we extend these observations to show the importance of intracellular iron levels in determining the outcome of RyhB-induced *acnB* repression. When *E. coli* is grown under high-iron conditions, RyhB expression results in *acnB* mRNA degradation. In contrast, low-iron conditions favor translational repression of *acnB*, leaving *acnB* mRNA intact. Our data suggest that apo-AcnB protects *acnB* mRNA from RNase E-mediated cleavage after RyhB pairing. This mechanism highlights a new level of regulation of sRNA-induced mRNA degradation that is linked to the metabolic status of *E. coli*, which influences the enzyme/RNA-binding properties of AcnB.

RESULTS

RyhB-induced nucleolytic cleavage of *acnB* mRNA depends on intracellular Fe levels.

The *acnB* mRNA has been previously shown to be down-regulated by the sRNA RyhB when expressed from the arabinose-inducible promoter of the pBAD-*ryhB* construct (31). In these experiments, RyhB was induced independently of intracellular iron status and Fur activity, both of which normally control the expression of the endogenous *ryhB* promoter (35,36). Notably, AcnB has been shown to shift from catalytic (holo-AcnB) to RNA-binding regulatory mode (apo-AcnB) under conditions of iron starvation (4,5). Therefore, we asked whether *acnB* mRNA could be protected from RyhB-induced mRNA degradation when AcnB switched (apo-form) to binding its own mRNA under conditions of low Fe. We first addressed this question by inducing expression of RyhB under two different modes of induction. The first mode involved cultures in Fe-rich media (Fig. 1A, left panels) of cells under the control of an arabinose-inducible pBAD promoter (0.1% arabinose, Ara). The second mode involved cultures in Fe-poor media by adding the iron chelator 2,2'-dipyridyl (Dip) to cells under the control of their endogenous promoter. Results showed that when RyhB was expressed in cells under control of an *ara*-BAD promoter in Fe-rich media, it triggered a rapid degradation (within 5 min) of *acnB* mRNA (Fig. 1A, lanes 1 to 5). The mRNA *sodB* was used as a positive control in these experiments and showed the expected degradation kinetics of a RyhB target (≤ 5 min). These results were in agreement with our previous observations that RyhB induced degradation of *acnB* when expressed under the control of pBAD-*ryhB* when arabinose was present in the medium (31). In marked contrast, when RyhB sRNA was induced under low Fe conditions, *acnB* mRNA remained stable even after 10 min of RyhB expression. This result was unexpected given that the fact that RyhB-sensitive *sodB* mRNA became fully degraded under similar conditions (Fig. 1A, lanes 5 to 10). The bulk of these results suggested that decreased intracellular iron levels may help to stabilise *acnB* mRNA although RyhB sRNA was fully expressed and able to induce degradation of control target *sodB* mRNA. To confirm that the results (Fig. 1A, lanes 1 to 5) were not due to an arabinose-related effect, a third mode of induction was investigated. In this case, RyhB was arabinose-induced under control of pBAD-*ryhB* and cells were grown under condition of iron depletion (Dip, 250 μ M). Results showed that *acnB* mRNA remained

stable throughout the experiment, although RyhB expression induced *sodB* degradation within 5 min (Fig. 1A, lanes 11 to 15). These results confirmed that expression of RyhB under depleted iron conditions protected *acnB* mRNA against RyhB-induced degradation.

Controls experiments performed in absence of RyhB (Δ *ryhB*) revealed the absence of noticeable effect on both *acnB* and *sodB* mRNAs (Fig. 1B, lanes 1-5). Unexpectedly, addition of Dip (250 μ M) induced a two-fold increase of *acnB* mRNA levels when cells had been treated with the iron chelator for 10 min (Fig. 1B, lanes 6-10). This *acnB* mRNA stabilisation effect was similar in the case of another Fe chelator, diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA), which unlike the Fe chelator Dip is not internalized by cells (Fig. S1A). These results were consistent with the interpretation that DTPA favored the switch to apo-AcnB and binding of its own mRNA (4). Taken together, our finding suggested that *acnB* mRNA was stabilized against RyhB-induced mRNA degradation in a Fe-depleted medium.

To determine whether promoter expression of *acnB* was sensitive to intracellular iron levels, we measured promoter activity in the presence or absence of Dip. Results showed that there were no significant differences between these two experimental conditions (Fig. S1B). This result was in contrast to that observed for the *ryhB* promoter in which case there was a strong response to iron depletion (Fig. S1B, *ryhB*). A possible explanation to account for the fact that the stability of *acnB* mRNA increased under depleted iron (Figs. 1A and B, compare lane 6 with lane 10) was that AcnB switched to its apo form favoring its binding to its own mRNA and increasing its stability. This possibility was tested by measuring *acnB* mRNA half-life in extracts of Δ *ryhB* cells grown in the presence or absence of Dip, for 15 min. Results showed that *acnB* mRNA stability was significantly increased in the presence of Dip, from 5 to 9 min as compared to growth in the absence of Dip (Fig. 1C). These data were consistent with the interpretation of post-transcriptional stabilization of *acnB* under iron-depleted conditions.

Apo-AcnB binds 3'UTR of *acnB* mRNA under conditions of iron depletion. Previous *in vitro* experiments have suggested that apo-AcnB bound to the 3'UTR of *acnB* mRNA (5). In these experiments, the authors used an arbitrary 308 nucleotides-long sequence without giving experimental evidence for the 3' end of the transcript. We set up experiments to define the 3' end of *acnB* by performing 3'RACE experiments. Results showed that the transcript terminated 67 nt after *acnB* ORF (Fig. 2A, sequence and structure of *acnB* 3'UTR). Next, we performed experiments to identify the apo-AcnB binding site on *acnB* 3'UTR. Footprinting assays in which radiolabeled *acnB* 3'UTR was subjected to partial cleavage by RNase T1 (cleaves single-stranded Gs) and RNase TA (cleaves single-stranded As) in the presence of increasing amounts of purified AcnB_{3xFLAG} protein were performed. We found clear protection of the structure surrounding the stem-loop located in 3'UTR (Fig. 2B, lanes 4 to 11). These results suggested that apo-AcnB bound to the 3'UTR of *acnB* mRNA in the stem-loop structure immediately downstream of the ORF (red nucleotides in Fig. 2A).

Because previous results suggested AcnB bound to *acnB* 3'UTR *in vitro*, we next performed AcnB_{3xFLAG} RNA immunoprecipitation (RIP) experiment to determine whether AcnB could bind to *acnB* mRNA under conditions of iron depletion. Cells were grown in LB medium to an OD of 0.5 after which point cells were left untreated or Dip was added for 15 min. Cells were then lysed and lysate was applied to a FLAG-binding column. After washes and elution, *acnB* mRNA was detected by Northern blot analysis. Results showed a significant enrichment (4- to 6-fold) in *acnB* mRNA recovery in the presence of Dip as compared to its absence (Fig. 2C, lanes 4 and 5). Control experiments were performed by monitoring *acnB* mRNA recovery in a strain carrying plasmid pBAD24-*acnB* without FLAG. Under these control conditions, there was no recovery of *acnB* mRNA from cultures grown under Fe depletion (Fig. 2C, lanes 3 and 6). Furthermore, there were no variations between the various conditions of culture with the non-target control *hns* mRNA and 16S ribosomal RNA (Fig. 2, lanes 1 to 6). These results gave further support to the interpretation that interaction between AcnB_{3xFLAG} and *acnB* mRNA depended on depleted intracellular Fe.

Implication of *acnB* 3'UTR in regulation of its mRNA stability. Results described above (Fig. 2) suggested that *acnB* 3'UTR mediated the stability of *acnB* mRNA through interaction with AcnB under conditions of iron starvation. To investigate the involvement of *acnB* 3'UTR in AcnB binding, we engineered a transcriptional *lacZ* fusion, which carried all but the last 12 nt of *acnB* mRNA (fused at nt 2749, see Fig. 3A). The fusion *acnB*₂₇₄₉-*lacZ* reproduced the same pattern of degradation previously observed (Figs. 1A and 1B) 10 min after RyhB expression under control of the Ara-inducible promoter (Fe-rich condition) (Fig. 3B, lanes 1 and 2) or in the presence of Dip (Fig. 3B, lanes 5-6). Furthermore, data indicated (Fig. 2B) that the stem-loop located immediately downstream of *acnB* 3'UTR could bind to AcnB under iron depletion. To investigate the role of this stem-loop in *acnB* 3'UTR, we constructed an *acnB*₂₇₄₉ Δ stem-*lacZ* fusion that was mutated for 2 nt within the stem structure. This mutation disrupts the stem-loop secondary structure as suggested by mfold (<http://mfold.rutgers.edu/?q=mfold>. Data not shown). Results showed that *acnB*₂₇₄₉ Δ stem-*lacZ* was completely degraded after 10 min of RyhB expression whether RyhB was expressed from plasmid with Ara (Fig. 3C, lanes 1 and 2) or, endogenously, in the presence of Dip (Fig. 3C, lanes 5 and 6). To address the question whether the RNA sequence or the stem-loop structure was responsible for the loss of regulation, we constructed a fusion carrying compensatory mutations that reconstituted the stem-loop in *acnB* 3'UTR (*acnB*₂₇₄₉-stem, Fig. 3A). Results showed that, under typical growth conditions, the *acnB*₂₇₄₉-stem construct was degraded when RyhB was expressed from Ara (Fig. 3D, lanes 1 and 2) but remained intact when RyhB was expressed in cells cultured in the presence of Dip (Fig. 3D, lanes 5 and 6). These results were interpreted to suggest that the stem-loop structure located immediately downstream of *acnB* ORF played an important role in the stability of *acnB* mRNA when RyhB is expressed.

To investigate the possibility that AcnB bound *acnB* constructs with different affinities, depending on the 3'UTR sequences, we performed RNA IP assays. In these experiments, FLAG-tagged AcnB (AcnB_{3xFLAG}) was used to quantitate binding affinity of the various constructs described above (Fig. 3, *acnB*₂₇₄₉, *acnB*₂₇₄₉ Δ stem, *acnB*₂₇₄₉-stem). Cells were grown to mid-log phase, at which point they were treated with Dip (250 μ M, 10 min), followed by lysis and purification (see Materials and Methods for details). Enrichment of the specific construct *acnB*₂₇₄₉ was then measured by qPCR. Results showed that transcriptional

constructs *acnB*₂₇₄₉ and *acnB*₂₇₄₉-stem had comparable enrichment with AcnB_{3xFLAG} relative to untagged AcnB (Fig. 3E, lanes 1 and 2 and lanes 5 and 6). In contrast, *acnB*₂₇₄₉ Δ stem construct showed no enrichment with AcnB_{3xFLAG} (Fig. 3E, lanes 3-4). These results established that the stem-loop structure was essential for AcnB binding to *acnB* 3'UTR under conditions of iron depletion.

The 3'UTR of *acnB* mRNA is essential for RyhB-induced cleavage. The bulk of the data described above suggested that binding of AcnB to *acnB* 3'UTR prevented binding of sRNA RyhB to *acnB* mRNA. To add support to this interpretation, we constructed a transcriptional fusion (*acnB*₂₆₈₈-*lacZ*) comprising all but the last 2 codons of *acnB* ORF (Fig. 3A). The reasoning behind the use of this construct was that it would allow RyhB binding to the translation initiation region (Figs. S2A and S2B) but would prevent apo-AcnB binding at the 3'UTR of *acnB* mRNA. The fusion *acnB*₂₆₈₈-*lacZ* was tested in cells grown under usual conditions (Fig. 1A). Results showed that *acnB*₂₆₈₈-*lacZ* became resistant to the expression of RyhB after 10 min of induction (Fig. 4A, lanes 1 and 2).

Although these observations suggested that RyhB expression could not induce *acnB*₂₆₈₈-*lacZ* degradation, they did not exclude the possibility that RyhB could nevertheless bind the construct. To confirm that RyhB was still able to bind *acnB*₂₆₈₈ transcript and block translation, we constructed a translational AcnB₂₆₈₈-LacZ fusion. Results showed that RyhB significantly reduced expression of translation, regardless of the mode of induction (Dip, Ara) of RyhB (Fig. 4B). These results, together with those shown in Fig. 4A, strongly suggested that even if RyhB could bind *acnB* mRNA, the absence of the 3'UTR region prevented sRNA-induced mRNA cleavage. To further investigate the effect of RyhB pairing on 30S ribosomal subunit binding to *acnB* mRNA translation initiation region (TIR), we performed a toeprint assay in presence of increasing amount of RyhB. Results revealed a strong inhibition (10-fold) of 30S subunit binding in the presence of added RyhB (Fig. S3, compare lanes 7 and 11, and 7 and 13). Moreover, the addition of purified Hfq chaperone contributed to block 30S subunit binding on *acnB* mRNA TIR by an additional 2.3-fold (Fig. S3, compare lanes 9 and 10, 11 and 12, 13 and 14). Control experiments showed that excess molar ratio of DsrA sRNA had no effect on 30S ribosomal subunit binding on *acnB* (Fig. S3, lane 15).

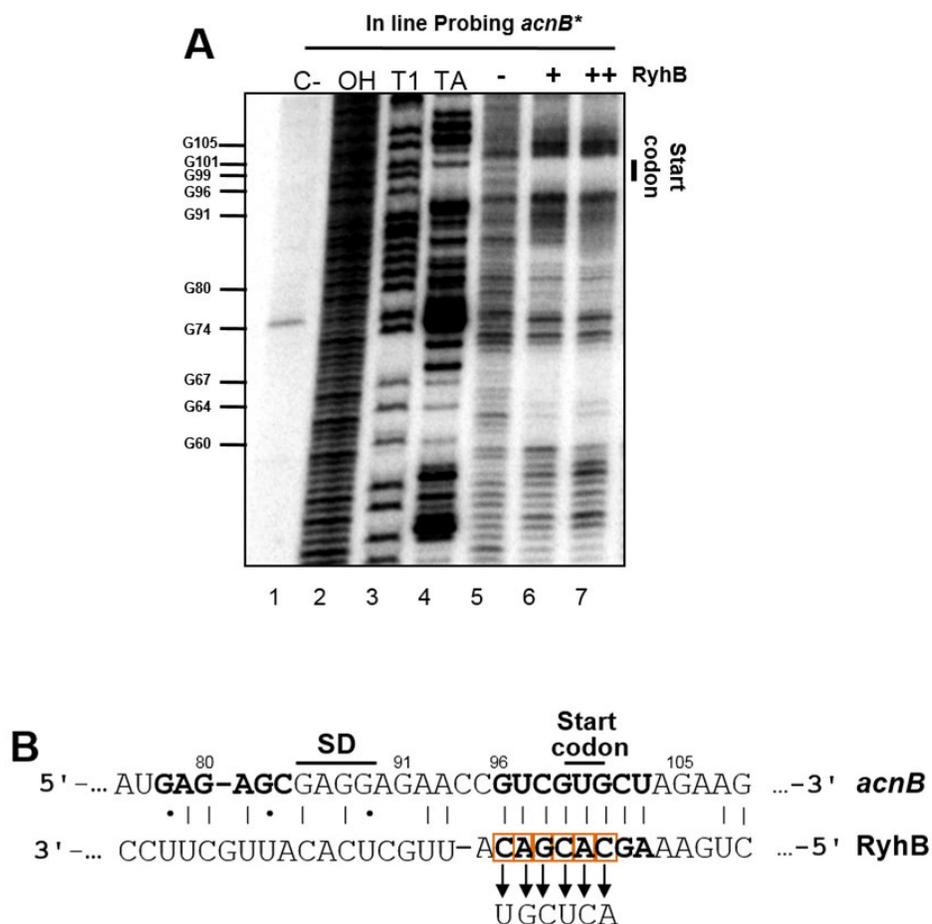


Figure S2. RyhB sRNA pairs to the translational initiation region of *acnB* mRNA. (A) *In vitro* pairing between sRNA RyhB and 5' end-radiolabelled *acnB* mRNA. (Lane 1) Control of *acnB* mRNA transcript alone. In-line probing reaction where *acnB* 5'UTR RNA transcript was incubated with RyhB sRNA in rates of 1:0, 1:10 and 1:20 (Lanes 5-7). (Lane 2) NaOH ladder. (Lane 3) RNase T1 ladder. (Lanes 4) RNase TA ladder. (B) *In silico* pairing prediction of RyhB sRNA on *acnB* mRNA on its translational initiation region by TargetRNA (57).

essential, we mutated the *acnB*₂₇₄₉-*lacZ* construct to introduce the CCUAAGCC mutation that blocked RNase E cleavage. Cells harboring the construct *acnB*₂₇₄₉CC-stop-GCC were subjected to RyhB expression and data analyzed by qRT-PCR. Results showed that the *acnB*₂₇₄₉CC-stop-GCC construct was completely resistant to RyhB-induced mRNA degradation under Fe-rich condition (Fig. 5C, compare *acnB*₂₇₄₉CC-stop-GCC and *sodB* panels, columns 1-2), highlighting the importance of the RyhB-induced cleavage site that mapped at the end of *acnB* ORF (Fig. 5B, nt 2692-97).

Next, we asked whether the 3' end of *acnB* could function ectopically on *sodB*, a mRNA that is also a target of RyhB. We used a truncated version of *sodB* mRNA (*sodB*₁₃₀) which has previously been shown to be resistant to RyhB-induced mRNA degradation (33). The construct was fused to the 3' end of *acnB* to obtain *sodB*₁₃₀-*acnB*₊₆₇ (Fig. S4A for details). As expected, this construct was sensitive to RyhB sRNA-dependent degradation under Fe-rich conditions (Fig. S4B, compare lanes 5 and 10). In contrast, induction of RyhB by Dip led to a slower degradation of the *sodB*₁₃₀-*acnB*₊₆₇ construct, suggesting that *acnB* 3' end can act ectopically to partially stabilize a particular mRNA from RyhB-induced degradation (Fig. S4).

The bulk of our results suggested that apo-AcnB protected *acnB* mRNA against RyhB-induced mRNA cleavage by occluding RNase E access to the cleavage site. This possibility required that the distance between apo-AcnB binding site must remain proximal to the cleavage site for competitive inhibition. To address this possibility, we initially constructed a *lacZ* fusion in which a sequence of 20 nt was inserted between RyhB-induced RNase E cleavage site and apo-AcnB binding site (*acnB*_{+20-3'UTR}-*lacZ*) (Fig. 3A). It must be noted that this 20 nt sequence has previously been reported to be resistant to RNase E cleavage (38). As expected, Northern blot analysis showed that the *acnB*_{+20-3'UTR}-*lacZ* construct was sensitive to RyhB when cells were grown under Fe starvation (Fig. 5D, lanes 5-6). This result could be explained by decreased binding affinity of apo-AcnB for *acnB*_{+20-3'UTR}-*lacZ* construct. This possibility was tested by performing an AcnB_{3xFLAG} IP experiment using cells grown in Fe-poor media. Data of IP experiments revealed *acnB* mRNA enrichment comparable to *acnB*₂₇₄₉ WT by apo-AcnB (Fig. S4C).

Antagonist regulation of *acnB* mRNA and its effect on protein levels. To evaluate the effect RyhB on AcnB expression, we monitored AcnB levels by Western blots and compared the results to native AcnB from WT and Δ *ryhB* cells grown under Fe starvation. Unexpectedly, AcnB levels remained stable over time when RyhB was induced in the presence of Dip (Fig. 6A, left panel). In marked contrast, we observed a significant accumulation of AcnB (3.6-fold increase) in Δ *ryhB* cells 2 h after Dip treatment (Fig. 6A, right panel). These results suggested that RyhB expression significantly repressed AcnB translation when cells grew under low Fe conditions.

We then investigated the effect of RyhB-induced repression of AcnB expression in Fe-rich LB medium (Fig. 6B). Western blot analysis revealed an important decrease (43%) of AcnB levels after expression of RyhB sRNA from an arabinose-inducible BAD promoter in Δ *ryhB* cells (Fig. 6B, right panel, 2 h). The decrease correlated with the repression observed on translational *AcnB*₂₆₈₈'-LacZ translational fusion (48% decrease) (Fig. 4B, Ara). These results added support to the interpretation that RyhB directly blocked *acnB* mRNA translation initiation, thus significantly affect the levels of AcnB in these cells.

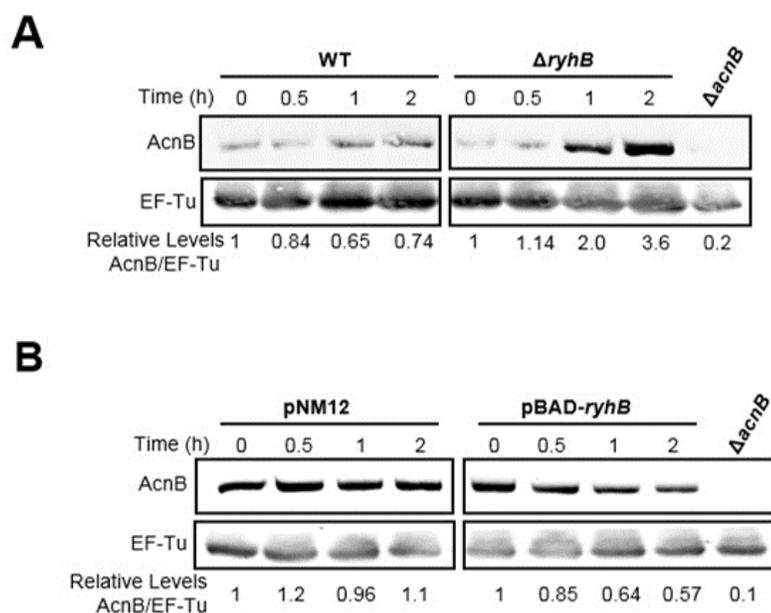


Figure 6. Both apo-AcnB stabilisation and RyhB negative regulation affect AcnB levels. (A) Quantitative Western blot of AcnB levels in Fe-depleted media. Fe depletion was induced by addition of Dip (200 μ M final) to WT (EM1055) or to $\Delta ryhB$ strains (EM1238) at time 0. Total proteins were extracted at the indicated time (h). Relative densitometry levels are indicated under the lanes. (B) Quantitative Western blot of AcnB levels under Fe-rich conditions when RyhB sRNA was expressed in WT strain (EM1455) from pBAD-*ryhB* compared with an empty plasmid pNM12 (0.01% arabinose final). Proteins were extracted at the indicated time (h). EF-Tu protein was used as a loading control in both experiments. A polyclonal anti-AcnB antibody was used for hybridization and antibody specificity was determined using a protein extract from $\Delta acnB$ strain (strain JAB284 for panel A, JAB154 for panel B). Relative densitometry levels are indicated under the lanes. A IRDye 800CW-conjugated secondary antibody was used for quantification.

Citrate interferes with the switch of holo-AcnB to apo-AcnB under low iron conditions.

Low intracellular iron conditions favor the switch of enzymatic (holo) AcnB to its RNA-binding (apo) conformation. We asked whether citrate, the substrate of AcnB, could interfere with this switch. To answer this question, WT cells were grown in iron-rich LB medium until mid-log phase, at which point Dip or a combination of Dip and citrate were added, followed by rifampicin to assess *acnB* mRNA stability. Results showed that *acnB* mRNA half-life was slightly stabilized in the presence of Dip, which correlated with the switch of holo- to apo-AcnB RNA under low iron (Fig. 7, top and middle panels). In contrast, the addition of citrate decreased the stability of *acnB* in a way similar to growth conditions in medium alone (Fig. 7). These data were consistent with the interpretation that the presence of citrate prevented the switch of holo- to apo-AcnB even under low Fe conditions.

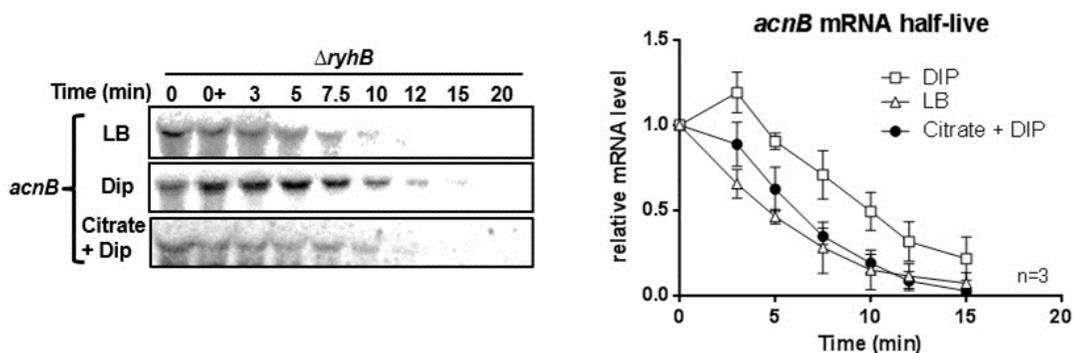


Figure 7. Addition of citrate, the AcnB substrate, abolishes *acnB* mRNA stabilisation. Northern blot of *acnB* mRNA half-life and corresponding densitometric curves of *acnB* mRNA are shown. Cells (EM1238) were grown in LB media to an OD₆₀₀ of 0.5 at which point citrate (30 mM final) or Dip (200 μM final) were added at indicated time. Thereafter rifampicin (250 μg/mL) was added at time 0 and RNA extraction was performed at the indicated times. Data are representative of two independent experiments performed in triplicates.

DISCUSSION

A common outcome of sRNAs binding to their target mRNAs is rapid RNase E-mediated cleavage of the targets. However, the RyhB-induced *acnB* mRNA degradation that has been previously reported (15,31) can be prevented when cells are grown under low iron conditions. Combined with previous studies, data presented here suggested that reduced intracellular iron promoted the switch of holo-AcnB to apo-AcnB with the resulting RNA-binding of *acnB* mRNA 3'UTR and protection against RyhB-induced mRNA degradation. According to the model proposed here, RyhB still binds to *acnB* RBS and partially blocks its translation initiation under low-iron conditions. However, bound apo-AcnB prevents RNase E access to *acnB* mRNA cleavage site (Fig. 8). Accordingly, this mechanism of regulation allows long-term expression homeostasis of AcnB as opposed to a significant stronger expression of AcnB in the absence of RyhB sRNA (Fig. 6A). Although RyhB partially blocked *acnB* translation (Figs. 4B and 6A, right), there was a steady production of AcnB (Fig. 6A, left). This seemingly paradoxical observation may be explained by the functional nature of AcnB. When cells grow under iron starvation, most RyhB targets become degraded. These degraded targets encode single-function enzymes, whose activity would falter in absence of sufficient amounts of iron as cofactor. In contrast, bi-functional AcnB switches functions despite low intracellular iron level. When it adopts its catalytic conformation, aconitase has an iron-independent metabolic function that participates to the TCA cycle. As an RNA-binding protein, apo-AcnB regulates expression of various transcripts such as *acnB* and *fisH* (3) despite environmental variations of iron concentrations and maintains steady expression of *acnB* that allows sufficient quantities of cellular AcnB to modulate both activities.

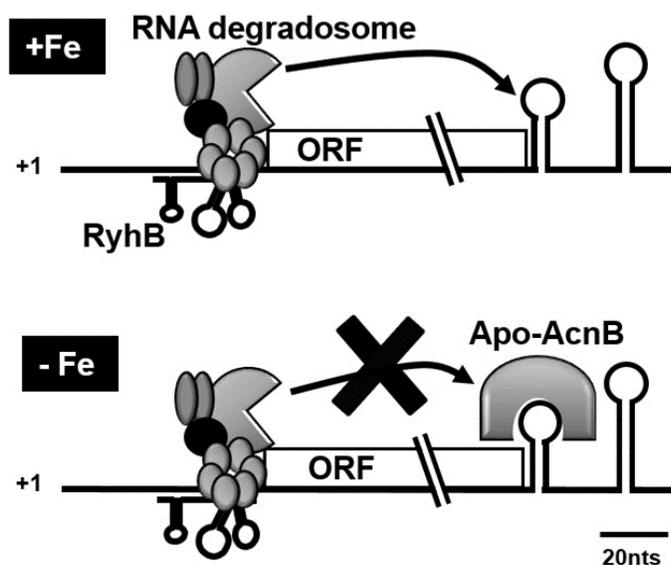


Figure 8. Working model of *acnB* mRNA double regulation by sRNA RyhB and RNA binding protein apo-AcnB (refer to the text for details).

The question may be raised concerning the reason why two effectors, a sRNA and a RNA-binding protein, would regulate *acnB* mRNA that results, in any case, in similar expression levels of AcnB? Whereas these findings suggest a robust homeostatic system operating in *E. coli*, the presence of citrate reduced *acnB* stability under iron starvation conditions (Fig. 7). These data suggest that citrate, the substrate of AcnB, can reduce the expression of *acnB* even under conditions of low iron. It can be suggested that the sensitivity to citrate may allow the system to sense and respond to metabolic changes. This possibility is especially relevant as citrate can also act as an iron chelator, helping the cell to cope with low iron conditions (39-40). Thus under growth conditions of low iron but high citrate, AcnB expression would be reduced (less apo-AcnB isoform) and iron acquisition would be increased in the presence of citrate. These growth conditions would favor activity of AcnB. In contrast, when both iron and citrate are low, there would be more AcnB in its apo-AcnB conformation, thus favoring its RNA-binding activity.

In terms of physiological significance, bacteria could benefit from a minimal synthesis of apo-AcnB protein. A proteomic study has indicated that SodA, GroEL, TrxB and DnaK proteins are modulated in *acnB* mutant strains and could be part of apo-AcnB regulon (2). Moreover, it has been reported that an *acnB* mutant of *Salmonella enteritica* serovar Typhimurium LT2 was impaired in binding to macrophage-like cell surface (3). In

Staphylococcus aureus, AcnB homolog (CitB) has been suggested to regulate various virulence factors such as toxin alpha, phospholipase C, serine protease and staphylococcal toxin C proteins (41). Although, it would be necessary to confirm any direct regulation of those potential mRNA targets, these reports suggest that apo-AcnB could be a broad regulator of virulence, Fe starvation, oxidative stress response and bacterial motility (3).

Another hallmark of the study reported here is that it is the first demonstration of a sRNA-induced RNase E mRNA cleavage close to the 3'UTR of the mRNA, some 2600 nts from the sRNA binding site. Although we have previously shown a distal sRNA-induced RNase E cleavage on *sodB* mRNA 350 nt away from the sRNA binding site, this is the longest distance observed between sites of sRNA pairing and induced cleavage on a target mRNA. Such a distal location suggests the importance of regulating *acnB* mRNA stability accordingly to the RNA binding ability of AcnB. A similar system has been identified with transcripts regulated by microRNA (miRNA) in eukaryotes (42). In general, miRNAs are post-transcriptional repressors that act together with a protein complex named miRNA-induced-silencing-complex (miRISC). The multimeric complex binds imperfect complementary sequences of 3'UTR mRNA to repress translation. Frequently, RNA degradation follows miRNA pairing by stimulating deadenylation and decapping events (43-45). However, there are some examples where RNA binding proteins antagonize miRNA silencing. One of them occurs in human hepatocarcinoma cells where amino acids starvation leads to HuR protein oligomerization and binding to 3'UTR, impeding miRNA pairing (46,47). Here, we present data that support a similar model in which RyhB-induced degradation is prevented by the RNA binding protein apo-AcnB.

A key point about the mechanism of protection against sRNA-induced *acnB* cleavage is the close proximity of AcnB binding and RNase E cleavage sites. Evidence for this interpretation was obtained by increasing the distance between both sites by inserting a 20 nt sequence, previously shown to resist RNase E cleavage. Results indicated that increasing the distance abolished the apo-AcnB protection when RyhB was expressed (Fig. 5D, *acnB*_{+20-3'UTR}). This finding was similar to a report in which *rpsO* stop codon was distanced from a nearby RNase E cleavage site located in the mRNA 3'UTR and that resulted in reduced cleavage protection by ribosomes (38). In spite of these findings, the possibility remained that introduction of a

20 nt sequence in the 3'UTR of *acnB* could prevent apo-AcnB binding, thus allowing cleavage. However, this possibility was excluded by performing RNA-IP of apo-AcnB. Data showed that similar levels of *acnB*_{+20-3'UTR} and WT *acnB* RNA were observed (Fig. S4C), suggesting that apo-AcnB to *acnB* exerted steric hindrance to RNase E degrading activity.

Auto-regulated proteins such as AcnB are common in bacterial housekeeping genes as observed in the case of many ribosomal proteins and tRNA regulators (48-51). For example, *rpmL-rplT* transcript is repressed when the second gene product, ribosomal protein L20, is overproduced. The binding of L20 protein to a pseudoknot located in *rpmL-rplT* 5'UTR blocks 30S ribosomal association with mRNA thereby preventing translation initiation (51,52). A similar case is ribosomal protein RpsO which binds structures in the 5'UTR of its own mRNA when it is overexpressed. Bound RpsO prevents translation initiation of *rpsO* mRNA, which becomes destabilized by exposed RNase E cleavage sites (38,53). These multiple levels of regulation/autoregulation of the same mRNA seem essential for highly regulated constitutive genes or global regulators.

Cellular adaptation to low iron growth remains a major stress for bacteria. When cells grow under low Fe conditions, many enzymes become virtually inactive in the absence of their iron cofactor. Under these stressful environmental conditions, these iron-dependent enzymes/proteins are repressed through sRNA-induced degradation of their mRNAs whereas in other cases some proteins/enzymes such as AcnB switch to a different functional form.

MATERIAL AND METHODS

Strains and plasmids

Strains and plasmids used in this study are listed in Table S1. The methods used to obtain all constructions are described in Supplemental experimental procedures. Derivatives of *E. coli* MG1655 were used in all experiments. *E. coli* expression strain BL21 (DE3) was used for overproduction and purification of AcnB_{3xFLAG} protein. DH5 α strain was used for routine cloning procedures. Cells were grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) medium with addition of antibiotics depending on plasmids used. In the case of cells carrying pFRA, pRS1551, pNM12, pBAD24 and pET-21b, ampicillin (final concentration, 50 μ g/mL) was added. Cells harboring pGD3 and pBAD33 plasmids were grown in presence of chloramphenicol (final concentration, 30 μ g/mL).

Beta-galactosidase assays

Kinetics assays for β -galactosidase activity were performed as described (54) using a SpectraMax 250 microtitre plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Briefly, overnight bacterial culture incubated at 37°C were diluted 1000-fold in 50 mL of fresh LB medium and grown under mechanical shaking at 37°C. Fe-starvation was induced by addition of a final concentration of 200 μ M of the Fe chelator Dip when cultures reached an OD₆₀₀ of 0.1. The formula V_{\max}/OD_{600} was used to calculate specific β -galactosidase activity. Results reported in this study correspond to a minimum of three independent experiments.

Western blot analysis

Cells were grown in LB media at 37°C. Appropriate inducer (arabinose or Dip) was added to cells at an OD₆₀₀ of 0.1. Proteins were harvested by precipitation with trichloroacetic acid (final concentration, 1% w/v) as described (55). Proteins were resuspended in protein loading gel electrophoresis buffer before loading on SDS-PAGE (7% acrylamide) and transferred on a nitrocellulose membrane. An anti-AcnB polyclonal antibody was used at a dilution of 1:5,000 (kind gift of Dr. Jeffrey E. Green, National Cancer Institute). The IRDye 800CW-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NB) was used at a dilution of 1:15,000 and revealed on an Odyssey Infrared Imaging System (Li-Cor Biosciences). Quantifications were carried out using the Odyssey Application Software.

RNA extraction and Northern blot analysis

Total RNA was extracted using the hot phenol procedure (56). Cells were grown to an OD₆₀₀ of 0.5 and 0.1% arabinose or 200 μM of Dip were added. Determination of RNA half-life was performed by addition of 250 μg/mL rifampicin to the culture before total RNA extraction. In the case of *acnB* Northern blots, 40 μg of total RNA were loaded on an agarose gel (1% agarose in MOPS buffer). In the case of RyhB sRNA and *sodB*_{130-*acnB*+67} construct Northern blots, 5 and 15 μg respectively of total RNA were loaded on 4% polyacrylamide gel (acrylamide 29:1, 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 performed as described (55). 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).

RNA immunoprecipitation

Cells carrying plasmids pBAD24-*acnB* and pBAD24-*acnB*-3xFLAG (see Supplemental Material for details) were grown in LB media to an OD₆₀₀ of 0.1, at which point both AcnB_{3xFLAG} and AcnB were induced by adding arabinose (final concentration of 0.1%). When the culture reached an OD₆₀₀ of 0.5, Dip (200 μM final) was added to induce RyhB for 10 min. The culture was then chilled on ice for 20 min to stop growth. Cells were then centrifuged and suspended in binding buffer (20 mM Tris HCl, 0.25 M KCl, 5 mM MgCl₂, 10% glycerol, 0.1% Tween 20, pH 8.0) (1 mL). After another centrifugation, cells were suspended in 2 mL of binding buffer and lysed using a French press (800 psi, 3 times). The lysate was then cleared by centrifugation (17,000 x g, 30 min, 4 °C) and proteins were quantified. At this point, 20 μL of soluble fraction were mixed with the same volume of protein sample buffer and 80 μL of the same fraction were used for total RNA extraction (input). The remaining soluble fraction (0.8 mL) was incubated with Anti-FLAG M2 Affinity gel (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) for 2 h on a rotating platform (all steps performed at 4°C). The suspension was centrifuged and the beads were washed twice with TBS (500 μL each). The beads were then suspended in TBS (100 μL) and FLAG-peptide (Sigma-Aldrich, 15 μg) was added. Eluted RNAs were then subjected to phenol-chloroform extraction, followed by

precipitation (2.5 vol. ethanol supplemented by 20 µg of glycogen) of the aqueous phase. Proteins were isolated from the organic phase by acetone precipitation. RNA samples were analysed by quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) (for *acnB*₂₇₄₉, *acnB*_{2749-Δstem}, *acnB*_{2749-stem}, *acnB*_{+20-3'UTR} constructs) or by Northern blot (endogenous *acnB*). qRT-PCR reactions were performed four times on a Rotor-Gene 3000 device (Corbett Life Science, Concorde, NSW) with Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) (29). Protein samples were analysed by Western blots.

In vitro RNA synthesis and radiolabelling

Oligonucleotides used to generate DNA template for in vitro transcription are listed in Supplemental Table S3. T7 RNA polymerase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) was used for radiolabeled probe transcription for Northern blot analysis. Antisense transcript of genes of interest were generated with a published method (55). A published protocol (22) was used for transcription of RNA used in secondary structure probing, RNase E degradation assays and toeprinting assays. ³²P-pCp 3'end radiolabelling was carried out as described (33) and 5'-³²P-end radiolabelling were done as published (55).

RNA degradosome degradation assays

Experimental procedure for RNase E cleavage sites characterization on ³²P-pCp 3'end radiolabeled RNA transcripts has been performed as described (33). RNase E-FLAG was purified as published (33).

Aconitase B purification

Purified AcnB_{3xFLAG} were prepared as described (33), with some modifications. *E. coli* (BL21 [DE3] pLysS/pET21b-*acnB-3xFLAG*) culture was grown in LB medium (2 L) containing ampicillin (50 µg/mL) and chloramphenicol (30 µg/mL) at 30 °C, until it reached an OD₆₀₀ between 0.5 and 0.6. During growth, DIP was added (final concentration of 200 µM) when the culture had reached an OD₆₀₀ of 0.1. Expression of AcnB_{3xFLAG} was induced with IPTG (1 mM) for 3 h at 30 °C. An additional FPLC exclusion purification (G200) was performed using modified Ip buffer (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, glycerol 5% and EDTA 1 mM, pH 7.4). Purified apo-AcnB_{3xFLAG} was used in all relevant experiments.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Karine Prévost, Phillippe Balthazar and Marie-Claude Carrier for excellent technical assistance. We thank Jeffrey E. Green (National Cancer Institute) for a gift of anti-aconitase B polyclonal antibody. We acknowledge all members of the laboratory for useful comments and discussions. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to EM. JAMB holds a PhD studentship from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada. EM is a Senior Scholar of the Fonds de Recherche du Québec - Santé (FRQS).

REFERENCES:

1. Cunningham, L., Gruer, M.J. and Guest, J.R. (1997) Transcriptional regulation of the aconitase genes (*acnA* and *acnB*) of *Escherichia coli*. *Microbiology*, **143**, 3795-3805.
2. Tang, Y., Quail, M.A., Artymiuk, P.J., Guest, J.R. and Green, J. (2002) *Escherichia coli* aconitases and oxidative stress: post-transcriptional regulation of *sodA* expression. *Microbiology*, **148**, 1027-1037.
3. Tang, Y., Guest, J.R., Artymiuk, P.J., Read, R.C. and Green, J. (2004) Post-transcriptional regulation of bacterial motility by aconitase proteins. *Molecular microbiology*, **51**, 1817-1826.
4. Varghese, S., Tang, Y. and Imlay, J.A. (2003) Contrasting sensitivities of *Escherichia coli* aconitases A and B to oxidation and iron depletion. *Journal of bacteriology*, **185**, 221-230.
5. Tang, Y. and Guest, J.R. (1999) Direct evidence for mRNA binding and post-transcriptional regulation by *Escherichia coli* aconitases. *Microbiology*, **145**, 3069-3079.
6. Hentze, M.W. and Argos, P. (1991) Homology between IRE-BP, a regulatory RNA-binding protein, aconitase, and isopropylmalate isomerase. *Nucleic acids research*, **19**, 1739-1740.
7. Rouault, T.A., Stout, C.D., Kaptain, S., Harford, J.B. and Klausner, R.D. (1991) Structural relationship between an iron-regulated RNA-binding protein (IRE-BP) and aconitase: functional implications. *Cell*, **64**, 881-883.
8. Kennedy, M.C., Mende-Mueller, L., Blondin, G.A. and Beinert, H. (1992) Purification and characterization of cytosolic aconitase from beef liver and its relationship to the iron-responsive element binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **89**, 11730-11734.
9. Haile, D.J., Rouault, T.A., Tang, C.K., Chin, J., Harford, J.B. and Klausner, R.D. (1992) Reciprocal control of RNA-binding and aconitase activity in the regulation of the iron-responsive element binding protein: role of the iron-sulfur cluster. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **89**, 7536-7540.
10. Castro, L.A., Robalinho, R.L., Cayota, A., Meneghini, R. and Radi, R. (1998) Nitric oxide and peroxynitrite-dependent aconitase inactivation and iron-regulatory protein-1 activation in mammalian fibroblasts. *Archives of biochemistry and biophysics*, **359**, 215-224.
11. Hentze, M.W. and Kühn, L.C. (1996) Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93**, 8175-8182.
12. Wang, J. and Pantopoulos, K. (2011) Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem. J*, **434**, 365-381.
13. Rouault, T.A. (2006) The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nature chemical biology*, **2**, 406-414.
14. Address, K.J., Basilion, J.P., Klausner, R.D., Rouault, T.A. and Pardi, A. (1997) Structure and dynamics of the iron responsive element RNA: implications for binding of the RNA by iron regulatory binding proteins. *Journal of molecular biology*, **274**, 72-83.
15. Masse, E. and Gottesman, S. (2002) A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 4620-4625.
16. Gottesman, S. and Storz, G. (2011) Bacterial small RNA regulators: versatile roles and rapidly evolving variations. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **3**, a003798.
17. Waters, L.S. and Storz, G. (2009) Regulatory RNAs in bacteria. *Cell*, **136**, 615-628.

53. Philippe, C., Eyermann, F., Benard, L., Portier, C., Ehresmann, B. and Ehresmann, C. (1993) Ribosomal protein S15 from *Escherichia coli* modulates its own translation by trapping the ribosome on the mRNA initiation loading site. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **90**, 4394-4398.
54. 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. *Molecular microbiology*, **64**, 1260-1273.
55. Desnoyers, G., Morissette, A., Prevost, K. and Masse, E. (2009) Small RNA-induced differential degradation of the polycistronic mRNA *iscRSUA*. *The EMBO journal*, **28**, 1551-1561.
56. Aiba, H., Adhya, S. and de Crombrugghe, B. (1981) Evidence for two functional *gal* promoters in intact *Escherichia coli* cells. *Journal of Biological Chemistry*, **256**, 11905-11910.
57. Tjaden, B., Goodwin, S.S., Opdyke, J.A., Guillier, M., Fu, D.X., Gottesman, S. and Storz, G. (2006) Target prediction for small, noncoding RNAs in bacteria. *Nucleic acids research*, **34**, 2791-2802.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

The iron-sensing aconitase B binds its own mRNA to prevent sRNA-induced mRNA
cleavage

Julie-Anna M. Benjamin and Eric Massé*

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

*Corresponding author. Department of Biochemistry, University of Sherbrooke, 3201 Jean-
Mignault Street, Sherbrooke, Qc, J1E 4K8, Canada

Phone ; E-mail

This File includes

Supplemental Material and Methods

Supplementary Tables S1 to S3

Supplementary References

Supplementary Material and Methods

Strain and plasmids

Derivatives of *E. coli* MG1655 were used in all experiments. DH5 α strain was used for routine cloning procedures. Construction of *acnB*₁₁₇-*lacZ*, *sodB-lacZ* and *ryhB-lacZ* (EM487-EM488) transcriptional fusions was constructed as described in Mitarai *et al.* (1).

To construct the AcnB₂₆₈₈-LacZ translational fusion, a PCR product obtained with oligonucleotides EM531 and EM549 was digested with *Bam*HI and ligated into *Bam*HI-digested pRS1551 (creating an in-frame translational fusion with *lacZ*). This fusion was then delivered as a single copy into the chromosome of different strains (see table S1) at the λ *attI* site, as described previously (2). Stable lysogens were screened for single insertion of recombinant λ by PCR (3).

To construct the *acnB*₂₇₄₉-*lacZ* transcriptional fusion, a PCR product was generated with oligonucleotides EM531 and EM1557 and then digested with *Bam*HI and ligated into *Bam*HI-digested pFR Δ vector. To generate mutated versions of *acnB*₂₇₄₉-*lacZ*, a PCR reaction was performed using *acnB*₂₇₄₉ PCR product as the DNA template with the following oligonucleotides: *acnB*_{2749- Δ stem (EM531-EM1956), *acnB*_{2749-stem} (EM531-EM2004) and *acnB*_{CC-stop-GCC} (EM531-EM1821). For *acnB*_{+20-3'UTR} construct, a two-step PCR strategy was used. While the first PCR was performed with oligonucleotides EM531-EM1958, the second step was performed by using EM531-EM1959. The *acnB*_{+20-GCC} construct was obtained by performing a PCR reaction with oligonucleotides EM531-EM2057 followed by another amplification reaction with oligonucleotides EM531 and EM2058. The resulting PCR product was then digested with *Bam*HI and ligated into *Bam*HI-digested pFR Δ . The cloning strategy used to generate plasmids pBAD33-*acnB*₂₇₄₉, pBAD33-*acnB*_{2749 Δ stem}, pBAD33-*acnB*_{2749-stem} and pBAD33-*acnB*_{+20-3'UTR} was to ligate appropriate *Bam*HI digested products into appropriately digested PBAD33. Those plasmids were transformed into appropriate strains before performing experiments.}

To construct *sodB*₁₃₀-*acnB*_{3'}, a three-step PCR strategy was performed. A first PCR product (*sodB*₁₃₀) was obtained by using oligonucleotides EM423-EM424 and *E. coli* genomic DNA. Then a second PCR was performed with oligonucleotides EM423-EM1957 on the previous *sodB*₁₃₀ PCR product as template. A third PCR product was obtained by amplifying the

previous PCR product with EM423 and EM1939. Finally, the PCR product was digested with *EcoRI* and *BamHI* and then ligated into *EcoRI/BamHI*-digested pFRΔ. The resulting transcriptional fusion was delivered as a single copy into the chromosome as described previously.

The plasmid pBAD24-*acnB* was generated by PCR reactions using oligonucleotides EM1695-EM1258 to produce a promoter-less *acnB* fragment. The resulting PCR product was digested with *BamHI/PstI* and ligated into *BamHI/PstI*-digested pBAD24. To construct the pBAD24-*acnB*_{3xFLAG} plasmid, PCR reactions using the following oligonucleotides (EM1689-EM1747 and EM1695-EM549) were used to generate two PCR products. Following this, both products were mixed and amplified with oligonucleotides EM1695-EM1748 to generate *acnB*_{3xFLAG}. Then, the final PCR was digested *BamHI* and ligated into *BamHI*-digested pBAD24.

Plasmid pET21b-*acnB*_{FLAG} was produced by a two-step PCR reaction to generate a promoter-less *acnB* fragment using oligonucleotides EM1259-EM1260, which then served as template for a second PCR reaction with oligonucleotides EM1259-EM1261. The final PCR product was digested with *NdeI/XhoI* and ligated into pET21b.

Plasmid pGD3 is a pBAD33 derivative (4) that has been mutagenized to insert a *XhoI* site at the -6 to -1 region of the +1 transcription start site (see (5) for details) (5). pGD3-*ryhB* was generated by a PCR reaction producing a promoter-less *ryhB* DNA fragment with a *XhoI* site upstream and an *EcoRI* site downstream (oligonucleotides EM1572-EM455). The PCR product was digested with *XhoI* and *EcoRI* and ligated into *XhoI/EcoRI*-digested pGD3.

RNA secondary structure probing

In line probing was performed as described previously (6). γ -5'-³²P-end labelled *acnB*₁₇₇ RNA (final concentration of 0.1 μ M) was incubated with 1 μ M or 2 μ M RyhB RNA. The *acnB*₁₇₇ and RyhB RNA were produced using T7 RNA polymerase from a PCR product (see Table S3 for oligonucleotides). Ribonucleases T1 (0.1 U) (Ambion) and TA (2.5 U) (Jena Biosciences) were used for 5 min at 37°C in sequencing buffer (Ambion). Alkaline ladder was generated in alkaline buffer (Ambion) for 5 min at 90°C.

Table S2 (afterpart)

Oligo number	Sequence 5'-3'
EM1689	GACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGATAT CGACTACAAAGATGACGACGATAAATAGTAAGTGTAGGCTG GAGCTGCT
EM1695	GCTAGGGATCCTGCGGTACTGGGCATTTACCC
EM1744	GCTAGGGATCCTGCGGTACTGGGCATTTACCC
EM1747	CGCAGTCTGGAAAATCACCCGACTACAAAGACCATGACGGT G
EM1748	GCTAGGGATCCTTACTATTTATCGTCGTCATCTTTG
EM1767	CTCTACAAGTGCGGCCATTTGGTT
EM1821	GCTAGGGATCCGGCATTGTGTCGTTTATGCGCAGCGCGTGCG CTGACGGCTTAGGCCGCGAGTCTGGAAAATCAC
EM1939	GCTAGGGATCCGTGATTTTCCAGACTGCGGTTTAAAAAGTCA GCGCACGCGCTGCGCATAAACGACACAATGCCCGGTGAATG AGATTCCCGGGCATTTTTTTTATTTTCGAATTCAGTCAG
EM1956	GCTAGGGATCCGAATCTCATTACCGGGCATTGTGTCGTTTA TGCGGTGCGCGTGCGCTGACTTTTTTAAACCGCAG
EM1957	CCGCAGTCTGGAAAATCACCTCGATGGTTTCCGCAGAAATGT G
EM1958	GTGATTTTCCAGACTGCGGTTTAAAAAGCGUCGCUAAUUCU UGCCAGGTCAGCGCACGCGCTGCG
EM1959	GCTAGGGATCCGAAATAAAAAAATGCCCGGGAATC
EM2004	GCTAGGGATCCGAATCTCATTACCGGGCATTGTGTCGTTTA TGCGGTGCGCGTGCGCACACTTTTTTAAACCGCAG
EM2057	CTGGCAAGAATTAGCGACGCGGCTTAGGCCGCGAGTCTGGAA AATC
EM2058	GCTAGGGATCCGGAATCTCATTACCGGGCATTGTGTCGTTT ATGCGCAGCGCGTGCGCTGACCTGGCAAGAATTAGCGACGC

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.

Final product	Oligonucleotides	DNA template
<i>acnB</i> (Northern probe)	EM140 - EM141	Genomic DNA
RyhB (Northern probe)	EM88 - EM89	Genomic DNA
<i>sodB</i> (Northern probe)	EM188 - EM189	Genomic DNA
<i>sodA</i> (Northern probe)	EM305 - EM306	Genomic DNA
<i>hns</i> (Northern probe)	EM411 - EM412	Genomic DNA
16S rRNA (Northern probe)	EM293 - EM294	Genomic DNA
<i>acnB</i> ₁₇₇ (5'end) (PbAc probing/ toeprinting)	EM125 – EM1767	Genomic DNA
<i>acnB</i> (3'end) (Footprint/ degradation assay)	EM1578 – EM1596	Genomic DNA or pFrΔ- <i>acnB</i> _{CC-stop-GCC}
RyhB (PbAc probing/toeprinting)	EM88-EM89	Genomic DNA
DsrA (PbAc probing/toeprinting)	EM635-EM636	Genomic DNA
<i>acnB</i> (qRT-PCR)	EM247-EM1573	Genomic DNA

SUPPLEMENTARY REFERENCES

1. Mitarai, N., Benjamin, J.A., Krishna, S., Semsey, S., Csiszovszki, Z., Masse, E. and Sneppen, K. (2009) Dynamic features of gene expression control by small regulatory RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 10655-10659.
2. Simons, R., Houman, F. and Kleckner, N. (1987) Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene*, **53**, 85-96.
3. Powell, B.S., Rivas, M., Court, D., Nakamura, Y. and Turnbough Jr, C. (1994) Rapid confirmation of single copy lambda prophage integration by PCR. *Nucleic acids research*, **22**, 5765.
4. Guzman, L.-M., Belin, D., Carson, M.J. and Beckwith, J. (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *Journal of bacteriology*, **177**, 4121-4130.
5. Desnoyers, G. and Massé, E. (2012) Noncanonical repression of translation initiation through small RNA recruitment of the RNA chaperone Hfq. *Genes & development*, **26**, 726-739.
6. Regulski, E.E. and Breaker, R.R. (2008), *Post-Transcriptional Gene Regulation*. Springer, pp. 53-67.
7. Morita, M.T., Tanaka, Y., Kodama, T.S., Kyogoku, Y., Yanagi, H. and Yura, T. (1999) Translational induction of heat shock transcription factor ζ 32: evidence for a built-in RNA thermosensor. *Genes & development*, **13**, 655-665.
8. 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. *Molecular microbiology*, **64**, 1260-1273.
9. Masse, E. and Gottesman, S. (2002) A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 4620-4625.
10. Prevost, K., Desnoyers, G., Jacques, J.F., Lavoie, F. and Masse, E. (2011) Small RNA-induced mRNA degradation achieved through both translation block and activated cleavage. *Genes & development*, **25**, 385-396.
11. Desnoyers, G., Morissette, A., Prevost, K. and Masse, E. (2009) Small RNA-induced differential degradation of the polycistronic mRNA iscRSUA. *The EMBO journal*, **28**, 1551-1561.
12. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**, 12462-12467.
13. Masse, E., Escorcia, F.E. and Gottesman, S. (2003) Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in Escherichia coli. *Genes & development*, **17**, 2374-2383.
14. Repoila, F. and Gottesman, S. (2001) Signal transduction cascade for regulation of RpoS: temperature regulation of DsrA. *Journal of bacteriology*, **183**, 4012-4023.

CHAPITRE 4

L'ARNm encodant la glutathione monothiol est régulé selon la condition en Fe par la protéine aconitase B et le sRNA RyhB

Auteurs de l'article: Julie-Anna M. Benjamin et Eric Massé*

Département de Biochimie, Groupe ARN, Université de Sherbrooke, Sherbrooke,
Québec, Canada.

Statut de l'article: Non-publié

Avant-propos: J'ai effectué toutes les expériences présentées dans cet article. J'ai aussi entièrement écrit l'article.

RÉSUMÉ

Les sRNA régulent leurs cibles selon plusieurs mécanismes, soit en bloquant l'initiation de la traduction, en déstabilisant l'ARNm ou en activant la traduction de sa cible. Le sRNA RyhB, exprimé en carence de Fe, régule négativement plusieurs cibles ARNm (environ 20 ARNm) en s'appariant au SLR de ces cibles et en recrutant le dégradosome ARN, et induit parfois un clivage dans l'ARNm, activant sa dégradation (Massé *et al.*, 2003; Massé *et al.*, 2005). Ce clivage de la RNase E, essentiel pour initier la dégradation active de la cible, se situerait, pour plusieurs cibles ARNm, à distance du site d'appariement du sRNA (Prévost *et al.*, 2011).

Cependant, une étude récente montrait que la dégradation induite par les sRNA n'est pas toujours infaillible. En effet, l'ARNm *acnB*, démontré pour être régulé de manière différentielle selon la condition en Fe, est dégradé activement par RyhB dans un milieu riche, alors qu'il est stabilisé par dans un milieu carencé pour cet élément (chapitre 3, Benjamin *et al.*, 2014). En effet, la liaison de l'apo-AcnB sur une tige-boucle dans le 3'-UTR de l'ARNm prévient le clivage de la RNase E. Le passage de la protéine AcnB de la forme catalytique (holo) à la forme régulatrice liant les ARN (apo) en carence de Fe expliquerait cette modulation dans la régulation.

L'ARNm *grxD*, cible du sRNA RyhB, semble être régulé par un mécanisme similaire à celui d'*acnB*. Dans cette étude, l'ARNm *grxD*, encodant la glutathione monothiol 4, a été confirmé comme étant une cible de RyhB *in vivo*. De plus, il a été montré comme étant stabilisé de manière post-transcriptionnelle en carence de Fe et ce, de façon dépendante à l'expression de la protéine AcnB. Un site de clivage limitant pour l'induction de la dégradation par RyhB a été identifié dans le 3'-UTR de l'ARNm, à proximité d'une tige-boucle prédite pour être le site d'attachement de l'apo-AcnB. Ainsi, cette étude présente la deuxième cible de RyhB étant régulée de manière différentielle selon la condition en Fe de la cellule, suggérant une plus grande prévalence de ce type de régulation.

**L'ARNm encodant la glutathione monothiol est régulé selon la condition en Fe par la protéine
aconitase B et le sRNA RyhB**

Julie-Anna M. Benjamin et Eric Massé*

Département de Biochimie, Groupe ARN, Université de Sherbrooke, Sherbrooke,
Québec, Canada.

20 019 caractères

Mots clés: aconitase B; RyhB; petitARN régulateur; ARNm *grxD*, protéine liant l'ARN; traduction; RNase E; dégradosome ARN; dégradation de l'ARNm

RÉSULTATS

Démonstration de la régulation directe *in vivo* de l'ARNm cible *grxD* par RyhB

Les premières évidences d'une régulation de l'ARNm *grxD* (*ydhD*) par le sRNA RyhB ont été révélées dans une étude de micropuce à ADN qui montrait que l'expression de *grxD* diminuait de 60% lorsque RyhB était surexprimé (Massé *et al.* 2005). Déjà, ces résultats suggéraient une régulation dépendante du Fe, puisque l'ajout de Fe dans le milieu (50 μ M FeSO₄) diminuait la régulation observée, sans que celle-ci ne soit Fur dépendant. Puis, des résultats obtenus dans le laboratoire par purification d'affinité de RyhB suivi d'un séquençage des ARN à haut débit (RNaseq), ont permis de montrer un enrichissement de l'ARNm *grxD* des plus importants parmi les cibles de RyhB (non publié) (voir Desnoyers *et al.*, 2012 pour la technique de purification d'affinité).

L'appariement de RyhB avec l'ARNm *grxD* a été prédit *in silico* par le logiciel TargetRNA2 (Figure 1A) et confirmé par la technique de probing *in vitro* au Pb²⁺ (Figure non présentée) (Tjaden *et al.*, 2006). Par ces deux techniques, une protection par RyhB des nucléotides 50 à 57 et 63 à 68 a été trouvée, régions correspondant au SLR de l'ARNm. Puis, afin de confirmer l'importance de l'interaction *in vivo*, un mutant d'appariement de RyhB avec le SLR de *grxD* a été conçu, appelé mutant RyhB_{MUTgrx} (nt en vert, Fig. 1A). L'appariement sRNA-ARNm étant interrompu, le mutant RyhB_{MUTgrx}, contrairement au RyhB de type sauvage, est prédit pour ne plus arriver à réguler l'ARNm *grxD* (Fig. 1B).

Dans le but de vérifier cette hypothèse *in vivo*, des buvardages Northern, comparant la dynamique de répression de la cible suite à l'expression du sRNA de type sauvage ou du mutant d'appariement RyhB_{MUTgrx}, ont été effectués (Fig. 1B). Lorsque RyhB de type sauvage est exprimé, le premier buvardage Northern de la figure 1B montre une dégradation rapide de l'ARNm *grxD* à partir du temps 5 min (comparer lignes 1 et 3). À l'inverse, l'expression du sRNA mutant RyhB_{MUTgrx} ne semble pas affecter la stabilité de l'ARNm *grxD*, le niveau étant toujours constant après 20 min d'expression du sRNA (comparer lignes 9 à 16). La dynamique du mutant RyhB_{MUTgrx} est comparable au contrôle négatif sans RyhB (voir lignes 17 à 24) (Fig. 1B). Ces résultats suggèrent que RyhB s'apparie de manière directe à la cible ARNm *grxD* *in vivo*, pour ensuite induire sa dégradation.

Puis, pour déterminer l'effet de répression traductionnelle de RyhB suite à son appariement au SLR de *grxD*, une fusion traductionnelle courte de la cible ARNm a été construite (GrxD₄₈-LacZ). L'essai β -galactosidase montre que l'expression de RyhB dans un milieu riche (LB) cause une répression de 45% de l'activité spécifique par rapport au contrôle sans RyhB (Fig. 1C). À l'inverse, l'expression du mutant d'appariement RyhB_{MUT_{grx}} n'entraîne aucune diminution de l'activité β -galactosidase, confirmant la spécificité de la répression de la traduction par RyhB (Fig. 1C). Ces résultats suggèrent que, dans des conditions riches, le mécanisme de régulation de *grxD* par RyhB débiterait par la liaison du sRNA au SLR, inhibant directement l'initiation de la traduction de la cible (essais β -galactosidase, Fig. 1C). Puis, l'ARNm serait déstabilisé activement par RyhB, menant à sa dégradation rapide (buvardage Northern, Fig. 1B).

La dégradation de la glutathione monothiol est dépendante de la condition en Fe

Typiquement, la confirmation de la régulation de cibles ARNm par un sRNA s'est faite en surexprimant celui-ci et en observant son effet sur les cibles potentielles. Plus récemment, des techniques avancées d'analyse ont permis d'observer l'effet d'un sRNA sur le transcriptome (par micropuce à ADN ou séquençage à haut débit) dans diverses conditions métaboliques (Massé *et al.*, 2005; Udekwu *et al.*, 2005). Souvent, ces expériences ont été réalisées uniquement dans un milieu riche, ce qui est une condition différente de celles permettant l'expression physiologique de la majorité des sRNA. Ce faisant, cela pourrait mener à négliger des variations dans la régulation de certaines cibles ou causer de faux positifs.

Le sRNA RyhB, régulateur de l'homéostasie du Fe, ne fait pas exception à cette règle. Toutefois, comme la condition en Fe joue sur l'activité de régulateurs de plusieurs types, telles les protéines Fur ou aconitase B, il semblait aussi important d'étudier la régulation de la cible ARNm *grxD* par RyhB dans un milieu carencé en Fe (Salvail et Massé, 2012; Benjamin *et al.*, 2014).

Dans les conditions de croissance en milieu riche, la protéine aconitase B passe de la forme catalytique impliquée dans le cycle du citrate (holo-AcnB), à la forme agissant comme régulateur post-transcriptionnel lors d'une carence en Fe (apo-AcnB) (Tang *et al.*, 1999, Varghese *et al.*, 2003). Précédemment, il a été démontré que l'apo-AcnB stabilisait son propre ARNm dans des conditions pauvres en Fe, contrant la dégradation induite par RyhB (Tang et Guest, 1999; Benjamin et Massé, 2014). Ainsi, l'hypothèse selon laquelle l'ARNm *grxD* pouvait être régulé de manière similaire, soit par l'apo-AcnB en fonction de la condition en Fe, a été investiguée.

En plus, il est intéressant d'observer, dans la condition avec le chélateur Dip, une augmentation d'environ 2 fois du niveau d'ARNm *grxD* sur le buvardage Northern contrôle sans RyhB, (Fig. 2B, lignes 16 à 20). Cet effet corrèle avec l'hypothèse qu'un régulateur stabiliserait l'ARNm dans cette condition au niveau post-transcriptionnel. À l'inverse, si seule l'arabinose est ajoutée dans le milieu riche (Δ *ryhB*), il n'y a pas d'augmentation remarquable du niveau d'ARNm *grxD* (Fig. 2B, lignes 11-15). Ce contrôle suggère que la stabilisation de l'ARNm est dépendante de la condition en Fe de la cellule.

L'ARNm *grxD* est stabilisé au niveau post-transcriptionnel par la protéine apo-AcnB

Dans l'intention de confirmer si l'ARNm *grxD* est stabilisé au niveau post-transcriptionnel en carence de Fe, des essais de demi-vie de l'ARNm *grxD* ont d'abord été réalisés (Fig. 3A et B). Comme le montre le buvardage Northern de la figure 3A, la demi-vie de l'ARNm *grxD* est légèrement plus longue suite à l'ajout de Dip (7,5 min) que dans une condition en milieu riche sans Dip (5 min). Le graphique de la figure 3B présente la densitométrie relative moyenne de trois expériences faites dans les deux mêmes conditions montrées en (A). Le calcul de la demi-vie a été réalisé à partir de ces données. Cette stabilisation de l'ARNm *grxD* en carence de Fe corrèle avec une régulation post-transcriptionnelle, possiblement effectuée par l'intermédiaire d'apo-AcnB. Une expérience additionnelle a été réalisée dans le but de soutenir cette dernière hypothèse.

Le résultat de la figure 3C a pour objectif de déterminer si la régulation de *grxD* par RyhB en carence de Fe est modulée par la protéine apo-AcnB. Pour ce faire, un buvardage Northern de la dynamique de régulation de *grxD* a été réalisé dans un mutant *acnB* et comparé à un double mutant *acnB ryhB*. La première condition a permis d'observer une déstabilisation de l'ARNm *grxD* par RyhB ($\Delta acnB$) (Fig. 3C, lignes 1 à 5). À l'inverse, un buvardage Northern exprimant AcnB dans les mêmes conditions (carence de Fe) montrait que le sRNA n'arrivait pas à déstabiliser cet ARNm cible (Fig. 2A, lignes 6 à 10). Dans le cas du double mutant, il est intéressant d'observer qu'il n'y a aucune augmentation remarquable du niveau d'ARNm *grxD* (lignes 6 à 10). À l'opposé, le buvardage Northern de la figure 2B (lignes 16 à 20) montrait une accumulation de plus de 2 fois du niveau de transcrits dans une souche exprimant l'aconitase B. Il semble que l'accumulation de l'ARNm *grxD* soit reliée à l'expression d'AcnB et ce, sous sa forme apo, retrouvée en carence de Fe. En conclusion, les résultats ci-haut corrélaient avec une stabilisation de l'ARNm *grxD* par l'apo-AcnB, mais pour mieux appuyer cette hypothèse des analyses d'immunoprécipitation de l'ARN (RNA-IP) ont été réalisées.

Le site de clivage dans le 3'-UTR de *grxD* est nécessaire à l'initiation de la dégradation par RyhB *in vivo*

Dans l'intention d'entériner l'hypothèse stipulant que le site de clivage de la RNase E, identifié dans le 3'-UTR, est essentiel pour la régulation de *grxD* par RyhB, des essais *in vivo* ont été réalisés. Pour ce faire, des constructions de *grxD* incluant ou non le 3'-UTR ont été étudié par buvardage Northern avec l'objectif de caractériser l'impact de cette région dans l'induction de la dégradation de *grxD* par le sRNA RyhB (Fig. 6).

La figure 6A présente le buvardage Northern de la fusion lacZ *grxD_{court}* (339 nt à partir du +1 transcriptionnel, voir schéma Fig. 5C). La cinétique a d'abord été faite dans un milieu riche, où AcnB se trouve sous la forme holo. Sur ce buvardage Northern, on peut voir que *grxD_{court}* n'est pas dégradé suite à l'induction de RyhB, alors qu'en comparaison, *grxD* endogène est dégradé rapidement (Figure 6A, lignes 1 vs 5). Le graphique en (B) présente la densitométrie du buvardage Northern montré en (A), représentatif de 3 expériences, et permet de mettre en évidence le peu de variation dans les niveaux de *grxD* entre les 2 conditions (avec et sans RyhB).

Dans le cas de la fusion *grxD_{long}* (372 nt à partir du +1 transcriptionnel, voir schéma Fig. 5C), on retrouve la dégradation induite par RyhB (Fig. 6C et D, lignes 11 vs 15), comparable à l'endogène. Ainsi, l'ajout d'une partie du 3'-UTR dans la construction *grxD_{long}*, incluant le site de clivage de la RNase E déterminé *in vitro*, permet de rétablir la régulation négative de RyhB. Comme dans le cas de *grxD_{court}*, le graphique représentant la densitométrie relative met en évidence la diminution de plus de la moitié (-60%) dans la condition exprimant RyhB par rapport au contrôle. Ce retour de la dégradation atteste de l'importance du site de clivage, cartographié dans le 3'-UTR *in vitro*, dans l'induction de la dégradation de *grxD* par RyhB *in vivo*.

- 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. *Molecular microbiology* (64), 1260-73.
- Powell, B.S., Rivas, M., Court, D., Nakamura, Y. and Turnbough Jr, C. (1994). Rapid confirmation of single copy lambda prophage integration by PCR. *Nucleic acids research* (22), 5765.
- Salvail, H., and Massé, E. (2012). Regulating iron storage and metabolism with RNA: an overview of posttranscriptional controls of intracellular iron homeostasis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* (3), 26-36.
- Simons, R., Houman, F. and Kleckner, N. (1987) Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* (53), 85-96.
- Tang, Y. and Guest, J.R. (1999) Direct evidence for mRNA binding and post-transcriptional regulation by Escherichia coli aconitases. *Microbiology* (145), 3069-79.
- Tang, Y., Quail, M.A., Artymiuk, P.J., Guest, J.R., and Green, J. (2002). Escherichia coli aconitases and oxidative stress: post-transcriptional regulation of sodA expression. *Microbiology* (148), 1027-37.
- Tjaden, J., Goodwin, S., Opdyke, J.A., Guillier, M., Fu, D.X., Gottesman, S., and Storz, G. (2006). Target prediction for small, noncoding RNAs in bacteria. *Nucleic Acids Research* (34), 2791-02.
- Udekwi, K.I., Darfeuille, F. Vogel, J., Reimegard, J., Holmqvist, E., and Wagner, E.G.H. (2005). Hfq-dependent regulation of OmpA synthesis is mediated by an antisense RNA. *Genes and Development* (19), 2355-66.
- Varghese, S., Tang, Y. and Imlay, J.A. (2003) Contrasting sensitivities of Escherichia coli aconitases A and B to oxidation and iron depletion. *Journal of bacteriology* (185), 221-30.

CHAPITRE 5 : DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Depuis la découverte du petit ARN (MicF) en 1984 et la reconnaissance de sa fonction antisens, de plus en plus de sRNA ont été identifiés et caractérisés chez un grand nombre de bactéries. Les mécanismes de régulation par les petits ARN procaryotes (sRNA) et eucaryotes (microARN) divergent quant aux mécanismes moléculaires qu'ils utilisent, mais il a été démontré que tous deux agissaient soit en bloquant la traduction, soit en entraînant la dégradation des ARNm ciblés.

Une grande proportion des modes de régulation utilisés par ces sRNA procaryotes correspondent aux mécanismes canoniques de régulation discutés dans la section 2.1 (voir chapitre 1). Néanmoins, des études récentes laissent présager que l'utilisation de modes de régulation non canoniques par les sRNA est plus courante que ce qui était prédit au départ. Qui plus est, l'hypothèse stipulant que les sRNA puissent agir avec des efficacités variées selon la cible a été avancée.

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse ont permis de mieux comprendre les propriétés des sRNA et de caractériser un nouveau mécanisme de régulation non canonique des sRNA. Ainsi, les études effectuées ont permis d'approfondir les connaissances sur les régimes utilisés par les sRNA en comparant ceux de deux sRNA parmi les plus connus (chapitre 2). Ensuite, les travaux de cette thèse ont mis en évidence qu'un sRNA peut agir par plusieurs mécanismes selon la cible ARNm, parfois par des mécanismes canoniques ou par des modes de régulation non standard (chapitres 3 et 4). Cette section permettra de discuter des principaux constats que les travaux de cette thèse et ceux d'autres groupes de recherche nous apprennent sur les mécanismes d'action des sRNA. En plus, la discussion donnera l'occasion de mettre à jour les modèles de répression de cibles ARNm par les sRNA, par la modélisation des mécanismes des sRNA et par l'étude de mécanismes non canonique de régulation. Par la même occasion, cette section permettra de discuter certaines observations et conclusions qui peuvent être tirées des résultats de cette thèse, mais qui n'ont pas été discutées dans les chapitres 2, 3 et 4.

lorsqu'un sRNA ayant plusieurs cibles régulerait certaines cibles ARNm plus fortement que d'autres. Par exemple, un sRNA régulant de multiples cibles (γ variant de faibles à élevés) favoriserait la régulation de celles ayant le γ le plus élevé. Par exemple, la priorisation pourrait s'observer dans des conditions où le sRNA serait moins exprimé (diminution du α) et ne pourrait réguler toutes ses cibles (voir Figure 10A et B). Plusieurs sRNA, connus pour réguler un grand nombre de cibles, sont des candidats potentiels à la priorisation (ex. : RyhB, GcvB, RybB, OmrA/B) (Vogel et Papenfort, 2006). Aussi, la priorisation pourrait se produire en favorisant la liaison d'un sRNA plutôt qu'un autre sur un même ARNm. Par exemple, cette situation pourrait se produire dans le cas d'un ARNm régulé par plusieurs sRNA, comme l'ARNm *rpoS* qui est ciblé par 4 sRNA (DsrA, RprA, ArcZ et OxyS) (Gottesman et Storz, 2011a). De manière similaire, la priorisation pourrait permettre à un sRNA de favoriser la régulation d'un ARNm comprenant 2 sites d'appariement du même sRNA par rapport aux autres cibles avec un seul site (ex : SgrS régulant *manXYZ*, RyhB régulant *msrB*) (Bobrovskyy et Vanderpool, 2013; Bos *et al.*, 2013). Toutefois, à notre connaissance, le concept de priorisation n'a pas été démontré de manière extensive *in vivo*. Pour ce faire, il serait nécessaire de faire des essais de compétitions qui mettraient en évidence les variations d'efficacité d'un sRNA à dégrader ses cibles, une démonstration qui serait ardue étant donné le nombre de facteurs impliqués.

Les facteurs modulant la valeur γ de chacune des cibles d'un sRNA sont nombreux. Effectivement, les paramètres déterminant la régulation de chaque cible dépendront des propriétés intrinsèques de ses cibles ARNm comme la structure de l'ARNm, l'intensité de la traduction, la séquence complémentaire au sRNA ou le site de clivage limitant de la RNase E et des facteurs extrinsèques telles la chaperonne Hfq ou les conditions environnementales. Ces critères vont participer à déterminer le γ de chaque cible ARNm et déterminer le mode de régulation qu'un sRNA donné adoptera pour chaque cible (positive, traductionnelle ou nucléolytique) (Figure 10C).

Si on compare le mode de régulation positif aux modes de régulation négatifs, on peut supposer que la régulation positive permettrait une régulation avec un α inférieur à 1 (Figure 10C). Le complexe sRNA-ARNm dans la régulation positive est considéré irréversible, n'étant pas dégradé, et sa durée sera simplement influencée par la demi-vie de l'ARN et l'efficacité de la traduction.

Gregory, E.M., and Fridovich, I. (1973). Oxygen toxicity and the superoxide dismutase. *Journal of bacteriology* (114), 1193-1197.

Groves, M.R., Hanlon, N., Turowski, P., Hemmings, B.A., and Barford, D. (1999). The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs. *Cell* (96), 99-110.

Gruer, M.J., Artymiuk, P.J., and Guest, J.R. (1997). The aconitase family: three structural variations on a common theme. *Trends in biochemical sciences* (22), 3-6.

Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N., and Altman, S. (1983). The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* (35), 849-857.

Guillier, M., Allemand, F., Raibaud, S., Dardel, F., Springer, M., and Chiaruttini, C. (2002). Translational feedback regulation of the gene for L35 in *Escherichia coli* requires binding of ribosomal protein L20 to two sites in its leader mRNA: A possible case of ribosomal RNA–messenger RNA molecular mimicry. *Rna* (8), 878-889.

Guillier, M., Gottesman, S., and Storz, G. (2006). Modulating the outer membrane with small RNAs. *Genes & development* (20), 2338-2348.

Hajnsdorf, E., and Régnier, P. (2000). Host factor Hfq of *Escherichia coli* stimulates elongation of poly (A) tails by poly (A) polymerase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (97), 1501-1505.

Hao, Y., Zhang, Z.J., Erickson, D.W., Huang, M., Huang, Y., Li, J., Hwa, T., and Shi, H. (2011). Quantifying the sequence-function relation in gene silencing by bacterial small RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (108), 12473-12478.

Hardwick, S.W., Chan, V.S., Broadhurst, R.W., and Luisi, B.F. (2011). An RNA degradosome assembly in *Caulobacter crescentus*. *Nucleic acids research* (39), 1449-1459.

Hattman, S. (1999). Unusual transcriptional and translational regulation of the bacteriophage μ operon. *Pharmacology & therapeutics* (84), 367-388.

Herrero, E., and De La Torre-Ruiz, M. (2007). Monothiol glutaredoxins: a common domain for multiple functions. *Cellular and molecular life sciences* (64), 1518-1530.

Hogema, B.M., Arents, J.C., Bader, R., Eijkemans, K., Yoshida, H., Takahashi, H., Aiba, H., and Postma, P.W. (1998). Inducer exclusion in *Escherichia coli* by non-PTS substrates: the role of the PEP to pyruvate ratio in determining the phosphorylation state of enzyme IIGlc. *Molecular microbiology* (30), 487-498.

- Holmgren, A. (1976). Hydrogen donor system for Escherichia coli ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (73), 2275-2279.
- Holmqvist, E., Reimegård, J., Sterk, M., Grantcharova, N., Römling, U., and Wagner, E.G.H. (2010). Two antisense RNAs target the transcriptional regulator CsgD to inhibit curli synthesis. *The EMBO journal* (29), 1840-1850.
- Ikeda, Y., Yagi, M., Morita, T., and 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. *Molecular microbiology* (79), 419-432.
- Ikemura, T., and Dahlberg, J.E. (1973). Small Ribonucleic Acids of Escherichia coli II. NONCOORDINATE ACCUMULATION DURING STRINGENT CONTROL. *Journal of Biological Chemistry* (248), 5033-5041.
- Imlay, J.A. (2006). Iron- sulphur clusters and the problem with oxygen. *Molecular microbiology* (59), 1073-1082.
- Imlay, J.A. (2008). Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annual review of biochemistry* (77), 755-776.
- Imlay, J.A., and Linn, S. (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* (240), 1302-1309.
- Irnov, I., Sharma, C.M., Vogel, J., and Winkler, W.C. (2010). Identification of regulatory RNAs in Bacillus subtilis. *Nucleic acids research* (38), 6637-6651.
- Iwai, K., Drake, S.K., Wehr, N.B., Weissman, A.M., LaVaute, T., Minato, N., Klausner, R.D., Levine, R.L., and Rouault, T.A. (1998). Iron-dependent oxidation, ubiquitination, and degradation of iron regulatory protein 2: implications for degradation of oxidized proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (95), 4924-4928.
- Iwema, T., Picciocchi, A., Traore, D.A., Ferrer, J.-L., Chauvat, F., and Jacquamet, L. (2009). Structural basis for delivery of the intact [Fe2S2] cluster by monothiol glutaredoxin. *Biochemistry* (48), 6041-6043.
- Jacques, J.F., Jang, S., Prevost, K., Desnoyers, G., Desmarais, M., Imlay, J., and Masse, E. (2006). RyhB small RNA modulates the free intracellular iron pool and is essential for normal growth during iron limitation in Escherichia coli. *Molecular microbiology* (62), 1181-1190.
- Johansson, J., Mandin, P., Renzoni, A., Chiaruttini, C., Springer, M., and Cossart, P. (2002). An RNA Thermosensor Controls Expression of Virulence Genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell* (110), 551-561.

Jousselin, A., Metzinger, L., and Felden, B. (2009). On the facultative requirement of the bacterial RNA chaperone, Hfq. *Trends in microbiology* (17), 399-405.

Kawamoto, H., Koide, Y., Morita, T., and Aiba, H. (2006). Base-pairing requirement for RNA silencing by a bacterial small RNA and acceleration of duplex formation by Hfq. *Molecular microbiology* (61), 1013-1022.

Keren, I., Wu, Y., Inocencio, J., Mulcahy, L.R., and Lewis, K. (2013). Killing by bactericidal antibiotics does not depend on reactive oxygen species. *Science* (339), 1213-1216.

Keyer, K., and Imlay, J.A. (1996). Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (93), 13635-13640.

Kim, H.-J., Kim, S.-I., Ratnayake-Lecamwasam, M., Tachikawa, K., Sonenshein, A.L., and Strauch, M. (2003). Complex regulation of the *Bacillus subtilis* aconitase gene. *Journal of bacteriology* (185), 1672-1680.

Komarova, A.V., Tchufistova, L.S., Dreyfus, M., and Boni, I.V. (2005). AU-rich sequences within 5' untranslated leaders enhance translation and stabilize mRNA in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* (187), 1344-1349.

Kreeger, P.K., and Lauffenburger, D.A. (2010). Cancer systems biology: a network modeling perspective. *Carcinogenesis* (31), 2-8.

LaVaute, T., Smith, S., Cooperman, S., Iwai, K., Land, W., Meyron-Holtz, E., Drake, S.K., Miller, G., Abu-Asab, M., and Tsokos, M. (2001). Targeted deletion of the gene encoding iron regulatory protein-2 causes misregulation of iron metabolism and neurodegenerative disease in mice. *Nature genetics* (27), 209-214.

Layer, G., Gaddam, S.A., Ayala-Castro, C.N., Ollagnier-de Choudens, S., Lascoux, D., Fontecave, M., and Outten, F.W. (2007). SufE transfers sulfur from SufS to SufB for iron-sulfur cluster assembly. *Journal of biological chemistry* (282), 13342-13350.

Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., and Kim, S. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* (425), 415-419.

Levine, E., Zhang, Z., Kuhlman, T., and Hwa, T. (2007a). Quantitative characteristics of gene regulation by small RNA. *PLoS biology* (5), e229.

Levine, E., Zhang, Z., Kuhlman, T., and Hwa, T. (2007b). Quantitative characteristics of gene regulation by small RNA. *PLoS biology* (5), e229.

Li, Z., Pandit, S., and Deutscher, M.P. (1998). Polyadenylation of stable RNA precursors in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (95), 12158-12162.

Li, Z., Pandit, S., and Deutscher, M.P. (1999). RNase G (CafA protein) and RNase E are both required for the 5' maturation of 16S ribosomal RNA. *The EMBO journal* (18), 2878-2885.

Lill, R., and Kispal, G. (2000). Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends in biochemical sciences* (25), 352-356.

Lillig, C.H., Berndt, C., and Holmgren, A. (2008). Glutaredoxin systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* (1780), 1304-1317.

Link, T.M., Valentin-Hansen, P., and Brennan, R.G. (2009). Structure of Escherichia coli Hfq bound to polyriboadenylate RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (106), 19292-19297.

Liochev, S.I., and Fridovich, I. (1993). Modulation of the Fumarases of Escherichia coli in Response to Oxidative Stress. *Archives of biochemistry and biophysics* (301), 379-384.

Liu, M., Durfee, T., Cabrera, J.E., Zhao, K., Jin, D.J., and Blattner, F.R. (2005). Global transcriptional programs reveal a carbon source foraging strategy by Escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry* (280), 15921-15927.

Liu, Y., and Imlay, J.A. (2013). Cell death from antibiotics without the involvement of reactive oxygen species. *Science* (339), 1210-1213.

Livny, J., Teonadi, H., Livny, M., and Waldor, M.K. (2008). High-throughput, kingdom-wide prediction and annotation of bacterial non-coding RNAs. *PloS one* (3), e3197.

Livny, J., and Waldor, M.K. (2007). Identification of small RNAs in diverse bacterial species. *Current opinion in microbiology* (10), 96-101.

Mackie, G.A. (1998). Ribonuclease E is a 5'-end-dependent endonuclease. *Nature* (395), 720-724.

Mackie, G.A. (2013). RNase E: at the interface of bacterial RNA processing and decay. *Nature reviews Microbiology* (11), 45-57.

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. *Journal of molecular biology* (234), 998-1012.

Mangan, S., Zaslaver, A., and Alon, U. (2003). The coherent feedforward loop serves as a sign-sensitive delay element in transcription networks. *Journal of molecular biology* (334), 197-204.

- Mann, B., van Opijnen, T., Wang, J., Obert, C., Wang, Y.-D., Carter, R., McGoldrick, D.J., Ridout, G., Camilli, A., and Tuomanen, E.I. (2012). Control of virulence by small RNAs in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS pathogens* (8), e1002788.
- Martin- Farmer, J., and Janssen, G.R. (1999). A downstream CA repeat sequence increases translation from leadered and unleadered mRNA in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* (31), 1025-1038.
- Masse, E., Escorcia, F.E., and Gottesman, S. (2003). Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes & development* (17), 2374-2383.
- Masse, E., and Gottesman, S. (2002). A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (99), 4620-4625.
- Massé, E., Majdalani, N., and Gottesman, S. (2003). Regulatory roles for small RNAs in bacteria. *Current opinion in microbiology* (6), 120-124.
- Masse, E., Vanderpool, C.K., and Gottesman, S. (2005). Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* (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.
- McDowall, K.J., Lin-Chao, S., and Cohen, S.N. (1994). A+ U content rather than a particular nucleotide order determines the specificity of RNase E cleavage. *Journal of Biological Chemistry* (269), 10790-10796.
- McHugh, J.P., Rodriguez-Quinones, F., Abdul-Tehrani, H., Svistunenko, D.A., Poole, R.K., Cooper, C.E., and Andrews, S.C. (2003). Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. A new mechanism for iron homeostasis. *The Journal of biological chemistry* (278), 29478-29486.
- Mehta, P., Goyal, S., and Wingreen, N.S. (2008). A quantitative comparison of sRNA- based and protein- based gene regulation. *Molecular systems biology* (4).
- Merianos, H.J., WANG, J., and MOORE, P.B. (2004). The structure of a ribosomal protein S8/spc operon mRNA complex. *Rna* (10), 954-964.
- Meyron-Holtz, E.G., Ghosh, M.C., and Rouault, T.A. (2004). Mammalian tissue oxygen levels modulate iron-regulatory protein activities in vivo. *Science* (306), 2087-2090.
- Miethke, M., and Marahiel, M.A. (2007). Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* (71), 413-451.

- Mikulecky, P.J., Kaw, M.K., Brescia, C.C., Takach, J.C., Sledjeski, D.D., and Feig, A.L. (2004). Escherichia coli Hfq has distinct interaction surfaces for DsrA, rpoS and poly (A) RNAs. *Nature structural & molecular biology* (11), 1206-1214.
- Mitarai, N., Andersson, A.M., Krishna, S., Semsey, S., and Sneppen, K. (2007). Efficient degradation and expression prioritization with small RNAs. *Physical biology* (4), 164.
- Mizuno, T., Chou, M.-Y., and Inouye, M. (1984). A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Proceedings of the National Academy of Sciences* (81), 1966-1970.
- Mohanty, B.K., and Kushner, S.R. (2000). Polynucleotide phosphorylase, RNase II and RNase E play different roles in the in vivo modulation of polyadenylation in Escherichia coli. *Molecular microbiology* (36), 982-994.
- Mohanty, B.K., and Kushner, S.R. (2002). Polyadenylation of Escherichia coli transcripts plays an integral role in regulating intracellular levels of polynucleotide phosphorylase and RNase E. *Molecular microbiology* (45), 1315-1324.
- Mohanty, B.K., Maples, V.F., and Kushner, S.R. (2004). The Sm-like protein Hfq regulates polyadenylation dependent mRNA decay in Escherichia coli. *Molecular microbiology* (54), 905-920.
- Moll, I., Grill, S., Gualerzi, C.O., and Bläsi, U. (2002). Leaderless mRNAs in bacteria: surprises in ribosomal recruitment and translational control. *Molecular microbiology* (43), 239-246.
- Møller, T., Franch, T., Højrup, P., Keene, D.R., Bächinger, H.P., Brennan, R.G., and Valentin-Hansen, P. (2002a). Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction. *Molecular cell* (9), 23-30.
- Møller, T., Franch, T., Udesen, C., Gerdes, K., and Valentin-Hansen, P. (2002b). Spot 42 RNA mediates discoordinate expression of the E. coli galactose operon. *Genes & development* (16), 1696-1706.
- Morita, T., Kawamoto, H., Mizota, T., Inada, T., and Aiba, H. (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. *Molecular microbiology* (54), 1063-1075.
- Morita, T., Maki, K., and Aiba, H. (2005). RNase E-based ribonucleoprotein complexes: mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. *Genes & development* (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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (103), 4858-4863.

Nandal, A., Huggins, C.C., Woodhall, M.R., McHugh, J., Rodriguez-Quinones, F., Quail, M.A., Guest, J.R., and Andrews, S.C. (2010). Induction of the ferritin gene (*ftnA*) of *Escherichia coli* by Fe(2+)-Fur is mediated by reversal of H-NS silencing and is RyhB independent. *Molecular microbiology* (75), 637-657.

Narberhaus, F., Waldminghaus, T., and Chowdhury, S. (2006). RNA thermometers. *FEMS microbiology reviews* (30), 3-16.

Neilands, J. (1993). Siderophores. *Archives of biochemistry and biophysics* (302), 1-3.

Nicholson, A.W. (1999). Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases. *FEMS microbiology reviews* (23), 371-390.

Niederhoffer, E.C., Naranjo, C.M., Bradley, K.L., and Fee, J.A. (1990). Control of *Escherichia coli* superoxide dismutase (*sodA* and *sodB*) genes by the ferric uptake regulation (*fur*) locus. *Journal of bacteriology* (172), 1930-1938.

Noble, D. (2002). The rise of computational biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (3), 459-463.

Nurmohamed, S., McKay, A.R., Robinson, C.V., and Luisi, B.F. (2010). Molecular recognition between *Escherichia coli* enolase and ribonuclease E. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* (66), 1036-1040.

Otaka, H., Ishikawa, H., Morita, T., and Aiba, H. (2011). PolyU tail of rho-independent terminator of bacterial small RNAs is essential for Hfq action. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (108), 13059-13064.

Overgaard, M., Johansen, J., Møller-Jensen, J., and Valentin-Hansen, P. (2009). Switching off small RNA regulation with trap-mRNA. *Molecular microbiology* (73), 790-800.

Ow, M.C., and Kushner, S.R. (2002). Initiation of tRNA maturation by RNase E is essential for cell viability in *E. coli*. *Genes & development* (16), 1102-1115.

Padalon-Brauch, G., Hershberg, R., Elgrably-Weiss, M., Baruch, K., Rosenshine, I., Margalit, H., and Altuvia, S. (2008). Small RNAs encoded within genetic islands of *Salmonella typhimurium* show host-induced expression and role in virulence. *Nucleic acids research* (36), 1913-1927.

Palsson, B. (2000). The challenges of in silico biology. *Nature biotechnology* (18), 1147-1150.

- Papenfort, K., Bouvier, M., Mika, F., Sharma, C.M., and Vogel, J. (2010). Evidence for an autonomous 5' target recognition domain in an Hfq-associated small RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (107), 20435-20440.
- Papenfort, K., Pfeiffer, V., Mika, F., Lucchini, S., Hinton, J.C., and Vogel, J. (2006). σ E-dependent small RNAs of Salmonella respond to membrane stress by accelerating global omp mRNA decay. *Molecular microbiology* (62), 1674-1688.
- Park, S., You, X., and Imlay, J.A. (2005). Substantial DNA damage from submicromolar intracellular hydrogen peroxide detected in Hpx-mutants of Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (102), 9317-9322.
- Park, S.Y., Cromie, M.J., Lee, E.J., and Groisman, E.A. (2010). A bacterial mRNA leader that employs different mechanisms to sense disparate intracellular signals. *Cell* (142), 737-748.
- Park, Y.-H., Lee, B.R., Seok, Y.-J., and Peterkofsky, A. (2006). In vitro reconstitution of catabolite repression in Escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry* (281), 6448-6454.
- 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. *Nature structural & molecular biology* (16), 840-846.
- Polekhina, G., Board, P.G., Gali, R.R., Rossjohn, J., and Parker, M.W. (1999). Molecular basis of glutathione synthetase deficiency and a rare gene permutation event. *The EMBO journal* (18), 3204-3213.
- Prevost, K., Desnoyers, G., Jacques, J.F., Lavoie, F., and Masse, E. (2011). Small RNA-induced mRNA degradation achieved through both translation block and activated cleavage. *Genes & development* (25), 385-396.
- 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. *Molecular microbiology* (64), 1260-1273.
- Prud'homme- Génereux, A., Beran, R.K., Iost, I., Ramey, C.S., Mackie, G.A., and Simons, R.W. (2004). Physical and functional interactions among RNase E, polynucleotide phosphorylase and the cold-shock protein, CsdA: evidence for a 'cold shock degradosome'. *Molecular microbiology* (54), 1409-1421.
- Py, B., Higgins, C.F., Krisch, H.M., and Carpousis, A.J. (1996). A DEAD-box RNA helicase in the Escherichia coli RNA degradosome.
- Ramakrishnan, V. (2002). Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* (108), 557-572.

Roberts, M.W., and Rabinowitz, J. (1989). The effect of *Escherichia coli* ribosomal protein S1 on the translational specificity of bacterial ribosomes. *Journal of Biological Chemistry* (264), 2228-2235.

Rodriguez-Manzanares, M.T., Tamarit, J., Belli, G., Ros, J., and Herrero, E. (2002). Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Molecular biology of the cell* (13), 1109-1121.

Rouault, T.A. (2006). The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nature chemical biology* (2), 406-414.

Rouhier, N., Couturier, J., Johnson, M.K., and Jacquot, J.-P. (2010). Glutaredoxins: roles in iron homeostasis. *Trends in biochemical sciences* (35), 43-52.

Sahagan, B.G., and Dahlberg, J.E. (1979a). A small, unstable RNA molecule of *Escherichia coli*: spot 42 RNA: I. Nucleotide sequence analysis. *Journal of molecular biology* (131), 573-592.

Sahagan, B.G., and Dahlberg, J.E. (1979b). A small, unstable RNA molecule of *Escherichia coli*: Spot 42 RNA: II. Accumulation and distribution. *Journal of molecular biology* (131), 593-605.

Salvail, H., Caron, M.P., Belanger, J., and Masse, E. (2013). Antagonistic functions between the RNA chaperone Hfq and an sRNA regulate sensitivity to the antibiotic colicin. *The EMBO journal* (32), 2764-2778.

Salvail, H., Lanthier-Bourbonnais, P., Sobota, J.M., Caza, M., Benjamin, J.A., Mendieta, M.E., Lepine, F., Dozois, C.M., Imlay, J., and Masse, E. (2010). A small RNA promotes siderophore production through transcriptional and metabolic remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (107), 15223-15228.

Salvail, H., and Massé, E. (2012). Regulating iron storage and metabolism with RNA: an overview of posttranscriptional controls of intracellular iron homeostasis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* (3), 26-36.

Santos, J.M., Lobo, M., Matos, A., De Pedro, M.A., and Arraiano, C.M. (2002). The gene *bolA* regulates *dacA* (PBP5), *dacC* (PBP6) and *ampC* (AmpC), promoting normal morphology in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* (45), 1729-1740.

Sauer, E., and Weichenrieder, O. (2011). Structural basis for RNA 3'-end recognition by Hfq. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (108), 13065-13070.

Schlx, P.J., Xavier, K.A., Gluick, T.C., and Draper, D.E. (2001). Translational Repression of the *Escherichia coli* α Operon mRNA IMPORTANCE OF AN mRNA

CONFORMATIONAL SWITCH AND A TERNARY ENTRAPMENT COMPLEX. *Journal of Biological Chemistry* (276), 38494-38501.

Schmiedel, J.M., Axmann, I.M., and Legewie, S. (2012). Multi-target regulation by small RNAs synchronizes gene expression thresholds and may enhance ultrasensitive behavior. *PloS one* (7).

Schweizer, H., Boos, W., and Larson, T. (1985). Repressor for the sn-glycerol-3-phosphate regulon of *Escherichia coli* K-12: cloning of the *glpR* gene and identification of its product. *Journal of bacteriology* (161), 563-566.

Semsey, S. (2014). A Mixed Incoherent Feed-Forward Loop Allows Conditional Regulation of Response Dynamics. *PloS one* (9), e91243.

Semsey, S., Benjamin, J.-A.M., Mitarai, N., Krishna, S., Csiszovszki, Z., Sneppen, K., and Massé, E. (2009). Dynamics of the recovery from sRNA-mediated gene silencing. *Cell Cycle* (8), 2863-2864.

Serio, A.W., Pechter, K.B., and Sonenshein, A.L. (2006). *Bacillus subtilis* aconitase is required for efficient late-sporulation gene expression. *Journal of bacteriology* (188), 6396-6405.

Sesto, N., Wurtzel, O., Archambaud, C., Sorek, R., and Cossart, P. (2013). The excludon: a new concept in bacterial antisense RNA-mediated gene regulation. *Nature Reviews Microbiology* (11), 75-82.

Sharma, C.M., Hoffmann, S., Darfeuille, F., Reignier, J., Findeiß, S., Sittka, A., Chabas, S., Reiche, K., Hackermüller, J., and Reinhardt, R. (2010). The primary transcriptome of the major human pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* (464), 250-255.

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

Somerville, G., Mikoryak, C.A., and Reitzer, L. (1999). Physiological characterization of *Pseudomonas aeruginosa* during exotoxin A synthesis: glutamate, iron limitation, and aconitase activity. *Journal of bacteriology* (181), 1072-1078.

Soper, T., Mandin, P., Majdalani, N., Gottesman, S., and Woodson, S.A. (2010). Positive regulation by small RNAs and the role of Hfq. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (107), 9602-9607.

Stehling, O., Wilbrecht, C., and Lill, R. (2014). Mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis and human disease. *Biochimie*.

Stelzl, U., Zengel, J.M., Tovbina, M., Walker, M., Nierhaus, K.H., Lindahl, L., and Patel, D.J. (2003). RNA-structural mimicry in Escherichia coli ribosomal protein L4-dependent regulation of the S10 operon. *Journal of Biological Chemistry* (278), 28237-28245.

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

Sussman, J.K., Simons, E.L., and Simons, R.W. (1996). Escherichia coli translation initiation factor 3 discriminates the initiation codon in vivo. *Molecular microbiology* (21), 347-360.

Symmons, M.F., Jones, G.H., and Luisi, B.F. (2000). A duplicated fold is the structural basis for polynucleotide phosphorylase catalytic activity, processivity, and regulation. *Structure* (8), 1215-1226.

Tang, Y., and Guest, J.R. (1999). Direct evidence for mRNA binding and post-transcriptional regulation by Escherichia coli aconitases. *Microbiology* (145), 3069-3079.

Tang, Y., Guest, J.R., Artymiuk, P.J., and Green, J. (2005). Switching aconitase B between catalytic and regulatory modes involves iron-dependent dimer formation. *Molecular microbiology* (56), 1149-1158.

Tang, Y., Guest, J.R., Artymiuk, P.J., Read, R.C., and Green, J. (2004). Post-transcriptional regulation of bacterial motility by aconitase proteins. *Molecular microbiology* (51), 1817-1826.

Tang, Y., Quail, M.A., Artymiuk, P.J., Guest, J.R., and Green, J. (2002). Escherichia coli aconitases and oxidative stress: post-transcriptional regulation of sodA expression. *Microbiology* (148), 1027-1037.

Thomason, M.K., and Storz, G. (2010). Bacterial antisense RNAs: How many are there and what are they doing? *Annual review of genetics* (44), 167.

Tjaden, B., Goodwin, S.S., Opdyke, J.A., Guillier, M., Fu, D.X., Gottesman, S., and Storz, G. (2006). Target prediction for small, noncoding RNAs in bacteria. *Nucleic acids research* (34), 2791-2802.

van Meerten, D., Girard, G., and Van Duin, J. (2001). Translational control by delayed RNA folding: identification of the kinetic trap. *Rna* (7), 483-494.

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 & development* (12), 2770-2781.

Varghese, S., Tang, Y., and Imlay, J.A. (2003). Contrasting sensitivities of Escherichia coli aconitases A and B to oxidation and iron depletion. *Journal of bacteriology* (185), 221-230.

- Varghese, S., Wu, A., Park, S., Imlay, K.R., and Imlay, J.A. (2007). Submicromolar hydrogen peroxide disrupts the ability of Fur protein to control free-iron levels in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* (64), 822-830.
- Varshney, U., Lee, C.P., Seong, B.L., and RajBhandary, U.L. (1991). Mutants of initiator tRNA that function both as initiators and elongators. *Journal of Biological Chemistry* (266), 18018-18024.
- Večerek, B., Moll, I., and Bläsi, U. (2007). Control of Fur synthesis by the non-coding RNA RyhB and iron-responsive decoding. *The EMBO journal* (26), 965-975.
- Vieira, H.L., Freire, P., and Arraiano, C.M. (2004). Effect of *Escherichia coli* morphogene *bolA* on biofilms. *Applied and environmental microbiology* (70), 5682-5684.
- Vogel, J., and Papenfort, K. (2006). Small non-coding RNAs and the bacterial outer membrane. *Current opinion in microbiology* (9), 605-611.
- Vytvytska, O., Moll, I., Kaberdin, V.R., von Gabain, A., and Bläsi, U. (2000). Hfq (HF1) stimulates *ompA* mRNA decay by interfering with ribosome binding. *Genes & development* (14), 1109-1118.
- Walden, W.E., Selezneva, A.I., Dupuy, J., Volbeda, A., Fontecilla-Camps, J.C., Theil, E.C., and Volz, K. (2006). Structure of dual function iron regulatory protein 1 complexed with ferritin IRE-RNA. *Science* (314), 1903-1908.
- Wallander, M.L., Zumbrennen, K.B., Rodansky, E.S., Romney, S.J., and Leibold, E.A. (2008). Iron-independent phosphorylation of iron regulatory protein 2 regulates ferritin during the cell cycle. *Journal of biological chemistry* (283), 23589-23598.
- Wang, J., Chen, G., Muckenthaler, M., Galy, B., Hentze, M.W., and Pantopoulos, K. (2004). Iron-mediated degradation of IRP2, an unexpected pathway involving a 2-oxoglutarate-dependent oxygenase activity. *Molecular and cellular biology* (24), 954-965.
- Wassarman, K.M. (2007). 6S RNA: a small RNA regulator of transcription. *Current opinion in microbiology* (10), 164-168.
- Wassarman, K.M., Repoila, F., Rosenow, C., Storz, G., and Gottesman, S. (2001). Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays. *Genes & development* (15), 1637-1651.
- Waters, L.S., and Storz, G. (2009). Regulatory RNAs in bacteria. *Cell* (136), 615-628.
- Williams, C.H., Stillman, T.J., Barynin, V.V., Sedelnikova, S.E., Tang, Y., Green, J., Guest, J.R., and Artymiuk, P.J. (2002). *E. coli* aconitase B structure reveals a HEAT-like domain with implications for protein-protein recognition. *Nature structural & molecular biology* (9), 447-452.

Wilson, T., Bertrand, N., Tang, J.L., Feng, J.X., Pan, M.Q., Barber, C., Dow, J., and Daniels, M. (1998). The *rpfA* gene of *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*, which is involved in the regulation of pathogenicity factor production, encodes an aconitase. *Molecular microbiology* (28), 961-970.

Winkler, W.C., and Breaker, R.R. (2005). Regulation of bacterial gene expression by riboswitches. *Annu Rev Microbiol* (59), 487-517.

Yeung, N., Gold, B., Liu, N., Prathapam, R., Sterling, H., Willams, E., and Butland, G. (2011). The *E. coli* monothiol glutaredoxin GrxD forms homodimeric and heterodimeric FeS cluster containing complexes. *Biochemistry* (50), 8957-8969.

Zhang, A., Wassarman, K.M., Ortega, J., Steven, A.C., and Storz, G. (2002). The Sm-like Hfq protein increases OxyS RNA interaction with target mRNAs. *Molecular cell* (9), 11-22.

Zheng, M., Doan, B., Schneider, T.D., and Storz, G. (1999). OxyR and SoxRS regulation offur. *Journal of bacteriology* (181), 4639-4643.