



**HAL**  
open science

# Etude fonctionnelle du dégradosome d'*Escherichia coli* et régulation de la RNase E par phosphorylation

Isabelle Toesca

► **To cite this version:**

Isabelle Toesca. Etude fonctionnelle du dégradosome d'*Escherichia coli* et régulation de la RNase E par phosphorylation. Biochimie [q-bio.BM]. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2005. Français. NNT: . tel-00010049

**HAL Id: tel-00010049**

**<https://theses.hal.science/tel-00010049>**

Submitted on 6 Sep 2005

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

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

**UNIVERSITÉ PAUL SABATIER TOULOUSE III**

UFR SVT

THESE

soutenue par

Isabelle TOESCA

en vue de l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE TOULOUSE III**

*Spécialité :*

*Microbiologie, Biologie et Génétique Moléculaires*

***Étude fonctionnelle du dégradosome d'Escherichia coli  
et régulation de la RNase E par phosphorylation***

Soutenue le 17 mars 2005 devant la commission d'examen :

<b>D<sup>r</sup> C. GUTIERREZ,</b>	Professeur de l'Université Paul Sabatier, TOULOUSE	<b><i>Président du Jury</i></b>
<b>D<sup>r</sup> H. PUTZER,</b>	Directeur de Recherche, CNRS, PARIS	<b><i>Rapporteur</i></b>
<b>D<sup>r</sup> E. HAJNSDORF</b>	Chargée de Recherche, CNRS, PARIS	<b><i>Rapporteur</i></b>
<b>D<sup>r</sup> B. FELDEN</b>	Professeur de l'Université de Rennes I, RENNES	<b><i>Examineur</i></b>
<b>D<sup>r</sup> A. CARPOUSIS,</b>	Directeur de Recherche, CNRS, TOULOUSE	<b><i>Directeur de thèse</i></b>

Institut de **B**iologie Cellulaire et de **G**énétique, CNRS  
Laboratoire de **M**icrobiologie et de **G**énétique **M**oléculaire  
118, route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex

Ecole doctorale Biologie-Santé-Biotechnologies de Toulouse

## REMERCEMENTS

En premier lieu je tiens à remercier les membres du jury qui ont bien voulu accepter de juger et d'apprécier le travail effectué au cours de ma thèse. Merci Eliane d'avoir finalement accepté d'être mon rapporteur. Merci Brice d'avoir été mon rapporteur, non, examinateur !! Et merci à Harald pour avoir dit oui sans hésiter.

Un grand merci à Claude qui sans le savoir à jouer un rôle primordiale dans ma vie. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir accueilli dans ton équipe. Merci Jean de m'avoir appris à faire quinze gels retard à la minute ! et pour ta bonne humeur si précieuse dans cet institut. Merci à Annie pour m'avoir encadrée et soutenue jusqu'au bout. Merci à Patricia et Carine qui ont permis mon intégration rapidement au cercle d'amis de la cafet ! Et surtout merci à l'équipe Gutierrez d'avoir pris un jeune thésard du nom de Yves l'année de mon DESU...

Merci à A.J. de m'avoir acceptée dans son équipe et de m'avoir beaucoup appris dans le domaine scientifique. Ce passage dans ton laboratoire aura été une expérience des plus enrichissantes sur le plan personnel. Evidemment, je n'oublie pas les membres de l'équipe actuelle, Léo et Béatrice. Un petit mot d'encouragement pour notre petite Virginie à qui je dis courage et surtout ne te braque pas. Bon courage pour ta future thèse où que ce soit ! Bon courage en général pour tous ces futurs thésards plein d'espoir. Et courage à mes compagnons d'écriture qui sont Patrice, Olivier, Jacques, Christian et Sylvain et Noëlle très prochainement !

Un merci sincère à mes amis d'outre-Manche que j'ai rencontré à Cambridge ! Thanks for your hearty welcome, your help and friendship !

Je remercie de tout mon cœur toutes les personnes qui m'ont accompagnée au cours de ces cinq années de joies et de galères....Presque 1/5<sup>e</sup> de ma vie passé à la paillassse et à la cafeteria du troisième étage, à râler contre ceux qui ne rallument pas les rollers de la chambre à 37°C, à courir derrière celui qui utilise la centri réservée exprès pour ma manip préférée : la préparation de cellules compétentes ! Mais c'est aussi les bons moments partagés lors des nombreux pots de thèse, d'accueil des nouveaux, d'anniversaires, de galettes des Rois, de Noël, d'articles acceptés... Bref, les occasions n'ont jamais manqué. Un grand merci donc à tous ceux que j'ai côtoyé ou juste croisé à l'IBCG.

Merci à tous mes amis exilés aux quatre coins de la Terre pour avoir fait de ces années une partie de plaisir : Virginie et JB partis à Washington et revenus à Nancy, Anne et Christophe qui pouponnent à Edimbourg, Vanessa que j'admire d'être partie seule, si loin en Caroline du Nord ! Céline qui se dore à Barcelone, Gaëlle qui survie en Allemagne sans son Fred, Claire qui skie dans les Rocheuses du Montana...Merci d'être encore là malgré la distance. Vivement la 2<sup>e</sup> édition du week-end des retrouvailles !

Un grand merci pour ceux qui m'ont soutenus dans mes derniers moments de thèse plutôt difficiles. Je pense en particulier à Philou qui a été là pour moi chaque fois que j'ai eu envie de parler (tu m'as apporté l'aide que j'attendais, et sans ambiguïté), à Béatrice qui a fait son possible pour me reconforter, à ma grande alliée Martine, sœur de chagrin, qui a été la mieux placée pour comprendre...Merci aussi à Marie-line et Mimi pour leur précieux réconfort.

Evidemment, je me dois de remercier ceux qui m'ont permis d'arriver au bout de ce long chemin : Didier Kaczan et Frédérique Massat.

Un grand merci à mon amie de toujours avec qui je partagerai encore de nombreux moments importants : Priscilla qui a su s'entourer de gens auxquels je tiens beaucoup aussi.

Je tiens à remercier tous les membres et copains du Dojo du Lotus dont toutes les soirées passées au Tae Kwondo sont devenues mon oxygène, ma drogue.

Plus que tous, je remercie ceux qui m'ont permis de devenir ce que je suis aujourd'hui, avec mes qualités et mes défauts dont ils sont en partie responsables, du moins génétiquement ! Mes parents ! Oui, merci Papa d'avoir financé toutes ces longues années d'études, d'avoir installé mes étagères de placard, mais surtout d'avoir pris soin de moi et d'avoir été présent aux moments les plus critiques. Je n'irai pas jusqu'à dire que tu as su me dire les mots qu'il fallait mais tu les as pensé et c'est le plus important pour moi. Merci ma petite maman de m'avoir élevée comme tu l'as fait, de m'avoir transmis ta force de vivre et ton courage. Merci d'avoir épuisé ton capital de vacances pour moi... Je vous aime très fort tous les deux. Et vive la devise du pays : *Kimbé raid, pa moli !*

Merci aussi à mon frère qui me manque et que j'adore. Prends soin de toi.

Merci à Magali et Rémi de m'avoir hébergé quelques jours, de m'avoir permis de squatter votre belle maison. A ces moments de complicités, pas assez fréquents à mon goût,

partagés avec ma grande petite sœur qui me sert de modèle. Et merci à Arthur et Elsa que j'adore et dont l'insouciance me rend parfois envieuse !

Merci à ma famille dispersée un peu partout en France et à ma future belle-famille qui m'a accueilli comme une des leurs.

Enfin juste mille mercis aux deux amours de ma vie Yves et Moustik, d'être là auprès de moi pour encore de longues années...

Je finirais par dire merci à ma sœur de cœur à qui j'en veux encore de m'avoir laissée tomber ce 16 octobre 1997. Cette thèse c'est pour moi que je l'ai menée au bout mais c'est aussi pour toi que je me suis accrochée et que j'ai réussi. Pour te montrer que c'était possible et que, de nous deux ce n'est peut-être pas toi qui as eu raison, même si j'en ai parfois douté ...Aujourd'hui je t'ai compris mais pas encore pardonnée. Tu as pris une part de moi en me laissant une part de toi en partant. Tu es à jamais avec moi où que tu sois... Cette thèse, elle est pour toi...

... .. à *Sabine Rafaël*

## SOMMAIRE

<b>Chapitre I : INTRODUCTION</b>	<b>10</b>
<b>I - La dégradation des ARNm chez <i>E. coli</i> : Généralités</b>	<b>11</b>
I - 1 - Les endoribonucléases	11
A) La RNase III	11
B) La RNase E	13
C) La RNase G : une endonucléase minoritaire	15
I - 2 - Les exonucléases	18
A) La RNase II	18
B) La Polynucléotide Phosphorylase	19
C) La RNase II et la PNPase : un comportement différent	22
<b>II - Les enzymes de la dégradation regroupées au sein d'un même complexe : le dégradosome</b>	<b>23</b>
II - 1 - La découverte du dégradosome	23
II - 2 - L'organisation du complexe et rôles des protéines associées	24
A) Les interactions protéines-protéines au sein du dégradosome	24
B) Les protéines majeures du dégradosome	26
a) L'Enolase	26
b) Les protéines RhlB et PNPase collaborent de manière étroite	29
C) Les protéines minoritaires du complexe	30
a) La polyphosphate kinase PPK	30
b) Les protéines chaperonnes DnaK et GroEL	30
II - 3 - Le rôle du dégradosome	31
II - 4 - L'existence de complexes de dégradation autres que le dégradosome d' <i>E. coli</i>	33
A) Des complexes bactériens comme le dégradosome	33
B) Des complexes eucaryotes de type « exosome »	35
<b>III - La RNase E : une enzyme centrale pour la cellule</b>	<b>38</b>
III - 1 - Identification	38
III - 2 - La RNase E est une protéine à domaines multifonctionnels	39
A) Le domaine NTH	39
B) Le domaine carboxy-terminal de la RNase E	41
C) Le CTH : une protéine intrinsèquement structurée	41
III - 3 - La RNase E participe à de nombreux processus cellulaires	43
A) La dégradation des messagers : quelques exemples d'ARNm spécifiques	43
a) La dégradation en fonction des conditions de croissance	43
b) L'expression différentielle de gènes polycistroniques	44
c) Le contrôle du métabolisme cellulaire	44

d) Le repliement des protéines _____	45
B) La maturation et la dégradation des ARNr _____	45
C) La maturation des ARN de transfert _____	45
D) La surveillance des peptides synthétisés et de l'intégrité des messagers _____	46
E) La dégradation d'ARN régulateurs _____	47
III - 4 - La régulation de la RNase E _____	47
A) Une régulation transcriptionnelle _____	47
B) Une régulation post-transcriptionnelle _____	48
a) L'autorégulation de la RNase E _____	48
(α) Les mécanismes et les éléments requis _____	48
(β) Les conséquences d'une telle régulation _____	50
b) La traduction influence la stabilité des messagers _____	51
C) Une régulation post-translationnelle : le facteur <i>trans</i> RraA _____	53
<b>IV - .La phosphorylation de la RNase E par la protéine PK du bactériophage T7</b> _____	<b>55</b>
IV - 1 - Le bactériophage T7 _____	55
IV - 2 - La protéine PK et son rôle lors de l'infection _____	58
A) Caractérisation de la protéine _____	58
B) Le rôle de PK _____	59
a) Le contrôle transcriptionnel des gènes précoces _____	59
b) La maturation des ARNm du bactériophage _____	60
c) Le contrôle traductionnel _____	62
IV - 3 - La protéine PK et la RNase E _____	63
<b>V - Conclusion</b> _____	<b>64</b>
<b>Chapitre II : RESULTATS ET DISCUSSION</b> _____	<b>66</b>
<b>I - 1ère PARTIE : ETUDE FONCTIONNELLE DU DEGRADOSOME</b> _____	<b>66</b>
I - 1 - Etude de la protéine RhIB : interaction des hélicases DEAD avec la RNase E _____	66
A) Introduction et résumé de l'article I _____	66
B) Article 1 _____	69
C) Commentaires supplémentaires _____	79
a) RhIE est-elle capable d'interagir avec la RNase E in vivo ? _____	79
b) Existe-t-il un dégradosome alternatif ? _____	79
I - 2 - Recherche du rôle de l'Enolase au sein du dégradosome et dans la dégradation des ARNm _____	82
A) La construction du mutant $\Delta eno$ _____	82
a) La stratégie de délétion _____	82
b) Vérification de la délétion du gène <i>eno</i> _____	82
(α) Vérification du phénotype de croissance de la souche TAZ1 _____	82
(β) Vérifications moléculaires et biochimiques de la délétion du gène <i>eno</i> _____	84
♦ Southern blot _____	84
♦ Absence de la protéine dans la cellule _____	86

B) L'Enolase joue t-elle un rôle sur le dégradosome ? _____	86
a) L'Enolase influence-t-elle la quantité des autres composants du dégradosome ? _____	88
b) L'Enolase influence-t-elle la composition du dégradosome ? _____	88
C) L'Enolase joue t-elle un rôle dans la dégradation des ARNm ? _____	92
a) La mise au point des conditions de croissances _____	92
b) Dégradation des ARNm fonctionnels ? _____	94
c) Dégradation spécifique de certains messagers ? _____	94
d) L'Enolase influence t- elle l'activité endonucléolytique de la RNaseE ? _____	96
(α) Le système expérimental T7-lacZ _____	96
(β) mesure d'activité β-galactosidase _____	98
I - 3 - Discussion - Conclusion _____	98
<b>II - 2<sup>de</sup> PARTIE : Etude de la régulation de la RNase E par phosphorylation</b>	<b>104</b>
II - 1 - Détermination des régions du CTH nécessaires à PK : approche <i>in vivo</i> _____	104
A) Vérifications des données antérieures et mise en place d'un nouveau vecteur d'expression _____	104
a) Confirmation des données antérieures _____	104
b) Construction d'un nouveau vecteur d'expression _____	105
B) Détermination des régions nécessaires à l'effet inhibiteur de PK _____	107
II - 2 - Détermination des régions cibles phosphorylées par PK : approche <i>in vitro</i> _____	109
A) Détermination des régions de la RNase E phosphorylée _____	109
B) RhlB est une cible de PK _____	113
C) Modèles d'action de PK sur la RNase E _____	113
II - 3 - Détermination des acides aminés cibles de PK : approche par phosphorylation <i>in vitro</i> _____	117
A) Détermination du pourcentage de molécules phosphorylées _____	117
B) Traitement à la phosphatase de la protéine PK purifiée _____	119
a) Déphosphorylation de PK et tests d'activité _____	119
b) Détermination des résidus autophosphorylés de PK et construction d'un mutant _____	121
II - 4 - Détermination des acides aminés cibles de PK : approche par phosphorylation <i>in vivo</i> _____	123
<b>Chapitre III : Conclusion générale</b> _____	<b>129</b>
<b>Chapitre IV : Matériel et Méthodes</b> _____	<b>131</b>
<b>I - Tableau des souches</b> _____	<b>131</b>
<b>II - Tableau de plasmides</b> _____	<b>132</b>
<b>III - Séquences des oligonucléotides</b> _____	<b>133</b>
<b>IV - Les conditions de cultures</b> _____	<b>134</b>

---

<b>V - Les expériences de Macroarrays</b>	<b>134</b>
<b>VI - Mesures d'activité <math>\beta</math>-galactosidase</b>	<b>135</b>
<b>VII - Phosphorylation <i>in vitro</i> par PK</b>	<b>135</b>
<b>VIII - Traitement phosphatase et FPLC</b>	<b>135</b>
<b>IX - Phosphorylation <i>in vivo</i></b>	<b>136</b>
<b>X - Spectrométrie de masse</b>	<b>136</b>
<b><i>Chapitre V : Références bibliographiques</i></b>	<b>137</b>

Chapitre I:  
INTRODUCTION

Chez les Procaryotes comme chez les Eucaryotes, la stabilité des ARN messagers (ARNm) est un important facteur d'expression différentielle des gènes (Belasco and Higgins, 1988). En effet, le taux de protéines données dans une cellule est dépendant de la quantité d'ARNm correspondant. La demi-vie spécifique d'un messenger varie de 30 secondes à 20 minutes. Chez *Escherichia coli*, elle est en moyenne de 2 à 3 minutes (Regnier and Arraiano, 2000). L'abondance d'un ARNm dépend de deux processus : la synthèse du messenger et sa dégradation. Or, la dégradation est le principal mécanisme de régulation post-transcriptionnelle. Plus que le maintien d'une quantité constante de messenger, cette régulation permettrait une modification rapide du profil d'expression génique de la bactérie en réponse à des variations environnementales spécifiques (Bernstein *et al.*, 2002). Elle contribue également à une différence d'expression de gènes cotranscrits comme les gènes polycistroniques (Baga *et al.*, 1988). De nombreuses études réalisées au cours de ces trente dernières années ont permis d'identifier les principaux facteurs protéiques impliqués dans ce processus subtil. La découverte d'une collaboration étroite entre une endoribonucléase et une exoribonucléase, les deux catégories d'enzymes de la dégradation, au sein d'un même complexe a permis de mieux comprendre les différents mécanismes mis en jeu dans la dégradation complète d'un ARNm. En plus de la RNase E et de la PNPase, ce complexe, appelé le dégradosome, est composé de deux autres protéines : RhlB et l'Enolase.

La première partie du chapitre II « Résultats et Discussion » est consacrée à l'étude de ces deux composants du dégradosome. Dans un premier temps, les études sur RhlB portent sur la caractérisation et la spécificité de son interaction avec la RNase E. Les travaux menés ensuite sur l'Enolase tentent de déterminer le rôle encore inconnu de cette enzyme glycolytique au sein du complexe.

La seconde partie du chapitre II concerne la RNase E et plus particulièrement la modulation de son activité par sa phosphorylation par une kinase du bactériophage T7.

L'objectif est de cartographier les résidus phosphorylés afin de déterminer les mécanismes impliqués dans la régulation de la RNase E et de mieux appréhender ainsi les relations structures/fonctions avec ses partenaires.

Quant au chapitre I, il sert d'introduction aux différents travaux traités ci-après. Cette synthèse bibliographique est un résumé des principales données scientifiques accumulées au cours de ces dernières années concernant la dégradation des ARNm chez *E. coli*. Les différentes protéines et les mécanismes impliqués dans ce processus y sont présentés, plus particulièrement l'endoribonucléase E (RNase E) qui joue un rôle central dans la cellule.

## I - La dégradation des ARNm chez *E. coli* : Généralités

La dégradation des ARNm est un processus complexe qui fait intervenir de nombreux partenaires. Elle est assurée principalement par l'activité combinée de deux types d'enzymes de fonctions complémentaires : les endonucléases et les exonucléases (Ehretsmann *et al.*, 1992a, b; Nierlich and Murakawa, 1996).

### I - 1 - Les endoribonucléases

Les endonucléases clivent les molécules d'ARNm au niveau de liaisons phosphodiester internes. Ce clivage intramoléculaire est à l'origine d'une dégradation dans le sens 5'-3' par morcellement des molécules cibles (Cannistraro *et al.*, 1986; Kano and Imamoto, 1979). Parmi les endonucléases identifiées chez *E. coli*, deux sont impliquées directement dans la dégradation des ARNm : la ribonucléase III (RNase III) et l'endoribonucléase E (RNase E).

#### A) La RNase III

Le gène *rnc* codant la RNase III est situé à 58,2 minutes du chromosome d'*E. coli*. Il est transcrit sous la forme d'un polycistron contenant également les gènes *era* et *recO* codant respectivement une protéine de liaison au GTP et une protéine impliquée dans la réparation de l'ADN. La RNase III est une endoribonucléase spécifique des ARN double brins. Elle se

compose de deux domaines qui fonctionnent de manière indépendante. Le domaine amino-terminal porte l'activité catalytique et semble être le déterminant majoritaire de la spécificité du substrat. Le domaine carboxy-terminal contient le site de fixation à l'ARN. Il contribue à la sélection du site de clivage et facilite la fixation du substrat (Conrad *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2001). Bien qu'il ne semble pas y avoir de séquences spécifiques de clivage, l'enzyme serait sensible à la présence de déterminants négatifs tels que des appariements de type Watson-Crick à des positions précises (Zhang and Nicholson, 1997). Active sous forme homodimérique, une seule unité catalytique au sein du dimère est suffisante pour assurer un clivage efficace (Conrad *et al.*, 2002; Robertson and Dunn, 1975).

La RNase III est impliquée dans la modulation de l'expression de nombreux gènes phagiques et cellulaires (Nicholson, 1999). Elle intervient principalement dans la maturation des précurseurs des ARN ribosomiques en mûrant les ARNr 23S et 16S à partir du précurseur 30S (Gegenheimer and Apirion, 1981). Elle est également impliquée dans sa propre régulation puisqu'elle initie la dégradation de son messenger après clivage de celui-ci au niveau d'une structure secondaire située dans son extrémité 5' (Bardwell *et al.*, 1989). La coupure de l'ARNm entraîne sa dégradation complète en supprimant la tige-boucle fournissant ainsi une extrémité 5' accessible à la RNase E.

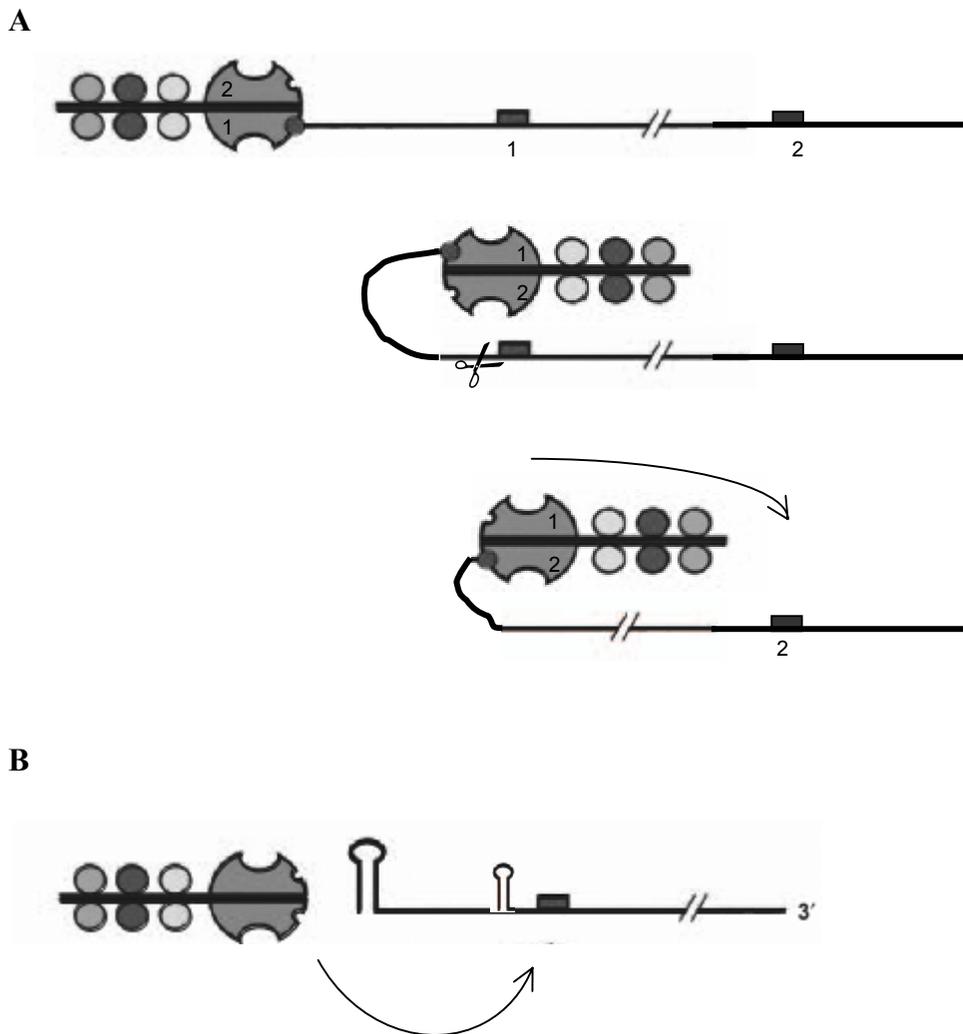
Bien que le gène *rnc* ne soit pas essentiel, un mutant de la RNase III présente une croissance ralentie. En effet, l'absence de cet enzyme entraînerait un défaut de la sous-unité ribosomale 50S et donc une synthèse protéique altérée (Apirion and Gitelman, 1980; King *et al.*, 1984). Il est intéressant de noter que la RNase III intervient dans la régulation de l'expression d'un autre enzyme impliqué dans la dégradation des ARNm. En effet, elle initie la dégradation du messenger *pnp* codant l'exoribonucléase PNPase (cf. § I-2B)(Hajnsdorf *et al.*, 1994).

La RNase III joue un rôle dans le processus de dégradation des ARNm en clivant les messagers au niveau de structures secondaires, facteurs inhibiteurs des autres nucléases. Cette protéine n'est cependant pas l'enzyme clé de ce processus. La dégradation de la majorité des messagers de la cellule est initiée par la deuxième endoribonucléase majeure chez *E. coli* : la RNase E.

## B) La RNase E

La RNase E est codée par le gène *rne* localisé à 24,58 minutes du chromosome d'*E. coli*. Cette endonucléase de 1061 acides aminés se divise en deux domaines fonctionnels (cf. §III-2). La première moitié de la protéine constitue le domaine amino-terminal (NTH). Il porte l'activité catalytique qui clive spécifiquement l'ARN simple brin (Ehretsmann *et al.*, 1992b). La deuxième moitié de la protéine contient, entre autres, les sites d'interaction avec les autres composants du dégradosome. Impliquée dans de nombreux processus cellulaires (cf. §III-3), elle joue un rôle important dans la dégradation des ARNm. A partir des données accumulées au cours de ces vingt dernières années, il est établi que la dégradation de la plupart des ARNm est initiée par le clivage endonucléolytique de la RNase E (Kushner, 2002; Regnier and Arraiano, 2000).

Bien qu'elle soit capable de couper des ARNm aux extrémités triphosphorylées, le substrat préférentiel de la RNase E est une extrémité 5' monophosphorylée simple brin (Mackie, 1998). La reconnaissance de cette extrémité est indépendante du domaine carboxy-terminal de la protéine (Jiang *et al.*, 2000). La comparaison de séquences des sites de clivages présents dans les différents substrats de la RNase E n'a pas mis en évidence de séquences spécifiquement reconnues par l'enzyme. Une simple région riche en nucléotides A/U suffit à définir un site potentiel, quel que soit l'agencement des bases (Lin-Chao *et al.*, 1994; McDowall *et al.*, 1994). La présence d'un G en position -2 par rapport à la coupure semble favoriser l'efficacité du clivage alors qu'un U en position -5 aurait l'effet inverse (Kaberdin, 2003; Redko *et al.*, 2003). L'activité de la RNase E est modulée par la présence de structures secondaires stables en amont ou en aval de la région du site de clivage. Leur rôle serait de maintenir le site principal de clivage dans une région simple brin et de limiter l'accès à la RNase E à d'autres sites secondaires potentiels (Coburn and Mackie, 1999; Mackie *et al.*, 1997). Le fait que la RNase E soit capable d'initier, même à faible efficacité, la dégradation de molécules dont les extrémités sont triphosphorylées ou séquestrées dans des structures secondaires suggère deux mécanismes d'action différents (cf. figure 1). Un premier modèle appelé « tethering » implique que la RNase E agisse sous forme d'un dimère. Selon ce modèle, le site de reconnaissance d'une des deux sous-unités du dimère fixe l'extrémité 5' triphosphorylée simple brin de l'ARNm au niveau du phosphate pendant



**Figure 1: Mécanismes d'action de la RNase E.** (A) Modèle « 5' tethering ». L'extrémité triphosphorylée de l'ARNm est reconnue par une sous-unité (1) d'un dimère de RNase E qui fixe le substrat pendant que la deuxième sous-unité (2) le coupe au niveau du site de clivage. L'extrémité 5' monophosphorylée est alors retenue pour que la première sous-unité puisse cliver un second site plus en aval. (B) Modèle de l'entrée interne. Lorsque l'extrémité 5' du messenger est sous la forme double brin ou qu'il y a une structure secondaire gênant la RNase E, celle-ci est capable de reconnaître directement les sites de clivages et les éléments environnants modulateurs (comme une tige-boucle). (NB: La RNase E est représentée ici associée aux protéines du dégradosome; figure adaptée à partir de Marchand *et al.*, 2001 et Baker and Mackie, 2003).

que la deuxième sous-unité coupe le substrat au niveau du site spécifique de clivage. La coupure génère une extrémité 5' monophosphorylée qui constitue un substrat privilégié pour la RNase E. La fixation de cette nouvelle extrémité permet à la première sous-unité d'atteindre un nouveau site de clivage situé plus en aval.

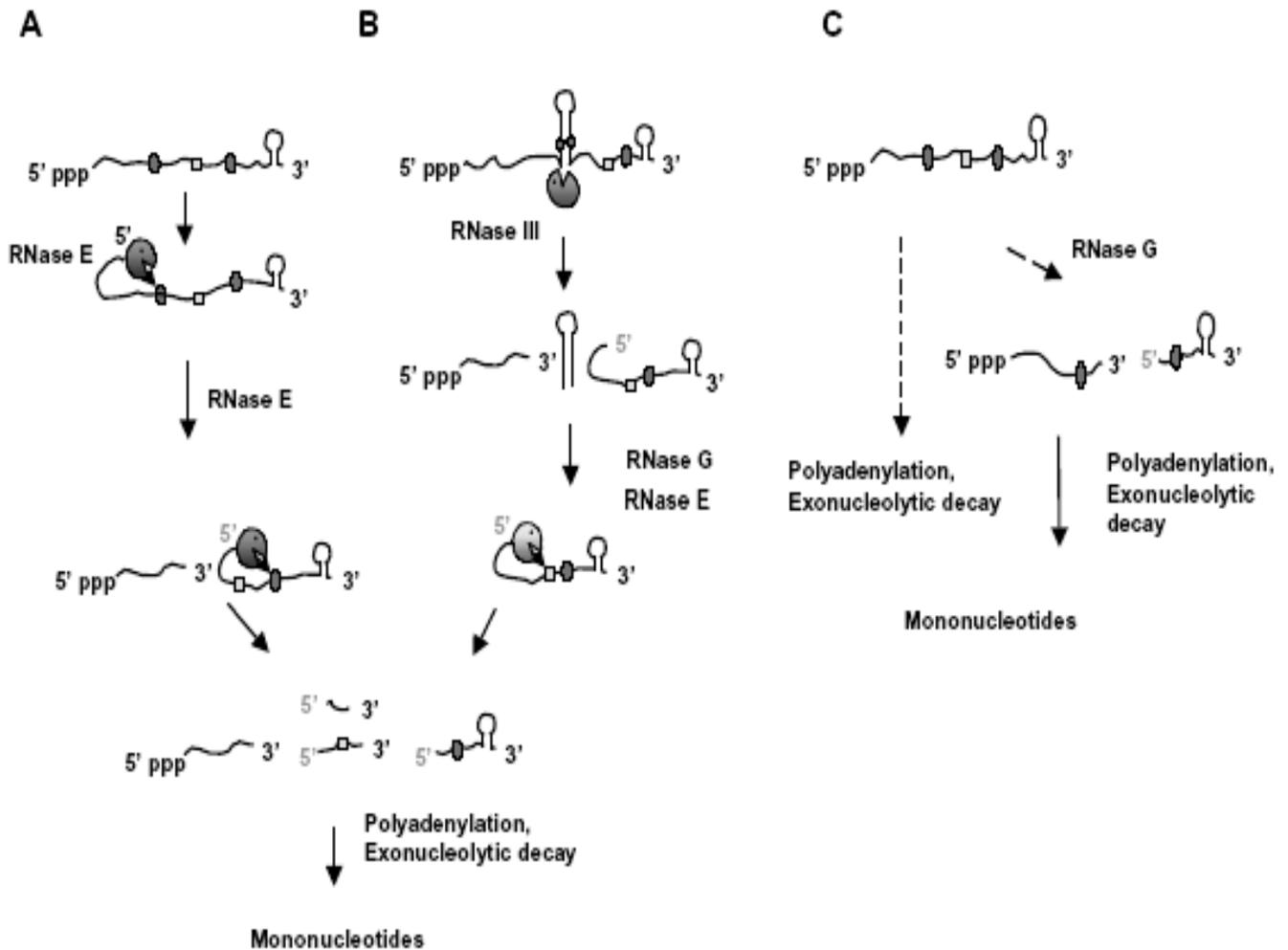
Le deuxième modèle propose une reconnaissance de l'ARNm par l'un des domaines catalytiques du dimère directement au niveau de séquences internes proches du site de clivage. Celui-ci serait coupé par le deuxième domaine catalytique. Ce modèle d'« entrée interne » permet à la RNase E de cliver des substrats malgré la présence de structures stabilisatrices ou l'absence de nucléotides non appariés en 5' (Baker and Mackie, 2003; Bouvet and Belasco, 1992; Joyce and Dreyfus, 1998). La reconnaissance d'une extrémité 5' ainsi que les modèles d'action proposés suggèrent une directionnalité 5'-3' de la RNase E, ce qui est en accord avec le fait que les ARNm peuvent être dégradés avant la fin de leur synthèse (Schlessinger *et al.*, 1977). Cependant, cette propriété ne semble pas acquise. En effet, des travaux récents montrent que lorsque deux sites de clivage se suivent, le clivage du site situé en 5' requiert au préalable celui du site en position 3'. La réciproque n'étant pas vraie, ces résultats suggèrent que la RNase E possède une directionnalité intrinsèque 3'-5'. Cependant, il est important de noter que ces expériences ont été réalisées *in vitro* sur de petits oligonucléotides et avec une RNase E dépourvue de son domaine carboxy-terminal. Il n'est donc pas évident que cette observation soit vraie pour un ARNm entier ou en cours de traduction. La possibilité que la RNase E agisse selon les deux directions reste envisagée. Le choix de celle-ci pourrait dépendre de la position des sites de clivage sur l'ARNm (5'-UTR, séquence codante ou 3'-UTR) (Feng *et al.*, 2002).

### C) La RNase G : une endonucléase minoritaire

La protéine RNase G est codée par le gène *rng* anciennement appelé *cafA* et localisé à 73,2 minutes du chromosome d'*E. coli*. Cette endoribonucléase, non essentielle pour la cellule, présente une forte homologie avec le domaine amino-terminale de la RNase E. Probablement active sous forme dimérique (Briant *et al.*, 2003), la RNase G coupe l'ARN simple brin au niveau de régions riches en A/U et son activité est dépendante d'une extrémité 5' monophosphorylée non appariée (Tock *et al.*, 2000). Elle est impliquée dans la

maturation de l'ARN ribosomique 16S en collaboration avec la RNase E et participe également à la dégradation de certains ARNm. Le premier exemple décrit est celui de l'ARNm *adhE* codant une alcool déshydrogénase (Umitsuki *et al.*, 2001). La demi-vie de ce messager dans une souche *rng<sup>-</sup>* est augmentée d'un facteur 2,5 alors qu'aucun effet n'est observé sur la stabilité d'autres messagers. Une étude plus globale de l'expression des gènes par la technique des puces à ADN a permis d'identifier seulement 11 gènes dont l'expression est spécifiquement contrôlée par la RNase G. Parmi eux, on note la présence du gène *eno* codant l'Enolase (enzyme de la glycolyse et composant du dégradosome, cf. § II-2Ba), et le gène *rng* lui-même (Lee *et al.*, 2002). Ceci peut laisser penser à un mécanisme d'autorégulation comme celui observé pour la RNase E (cf. § III-4Ba). Des expériences de complémentation montrent que la surexpression de la RNase G restaure partiellement la croissance d'une souche *ams* dont l'activité RNase E est abolie (Deana and Belasco, 2004; Wachi *et al.*, 1997). Des études ont montré que la croissance d'une telle souche pouvait être efficacement compensée grâce à une augmentation de la quantité de RNase G (x50) dans la cellule (Lee *et al.*, 2002). Cependant, il semble que cette compensation efficace soit due à la présence d'une extension non naturelle à l'extrémité amino-terminale de la protéine RNase G surexprimée (Deana and Belasco, 2004). Les auteurs suggèrent que la présence d'extension amino- ou carboxy-terminale de la protéine altère ou diminue la spécificité de la RNase G. Celle-ci devient alors capable de couper des ARN normalement clivés par la RNase E. La protéine RNase G semble *in vivo* participer de façon mineure à la maturation de l'ARN ribosomique 5S bien que des expériences *in vitro* montrent que la protéine purifiée ne clive pas l'ARN 9S précurseur (Ow *et al.*, 2003). La RNase G n'est en revanche pas capable de restaurer un défaut de maturation de l'ARN M1 dans une souche dont l'activité de la RNase E est abolie, ni celui de la maturation des ARN de transfert. Ces deux processus nécessitent la présence de la RNase E dans la cellule. Ces deux endoribonucléases qui partagent des propriétés similaires semblent donc jouer des rôles différents dans la cellule.

Le chemin de dégradation endonucléolytique est principalement assuré par les endoribonucléases RNase III et RNase E (cf. figure 2). L'action combinée de ces deux enzymes de dégradation génère des fragments d'ARNm dépourvus d'éléments



**Figure 2:** La dégradation des ARNm chez *E. coli* (d'après Ow *et al.*, 2003); (A) Initiation de la dégradation par la RNase E. Le premier clivage constitue l'étape limitante du processus du fait de la nature triphosphorylée de l'extrémité 5' de l'ARNm. Les intermédiaires générés ne possèdent qu'un phosphate en 5'. Ils sont alors rapidement clivés par la RNase E et/ou la RNase G. Les morceaux d'ARN sont ensuite pris en charge par la voie exonucléolytique où la PNPase, la RNase II et l'oligoribonucléase dégradent leur substrat en mononucléotides. La synthèse de queue polyA par la PAP I est parfois nécessaire si les fragments contiennent des structures secondaires stables. (B) L'initiation de la dégradation peut parfois être initiée par la RNase III. Le clivage au niveau de séquences appariées élimine des structures secondaires inhibitrices et génère des fragments aux extrémités 5' monophosphorylées. Ces fragments sont ensuite dégradés par la RNase E et/ou la RNase G puis rejoignent la voie exonucléolytique. (C) Dégradation indépendante de la RNase E. Le clivage endonucléolytique, s'il y en a un, est assuré par la RNase G. Le messenger peut être entièrement dégradé par la voie exonucléolytique impliquant le processus de polyadénylation.

stabilisateurs. Les extrémités 5' issues des coupures endogènes sont monophosphorylées et les extrémités 3'-OH dépourvues de structures secondaires. La dégradation de ces morceaux d'ARNm peut alors se poursuivre via la voie exonucléolytique jusqu'à la complète disparition de la molécule de départ.

## I - 2 - Les exonucléases

La dégradation par les exonucléases se fait par digestion de l'ARNm de manière processive, libérant ainsi des produits mononucléotidiques. Alors que deux types d'exonucléases ont été caractérisés chez les Eucaryotes, aucune exonucléase dégradant l'ARN à polarité 5'-3' n'a été identifiée chez les procaryotes (Beelman and Parker, 1995; Deutscher and Li, 2001). Parmi les huit exonucléases 3'-5' présentes chez *E. coli*, on distingue essentiellement la RNase II et la Polynucléotide Phosphorylase (PNPase) qui sont impliquées dans la dégradation des ARNm.

### A) La RNase II

Le gène *rnb* codant l'exoribonucléase II est localisé à 29 minutes du chromosome d'*E. coli*. Ce gène est transcrit à partir de deux promoteurs P1 et P2. Ce dernier génère près de 75% des transcrits *rnb* de la cellule en présence d'un cofacteur qui semble requis pour l'initiation de la transcription (Zilhao *et al.*, 1996). La RNase II est une protéine de 72,5 KDa qui dégrade les ARNm de manière processive en libérant des nucléotides monophosphates (Coburn and Mackie, 1996a). Cette activité hydrolytique est dépendante du magnésium et est stimulée par la présence de cations monovalents. La fixation de l'ARN par l'enzyme se fait au niveau de son site d'interaction S1 présent dans le domaine carboxy-terminal de la protéine (Bycroft *et al.*, 1997). Ce motif extrêmement conservé dans les protéines fixant l'ARN est homologue à celui de la protéine ribosomale S1. Il est également présent dans la RNase E et la PNPase. La RNase II est impliquée dans les étapes finales de maturation des extrémités 3' des ARN de transfert. Elle intervient également dans la maturation de l'ARNr 5S. Sa fonction première au sein de la cellule reste la

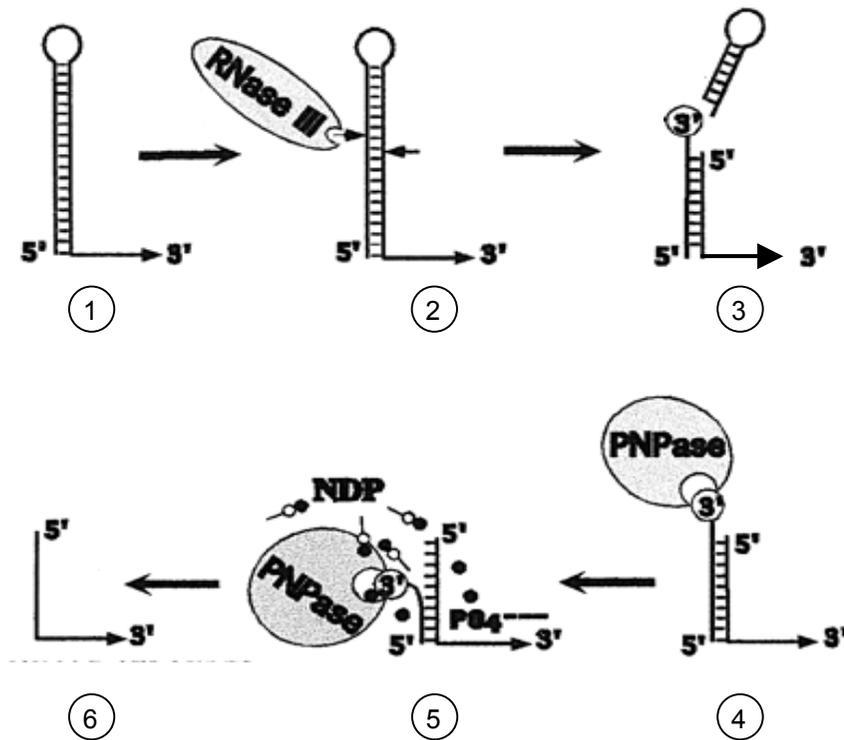
dégradation des ARNm. Elle représente 90% de l'activité exoribonucléique totale d'un extrait cellulaire (Deutscher and Reuven, 1991).

L'expression de la RNase II est modulée en fonction des conditions de croissance de la bactérie. Cette régulation est dépendante du gène *gmr* dont la séquence codante est située en aval du gène *rnb* lui-même. La protéine Gmr, par un mécanisme encore inconnu, agit sur la stabilité de la protéine RNase II (Cairrao *et al.*, 2001). L'expression de la RNase II est également contrôlée au niveau de la stabilité de son messenger. Cette régulation post-transcriptionnelle fait également intervenir deux autres enzymes de la dégradation : la RNase E et, de manière indirecte, la RNase III. Elle est étroitement liée avec celle du messenger codant la deuxième exonucléase majeure chez *E. coli*, la PNPase (Zilhao *et al.*, 1995; Zilhao *et al.*, 1996).

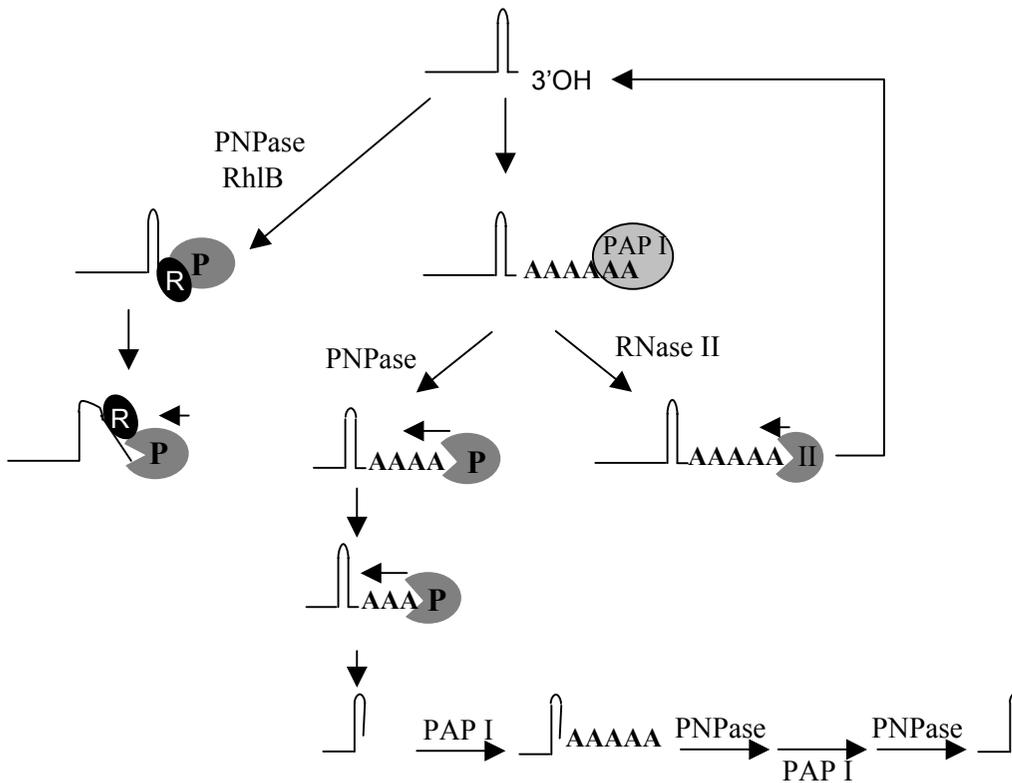
### B) La Polynucléotide Phosphorylase

La PNPase est une exonucléase de type phosphorolytique qui génère des mononucléotides diphosphates à partir d'une extrémité 3'-OH simple brin d'un ARNm (Coburn and Mackie, 1996b). Bien qu'elle soit également impliquée dans le contrôle de la qualité des ARNt et ARNr, son rôle majeur dans la cellule est la dégradation des ARNm (Donovan and Kushner, 1986). Active sous la forme d'un homotrimère, chacune des trois sous-unités qui la constituent a un poids moléculaire de 77 KDa. Cet homotrimère forme un pore par lequel l'ARN serait susceptible de passer (Symmons *et al.*, 2002).

La PNPase est codée par le gène *pnp* localisé à 71 minutes du chromosome d'*E. coli*. Ce gène est transcrit à partir de deux promoteurs. Le premier est situé juste en amont de la séquence codante et génère un transcrite unique *pnp*. Le second est le promoteur du gène *rpsO* donnant un ARNm polycistronique *rpsO-pnp* (Portier and Regnier, 1984). Les deux séquences codantes du polycistron sont séparées après le clivage de celui-ci par la RNase III au niveau d'une structure secondaire présente dans la région intergènique du messenger. Les deux transcrits *pnp* et *rpsO* sont alors traduits et dégradés indépendamment. La PNPase participe au contrôle de son expression en dégradant son propre messenger. Une accumulation du messenger *pnp* dans une souche *rnc<sup>-</sup>* montre que cette dégradation dépend du clivage initial de l'ARNm par la RNase III (Robert-Le Meur and Portier, 1992). Ce



**Figure 3 :** Modèle de régulation de la stabilité du messenger *pnp* ( Jarrige *et al.*, 2001). L'extrémité 5'-UTR du messenger *pnp* est fortement structurée (1). La dégradation de cet ARN est initiée par le clivage de la séquence appariée par la RNase III (2). Le clivage asymétrique génère une extrémité 3' sortante accessible à la PNPase (3-4). La PNPase digère alors son propre messenger (5) et libère un fragment aux extrémités 5' et 3' favorable à une dégradation rapide(6).



**Figure 4 : La dégradation des structures secondaires.** La présence de structures secondaires tels que les terminateurs de transcription Rho-indépendants ou les séquences REP constituent de véritables barrières contre les exonucléases. La PolyA polymérase I (PAP I) synthétise des queues polyA en 3' des messagers. Ces extensions permettent l'ancrage de la PNPase et de la RNase II. La PNPase est capable de dégrader ces structures secondaires après plusieurs cycles de polyadénylation. Après chaque cycle, un petit bout de la structure est éliminé jusqu'à la disparition totale de la séquence appariée. La RNase II en revanche reste bloquée en aval de cette structure. La dégradation des séquences REP passe également par une voie indépendante de la polyadénylation. C'est l'hélicase à ARN RhIB qui, en présence d'ATP, déroule les structures et fournit à la PNPase un substrat simple brin.

clivage permet de supprimer la structure en tige-boucle responsable de la stabilité du messager en formant un duplexe ARN-ARN présentant une extrémité 3'-OH sortante. Cette extrémité servirait alors d'ancrage à la PNPase qui dégraderait le premier brin du duplex (cf. figure 3)(Jarrige *et al.*, 2001). Comme pour la RNase III et la RNase E, l'expression de la PNPase dépend d'un processus d'autorégulation.

### C) La RNase II et la PNPase : un comportement différent

La RNase II et la PNPase sont les deux enzymes majeurs de la dégradation exonucléolytique des ARNm chez *E. coli*. L'inactivation d'un seul de ces enzymes entraîne une modification de 46,4 % du niveau global des ARNm de la cellule (Mohanty and Kushner, 2003). En revanche, dans un mutant *rnb<sup>-</sup> pnp<sup>-</sup>*, on observe une augmentation de la stabilité des ARNm associée à une létalité des cellules (Donovan and Kushner, 1986). Ces résultats suggèrent que les deux exonucléases, non essentielles dans les conditions normales de croissance, sont impliquées dans un même processus et qu'elles agissent de manière redondante. Bien que ces deux enzymes possèdent des activités différentes, la présence d'une extrémité 3'-OH d'une longueur minimale de six nucléotides non appariés est requise pour amorcer la dégradation du substrat (Coburn and Mackie, 1996b; Spickler and Mackie, 2000). Diverses études biochimiques ont montré que l'activité de ces deux enzymes était partiellement ou complètement inhibée par la présence de structures secondaires tels que des terminateurs de transcription de type Rho-indépendant ou des séquences REP (McLaren *et al.*, 1991; Newbury *et al.*, 1987). Le comportement de ces deux enzymes n'est cependant pas le même face aux structures rencontrées. Alors que la RNase II est totalement bloquée par la présence d'une tige-boucle, la PNPase est capable de franchir des structures secondaires plus ou moins stables selon la taille et la séquence appariée (Braun *et al.*, 1996; Guarneros and Portier, 1990; Spickler and Mackie, 2000). Le franchissement de telles structures est favorisé par la PolyA polymérase I (PAP I) (cf. figure 4). Cette enzyme synthétise principalement des queues polyA aux extrémités 3' des produits de dégradation de la voie endonucléolytique. Cette polyadénylation aurait pour but de fournir à la PNPase et à la RNase II une extrémité 3' suffisamment longue pour leur ancrage au substrat. Plusieurs cycles de polyadénylation permettent la dégradation

progressive par la PNPase d'une structure secondaire, même très stable. La PNPase est également capable de franchir de telles structures grâce à un deuxième enzyme : l'hélicase à ARN RhlB (cf. § II-2Bb).

Enfin, la RNase II comme la PNPase ne sont pas capables de dégrader des substrats inférieurs à une dizaine de nucléotides. Ces oligomères ainsi libérés par les exonucléases sont alors pris en charge par l'oligoribonucléase pour une digestion complète du substrat. L'oligoribonucléase est essentielle à la survie de la bactérie ce qui suggère que la présence de petits morceaux d'ARN non fonctionnels peut être délétère pour la cellule (Ghosh and Deutscher, 1999; Yu and Deutscher, 1995).

Les études menées chez les bactéries et particulièrement chez *E. coli* ont permis de dégager un schéma général des mécanismes mis en jeu au cours de la dégradation des ARNm et d'en identifier les nombreux partenaires protéiques. Parmi eux, on retrouve l'endoribonucléase et l'exoribonucléase les plus importantes de ce processus cellulaire associées au sein d'un unique complexe protéique : le dégradosome d'*E. coli*. La découverte d'un tel complexe renforce l'idée d'une étroite collaboration entre ces deux types d'enzymes aux mécanismes d'action complémentaires.

## II - Les enzymes de la dégradation regroupées au sein d'un même complexe : le dégradosome

### II - 1 - La découverte du dégradosome

L'existence d'un complexe protéique contenant à la fois une endoribonucléase et une exoribonucléase a été mise en évidence en parallèle par deux équipes de recherche. La première recherchait une activité de fixation de l'ARN associée à la PNPase tandis que la deuxième réalisait une purification native de la RNase E, extrêmement sensible à la protéolyse (Carpousis *et al.*, 1994; Py *et al.*, 1994). Ces deux approches biochimiques ont révélé que la RNase E et la PNPase appartiennent à un même complexe protéique contenant deux autres protéines majeures. Le séquençage de leur extrémité amino-terminale a permis d'identifier l'hélicase à ARN RhlB et l'enzyme glycolytique Enolase

(Miczak *et al.*, 1996; Py *et al.*, 1996). Ce complexe multiprotéique a été nommé le dégradosome.

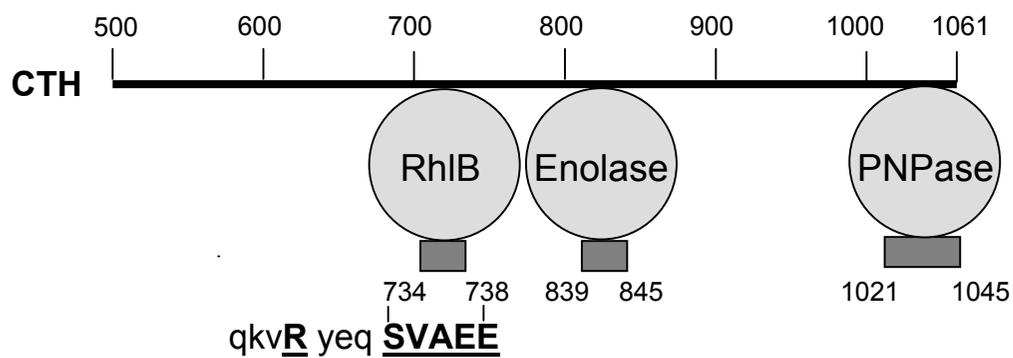
Des expériences de co-localisation des protéines après un marquage par des anticorps couplés à des billes d'or montrent que la RNase E, la PNPase, RhlB et l'Enolase co-localisent toutes à la membrane interne de la cellule. La délétion du domaine carboxy-terminal de la RNase E, plateforme du dégradosome, entraîne une diffusion de RhlB dans le cytoplasme. Ces expériences semblent être la preuve que le dégradosome existe *in vivo* (Liou *et al.*, 2001).

## II - 2 - L'organisation du complexe et rôles des protéines associées

### A) Les interactions protéines-protéines au sein du dégradosome

La RNase E constitue le cœur structural du dégradosome. La délétion de la moitié carboxy-terminale de la RNase E se traduit par la perte complète des interactions avec les autres protéines du dégradosome. L'ensemble des interactions protéine-protéine se situe donc dans le domaine carboxy-terminal qui constitue la base de l'assemblage du complexe. Des études biochimiques ainsi que des expériences de double hybride chez la Levure ont été réalisées à partir de peptides tronqués de la RNase E. Ces études ont permis de délimiter les régions d'interaction entre l'endoribonucléase et les autres protéines du dégradosome (cf. figure 5)(Callaghan *et al.*, 2004; Vanzo *et al.*, 1998). La protéine RhlB interagit avec la RNase E au niveau des résidus 734 à 738. Cette région est constituée des acides aminés SVAEE nécessaires à cette interaction. Les données présentées dans l'article I du chapitre II « Résultats et Discussion » montrent que l'arginine en position 730 est également requise pour la fixation spécifique de RhlB (Khemici *et al.*, 2004).

Proche de ce site de liaison se trouve celui de l'Enolase. La région minimale nécessaire à la présence de l'Enolase complexée au CTH de la RNase E est comprise entre les résidus 839 et 845. Aucune protéine Enolase n'a été observée *in vitro* dans un complexe formé par RhlB et le CTH de même qu'un complexe CTH-Enolase ne semble pas fixer d'hélicase. Il semble que la fixation simultanée de ces deux protéines au CTH soit difficile voire impossible. Ces résultats peuvent s'expliquer par un encombrement allostérique entre les



**Figure 5: L'organisation du dégradosome.** La moitié carboxy-terminale de la RNase E constitue l'échafaudage du dégradosome. Les sites d'interactions entre la RNase E et les autres composants du complexe ont été déduits d'après Vanzo *et al.*, 1998 et Callaghan *et al.*, 2004. Les acides aminés du CTH impliqués dans l'interaction avec RhlB ont été soulignés.

deux protéines dû à la proximité de leur site d'interaction. Lors de la purification partielle de la RNase E, ces deux protéines sont pourtant toujours présentes simultanément. Leur copurification avec la RNase E peut être due à l'existence de deux sous-complexes contenant chacun une seule des deux protéines. La RNase E étant capable de former des dimères et des tétramères, ces deux protéines peuvent coexister au sein d'un dimère en se fixant chacune sur un domaine carboxy-terminal différent (Callaghan *et al.*, 2003; Callaghan *et al.*, 2004).

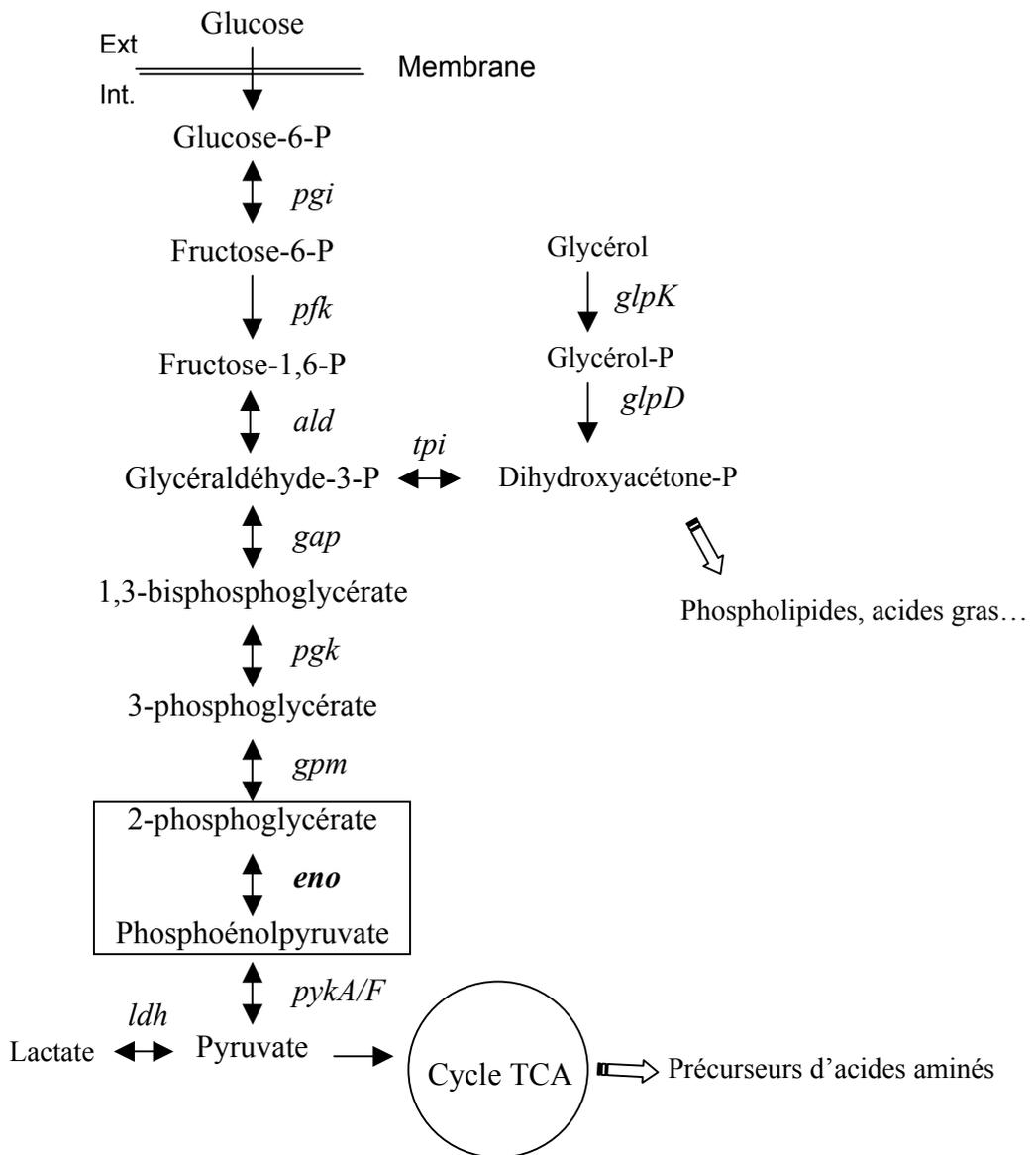
Enfin, la région acide à l'extrémité carboxy-terminale du CTH de la RNase E contient les résidus impliqués dans l'interaction avec la PNPase. La présence des acides aminés 1021 à 1045 suffisent à la formation du complexe PNPase-CTH.

Aucune interaction entre l'Enolase et la PNPase ou RhlB n'a été mise en évidence. En revanche, RhlB interagit physiquement avec la PNPase via son domaine carboxy-terminal (Liou *et al.*, 2002).

## B) Les protéines majeures du dégradosome

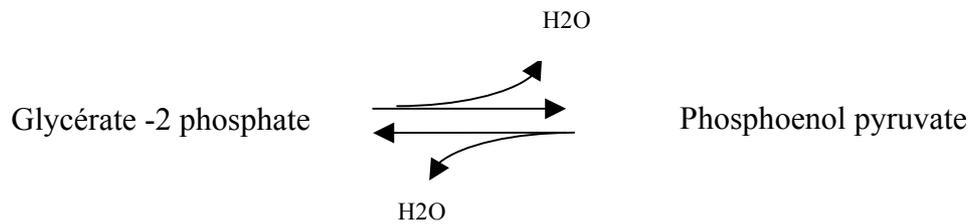
### a) L'Enolase

L'Enolase est une protéine de 48 KDa codée par le gène *eno* situé à 62,6 minutes du chromosome d'*E. coli*. Elle joue un rôle majeur dans le métabolisme énergétique de la cellule puisqu'elle intervient dans la voie de la glycolyse. Cette voie permet de produire des intermédiaires métaboliques à partir du glucose. Ces métabolites sont utilisés pour la synthèse des constituants cellulaires comme les phospholipides des membranes. Le chemin de la glycolyse permet également de générer du pyruvate, principale molécule qui alimente le cycle de Krebs. C'est à partir du cycle de Krebs que l'ensemble des précurseurs des acides aminés est synthétisé. En absence de glucose, la bactérie est capable d'utiliser d'autres sources de carbone comme le glycérol (cf. figure 6).



**Figure 6 :** La glycolyse chez *E. coli*. Le glucose est phosphorylé lors de son internalisation par les systèmes de transporteurs PTS. Le glucose-P entre alors dans la voie de la glycolyse pour donner du pyruvate. Le pyruvate alimente le cycle de Krebs qui fournit les précurseurs nécessaires à la synthèse des acides aminés et des constituants membranaires. En absence du gène *eno* codant l'Enolase, la glycolyse est bloquée au niveau de la réaction encadrée. La conversion du lactate présent dans le milieu en pyruvate permet au cycle de Krebs de fonctionner. Les réactions en amont du blocage de la glycolyse sont possibles par la conversion du glycéról en dihydroxyacétone-P. Ce métabolite est également requis pour la synthèse des constituants membranaires cellulaires tels que les phospholipides.

L'Enolase catalyse la réaction suivante de manière réversible :



La caractérisation de mutants de la glycolyse montre que la croissance d'une bactérie *eno<sup>-</sup>* nécessite la présence simultanée dans le milieu de succinate (ou de lactate) comme source de carbone et de glycérol. La présence du glucose dans ces conditions est toxique pour la cellule (Irani and Maitra, 1974; Irani and Maitra, 1977).

L'Enolase a été identifiée comme un composant majeur du dégradosome (Carpousis *et al.*, 1994; Miczak *et al.*, 1996; Py *et al.*, 1996). Ceci suggère que cet enzyme du métabolisme joue également un rôle dans le processus de dégradation des ARNm. L'absence de cette protéine au sein d'un dégradosome minimal fonctionnel *in vitro* suggère toutefois que ce rôle n'est pas crucial. Le rôle de l'Enolase dans la dégradation des ARNm est jusqu'à présent encore inconnu. L'hypothèse que l'Enolase puisse être un lien entre la dégradation des ARNm et le métabolisme semble la plus logique. La possibilité qu'elle soit capable de lier l'ARN suggère qu'elle pourrait diriger le dégradosome vers des ARNm spécifiques (al-Giery and Brewer, 1992; Kuhnel and Luisi, 2001). Par ailleurs, le site d'interaction entre RhlB et la RNase E étant localisé dans une région proche de celui de l'Enolase, il a été proposé que cette dernière puisse avoir un rôle allostérique modifiant les interactions de la RNase E avec les autres composants du dégradosome (Callaghan *et al.*, 2004). Enfin, un rôle uniquement structural n'est pas exclu.

Une partie des travaux de recherche réalisés au cours de ma thèse a été consacrée à la détermination du rôle de l'Enolase au sein du dégradosome. Les résultats de ces travaux sont présentés dans la première partie du chapitre II.

*b) Les protéines RhlB et PNPase collaborent de manière étroite*

La protéine RhlB, codée par le gène non essentiel *rhlB* (Khemici and Carpousis, 2004), est une hélicase à ARN appartenant à la famille des hélicases à motif DEAD (pour Asp-Glu-Ala-Asp) (Kalman *et al.*, 1991). Ce motif, extrêmement conservé au sein des protéines de cette famille, est requis pour l'hydrolyse de l'ATP nécessaire à leur activité hélicasique (Pause *et al.*, 1993). Près de 80% des protéines RhlB de la cellule semble complexé au CTH de la RNase E *in vivo* (Liou *et al.*, 2001). De plus, l'activité de RhlB est fortement stimulée par son interaction avec la région centrale de la RNase E, et ce indépendamment de l'activité catalytique de cette dernière (Coburn *et al.*, 1999; Py *et al.*, 1996; Vanzo *et al.*, 1998). Ceci suggère que RhlB n'est active qu'au sein du dégradosome. Cependant, cette hypothèse est remise en question par des expériences *in vitro* qui montrent que RhlB pourrait dérouler des structures secondaires en absence de tout autre partenaire protéique (Liou *et al.*, 2002). L'étroite collaboration de RhlB et de la PNPase a été clairement mise en évidence par des expériences *in vitro* réalisées, entre autres, à partir de dégradosomes reconstitués. Ces expériences montrent que la dégradation exonucléolytique d'un ARN contenant une structure secondaire stable n'est possible qu'en la présence simultanée d'ATP et de ces deux protéines complexées (Coburn *et al.*, 1999) ou non à la RNase E (Liou *et al.*, 2002). Le rôle de RhlB serait alors de dérouler ces structures secondaires qui bloquent la dégradation 3'-5' du substrat par la PNPase. Des études récentes réalisées sur plusieurs ARNm contenant des structures secondaires de type REP confirment ce modèle et montre pour la première fois le rôle de RhlB *in vivo* (Khemici and Carpousis, 2004). Ces travaux mettent en évidence deux voies de dégradation exonucléolytique par la PNPase. L'une est dépendante de RhlB, tandis que l'autre nécessite la présence de la polyA polymérase I. Une troisième voie de dégradation semble également impliquée dans la dégradation des séquences REP. Cette voie polyA dépendante fait intervenir une nucléase qui n'est ni la PNPase, ni la RNase II (Khemici and Carpousis, 2004). Une étude récente montre qu'il s'agit de la RNase R, une exonucléase de la même famille que la RNase II (Cheng and Deutscher, 2005)

### C) Les protéines minoritaires du complexe

#### a) La polyphosphate kinase PPK

La polyphosphate kinase a été identifiée comme un composant à part entière du dégradosome (Blum *et al.*, 1997; Carpousis *et al.*, 1994; Py *et al.*, 1994). Cet enzyme possède une activité de polymérisation du phosphate en catalysant la réaction réversible suivante (Ahn and Kornberg, 1990) :



Aucune modification de la stabilité globale des ARNm n'a été observée dans une souche délétée pour le gène codant PPK. En revanche, une augmentation de la demi-vie du messenger *ompA*, substrat de la RNase E, semble indiquer que cette protéine non essentielle jouerait un rôle modéré dans la dégradation de certains ARNm. Les extrémités 5' des ARNm étant pour la plupart triphosphorylées et le substrat préférentiel de la RNase E étant une extrémité 5' ne possédant qu'un phosphate, l'hypothèse que PPK puisse modifier la nature de l'extrémité 5' des ARNm a été proposée. Bien que PPK soit capable de fixer l'ARN, aucune modification des extrémités 5' et 3' n'a cependant été observée. Il semblerait que PPK joue plutôt un rôle dans la régulation de l'activité du dégradosome en maintenant celui-ci dans un microenvironnement énergétique favorable. Cette hypothèse découle de plusieurs observations : i) PPK est capable de dégrader le polyphosphate en présence d'ADP, ii) le polyphosphate inhibe l'activité du dégradosome, iii) la PNPase est inhibée en présence d'ADP, iiiii) l'activité de RhlB dépend de la présence d'ATP (Blum *et al.*, 1997).

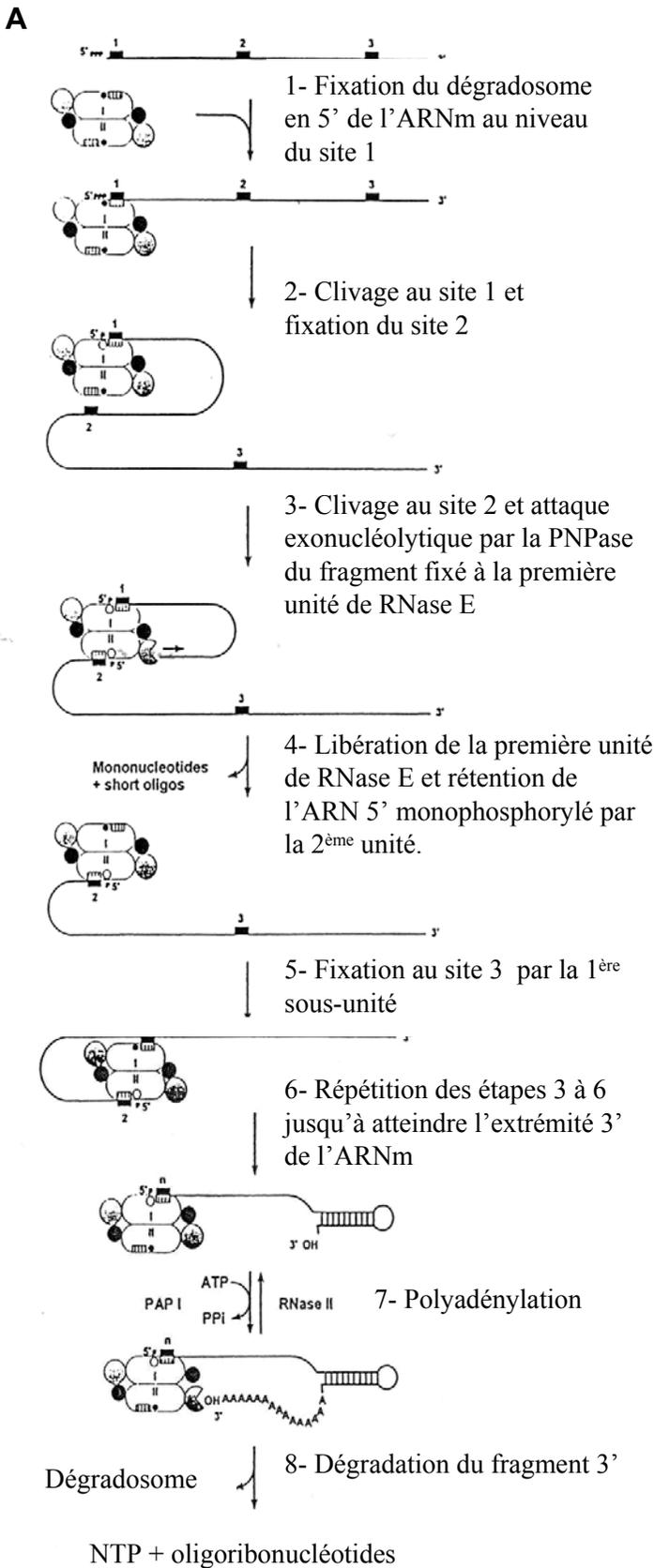
#### b) Les protéines chaperonnes DnaK et GroEL

Les protéines DnaK et GroEL sont les deux protéines chaperonnes majeures du système de protection induit lors d'un choc thermique élevé (Lund, 2001). La protéine DnaK joue un rôle pléiotropique dans la cellule. Elle intervient notamment dans la modulation de l'expression du facteur de transcription sigma 32 (Bukau, 1993). La protéine GroEL,

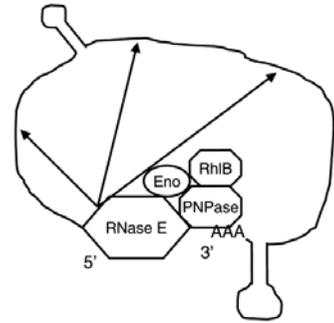
essentielle pour la survie de la bactérie, est impliquée dans le processus de repliement et d'assemblage des protéines (Fayet *et al.*, 1989; Martin *et al.*, 1993). Ces deux protéines ont été identifiées comme des composants minoritaires du dégradosome. Cependant, leur rôle au sein du dégradosome n'est pas élucidé (Carpousis *et al.*, 1994; Miczak *et al.*, 1996). Seules les co-purifications réalisées à partir de cellules exprimant une RNase E thermosensible contiennent la protéine GroEL. Cette observation supporte l'hypothèse que ces protéines ne co-purifieraient qu'avec des complexes altérés ou en cours d'assemblage.

### II - 3 - Le rôle du dégradosome

A travers les études menées au cours de ces dix dernières années, le rôle précis du dégradosome n'est pas complètement défini. Des données biologiques et biochimiques montrent clairement que ce complexe multi-enzymatique joue un rôle non négligeable dans la dégradation des ARNm. Egalement impliqué dans la dégradation des ARN ribosomiques, il n'est cependant pas nécessaire à leur maturation (Bessarab *et al.*, 1998; Coburn *et al.*, 1999; Lopez *et al.*, 1999). L'hypothèse proposée quant au rôle du dégradosome est que celui-ci permettrait la dégradation rapide et efficace des ARN. Cette hypothèse est confortée par le fait que la stabilité globale chimique et fonctionnelle des ARNm est doublée en absence du CTH de la RNase E et que l'absence de chacune des trois autres protéines du complexe entraîne une stabilité globale ou spécifique de messagers (Bernstein *et al.*, 2004; Lopez *et al.*, 1999). Deux modèles d'action du dégradosome sont proposés. Le premier repose sur le modèle « 5' tethering » suggéré pour la RNase E (cf. § I-1B). Le dégradosome fixe l'extrémité 5' de l'ARNm par une sous-unité RNase E. Le clivage de celui-ci par la deuxième sous-unité libère alors une extrémité 3'-OH libre pour la PNPase du complexe. Le fragment généré est alors complètement dégradé grâce au concours de RhlB et de la PolyA polymérase I (cf. figure 7A). Le deuxième modèle suggère que l'ARNm est fixé au dégradosome à la fois par son extrémité 5' via la RNase E et son extrémité 3' par la PNPase. L'ARN serait simultanément dégradé par ses deux extrémités (cf. figure 7B). La pseudocircularisation du substrat suppose le blocage des ribosomes en cours de traduction. Ce modèle s'appliquerait préférentiellement à des ARNm peu ou pas traduits. Ces deux modèles ne sont pas exclusifs.



**B**



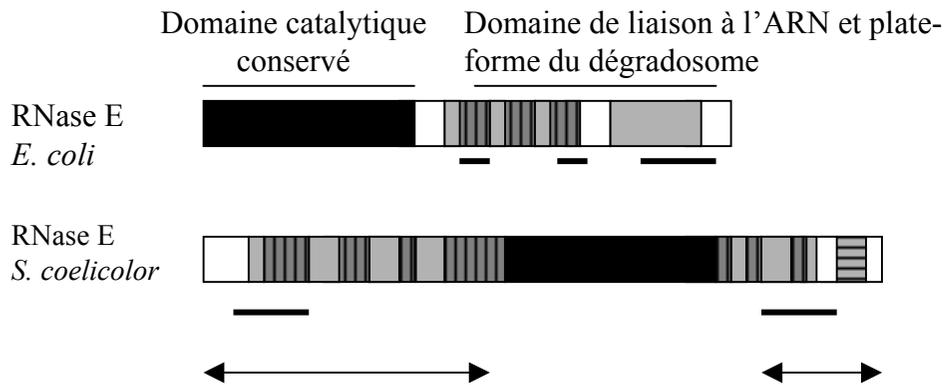
**Figure 7 : Modèles d'action du dégradosome.** (A) modèle 5' tethering (Coburn et Mackie, 1999). (B) Modèle de pseudocircularisation de l'ARNm. Les extrémités 5' et 3' sont attaquées simultanément. Les flèches représentent les sites de coupure internes de la RNase E (Kushner, 2002).

Le fait que le domaine amino-terminal de la RNase E soit nécessaire et suffisant pour la survie de la bactérie montre que la présence du dégradosome dans la cellule n'est pas primordiale. En revanche, il semble que la possession d'un tel complexe de dégradation présente un avantage sélectif. En effet, la croissance d'une souche codant une RNase E dépourvue de son domaine carboxy-terminal est largement défavorisée par rapport à celle d'une souche sauvage (Leroy *et al.*, 2002). La conservation de tels complexes chez les procaryotes ainsi que chez des organismes eucaryotes conforte cette hypothèse.

## II - 4 - L'existence de complexes de dégradation autres que le dégradosome d'*E. coli*

### A) Des complexes bactériens comme le dégradosome

Il semble que des complexes de type dégradosome soient conservés chez certaines bactéries. C'est le cas de *Rhodobacter capsulatus* chez qui un complexe similaire a été mis en évidence (Jager *et al.*, 2001). Ce complexe purifié selon le protocole mis au point pour la purification du dégradosome d'*E. coli* (Carpousis *et al.*, 2001) contient au moins quatre protéines. Le séquençage des extrémités amino-terminales de ces protéines a permis d'identifier une RNase E avec les mêmes caractéristiques que celle d'*E. coli*. En plus d'une endoribonucléase, ce complexe contient une hélicase à ARN de type boîte DEAD dont l'activité au sein du complexe est dépendante de l'ATP. Le facteur de transcription Rho est également un composant du dégradosome de *R. capsulatus*. Sa stœchiométrie au sein du complexe semble être régulée au cours de la croissance en fonction de la quantité d'oxygène dans le milieu (Jager *et al.*, 2004). Enfin, la quatrième protéine n'a pu être identifiée. Le début de la séquence protéique présente des similitudes avec celle de l'Enolase d'*E. coli* mais ne correspond pas à l'Enolase de *R. capsulatus*. Une deuxième hélicase homologue à RhlB semble appartenir au complexe, cependant l'absence de cette protéine lors de co-immunoprécipitation suggère que les interactions avec les autres protéines sont plus faibles. L'association d'une activité exonucléolytique au complexe purifié montre une possible interaction avec une protéine homologue à la PNPase. Cette hypothèse est confortée par le fait que cette protéine est reconnue par des anticorps



**Figure 8 :** Structures primaires des RNase E d'*E. coli* et de *S. coelicolor*. Le domaine catalytique conservé entre les deux protéines est représenté par le rectangle noir. Les zones grises, à rayures verticales et horizontales figurent les régions acides, riches en arginines et riches en lysines, respectivement. Les régions soulignées sont riches en prolines. Les doubles flèches délimitent les domaines nécessaires pour l'interaction entre la RNase E et la PNPase de *S. coelicolor* (Lee and Cohen, 2003).

spécifiques de la PNPase d'*E. coli*. Toutefois, si une PNPase est associée au complexe, elle ne semble pas être un composant majoritaire, contrairement à celle du dégradosome d'*E. coli*.

Un deuxième complexe de type dégradosome a été mis en évidence par des expériences de co-immunopurifications et de gradient de glycérol chez *Pseudomonas syringae*. Ce complexe contient en plus d'une RNase E, la RNase R et deux hélicases à ARN (SrmB et RhlE)(Purusharth *et al.*, 2005).

La présence d'une activité endonucléolytique de type RNase E a été mise en évidence chez *Streptomyces coelicolor* et *Streptomyces lividans* (Hagege and Cohen, 1997). Le séquençage complet du génome de *S. coelicolor* a permis d'identifier un cadre ouvert de lecture codant une protéine de 1034 acides aminés. Des expériences *in vitro* ont montré que cette protéine clive les ARN substrats de la RNase E d'*E. coli* de manière similaire. De plus, le défaut de croissance d'une souche *E. coli rne<sup>-</sup>* est supprimé par la surexpression de cette protéine. Ces résultats suggèrent que le gène, appelé *rns*, code une endonucléase de type RNase E. Cette protéine est nommée RNase ES, pour *Streptomyces*. La comparaison de la séquence protéique avec celle de la RNase E d'*E. coli* montre 36% d'identité et 58% de similarité avec la région amino-terminale catalytique de celle-ci. Des régions homologues à celles impliquées dans les interactions protéine-protéine du dégradosome sont également présentes mais l'organisation de ces régions est différente. Les régions riches en résidus arginines et prolines sont réparties de part et d'autre de ce qui semble être le domaine catalytique de la protéine RNase ES (cf. figure 8)(Lee and Cohen, 2003). La présence de ces sites potentiels d'interaction suggère l'existence d'un possible complexe protéique comme le dégradosome. Cette hypothèse est confortée par le fait que la RNase ES est capable d'interagir physiquement avec un homologue de la PNPase. Toutefois, les interactions entre ces deux protéines ont été réalisées *in vitro* avec des protéines surexprimées. L'existence d'un tel complexe *in vivo* reste à démontrer.

#### B) Des complexes eucaryotes de type « exosome »

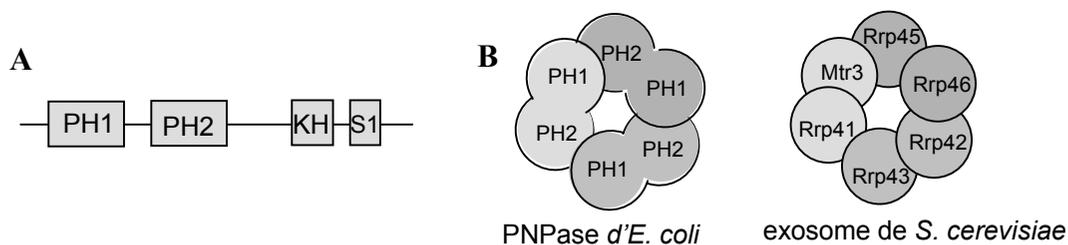
Bien que des protéines homologues à la RNase E d'*E. coli* semblent exister chez les Eucaryotes et les Archae, il semble que la dégradation des ARNm soit essentiellement médiée par des exonucléases (Franzetti *et al.*, 1997; Tourriere *et al.*, 2002).

Des complexes de dégradation, appelés exosomes, ont été mis en évidence chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Le cœur du complexe est constitué de six exoribonucléases apparentées à la famille des RNases PH et dont la structure est similaire à celle du trimère de PNPase présent dans le dégradosome d'*E. coli* (cf. figure 9). Quatre autres exonucléases présentent une activité hydrolytique homologue à celle de la RNase II. En plus des exoribonucléases, l'exosome est associé à des protéines partenaires comme des hélicases d'ARN. La levure possède deux exosomes localisés soit dans le cytoplasme, soit dans le noyau. La principale différence entre les deux complexes réside au niveau des protéines associées et de la présence d'une exonucléase supplémentaire dans l'exosome nucléaire. L'exosome cytoplasmique est impliqué dans la dégradation des ARNm (Anderson and Parker, 1998; Mitchell and Tollervey, 2000). L'exosome nucléaire participe à la maturation des ARNr et des petits ARNsn et ARNsno mais également à la dégradation des ARNm défectueux avant leur export vers le cytoplasme (Allmang *et al.*, 1999a; Allmang *et al.*, 2000; Bousquet-Antonelli *et al.*, 2000; Mitchell *et al.*, 1997).

L'association d'une exonucléase 3'-5' de type RNase II et d'une hélicase à ARN a également été identifiée dans les mitochondries de levure. Ce complexe appelé mtEXO est impliqué dans la dégradation des introns ainsi que celle des ARNm et ARNr mitochondriaux. Le mtEXO n'est pas impliqué dans la maturation ni la dégradation des ARNt (Dziembowski *et al.*, 1998; Dziembowski *et al.*, 2003; Margossian *et al.*, 1996; Min and Zassenhaus, 1993).

Des complexes homologues à l'exosome de la levure semblent être conservés chez les organismes eucaryotes inférieurs et supérieurs (cf. Tableau 1). C'est le cas de l'eucaryote primitif *Trypanosoma brucei* chez qui un complexe a été identifié (Estevez *et al.*, 2001). Ce complexe, plus simple, ne contient que cinq protéines, toutes essentielles pour la cellule, et dont l'activité exonucléolytique 3'-5' a été démontrée. Cet exosome semble avoir un mécanisme d'action similaire à son homologue chez la levure. L'activité exonucléolytique 3'-5' d'un complexe homologue a également été démontrée *in vitro* chez la Drosophile (Andrulis *et al.*, 2002).

Par recherche d'homologie de séquences, près de 11 composants susceptibles d'être des composants d'un exosome humain ont été répertoriés. Parmi eux, sept sont capables d'interagir entre eux pour former un complexe et six présentent *in vitro* une réelle activité



**Figure 9** : (A) Motifs PH catalytiques de la PNPase d'*E. coli* et les deux motifs de liaison à l'ARN KH et S1. (B) Homologie de structure entre le cœur de l'exosome de la levure et le trimère de PNPase d'*E. coli* où chacune des trois sous-unités s'assemble en un anneau hexamérique (Symmons *et al.*, 2002; Aloy *et al.*, 2002).

<i>S. cerevisiae</i>	Motifs homologues chez <i>E. coli</i>	<i>Drosophila</i>	Homme	<i>T. brucei</i>	<i>A. thaliana</i>	Archae
Rrp44	RNase II	dDisp3	hDisp3	TbRrp44 (pas complexée)	-	-
Rrp6 (nucléaire)	RNase D	dRrp6	PM-Scl 100	TbRrp6	-	-
Mtr3	RNase PH	dMtr3	hMtr3	-	-	prédite
Rrp42	RNase PH	dRrp42	hRrp42	-	-	Rrp42
Rrp4	S1 et KH	dRrp4	dRrp4	TbRrp4	AtRrp4	Rrp4
Rrp41	RNase PH	dSki6	hRrp41	Rrp41A Rrp41B (pas complexées)	AtRrp41	Rrp41
Rrp46	RNase PH	dRrp46	hRrp46	-	-	prédite
Rrp40	S1	dRrp40	hRrp40	Rrp40 (pas complexée)	-	prédite
Cs14	S1	dCs14	hCs14	TbCs14	-	Cs14
Rrp45	RNase PH	dRrp45 (pas complexée)	PM-Scl 75	TbRrp45	-	prédite
Rrp43	RNase PH	-	-	-	-	prédite
-	-	-	-	Protéine non identifiée	-	-
Mtr4 Ski2 Ski3-Ski8	Hélicase DEAD Hélicase DEAD					prédite prédite DNAG (hélicase??)

**Tableau 1** : Exosomes et protéines homologues identifiés ou prédits chez différents organismes

exonucléolytique 3'-5' (Allmang *et al.*, 1999b; Brouwer *et al.*, 2001; Raijmakers *et al.*, 2002).

Enfin, l'existence d'un complexe de dégradation dans le règne des Archae a été suggérée suite à une étude génomique basée sur la comparaison de différents génomes séquencés (Koonin *et al.*, 2001). Cette étude montre qu'il existe potentiellement des protéines orthologues aux sous-unités protéiques de l'exosome de la Levure. Toutes les catégories d'enzyme retrouvées au sein d'un tel complexe ont été prédites, comme des protéines de type RNase PH susceptibles de porter une activité exonucléolytique 3'-5', des protéines contenant des motifs S1 et KH capables de fixer l'ARN ou encore une activité hélicasique. Dernièrement, les preuves expérimentales montrent que seules quatre protéines orthologues ont été co-purifiées au sein d'un même complexe chez *Sulfolobus solfataricus*. Aucune ne porte d'activité hélicasique (Evguenieva-Hackenburg *et al.*, 2003). Ces données suggèrent un mécanisme de dégradation des ARNm par voie exonucléolytique proche de celui des eucaryotes inférieurs.

Il apparaît à travers toutes ces données que l'existence de complexes protéiques associant des enzymes de la dégradation des ARN ait été conservée au cours de l'évolution. Cependant, on note que la différence principale entre les cellules eucaryotes et procaryotes réside dans la présence ou non d'une endoribonucléase au sein des complexes. Cette différence est probablement due à l'importance d'un tel enzyme dans la stratégie de dégradation appliquée chez ces organismes. En effet, l'intervention d'un enzyme « RNase E-like » chez les Eucaryotes semble être mineure alors qu'elle est primordiale chez les bactéries comme *E. coli*.

### III - La RNase E : une enzyme centrale pour la cellule

#### III - 1 - Identification

La RNase E est une endoribonucléase spécifique des molécules d'ARN simple brin. D'abord identifiée au cours de l'étude d'un mutant thermosensible associé à une stabilisation chimique des ARN (Ono and Kuwano, 1979), elle a été décrite comme responsable de la maturation de l'ARN ribosomique (ARNr) 9S en 5S (Apirion and Lassar,

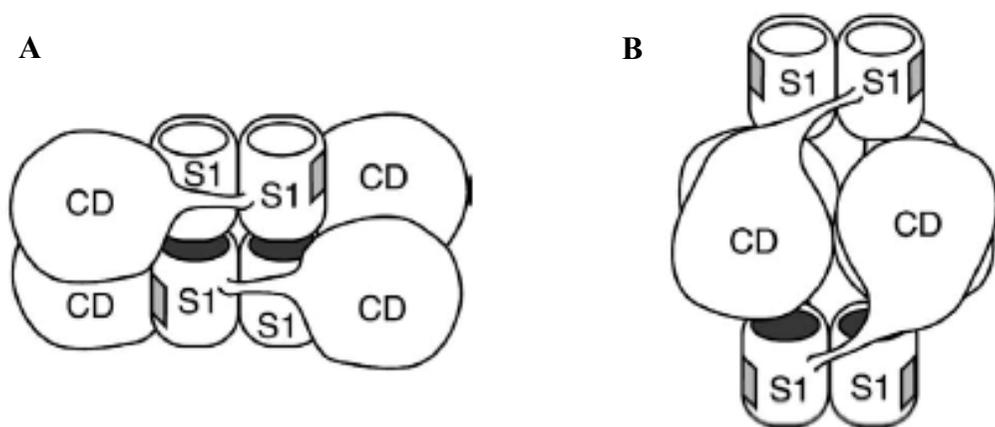
1978). Ces deux études ont été réalisées à partir de deux mutants thermosensibles indépendants qui sont le mutant *ams-1* et *rne-3071*, respectivement. Des études ultérieures ont cependant montré que ces deux mutations associées à ces phénotypes différents étaient localisées dans un seul et même gène : le gène *rne*, situé à 24,58 minutes du chromosome d'*E. coli* (Babitzke and Kushner, 1991; Mudd *et al.*, 1990).

### III - 2 - La RNase E est une protéine à domaines multifonctionnels

La RNase E est une protéine de 1061 acides aminés d'un poids moléculaire de 118 KDa. Elle peut être divisée en deux domaines fonctionnels différents : le domaine amino-terminal et le domaine carboxy-terminal.

#### A) Le domaine NTH

Le domaine amino-terminal de la protéine (NTH) constitué des 500 premiers acides aminés est nécessaire et suffisant pour la viabilité de la cellule et porte l'activité endonucléolytique (McDowall and Cohen, 1996; Taraseviciene *et al.*, 1995). La région comprise entre les résidus 35 et 119 contient un motif S1 très conservé chez les protéines qui fixent l'ARN simple brin (Bycroft *et al.*, 1997). Ce motif S1 est requis pour l'activité de clivage du substrat et pour l'autorégulation de la RNase E (Diwa *et al.*, 2002; Jain and Belasco, 1995). Probablement active sous forme dimérique, des études biochimiques et structurales du domaine NTH de la RNase E montrent que celui-ci est capable de s'assembler en dimères et homotétramères (Callaghan *et al.*, 2003; Carpousis *et al.*, 1994; Mackie *et al.*, 1997; Vanzo *et al.*, 1998). La formation de ces complexes se ferait par le motif S1. Deux modèles sont proposés : le premier serait la tétramérisation de la RNase E au niveau d'un site hypothétique du motif S1 comprenant les résidus 37 et 60 (cf. figure 10A). Le deuxième propose que le cœur du tétramère soit formé par les domaines catalytiques de deux dimères de NTH (cf. figure 10B)(Schubert *et al.*, 2004). Il est intéressant de noter que les mutants thermosensibles *ams-1* et *rne3071* cités dans le paragraphe précédent portent tous deux des mutations au niveau du domaine S1. Schubert



**Figure 10 :** Modèles de tétramères de RNase E. Le domaine amino-terminal du NTH qui contient le motif S1 est représenté par un cylindre. La région d'interaction avec l'ARN est figurée par le carré grisé. Le domaine catalytique du NTH est représenté par un oval (CD). Dans le modèle A, le cœur du tétramère est formé par l'association de deux dimères de NTH au niveau d'un site hypothétique de liaison au niveau du motif S1. Dans le modèle B, la tétramérisation se fait au niveau des domaines catalytiques des dimères de NTH (Schubert *et al.*, 2004).

et ses collaborateurs suggèrent que ces mutations entraînent une perte totale de la structure et de la fonction de ce domaine.

### B) Le domaine carboxy-terminal de la RNase E

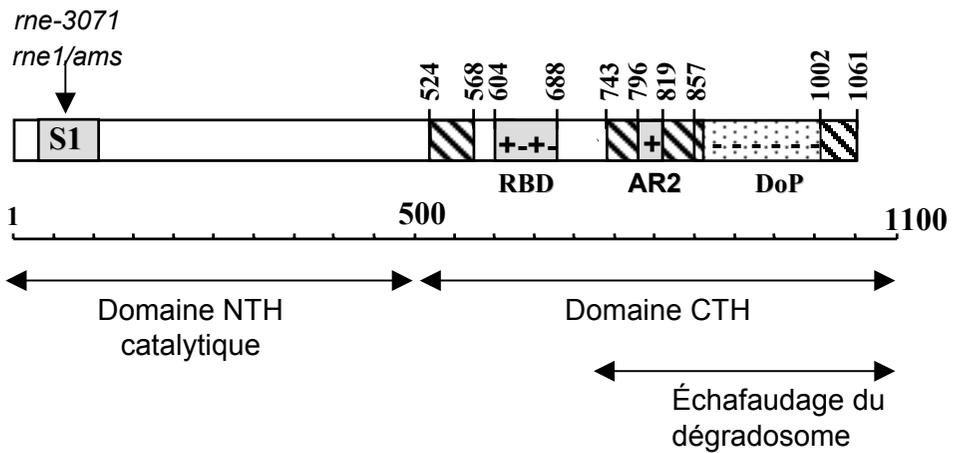
Le domaine carboxy-terminal (CTH) de la RNase E peut lui-même être divisé en deux sous domaines (cf. figure 11). La région comprise entre les acides aminés 500 et 800 est riche en résidus prolines et arginines. La présence de ces acides aminés fortement chargés positivement est probablement responsable de la migration aberrante de la protéine à un poids apparent de 180 KDa sur un gel SDS-page. Ce domaine central de la RNase E contient deux régions riches en arginines appelées RBD (*RNA Binding Protein*) et AR2 (*Arginin region 2*). Ces deux régions sont capables de fixer l'ARN *in vitro* (Cormack *et al.*, 1993; Leroy *et al.*, 2002; McDowall and Cohen, 1996; Taraseviciene *et al.*, 1995). Bien que ces domaines de fixation à l'ARN ne soient pas indispensables à l'activité de la RNase E, ils joueraient le rôle de facteurs de processivité de la RNase E en facilitant les coupures endonucléolytiques successives. En effet, l'efficacité de clivage du précurseur 9S dépend de la présence du site RBD (Kaberdin *et al.*, 2000).

Enfin, le domaine du CTH compris entre les résidus 700 et 1061 constitue la base de l'échafaudage du dégradosome. Il contient l'ensemble de sites d'interaction protéine-protéine du complexe, notamment le domaine de fixation à la PNPase extrêmement acide (Dop).

L'ensemble du domaine CTH est important pour la régulation de l'activité de la RNase E. En effet, la région centrale possède des éléments régulateurs positifs du processus d'autorégulation alors que le domaine acide semble jouer un rôle négatif (Leroy *et al.*, 2002).

### C) Le CTH : une protéine intrinsèquement structurée

De par sa composition et sa structure primaire, il a été suggéré que la RNase E appartient à la classe des protéines intrinsèquement structurées (IUP) (Tompa, 2002). En effet, plusieurs caractéristiques de ces protéines sont attribuées au CTH de la RNase E comme i) la faible complexité de sa composition en acides aminés, ii) la présence de



	Domaine riche en prolines		Domaine chargé
	Domaine riche en arginines	<b>S1, RBD, AR2</b>	Domaines fixant l'ARN
	Domaine riche en prolines et acides glutamiques	<b>DoP</b>	Domaine d'interaction avec la PNPase
			Mutations thermosensibles

**Figure 11** : Structure primaire de la RNase E.

régions hautement chargées, iii) la prédominance de résidus prolines inhibiteurs de structures secondaires rigides, iv) la forte sensibilité à la protéolyse (Callaghan *et al.*, 2004). De plus, la délétion d'un site d'interaction pour l'un des composants du complexe ne modifie pas les interactions avec les autres composants (Vanzo *et al.*, 1998). Ceci est compatible avec l'idée que le CTH de la RNase E ne possède pas de structure protéique globulaire. Enfin, les protéines IUP ont le plus souvent un rôle clé dans la régulation de processus cellulaires. Le paragraphe qui suit suggère que la RNase E partage aussi cette propriété.

### III - 3 - La RNase E participe à de nombreux processus cellulaires

#### A) La dégradation des messagers : quelques exemples d'ARNm spécifiques

##### a) La dégradation en fonction des conditions de croissance

Comme on a pu le voir précédemment, la RNase E est un enzyme clé de la dégradation des ARNm chez *E. coli* en intervenant dans l'étape initiale du processus. Des études menées sur des ARNm spécifiques ont pu mettre en évidence un lien direct entre l'expression génique et la stabilité du messager en fonction des conditions de croissance de la bactérie. C'est le cas du gène *ompA* qui code la protéine majoritaire de la membrane externe d'*E. coli*. Ce messager très stable grâce à son extrémité 5' non traduite est fortement déstabilisé en condition de croissance lente (Georgellis *et al.*, 1992). La stabilité de ce messager dépend donc de la présence de cet élément *cis* de l'ARN. Elle est également dépendante du facteur *trans* Hfq (Vytvytska *et al.*, 1998). En effet, dans des conditions de croissance ralentie, la fixation de cette protéine dans la région 5' de l'ARNm *ompA* est augmentée. Il y aurait alors compétition entre ce facteur et les ribosomes au niveau de l'accès à l'ARNm. La diminution de la traduction du messager favoriserait ainsi sa dégradation (Vytvytska *et al.*, 2000).

La stabilité du messager *ompA* est également régulée en fonction de la température. La dégradation de l'ARNm *ompA* est en effet plus rapide à 37°C qu'à 28°C. Cette dégradation est initiée par un clivage endonucléolytique de la RNase E dans sa partie 5'-UTR fortement structurée. Les auteurs suggèrent que la température entraîne une modification

conformationnelle de l'extrémité rendant alors l'ARNm plus susceptible aux coupures de la RNase E (Afonyushkin *et al.*, 2003).

*b) L'expression différentielle de gènes polycistroniques*

Chez *E. coli*, de nombreux gènes sont organisés en opéron et transcrits sous forme d'ARNm précurseurs polycistroniques. C'est le cas par exemple de l'opéron *pap* qui code plusieurs protéines impliquées dans la synthèse du pili de la bactérie. Les cistrons *papB* et *papA* sont transcrits à partir d'un seul promoteur générant un ARNm précurseur polycistronique *papBA*. Le précurseur est mûri par la RNase E qui clive l'ARNm dans la région intercistronique (Nilsson and Uhlin, 1991). Cette maturation a pour conséquence la dégradation rapide du cistron *papB* qui correspond au fragment 5' ainsi généré. Parallèlement, le produit du clivage correspondant au fragment 3' est fortement stabilisé. La RNase E a donc ici deux effets opposés : la stabilisation de *papA* et la dégradation rapide de *papB*. Il en résulte une quantité de protéine PapA largement supérieure à celle de PapB (Baga *et al.*, 1988).

*c) Le contrôle du métabolisme cellulaire*

La RNase E est étroitement liée avec le métabolisme cellulaire. Elle est impliquée par exemple dans la dégradation du messenger spécifique *ptsG*. Le gène *ptsG* code un récepteur membranaire qui intervient dans le transfert de phosphate du phosphoenol pyruvate (PEP) au glucose (Postma *et al.*, 1993). Celui-ci, une fois phosphorylé, peut entrer dans la voie de la glycolyse (Saier *et al.*, 1996). L'expression du gène *ptsG* est fortement diminuée lors du blocage de la glycolyse. Cette diminution d'expression est due à la dégradation accélérée du messenger *ptsG* par la RNase E (Kimata *et al.*, 2001). C'est l'accumulation des intermédiaires de la glycolyse, le glucose 6-phosphate et le fructose 6-phosphate qui déclenche cette dégradation rapide (Morita *et al.*, 2003). L'action de ces molécules sur la RNase E reste cependant inconnue. En plus du contrôle du métabolisme, les auteurs suggèrent que la RNase E exercerait aussi un contrôle sur l'intégrité du génome de la cellule. En effet, il semble qu'une concentration trop élevée de glucose-6P et fructose-6P augmente le taux de mutation sur le génome bactérien (Lee and Cerami, 1987; Levi and Werman, 2001).

#### d) Le repliement des protéines

La RNase E est indirectement liée au processus de modifications post-traductionnelles des protéines puisqu'elle intervient dans la modulation de l'expression du gène *dsbC*. Ce gène code une isomérase responsable de la formation des ponts disulfures présents dans les protéines chez *E. coli*, notamment celles sécrétées dans le périplasme (Zhan *et al.*, 2004). Sur huit mutants présentant un phénotype de surexpression de DsbC, sept se sont avérés être des mutants du gène *rne* entraînant une augmentation de la stabilité du messenger *dsbC*. L'implication directe de la RNase E dans la dégradation de ce messenger a été montrée *in vitro* et *in vivo* (Lee *et al.*, 2003).

#### B) La maturation et la dégradation des ARNr

Chez *E. coli*, les ARN ribosomiques sont transcrits sous forme d'un seul polycistron précurseur : l'ARN 30S (Gegenheimer and Apirion, 1981). La maturation de cet ARN par la RNase III permet de générer les précurseurs des ARNr 23S et 16S. En association avec la RNase P, elle libère également l'ARN 9S, précurseur de l'ARNr 5S. La RNase E est impliquée dans la maturation de l'ARN 5S. Le clivage de l'ARNr 9S par la RNase E donne le précurseur p5S qui sera finalement mûri entre autre par la RNase T. La RNase E est également impliquée dans la maturation de l'extrémité 5' de l'ARNr 16S (Ghora and Apirion, 1978). La découverte de fragments d'ARNr 23S et 16S dans des fractions purifiées de dégradosome montre que ce complexe, et donc la RNase E, participe également à la dégradation de ces ARNr (Bessarab *et al.*, 1998).

#### C) La maturation des ARN de transfert

La RNase E joue un rôle essentiel dans l'initiation de la maturation des ARN de transfert (Li and Deutscher, 2002; Ow and Kushner, 2002). La fonctionnalité des ARNt, nécessaires à la synthèse des protéines, dépend de la maturation de leurs extrémités 5' par clivages endonucléolytiques générés par l'endonucléase RNase P et de la maturation des extrémités 3' obtenues par les exonucléases 3'-5'. Les ARNt étant synthétisés sous forme

de précurseurs polycistroniques ou monocistroniques, les coupures endogènes générées par la RNase E permettent de séparer les polycistrons en transcrits individuels. Ces clivages permettent, d'une part, de rendre accessibles les extrémités 3' des ARN aux exonucléases en supprimant les structures secondaires inhibitrices et, d'autre part, l'obtention d'extrémités 5' accessibles au deuxième enzyme clé de ce processus, la RNase P. Il est intéressant de noter que l'ARN M1, constituant catalytique de la RNase P, est lui-même mûri par la RNase E (Sim *et al.*, 2002).

Ow et ses collaborateurs (2002) suggèrent que le caractère essentiel de la RNase E pour la viabilité de la cellule est attribué à cette fonction de maturation des ARNt. Cependant, cette hypothèse est remise en cause par des travaux récents qui montrent que la viabilité d'une souche déficiente pour l'activité RNase E peut être restaurée par la surexpression de la RNase G alors que cette dernière n'intervient pas dans la maturation des ARNt (Deana and Belasco, 2004)

#### D) La surveillance des peptides synthétisés et de l'intégrité des messagers

La présence de molécules d'ARNm qui ne possèdent pas de codon stop conduit à la synthèse de peptides tronqués dans la cellule. Chez *E. coli*, de tels peptides sont étiquetés en leur extrémité carboxy-terminale par un court peptide « tag » et rapidement envoyés dans le chemin de dégradation (Keiler *et al.*, 1996). Ce court peptide « tag » est codé par l'ARN *ssrA* (Oh *et al.*, 1990). Cet ARN est également appelé ARNtm du fait de la dualité de ces activités d'ARNt et d'ARNm. Synthétisé sous forme d'un précurseur de 457 nucléotides, il est mûri en 5' par la RNase P et en 3' par les exoribonucléases T et PH (Li *et al.*, 1998). Cependant, Lin-Chao *et al* (1999) ont montré que la RNase E est requise pour la formation de l'extrémité 3'-CAA nécessaire pour un ARNtm fonctionnel. La RNase E est donc étroitement liée au processus de surveillance de la synthèse des peptides. Après la fusion entre le peptide tronqué et le tag, les ribosomes bloqués sur le messenger sont libérés. L'ARNm devient alors accessible aux exonucléases et peut être dégradé complètement. En mûrant l'ARNtm, la RNase E permet l'aboutissement de la dégradation de peptides tronqués générés par sa propre activité endonucléolytique.

### E) La dégradation d'ARN régulateurs

L'exemple le mieux décrit dans la littérature est celui de la dégradation de l'ARN I (pour revue : (Jung and Lee, 1995)). L'ARN I est un ARN non codant impliqué dans la régulation négative du nombre de copies du plasmide ColEI d'*E. coli*. L'initiation de la réplication du plasmide ColEI dépend de l'ARN II qui en s'appariant à l'origine du plasmide, permet l'ancrage de l'ADN polymérase I. L'ARN I est un ARN antisens de l'ARN II. La formation d'un hybride entre l'ARN I et l'ARN II inhibe ainsi l'initiation de la réplication du plasmide. La RNase E clive l'extrémité 5' de l'ARN I. Celui-ci n'est alors plus capable de s'apparier avec l'ARN II et est rapidement envoyé dans le chemin de dégradation (Lin-Chao and Cohen, 1991; Tomcsanyi and Apirion, 1985). La RNase E participe donc à la régulation de la réplication du plasmide ColEI. Elle est également impliquée dans la régulation de transfert de plasmide de type F en dégradant l'ARN *finP* (Jerome *et al.*, 1999). Cet ARN antisens régule négativement la transcription de l'opéron de transfert du plasmide (Wagner and Simons, 1994).

La RNase E joue un rôle central dans la cellule puisqu'elle intervient directement ou indirectement dans de nombreux processus clés cellulaires. Ce rôle central en fait une protéine primordiale. Il paraît donc évident que la quantité d'un tel enzyme dans la cellule doit être finement contrôlée et nécessite plusieurs niveaux de régulation d'expression afin de préserver une activité endonucléolytique essentielle.

## III - 4 - La régulation de la RNase E

### A) Une régulation transcriptionnelle

Des analyses par extension d'amorce à partir de l'extrémité 5'-UTR du messenger *rne* ont mis en évidence l'existence de trois promoteurs p1, p2 et p3 (Ow *et al.*, 2002). Bien que ces trois promoteurs soient fonctionnels *in vivo*, 95% des transcrits *rne* sont produits à partir du promoteur p1. Des délétions partielles des promoteurs p2 ou p3 entraînent une diminution de l'efficacité de transcription du promoteur p1. Deux hypothèses sont proposées pour expliquer ce phénomène. La première est que l'initiation de la transcription des deux

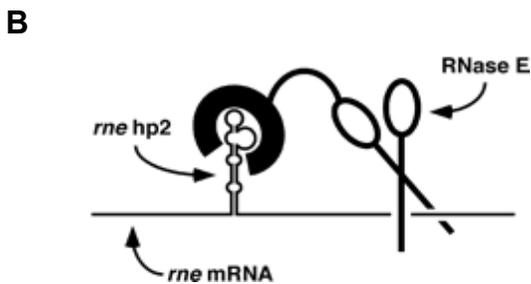
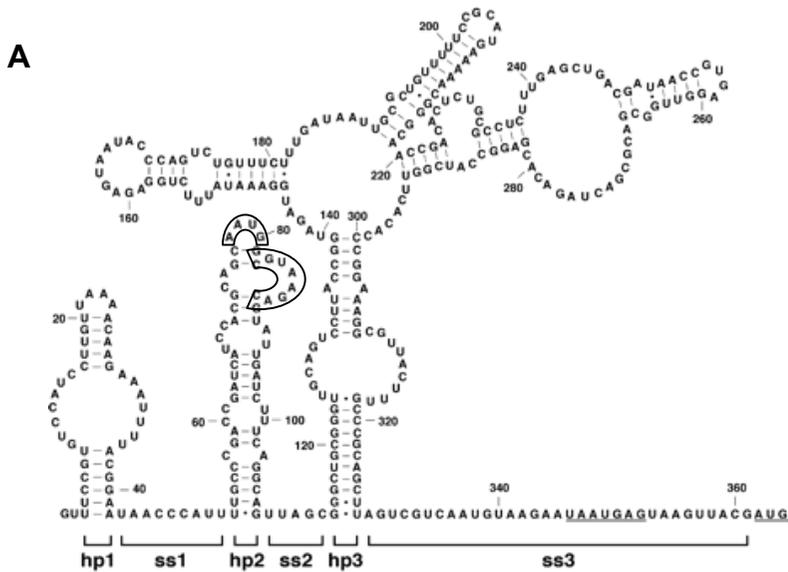
promoteurs en amont de p1 pourrait améliorer celle du promoteur p1. La seconde hypothèse serait que les séquences des promoteurs p2 et p3 soient des éléments *cis* activateurs directement reconnus par l'ARN polymérase. Il serait alors intéressant de comparer l'affinité de la polymérase ainsi que le profil d'interaction de celle-ci avec les différents promoteurs. Bien que la présence des trois promoteurs apparaisse nécessaire pour une transcription optimale du gène *rne*, les mécanismes de cette régulation restent à élucider. La présence des trois promoteurs est également requise pour qu'un deuxième niveau de régulation de la RNase E puisse s'effectuer : l'autorégulation de la RNase E au niveau post-transcriptionnelle.

## B) Une régulation post-transcriptionnelle

### a) L'autorégulation de la RNase E

#### (α) Les mécanismes et les éléments requis

La RNase E est capable de réguler son taux de messagers dans la cellule par un phénomène d'autorégulation. En effet, une stabilisation du messager *rne* dans une souche contenant une RNase E thermosensible est observée à température non permissive (Mudd and Higgins, 1993). Des expériences *in vitro* et *in vivo* ont permis d'établir le lien direct entre cette déstabilisation et le clivage par la RNase E de l'ARNm *rne* dans son extrémité 5'-UTR. En effet, la fusion entre le 5'-UTR du messager *rne* et un ARNm hétérologue suffit à déstabiliser ce dernier (Jain and Belasco, 1995; Mudd and Higgins, 1993). Une étude phylogénétique intéressante a permis de mettre en évidence les éléments du 5'-UTR impliqués dans ce processus (Diwa *et al.*, 2000). Par comparaison de séquences, la recherche de structures secondaires potentielles a révélé l'existence d'une extrémité 5'-UTR très structurée et très conservée chez des bactéries plus ou moins proches d'*E. coli*. On distingue trois structures en tige-boucle hp1, hp2 et hp3 dont la dernière contient elle-même quatre tiges-boucles. Chacune de ces structures est séparée par une région simple brin notée ss1, ss2 et ss3. En procédant par délétions partielles de un ou plusieurs de ces éléments, seules les structures hp2 et hp3 se sont avérées nécessaires pour l'autorégulation du messager. La structure hp2 semble cependant être plus importante que hp3. Une étude



**Figure 12 : Autorégulation de la RNase E.** (A) Structure secondaire de la région 5' non traduite du messenger *rne*. La présence de la boucle apicale ainsi que les 8 nucléotides non appariés de la tige de hp2 sont requis pour le clivage du messenger *rne* par la RNase E. (B) La structure hp2 reconnue par l'enzyme lui servirait de point d'ancrage pour le clivage du site localisé en aval (Diwa *et al.*, 2002).

complémentaire sur la structure de hp2 montre que la présence d'une boucle au sommet, indépendamment de sa séquence est requise pour la reconnaissance par la RNase E. La présence de la boucle interne formée par 8 nucléotides non appariés est également primordiale (cf. figure 12A). La modification complète de la séquence nucléotidique de la tige n'affecte pas l'autorégulation. Ceci suggère que la tige ne joue pas un rôle important et ne sert qu'à rendre les boucles interne et apicale accessibles à la RNase E (Diwa and Belasco, 2002). Les structures hp2 et hp3 interviennent de manière indépendante dans l'autorégulation du messenger *rne*. Les auteurs proposent deux mécanismes différents pour expliquer cela : la structure hp3 qui contient un site potentiel de clivage servirait directement de cible à la RNase E. La dégradation du messenger serait alors initiée après clivage dans cette structure. La structure hp2 en revanche, servirait d'entrée interne à la RNase E en lui présentant ainsi un point d'ancrage sur le substrat. La tige-boucle faciliterait ainsi l'accès de la RNase E aux sites de clivage présents en aval sur le messenger (cf. figure 12B)

### (β) Les conséquences d'une telle régulation

Ce processus d'autorégulation permet de maintenir une quantité constante de RNase E dans la cellule. De nombreux travaux montrent que cette quantité est étroitement liée avec l'activité de l'enzyme (Jain and Belasco, 1995; Leroy *et al.*, 2002; Sousa *et al.*, 2001). Une fusion transcriptionnelle entre un promoteur inductible et le messenger *rne* délété de sa partie 5'-UTR a permis de s'affranchir de cette autorégulation. Ainsi, il a pu être montré que le messenger *rne* est stabilisé en présence d'une quantité de RNase E inférieure à celle d'une souche *E. coli* sauvage (Jain *et al.*, 2002; Sousa *et al.*, 2001). Cette stabilisation permet alors la synthèse de nouvelles protéines RNase E jusqu'à obtenir une quantité suffisante pour assurer la viabilité de la cellule. Le messenger *rne* est alors de nouveau clivé et dégradé. La stabilisation du messenger *rne* n'est donc que transitoire. Du fait de sa sensibilité vis-à-vis de l'activité de la RNase E, il semble que ce soit le messenger *rne* qui serve de senseur d'activité RNase E cellulaire.

Ces études ont également pu mettre en évidence que la protéine RNase E est présente en large excès dans la cellule puisqu'il ne suffit que de 10 à 15% de la quantité normale de RNase E pour maintenir une croissance de la cellule. La surexpression de la RNase E ne

semble pas avoir d'incidence sur la viabilité de la cellule. En effet, l'augmentation d'un facteur 2,5 de la quantité de RNase E ne modifie pas la croissance cellulaire et n'induit qu'une faible accélération dans la dégradation des messagers (Sousa *et al.*, 2001). En revanche, une quantité insuffisante de RNase E conduit à un grave défaut de ségrégation du chromosome et à la filamentation des cellules (Leroy *et al.*, 2002).

*b) La traduction influence la stabilité des messagers*

Chez les Procaryotes, l'absence de membrane nucléaire permet le couplage entre la transcription d'un ARNm et sa traduction. Plusieurs études ont montré que la traduction simultanée joue un rôle sur la stabilité du messenger en cours de transcription. Schneider et ses collaborateurs ont montré que le clivage endonucléolytique du messenger *lac* est inhibé en présence de molécules qui bloquent la progression des ribosomes sur l'ARNm alors qu'il est augmenté lorsque l'initiation de la traduction est inhibée (Schneider *et al.*, 1978). Ces résultats suggèrent que les ribosomes jouent un rôle dans la stabilité des messagers en les protégeant des attaques des nucléases. Cette hypothèse a largement été renforcée par les travaux réalisés par Marc Dreyfus et ses collaborateurs grâce à un système expérimental qui permet le découplage entre la transcription et la traduction d'un messenger rapporteur *lacZ*. Ce découplage est obtenu lors de la transcription du gène par la polymérase du bactériophage T7. Cette polymérase étant huit fois plus rapide que l'ARN polymérase endogène d'*E. coli* (Iost *et al.*, 1992) et la vitesse de traduction restant inchangée, il en résulte un messenger dépourvu de ribosomes en son extrémité 5' qui devient alors plus sensible à la RNase E. Ce système a permis de montrer une corrélation entre l'efficacité d'une séquence RBS (*Ribosome Binding Site*) placée en amont de la séquence codante du gène rapporteur et la stabilité du messenger. Plus la séquence RBS sera forte, plus le messenger est stabilisé et réciproquement (Iost and Dreyfus, 1995). La comparaison de la stabilité de différents messagers transcrits par la polymérase T7 montre que tous ne sont pas stabilisés de la même manière. Ainsi, la stabilité des messagers dépend à la fois de leur traduction mais également de leur susceptibilité aux nucléases, notamment la RNase E (Lopez *et al.*, 1994).

Le messenger codant l'ARNt threonyl synthétase est un autre exemple montrant que la stabilité dépend de la traduction du messenger. La traduction de ce messenger est régulée par le répresseur ThrS qui se fixe spécifiquement à la région 5'-UTR de l'ARN proche du site de fixation des ribosomes. Le modèle de régulation propose l'existence d'une compétition entre les ribosomes et le répresseur pour l'ARNm. Lorsque le ribosome se fixe sur l'ARNm, celui-ci subit un changement de conformation empêchant alors toute fixation de ThrS. Seuls les ribosomes se fixent ensuite, aboutissant à la traduction complète du messenger et prolongeant la demi-vie du messenger en le protégeant des coupures endonucléolytiques. En revanche, si le répresseur ThrS se fixe en premier, les ribosomes n'ont aucun accès à l'ARNm. Celui-ci est alors dépourvu de ribosomes et est dégradé rapidement par la RNase E et la PNPase (Nogueira *et al.*, 2001).

A travers ces exemples, il apparaît évident que la traduction d'un messenger influe sur sa stabilité. La stabilité du messenger *rne* serait, elle aussi, dépendante de la traduction. Il est suggéré une compétition entre les ribosomes et la RNase E au niveau de l'extrémité 5'UTR. Ainsi, lorsque la quantité de RNase E est insuffisante dans la cellule, le messenger *rne* est facilement accessible aux ribosomes. Cet ARNm est alors stabilisé, d'une part, par le manque d'activité endonucléolytique dans la cellule et, d'autre part, par une traduction accrue. Lorsque la quantité de RNase E redevient suffisante, l'équilibre entre ribosomes et RNase E est déplacé en faveur de l'endoribonucléase qui initie alors la dégradation du messenger. Ce modèle est en accord avec l'observation de la stabilité transitoire du messenger *rne* en conditions d'activité endonucléolytique limitante (Komarova *et al.*, 2005; Sousa *et al.*, 2001).

L'autorégulation est le processus connu le plus efficace qui permet l'adaptation du niveau d'activité endoribonucléique essentiel en fonction des besoins de la cellule. Cependant, il a été récemment proposé un nouveau système de régulation de l'activité de la RNase E. Cette régulation implique pour la première fois un facteur agissant directement *in trans* sur l'activité de la RNase E.

### C) Une régulation post-traductionnelle : le facteur *trans* RraA

C'est au cours d'une recherche de gènes impliqués dans l'augmentation des activités isomérases responsables de la formation des ponts disulfures des protéines chez *E. coli* que Lee *et al.*, (2003) ont mis en évidence l'existence d'un gène dont la surexpression modifie celle de la protéine DsbC. Ce gène initialement nommé *menG* a été rebaptisé *rraA* (*regulator of ribonuclease activity A*) suite aux résultats des travaux qui ont suivi. On a vu précédemment que la dégradation du messenger codant cette protéine est directement initiée par son clivage par la RNase E (cf. § III-3Ad). De plus, la surexpression d'un facteur 5 de DsbC correspond à la stabilité de son messenger. Ces observations ont conduit les auteurs à s'intéresser aux effets de la surexpression de *rraA* sur l'activité de la RNase E. Des expériences *in vivo* montrent que l'activité de la RNase E est diminuée lors de la surexpression de *rraA* à partir d'un promoteur inductible. Cette baisse d'activité est corrélée à l'augmentation de la quantité de RNase E dans la cellule, phénomène dû à son autorégulation (cf. paragraphe précédent). Il semble que l'activité catalytique de la RNase E soit directement inhibée par le facteur RraA, et ce indépendamment de sa fixation au substrat. Aucune évidence n'a été établie quant à l'interaction du domaine NTH de la RNase E et RraA. Cependant, l'observation d'une inhibition de l'activité de la RNase E, même réduite, en absence du domaine CTH suggère que RraA agit via le domaine amino-terminal de la RNase E. La présence de l'extrémité carboxy-terminale (CTH) de la RNase E n'est donc pas requise cependant, elle semble jouer un rôle dans l'efficacité de cette inhibition. Deux hypothèses sont alors proposées : la première impliquerait la présence d'au moins deux sites de fixation de RraA sur la RNase E. L'un des sites se situerait dans la moitié amino-terminale et le deuxième dans la moitié carboxy-terminale. Ce dernier jouerait alors un rôle positif sur la fixation de RraA. La deuxième hypothèse, privilégiée par les auteurs, serait que la RNase E possède une conformation favorable à son interaction avec RraA. L'absence du domaine CTH modifierait cette conformation et réduirait alors l'affinité entre les deux protéines.

Enfin l'idée que la protéine RraA soit un réel régulateur de l'activité de la RNase E est confortée par des analyses du transcriptôme. Celles-ci montrent une étroite corrélation

entre la stabilisation/déstabilisation de certains messagers en absence de RNase E et dont l'abondance est accrue/diminuée lors de la surexpression de RraA. Cependant, toutes les expériences ont été réalisées en condition de surexpression de la protéine RraA. Il reste à déterminer s'il existe des conditions de croissance où la quantité de RraA est physiologiquement suffisante pour diminuer l'activité endoribonucléolytique. La délétion du gène *rraA* n'entraîne aucune perte de viabilité de la souche. Seule l'abondance de quelques messagers (80) est modifiée d'un facteur 2 dans ce mutant, ce qui est compatible avec l'idée que l'absence de RraA lève une inhibition d'activité endoribonucléique effective.

Il est intéressant de noter la présence de gènes homologues à *rraA* chez d'autres protéobactéries, Archae ou plantes possédant aussi des gènes codant des protéines homologues à la RNase E d'*E. coli* (Monzingo *et al.*, 2003). La protéine RraA d'*E. Coli* étant capable d'inhiber l'activité endonucléolytique de la RNase E de *S. coelicolor*, on peut penser à une conservation du mécanisme de modulation de l'activité de la RNase E parallèlement à la conservation de cette dernière au cours de l'évolution.

La cristallisation du facteur RraA a permis de déterminer la structure tridimensionnelle d'un trimère de RraA. La formation d'un pore au centre du trimère semble comparable à celui d'un trimère de PNPase. Sa nature structurale et électrostatique écarte cependant l'hypothèse d'un rôle dans la fixation de l'ARN. Cette étude n'a pas permis d'établir un rôle distinct de RraA dans la cellule ni de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'inhibition de la RNase E. Une homologie avec la structure de l'enzyme I du système phosphotransférase PEP-sucres n'exclut pas la possibilité d'une interaction entre RraA et l'Enolase au niveau de son site de fixation au PEP. L'Enolase étant un composant majeur du dégradosome, on peut imaginer une possible interaction de RraA avec la RNase E via cette protéine.

On a vu précédemment que l'activité de la RNase E était modulée par le phénomène d'autorégulation. Cette régulation implique des éléments *cis* contenus dans son domaine carboxy-terminal. Les études réalisées sur RraA suggèrent une inhibition de la RNase E nécessitant le CTH de celle-ci. Le domaine CTH est également la cible d'un deuxième

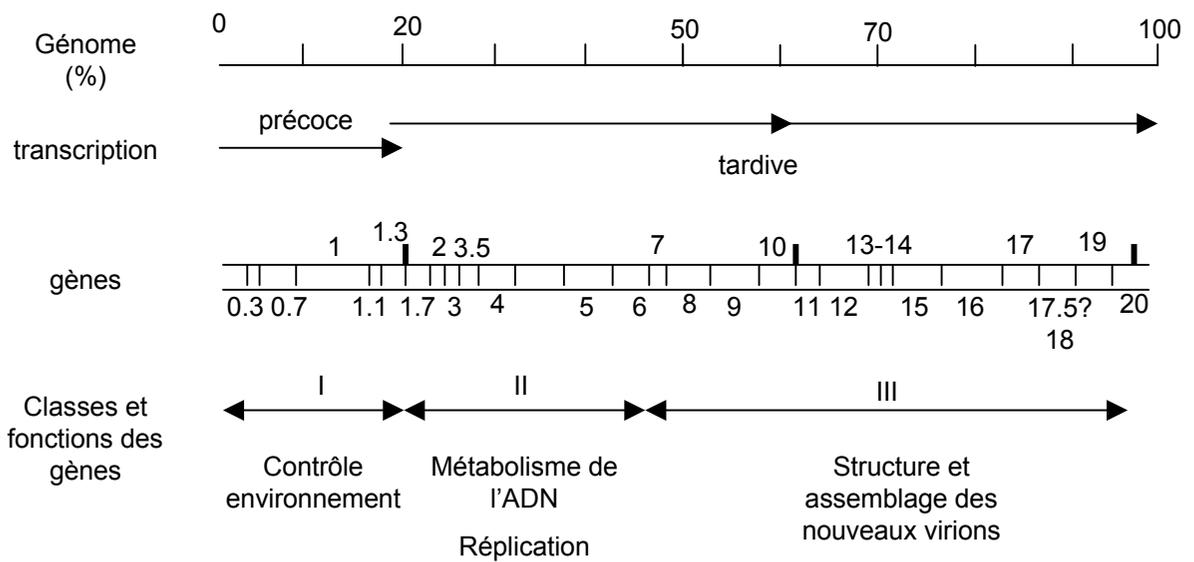
mode de régulation par un facteur *trans* : la phosphorylation par la protéine PK du bactériophage T7.

#### IV - La phosphorylation de la RNase E par la protéine PK du bactériophage T7

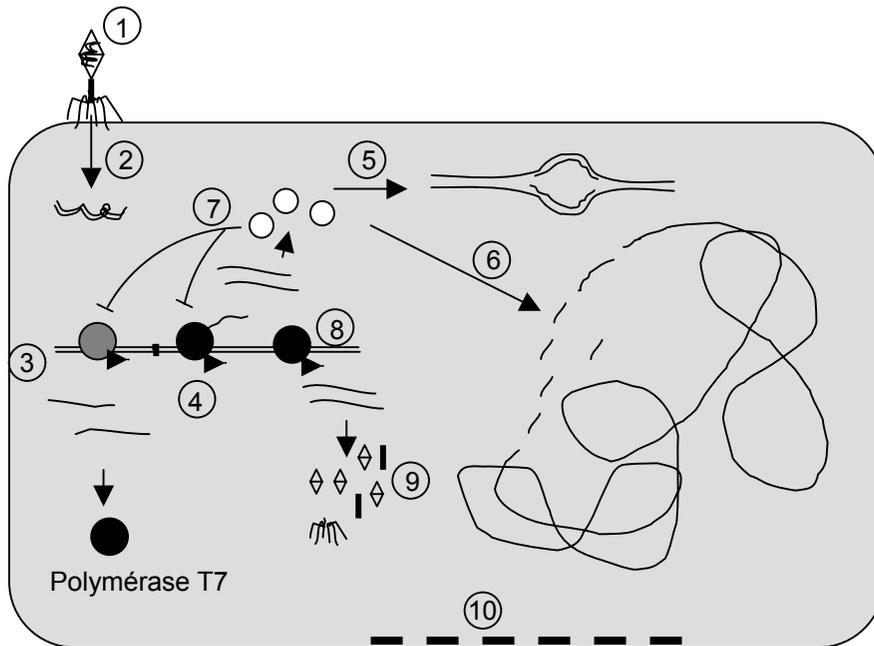
##### IV - 1 - Le bactériophage T7

Le bactériophage T7 est un virus de la bactérie *E. coli* qui infecte aussi bien les souches de type K que celles de type B et C. Il est constitué d'une capsidie icosaédrique de 50 nm de diamètre et d'une queue non contractile de 20 nm de long qui permet son adsorption au niveau de lipopolysaccharides de la membrane externe de la bactérie hôte. La capsidie contient le génome du virus qui se présente sous la forme d'un ADN double brin linéaire d'environ 40.000 paires de bases. Il code une trentaine de protéines dont les gènes sont divisés en trois classes définies selon l'ordre de leur expression au cours de la phase d'infection (cf. figure 13). Les gènes de classe I sont localisés à gauche du génome et représente 19% de l'ADN viral. Ils sont exprimés de manière précoce au cours des huit minutes qui suivent le début de l'infection à 30°C. Leur transcription est assurée par l'ARN polymérase endogène de la cellule infectée. Les produits des gènes précoces ont pour but de préparer un environnement optimal dans la cellule hôte pour une infection et une multiplication efficace du bactériophage. C'est au cours de cette phase précoce que le bactériophage neutralise les systèmes de modification/restriction de l'ADN et détourne le métabolisme de l'hôte en faveur de sa propre expression génique.

Les gènes de la classe II sont exprimés 6 à 15 minutes après le début de l'infection et les gènes de la classe III après 8 minutes jusqu'à la lyse de la cellule. Ces deux classes de gènes tardifs sont transcrites par l'ARN polymérase du bactériophage codée par le gène précoce noté *gene1*. Cette polymérase, spécifique des promoteurs pT7, ne reconnaît pas les promoteurs des gènes bactériens, ni les terminateurs de transcription et est insensible à l'action du facteur Rho endogène. Les gènes de la classe II codent, entre autres, des protéines impliquées dans la dégradation de l'ADN bactérien et dans la réplication du génome phagique. La classe III regroupe l'ensemble des gènes codant les protéines nécessaires à la synthèse et l'assemblage des capsides et autres constituants des nouveaux



**Figure 13 : Organisation du génome du bactériophage T7 (Krüger and Schroeder, 1981)**



**Figure 14 : Le cycle d'infection du bactériophage T7.** Après adsorption du phage à la bactérie (1), l'ADN viral est internalisé de manière active dans la cellule (2). L'expression des gènes de la classe I par la polymérase endogène prépare un environnement intracellulaire favorable à l'infection et permet la synthèse de la polymérase T7 (3). La polymérase T7 transcrit les gènes de la classe II (4) dont les produits protéiques permettront la réplication de l'ADN viral (5) et la dégradation de l'ADN bactérien (6). L'expression des gènes de classe I et II est alors inhibée (7) en faveur de celle des gènes de classe III (8) qui codent les constituants des nouveaux virions (9). Ces virions sont alors relargués dans le milieu à la fin du cycle après la lyse de la membrane bactérienne (10).

virions. Enfin, les 200 à 400 nouveaux virions produits après un cycle d'infection sont relargués dans le milieu après la lyse de la cellule hôte.

L'expression du génome du bactériophage se fait donc de manière séquentielle. Les gènes précoces sont nécessaires à l'expression des gènes tardifs. Les gènes de la classe II permettent la synthèse de génomes pour les nouveaux virions. Ces nouveaux génomes sont alors internalisés dans les capsides codées par les gènes de la classe III. L'expression de ces gènes est favorisée par l'arrêt de l'expression des gènes de classes I et II, dû à des facteurs inhibiteurs de la polymérase endogène et de T7 codés par des gènes de la classe II (cf. figure 14).

Les gènes de la classe I ont pour rôle de préparer le milieu intracellulaire à l'infection. Cela suppose que certains produits de ces gènes sont capables de modifier des fonctions cellulaires de l'hôte en faveur du bactériophage. Parmi ces gènes se trouve le *gène 0.7* qui code la protéine kinase PK.

#### IV - 2 - La protéine PK et son rôle lors de l'infection

##### A) Caractérisation de la protéine

La protéine PK codée par le *gène 0.7* du bactériophage T7 est une protéine kinase qui phosphoryle spécifiquement les résidus sérines et thréonines (Rahmsdorf *et al.*, 1974; Zillig *et al.*, 1975). Son activité phosphotransférase est localisée dans les deux premiers tiers de la protéine (Michalewicz and Nicholson, 1992). Les études biochimiques réalisées sur cette protéine montrent que son activité AMPc-indépendante est optimale à pH neutre et à une température inférieure à 37°C. Les conditions de réaction nécessitent une faible force ionique, et la présence d'ion magnésium. Une étude cinétique de l'activité kinase de PK montre qu'elle est active dès les trois à quatre minutes qui suivent l'infection bactérienne. Le maximum est atteint après six minutes pour disparaître rapidement ensuite. Cette perte d'activité est corrélée à l'apparition d'une forme phosphorylée de la protéine. Ainsi, la protéine PK s'auto-inhibe en s'autophosphorylant (Pai *et al.*, 1975; Zillig *et al.*, 1975). La substitution de la glycine en position 76 par une phénylalanine abolit cette activité kinase.

La protéine n'est plus capable de s'autophosphoryler ni de transférer à partir de l'ATP les phosphates aux protéines cibles (Marchand *et al.*, 2001b).

## B) Le rôle de PK

Des expériences de marquage des protéines *in vivo* avec du phosphate radioactif ont permis d'estimer la quantité de protéines phosphorylées par la protéine PK au cours de l'infection. D'abord estimé à une quarantaine puis à 10, il semble que le nombre de protéines phosphorylées spécifiquement en présence de PK soit finalement de 90 (Robertson and Nicholson, 1990; Zillig *et al.*, 1975). La difficulté rencontrée pour identifier ces protéines semble due à la présence d'activités kinases endogènes et de protéines déjà phosphorylées chez *E. coli* (Cortay *et al.*, 1986; Cozzone, 1988; Stock *et al.*, 1989). Parmi les protéines cibles de PK, la plus grosse des protéines identifiées (165 KDa) est la sous-unité  $\beta'$  de l'ARN polymérase d'*E. coli* qui est phosphorylée au niveau de résidus thréonine (Zillig *et al.*, 1975).

### a) Le contrôle transcriptionnel des gènes précoces

La transcription des gènes précoces ainsi que celle des gènes de la cellule hôte sont inhibées au cours de l'infection par le bactériophage. Ce contrôle transcriptionnel passe par l'inactivation de l'ARN polymérase endogène qui débute dès les cinq premières minutes après le début de l'infection pour être totale après dix minutes (Hesselbach and Nakada, 1977a). Deux gènes du bactériophage T7 sont impliqués dans ce contrôle. Le *gène 2* code une protéine de 7 KDa, nommée protéine I, qui inhibe l'initiation de la transcription en se fixant sur l'ARN polymérase. L'holoenzyme est alors incapable d'interagir avec les promoteurs des gènes (Hesselbach and Nakada, 1975, 1977b). Le deuxième gène est le *gène 0.7* codant la protéine PK. L'expression des gènes d'une souche infectée par un bactériophage muté pour ces deux gènes reste inchangée même vingt minutes après l'infection. L'inactivation de la polymérase endogène est corrélée à la synthèse protéique de PK. L'hypothèse que cette inactivation passe par la phosphorylation de la sous-unité  $\beta'$  de la polymérase a été écartée par des résultats montrant un découplage entre l'activité kinase de PK et sa capacité à inhiber l'ARN polymérase de *E. coli* (Michalewicz and

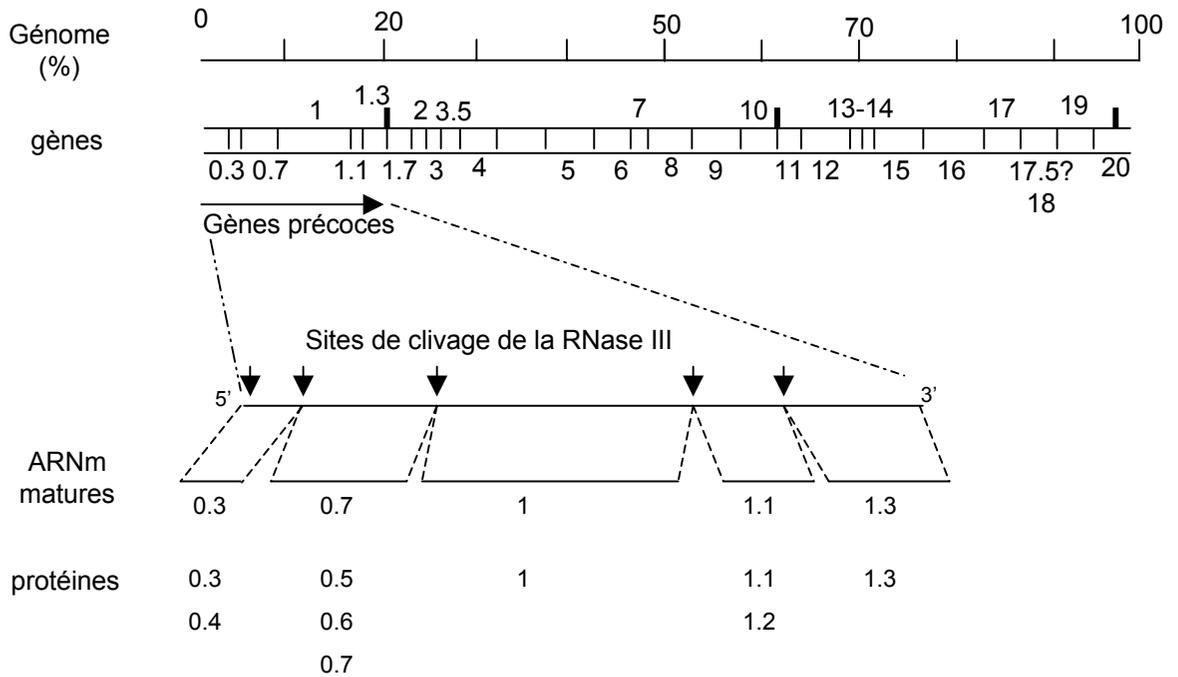
Nicholson, 1992). Il semble que les déterminants protéiques impliqués dans l'inactivation de la polymérase se situent dans les 30 derniers acides aminés de la protéine. Ceci est conforté par le fait que l'expression d'une PK entière n'a jamais pu être obtenue contrairement à celle d'une PK tronquée pour cette région, ce qui suggère un effet toxique de celle-ci pour la cellule (Michalewicz and Nicholson, 1992).

Le gène *0.7* n'est pas essentiel à la multiplication du phage dans des conditions de croissance optimale telles que celles utilisées dans les laboratoires. En revanche, la protéine PK devient nécessaire dans des conditions sub-optimales comme un milieu minimal ou une température élevée. L'absence de la protéine PK entraîne une diminution de la quantité de virions relargués à la fin du cycle d'infection. Ces observations ont conduit à l'hypothèse que PK aide à la propagation des virus. Cependant, les mécanismes d'un tel rôle de PK ne sont pas éclaircis (Hirsch-Kauffmann *et al.*, 1975).

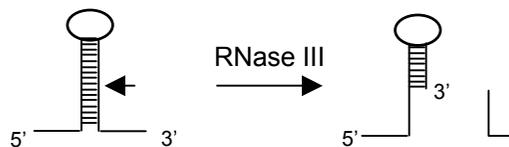
Bien que l'implication de la protéine PK dans le contrôle transcriptionnel des gènes transcrits par l'ARN polymérase endogène soit évidente, les conséquences de la phosphorylation de la sous-unité  $\beta'$  ainsi que les mécanismes d'inactivation de la transcription restent à élucider.

#### *b) La maturation des ARNm du bactériophage*

La protéine PK phosphoryle la RNase III exclusivement sur des résidus sérines (Mayer and Schweiger, 1983). Les sérines 195 et 198 sont localisées dans le domaine de liaison à l'ARN dsRBD. D'autres cibles ont été localisées dans le domaine amino-terminal mais ne sont pas encore identifiées (Nicholson, 1999). La phosphorylation entraîne une augmentation de l'activité de l'endoribonucléase d'un facteur 4 (Mayer and Schweiger, 1983). On a vu dans les pages précédentes que la RNase III est impliquée dans la maturation des ARNr ainsi que dans la dégradation de certains ARNm d'*E. coli*. Elle est également impliquée dans la maturation des ARNm du bactériophage T7 transcrits sous forme de polycistrons (cf. figure 15)(Kruger and Schroeder, 1981). La maturation des transcrits n'est cependant pas nécessaire à leur traduction, du moins dans les conditions optimales de croissance. L'expression des gènes T7 semble être la même dans une souche exprimant ou non la RNase III, à l'exception de celle du gène 3 (Dunn and Studier, 1975). Ce gène code pour une protéine impliquée dans la neutralisation du système de restriction



**Figure 15 : Maturation des ARNm des gènes précoces.** Les gènes précoces sont transcrits sous forme d'un message polycistronique. Le clivage du transcrit unique par la RNase III génère deux ARNm matures monocistroniques et trois ARNm matures polycistroniques (Krüger and Schroeder, 1981).



**Figure 16 :** Le clivage par la RNase III d'un seul brin au niveau de séquences appariées dans les ARNm T7 entraîne la séquestration des extrémités 3' des messagers qui sont alors protégés des exoribonucléases bactériennes (Panayotatos and Truong, 1985).

de la bactérie hôte (Bandyopadhyay *et al.*, 1985). Sa présence est donc primordiale pour l'intégrité de l'ADN viral au cours du cycle d'infection. Le clivage des ARNm T7 par la RNase III au niveau de séquences appariées génère des structures secondaires aux extrémités 3' des ARNm matures. La présence de telles structures pourrait alors protéger les ARNm des exoribonucléases bactériennes (cf. figure 16) (Panayotatos and Truong, 1985). Enfin, la découverte de queues polyA aux extrémités 3' des ARNm T7 maturés conforte l'hypothèse que la maturation joue un rôle dans la stabilité de ces messagers. Ces extensions 3' ne sont pas constituées exclusivement d'adénosine. La présence des trois autres nucléotides à hauteur de 33% inhibe probablement l'activité exoribonucléique de la cellule hôte (Johnson *et al.*, 1998). Ceci expliquerait le rôle stabilisateur de ces queues « polyA », opposé à celui observé pour les queues polyA présentes aux extrémités 3' des messagers endogènes d'*E. coli*.

Ainsi, en phosphorylant la RNase III, la protéine PK favorise l'expression des gènes du bactériophage. L'activation de la RNase III est maximale 8 à 10 minutes après le début de l'infection, ce qui suggère que cet enzyme est requis pour la phase précoce du développement phagique mais aussi pour la phase tardive.

### *c) Le contrôle traductionnel*

La synthèse des protéines codées par les gènes bactériens est inhibée dès cinq minutes après le début de l'infection de la cellule par le bactériophage T7. Ceci suggère que le contrôle traductionnel des gènes est assuré par une protéine du phage codée par un gène précoce (Schweiger *et al.*, 1972). Des études ont montré la présence d'une protéine qui co-purifie avec les ribosomes uniquement dans des cellules infectées par le bactériophage T7. Cette protéine inhibe l'initiation de la traduction des messagers bactériens tout en permettant la synthèse des protéines phagiques. Les auteurs ont alors suggéré que ce répresseur agit au niveau du facteur d'initiation de la traduction IF3 (Herrlich *et al.*, 1974). Le facteur IF3 ainsi que les facteurs d'initiation IF2 et IF1, le facteur d'élongation EF-G et deux protéines de la sous-unité ribosomale 30S (les protéines S1 et S6) sont phosphorylées par la protéine PK (Robertson and Nicholson, 1992; Robertson *et al.*, 1994). De plus, des études antérieures montrent que l'activité traductionnelle de ribosomes isolés de cellules

infectées est supérieure à celle de ribosomes issus de cellules non infectées (Yamada and Nakada, 1976). Ces résultats suggèrent que la phosphorylation de la machinerie de traduction de l'hôte par PK favoriserait l'expression des gènes phagiques au détriment des gènes bactériens. Les mécanismes d'un tel contrôle de la traduction ne sont pas établis. La reconnaissance spécifique des séquences de traduction T7 pourrait être favorisée par la phosphorylation des protéines ribosomales S1 et S6. La phosphorylation des facteurs d'initiation et d'élongation servirait à maintenir un système de traduction stable et efficace jusqu'à la fin du cycle lytique.

En plus des protéines de l'hôte, PK phosphoryle également des protéines codées par le bactériophage lui-même. C'est le cas de la protéine PK qui par autophosphorylation semble réguler négativement son activité. La polymérase T7 semble également être la cible de PK (Thèse d'Isabelle Marchand, 2000). La phosphorylation de cette protéine augmenterait son affinité pour les promoteurs T7 des gènes tardifs. Ceci expliquerait le rôle de PK dans l'expression des protéines tardives en fin de cycle lytique (Gomez and Nualart, 1977; Hirsch-Kauffmann *et al.*, 1975). Cette hypothèse est confortée par des expériences qui montrent que l'expression du gène *0.7* placé en aval d'un promoteur et d'une région d'initiation de traduction (TIR) d'un gène tardif est fortement stimulée. Cette stimulation, due à l'activité phosphotransférase de PK, est observée au niveau transcriptionnel mais également post-transcriptionnel. Ces résultats ont poussé les auteurs à s'intéresser à l'effet éventuel de PK sur la RNase E, endoribonucléase majeure de la dégradation des ARNm chez *E. coli*.

#### IV - 3 - La protéine PK et la RNase E

Les ARNm T7 possèdent une demi-vie de l'ordre de 20 minutes, ce qui est 10 fois supérieur à celle des transcrits de la cellule hôte (Summers, 1970). Cette observation ainsi que les résultats décrits précédemment suggèrent une altération de la machinerie de dégradation des ARNm par la protéine PK au cours de l'infection virale. Des études récentes montrent que la RNase E est phosphorylée lors de l'expression de la protéine kinase à partir d'un vecteur (Marchand *et al.*, 2001a). Cette phosphorylation induit une

diminution de l'activité de la RNase E qui se traduit par l'augmentation de la stabilité d'ARNm rapporteurs sensibles aux attaques endonucléolytiques. L'effet de cette phosphorylation n'est cependant pas la même en fonction des ARNm substrats testés, ce qui suggère que l'inhibition de la RNase E n'est que partielle. L'activité résiduelle serait alors suffisante pour le clivage de messagers préférentiels dits « bons substrats » de la RNase E. L'absence de phosphorylation d'une protéine RNase E tronquée de sa moitié carboxy-terminale montre que la cible de PK est le domaine CTH de l'endoribonucléase. La cible de PK pourrait alors être le dégradosome d'autant que RhlB, un autre composant du complexe, est également phosphorylé par PK (Marchand *et al.*, 2001a). Les mécanismes impliqués dans la diminution de l'activité de la RNase E ne sont pas élucidés.

Les protéines phosphorylées par PK ne sont pas encore toutes connues. Toutefois, les protéines cibles identifiées interviennent à chaque étape clé de l'expression génique : la transcription, la traduction, et la stabilité des messagers. La phosphorylation de l'ensemble de ces protéines suggère un rôle global de PK dans la mise en place d'une expression des gènes en faveur du bactériophage T7 au cours de l'infection.

Une partie des travaux de recherche réalisés au cours de ma thèse s'inscrit dans la suite directe de l'étude menée sur la phosphorylation de la RNase E par PK. L'objectif est de cartographier les résidus du CTH phosphorylés par PK afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'inhibition de la RNase E. Les résultats sont présentés dans la dernière partie du chapitre II.

## V - Conclusion

Les nombreuses études réalisées sur la dégradation des ARNm chez *E. coli* ont permis d'identifier un grand nombre de partenaires protéiques et ribonucléiques. La mise en évidence de plusieurs chemins de dégradation complémentaires en fait un processus complexe qui n'est pas encore entièrement compris. La différence de comportement des enzymes et substrats au cours d'études biochimiques ou biologiques rend parfois les interprétations difficiles. Bien qu'un schéma global puisse être dessiné, il semble que le

processus ne soit pas généralisable pour tous les messagers cellulaires. Plusieurs facteurs interviennent comme la présence de sites de clivage endonucléolytique, la spécificité et la localisation de ces sites sur l'ARNm, l'efficacité de traduction du messager ou encore la présence de structures secondaires plus ou moins stables dans le messager.

Le dégradosome d'*E. coli* constitue un bon modèle d'étude de complexes multienzymatiques qu'on retrouve des Archae jusqu'aux Eucaryotes supérieurs. La compréhension de la dégradation des ARNm chez *E. coli* permet de mieux appréhender ce processus chez les autres organismes plus complexes tels que les mammifères, dont l'homme.

## Chapitre II:

## RESULTATS ET DISCUSSION

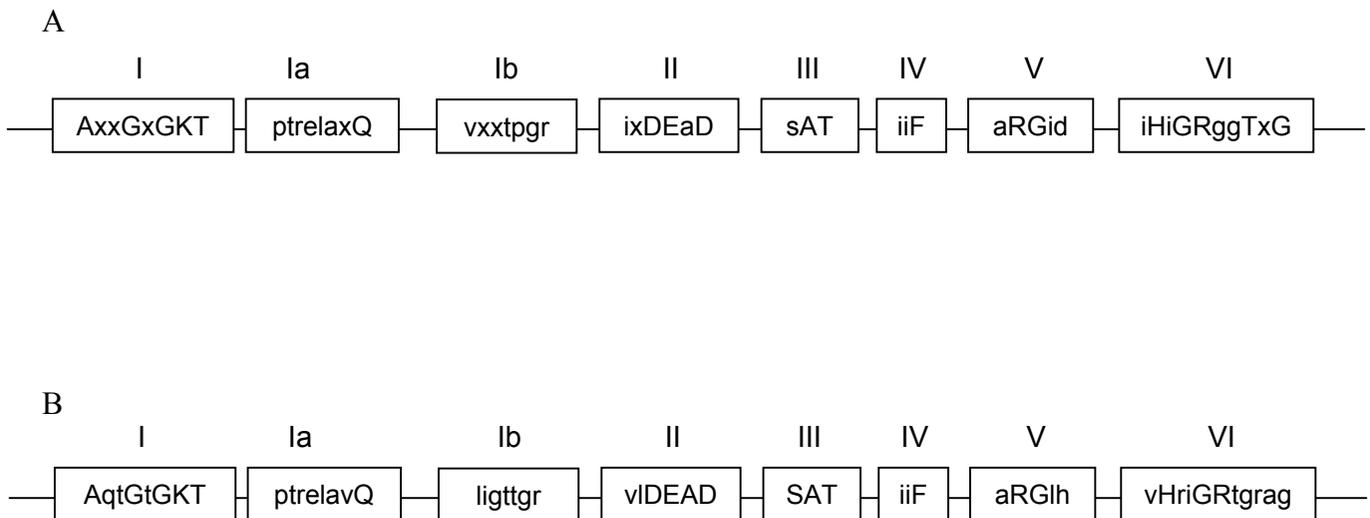
Ce deuxième chapitre présente les résultats des travaux réalisés au cours de ma thèse. Il se divise en deux grandes parties. La première concerne l'étude fonctionnelle du dégradosome d'*E. coli* et s'intéresse particulièrement à deux protéines du complexe : RhIB et l'Enolase. La deuxième partie traite du processus de régulation de la RNase E par phosphorylation par la kinase PK du bactériophage T7.

## I - 1ère PARTIE : ETUDE FONCTIONNELLE DU DEGRADOSOME

## I - 1 - Etude de la protéine RhIB : interaction des hélicases DEAD avec la RNase E

## A) Introduction et résumé de l'article I

La protéine RhIB est une hélicase à ARN de type DEAD-box qui appartient à la sous-famille SF2. Chez *E. coli*, il existe quatre autres hélicases de ce type. La protéine DeaD ou CsdA est induite lors de choc thermique à basse température (Jones *et al.*, 1996) et est impliquée, comme l'hélicase SrmB, dans la biogenèse de la sous-unité 50S des ribosomes. Ces deux hélicases possèdent des fonctions redondantes (Charollais *et al.*, 2003; Charollais *et al.*, 2004). DpbA est l'hélicase la plus étudiée biochimiquement. Comme toutes ces hélicases, elle possède une activité hélicasique dépendante de la présence d'ATP et d'ARN. L'activité de DpbA dépend cependant de l'ARN spécifique 23S, et plus précisément de sa structure en tige boucle 92 (Diges and Uhlenbeck, 2001). Enfin, la cinquième hélicase RhIE est très peu étudiée jusqu'à aujourd'hui. Toutes ces protéines se caractérisent par la présence de sept



**Figure 17 : Motifs conservés chez les hélicases d'ARN à boîte DEAD.** (A) Séquences protéiques des motifs conservés des hélicases d'ARN à boîtes DEAD de la sous-famille SF2. (B) Séquences protéiques des motifs de RhIB. Les motifs I et II sont impliqués respectivement dans la liaison et dans l'hydrolyse de l'ATP. Les motifs Ia, Ib, IV et V sont probablement impliqués dans la liaison du substrat. Le motif III et IV sont associés à la modification conformationnelle de la protéine induite par l'hydrolyse de l'ATP et nécessaire à l'activité hélicasique (de la Cruz, 1999; Tanner and Linder, 2001).

motifs hautement conservés dont le motif DEAD nécessaire à l'hydrolyse de l'ATP (cf. figure 17) (de la Cruz *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 1996). En plus de ces motifs homologues, ces hélicases possèdent des extensions amino ou carboxy-terminales dont les séquences divergent fortement. Il est suggéré que ces extensions sont impliquées dans la reconnaissance spécifique du substrat par la protéine.

La délétion du gène codant RhlB n'étant pas létale pour la cellule et les homologies séquentielles et fonctionnelles avec les autres hélicases de type DEAD ont conduit à l'hypothèse d'une redondance entre RhlB et une ou plusieurs de ces hélicases dans le dégradosome.

Les études menées sur RhlB et présentées dans l'article I mettent en évidence *in vitro* une interaction directe entre la RNase E et les hélicases RhlE et SrmB dans la région contenant le site d'interaction avec RhlB. Une cartographie plus précise de cette région montre qu'il existe deux sites d'interaction distincts : le premier est spécifique à RhlB et nécessite l'acide aminé A730 et le second où se fixent les autres hélicases. Des mesures d'activité de dégradation de mini dégradosomes contenant soit RhlB soit RhlE montrent que cette dernière est fonctionnellement capable de remplacer *in vitro* RhlB au sein du complexe.

B) Article 1

*The RNase E of Escherichia coli has at least two binding sites for DEAD-box RNA helicases : functional replacement of RhlB by RhlE*

Vanessa Khemici, Isabelle Toesca, Leonora Poljak, Nathalie F. Vanzo and Agammemnon J. Carpousis  
Mol Microbiol. (2004)54(5):1422-30

# The RNase E of *Escherichia coli* has at least two binding sites for DEAD-box RNA helicases: functional replacement of RhIB by RhIE

Vanessa Khemici,<sup>‡</sup> Isabelle Toesca,<sup>‡</sup> Leonora Poljak, Nathalie F. Vanzo<sup>†</sup> and Agamemnon J. Carpousis\*

Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaires, UMR 5100, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) et Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France.

## Summary

The non-catalytic region of *Escherichia coli* RNase E contains a protein scaffold that binds to the other components of the RNA degradosome. Alanine scanning yielded a mutation, R730A, that disrupts the interaction between RNase E and the DEAD-box RNA helicase, RhIB. We show that three other DEAD-box helicases, SrmB, RhIE and CsdA also bind to RNase E *in vitro*. Their binding differs from that of RhIB because it is not affected by the R730A mutation. Furthermore, the deletion of residues 791–843, which does not affect RhIB binding, disrupts the binding of SrmB, RhIE and CsdA. Therefore, RNase E has at least two RNA helicase binding sites. Reconstitution of a complex containing the protein scaffold of RNase E, PNPase and RhIE shows that RhIE can furnish an ATP-dependent activity that facilitates the degradation of structured RNA by PNPase. Thus, RhIE can replace the function of RhIB *in vitro*. The results in the accompanying article show that CsdA can also replace RhIB *in vitro*. Thus, RhIB, RhIE and CsdA are interchangeable in *in vitro* RNA degradation assays.

## Introduction

Instability is an intrinsic property of mRNA permitting a rapid response to changes in the programme of transcription. Furthermore, in some cases, gene expression can be controlled post-transcriptionally at the level of mRNA degradation. In *Escherichia coli*, the overall pathway for

mRNA degradation is well established (Coburn and Mackie, 1999; Grunberg-Manago, 1999) although much remains to be learned about its control in conditions of stress or shock. The ribonuclease E (RNase E) of *E. coli* is an essential enzyme involved in the maturation of transfer and ribosomal RNA, and the degradation of mRNA (Kushner, 2002). RNase E, which is an endo-ribonuclease, initiates mRNA decay by cutting messages into fragments. It is part of the RNA degradosome, a ribonucleolytic multi-enzyme complex (Carpousis *et al.*, 1994; Py *et al.*, 1994). The other integral components of the degradosome are an RNA helicase (RhIB), the glycolytic enzyme enolase, and polynucleotide phosphorylase (PNPase) (Miczak *et al.*, 1996; Py *et al.*, 1996). PNPase is a member of the ubiquitous RNase PH family of 3'→5' RNA-degrading enzymes (Zuo and Deutscher, 2001; Symmons *et al.*, 2002). In *E. coli*, PNPase is one of the enzymes involved in the degradation of mRNA fragments produced by RNase E. Thus, the RNA degradosome associates a ribonuclease that fragments mRNA with a ribonuclease that degrades these fragments to nucleotides.

RhIB is a member of the DEAD-box family of RNA helicases (Kalman *et al.*, 1991; de la Cruz *et al.*, 1999; Tanner and Linder, 2001). Experiments *in vitro* and *in vivo* have shown that RhIB facilitates the degradation of structured RNA by PNPase and that this activity requires the integrity of the RNA degradosome (Py *et al.*, 1996; Vanzo *et al.*, 1998; Coburn *et al.*, 1999; Khemici and Carpousis, 2004). Other ribonucleolytic complexes with 3'→5' RNA degrading activity, such as the eukaryotic exosome and yeast mtEXO complex, also have associated factors that are related to the DEAD-box proteins (Margossian and Butow, 1996; de la Cruz *et al.*, 1998; Jacobs *et al.*, 1998; Dziembowski and Stepień, 2001). In the case of the yeast mtEXO complex, the DExH-box protein, Suv3p, is required for the exonucleolytic degradation of mitochondrial group I RNA introns.

RNase E is a complex multidomain protein with an N-terminal catalytic domain and a large non-catalytic region containing RNA binding sites and the protein scaffold upon which the other components of the degradosome assemble (Taraseviciene *et al.*, 1995; McDowall and Cohen, 1996; Kaberdin *et al.*, 1998; Vanzo *et al.*, 1998). Mutant *E. coli* strains that express RNase E lacking the

Accepted 16 August, 2004. \*For correspondence. E-mail carpousi@ibcg.biotoul.fr; Tel. (+33) 561335894; Fax (+33) 561335886. <sup>†</sup>Present address: Centre de Biologie du Développement, UMR 5547, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) et Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France. <sup>‡</sup>These authors have contributed equally to this work.

non-catalytic region are viable although the defective RNase E protein is overexpressed, mRNA decay is slowed and the strains are less fit than wild-type in growth competition experiments (Kido *et al.*, 1996; Vanzo *et al.*, 1998; Lopez *et al.*, 1999; Ow *et al.*, 2000; Leroy *et al.*, 2002; Bernstein *et al.*, 2004). In the work described here, we performed alanine scanning in a region of RNase E previously shown to interact with RhlB. A mutation, R730A, that disrupts RhlB binding was isolated and characterized. During this study, we discovered that RhlE, SrmB and CsdA, three other DEAD-box proteins in *E. coli*, could also bind to RNase E, but at a different site from the RhlB binding site. A complex containing the protein scaffold of RNase E, PNPase and RhlE can be reconstituted and purified *in vitro*. This complex degrades a highly structured mRNA fragment, containing REP sequences from the *malE-malF* intergenic region, in an ATP-dependent reaction thus demonstrating the functional replacement of RhlB by RhlE.

## Results

### The R730A mutation disrupts RhlB binding

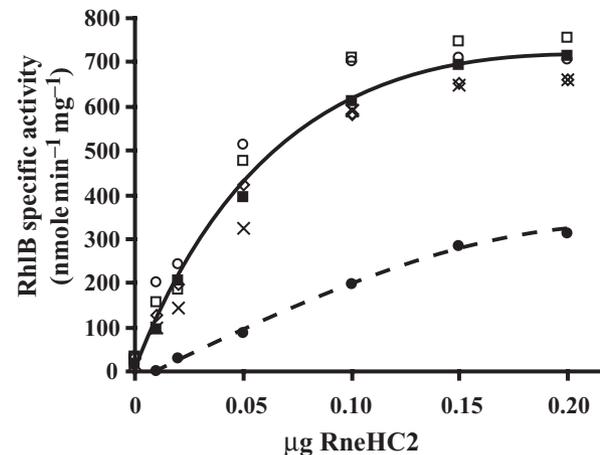
By a combination of deletion and two hybrid analyses, we previously mapped a small region in RNase E that is necessary for RhlB binding (Vanzo *et al.*, 1998). Our results indicated that the binding site should contain the residues SVAEE (734–738) although it seemed likely that upstream amino acids (729–733) would also be important (Fig. 1). To better define the RhlB binding site, we used the RneHC2 polypeptide corresponding to residues 628–843 of RNase E, which is sufficient for RhlB binding *in vitro* (Vanzo *et al.*, 1998). Figure 1 A shows the amino acid sequence from residues 721–740 of RNase E with the SVAEE sequence underlined. We selected five residues and replaced them, one by one, with alanine (asterisks). The interaction of the mutant polypeptides with RhlB was tested by Far Western blotting. Of the five RneHC2 variants, only RneHC2(R730A) failed to bind RhlB (data not shown). As a further test, we examined the activation of the RNA-dependent ATPase of RhlB, which by itself has little activity (Vanzo *et al.*, 1998). Figure 1B shows the ATPase activity of RhlB as a function of the concentration of RneHC2 or variant polypeptide. In this assay, RneHC2(R730A) is defective in stimulating RNA-dependent ATPase activity whereas the other variants are fully active. In previous work with RneHC2, assuming that the activation of RhlB involves a simple binding reaction, we estimated a dissociation constant of 50 nM in a reaction with 1:1 stoichiometry for the RneHC2–RhlB interaction (Vanzo *et al.*, 1998). Visual inspection of the plot in Fig. 1B shows that at least fivefold more RneHC2(R730A) is needed to activate RhlB to comparable levels, consistent with the loss of binding by Far Western blotting.

## A RNase E helicase binding site

721 kqrqlnqkvr yeqsvaeeeav 740

\* = alanine substitution

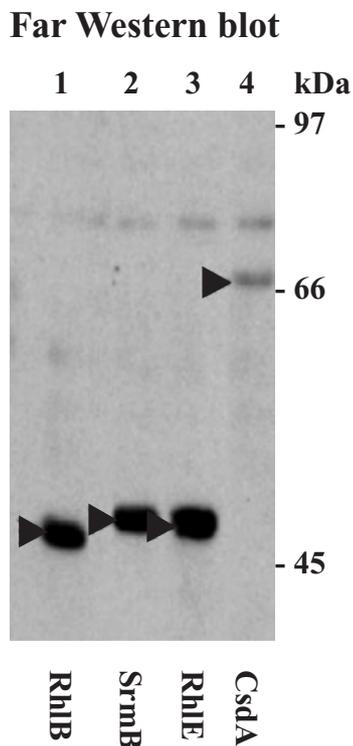
## B RNA-dependent ATPase activity



**Fig. 1.** A. The RhlB helicase binding site of RNase E. Residues 721–740 of RNase E. The underlined SVAEE sequence was shown previously to be important for RhlB binding (see text). Five mutants were constructed in which the amino acids marked with an asterisk were replaced one by one with alanine. B. RNA-dependent ATPase activity. The RneHC2 polypeptide and its derivatives were overexpressed and partially purified as described in the *Experimental procedures*. ATP hydrolysis was measured as described except that the yeast RNA was increased to 250 µg ml<sup>-1</sup> (Py *et al.*, 1996). In a 50 µl reaction, the ATPase activity of RhlB (0.2 µg, 80 nM) was measured in the presence of increasing concentrations of RneHC2 or mutant protein (0–0.2 µg, 0–170 nM). An initial rate of ATP hydrolysis, from a single time point (30 min, 37°C), was used to determine the specific activity (i.e. normalized to 1 mg of RhlB). The solid line shows the activation of RhlB by wild-type RneHC2 (■) or the K728A (◇), Y731A (×), E737A (○) and E738A (□) proteins. The dashed line shows the activation of RhlB by the R730A (●) mutant protein.

### SrmB, RhlE and CsdA interact with RNase E

Because the DEAD-box proteins in *E. coli* contain a highly conserved core of about 400 residues, we asked if binding to RNase E was a general property of these proteins or a specific characteristic of RhlB. Three DEAD-box proteins, SrmB, RhlE and CsdA, were tested. CsdA, previously known as DeaD, was renamed to indicate that it is induced by cold shock (Jones *et al.*, 1996). For Far Western blotting, the DEAD-box proteins were lightly overexpressed in *E. coli* (1–2% of total protein), protein extracts were separated by SDS-PAGE, blotted, renatured and probed with RNase E in solution (Fig. 2). RhlB is included as a control. In lane 1, as expected, an interaction between RhlB on the blot and RNase E in solution was



**Fig. 2.** Far Western blot. Protein extracts prepared from BL21(DE3) harbouring pET11 derivatives, in which RhIB, SrmB, RhIE or CsdA were expressed during a brief induction, separated by SDS-PAGE (7.5% polyacrylamide) and blotted. The filter was incubated with RNase E, washed and then analysed using antibodies against RNase E and an ECL detection kit (Amersham). The position of each helicase, determined by Ponceau red staining of the blot, is indicated by the arrowheads. The position of molecular mass markers is indicated to the right.

detected. We also detected interactions with SrmB, RhIE and CsdA (lanes 2–4). Control blots made in parallel, but incubated without RNase E, gave no detectable signal (data not shown). In a different experiment, RneHC2 was also shown to interact with the DEAD-box proteins (data not shown). It is also possible to detect an interaction by blotting RneHC2 and probing with the DEAD-box proteins in solution (see below). By comparison to RhIB, SrmB and RhIE, the interaction with CsdA is weak, but we have reproducibly detected a signal under the conditions employed in this experiment. Furthermore, in the next section, we show that CsdA in solution can efficiently bind to RneHC2 on a filter. Thus, the central region of RNase E, which was previously shown to interact with RhIB and enolase, can also bind to SrmB, RhIE and CsdA.

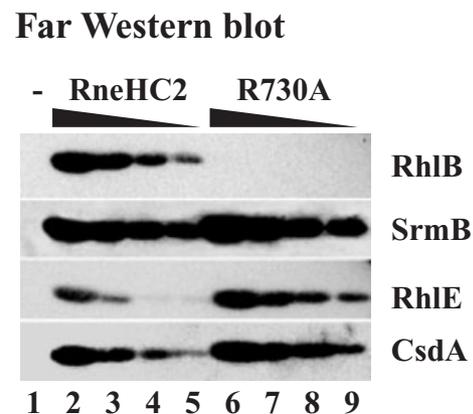
*The binding of SrmB, RhIE and CsdA is not disrupted by the R730A mutation*

We analysed the binding of SrmB, RhIE and CsdA to RneHC2(R730A) by Far Western blotting (Fig. 3). In this experiment, different amounts of RneHC2 or the R730A

variant on the filter were tested for an interaction with RhIB, SrmB, RhIE or CsdA in solution. The signal requires RneHC2 on the filter (lane 1). Other controls have shown that the antibodies against the DEAD-box proteins do not cross-react with each other or with RneHC2, and that the signal in the Far Western blot depends on the presence of the DEAD-box proteins in solution (data not shown). As expected, there is no detectable binding of RhIB to RneHC2(R730A). However, the other DEAD-box proteins interact. This result shows that the binding of SrmB, RhIE and CsdA is not disrupted by the R730A amino acid change.

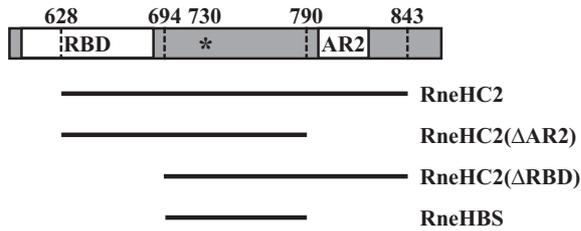
*The RneHBS polypeptide binds RhIB but not SrmB, RhIE or CsdA*

To further delimit the RhIB binding site, flanking segments of the RneHC2 polypeptide were deleted. RneHC2 and three of its derivatives are shown schematically in Fig. 4A. The arginine-rich RNA binding domain (RBD) or a second arginine-rich region (AR2) has been deleted in RneHC2( $\Delta$ RBD) and RneHC2( $\Delta$ AR2) respectively. In the smallest polypeptide, RneHBS, both regions have been deleted. Figure 4B shows a Far Western experiment in which total protein extracts containing overexpressed RneHC2 or its derivatives were separated, blotted, renatured and then incubated with RhIB or RhIE in solution. The position of RneHC2 and its derivatives (indicated to the right) was determined by Ponceau S staining. These blots were heavily overexposed to maximize the detection of protein–protein interactions. The background signals are probably because of traces of RhIB or RhIE bound

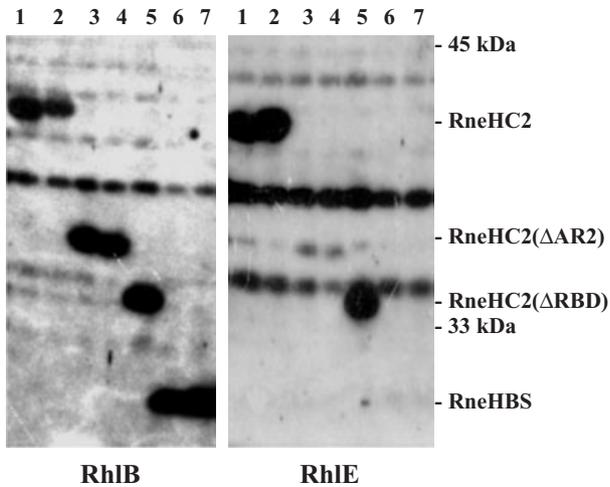


**Fig. 3.** Far Western blot. Protein extracts prepared from BL21(DE3) harbouring pET11 derivatives, in which RneHC2 (lanes 2–5) or RneHC2(R730A) (lanes 6–9) were lightly overexpressed (1–2% of the total protein), separated by SDS-PAGE (7.5% polyacrylamide) and blotted. The lanes in each set are a twofold serial dilution. Lane 1 is a negative control using protein extracted from BL21(DE3) harbouring pET11a. The filters were incubated with partially purified RhIB, SrmB, RhIE or CsdA, washed and then developed with antibodies specific to each protein and an ECL detection kit (Amersham).

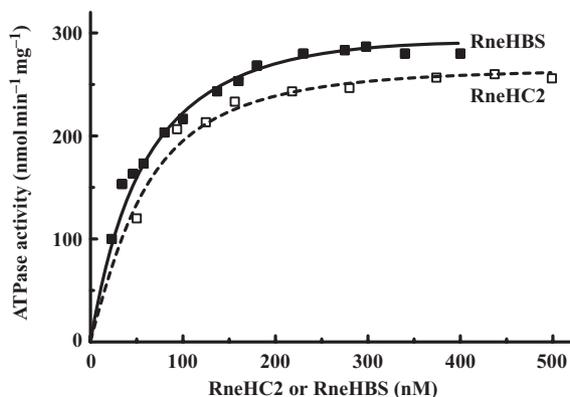
## A Central region of RNase E



## B Far Western blotting



## C RNA-dependent ATPase activity



non-specifically to proteins in the extracts. RhIB interacts with RneHC2 and its derivatives showing that the flanking sequences are not important for RhIB binding and that smallest polypeptide contains an intact RhIB binding site. We have thus named this polypeptide RneHBS (helicase binding site). The results with RneHBS are consistent with a recent analysis showing that residues 684–784 are sufficient for RhIB binding *in vivo* (Liou *et al.*, 2002). In a test of the activation of RhIB as described above (Fig. 1B), RneHBS was equivalent to RneHC2 (Fig. 4C). Therefore, RneHBS is fully competent in stimulating the RNA-

## Fig. 4. Analysis of truncated forms of RneHC2.

A. Schematic diagram of polypeptides derived from RNase E. The RneHC2 polypeptide, and the RBD and AR2 RNA binding regions have been described previously (Taraseviciene *et al.*, 1995; McDowall and Cohen, 1996; Vanzo *et al.*, 1998; Leroy *et al.*, 2002). The dashed vertical lines indicate the positions of the end-points of the polypeptides. The asterisk indicates the position of the R730A change that disrupts the interaction with RhIB (see text).

B. Far Western blotting performed as described in Fig. 3. Filters with RneHC2 and its derivatives were incubated with RhIB (left panel) or RhIE (right panel), washed and then developed with an ECL detection kit (Amersham) using antibodies specific to each protein. The position of the Rne polypeptides, and the 45 and 33 kDa markers is indicated to the right. In each panel: lanes 1 and 2, RneHC2; lanes 3 and 4, RneHC2(ΔAR2); lane 5, RneHC2(ΔRBD); lanes 6 and 7, RneHBS. Lanes 1–2, 3–4 and 6–7 are duplicates of the same protein extract.

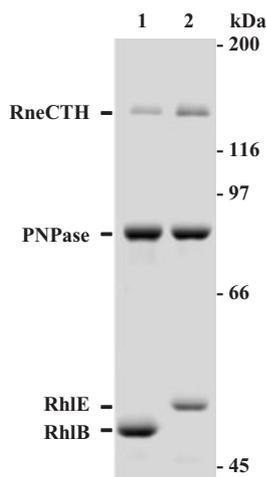
C. RNA-dependent ATPase activity as a function of the concentration of RneHC2 (□) or Rne HBS (■). Reactions, containing 200 nM RhIB and 0–500 nM RneHC2 or RneHBS were performed as described in Fig. 1 except that the yeast RNA was 150 μg ml<sup>-1</sup>. The variation in the maximum level of ATPase hydrolysis between the experiments in Figs 1 and 4 is probably because of different preparations of RhIB used in each experiment.

dependent ATPase activity of RhIB. Note that in Fig. 4B, RhIE does not interact with RneHBS or RneHC2(ΔAR2). These results show that residues 791–843 are important for the interaction with RhIE. The same result was obtained when the RneHC2 derivatives were tested with SrmB and CsdA (data not shown). Thus, the binding of SrmB, RhIE and CsdA depends on contacts with RNase E that lie outside of the region sufficient for RhIB binding.

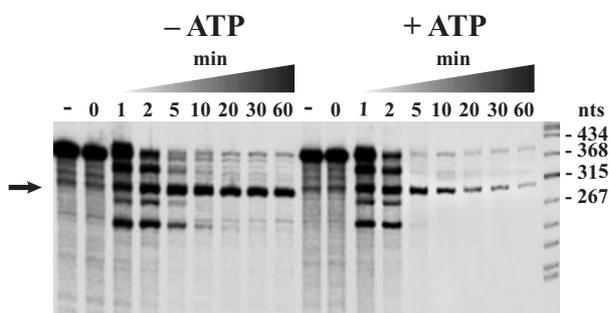
## Reconstitution of a mini-degradosome containing RhIE

Because the above experiments suggest a physical interaction of RNase E with SrmB, RhIE and CsdA, we wanted to ask if these helicases could participate in the degradation of structured RNA by a complex containing RNase E and PNPase. We developed a protocol for reconstituting a subcomplex of the RNA degradosome that contains RhIB, PNPase and the RNase E protein scaffold. Briefly, the RneCTH polypeptide is an N-terminal HIS-tagged version of RNase E in which the catalytic domain (residues 27–497) has been deleted. After absorption to Ni-NTA resin under denaturing conditions, the protein was washed and the denaturing buffer was then replaced by a non-denaturing buffer. PNPase and RhIB were added under native conditions; the complex was washed and then eluted. Figure 5A, lane 1 shows an SDS-PAGE of the eluate containing RneCTH, PNPase and RhIB. A reconstitution in which RhIB was replaced by RhIE is shown in lane 2. These results suggest that, like RhIB, RhIE can interact physically in a complex containing RNase E and PNPase. In a mock reconstitution without the RneCTH, PNPase did not bind to the Ni-NTA resin (data not shown). Thus, its presence depends on RneCTH. However, some RhIB (or RhIE) was detected in the eluates suggesting a

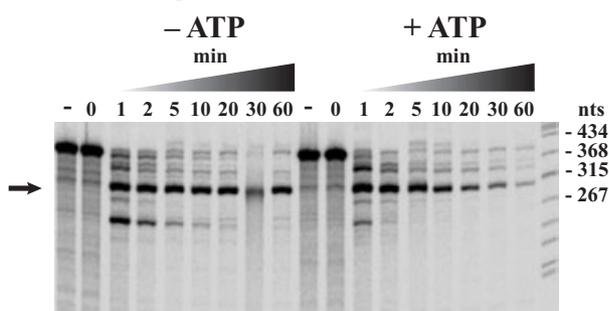
## A SDS-PAGE



## B mini-degradosome (RhIB)



## C mini-degradosome (RhIE)



non-specific interaction of the helicases with the resin. Therefore, the presence of RhIE in the eluate cannot be taken as strong evidence for a physical interaction. Regardless of these considerations, the protocol yields material sufficiently pure to test if there is a functional interaction between RhIE and a complex containing the protein scaffold of RNase E and PNPase.

Figure 5B shows the degradation of an mRNA fragment from the *malE-malF* intergenic region of *E. coli*. This mRNA fragment, which is highly structured because of the presence of multiple REP (repeated extragenic palin-

**Fig. 5.** Reconstitution of a mini-degradosome containing RhIE (A). SYPRO orange-stained SDS-PAGE of a complex reconstituted with the CTH of RNase E, PNPase and RhIB (lane 1) or RhIE (lane 2). A radiolabelled RNA substrate from the intergenic region of the *E. coli malE-malF* genes was digested with the complex containing RhIB (B) or RhIE (C). The reactions, in which the PNPase and the RNA substrate were present at 20 nM each, were performed in the absence or presence of ATP as described previously (Py *et al.*, 1996). The products were separated by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (6%, 29:1, 0.5× TBE, 8 M urea). The arrow to the left of each panel indicates the position of the major pause product, which corresponds to the arrest of degradation just downstream of a stable double-stranded RNA structure formed by the interaction of the two REP sequences (see Py *et al.*, 1996 and references therein). In each time course (–) is a sample without enzyme that was incubated for 30 min; (0) is an aliquot of the reaction taken just before the addition of enzyme. The right lane in each panel is a radiolabelled DNA ladder, prepared by phosphorylating HaeIII + TaqI fragments of pBR322 (Appligene) and denaturing before electrophoresis.

drome) sequences, is known to impede degradation by PNPase *in vitro* and *in vivo* (Py *et al.*, 1996; Coburn *et al.*, 1999; Khemici and Carpousis, 2004). The principal intermediate in its decay, marked by the arrow to the left, corresponds to a product in which PNPase pauses at the base of an extended double-stranded RNA structure. In the presence of ATP, this intermediate is degraded whereas in its absence it persists for up to 60 min. Previous work has shown that PNPase by itself is not stimulated by ATP, and that the stimulation depends on ATP hydrolysis and the binding of both PNPase and RhIB to the protein scaffold of RNase E (Py *et al.*, 1996; Coburn *et al.*, 1999; Khemici and Carpousis, 2004). In Fig. 5C, degradation by the complex containing RhIE is comparable to the complex containing RhIB (Fig. 5B). The degradation of the decay intermediate in the presence of ATP has been observed reproducibly with complexes containing RhIE, prepared in two independent reconstitutions. These results show that RhIE can facilitate RNA degradation by PNPase in an ATP-stimulated reaction.

## Discussion

*Escherichia coli* encodes five DEAD-box RNA helicases. DbpA has been shown to be activated by its interaction with the peptidyltransferase centre of the 23S ribosomal RNA. It has thus been suggested that it might act during ribosome biogenesis (Fuller-Pace *et al.*, 1993; Diges and Uhlenbeck, 2001). SrmB and CsdA, also known as DeaD, were identified as suppressors of defects in ribosome assembly suggesting that they too could have a role in ribosome biogenesis (Nishi *et al.*, 1988; Toone *et al.*, 1991; Moll *et al.*, 2002). Indeed, it has recently been shown that a strain with a knockout of the gene encoding SrmB is cold sensitive and the assembly of the 50S ribosomal subunit is defective (Charollais *et al.*, 2003). A strain with a disruption of the *rhIE* gene, which was identified by its homology with the other DEAD-box genes

(Kalman *et al.*, 1991), is viable (Ohmori, 1994). To date, no phenotype has been associated with the absence of RhlE. The role of DbpA, SrmB and CsdA in ribosome biogenesis is reminiscent of the situation in *Saccharomyces cerevisiae* where 13 out of 27 DEAD-box helicases have been implicated in this process (de la Cruz *et al.*, 1999). Nevertheless, there is evidence suggesting that SrmB, RhlE and CsdA could have other functions. The overexpression of SrmB and CsdA has been shown to stabilize mRNA (lost and Dreyfus, 1994). CsdA is a cold shock protein (Jones *et al.*, 1996) and it has been implicated in facilitating the translation of structured mRNA (Lu *et al.*, 1999). SrmB, RhlE and CsdA also interact with *E. coli* poly(A) polymerase (Raynal and Carpousis, 1999).

In this work, we have presented *in vitro* evidence that SrmB, RhlE and CsdA can bind to RNase E at a site that is different from the RhlB binding site. RneHC2 and RneHC2( $\Delta$ RBD) corresponding, respectively, to residues 628–843 and 694–843 of RNase E bind to RhlB, SrmB, RhlE and CsdA whereas RneHC2( $\Delta$ AR2) and RneHBS corresponding, respectively, to residues 628–790 and 694–790 bind only to RhlB. A mutation changing an arginine at residue 730 to alanine disrupts RhlB binding without affecting the binding of the other DEAD-box proteins. Taken together, these results show that RNase E has at least two binding sites for the DEAD-box proteins: one that is RhlB-specific, containing an important contact at residue 730 and at least one additional site requiring contacts between residues 791 and 843. Our results do not address the question of whether the sites for binding RhlB and a second helicase are independent or overlapping. Furthermore, although it seems likely that a single site interacts with SrmB, RhlE or CsdA, our results do not exclude the possibility of multiple sites each with specificity for one of the helicases. These issues could be addressed by a more detailed mapping of the sites as well as experiments in which the binding of two different helicases to the same molecule of RNase E is examined.

We have reconstituted a 'mini-degradosome' containing the protein scaffold of RNase E, PNPase and RhlB or RhlE. As expected, the mini-degradosome containing RhlB exhibits ATP-stimulated degradation of a structured mRNA fragment. Comparable results were obtained with a complex containing RhlE thus demonstrating the functional replacement of RhlB by RhlE. Attempts to reconstitute SrmB into a complex failed suggesting that, under these conditions, its interaction with RNase E is weaker than RhlB. We were unable to reconstitute a complex with CsdA because of solubility problems. In the accompanying article (Prud'homme-G n reux *et al.*), the functional replacement of RhlB by CsdA is demonstrated. Thus, three DEAD-box proteins, RhlB, RhlE and CsdA, are interchangeable in the *in vitro* degradation of a structured mRNA fragment containing REP sequences from the

*malE-malF* intergenic region. The accompanying article (Prud'homme-G n reux *et al.*) shows that CsdA associates with RNase E upon cold shock, demonstrating for the first time *in vivo* the interaction of a DEAD-box RNA helicase other than RhlB with the RNase E of *E. coli*. An RNase E-based degradosome identified in *Rhodobacter capsulatus* is associated with two DEAD-box proteins (Jäger *et al.*, 2001) and the accompanying article suggests that the *E. coli* cold shock degradosome contains RhlB and CsdA. Thus, the capacity to bind multiple DEAD-box RNA helicases could be a general feature of an RNase E-based degradosome.

RhlB is the only *E. coli* DEAD-box helicase presently known to have a clear role in the degradation of RNA *in vivo* (Khemici and Carpousis, 2004). In a  $\Delta$ *rhlB* strain and its isogenic wild-type control, we have not been able to detect SrmB, RhlE or CsdA by immunoprecipitation of the degradosome during exponential growth in rich medium at 37 C, even when the helicases were overexpressed at the level of a few thousand molecules per cell (unpubl. results). Thus, the recruitment of CsdA to the degradosome appears to depend on physiological conditions and this could also be the case for SrmB and RhlE. The restriction of CsdA binding to RNase E during exponential growth could result from simple competition by substrates such as preribosomal particles. However, models that are more complicated can be envisioned. For example, the binding of enolase, which is present in the RNA degradosome in stoichiometric amounts, requires contacts located between residues 739 and 845 of RNase E (Vanzo *et al.*, 1998). Thus, it could interfere with the interaction between RNase E and RNA helicases other than RhlB. An important conclusion from the above considerations is that the composition of the *E. coli* degradosome appears to depend on physiological conditions. Determining the parameters that affect degradosome composition and understanding how these changes influence its function are obvious goals for future studies.

## Experimental procedures

Standard techniques in genetics and molecular biology have been described (Miller, 1972; Sambrook and Russell, 2001).

### *Mutagenesis and plasmid constructions*

Base substitutions to create an alanine codon were generated using a U.S.E. Mutagenesis Kit (Pharmacia). The substrate plasmid, pUC-RneHC2, was constructed by replacing the BamHI-NdeI fragment of pUC18 with the BamHI-NdeI fragment from pET11-RneHC2 (Vanzo *et al.*, 1998). Mutations were confirmed by DNA sequencing. The BamHI-NdeI fragment was then reintroduced into pET15a.

The pET11a-derived vectors for expression of RhlB, RhlE,

SrmB, CsdA, PNPase and RneHC2 were previously described (Py *et al.*, 1996; Coburn and Mackie, 1998; Vanzo *et al.*, 1998; Raynal and Carpousis, 1999). To produce His-tagged proteins for antibody production, the genes encoding RhlB, RhlE and CsdA were transferred from the pET11a vector to pET15a.

The construction of the plasmids for expressing RneHC2( $\Delta$ RBD), RneHC2( $\Delta$ AR2) and RneHBS was as follows. Briefly, the corresponding regions in the pUC-RneHC2 plasmid (see above) were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and then blunt end ligated to pSK (Stratagene) digested with EcoRV. When necessary, BamHI or NdeI sites were added with the PCR primer. The NdeI-BamHI fragments were excised and ligated to the pET11a vector (Novagen) digested by the same enzymes. In all constructs, the polypeptides have a carboxyl terminal fusion with the C-terminal end of bacteriophage T7 *gene10*, which is encoded by the pET vector.

The His-tagged RneCTH polypeptide was expressed from pET15 (Novagen). Briefly, pET15-*rne* was constructed cloning the NdeI-ApoI fragment from pET11-*rne* (Vanzo *et al.*, 1998) into pET15a digested with NdeI and EcoRI. pET15-*rneCTH*, was constructed by deleting the region corresponding to residues 27–497 of RNase E. Thus, the RneCTH polypeptide contains the His-tag from pET15, the first 26 amino acids of RNase E and amino acids 498–1061 of RNase E.

#### *Protein expression, preparation of extracts and Far Western blotting*

Proteins were expressed in BL21(DE3) (Novagen). For Far Western blotting, short inductions were employed (20–30 min) to limit the level of expression (1–2% of the total protein). Total extracts for blotting were prepared by boiling cells in SDS-PAGE loading buffer. To obtain partially purified proteins for ATPase assays and as probes for Far Western blots, after a long induction (2 h), small-scale extracts were prepared as described (Carpousis *et al.*, 2001). Ammonium sulphate pellets were suspended in buffer BG\* with 300 mM NaCl. Protein concentrations were determined by Lowry assay using a BSA standard. These partially purified proteins are essentially free of ribosomes and nucleic acids. The purity of the proteins was estimated as a percentage of total protein by SYPRO orange (Interchim) staining of SDS-PAGE (12% polyacrylamide) and quantification using a Molecular Dynamics FluorImager. All the proteins were 40–50% pure (RneHC2 and its derivatives; RhlB, RhlE and SrmB) except for CdsA, which was somewhat less enriched (20–40%). In the results described here, the quantity of protein indicated is the total protein determined by Lowry assay corrected for the purity of the preparation.

Far Western blotting was performed as described (Vanzo *et al.*, 1998) using Hybond C Extra (Amersham). Partially purified protein (30  $\mu$ g) was incubated with the blots. Antibodies against RNase E and SrmB were described previously (Vanzo *et al.*, 1998; Raynal and Carpousis, 1999). Antibodies against RhlB, CsdA and RhlE were raised in rabbits (EuroGentec) using N-terminal HIS-tagged proteins purified on Ni-NTA spin columns under denaturing conditions (Qiagen, 8 M urea).

#### *Reconstitution of mini-degradosomes and RNA degradation assays*

ASP-60 fractions containing overexpressed RhlB, RhlE or PNPase were prepared from 200 ml of cultures as described (Carpousis *et al.*, 2001). pET15-RneCTH in BL21(DE3) was induced at an OD<sub>600</sub> of 0.4 with 1 mM IPTG and then incubated for 2 h at 37°C. A cleared lysate, from 50 ml of culture, was prepared in Buffer B according to the manufacturer's instructions (Qiagen). These steps, which are under denaturing conditions with 8 M urea, were performed at room temperature. Approximately 100  $\mu$ l of cleared lysate containing about 200  $\mu$ g RneCTH was diluted to 600  $\mu$ l in Buffer B and passed three times over a Ni-NTA spin column (Qiagen). The column was washed with 600  $\mu$ l Buffer C (Qiagen), equilibrated with 10 mM Tris, pH 7.5, 500 mM NaCl, 5% glycerol; 0.1% Genapol X-080, 0.1 mg ml<sup>-1</sup> acetylated BSA, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 1 mM PMSF, 2  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> aprotinin, 0.8  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> pepstatin, 0.8  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> leupeptin (Buffer 1), transferred to 4°C and then washed again with cold Buffer 1. Subsequent steps were at 4°C. Approximately 500  $\mu$ g of PNPase and 300  $\mu$ g RhlB were diluted into 500  $\mu$ l of Buffer 1 containing 50 mM imidazole (pH 7.0 throughout) and passed over the column three times. After two washes with Buffer 2 (Buffer 1 containing 20 mM imidazole instead of Tris), the reconstitutes were eluted with Buffer 2 containing 300 mM imidazole (3  $\times$  200  $\mu$ l). The first two fractions were pooled, concentrated with a Centricon YM-50 unit (Millipore) and washed once with 10 volumes of EB, with protease inhibitors, lacking detergent (Carpousis *et al.*, 2001). The same procedure was used to reconstitute a complex containing RhlE instead of RhlB.

The mini-degradosomes were assayed for PNPase-mediated degradation of a <sup>32</sup>P-labelled 375 nt *malEF* REP RNA as described (Py *et al.*, 1996) with minor changes. KCl was removed from the reaction buffer; 5 mM DTT and 40 units of RNasin were added.

#### **Acknowledgements**

We thank M. Dreyfus, I. Iost, G. Mackie and R. Simons for discussions and the communication of results before publication; G. Mackie for the strain that overproduces PNPase. This research was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) with aid from the technical platform of the IEFG (IFR 109). Additional funding was from the Cancer Research Association (ARC) and the Fundamental Microbiology Program of the Ministry of Education (MENRT). V.K., I.T. and N.V. were predoctoral students with support from the MENRT and the ARC.

#### **References**

- Bernstein, J.A., Lin, P.H., Cohen, S.N., and Lin-Chao, S. (2004) Global analysis of *Escherichia coli* RNA degradosome function using DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 2758–2763.
- Carpousis, A.J., Van Houwe, G., Ehretsmann, C., and Krisch, H.M. (1994) Copurification of *E. coli* RNAase E and PNPase: evidence for a specific association between two

- enzymes important in RNA processing and degradation. *Cell* **76**: 889–900.
- Carpousis, A.J., Leroy, A., Vanzo, N., and Khemici, V. (2001) *Escherichia coli* RNA degradosome. *Methods Enzymol* **342**: 333–345.
- Charollais, J., Pflieger, D., Vinh, J., Dreyfus, M., and Iost, I. (2003) The DEAD-box RNA helicase SrmB is involved in the assembly of 50S ribosomal subunits in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **48**: 1253–1265.
- Coburn, G.A., and Mackie, G.A. (1998) Reconstitution of the degradation of the mRNA for ribosomal protein S20 with purified enzymes. *J Mol Biol* **279**: 1061–1074.
- Coburn, G.A., and Mackie, G.A. (1999) Degradation of mRNA in *Escherichia coli*: an old problem with some new twists. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **62**: 55–108.
- Coburn, G.A., Miao, X., Briant, D.J., and Mackie, G.A. (1999) Reconstitution of a minimal RNA degradosome demonstrates functional coordination between a-3' exonuclease and a DEAD-box RNA helicase. *Genes Dev* **13**: 2594–2603.
- de la Cruz, J., Kressler, D., Tollervey, D., and Linder, P. (1998) Dob1p (Mtr4p) is a putative ATP-dependent RNA helicase required for the 3' end formation of 5.8S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **17**: 1128–1140.
- de la Cruz, J., Kressler, D., and Linder, P. (1999) Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends Biochem Sci* **24**: 192–198.
- Diges, C.M., and Uhlenbeck, O.C. (2001) *Escherichia coli* DbpA is an RNA helicase that requires hairpin 92 of 23S rRNA. *EMBO J* **20**: 5503–5512.
- Dziembowski, A., and Stepien, P.P. (2001) Genetic and biochemical approaches for analysis of mitochondrial degradosome from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* **342**: 367–378.
- Fuller-Pace, F.V., Nicol, S.M., Reid, A.D., and Lane, D.P. (1993) DbpA: a DEAD box protein specifically activated by 23s rRNA. *EMBO J* **12**: 3619–3626.
- Grunberg-Manago, M. (1999) Messenger RNA stability and its role in control of gene expression in bacteria and phages. *Annu Rev Genet* **33**: 193–227.
- Iost, I., and Dreyfus, M. (1994) mRNAs can be stabilized by DEAD-box proteins. *Nature* **372**: 193–196.
- Jacobs, J.S., Anderson, A.R., and Parker, R.P. (1998) The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J* **17**: 1497–1506.
- Jäger, S., Fuhrmann, O., Heck, C., Hebermehl, M., Schiltz, E., Rauhut, R., and Klug, G. (2001) An mRNA degrading complex in *Rhodobacter capsulatus*. *Nucleic Acids Res* **29**: 4581–4588.
- Jones, P.G., Mitta, M., Kim, Y., Jiang, W., and Inouye, M. (1996) Cold shock induces a major ribosomal-associated protein that unwinds double-stranded RNA in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 76–80.
- Kaberdin, V.R., Miczak, A., Jakobsen, J.S., Lin-Chao, S., McDowall, K.J., and von Gabain, A. (1998) The endoribonucleolytic N-terminal half of *Escherichia coli* RNase E is evolutionarily conserved in *Synechocystis sp.* & other bacteria but not the C-terminal half, which is sufficient for degradosome assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 11637–11642.
- Kalman, M., Murphy, H., and Cashel, M. (1991) *rhIB*, a new *Escherichia coli* K-12 gene with an RNA helicase-like protein sequence motif, one of at least five such possible genes in a prokaryote. *New Biol* **3**: 886–895.
- Khemici, V., and Carpousis, A.J. (2004) The RNA degradosome and poly (A) polymerase of *Escherichia coli* are required *in vivo* for the degradation of small mRNA decay intermediates containing REP-stabilizers. *Mol Microbiol* **51**: 777–790.
- Kido, M., Yamanaka, K., Mitani, T., Niki, H., Ogura, T., and Hiraga, S. (1996) RNase E polypeptides lacking a carboxyl-terminal half suppress a *mukB* mutation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**: 3917–3925.
- Kushner, S.R. (2002) mRNA decay in *Escherichia coli* comes of age. *J Bacteriol* **184**: 4658–4665.
- Leroy, A., Vanzo, N.F., Sousa, S., Dreyfus, M., and Carpousis, A.J. (2002) Function in *Escherichia coli* of the non-catalytic part of RNase E: role in the degradation of ribosome-free mRNA. *Mol Microbiol* **45**: 1231–1243.
- Liou, G.G., Chang, H.Y., Lin, C.S., and Lin-Chao, S. (2002) DEAD Box RhlB RNA Helicase Physically Associates with Exoribonuclease PNPase to Degrade Double-stranded RNA Independent of the Degradosome-assembling Region of RNase E. *J Biol Chem* **277**: 41157–41162.
- Lopez, P.J., Marchand, I., Joyce, S.A., and Dreyfus, M. (1999) The C-terminal half of RNase E, which organizes the *Escherichia coli* degradosome, participates in mRNA degradation but not rRNA processing *in vivo*. *Mol Microbiol* **33**: 188–199.
- Lu, J., Aoki, H., and Ganoza, M.C. (1999) Molecular characterization of a prokaryotic translation factor homologous to the eukaryotic initiation factor eIF4A. *Int J Biochem Cell Biol* **31**: 215–229.
- McDowall, K.J., and Cohen, S.N. (1996) The N-terminal domain of the *rne* gene product has RNase E activity and is non-overlapping with the arginine-rich RNA-binding site. *J Mol Biol* **255**: 349–355.
- Margossian, S.P., and Butow, R.A. (1996) RNA turnover and the control of mitochondrial gene expression. *Trends Biochem Sci* **21**: 392–396.
- Miczak, A., Kaberdin, V.R., Wei, C.L., and Lin-Chao, S. (1996) Proteins associated with RNase E in a multicomponent ribonucleolytic complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 3865–3869.
- Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Moll, I., Grill, S., Grundling, A., and Blasi, U. (2002) Effects of ribosomal proteins S1, S2 and the DeaD/CsdA DEAD-box helicase on translation of leaderless and canonical mRNAs in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **44**: 1387–1396.
- Nishi, K., Morel-Deville, F., Hershey, J.W., Leighton, T., and Schnier, J. (1988) An eIF-4A-like protein is a suppressor of an *Escherichia coli* mutant defective in 50S ribosomal subunit assembly. *Nature* **336**: 496–498.
- Ohmori, H. (1994) Structural analysis of the *rhIE* gene of *Escherichia coli*. *Jpn J Genet* **69**: 1–12.
- Ow, M.C., Liu, Q., and Kushner, S.R. (2000) Analysis of mRNA decay and rRNA processing in *Escherichia coli* in

- the absence of RNase E-based degradosome assembly. *Mol Microbiol* **38**: 854–866.
- Py, B., Causton, H., Mudd, E.A., and Higgins, C.F. (1994) A protein complex mediating mRNA degradation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **14**: 717–729.
- Py, B., Higgins, C.F., Krisch, H.M., and Carpousis, A.J. (1996) A DEAD-box RNA helicase in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Nature* **381**: 169–172.
- Raynal, L.C., and Carpousis, A.J. (1999) Poly (A) polymerase I of *Escherichia coli*: characterization of the catalytic domain, an RNA binding site and regions for the interaction with proteins involved in mRNA degradation. *Mol Microbiol* **32**: 765–775.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Symmons, M.F., Williams, M.G., Luisi, B.F., Jones, G.H., and Carpousis, A.J. (2002) Running rings around RNA: a superfamily of phosphate-dependent RNases. *Trends Biochem Sci* **27**: 11–18.
- Tanner, N.K., and Linder, P. (2001) DExD/H box RNA helicases: from generic motors to specific dissociation functions. *Mol Cell* **8**: 251–262.
- Taraseviciene, L., Bjork, G.R., and Uhlin, B.E. (1995) Evidence for an RNA binding region in the *Escherichia coli* processing endoribonuclease RNase E. *J Biol Chem* **270**: 26391–26398.
- Toone, W.M., Rudd, K.E., and Friesen, J.D. (1991) *deaD*, a new *Escherichia coli* gene encoding a presumed ATP-dependent RNA helicase, can suppress a mutation in *rpsB*, the gene encoding ribosomal protein S2. *J Bacteriol* **173**: 3291–3302.
- Vanzo, N.F., Li, Y.S., Py, B., Blum, E., Higgins, C.F., Raynal, L.C., et al. (1998) Ribonuclease E organizes the protein interactions in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Genes Dev* **12**: 2770–2781.
- Zuo, Y., and Deutscher, M.P. (2001) Exoribonuclease super-families: structural analysis and phylogenetic distribution. *Nucleic Acids Res* **29**: 1017–1026.

### C) Commentaires supplémentaires

#### a) RhlE est-elle capable d'interagir avec la RNase E *in vivo* ?

Les résultats décrits dans l'article I suggèrent que RhlE est capable de remplacer fonctionnellement RhlB au sein du dégradosome *in vitro*. Des expériences de double hybride ont été réalisées chez *E. coli* dans le but de vérifier si l'interaction entre la RNase E et RhlE existe également *in vivo* (expériences réalisées par Sophie Blagnié, stage de maîtrise). Ce système de double hybride a déjà été utilisé afin de mettre en évidence l'interaction physique entre la RNase E et RhlB *in vivo* ainsi qu'une interaction entre RhlB et la PNPase (Liou *et al.*, 2002). Les résultats obtenus ne montrent aucune interaction physique directe entre la RNase E et les hélicases SrmB et RhlE alors qu'on observe les résultats attendus pour le témoin positif RhlB (résultats non montrés). Il semble donc que les hélicases SrmB et RhlE ne soient pas capables d'interagir *in vivo*, ou de manière peu suffisante, avec la RNase E dans ces conditions expérimentales. On ne peut pas exclure l'hypothèse que la construction du système double hybride ait conservé le site d'interaction de RhlB avec la RNase E et modifié celui des autres hélicases. Cependant, ces résultats semblent suggérer que seul RhlB joue un rôle dans le dégradosome, *in vivo*.

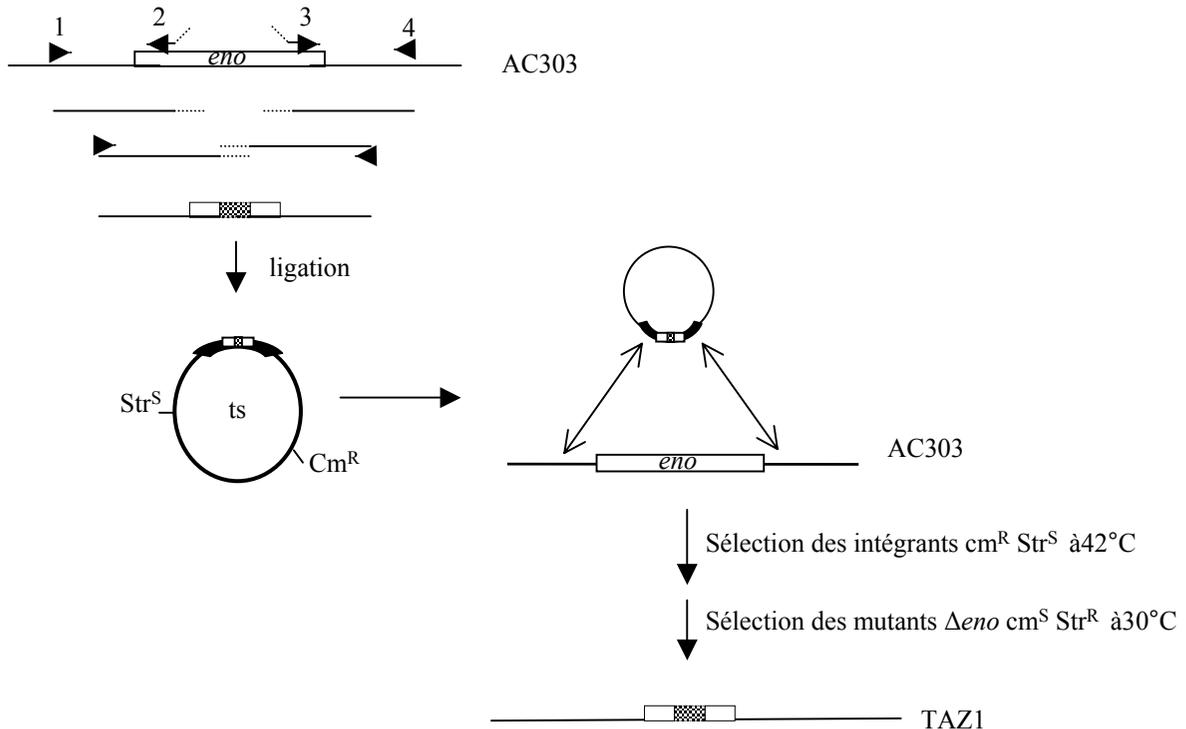
#### b) Existe-t-il un dégradosome alternatif ?

Simultanément à notre article, Prud'homme-Généreux et ses collègues ont publié des résultats qui montrent la coimmuno-précipitation de CsdA et de la RNase E *in vitro* et *in vivo*. Ces résultats suggèrent fortement que CsdA est capable d'interagir avec la RNase E pour formé un complexe, et ce, après sa surexpression physiologique induite par un choc thermique à basse température (Prud'homme-Genereux *et al.*, 2004). Des expériences biochimiques réalisées à partir de mini dégradosome contenant RhlB ou CsdA montrent que ces deux types de complexes ont une activité enzymatique de dégradation semblable et ATP dépendante. Cette activité ATPasique est dans les deux cas dépendante de la présence d'ARN. Ces résultats montrent que CsdA est capable, *in vitro*, de remplacer fonctionnellement RhlB au sein du dégradosome ce qui est en accord avec nos résultats obtenus avec RhlE.

De plus, il a été montré que RhlB avait un rôle spécifique dans la dégradation d'ARNm fortement structurés (Khemici and Carpousis, 2004). Cependant la délétion du gène *rhlB* n'entraîne aucun défaut de croissance de la bactérie. Il semble donc que l'accumulation d'intermédiaires de dégradation ne soit pas délétère pour la cellule. En plus de son rôle coopératif avec la PNPase pour la dégradation des structures secondaires, il semble que RhlB collabore avec la RNase E en modulant son activité endonucléolytique (Khemici V., Poljak L., Toesca I et Carpousis A.J., manuscrit en préparation). Ces fonctions bien spécifiques attribuées à RhlB semblent écarter l'hypothèse de redondance des hélicases à boîte DEAD dans la cellule.

Ainsi, l'ensemble des résultats concernant les hélicases d'ARN à boîte DEAD privilégie l'hypothèse de l'existence de dégradosomes alternatifs formés spécifiquement en réponse à une variation des conditions de croissance plutôt qu'à une redondance entre ces protéines.

L'ensemble des travaux concernant la protéine RhlB a par la suite entièrement été mené par Vanessa Khemici. Pour ma part, je me suis intéressée à l'Enolase et à son rôle éventuel au sein du dégradosome et son implication dans la dégradation des messagers chez *E. coli*.



**Figure 18 :** Construction du mutant  $\Delta eno$ . Des fragments PCR obtenus avec les couples d'oligonucléotides 1-2 (*eno*60-*eno*1886) et 3-4 (*eno*3135-*eno*4714) contiennent respectivement les régions en amont et en aval du gène *eno* ainsi que la séquence codant les huit premiers et huit derniers acides aminés de l'Enolase (rectangle blanc). Les oligonucléotides 2 et 3 portent en plus une séquence complémentaire figurée en pointillés et qui code une étiquette représentée par le rectangle hachuré. Le fragment PCR obtenu avec les oligonucléotides 1 et 4 a été ensuite digéré puis ligué dans un plasmide digéré par les mêmes enzymes de restriction. Ce plasmide possède une répllication thermosensible (*ts*) ainsi que les gènes dominants codant la sensibilité à la Streptomycine (*Str<sup>S</sup>*) et la résistance au chloramphénicol (*cm<sup>R</sup>*). Après transformation des souches AC303 avec ce plasmide, les évènements d'insertion et d'excision du vecteur ont été sélectionnés et les souches portant la délétion du gène *eno* (TAZ1) ont été isolées.

## I - 2 - Recherche du rôle de l'Enolase au sein du dégradosome et dans la dégradation des ARNm

### A) La construction du mutant $\Delta eno$

Dans le but de déterminer le rôle de la protéine Enolase en dehors de celui connu dans la glycolyse, une bactérie délétée du gène codant cette protéine a été construite. Puis, un phénotype associé à la délétion a été recherché au niveau de la dégradation des ARNm.

#### a) La stratégie de délétion

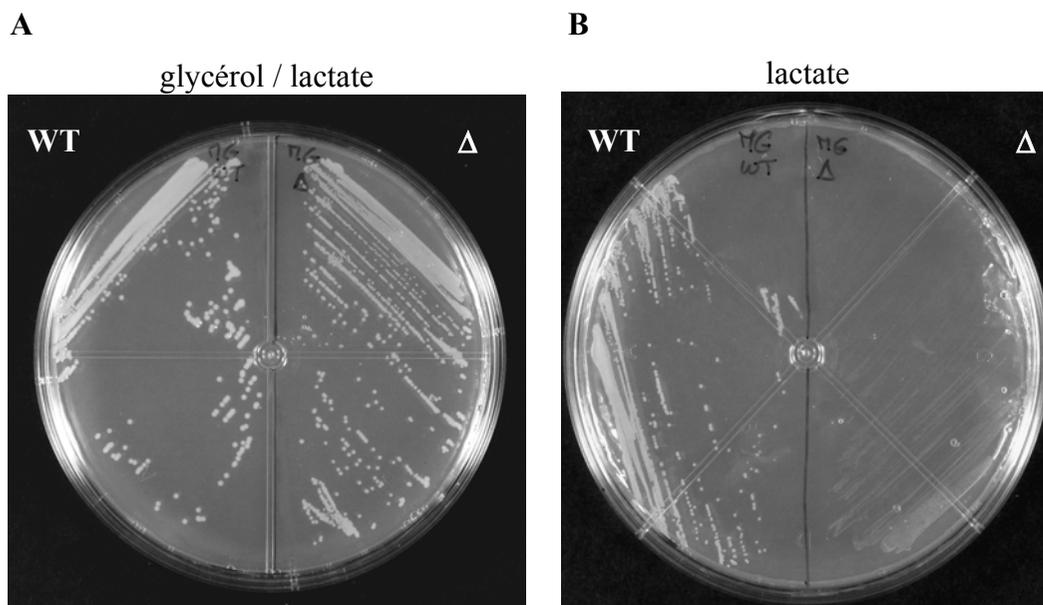
La délétion de la totalité de la séquence codante du gène *eno* exceptés les huit premiers et les huit derniers codons a été générée après deux étapes successives de PCR à partir des amorces Eno60/Eno1886 et Eno3135/Eno4714 dans un premier temps, puis Eno60/Eno4714 (cf. figure 18). Grâce à ces amorces, une étiquette correspondant à 8 acides aminés du gène 32 du phage T4 a été insérée. Cette séquence codante permet ainsi de conserver le cadre de lecture original et d'éviter d'éventuels effets polaires sur les gènes situés en aval de la délétion. Le produit PCR final qui contient ainsi la délétion du gène *eno* a été inséré dans un plasmide. La répllication thermosensible de celui-ci permet d'induire les événements d'intégration et d'excision du vecteur dans le chromosome bactérien. Par recombinaison homologue, le gène *eno* sauvage de la souche AC303 a ainsi été remplacé par la copie délétée du plasmide. Enfin, un milieu permissif contenant à la fois du glycérol et du lactate a permis d'isoler une souche contenant *a priori* la délétion voulue. Cette souche est appelée TAZ1.

La présence de la délétion dans la souche TAZ1 a alors été vérifiée par des approches biologiques et moléculaires.

#### b) Vérification de la délétion du gène *eno*

##### ( $\alpha$ ) Vérification du phénotype de croissance de la souche TAZ1

La délétion du gène *eno* entraîne le blocage de la voie de la glycolyse et rend l'utilisation du glucose impossible qui devient alors toxique pour la cellule. La croissance d'une souche ne



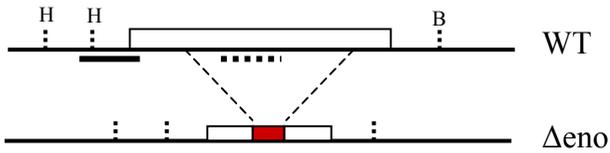
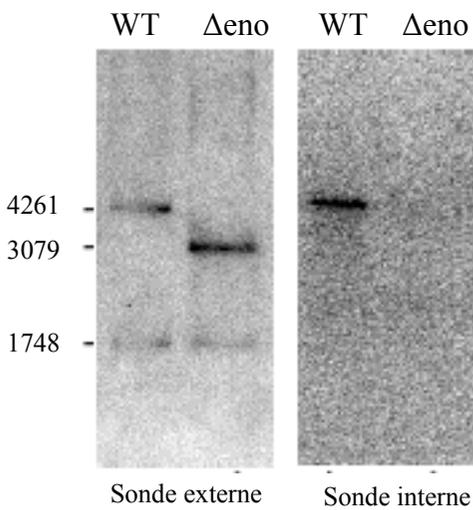
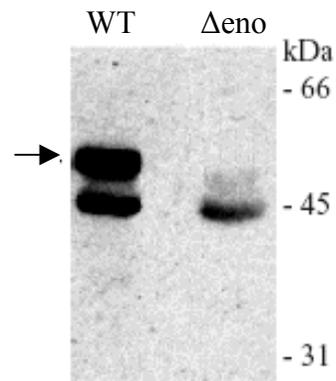
**Figure 19 :** Phénotype de croissance du mutant  $\Delta eno$ . Croissance des souches AC303 (wt) et TAZ1( $\Delta eno$ ) sur un milieu solide MOPS contenant 0,4% de glycérol et 0,2% de lactate (A) ou sur le même milieu sans glycérol (B).

possédant plus l'Enolase dépend alors de la présence du glycérol. Celui-ci est utilisé comme substrat nécessaire à la synthèse de composants essentiels tels que les constituants de la membrane cellulaire. La croissance de cette souche nécessite également une deuxième source de carbone, comme ici le lactate. La conversion du lactate en pyruvate permet d'alimenter le cycle de Krebs, fournisseur d'énergie et de précurseurs des acides aminés essentiels (cf. figure 6, Introduction). La figure 19 montre la croissance des souches AC303 et TAZ1 sur un milieu solide contenant du lactate avec (A) ou sans (B) glycérol. En présence des deux sources de carbone, on observe des colonies d'aspect similaire pour les deux souches. Ces résultats montrent que celles-ci sont capables de croître normalement sur le milieu utilisé. En revanche, en absence de glycérol, on n'observe aucune colonie pour la souche TAZ1. Des résultats similaires ont été obtenus avec un milieu de croissance contenant du glycérol avec ou sans lactate (résultats non montrés). La toxicité du glucose a également été testée. La présence de glucose dans le milieu contenant du glycérol et du lactate ne permet pas l'obtention de colonie pour la souche TAZ1 (résultats non montrés). Ces observations corroborent avec le phénotype attendu pour un mutant  $\Delta eno$  et conforte l'idée que la souche TAZ1 isolée porte la délétion du gène *eno*. Afin d'en être certain, des vérifications moléculaires et biochimiques ont également été effectuées.

### ( $\beta$ ) Vérifications moléculaires et biochimiques de la délétion du gène *eno*

#### ◆ Southern blot

La délétion du gène *eno* dans la souche TAZ1 a été vérifiée par Southern blot (cf. figure 20). L'ADN génomique de la souche parentale AC303 et de la souche TAZ1 a été extrait et digéré par les enzymes de restriction puis hybridé avec deux sondes radioactives. La sonde externe est complémentaire d'une séquence située en amont de la région délétée. La sonde interne correspond à la séquence complémentaire délétée chez le mutant  $\Delta eno$  (cf. figure 20A). L'hybridation effectuée avec la sonde externe révèle la présence de deux bandes (cf. figure 20B). La bande migrant à 1748 pb, présente dans les deux pistes wt et  $\Delta eno$ , correspond au fragment généré par les coupures aux sites HindIII. La bande migrant à 4261 pb correspond à la taille attendue pour le fragment HinIII/BamHI qui contient le gène *eno* entier de la souche AC303. Cette bande est également révélée avec la sonde interne. La piste  $\Delta eno$  qui correspond à la souche TAZ1 montre une bande migrant à une taille inférieure à

**A****B****C**

**Figure 20 : Vérification de la délétion du gène *eno* dans la souche TAZ1.**

(A) Schéma de la région génomique *eno* des souches AC303 (WT) et TAZ1 ( $\Delta eno$ ). Les sites de restriction HindIII et BamHI y sont figurés. Les sondes utilisées lors du Southern blot montrées en (B) sont représentées par un trait plein ou en pointillé pour la sonde externe et interne, respectivement. (B) Southern blot réalisés à partir de l'ADN des souches AC303 et TAZ1 digéré par les enzymes HindIII et BamHI. Les sondes externe et interne utilisées pour l'hybridation sont figurées sur le schéma (A). (C) Western blot réalisé avec un anticorps dirigé contre la protéine Enolase sur un extrait protéique total des souches AC303 et TAZ1. La position de l'Enolase est indiquée par la flèche.

celle présente dans la piste témoin wt. La taille de 3079 pb est celle attendue pour le fragment d'ADN contenant la délétion du gène *eno*. L'hybridation avec la sonde interne ne révèle aucune bande pour la souche TAZ1. Ces résultats démontrent que la souche TAZ1 porte sur son chromosome la délétion du gène *eno*.

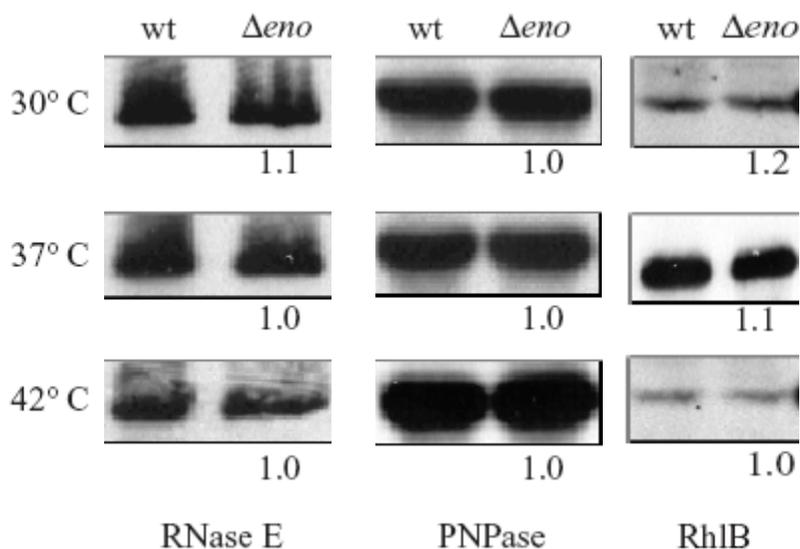
#### ◆ Absence de la protéine dans la cellule

L'absence de la protéine Enolase dans la cellule a également été vérifiée par Western blot (cf. figure 20C). La piste témoin correspondant à la souche AC303 (wt) montre la présence d'une bande migrant à la taille attendue pour l'Enolase. Cette bande n'est pas observée dans la piste correspondant au mutant  $\Delta eno$ . Ces résultats confirment que le gène *eno* est bien délété dans la souche TAZ1 et qu'aucune protéine Enolase n'est exprimée dans la cellule. L'absence de la protéine a été confirmée par la mesure d'activité spécifique de l'Enolase dans des fractions protéiques précipitées au sulfate d'ammonium (60%) des souches AC303 et TAZ1. Une activité de 83 U/mg a été mesurée dans la souche sauvage témoin. Aucune activité n'a été détectée chez la souche TAZ1 (résultats non montrés). Ces résultats confirment qu'aucune protéine Enolase n'est présente chez la souche mutante TAZ1.

Ces expériences complémentaires montrent clairement que le mutant TAZ1 isolé porte la délétion du gène *eno* et qu'aucune activité protéique de l'Enolase n'est présente dans la cellule. La souche TAZ1 a donc été utilisée pour la suite des expériences réalisées dans le but de rechercher le rôle de l'Enolase au sein du dégradosome et dans la dégradation des ARNm.

#### B) L'Enolase joue t-elle un rôle sur le dégradosome ?

L'hypothèse que l'Enolase puisse jouer un rôle structural dans le dégradosome a été proposée. Dans le but de tester cette hypothèse, des effets de l'absence de l'Enolase ont été recherchés sur le dégradosome et ses composants protéiques.



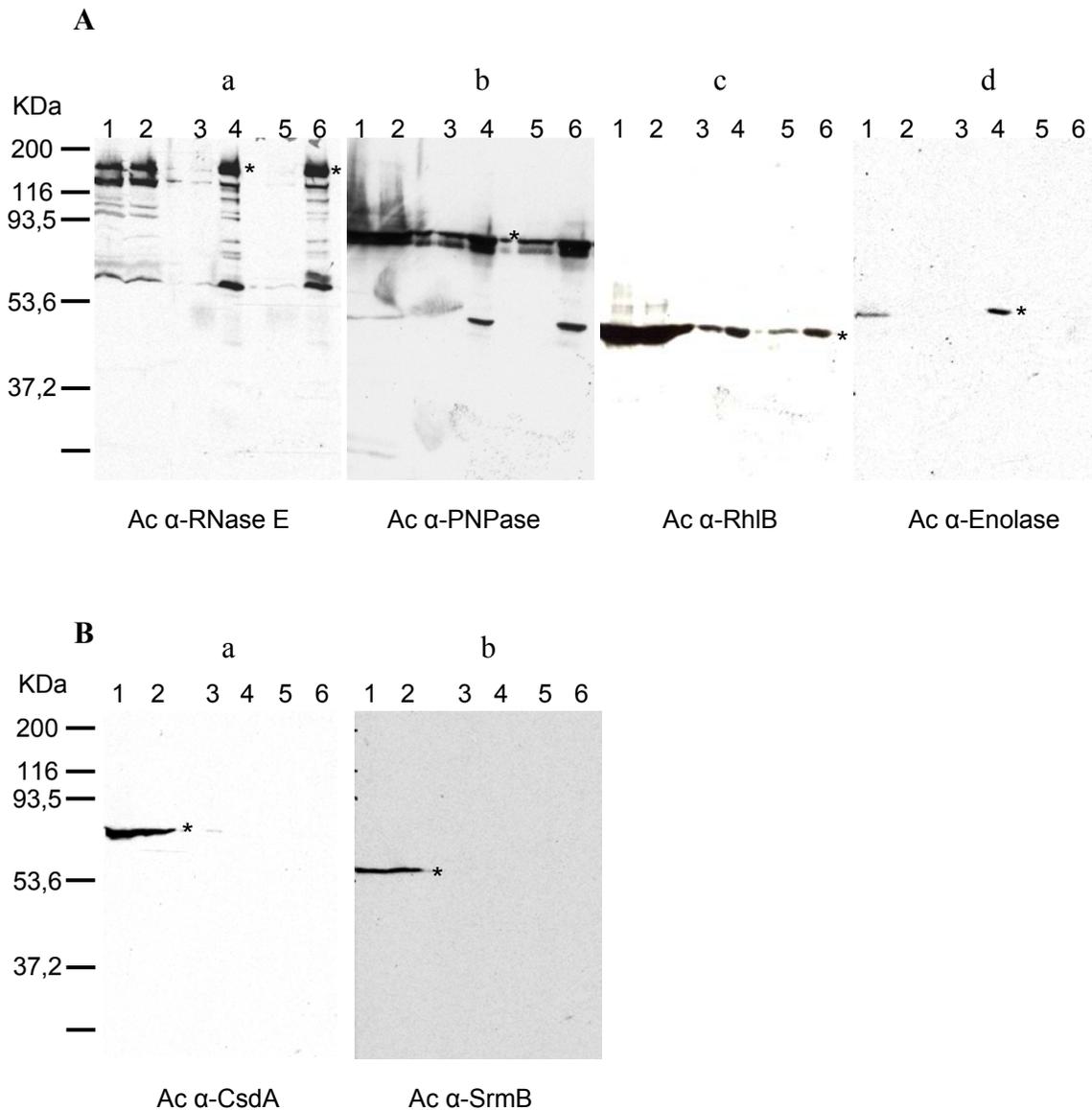
**Figure 21 :Quantité totale de protéines du dégradosome en absence de l'Enolase.** Western blot faits à partir d'échantillons protéiques des souches AC303 (wt) et TAZ1 ( $\Delta eno$ ) cultivées dans les milieux A et A\* respectivement, à différentes températures. Des anticorps  $\alpha$ RNase E (série de gauche),  $\alpha$ PNPase (série centrale) et  $\alpha$ RhIB (série de droite) ont été utilisés. Les chiffres indiqués correspondent à la quantité relative de chacune des protéines après quantification du signal et normalisation par rapport à celui obtenu pour la souche sauvage.

a) *L'Enolase influence-t-elle la quantité des autres composants du dégradosome ?*

Afin de regarder si l'absence de l'Enolase dans la cellule entraîne une modification de la quantité cellulaire des autres protéines majeures du dégradosome, des Western blot contre les protéines RNase E, PNPase et RhlB ont été réalisés sur des extraits protéiques totaux obtenus à partir des souches AC303 et TAZ1 (cf. figure 21). L'intensité du signal des bandes révélées pour la souche témoin AC303 (piste wt) a été quantifiée et normalisée à 1. L'intensité des bandes obtenues pour la souche TAZ1 (piste  $\Delta eno$ ) a été quantifiée et comparée à celle de la souche témoin. Les chiffres inscrits en dessous de chaque piste représentent le ratio wt/ $\Delta eno$ . Aucune différence significative n'a été observée pour les protéines RNase E, PNPase et RhlB dans les souches cultivées à 30°C exprimant ou non l'Enolase. La même expérience a été réalisée à deux autres températures (37° et à 42°C). Aucune différence dans la quantité de protéines du dégradosome n'a été observée. Ces résultats suggèrent que l'absence de l'Enolase dans la cellule n'affecte pas la quantité globale des protéines du dégradosome dans nos conditions de croissance.

b) *L'Enolase influence-t-elle la composition du dégradosome ?*

Un rôle structural a été suggéré pour l'Enolase au sein du dégradosome. L'hypothèse serait que l'Enolase joue un rôle dans le maintien des protéines sous forme de complexe stable. Afin de tester cette hypothèse, la présence du dégradosome a été vérifiée dans les cellules contenant ou non la protéine Enolase. Pour cela, des expériences de co-immunoprécipitation ont été réalisées avec des anticorps polyclonaux anti-RNase E fixés à des billes d'agarose couplées à la protéine A (cf. figure 22A). Le Western blot réalisé avec les anticorps anti-RNase E (figure 22A-a) montre que la protéine est bien exprimée dans les souches AC303 et TAZ1 (piste 1 et 2). La comparaison des pistes 3 et 4 ainsi que 5 et 6 indique que la protéine RNase E se fixe uniquement aux billes d'agarose incubées avec les anticorps anti-RNase E. Les bandes de taille inférieure sont probablement des produits de dégradation de l'enzyme générés au cours de l'expérience. Les profils protéiques des immunoprécipitations pour les souches AC303 et TAZ1 ne présentent pas de différence significative. Les Western blot réalisés avec les anticorps anti-PNPase (cf. figure 22A-b) et anti-RhlB (cf. figure 22A-c) montrent la présence de bandes correspondant aux tailles attendues pour ces deux protéines.



**Figure 22 : Co-immunoprécipitations réalisées avec l'anticorps anti-RNase E.** (A) Western blot réalisés avec les anticorps dirigés contre les protéines majeures du dégradosome (a =  $\alpha$ RNase E; b =  $\alpha$ PNPase; c =  $\alpha$ RhlB; d =  $\alpha$ Enolase). La position des protéines est indiquée par un astérisque. (B) Western blot réalisés avec les anticorps dirigés contre CsdA et SrmB. Les pistes 1 et 2 représentent la fraction protéique des souches AC303 et TAZ1, respectivement, après précipitation par 60% de sulfate d'ammonium. Les pistes 3 et 4 sont les fractions protéiques après incubation avec le préImmun et l'anticorps  $\alpha$ -RNase E, respectivement, pour la souche AC303. Les pistes 4 et 5 sont les fractions protéiques après incubation avec le préImmun et l'anticorps  $\alpha$ -RNase E, respectivement, pour la souche TAZ1.

La présence de ces bandes dans les pistes 4 et 6 indique que ces protéines sont capables d'interagir avec la RNase E, que l'Enolase soit présente ou non dans la cellule. On peut noter une fixation non spécifique de RhlB et de la PNPase avec les billes d'agarose seules probablement due à une étape de lavage insuffisante (cf. figure 22A-c, pistes 3 et 4). L'absence de bande correspondant à la protéine Enolase dans les pistes 2, 5 et 6 du Western blot « A-d » montre que la souche TAZ1 à partir de laquelle l'extrait protéique a été préparé n'exprime pas l'Enolase. Ce Western blot sert de contrôle négatif.

L'ensemble de ces résultats montre que le complexe protéique est capable de s'assembler en absence de l'Enolase. Aucune différence significative dans la quantité de chacune de ces protéines n'a été observée entre les pistes des souches AC303 et TAZ1 (données non montrées). Ces résultats suggèrent que l'Enolase n'a pas de rôle quant à la structure et la stabilité du complexe.

Les résultats présentés dans l'article I de la première partie de ce chapitre suggèrent la formation de dégradosomes alternatifs où RhlB serait remplacée par une des quatre autres hélicases de type DEAD d'*E. coli*. La proximité des sites de fixation de ces hélicases sur la RNase E avec celui de l'Enolase conduit à l'hypothèse que l'Enolase pourrait jouer un rôle dans la composition du dégradosome par encombrement allostérique. Afin de regarder si l'absence de l'Enolase permet la fixation d'une hélicase autre que RhlB dans le dégradosome, des Western blot ont été réalisés sur les mêmes produits des co-immunoprécipitations présentées ci-dessus. Des anticorps dirigés contre les hélicases RhlE, CsdA et SrmB ont été utilisés (cf. figure 22B). Aucune bande n'a été révélée avec l'anticorps anti-RhlE et ce, dans aucune des pistes du western blot. L'hypothèse que les anticorps ne soient pas fonctionnels est peu probable. Il semble que la protéine RhlE ne soit pas ou peu exprimée dans les souches dans les conditions de croissance utilisées. L'absence de bande aux tailles attendues pour les protéines CsdA et SrmB dans les pistes 4 et 6 suggère que celles-ci ne sont pas capables d'interagir, ou du moins pas suffisamment fort, avec la RNase E. Ces deux protéines sont pourtant exprimées dans nos conditions de cultures comme le montrent les pistes contrôles 1 et 2. Ces résultats suggèrent que l'absence de l'Enolase ne permet pas la fixation d'autres hélicases à la RNase E. Il semble donc que l'Enolase au sein du dégradosome n'influence pas la composition du complexe dans nos conditions d'expérience.

Les souches AC303 et TAZ1 expriment la protéine RhlB. Il serait peut-être intéressant de faire ces mêmes expériences dans un double mutant  $\Delta rhlB \Delta eno$ .

Milieux	Temps de génération (minutes)	
	AC303	TAZ1
A	185	-
A*	157	210

Milieux de croissance wt/ <i>Δeno</i>	Différence de temps de génération pour <i>Δeno</i> par rapport à wt
A/A*	25 min soit 15% du tps de wt
A*/A*	57 min soit 34% du tps de wt

**Tableau 2 : Temps de génération en fonction des milieux.** Les temps de génération des souches AC303 et TAZ1 ont été mesurés après dilutions successives des cultures réalisées à 30°C dans les milieux A et A\*. Le milieu A est composé de MOPS+ 0,2 % lactate. Le milieu A\* est le milieu A contenant en plus 0,4 % glycérol.

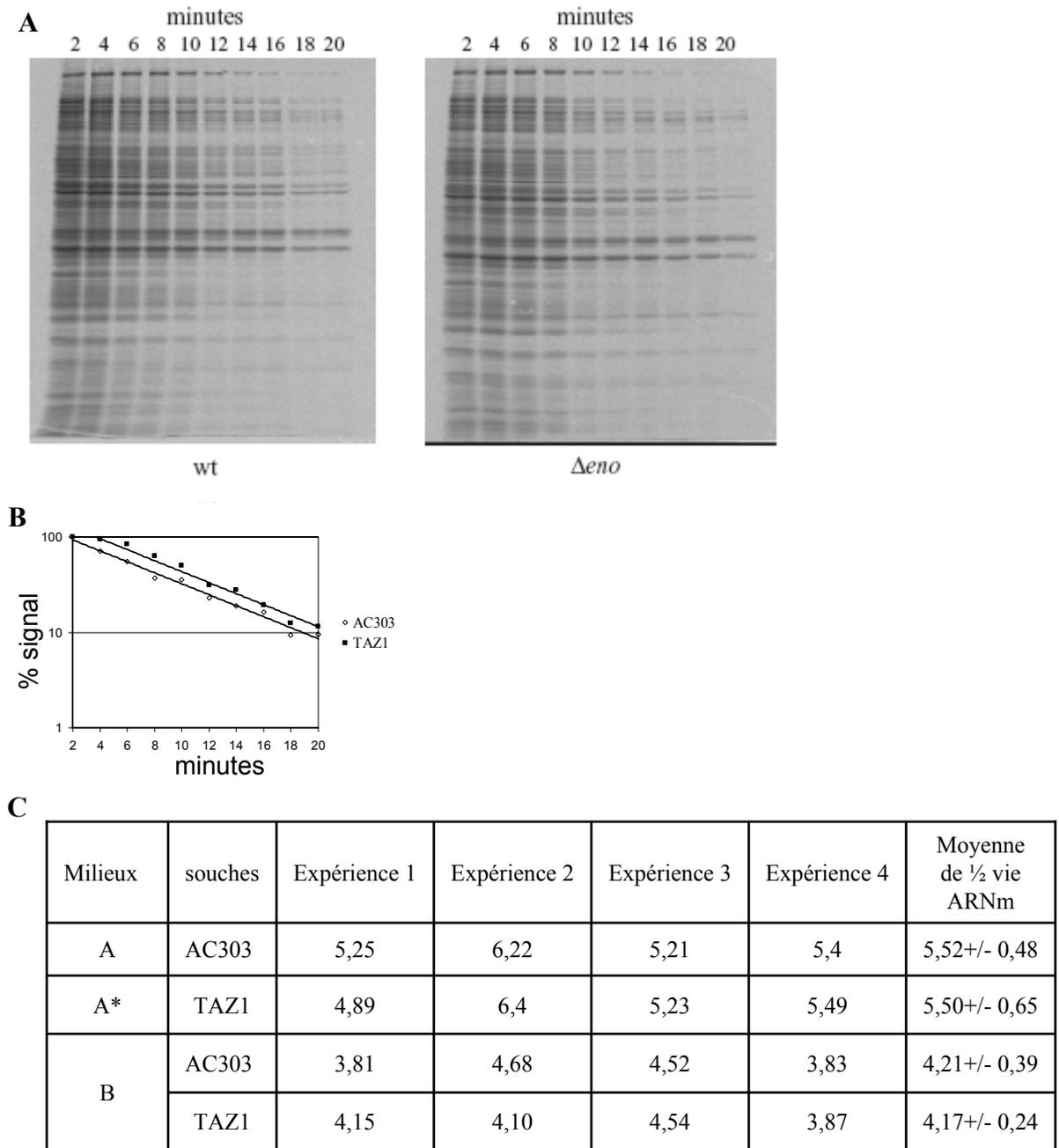
L'ensemble des résultats obtenus jusqu'à maintenant semblent suggérer que l'Enolase n'a pas de rôle direct sur le complexe protéique lui-même. Les expériences présentées ci-après tentent de mettre en évidence un rôle de cette protéine dans la dégradation des ARNm.

### C) L'Enolase joue-t-elle un rôle dans la dégradation des ARNm ?

La présence systématique de l'Enolase dans le dégradosome au cours de la purification du complexe en fait un composant majeur du dégradosome. La question de son rôle dans la dégradation des ARNm est longtemps restée sans réponse. Afin de tenter d'y répondre, deux approches ont été menées ici. Dans un premier temps, une approche globale a permis de comparer la dégradation de l'ensemble des ARNm fonctionnels entre une souche sauvage et le mutant  $\Delta eno$ . Dans un deuxième temps, des expériences de puces à ADN ou « macroarrays » ont été réalisées dans le but de déterminer si l'Enolase permet de cibler la dégradation d'ARNm spécifiques.

#### a) La mise au point des conditions de croissances

La présence de deux sources de carbone étant essentielle pour le mutant  $\Delta eno$ , les souches AC303 et TAZ1 ont été cultivées dans un premier temps dans un milieu minimum contenant du glycérol et du lactate (milieu A\*) puis, le temps de doublement des cellules a été déterminé pour chacune des souches (cf. tableau 2). Dans ces conditions de croissance, la souche sauvage possède un temps de génération de 157 minutes contre 210 minutes pour le mutant  $\Delta eno$  (soit près de 34% en plus). La souche AC303 a également été cultivée en absence de glycérol. Dans ce milieu A, le temps de génération de la souche sauvage est alors augmenté (185 minutes). L'écart entre le temps de génération de la souche AC303 et TAZ1 est donc diminué lorsque celles-ci sont cultivées en parallèle dans les milieux A et A\*, respectivement. Un temps de génération proche entre les souches à comparer étant favorable pour des expériences physiologiques, ce sont donc ces dernières conditions de croissance qui ont été appliquées au cours des expériences qui suivent.



**Figure 23: Stabilité des ARNm fonctionnels.** (A) Exemple d'une expérience de marquage radioactif des protéines après arrêt de la transcription des cellules cultivées dans les milieux A et A\* décrits dans le chapitre Matériel et Méthode. Chaque piste correspond à l'échantillon protéique total prélevé toutes les deux minutes après ajout de rifampicine dans la culture. L'expérience a été réalisée en parallèle pour la souche AC303 (wt) et TAZ1 ( $\Delta eno$ ). L'intensité du signal radioactif de chaque piste a été mesurée et normalisée en pourcentage par rapport à la piste 2 min représentant le 100%, puis reportée sur le graphique en fonction du temps (B). La demi-vie des ARNm fonctionnels des souches AC303 et TAZ1 a été reportée dans le tableau (C). Ces expériences ont été réalisées quatre fois dans les conditions de croissance A/A\* et B pour chacune des deux souches (milieu B : MOPS + 0,4% glycérol + 0,2% lactate + acides aminés (25  $\mu$ g/mL de chaque) exceptées la méthionine et la glutamine).

### b) Dégradation des ARNm fonctionnels ?

Des expériences antérieures réalisées par Lopez et ses collaborateurs ont mis en évidence une stabilisation globale des ARNm par une approche de mesure de la stabilité des ARNm fonctionnels (Lopez *et al.*, 1999). Afin de déterminer si l'absence de l'Enolase chez *E. coli* entraîne un même effet global, des expériences similaires ont été effectuées avec les souches AC303 et TAZ1. Brièvement, un marquage radioactif des protéines néo-synthétisées après l'arrêt de la transcription a été réalisé. A intervalles réguliers, des aliquots de culture ont été prélevés et déposés sur gel SDS-page (cf. figure 23A). L'intensité totale du signal radioactif a été quantifiée et reportée sur un graphique semi-logarithmique en fonction du temps (cf. figure 23 B). Les équations des droites ainsi obtenues ont permis de calculer la demi-vie du signal radioactif qui correspond à la demi-vie des messagers codant les protéines radiomarquées. Quatre expériences indépendantes ont été réalisées dans les milieux de cultures A et A\* pour les souches AC303 et TAZ1, respectivement (cf. § suivant). La demi-vie moyenne des ARNm fonctionnels de la souche sauvage dans ces conditions est de 5,52 minutes alors que celle des messagers du mutant  $\Delta eno$  est de 5,5 minutes (cf. figure 23C). La différence observée entre ces deux souches n'est pas significative. Ces résultats suggèrent que l'Enolase ne semble pas avoir d'effet global sur la stabilité des ARNm fonctionnels. Ceci est confirmé par quatre expériences supplémentaires réalisées dans des conditions de croissance égales pour les deux souches (milieu B, figure 23C). Les résultats obtenus ne montrent pas non plus de différence de stabilité des messagers entre les deux souches AC303 et TAZ1.

### c) Dégradation spécifique de certains messagers ?

La protéine RhlB au sein du dégradosome permet de dégrader spécifiquement les ARNm qui contiennent des séquences REP. Un rôle similaire de dégradation ciblée a donc été envisagé pour l'Enolase. Dans le cas où celle-ci entraîne la dégradation de messagers spécifiques par le dégradosome, une augmentation de la quantité de ces messagers devrait être observée en l'absence de l'Enolase. Afin de tester cette hypothèse, l'abondance de chacun des ARNm des souches AC303 et TAZ1 a été comparée par des expériences de puces à ADN.

Trois expériences indépendantes ont été réalisées selon le protocole décrit dans le Matériel et Méthodes. L'abondance de chacune des ORFs a été quantifiée et normalisée et les profils d'expression obtenus pour la souche AC303 et TAZ1 ont été comparés. Les gènes montrant

A

Gènes	$\Delta eno/wt$	Gènes	$\Delta eno/wt$	Gènes	$\Delta eno/wt$
<i>glpD</i>	3.90	<i>crp</i>	1.77	<i>rpoE</i>	1.63
<i>glpK</i>	2.88	<i>b2505</i>	1.72	<i>aroF</i>	1.62
<i>yzgL</i>	2.55	<i>ycgC</i>	1.71	<i>glpF</i>	1.61
<i>soxS</i>	2.34	<i>gltD</i>	1.70	<i>b0900</i>	1.61
<i>yhhA</i>	2.27	<i>pykF</i>	1.69	<i>glgX</i>	1.59
<i>b1200</i>	2.09	<i>b3515</i>	1.69	<i>mdaA</i>	1.56
<i>b1685</i>	2.05	<i>tktB</i>	1.68	<i>adhE</i>	1.55
<i>exbD</i>	2.01	<i>uspA</i>	1.68	<i>b8036</i>	1.55
<i>grxB</i>	1.89	<i>yjdG</i>	1.65	<i>hha</i>	1.54
<i>b0465</i>	1.89	<i>yhhK</i>	1.65	<i>b1903</i>	1.53
<i>b3238</i>	1.86	<i>mdoG</i>	1.65	<i>rstA</i>	1.52
<i>yciG</i>	1.85	<i>mdlA</i>	1.65	<i>rfaF</i>	1.52
<i>ppc</i>	1.83	<i>fdnI</i>	1.65	<i>gapA</i>	1.51
<i>katE</i>	1.80	<i>cutC</i>	1.64	<i>rnhB</i>	1.51

B

Gènes	$\Delta eno/wt$
<i>b3254</i>	0.49
<i>phnI</i>	0.49
<i>b1387</i>	0.49
<i>b1567</i>	0.48
<i>fliE</i>	0.47
<i>yiiR</i>	0.47
<i>yijE</i>	0.47
<i>atoA</i>	0.46
<i>fliS</i>	0.46
<i>viaH</i>	0.45
<i>flhD</i>	0.42
<i>yjiY</i>	0.34
<i>b3443</i>	0.34
<i>yhiJ</i>	0.33
<i>fliO</i>	0.32
<i>minE</i>	0.29

**Tableau 3 : Résultats de l'analyse des puces à ADN.** Le tableau A représente l'ensemble des gènes du mutant TAZ1 surexprimés d'un facteur supérieur à 1,5 par rapport à la souche AC303 (wt). Le tableau B montre les gènes sous-exprimés par rapport à la souche sauvage (rapport < à 0,5).

une diminution d'expression supérieure à un facteur 0,5 ou une augmentation supérieure à un facteur 1,5 en absence de l'Enolase sont indiqués dans le tableau 3. Ces valeurs se situent dans les limites suffisantes pour montrer des modifications physiologiquement significatives. Les résultats obtenus montrent une différence d'abondance de messagers uniquement pour 58 gènes de la souche TAZ1 par rapport à la souche sauvage. Après l'analyse des données, il ne semble pas y avoir de groupe de gènes dont l'expression soit spécifiquement modifiée en l'absence de l'Enolase. La différence d'abondance semble se situer à un niveau transcriptionnel plutôt qu'à une stabilisation des ARNm (*voir Discussion*).

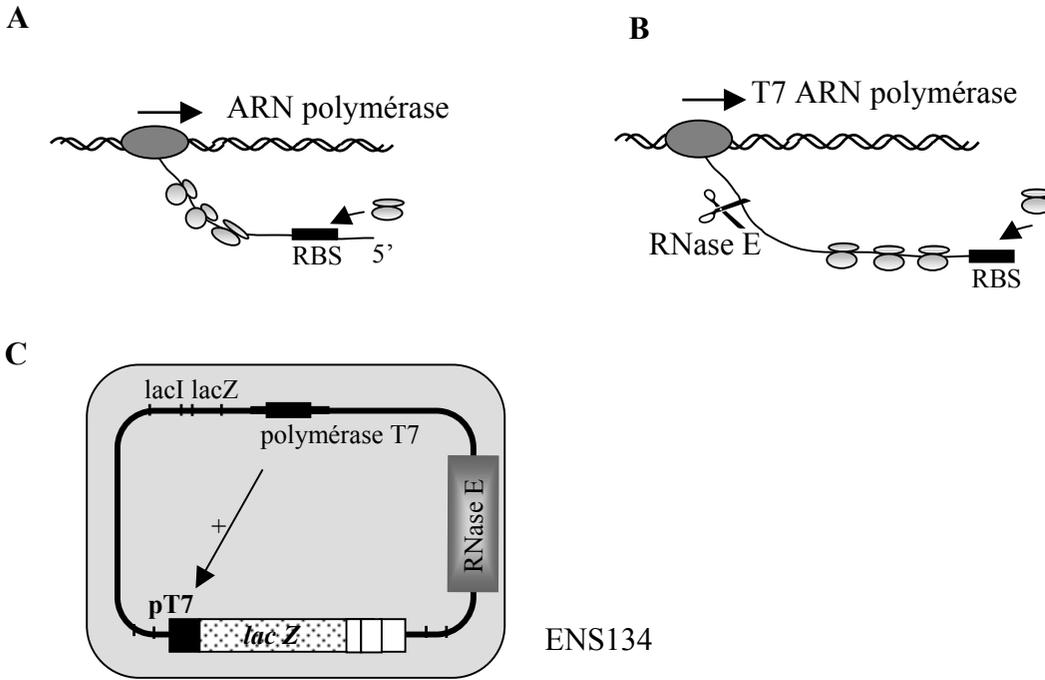
Les résultats obtenus à partir des expériences de stabilité des messagers fonctionnels et de macroarrays n'ont pas mis en évidence d'effet significatif dû à l'absence de l'Enolase dans le dégradosome et dans la cellule en général. Pour écarter l'hypothèse d'un faible effet sur l'ensemble des ARNm, l'effet de la délétion  $\Delta eno$  sur l'activité endonucléolytique de la RNase E a été recherché.

*d) L'Enolase influence-t-elle l'activité endonucléolytique  
de la RNaseE ?*

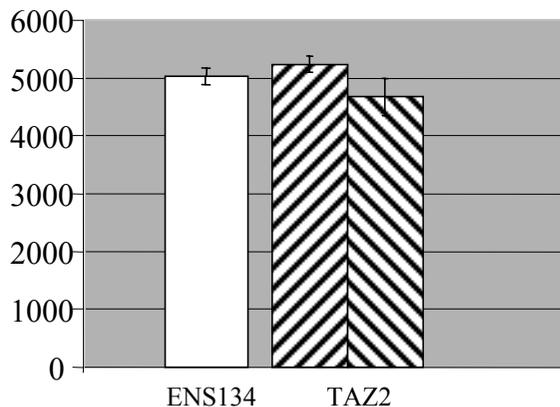
Si l'absence de l'Enolase entraîne une faible stabilité globale des messagers dans la cellule, cet effet pourrait être dû à une diminution de l'activité de l'endoribonucléase RNase E. Afin de tester cette hypothèse, des expériences réalisées avec un système expérimental plus sensible ont été effectuées.

( $\alpha$ ) Le système expérimental T7-lacZ

Le système expérimental utilisé dans les expériences suivantes a permis de mettre en évidence des effets sur l'activité endonucléolytique de la RNase E dans de nombreuses expériences antérieures. Il s'agit de la souche ENS134 qui possède sur son chromosome le gène rapporteur *lacZ* en aval du promoteur pT7 d'un gène tardif du bactériophage T7 (cf. figure 24C)(Iost and Dreyfus, 1995). Cette souche porte également une copie chromosomique du gène *l* codant la polymérase T7. Ce gène est sous le contrôle du promoteur *plac*, inductible à l'IPTG. L'induction de l'expression de la polymérase T7 permet ainsi la transcription du messenger *lacZ* codant la  $\beta$ -galactosidase. Dans une souche d'*E. coli*, la transcription d'un gène et la traduction du messenger synthétisé sont simultanées (cf. figure 24A). Les ribosomes



**Figure 24 :** **Système expérimental T7-*lacZ*.** Chez les bactéries, la transcription et la traduction sont deux processus simultanés (A). La transcription d'un messenger par l'ARN polymérase T7 permet le découplage de ces deux processus. L'ARNm synthétisé est alors dépourvu de ribosomes et plus sensible aux attaques de la RNase E (B). La souche ENS134 figurée en (C) porte sur son chromosome le gène rapporteur *lacZ* en aval du promoteur pT7. Cette souche possède également le gène codant l'ARN polymérase T7 en aval du promoteur inductible *plac* (Iost *et al*, 1995).



**Figure 25 :** **Activité  $\beta$ -galactosidase.** L'activité  $\beta$ -galactosidase a été mesurée dans une souche sauvage (ENS134) et dans deux mutants indépendants portant la délétion du gène *eno* (TAZ2). Cette expérience a été réalisée dans les milieux A/A\* contenant 1mM d'IPTG.

protègent ainsi l'ARNm des attaques des endonucléases. Lorsque le messenger est synthétisé par la polymérase T7, celle-ci étant très rapide, les deux processus cellulaires transcription-traduction sont découplés. La vitesse des ribosomes restant inchangée, il en résulte un messenger (*lacZ*) dénudé de ribosome. L'ARNm T7-*lacZ* étant un bon substrat de la RNase E, sa stabilité est alors modifiée. Ainsi, la mesure de l'activité  $\beta$ -galactosidase dans la souche ENS134 rend compte directement de l'activité de clivage de la RNase E. Une diminution de l'activité due à une dégradation plus importante du messenger *lacZ* traduit un gain d'activité de la RNase E. Inversement, une augmentation de l'activité  $\beta$ -galactosidase traduit une perte d'activité de l'endonucléase.

Ce système a donc été utilisé afin de mesurer l'activité de la RNase E chez un mutant  $\Delta eno$ .

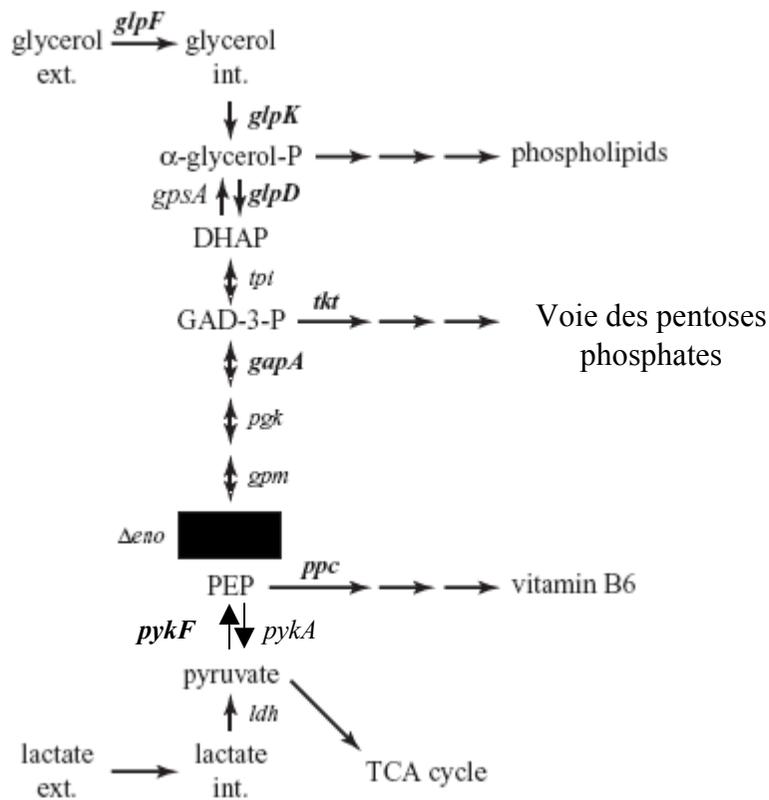
#### ( $\beta$ ) mesure d'activité $\beta$ -galactosidase

Dans un premier temps, la souche ENS134 délétée du gène *eno* a été construite. La technique utilisée pour la construction de la souche TAZ1 a été employée pour la souche ENS134. Les différentes vérifications du mutant  $\Delta eno$  présentées pour la souche TAZ1 ont également été réalisées (expériences non montrées). Les résultats obtenus confirment la présence de la délétion  $\Delta eno$  dans le mutant ENS134 isolé. La souche est appelée TAZ2.

Les activités  $\beta$ -galactosidases des souches ENS134 et TAZ2 ont donc été mesurées puis comparées (cf. figure 25). Aucune différence d'activité  $\beta$ -galactosidase n'est observée entre ces deux souches. Ces résultats montrent que l'absence de l'Enolase ne modifie pas la stabilité du messenger T7-*lacZ*. Ceci suggère que l'Enolase n'a pas d'effet sur l'activité de la RNase E dans nos conditions expérimentales.

### I - 3 - Discussion - Conclusion

L'ensemble des études antérieures menées sur les mutants de la glycolyse, donc de l'Enolase, a été réalisé à partir de mutants ponctuels. La construction de la souche TAZ1 est le premier exemple d'obtention d'un mutant du gène *eno* par délétion. Comme attendu, la délétion de ce gène est létale pour la cellule sauf dans des conditions de croissance nécessitant la présence de glycérol et d'une deuxième source de carbone permettant d'alimenter le cycle de Krebs.



**Figure 26 :** Voie d'utilisation du glycérol chez le mutant TAZ1. La délétion du gène *eno* bloque le chemin de la glycolyse au niveau du rectangle noir. Les conditions de croissance de la souche TAZ1 nécessite la présence de deux sources de carbone dans le milieu. Le pyruvate, converti à partir du lactate, permet d'alimenter le cycle TCA (Krebs). Le glycérol permet la synthèse d'intermédiaires métaboliques comme les phospholipides nécessaires à la constitution des membranes cellulaires. Les gènes qui codent les enzymes figurés en caractère gras sont surexprimés chez la souche TAZ1 (cf. tableau 2).

La souche AC303 possède un temps de génération plus court lorsqu'elle est cultivée dans un milieu contenant du glycérol (tableau 2). La raison la plus probable est que la souche sauvage étant capable de réaliser le chemin complet de la glycolyse, le glycérol est alors utilisé comme principal substrat énergétique. En revanche, la souche TAZ1 ne peut utiliser le glycérol qu'en tant que précurseur de constituants membranaires. Seul le lactate lui sert de source d'énergie. Il apparaît donc que le glycérol soit en partie responsable de la différence de temps de génération observée entre les deux souches. On constate cependant que celui-ci n'est pas identique même si l'on cultive la souche sauvage sans glycérol ou les deux souches dans le milieu B (99 min. pour wt contre 110 pour  $\Delta eno$ ). Ceci suggère que le faible ralentissement du temps de génération résiduel observé chez la souche TAZ1 (10 à 15%) est probablement dû à la mutation elle-même. Une comparaison entre une souche sauvage et un deuxième mutant de la glycolyse (par exemple  $\Delta pgk$ ) permettrait de savoir si le ralentissement de croissance est un effet dû à l'interruption de la glycolyse ou lié spécifiquement à l'absence de l'Enolase.

Les expériences de macroarray montrent une différence d'abondance pour un nombre limité de messagers dans la souche TAZ1. La présence des gènes *fli*, impliqués dans le contrôle de la synthèse des flagelles de la bactérie, parmi les 16 gènes sous-exprimés suggère un effet indirect probablement dû à une perturbation du métabolisme glycolytique.

Une augmentation de la quantité d'ARNm est observée pour 42 gènes. Les gènes présentant le plus grand facteur de surexpression (3.9 et 2.88) sont les gènes *glpD* et *glpK* nécessaires à l'utilisation du glycérol présent dans le milieu. L'expression de ces gènes est sous le contrôle des régulateurs transcriptionnels Crp et GlpR (Weissenborn *et al.*, 1992). La surexpression du gène *crp* suggère fortement que l'abondance des ARNm mis en évidence par ces expériences de macroarray est due à une activation transcriptionnelle plutôt qu'à la stabilisation de ces messagers dans la souche TAZ1. Cette hypothèse est renforcée par la présence d'autres gènes exprimés au cours de la croissance en présence de glycérol et de lactate comme le gène *tktB* qui code un enzyme impliqué dans la voie des pentoses-phosphates. Le chemin d'utilisation du glycérol est illustré figure 26 et les gènes identifiés par les macroarrays y sont inscrits en caractères gras.

En parallèle à ces travaux, Bernstein et ses collaborateurs (2004) ont mené une étude sur l'effet de la délétion de chacun des composants du dégradosome sur la stabilité des ARNm par une approche de puces à ADN. Les résultats suggèrent une augmentation globale de la

demi-vie des messagers dans un mutant *eno*<sup>-</sup>. Cependant, sur les 4300 gènes, seule la stabilité des messagers de 1300 gènes a pu être comparée. La stabilité de 220 messagers environ montre une différence d'expression significative chez le mutant *eno*<sup>-</sup> supérieure aux limites de 0,5 et 1,5. Ces résultats n'ont pas mis en évidence de groupe de gènes codant des fonctions communes, ce qui est en accord avec nos résultats de macroarrays. Les deux approches par puces à ADN sont cependant difficilement comparables. En effet, dans un cas, c'est la demi-vie spécifique de chaque messager qui est comparée alors que dans l'autre, seule l'abondance de ces messagers est regardée à un temps donné de la croissance cellulaire. De plus, ces deux expériences ont été réalisées à partir de souches au fond génétique différent et dans des conditions de cultures distinctes.

Les expériences de stabilité des ARNm fonctionnels suggèrent que l'effet global sur la stabilité des messagers en absence de l'Enolase est peu probable. Des travaux récents publiés dernièrement montrent que le rôle de l'Enolase serait la dégradation spécifique de messagers sous certaines conditions de croissance. En effet, Morita et ses collaborateurs (2004) montrent que la dégradation du messager *ptsG* par la RNase E en conditions de stress métabolique est complètement abolie en absence de l'Enolase. Les mécanismes par lesquels l'Enolase répond au stress métabolique ne sont cependant pas encore établis. Les auteurs proposent plusieurs hypothèses comme la localisation du dégradosome à la membrane cytoplasmique via l'Enolase. En effet, la déstabilisation du messager *ptsG* est dépendante de sa localisation à la membrane interne (Morita *et al.*, 2004). Il serait alors intéressant de regarder le positionnement du dégradosome dans la cellule dans un mutant  $\Delta eno$ .

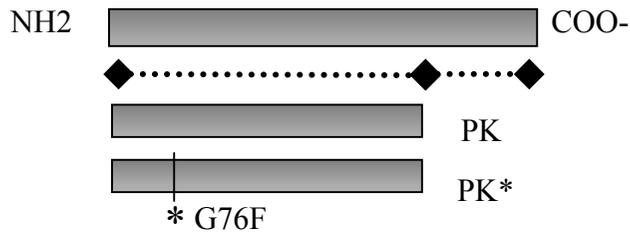
L'hypothèse que l'Enolase puisse agir directement sur l'activité de la RNase E a également été suggérée. Les expériences réalisées avec le système T7-*lacZ* ne semblent pas en accord avec cette proposition. Cependant, afin d'écarter cette hypothèse, l'activité de la RNase E pourra être mesurée dans des conditions d'accumulation de glucose-6P utilisées dans les expériences de Morita *et al.* (2004).

Enfin, des études réalisées sur l'Enolase de la levure suggèrent que celle-ci est capable de lier l'ARN. Les 50% d'identité partagés entre l'Enolase d'*E. coli* et celle de la levure suggèrent une conservation des structures tertiaires et quaternaires entre ces deux enzymes (Kuhnel and Luisi, 2001). Ces observations laissent à penser que l'Enolase pourrait participer à la dégradation d'ARNm spécifiques en fixant les substrats cibles de la RNase E. Cependant, aucune interaction entre l'ARN et l'Enolase d'*E. coli* n'a pu être mise en évidence jusqu'à

aujourd'hui. On peut imaginer qu'il existe un autre partenaire intermédiaire entre l'Enolase et l'ARNm. L'implication de la protéine Hfq dans la dégradation du messenger *ptsG* a été suggérée (Morita *et al.*, 2004). Cette protéine est capable de lier l'ARN non codant *sgrS* qui, en s'appariant au messenger *ptsG*, entraîne la dégradation rapide de ce dernier (Vanderpool and Gottesman, 2004). Il serait alors intéressant de voir s'il existe un lien direct ou indirect entre l'Enolase et la protéine Hfq.

La dégradation de l'ARNm *ptsG* n'a pas été mise en évidence dans nos expériences de macroarray compte tenu du milieu de croissance utilisé pour les souches AC303 et TAZ1. En absence de glucose, toxique pour le mutant  $\Delta eno$ , le gène *ptsG* n'a pas été induit.

En conclusion, les expériences réalisées avec les mutants TAZ1 et TAZ2 n'ont pas permis de mettre en évidence de rôle évident de l'Enolase dans la dégradation des ARNm. Dans les conditions de croissance utilisées, l'Enolase ne semble pas avoir d'effet sur la stabilité et la composition du dégradosome. L'hypothèse d'un effet global sur la stabilité des messagers reste peu probable. Enfin, l'hypothèse d'une dégradation d'ARNm spécifique dans des conditions de stress métabolique est l'hypothèse privilégiée. Les mécanismes de cette spécificité restent encore à déterminer.



**Figure 27: Les différentes formes de PK.** Le gène 0,7 du bactériophage T7 code une protéine PK possédant deux domaines, définis sur des bases génétiques. L'ensemble des expériences *in vivo* ou *in vitro* effectuées lors de la thèse ont été réalisées avec les formes tronquées PK et PK\* figurées ici. La protéine PK\* porte une mutation ponctuelle qui abolit son activité phosphotransférase (Marchand *et al.*, 2001b).

## II - 2<sup>nde</sup> PARTIE : Etude de la régulation de la RNase E par phosphorylation

On a vu dans l'introduction que la RNase E, et plus précisément son domaine CTH, est phosphorylée par la protéine PK du bactériophage T7. Cette phosphorylation semble inhiber l'activité de l'endoribonucléase. Ces observations ont conduit à l'hypothèse que la RNase E pouvait être régulée par un phénomène de phosphorylation. Les mécanismes impliqués dans cette régulation ne sont cependant pas établis. C'est dans l'objectif de mieux comprendre les processus mis en jeu que j'ai entrepris les travaux présentés ci-après. Les études antérieures ont montré que près de 22 phosphates étaient présents au niveau du CTH lors de la phosphorylation *in vivo* par PK (Marchand *et al.*, 2001a). Le but principal de mes travaux a consisté à l'identification des résidus phosphorylés afin de comprendre ce mode de régulation de la RNase E. Pour cela, des approches biologiques et biochimiques ont été employées.

### II - 1 - Détermination des régions du CTH nécessaires à PK : approche *in vivo*

Dans le but de déterminer les régions de la RNase E nécessaires à l'effet inhibiteur de PK, le système expérimental « T7-*lacZ* » décrit dans le paragraphe II-2Ca du chapitre II a été utilisé.

#### A) Vérifications des données antérieures et mise en place d'un nouveau vecteur d'expression

##### a) Confirmation des données antérieures

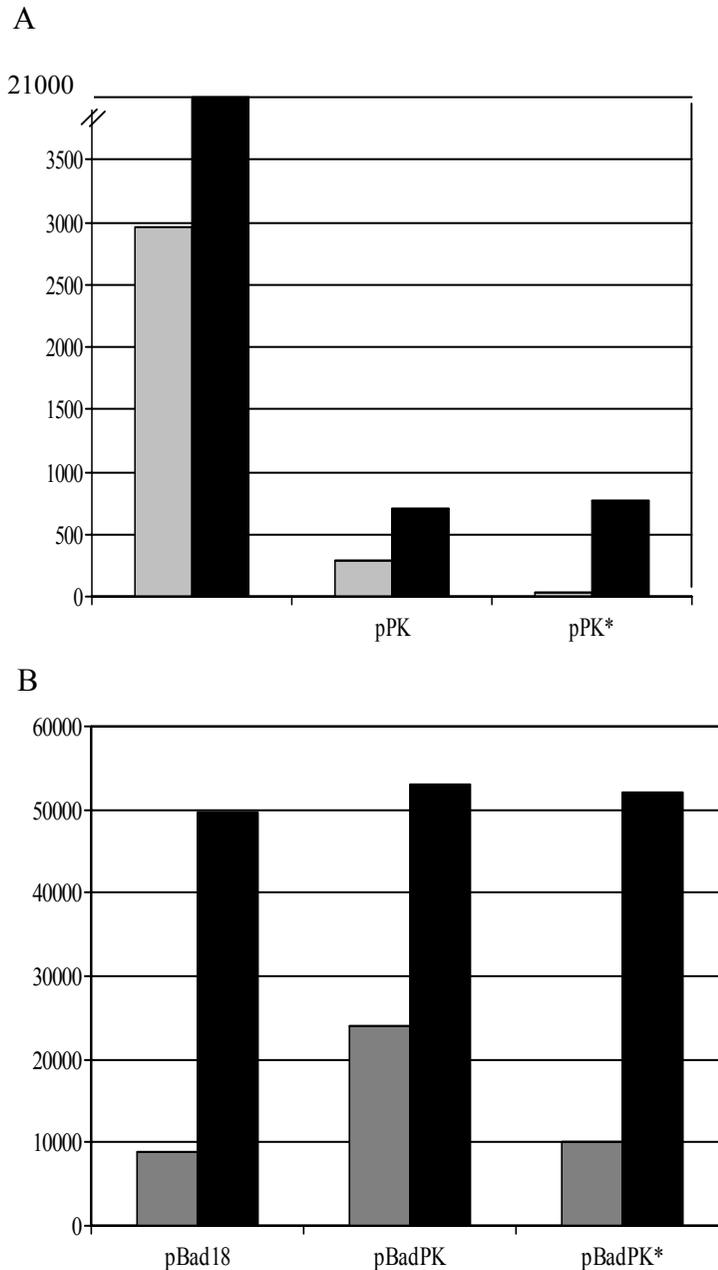
Les mesures d'activité  $\beta$ -galactosidase ont été dans un premier temps réalisées dans les souches ENS134 et ENS134-2 afin de confirmer les résultats déjà décrits par Isabelle Marchand (Marchand *et al.*, 2001a). Ces souches contiennent le vecteur pPK et pPK\* exprimant respectivement les protéines PK et PK\* (cf. figure 27). Ces deux protéines sont sous forme de protéines tronquées pour le dernier tiers carboxy-terminal qui porte une fonction toxique pour la cellule hôte encore non définie (cf. *introduction* §IV-2Ba)

(Michalewicz and Nicholson, 1992). La protéine PK\* porte une mutation ponctuelle qui abolit son activité phosphotransférase. L'expression de ces deux formes de protéine est sous le contrôle du promoteur *placUV5*. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 28A. L'activité  $\beta$ -galactosidase de la souche ENS134 (en gris) est de 291 unités Miller lorsque l'expression de PK est induite alors qu'elle n'est que de 37 unités Miller en présence de PK\*. Ces résultats montrent une augmentation d'activité  $\beta$ -galactosidase d'un facteur 7,9 en présence d'activité kinase de PK, ce qui est en accord avec ceux décrits antérieurement (Marchand *et al.*, 2001a). Cette augmentation d'activité  $\beta$ -galactosidase traduit une inhibition de la RNase E. Cette inhibition est spécifique de PK. Les résultats obtenus avec la souche ENS134-2 (en noir), qui expriment une RNase E délétée de son domaine CTH, sont également cohérents avec les résultats attendus. En effet, aucune différence significative d'activité  $\beta$ -galactosidase n'est observée en présence de la protéine PK ou de PK\*. Le domaine CTH est donc nécessaire à l'effet de PK.

Ces résultats confirment que PK inhibe la RNase E par phosphorylation et que ce processus nécessite le domaine CTH. Il est à noter que l'on retrouve le phénotype attendu pour la souche ENS134-2 par rapport à celui de la souche ENS134, à savoir, une forte stabilisation du messenger *lacZ* due à la perte du CTH de la RNase E (Leroy *et al.*, 2002; Lopez *et al.*, 1999). En revanche, la comparaison des valeurs d'activité  $\beta$ -galactosidase obtenues pour les souches contenant les plasmides pPK ou pPK\* avec celles obtenues pour les souches ne possédant aucun vecteur (diagramme de gauche) montre une importante différence de valeur relative. Il semble que les plasmides pPK et pPK\* aient un effet négatif sur l'induction du messenger rapporteur *lacZ* et donc probablement sur celle de PK ou PK\*. Cet effet s'explique par le fait que les plasmides portent une copie du gène *lacIq* qui permet l'expression constitutive du répresseur du promoteur *plac*. Afin d'éliminer ce problème et d'éviter toute induction différentielle éventuelle du messenger rapporteur et des protéines kinases, le vecteur d'expression a été remplacé.

#### b) Construction d'un nouveau vecteur d'expression

Les séquences codantes des protéines PK et PK\* ont été insérées dans le vecteur pBad18 en aval d'un promoteur inductible à l'arabinose. Le changement de vecteur d'expression des protéines PK permet ainsi leur induction de manière indépendante de celle du messenger T7-*lacZ*. Après transformation des souches ENS134 et ENS134-2 par ces nouveaux vecteurs, leur

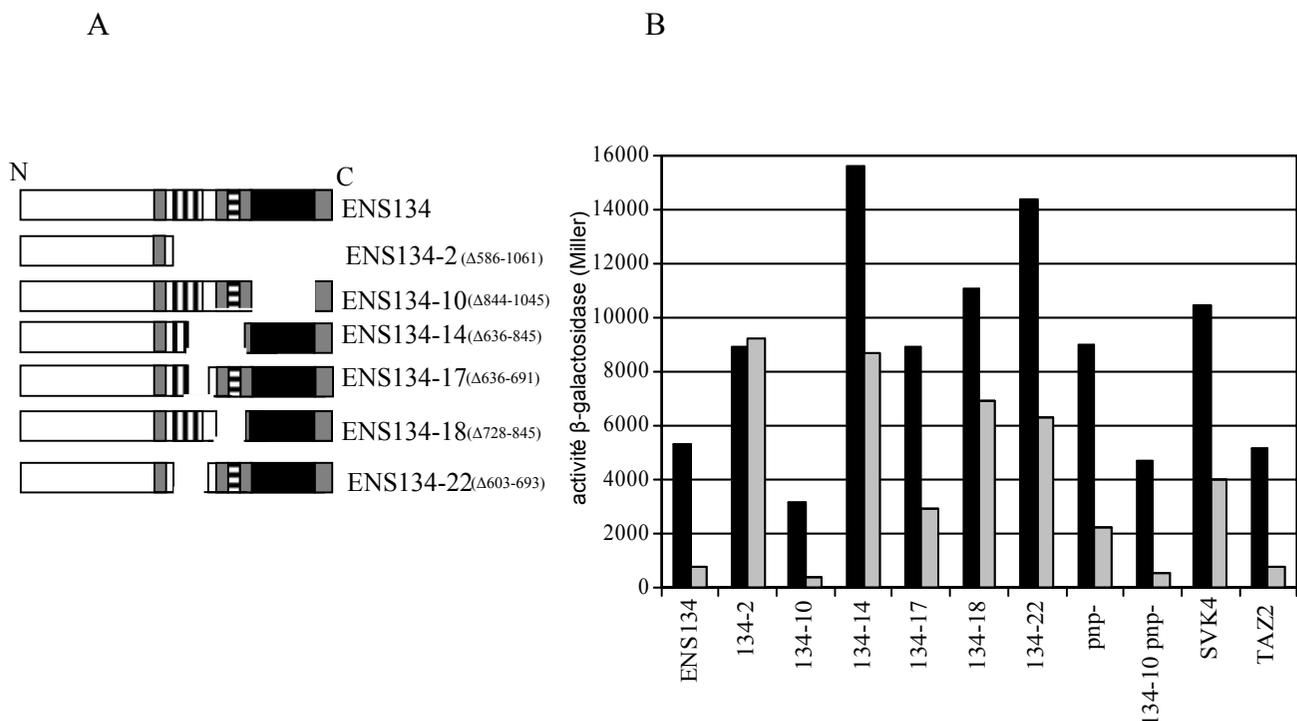


**Figure 28:** Effets *in vivo* de PK sur l'activité de la RNase E. (A) L'activité  $\beta$ -galactosidase de la souche ENS134 (gris) ou ENS134-2 (noir, codant une RNase E délétée du CTH) a été mesurée après induction à l'IPTG des plasmides pPK de pPK\* ou en absence de plasmide (à gauche). (B) L'activité  $\beta$ -galactosidase de la souche ENS134 (gris) ou ENS134-2 (noir) a été mesurée après induction à l'arabinose (0,02%) des plasmides pBad18, pBadPK ou pBadPK\*.

activité  $\beta$ -galactosidase a été comparée après induction à l'arabinose (cf. figure 28B). L'activité  $\beta$ -galactosidase dans la souche ENS134 contenant le vecteur pBad18 ou pBadPK\* est sensiblement la même. En revanche, elle est augmentée d'un facteur 2,6 en présence du vecteur codant PK. Ces résultats reproduisent ceux attendus, à savoir que l'induction de la protéine PK entraîne une inhibition de la RNase E. Cependant, l'effet inhibiteur de PK semble plus faible lorsque celle-ci est induite à partir du plasmide pBad au lieu de pPK (2,6 vs 7,9). Ceci peut s'expliquer par l'ajout de l'IPTG dans le milieu à des moments différents de la culture. Dans le cas du plasmide pPK, l'induction du messenger rapporteur et celle de la protéine PK est simultanée par ajout d'IPTG à une  $DO_{600}$  définie. Dans le cas du vecteur pBad, l'IPTG a été mis dans le milieu dès le début de la culture. Le taux de  $\beta$ -galactosidase est donc déjà élevé dans la cellule lors de l'induction de PK. L'effet inhibiteur est alors probablement partiellement masqué par un bruit de fond de  $\beta$ -galactosidase déjà présente. Ceci est confirmé par les résultats obtenus par la suite (cf. figure 29) où l'on retrouve un effet inhibiteur de PK plus élevé quand l'induction de PK à partir de pBad et celle du messenger T7-*lacZ* se font en même temps (x 6,4). L'activité  $\beta$ -galactosidase de la souche ENS134-2 reste, comme attendu, inchangée quel que soit le vecteur présent. Ceci est en accord avec le fait que l'effet de PK dépend de la présence du CTH de la RNase E. Les résultats obtenus avec les vecteurs pBad sont similaires à ceux obtenus avec les plasmides de départ pPK et pPK\*. L'ensemble des expériences *in vivo* réalisées par la suite a donc été effectué avec les nouveaux vecteurs d'expression pBad.

## B) Détermination des régions nécessaires à l'effet inhibiteur de PK

Afin de définir les régions du CTH impliquées dans le phénomène d'inhibition de la RNase E par PK, les vecteurs pBadPK et pBadPK\* ont été introduits dans des souches dérivées de l'ENS134. Ces souches, présentées en figure 29A, portent sur leur chromosome un gène *rne* codant une RNase E partiellement délétée dans sa moitié carboxy-terminale. L'activité  $\beta$ -galactosidase a été mesurée après induction simultanée du messenger rapporteur et des protéines PK ou PK\* (cf. figure 29). Les activités  $\beta$ -galactosidase obtenues pour les souches exprimant une kinase inactive sont cohérentes avec celles attendues pour les mutants partiels de la RNase E. En effet, on retrouve une augmentation de cette activité si l'on enlève des éléments de la région centrale de la RNase E alors que l'effet inverse se produit si le domaine



**Figure 29:** Détermination *in vivo* des régions du CTH de la RNase E nécessaires à PK. L'activité β-galactosidase a été mesurée dans les souches dérivées de l'ENS134. Ces souches portent sur leur chromosome un gène codant une RNase E délétée pour une région du CTH. Les protéines RNase E obtenues sont figurées en (A) ainsi que le nom des souches correspondantes (La région RBD est figurée par les hachures verticales, la région AR2 par les hachures horizontales). (B) L'activité β-galactosidase de la souche ENS134 et de ces dérivées a été mesurée après induction de PK (noir) ou de PK\* (gris).

Souches	Ratio PK/PK*	Inhibition par PK (%)
<b>ENS134</b>	6,4	100
<b>ENS134-2</b>	1,0	0
<b>ENS134-10</b>	7,1	111
<b>ENS134-14</b>	1,8	28,1?
<b>ENS134-17</b>	3	46,9
<b>ENS134-18</b>	1,6	25

Souches	Ratio PK/PK*	Inhibition par PK (%)
<b>ENS134-22</b>	2,3	35,9 ?
<b>ENS134 PNP-</b>	3,9	61
<b>ENS134-10 PNP-</b>	8	125
<b>SVK4</b>	2,6	40,6
<b>TAZ2</b>	6,3	100

**Tableau 4:** Détermination de l'effet inhibiteur de PK en fonction des régions du CTH de la RNase E (à partir des données de la figure 29B).

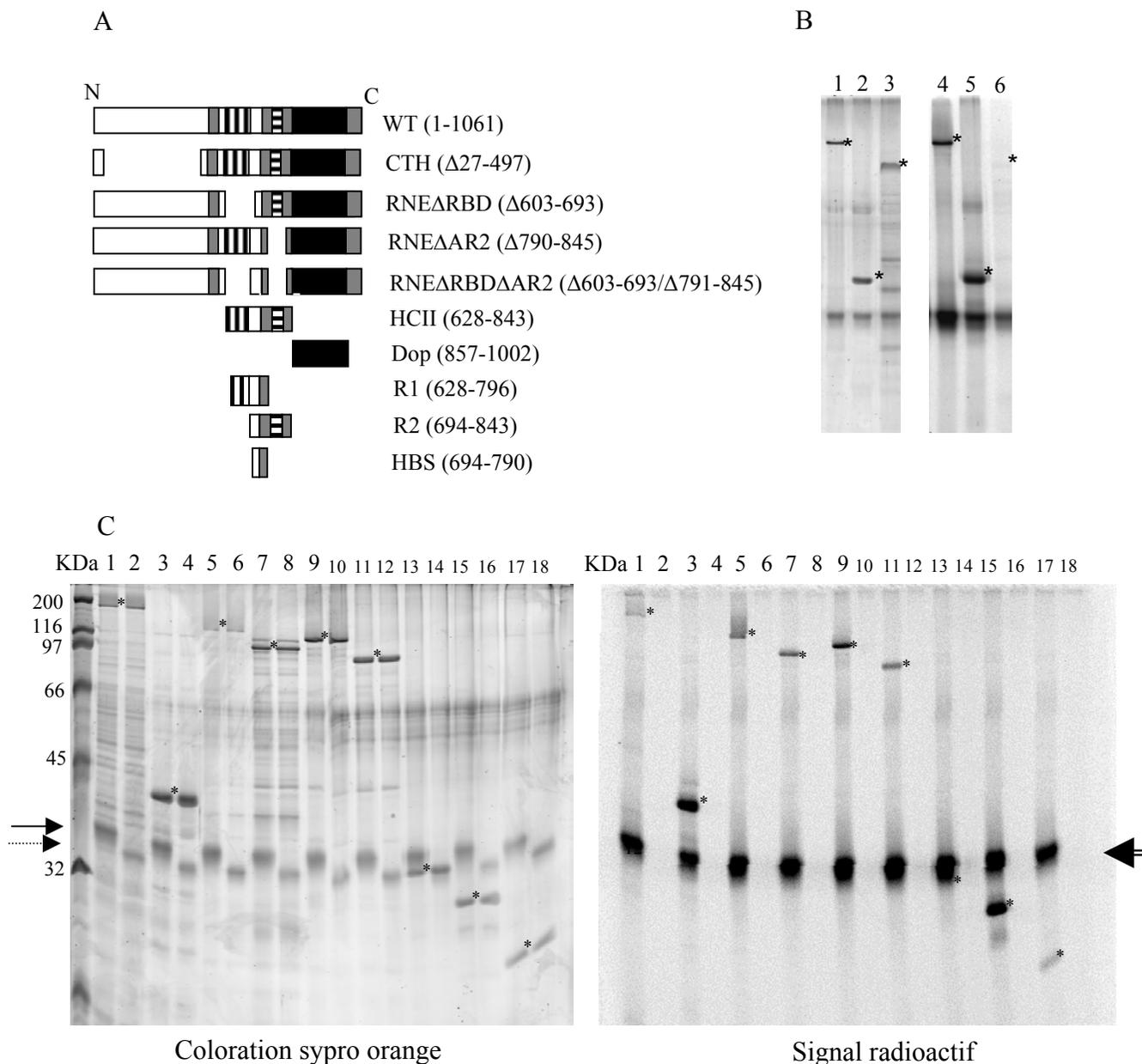
Dop, contenant le site de liaison de la PNPase, est absent (Leroy *et al.*, 2002). Le comportement des souches ENS134 *pnp<sup>-</sup>*, ENS134-10 *pnp<sup>-</sup>*, SVK4 et TAZ2 sont en accord avec les résultats déjà décrits antérieurement (Lopez *et al.*, 1999 ; Leroy, Thèse 2002 ; Khemici V., Poljak L., Toesca I and Carpousis A.J., manuscrit en préparation). L'induction de la protéine PK dans l'ensemble des souches entraîne une augmentation de l'activité  $\beta$ -galactosidase excepté pour ENS134-2, comme attendu. Le ratio entre l'activité des souches exprimant PK et celle des souches exprimant PK\* permet d'évaluer l'effet inhibiteur de PK sur la RNase E. Ce ratio (PK/PK\*) est rapporté dans le tableau 4. Le ratio obtenu avec la souche ENS134 correspond au 100% de l'effet inhibiteur de PK. Les résultats obtenus montrent que l'effet inhibiteur de PK est fortement diminué dans toutes les souches exceptée ENS134-10. Le domaine Dop ne semble pas impliqué dans l'effet de PK. Ceci suggère que les régions du CTH nécessaires pour l'inhibition de la RNase E se situent dans la région centrale qui contient les sites de fixation de l'ARN (RBD et AR2) ainsi que les sites d'interaction de RhlB et de l'Enolase. Toutefois, le niveau de  $\beta$ -galactosidase étant déjà élevé dans les souches ENS134-14 et ENS134-22, il est possible que le niveau atteint en présence de PK soit le maximum possible et donc correspondrait au niveau de saturation d'activité  $\beta$ -galactosidase dans la cellule. Ceci fausserait alors les pourcentages de perte de l'effet de PK pour ces deux souches. L'absence de perte d'effet de PK dans la souche TAZ2 montre que l'Enolase n'est pas impliquée dans le phénomène d'inhibition de la RNase E. En revanche, les résultats obtenus avec la souche SVK4, délétée du gène codant RhlB, suggèrent que cette protéine interviendrait dans ce phénomène.

Afin de mieux identifier les régions du CTH impliquées dans l'inhibition de la RNase E, cette approche *in vivo* a été complétée par une approche biochimique de phosphorylation *in vitro*.

## II - 2 - Détermination des régions cibles phosphorylées par PK : approche *in vitro*

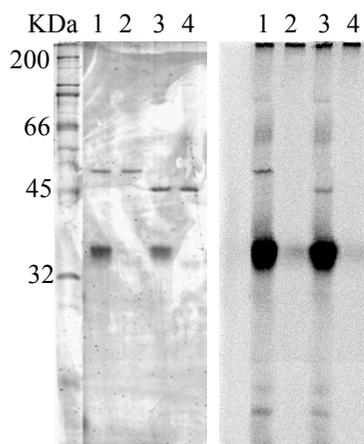
### A) Détermination des régions de la RNase E phosphorylée

Dans le but de définir les régions du CTH directement phosphorylées par la protéine PK, des expériences de phosphorylation *in vitro* ont été réalisées en présence d'ATP radiomarqué



**Figure 30: Phosphorylation *in vitro* de peptides purifiés dérivés de la RNase E.** Des réactions de phosphorylation *in vitro* de la RNase E entière ou de peptides purifiés dérivés ont été réalisées avec la protéine kinase PK. (A) Représentation schématique des peptides utilisés. Les chiffres entre parenthèses indiquent les acides aminés compris dans les peptides ou ceux qui ont été délétés ( $\Delta$ ). La région RBD est figurée par les hachures verticales, la région AR2 par les hachures horizontales. (B) Réactions de phosphorylation réalisées avec le peptide CTH (pistes 1 et 4), HCII (pistes 3 et 5) ou Dop (pistes 3 et 6). Les pistes 1 à 3 représentent une coloration des protéines au sypro orange. Les pistes 4 à 6 correspondent au signal radioactif obtenu après exposition sur écran phosphoImager. Les astérisques indiquent la position des peptides. (C) Idem que (B). L'image de gauche montre la coloration au sypro orange des protéines. L'image de droite correspond au signal radioactif obtenu après exposition sur écran phosphoImager. Les pistes impaires correspondent aux réactions réalisées avec PK\* et les pistes paires avec PK. Pistes 1-2 : RNase E; pistes 3-4: HCII; pistes 5-6: CTH; pistes 7-8: RNE $\Delta$ RBD; pistes 9-10: RNE $\Delta$ AR2; pistes 11-12: RNE $\Delta$ RBD $\Delta$ AR2; pistes 13-14: R1; pistes 15-16: R2; pistes 17-18: HBS. Les astérisques indiquent la position des peptides. Les flèches indiquent la position de PK (trait plein) et de PK\* (trait pointillé) et le signal d'auto-phosphorylation de PK (double trait).

avec des protéines purifiées. Les protéines RNase E et les peptides dérivés ont été purifiés grâce à une étiquette histidine présente à leur extrémité amino-terminale. Ces peptides, représentés dans la figure 30A, ont été incubés en présence de la protéine PK ou PK\*. Ces dernières ont également été purifiées natives grâce à l'étiquette histidine présente en N-terminal. La figure 30B montre les résultats de la phosphorylation des peptides CTH (piste 1), HCII (piste 2) et Dop (piste 3). La présence d'un signal radioactif au niveau des peptides testés dans les pistes 4 et 5 montre que le CTH et le peptide HCII sont phosphorylés par PK. En revanche, aucun signal radioactif n'est visible au niveau du peptide Dop. Ces résultats confortent l'hypothèse que l'ensemble des sites de phosphorylation se trouve dans la région centrale de la RNase E. Il semble que le peptide HCII corresponde à la région minimale contenant la totalité des sites phosphorylés par PK. Ce peptide HCII porte le site d'interaction de RhlB (HBS) et de l'Enolase ainsi que les deux régions impliquées dans la fixation de l'ARN par la RNase E. Afin de mieux cibler les résidus phosphorylés par PK, les mêmes expériences *in vitro* ont été effectuées avec des peptides dérivés du HCII. Ces peptides sont délétés soit de la région RBD (R2), soit de la région AR2 (R1), soit des deux (HBS). Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 30C, pistes 13 à 18. Le peptide R1 migre légèrement en dessous de la protéine PK dont le signal d'autophosphorylation couvre l'éventuel signal correspondant au peptide R1. Il est donc impossible ici de déterminer si R1 est phosphorylé par PK. En revanche, le peptide R2 présente un signal radioactif d'une intensité similaire à celle observée pour le peptide HCII (piste 3). Un signal d'intensité plus faible est observé pour le peptide HBS. D'après ces résultats, il semble que les sites de phosphorylation soient répartis sur l'ensemble du peptide HCII. L'intensité de la bande correspondant au peptide R2 suggère une prédominance de la phosphorylation dans la région AR2. Afin de vérifier cela, l'expérience a été réalisée avec des peptides équivalents mais dérivés du CTH de la RNase E. Il s'agit du peptide RNE $\Delta$ RBD (pistes 7 et 8) qui correspond au peptide R2, RNE $\Delta$ AR2 (piste 9 et 10) correspondant à R1 et RNE $\Delta$ RBD $\Delta$ AR2 (pistes 11 et 12), équivalent du HBS. Les résultats obtenus montrent que les trois peptides sont phosphorylés par PK avec une intensité plus forte pour la bande correspondant à RNE $\Delta$ AR2. Ces résultats confortent l'hypothèse d'une répartition des sites de phosphorylation dans l'ensemble du HCII. En revanche, le contexte protéique semble influencer sur les sites de phosphorylation. En effet, l'absence de la région AR2 semble favoriser la phosphorylation des autres régions du peptide. L'absence de signal radioactif dans l'ensemble des pistes



**Figure 31: Phosphorylation *in vitro* de RhlB.** Des réactions de phosphorylation *in vitro* de la protéine RhlB (pistes 1-2) ou de la protéine RhlB délétée dans son extrémité carboxy-terminale (pistes 3-4) ont été réalisées avec PK (pistes impaires) ou PK\* (pistes paires). L'image de gauche est une coloration au sypro orange du gel SDS-page. L'image de droite correspond aux signaux radioactifs obtenus après exposition du gel sur un écran phosphoImager.

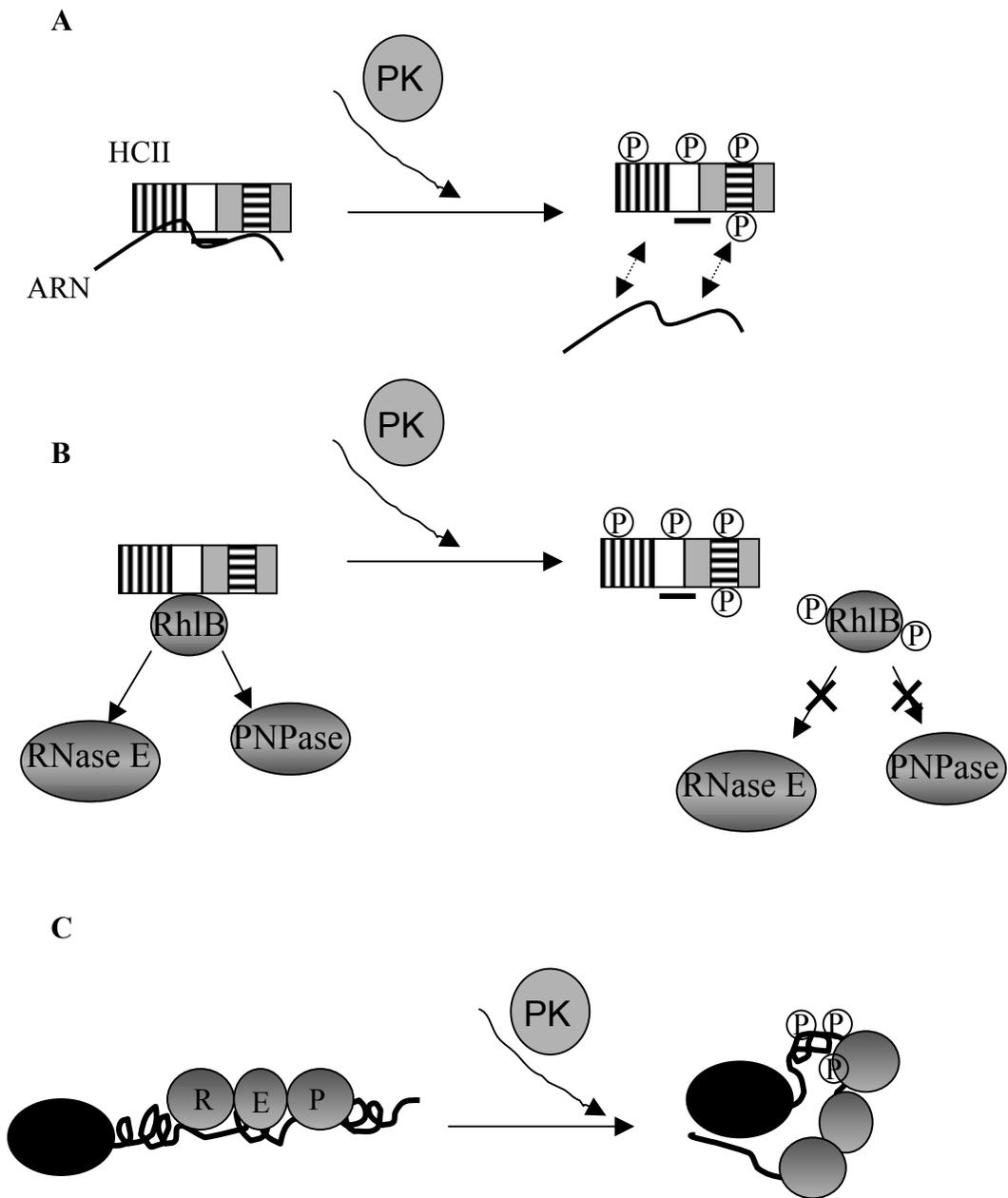
correspondant aux réactions faites avec PK\* montre que la phosphorylation obtenue avec PK est spécifique de la kinase.

### B) RhlB est une cible de PK

Marchand et ses collaborateurs (2001a) ont montré qu'en plus de la RNase E, un deuxième composant du dégradosome, RhlB, est également phosphorylé par PK. L'extrémité carboxy-terminale de RhlB contient une région riche en résidus arginines et lysines. Cette région, susceptible de fixer l'ARN, pourrait être la cible de phosphorylation par PK. Afin de tester cette hypothèse, des expériences de phosphorylation *in vitro* ont été réalisées avec une protéine RhlB sauvage ou délétée des 23 acides aminés carboxy-terminaux, disponible dans notre laboratoire. Les résultats sont présentés dans la figure 31. La coloration du gel SDS-page au sypro orange (image de gauche) permet de contrôler la présence des protéines en quantité égale pour chaque piste. L'image de droite correspond aux signaux radioactifs obtenus après exposition du gel sur un écran phosphoImager. La présence de signaux radioactifs correspondants aux protéines RhlB sauvage et tronquée indique que les deux protéines sont phosphorylées. L'absence de ces bandes dans les pistes 2 et 4 montre que cette phosphorylation est bien spécifique de PK. Ces résultats suggèrent que les cibles de phosphorylation par PK se situe ailleurs que dans les 23 derniers acides aminés de RhlB.

### C) Modèles d'action de PK sur la RNase E

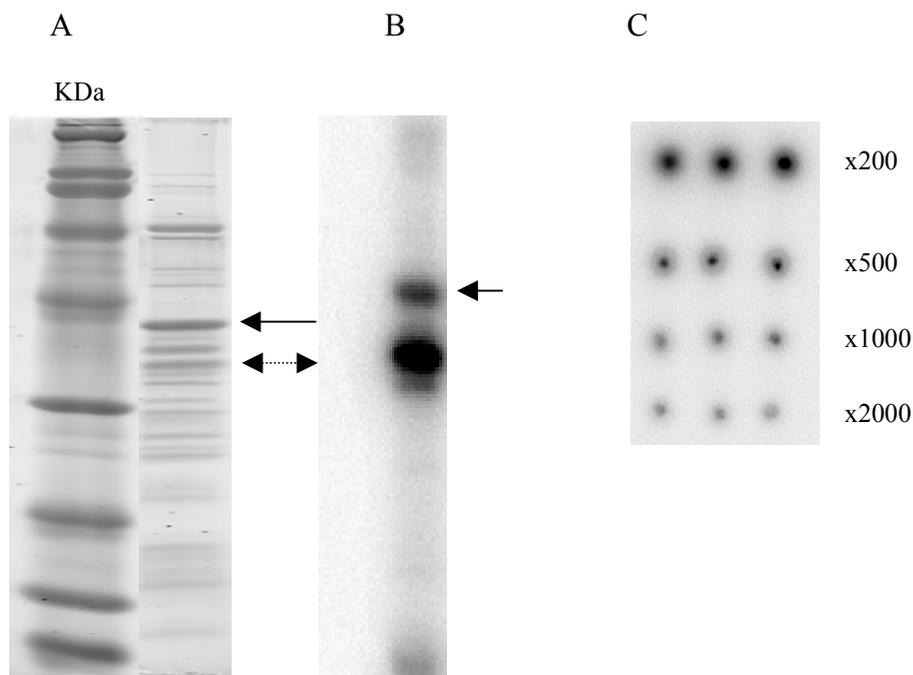
Les résultats obtenus à partir des expériences réalisées *in vivo* semblent définir la région centrale de la RNase E comme nécessaire à l'effet inhibiteur de PK. Les expériences *in vitro* montrent que le peptide minimal contenant la plupart des sites de phosphorylation est HCII. Ce peptide correspond à la région centrale et possède les sites d'interaction avec RhlB et l'Enolase ainsi que les régions de fixation de l'ARN. La corrélation entre les résultats obtenus par ces deux approches suggère que l'inhibition de la RNase E est un effet direct de la phosphorylation des régions et des protéines cibles de PK. L'Enolase, présente dans les expériences *in vivo*, ne semble pas jouer un rôle dans l'inhibition de la RNase E par PK. Plusieurs modèles quant aux mécanismes impliqués sont proposés (cf. figure 32). Le modèle



**Figure 32: Modèles d'inhibition de la RNase E par PK.** (A) La phosphorylation des régions de fixation à l'ARN entraînerait une diminution de l'affinité de la RNase E pour ses substrats ARNm. (B) La phosphorylation de la région centrale et particulièrement le site HBS empêcherait l'interaction entre RhIB et la RNase E. La phosphorylation de RhIB pourrait soit diminuer l'activité de l'hélicase, soit la rendre moins affine pour son site d'interaction. RhIB devient alors incapable de collaborer ni avec l'endonucléase, ni avec la PNPase. (C) La phosphorylation du CTH de la RNase E et de RhIB entraînerait un changement conformationnel de la RNase E. La nouvelle conformation provoquerait la diminution de l'activité endonucléolytique.

le plus simple est que la phosphorylation du CTH de la RNase E entraîne une perte d'affinité entre l'endoribonucléase et ses substrats ARN. Ce modèle est appuyé par le fait qu'il semble que les régions de fixation de l'ARN soient la cible de phosphorylation par PK. Ce type de régulation a déjà été décrit pour des protéines fixant l'ARN. C'est le cas, par exemple, de la protéine Rnc1 chez la levure qui fixe l'ARNm *pmp1* codant la MAPK phosphatase de la protéine Pmk1. Celle-ci phosphoryle la protéine Rnc1 dont l'affinité pour l'ARNm *pmp1* est augmentée. Il s'agit d'un modèle de rétro-contrôle dans le chemin de signalisation des MAPK (Sugiura *et al.*, 2003). Un autre exemple est la protéine MnSOD-BP qui fixe l'ARN codant la dismutase MNSOD chez le rat. La phosphorylation de cette protéine entraîne une diminution de son affinité pour son ARN substrat (Knirsch and Clerch, 2001).

Le second modèle repose sur le fait que i) le site d'interaction de RhlB (HBS) est dans une région cible de PK, ii) la protéine RhlB est elle-même phosphorylée par PK et iii) l'effet de PK sur l'activité de dégradation du messenger T7-*lacZ* est fortement diminué dans une souche délétée du gène codant RhlB (59%, tableau 4). L'ensemble de ces observations supporte l'hypothèse que l'inhibition de la RNase E implique l'hélicase d'ARN. Les expériences réalisées *in vivo* et *in vitro* décrites précédemment montrent que l'effet inhibiteur de la RNase E par PK est diminué de 39% (tableau 4) dans une souche délétée du gène *pnp* et que le site de fixation de la PNPase (DOP) n'est pas phosphorylé. Ces résultats suggèrent que PK inhibe la dégradation du T7-*lacZ* en inhibant la dégradation exonucléolytique assurée par la PNPase (Lopez *et al.*, 1999). Or, la PNPase n'est pas phosphorylée par PK (Marchand *et al.*, 2001a). RhlB et la PNPase collaborent afin d'éliminer de manière rapide et efficace certains messagers. La protéine PK pourrait alors altérer la dégradation du messenger cible en diminuant l'activité exonucléolytique par le biais de la phosphorylation de RhlB. Enfin, il semble que RhlB active l'activité endonucléolytique de la RNase E dans la dégradation du messenger T7-*lacZ* (Khemici V., Poljak L., Toesca I. and Carpousis A.J., manuscrit en préparation). La phosphorylation de l'hélicase pourrait la rendre inactive et diminuer ainsi l'activité de la RNase E. Il serait intéressant de regarder l'activité de RhlB lorsqu'elle est phosphorylée par PK. L'inactivation de RhlB pourrait être, soit directement liée à la phosphorylation de la protéine elle-même, soit due à la perte de l'interaction entre la RNase E et RhlB. Cette dernière hypothèse est appuyée par des résultats d'expériences de co-immunoprécipitation réalisées par Isabelle Marchand (Thèse 2000) qui suggèrent que les



**Figure 33 :** Taux de phosphorylation du peptide HClI par PK *in vitro*. Des réactions de phosphorylation *in vitro* du peptide HClI ont été réalisées avec la protéine PK. Les réactions ont été réalisées en présence de 50  $\mu$ M d'ATP froid. La totalité des réactions a été déposée sur gel SDS-page. Le gel a été coloré au sypro-orange (A), séché puis exposé sur écran phosphoImager (B). Les positions du peptide HClI et de PK sont signalées par des flèches (trait plein, trait pointillé, respectivement). Des dilutions successives de la radioactivité contenue dans la réaction ont été déposées (C). La comparaison de l'intensité du signal des spots et des bandes correspondant à HClI a permis de quantifier le nombre de phosphates incorporés par molécule de peptide HClI.

proportions de RhlB présentes dans les dégradosomes sont diminuées de moitié après phosphorylation par PK. Enfin, un troisième modèle suppose que la phosphorylation de la RNase E et de l'un des composants du dégradosome entraîne une modification conformationnelle de la protéine. Cette nouvelle conformation altérerait l'activité de l'endonucléase. Cette hypothèse est renforcée par des observations suggérant que la RNase E est moins active sous forme monomérique (Jiang and Belasco, 2004). La phosphorylation du CTH pourrait empêcher la formation des dimères ou tétramères de RNase E.

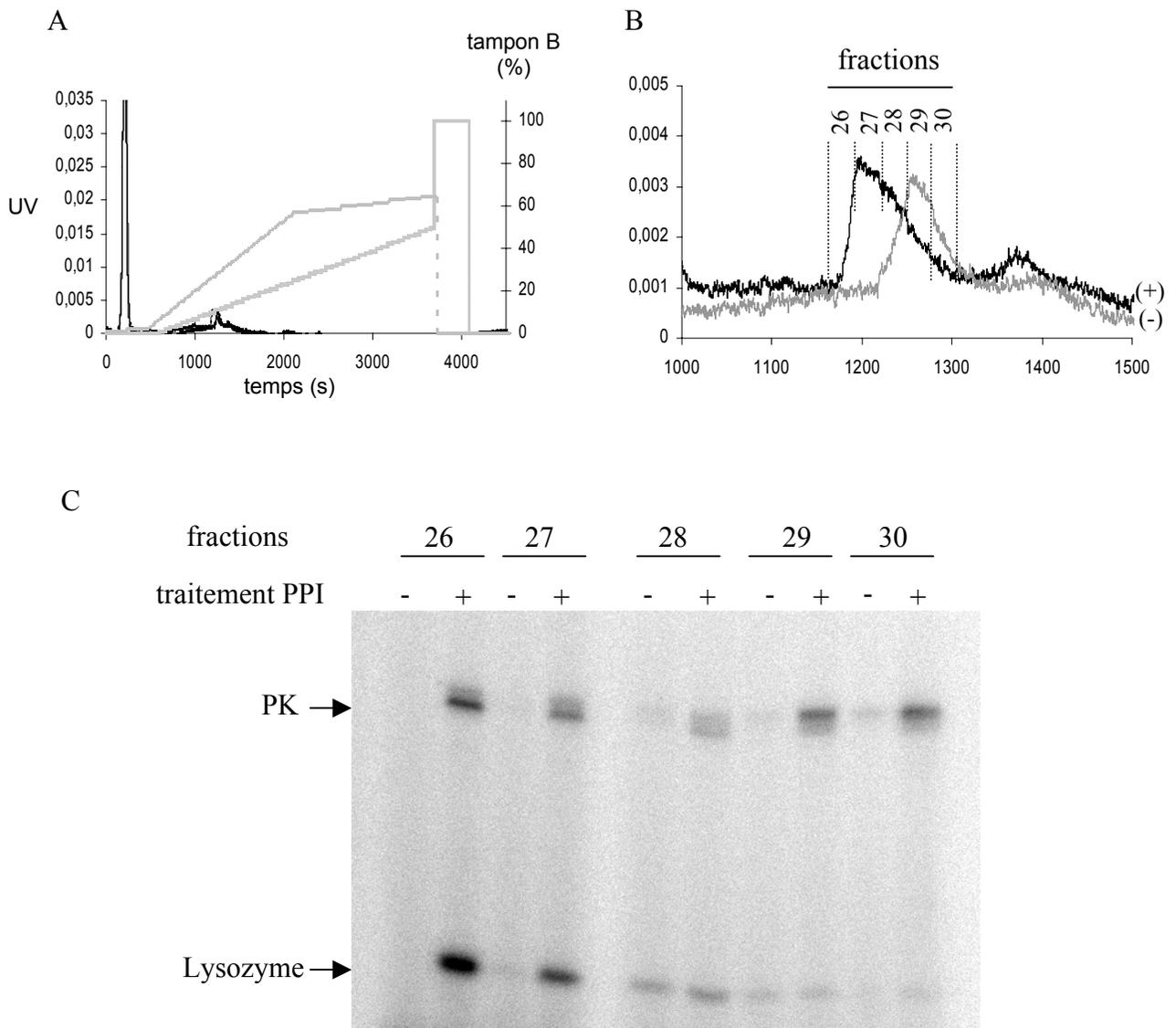
Ces trois modèles ne sont pas exclusifs. L'effet inhibiteur de PK peut être dû à plusieurs de ces mécanismes. Afin de pouvoir éprouver l'une ou l'autre de ces hypothèses, une cartographie plus fine des résidus phosphorylés par PK a été initiée par une approche biochimique telle que la spectrométrie de masse.

### II - 3 - Détermination des acides aminés cibles de PK : approche par phosphorylation *in vitro*

Les expériences de spectrométrie de masse ont été effectuées en collaboration avec le laboratoire de Ben Luisi, au département de biochimie de l'université de Cambridge (UK). Ces expériences ont nécessité, dans un premier temps, la détermination du nombre de molécules substrats phosphorylées. En effet, la sensibilité de la technique employée ici nécessite un minimum de 10% de molécules phosphorylées dans l'échantillon réactionnel.

#### A) Détermination du pourcentage de molécules phosphorylées

Afin de déterminer le nombre de phosphates incorporés dans les molécules HCII substrats, les mêmes expériences de phosphorylation *in vitro* décrites précédemment ont été réalisées. Le peptide HCII purifié a été incubé avec la protéine PK purifiée en présence d'ATP radioactif et de 50  $\mu$ M d'ATP froid (cf. figure 33). La quantification du signal radioactif correspondant au peptide HCII a été comparé à une gamme de signal correspondant à des dilutions de la quantité d'ATP radioactif total présent dans la réaction (figure 33C). Le nombre de phosphates présent dans HCII a pu être déterminé et rapporté au nombre de molécules substrats présents dans la réaction. Le résultat de ces expériences montre que moins



**Figure 34 : Phosphorylation *in vitro* de PK avant ou après traitement PPI.** Les graphiques A et B représentent les profils d'éluion à partir d'une colonne MonoQ de la protéine PK avant (ligne grise) ou après (ligne noire) traitement à la phosphatase PPI. Le graphique (A) montre le profil global où sont figurés le gradient d'éluion (gros pointillés) et les fractions d'éluion ( fins pointillés). Le graphique (B) est un agrandissement de (A) au niveau des pics d'éluion de PK après (+) ou avant (-) traitement PPI. (C) L'activité kinase de la protéine PK présente dans les fractions d'éluions 26 à 30 a été testée sur la protéine PK elle-même et le lysozyme (indiqués par les flèches).

de 5% des peptides HCII sont phosphorylés. Ces calculs ont été réalisés en considérant qu'un seul site de phosphorylation était présent sur le peptide or, les expériences précédentes et ceux décrits par Marchand et al. (2001a) suggèrent fortement la présence de plusieurs cibles de phosphorylation. Le pourcentage de molécules phosphorylées serait alors inférieur à 5%. Dans le but d'améliorer l'efficacité de la réaction *in vitro*, différents paramètres ont été modifiés. Des réactions de phosphorylation ont été testées en variant soit le pH du tampon de réaction, soit en changeant le ratio substrat/enzyme. Aucune amélioration significative et suffisante n'a permis d'obtenir un minimum de 10% de molécules phosphorylées.

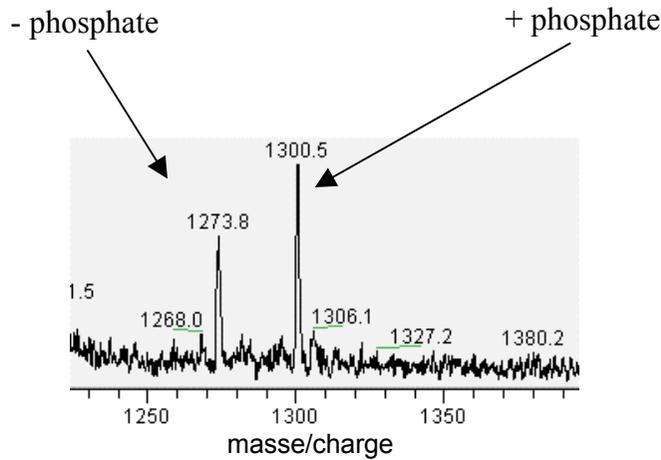
La protéine PK étant capable de s'autophosphoryler pour s'auto-inhiber, l'hypothèse que la kinase PK soit majoritairement déjà sous forme phosphorylée lors de sa purification semble une explication cohérente du peu d'activité observée lors des réactions de phosphorylation *in vitro*. Cette hypothèse a été vérifiée par des essais de déphosphorylation de PK.

## B) Traitement à la phosphatase de la protéine PK purifiée

### a) Déphosphorylation de PK et tests d'activité

La déphosphorylation de la protéine PK a été effectuée par traitement de la protéine purifiée par différentes phosphatases. Parmi ces phosphatases, les meilleurs résultats ont été obtenus avec la phosphatase PPI, spécifique des résidus sérines et thréonines phosphorylés (résultats non montrés). La totalité des échantillons réactionnels a été ensuite passée sur une colonne échangeuse d'ions de type MonoQ. La charge de la protéine PK phosphorylée étant plus négative que celle non phosphorylée, on attend un profil d'élution différent pour les deux espèces de molécules. Le profil d'élution obtenu de manière très reproductible à chaque expérience de déphosphorylation est représenté figure 34A et B. Comme attendu, l'élution de la protéine PK sans traitement phosphatase est plus tardive que celle traitée par PPI. Ces résultats sont compatibles avec l'hypothèse que PK est purifiée sous forme déjà phosphorylée et que le ou les phosphates sont supprimés lors du traitement PPI. Si cette hypothèse est correcte, la protéine PK traitée à la phosphatase (PK<sub>+PPI</sub>) devrait être plus active que la protéine non traitée (PK<sub>-PPI</sub>). Les fractions d'élution 26 à 30 des échantillons de PK traitée (+) ou non (-) à la phosphatase ont alors été testées lors de réaction de phosphorylation *in vitro* (cf. figures 34C). La comparaison de l'intensité du signal de phosphorylation du lysozyme par

A



B

1	MNITDIMNAI	DAIKALPICE	LDKRQGMLID	LLVEMVNSET	CDGELTELNQ
51	ALEHQDWWT	LKCLTADAGF	KMLGNHGFSA	AYSHPLPNR	VIKVGFKKED
101	SGAAYTAFCR	MYQGRPGIPN	VYDVQRHAGC	YTVVLDALKD	CERFNDAHY
151	KYAEIASDII	DCNSDEHDEL	TGWDGEFVET	CKLIRKFFEG	IASFDMHSGN
201	IMFSNGDVPY	<b>ITDPVSFSOK</b>	<b>KDGGAFSIDP</b>	EELIKEVEEV	AR

**Figure 35 :** Identification du résidu phosphorylé de PK. Des échantillons de la protéine PK purifiée ont été traités ou non par la phosphatase PPI. Chaque échantillon a ensuite été analysé par spectrométrie de masse MS/MS. La figure (A) montre les profils ainsi obtenus. Les échantillons ont ensuite été traités par une Asn peptidase. La figure (B) représente la séquence entière de PK. L'étiquette histidine à son extrémité amino-terminale n'est pas figurée ici. La séquence du plus petit produit de digestion portant le résidu phosphorylé est présenté en caractère gras. Le résidu autophosphorylé identifié est la sérine 216 (grisée).

PK ainsi que de PK elle-même entre les pistes correspondant aux échantillons incubés avec une kinase traitée ou non à la phosphatase montre clairement que la réaction de phosphorylation est plus efficace lorsque PK a été préalablement déphosphorylée. De plus, le signal s'intensifie dans les pistes (+) de la fraction 30 à la fraction 26. Cette augmentation d'intensité de signal, représentant une activité kinase plus efficace, est parfaitement corrélée au profil d'élution de PK après le traitement à la phosphatase PPI. La fraction 26 qui contient la kinase la plus déphosphorylée possède l'activité kinase la plus forte. Ces expériences confirment l'hypothèse de départ, *i.e.* PK est déjà majoritairement sous forme phosphorylée et inactive lors de son expression chez *E. coli* et de sa purification.

*b) Détermination des résidus autophosphorylés de PK et construction d'un mutant*

Des expériences de phosphorylation *in vitro* du peptide HCII ont été réalisées avec la protéine PK traitée à la phosphatase. Cependant, la protéine PK déphosphorylée étant extrêmement diluée dans la fraction d'élution, la quantité de kinase compatible avec le volume réactionnel de phosphorylation n'a pas permis d'obtenir un pourcentage de molécules de HCII phosphorylées suffisant, et ce même après concentration de PK<sub>+PPI</sub> (résultats non montrés). L'alternative de produire une protéine PK incapable de s'autophosphoryler a donc été envisagée. Pour cela, l'identification du ou des résidus phosphorylés de PK a, dans un premier temps, été nécessaire.

Des échantillons de protéines PK purifiées, PK<sub>+PPI</sub> et PK<sub>-PPI</sub> ont été soumis à la spectrométrie de masse. Des spectres identiques ont été obtenus pour la protéine PK et PK<sub>-PPI</sub> (résultats non montrés). Le spectre obtenu pour PK<sub>+PPI</sub> révèle en revanche un nouveau pic (1273.8) absent du spectre obtenu pour PK<sub>-PPI</sub> (figure 35A). Après différents traitements enzymatiques des échantillons protéiques, l'analyse par spectrométrie de masse a permis de montrer qu'un seul résidu est phosphorylé dans PK et que la cible de son autophosphorylation est la sérine 216 (cf. figure 35B).

Dans le but d'obtenir une protéine mutée pour cette sérine 216 (PK<sub>216</sub>), une mutation ponctuelle dans la séquence du codon correspondant a été générée par PCR. Après vérification de la présence de la mutation par séquençage du produit de PCR, celui-ci a été inséré dans le vecteur d'expression pET15a en aval du promoteur pT7. L'efficacité de transformation de souches permettant l'expression du gène muté par le vecteur pETPK<sub>216</sub>

(BL21DE3) est extrêmement faible et ce, à chaque essai de transformation, même en absence d'IPTG induisant la synthèse de la polymérase T7. Le peu de transformants obtenus a été repiqué en milieu liquide et la plupart de ces clones n'a pu se développer. Ceux qui ont pu être cultivés n'étaient que des contaminants contenant un vecteur dont le gène PK était non muté. En revanche, la transformation de souches dans laquelle l'expression du gène est impossible (DH5 $\alpha$ ) a permis d'obtenir des clones contenant le bon vecteur. De plus, l'insertion du gène muté dans un vecteur sans système d'expression de l'insert a également permis l'obtention de transformants. Ces résultats suggèrent fortement que le gène muté code une protéine kinase toxique pour la cellule. Cette toxicité est probablement due au fait que PK<sub>216</sub> n'est plus capable de s'auto-inhiber. La kinase PK<sub>216</sub> est alors constitutivement active dans la cellule. L'hypothèse que PK puisse altérer les processus de transcription et de traduction des gènes endogènes est cohérente avec les cibles bactériennes phosphorylées par PK et le phénotype toxique supposé. Afin de résoudre ces problèmes de toxicité, l'expression de PK<sub>216</sub> dans une souche qui permet un meilleur contrôle des promoteurs est envisagée. Le verrouillage de l'expression de cette protéine devrait, dans un premier temps, permettre l'obtention de clones à un stade de croissance suffisant pour ensuite induire l'expression de la protéine PK<sub>216</sub>. Le recours à des systèmes de transcription-traduction *in vitro* reste également possible. Le but final est d'obtenir une kinase constitutivement active purifiée pour réaliser des réactions de phosphorylation *in vitro* suffisamment efficaces pour l'identification des résidus phosphorylés de la RNase E par la technique de spectrométrie de masse. Des expériences de retards de migration sur gels pourront également être effectuées. Ces expériences permettraient de comparer l'affinité de la RNase E pour un ARN substrat avant et après phosphorylation par PK<sub>216</sub>. La comparaison de l'activité ATPasique et hélicasique de RhlB avant et après sa phosphorylation permettrait de tester le modèle d'action de PK n° 2 proposé précédemment.

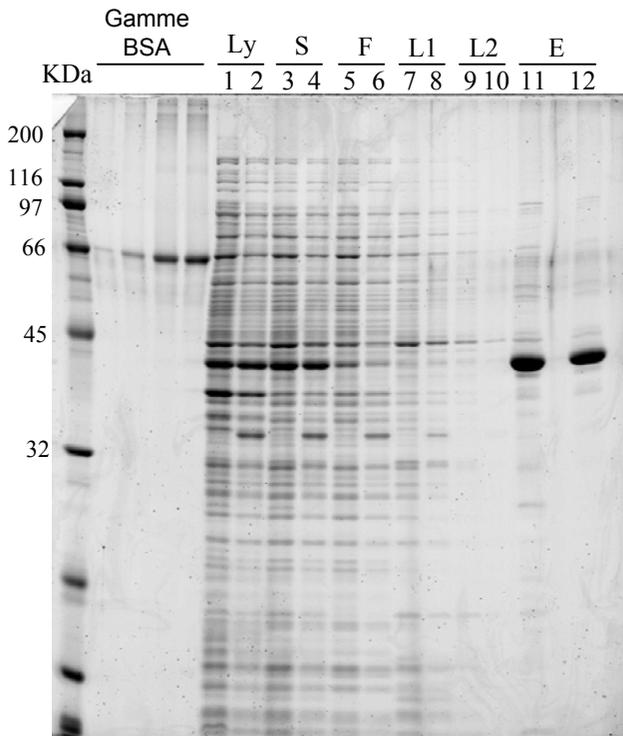
En attendant de résoudre ces problèmes de toxicité, des expériences de phosphorylation *in vivo* ont été réalisées.

## II - 4 - Détermination des acides aminés cibles de PK : approche par phosphorylation *in vivo*

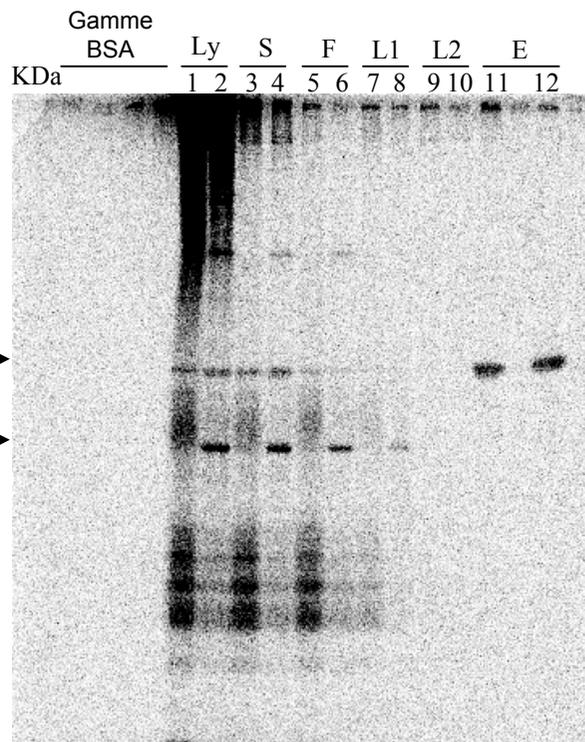
Devant la faible efficacité des tests de phosphorylation *in vitro*, des expériences de phosphorylations *in vivo* ont été effectuées. La protéine PK et le peptide HCII ont été co-exprimés chez *E. coli* en présence de phosphate radiomarqué puis la purification du peptide HCII a été réalisée grâce à son étiquette histidine. Dans ces expériences, la kinase ne possède plus d'étiquette histidine. Des expériences contrôles ont été effectuées en parallèle avec des souches n'exprimant que le peptide HCII. Les résultats de ces phosphorylations sont présentés dans la figure 36. Le gel de gauche (A) montre une coloration au sypro orange des extraits protéiques obtenus au cours des différentes étapes de la purification de HCII dans les souches co-exprimant (pistes paires) ou non (pistes impaires) PK. La présence d'une bande correspondant au peptide HCII dans les pistes 1 et 2 indique que le peptide est bien surexprimé dans la cellule. La présence de cette bande quasi unique dans les pistes 11 et 12 montre que la purification est efficace et que le degré de purification est suffisant pour une analyse par spectrométrie de masse éventuelle ultérieure. La protéine PK est également exprimée, comme en témoigne la présence de la bande correspondante uniquement dans les pistes paires. Le gel de droite (B) montre les signaux radioactifs obtenus après l'exposition du gel A sur un écran phosphoImager. Les résultats de phosphorylation montrent la présence d'un signal radioactif dans les pistes 11 et 12. Ces résultats signifient que le peptide HCII est phosphorylé *in vivo* même en absence de PK. Ces observations sont inattendues compte tenu des résultats décrits antérieurement qui montrent que la RNase E n'est pas phosphorylée *in vivo* en absence d'expression d'une kinase PK active (Marchand *et al.*, 2001a). La phosphorylation de HCII est donc non spécifique de PK.

Afin de vérifier que la cible de cette phosphorylation non spécifique n'est pas l'étiquette histidine de HCII, les mêmes expériences ont été réalisées avec des souches co-exprimant ou non PK avec un peptide HCII non étiqueté (HCII<sub>NE</sub>) (cf. figure 37). La phosphorylation des peptides CTH, étiquetés ou non (pistes 5-6 et 3-4, respectivement) et de la RNase E entière étiquetée (pistes 1 et 2) a également été testée. La surexpression de ces peptides est confirmée par la présence de bandes migrant aux tailles attendues pour chacun d'eux (figure 37A). La co-expression de PK est également visible, surtout dans la piste 2. Cette co-expression est

A



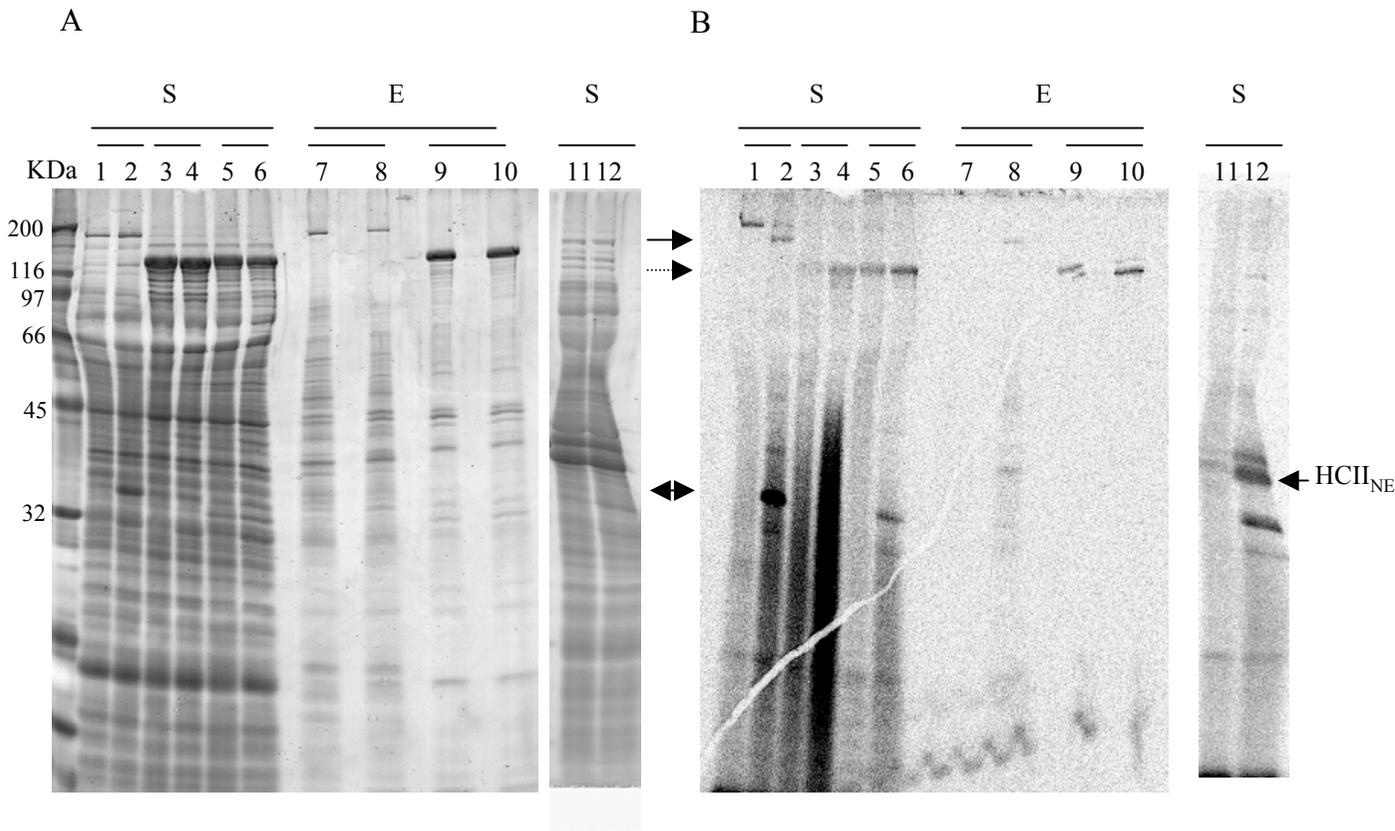
B



**Figure 36 :** Phosphorylation *in vivo* du peptide HCII. La purification dénaturante du peptide HCII portant une étiquette histidine a été réalisée après le marquage *in vivo* des protéines néosynthétisées dans des cellules surexprimant simultanément HCII et PK (pistes paires) ou HCII seul (pistes impaires). Les échantillons protéiques ont été déposés sur gel SDS-page. (A) coloration sypro orange. (B) signal radioactif après exposition sur écran phosphoImager. Ly: lysat; S: surnageant; F: flowthrough; L1-L2: lavage 1 et 2; E: élution. Les doubles flèches indiquent la position de HCII (trait plein) et de PK (trait pointillé)

confirmée par la présence d'un signal d'autophosphorylation de PK dans les pistes uniquement paires correspondant aux fractions de surnageant (figure 37B). La piste 11 du gel B montre la présence d'un signal radioactif au niveau du peptide HCII<sub>NE</sub>. Cependant, l'intensité de ce signal est plus faible que celle du signal observé dans la piste 12. Ces résultats suggèrent que le peptide HCII<sub>NE</sub> est phosphorylé *in vivo* même en absence de la protéine PK dans la cellule et confirment ceux obtenus précédemment avec HCII étiqueté. L'intensité plus forte en présence de PK suggère que la phosphorylation spécifique et non spécifique de PK n'est pas la même. Ces résultats signifient également que l'étiquette histidine n'est pas la cible de la phosphorylation spécifique et non spécifique de PK. Les mêmes observations sont faites dans les expériences réalisées avec le peptide CTH<sub>NE</sub> (pistes 3 et 4) et CTH (pistes 5-6 et 9-10). De plus, la comparaison des pistes 3 et 5 du gel B montre que de l'intensité du signal radioactif est plus faible pour la bande correspondant au peptide CTH<sub>NE</sub> que celle du peptide CTH. Ces résultats suggèrent que l'étiquette histidine pourrait favoriser la phosphorylation du peptide non spécifique de PK. Cette phosphorylation est probablement assurée par une kinase endogène d'*E. coli*.

Les résultats obtenus pour la phosphorylation de la RNase E entière sont présentés dans les pistes 1 et 2 qui correspondent aux échantillons protéiques issus des souches exprimant la RNase E seule ou avec PK, respectivement. Les pistes 7 et 8 correspondent aux fractions d'élution obtenues après passage de ces échantillons sur colonne de nickel. Les pistes 2 et 8 montrent la présence d'un signal radioactif (figure 37B) au niveau de la protéine purifiée, c'est-à-dire la RNase E. Ce signal est absent des pistes 1 et 3 alors que la protéine est bien présente dans ces échantillons (piste 1 et 2, figure 37A). Ces résultats indiquent que la RNase E entière n'est phosphorylée *in vivo* qu'en présence de l'expression de la protéine kinase PK. Il semble donc que la RNase E entière ne soit pas phosphorylée par une kinase endogène d'*E. coli*. Ceci est en accord avec les résultats publiés antérieurement par Marchand et ses collaborateurs (2001a). L'estimation de l'intensité du signal radioactif correspondant à la RNase E dans la piste 2 (gel B) ainsi que celle de la quantité de protéines RNase E présente dans la piste 2 du gel A semble indiquer que la phosphorylation *in vivo* de cette protéine est plus efficace que celle réalisée *in vitro*. La quantification précise du nombre de phosphates incorporé par molécule de RNase E est nécessaire, cependant une estimation rapide suggère que ce nombre est encore inférieur à une vingtaine comme suggérée précédemment. La différence notable entre les expériences de Marchand et ses collaborateurs (2001a) et celles



**Figure 37 :** Phosphorylation *in vivo* de la RNase E. Les purifications dénaturantes de la RNase E entière portant une étiquette histidine (pistes 1,2,7,8) , du domaine CTH de la RNase E portant (pistes 5,6,9,10) ou non (pistes 3,4) une étiquette histidine ou du peptide HCII sans étiquette histidine (HCII<sub>NE</sub>; pistes 11 et 12) ont été réalisées après le marquage *in vivo* des protéines néosynthétisées dans des cellules surexprimant simultanément (pistes impaires) ou non (pistes paires) PK. Les échantillons protéiques issus du surnageant (S) ou de l'éluion (E) de ces purifications ont été déposés sur gel SDS-page. (A) coloration au sypro orange. (B) signal radioactif après exposition sur écran phosphorImager. Les flèches indiquent la position des protéines RNase E (trait plein), CTH (trait pointillé) et PK (double flèche).

réalisées ici est la quantité de substrat par rapport à celle de PK. En effet, dans nos conditions de phosphorylation *in vivo*, la RNase E est surexprimée à partir d'un plasmide alors que leur substrat est la RNase E endogène. La quantité d'enzyme dans nos expériences n'est peut-être pas suffisante par rapport au nombre de molécules de substrat pour assurer la phosphorylation maximale de la RNase E. En revanche, il est possible que la quantité de kinase obtenue au cours de leurs expériences soit largement supérieure au nombre de molécules de RNase E, ce qui permettrait la phosphorylation de résidus secondaires. Dans les deux cas, on peut alors s'interroger sur la spécificité de la phosphorylation de la RNase E par cette kinase PK. Il serait intéressant de regarder la quantité de RNase E et de PK au cours d'une infection d'*E. coli* par le bactériophage T7 afin de connaître le ratio physiologique entre ces deux protéines.

La phosphorylation non spécifique de PK observée pour les peptides tronqués dérivés de la RNase E suggère que l'absence du NTH rendrait accessibles certains acides aminés du CTH à des kinases endogènes. Il semble donc qu'il existe une relation structure-fonction étroite entre le CTH et le NTH de la RNase E. Cette hypothèse est confortée par le fait que certains éléments du CTH puissent agir sur l'activité de la RNase E située en N-terminal (Leroy *et al.*, 2002) ou que le régulateur *trans* RraA ait besoin du CTH pour inhiber cette activité (Lee *et al.*, 2003). Le modèle d'action de la kinase PK proposé précédemment en n°3 reste donc envisageable.

La présence de kinases endogènes capables de phosphoryler le CTH de la RNase E laisse ouverte la question de l'existence de conditions physiologiques nécessitant la phosphorylation de cette protéine. Par exemple, la présence de RNase E tronquée dans la cellule pourrait conduire à la séquestration des protéines RhlB ou d'ARNm ciblés à la dégradation par des morceaux de CTH. La phosphorylation de ces portions de RNase E inutiles pour la cellule empêcherait alors la fixation des ARNm ou des hélicases, toujours accessibles aux RNase E fonctionnelles.

Bien qu'aucune kinase endogène d'*E. coli* ne semble partager d'homologies de séquences ou fonctionnelles avec la protéine kinase PK, il serait intéressant de rechercher la (ou les) protéines capable de phosphoryler l'endoribonucléase et de regarder si les résidus phosphorylés sont identiques à ceux ciblés par la kinase du bactériophage T7. Ces deux phosphorylations, l'une par une kinase endogène et l'autre par une kinase exogène, pourraient avoir des conséquences totalement différentes sur la RNase E.

En conclusion, les deux approches de phosphorylation *in vitro* et *in vivo* n'ont pas permis l'identification des résidus phosphorylés sur le CTH de la RNase E par PK. Les problèmes rencontrés au cours de ces expériences ont aboutis à la question de la spécificité de cette phosphorylation. Les expériences *in vivo* semblent cependant plus efficaces et permettront peut-être de finaliser le projet. La comparaison des acides aminés phosphorylés dans une RNase E entière ou dans le CTH et le peptide HCII permettraient d'obtenir des éléments de réponse quant au comportement du CTH vis-à-vis du NTH de la RNase E.

Les résultats de cette étude par phosphorylation ont également ouvert la possibilité de l'existence de kinases endogènes agissant sur l'endonucléase tronquée du domaine NTH. Les conséquences physiologiques d'une telle phosphorylation reste à déterminer.

Chapitre III:

CONCLUSION GÉNÉRALE

La dégradation des ARNm est un processus longtemps ignoré par les scientifiques. Cependant, les recherches au cours de ces trente dernières années axées sur ce sujet ont permis de montrer qu'elle est aussi importante pour la cellule que la synthèse de ces molécules. Plus qu'un moyen de maintenir une quantité adéquate de messagers dans la cellule, la dégradation des messagers permet l'adaptation rapide des bactéries au cours des changements des conditions de croissance et ce, en modifiant le profil protéique cellulaire.

Il est établi que la RNase E initie la majorité, si ce n'est la quasi-totalité, de la dégradation des ARNm et que la disparition totale des molécules se fait grâce à l'action complémentaire d'endoribonucléases et d'exoribonucléases. La découverte du dégradosome d'*E. coli*, complexe multi-enzymatique impliqué dans la dégradation des ARNm, a permis de mieux appréhender les mécanismes et les événements séquentiels de ce processus. Ce complexe est composé de quatre protéines majeures qui sont la RNase E, la PNPase, RhlB et l'Enolase.

Les travaux effectués sur la relation fonctionnelle entre la RNase E et RhlB ont permis de mettre en évidence que d'autres hélicases que RhlB peuvent constituer un nouveau dégradosome *in vitro*. La cartographie du site d'interaction entre la RNase E et ces hélicases a montré que RhlB se fixe au niveau d'un site bien distinct de celui des autres hélicases de la même famille (hélicase à boîte DEAD) et que la présence de l'arginine située en position 730 de la RNase E est nécessaire pour RhlB uniquement. Des tests *in vitro* ont montré que RhlE est capable de remplacer fonctionnellement RhlB dans le dégradosome et que CsdA est présente dans un dégradosome formé *in vivo* dans des conditions de croissance à basse température (travaux effectués en parallèle dans une autre équipe de recherche). Ces travaux ont soulevé la question de l'existence de dégradosomes alternatifs spécifiquement formés selon les conditions de croissance de la bactérie.

Des études postérieures à ces travaux ont montré que RhlB a un rôle non essentiel mais important dans la cellule. Les études sur les hélicases présentent donc un intérêt certain quant à la finalisation du modèle de la dégradation des ARNm cellulaires.

Les études réalisées sur l'Enolase ont permis de montrer que cette protéine n'a probablement aucun rôle quant à la stabilité ou la composition du dégradosome. Les expériences effectuées ici et en parallèle par d'autres équipes favorisent l'hypothèse d'un rôle de la protéine dans la dégradation de certains messagers spécifiques par la RNase E plutôt que celle d'un rôle global.

Enfin, la régulation de la RNase E est encore mal comprise. Le phénomène d'inhibition de son activité par la protéine kinase du bactériophage T7 reste encore à élucider. Les travaux menés sur ce processus de phosphorylation au niveau du CTH de la RNase E n'a pas permis de comprendre les mécanismes impliqués dans ce processus. La question de spécificité et d'efficacité de ce processus a été soulevée et reste pour l'instant à démontrer. Les études sur PK et la RNase E ont cependant apporté quelques éléments putatifs sur la relation structure-fonction de la RNase E et ses deux grands domaines NTH et CTH. De plus, l'existence de kinases endogènes capables de phosphoryler l'endonucléase  $\alpha$ , pour la première fois, été mise en évidence.

L'étude fonctionnelle du dégradosome reste un modèle d'étude intéressant pour les complexes homologues présents ou hypothétiques chez des organismes plus évolués tels que les plantes, ou chez des organismes moins bien connus comme les Archae, chez qui la dégradation des ARN reste encore un processus à éclaircir. Un schéma global de ce qui se passe chez *E. coli* est bien établi, cependant ce processus n'est pas complètement généralisable pour tous les messagers et pour tous les organismes, même chez les bactéries. En effet, cette RNase E si essentielle chez *E. coli* est inexistante chez *Bacillus subtilis*...

## Chapitre IV:

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le chapitre qui suit n'est pas une liste exhaustive des protocoles de toutes les expériences réalisées au cours de ma thèse. Seules les expériences non réalisées auparavant dans le laboratoire y sont décrites.

## I - Tableau des souches

Souches	Génotypes	Références
DH5 $\alpha$	F'/endA1 hsdR17 (rk-mk+) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal <sup>r</sup> ) relA1 $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 deoR ( $\Phi$ 80dlac $\Delta$ (lacZ)M15)	Biolabs
BL21(DE3)	<i>E. coli</i> B, F hsdS gal ( $\lambda$ clts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1)	Novagen
AC303	MG1655 str <sup>R</sup>	Cette étude
TAZ1	AC303 $\Delta$ eno	Cette étude
ENS134	BL21(DE3), lacZ::Tn10, P <sub>lac</sub> -T7 RNA polymerase, malPp $\Delta$ 534::P <sub>T7</sub> -lacZ::RBS <sup>lamB</sup> Arg5.	Lopez <i>et al.</i> , 1994
TAZ2	ENS134 $\Delta$ eno	Cette étude
ENS134-2	ENS134, rne131	Lopez <i>et al.</i> , 1999
ENS134-3	ENS134, zce-726::Tn10, pnp::Tn5	Lopez <i>et al.</i> , 1999
ENS134-10	ENS134, zce-726::Tn10, rne $\Delta$ 10 ( $\Delta$ 844-1045)	Leroy <i>et al.</i> , 2002
ENS134-14	ENS134, zce-726::Tn10, rne $\Delta$ 14 ( $\Delta$ 636-845)	Leroy <i>et al.</i> , 2002
ENS134-17	ENS134, zce-726::Tn10, rne $\Delta$ 17 ( $\Delta$ 636-693)	Leroy <i>et al.</i> , 2002
ENS134-18	ENS134, zce-726::Tn10, rne $\Delta$ 10 ( $\Delta$ 728-845)	Leroy <i>et al.</i> , 2002
ENS134-22	ENS134, zce-726::Tn10, rne $\Delta$ 22 ( $\Delta$ 603-693)	Leroy <i>et al.</i> , 2002
ENS134-10 pnp <sup>-</sup>	ENS134, zce-726::Tn10, rne $\Delta$ 10 pnp::Tn5	Leroy (Thèse) 2002
SVK4	ENS134 $\Delta$ rh1B	Khemici <i>et al.</i> , manuscrit en préparation

## II - Tableau de plasmides

Plasmides	Caractéristiques	Références
pET11a	vecteur d'expression de protéines chez <i>E. coli</i> à partir du promoteur P <sub>T7</sub> .	Studier <i>et al.</i> , 1990
pET11-ΔCTH	dérivé de pET11- <i>rne</i> (Δ585-1045)	Leroy <i>et al.</i> , 2002
pET11-HCII	pET11a où a été inséré le fragment PCR correspondant à la région de la RNase E entre les acides aminés 628-843.	Vanzo <i>et al.</i> , 1998
pET11-R1	pET11a où a été inséré le fragment PCR correspondant à la région de la RNase E entre les acides aminés 628-790.	Thèse Leroy (2002) (N. Vanzo)
pET11-R2	pET11a où a été inséré le fragment PCR correspondant à la région de la RNase E entre les acides aminés 694-843.	Thèse Leroy (2002) (N. Vanzo)
pET11-HBS	pET11a où a été inséré le fragment PCR correspondant à la région de la RNase E entre les acides aminés 694-790.	Thèse Leroy (2002) (N. Vanzo)
pET15a	vecteur d'expression et d'étiquetage hexa-histidine (His6) de polypeptides chez <i>E. coli</i> , à partir du promoteur P <sub>T7</sub> .	Novagen
pET15- <i>rne</i>	pET15a avec la séquence codante complète du gène <i>rne</i> et les sites de terminaison de transcription, permettant la production de la protéine His6-Rne.	Thèse Leroy (2002) (N. Vanzo)
pET15-R1	dérivé de pET11-R1	Cette étude
pET15-R2	dérivé de pET11-R2	Cette étude
pET15-RneCTH	dérivé de pET15- <i>rne</i> (Δ27-497)	Thèse Leroy (2002) (L. Poljak)
pET15-DoP	dérivé de pET15-RneCTH (Δ27-845) réalisé par PCR inverse avec les oligonucléotides "rne4464" et "rne3076".	Thèse Leroy (2002)
pET15-HCII	pET15a où a été inséré le fragment PCR correspondant à la région de la RNase E entre les acides aminés 628 et 843.	cette étude (N. Vanzo)
pET15-HBS	Dérivé du pET11-HBS	Cette étude
pET15-CTHΔRBD	pET11a où a été inséré le fragment PCR correspondant à la région CTH de la RNase E entre les acides aminés 603-693	Thèse Leroy (2002)
pET15-CTHΔRBDΔAR2	pET11a où a été inséré le fragment PCR correspondant à la région CTH de la RNase E entre les acides aminés 603-693 et 791-845	Thèse Leroy (2002)
pET15-CTHΔAR2	pET11a où a été inséré le fragment PCR correspondant à la région de la RNase E entre les acides aminés 790-845	Thèse Leroy (2002)
pLN135.1	vecteur de clonage à la répllication thermosensible, cm <sup>R</sup> , sti <sup>S</sup>	(Cornet <i>et al.</i> , 1994)
pLN135Δ <i>eno</i>	pLN135.1 contenant le produit de PCR portant la délétion du gène <i>eno</i> inséré aux sites BglII/HindIII	Cette étude

Plasmides	Caractéristiques	Références
pPK	pTrc99 contenant le gène codant la PK tronquée	(Michalewicz and Nicholson, 1992)
pPK*	pTrc99 contenant le gène codant la PK tronquée et mutée	(Marchand <i>et al.</i> , 2001a)
pBadPK	pBad18 contenant le produit de PCR correspondant au gène du plasmide pPK	Cette étude
pBadPK*	pBad18 contenant le produit de PCR correspondant au gène du plasmide pPK*	Cette étude
petPK216	pET15a contenant le fragment PCR correspondant à la séquence de PK mutée pour la sérine 216	Cette étude
pUCPKJS	pUC18 contenant le fragment PKJS	Cette étude
pET11PK	Dérivé du pET15PKJS dans le pET11	Cette étude ; (Michalewicz and Nicholson, 1992)
pAPTpET11PK	Plasmide hybride entre le pAPT110 et le pET11PK	Cette étude

### III - Séquences des oligonucléotides

Noms	Séquences (5'-3')	Utilisation
Eno60	CACAGGTCATGTTTCGGGTATACTG	synthèse du fragment PCR contenant le gène <i>eno</i> délété. Ce fragment est inséré dans le pLN135.1 aux sites HindIII/BglIII
Eno1886	ctcttccttaagaagatctaactctagGATGATTTTTACGATTTTGGACAT TAG	
Eno3135	ctaggattagatcttcttaaggaagagCGTAAAGAGATCAAAGGCCAGG CA	
Eno4714	TTTTTCGAGCAGATCAGTCAGTGGC	Synthèse de la sonde interne du southern blot <i>eno</i>
Eno2231	AGCTGCTAAAGGTATGCCGCTGTA	
Eno2980	CCAGAACGGTGAGAGATAACTGCA	
PK234E	GGGAATTCGAGCGGATAACAATTTACACAG	Synthèse des fragments PCR PK et PK* clonés dans pBad18 aux sites EcoRI / HindIII
PK1100	AGACCGCTTCTGCGTTCTGA	
PKuc5	GAAACAGCTATGACCATGATTACG	synthèse du fragment PCR contenant le gène codant PK mutée pour la sérine 216
PKuc8	CAAGCTTGCATGCCTGCAAGGT	
PKuc9	ACCCGGTAGCTTTTCTCGCAG	
PKuc10	CTGCGAGAAAGCTACCGGGT	
PKet1	CGCCACGCTGGATGCTATAC	Séquençage de l'insert dans le plasmide pETPK216
PKet2	GTATAGCATCCAGCGTGGCG	
PKet3	GGAGATATACCATGGGCAGC	
PKet4	TATTGCTCAGCGGTGGCAG	

#### IV - Les conditions de cultures

Pour les expériences réalisées avec les souches TAZ1 et TAZ2 et leurs souches parentales, les milieux A (MOPS + 0,2% lactate), A\* (milieu A + 0,4% glycérol) et B (milieu A\*+ mélange de tous les aa sauf methianine et glutamine (25µg/mL)) sont utilisés pour des cultures, faites à 30°C.

Les expériences de mesure d'activité  $\beta$ -galactosidase dans les souches exprimant les protéines PK et PK\* sont réalisées avec du milieu LB à 37°C exceptées les expériences de marquage radioactif *in vivo*. Dans ce cas, le milieu utilisé est du MOPS (avec la concentration en phosphate 10 fois moins élevée que le MOPS classique) + 0,4% glycérol + 0,2% de casamino-acides.

#### V - Les expériences de Macroarrays

Les membranes sur lesquelles est déposé l'ensemble des ORF du génome de *E. coli* sont les membranes Panorama, Genosys de chez Sigma.

Les ARN totaux des souches AC303 et TAZ1 sont obtenus par extraction phénol/chloroforme (protocole du laboratoire) à partir de 5 mL de culture à  $DO_{600}$  de 0,3 puis traités à la DNase RQ1. Les cDNA sont synthétisés selon le protocole préconisé dans le kit AMBION. La matrice de départ est 5 µg d'ARN totaux. La radioactivité utilisée est de l' $\alpha$ -33P ATP. Les membranes sont prémouillées 5 minutes à température ambiante dans du SSC 2X (0,3M NaCl, 30mM trisodium acétate, pH7,2), puis préhybridées 1h30 à 42°C dans le tampon d'hybridation (SSC 5x, 2% SDS, Denhardts Reagent 1x, ADN saumon préalablement dénaturé à 95°C (100µg/mL)). Les membranes sont ensuite hybridées toute la nuit à 42°C dans du tampon neuf contenant les cDNA radioactifs, lavées 3x3 minutes à température ambiante dans un grand volume de tampon de lavage (0,5X SSC, 0,2% SDS) puis 3x 30 minutes à 65°C. Les membranes sont exposées durant 4 jours sur un écran phosphoImager et déhybridées dans un tampon (0,5 M EDTA, 10% SDS, 1M Tris pH7,5) porté à ébullition.

L'analyse des membranes a été réalisée par la génopole de l'INRA, Toulouse.

## VI - Mesures d'activité $\beta$ -galactosidase

Les cellules sont cultivées dans les milieux décrits précédemment. Pour les expériences réalisées avec le mutant de l'Enolase, l'IPTG est rajouté dès le début dans le milieu à une concentration de 1mM ou 100 $\mu$ M. Pour les expériences concernant l'effet de PK sur la RNase E, l'IPTG (100 $\mu$ M) et l'arabinose (0,2%) sont rajoutés dans la culture à une DO<sub>600</sub> de 0,25-0,3. Les mesures d'activité  $\beta$ -galactosidase sont réalisées après 1h d'induction selon le protocole du laboratoire.

## VII - Phosphorylation *in vitro* par PK

Les réactions de phosphorylation *in vitro* sont réalisées dans le tampon défini par Marchand et al. (2001a) (30mM Tris pH7, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM NH<sub>4</sub>Cl, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA). Le volume réactionnel est de 40  $\mu$ L et la quantité d'enzyme et de substrat est de 0,5 $\mu$ g et 1 $\mu$ g (2 $\mu$ g pour le lysozyme) respectivement. La réaction est incubée 30 minutes à 30°C en présence de 10  $\mu$ Ci de  $\gamma$ 33P ATP, arrêtée par ajout de tampon de charge protéique et déposée sur gel SDS-page 12% acrylamide.

## VIII - Traitement phosphatase et FPLC

Dans un volume final de 160  $\mu$ L, 48  $\mu$ g de protéine PK purifiée sont incubés 1h à 30°C en présence ou non de 6,5 unités de phosphatase PPI, le tampon 1x et du MnCl<sub>2</sub> 1x fourni par Biolabs. La réaction est stoppée dans la glace et 740  $\mu$ L de tampon de charge de la colonne MonoQ (Tampon A : 50 mM Hepès, 50 mM NaCl, pH 6,5) sont rajoutés. Les 900  $\mu$ L finaux sont passés sur la colonne MonoQ reliée à une FPLC. L'élution est faite sur 52 mL selon un gradient linéaire de tampon B (50 mM Hepès, 2 M NaCl, pH 6,5) dans des fractions de 500  $\mu$ L. La concentration des protéines PK<sub>+PPI</sub> est réalisée avec des colonnes Vivaspin6 (Vivascience) où toutes les fractions contenant la protéine ont été rassemblées. Cependant la perte de protéine est importante entre le passage sur colonne monoQ et celles-ci.

## IX - Phosphorylation *in vivo*

Les cultures des souches contenant les plasmides pET15HCII et pAPTpET11PK (ou non) sont réalisées dans le 10 mL de milieu défini précédemment. L'expression des peptides HCII et PK est induite par l'ajout de 1mM d'IPTG à une  $DO_{600}$  de 0,25-0,3. Au même moment, 100 $\mu$ Ci de  $^{33}P$  phosphate est ajouté. Après 1h, la culture est centrifugée 10 minutes à 6000g et le culot est repris dans 1 mL de tampon de lyse préconisé par Qiagen et les peptides portant une étiquette histidine sont purifiés avec le kit Qiagen de purification sur colonne NiTA.

## X - Spectrométrie de masse

Les expériences de spectrométrie de masse ont été réalisées en collaboration avec le laboratoire de Ben LUISI localisé au département de Biochimie de l'université de Cambridge (UK) où j'ai séjourné durant 1 mois.

## Chapitre V:

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Afonyushkin, T., Moll, I., Blasi, U., and Kaberdin, V.R. (2003) Temperature-dependent stability and translation of Escherichia coli ompA mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* **311**: 604-609.
- Ahn, K., and Kornberg, A. (1990) Polyphosphate kinase from Escherichia coli. Purification and demonstration of a phosphoenzyme intermediate. *J Biol Chem* **265**: 11734-11739.
- al-Giery, A.G., and Brewer, J.M. (1992) Characterization of the interaction of yeast enolase with polynucleotides. *Biochim Biophys Acta* **1159**: 134-140.
- Allmang, C., Kufel, J., Chanfreau, G., Mitchell, P., Petfalski, E., and Tollervey, D. (1999a) Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *Embo J* **18**: 5399-5410.
- Allmang, C., Petfalski, E., Podtelejnikov, A., Mann, M., Tollervey, D., and Mitchell, P. (1999b) The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3' to 5' exonucleases. *Genes Dev* **13**: 2148-2158.
- Allmang, C., Mitchell, P., Petfalski, E., and Tollervey, D. (2000) Degradation of ribosomal RNA precursors by the exosome. *Nucleic Acids Res* **28**: 1684-1691.
- Aloy, P., Ciccarelli, F.D., Leutwein, C., Gavin, A.C., Superti-Furga, G., Bork, P., Bottcher, B., and Russell, R.B. (2002) A complex prediction: three-dimensional model of the yeast exosome. *EMBO Rep* **3**: 628-635.
- Anderson, J.S., and Parker, R.P. (1998) The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *Embo J* **17**: 1497-1506.
- Andrulis, E.D., Werner, J., Nazarian, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Lis, J.T. (2002) The RNA processing exosome is linked to elongating RNA polymerase II in Drosophila. *Nature* **420**: 837-841.
- Apirion, D., and Lassar, A.B. (1978) A conditional lethal mutant of Escherichia coli which affects the processing of ribosomal RNA. *J Biol Chem* **253**: 1738-1742.
- Apirion, D., and Gitelman, D.R. (1980) Decay of RNA in RNA processing mutants of Escherichia coli. *Mol Gen Genet* **177**: 339-343.
- Babitzke, P., and Kushner, S.R. (1991) The Ams (altered mRNA stability) protein and ribonuclease E are encoded by the same structural gene of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 1-5.
- Baga, M., Goransson, M., Normark, S., and Uhlin, B.E. (1988) Processed mRNA with differential stability in the regulation of E. coli pilin gene expression. *Cell* **52**: 197-206.
- Baker, K.E., and Mackie, G.A. (2003) Ectopic RNase E sites promote bypass of 5'-end-dependent mRNA decay in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **47**: 75-88.
- Bandyopadhyay, P.K., Studier, F.W., Hamilton, D.L., and Yuan, R. (1985) Inhibition of the type I restriction-modification enzymes EcoB and EcoK by the gene 0.3 protein of bacteriophage T7. *J Mol Biol* **182**: 567-578.

- Bardwell, J.C., Regnier, P., Chen, S.M., Nakamura, Y., Grunberg-Manago, M., and Court, D.L. (1989) Autoregulation of RNase III operon by mRNA processing. *Embo J* **8**: 3401-3407.
- Beelman, C.A., and Parker, R. (1995) Degradation of mRNA in eukaryotes. *Cell* **81**: 179-183.
- Belasco, J.G., and Higgins, C.F. (1988) Mechanisms of mRNA decay in bacteria: a perspective. *Gene* **72**: 15-23.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 9697-9702.
- Bernstein, J.A., Lin, P.H., Cohen, S.N., and Lin-Chao, S. (2004) Global analysis of *Escherichia coli* RNA degradosome function using DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 2758-2763.
- Bessarab, D.A., Kaberdin, V.R., Wei, C.L., Liou, G.G., and Lin-Chao, S. (1998) RNA components of *Escherichia coli* degradosome: evidence for rRNA decay. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 3157-3161.
- Blum, E., Py, B., Carpousis, A.J., and Higgins, C.F. (1997) Polyphosphate kinase is a component of the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Mol Microbiol* **26**: 387-398.
- Bousquet-Antonelli, C., Presutti, C., and Tollervey, D. (2000) Identification of a regulated pathway for nuclear pre-mRNA turnover. *Cell* **102**: 765-775.
- Bouvet, P., and Belasco, J.G. (1992) Control of RNase E-mediated RNA degradation by 5'-terminal base pairing in *E. coli*. *Nature* **360**: 488-491.
- Braun, F., Hajsndorf, E., and Regnier, P. (1996) Polynucleotide phosphorylase is required for the rapid degradation of the RNase E-processed rpsO mRNA of *Escherichia coli* devoid of its 3' hairpin. *Mol Microbiol* **19**: 997-1005.
- Briant, D.J., Hankins, J.S., Cook, M.A., and Mackie, G.A. (2003) The quaternary structure of RNase G from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **50**: 1381-1390.
- Brouwer, R., Allmang, C., Raijmakers, R., van Aarssen, Y., Egberts, W.V., Petfalski, E., van Venrooij, W.J., Tollervey, D., and Pruijn, G.J. (2001) Three novel components of the human exosome. *J Biol Chem* **276**: 6177-6184.
- Bukau, B. (1993) Regulation of the *Escherichia coli* heat-shock response. *Mol Microbiol* **9**: 671-680.
- Bycroft, M., Hubbard, T.J., Proctor, M., Freund, S.M., and Murzin, A.G. (1997) The solution structure of the S1 RNA binding domain: a member of an ancient nucleic acid-binding fold. *Cell* **88**: 235-242.
- Cairrao, F., Chora, A., Zilhao, R., Carpousis, A.J., and Arraiano, C.M. (2001) RNase II levels change according to the growth conditions: characterization of gmr, a new *Escherichia coli* gene involved in the modulation of RNase II. *Mol Microbiol* **39**: 1550-1561.
- Callaghan, A.J., Grossmann, J.G., Redko, Y.U., Ilag, L.L., Moncrieffe, M.C., Symmons, M.F., Robinson, C.V., McDowall, K.J., and Luisi, B.F. (2003) Quaternary structure and catalytic activity of the *Escherichia coli* ribonuclease E amino-terminal catalytic domain. *Biochemistry* **42**: 13848-13855.
- Callaghan, A.J., Aurikko, J.P., Ilag, L.L., Gunter Grossmann, J., Chandran, V., Kuhnle, K., Poljak, L., Carpousis, A.J., Robinson, C.V., Symmons, M.F., and Luisi, B.F. (2004) Studies of the RNA degradosome-organizing domain of the *Escherichia coli* ribonuclease RNase E. *J Mol Biol* **340**: 965-979.
- Cannistraro, V.J., Subbarao, M.N., and Kennell, D. (1986) Specific endonucleolytic cleavage sites for decay of *Escherichia coli* mRNA. *J Mol Biol* **192**: 257-274.

- Carpousis, A.J., Van Houwe, G., Ehretsmann, C., and Krisch, H.M. (1994) Copurification of *E. coli* RNAase E and PNPase: evidence for a specific association between two enzymes important in RNA processing and degradation. *Cell* **76**: 889-900.
- Carpousis, A.J., Leroy, A., Vanzo, N., and Khemici, V. (2001) Escherichia coli RNA degradosome. *Methods Enzymol* **342**: 333-345.
- Charollais, J., Pflieger, D., Vinh, J., Dreyfus, M., and Iost, I. (2003) The DEAD-box RNA helicase SrmB is involved in the assembly of 50S ribosomal subunits in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **48**: 1253-1265.
- Charollais, J., Dreyfus, M., and Iost, I. (2004) CsdA, a cold-shock RNA helicase from Escherichia coli, is involved in the biogenesis of 50S ribosomal subunit. *Nucleic Acids Res* **32**: 2751-2759.
- Cheng, Z.F., and Deutscher, M.P. (2005) An important role for RNase R in mRNA decay. *Mol Cell* **17**: 313-318.
- Coburn, G.A., and Mackie, G.A. (1996a) Overexpression, purification, and properties of Escherichia coli ribonuclease II. *J Biol Chem* **271**: 1048-1053.
- Coburn, G.A., and Mackie, G.A. (1996b) Differential sensitivities of portions of the mRNA for ribosomal protein S20 to 3'-exonucleases dependent on oligoadenylation and RNA secondary structure. *J Biol Chem* **271**: 15776-15781.
- Coburn, G.A., and Mackie, G.A. (1999) Degradation of mRNA in Escherichia coli: an old problem with some new twists. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **62**: 55-108.
- Coburn, G.A., Miao, X., Briant, D.J., and Mackie, G.A. (1999) Reconstitution of a minimal RNA degradosome demonstrates functional coordination between a 3' exonuclease and a DEAD-box RNA helicase. *Genes Dev* **13**: 2594-2603.
- Conrad, C., Evguenieva-Hackenberg, E., and Klug, G. (2001) Both N-terminal catalytic and C-terminal RNA binding domain contribute to substrate specificity and cleavage site selection of RNase III. *FEBS Lett* **509**: 53-58.
- Conrad, C., Schmitt, J.G., Evguenieva-Hackenberg, E., and Klug, G. (2002) One functional subunit is sufficient for catalytic activity and substrate specificity of Escherichia coli endoribonuclease III artificial heterodimers. *FEBS Lett* **518**: 93-96.
- Cormack, R.S., Genereaux, J.L., and Mackie, G.A. (1993) RNase E activity is conferred by a single polypeptide: overexpression, purification, and properties of the *ams/rne/hmp1* gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 9006-9010.
- Cornet, F., Mortier, I., Patte, J., and Louarn, J.M. (1994) Plasmid pSC101 harbors a recombination site, *psi*, which is able to resolve plasmid multimers and to substitute for the analogous chromosomal Escherichia coli site *dif*. *J Bacteriol* **176**: 3188-3195.
- Cortay, J.C., Rieul, C., Duclos, B., and Cozzone, A.J. (1986) Characterization of the phosphoproteins of Escherichia coli cells by electrophoretic analysis. *Eur J Biochem* **159**: 227-237.
- Cozzone, A.J. (1988) Protein phosphorylation in prokaryotes. *Annu Rev Microbiol* **42**: 97-125.
- de la Cruz, J., Kressler, D., and Linder, P. (1999) Unwinding RNA in Saccharomyces cerevisiae: DEAD-box proteins and related families. *Trends Biochem Sci* **24**: 192-198.
- Deana, A., and Belasco, J.G. (2004) The function of RNase G in Escherichia coli is constrained by its amino and carboxyl termini. *Mol Microbiol* **51**: 1205-1217.
- Deutscher, M.P., and Reuven, N.B. (1991) Enzymatic basis for hydrolytic versus phosphorolytic mRNA degradation in Escherichia coli and Bacillus subtilis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 3277-3280.

- Deutscher, M.P., and Li, Z. (2001) Exoribonucleases and their multiple roles in RNA metabolism. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **66**: 67-105.
- Diges, C.M., and Uhlenbeck, O.C. (2001) Escherichia coli DbpA is an RNA helicase that requires hairpin 92 of 23S rRNA. *Embo J* **20**: 5503-5512.
- Diwa, A., Bricker, A.L., Jain, C., and Belasco, J.G. (2000) An evolutionarily conserved RNA stem-loop functions as a sensor that directs feedback regulation of RNase E gene expression. *Genes Dev* **14**: 1249-1260.
- Diwa, A.A., and Belasco, J.G. (2002) Critical features of a conserved RNA stem-loop important for feedback regulation of RNase E synthesis. *J Biol Chem* **277**: 20415-20422.
- Diwa, A.A., Jiang, X., Schapira, M., and Belasco, J.G. (2002) Two distinct regions on the surface of an RNA-binding domain are crucial for RNase E function. *Mol Microbiol* **46**: 959-969.
- Donovan, W.P., and Kushner, S.R. (1986) Polynucleotide phosphorylase and ribonuclease II are required for cell viability and mRNA turnover in Escherichia coli K-12. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 120-124.
- Dunn, J.J., and Studier, F.W. (1975) Effect of RNAase III, cleavage on translation of bacteriophage T7 messenger RNAs. *J Mol Biol* **99**: 487-499.
- Dziembowski, A., Malewicz, M., Minczuk, M., Golik, P., Dmochowska, A., and Stepień, P.P. (1998) The yeast nuclear gene DSS1, which codes for a putative RNase II, is necessary for the function of the mitochondrial degradosome in processing and turnover of RNA. *Mol Gen Genet* **260**: 108-114.
- Dziembowski, A., Piwowarski, J., Hoser, R., Minczuk, M., Dmochowska, A., Siep, M., van der Spek, H., Grivell, L., and Stepień, P.P. (2003) The yeast mitochondrial degradosome. Its composition, interplay between RNA helicase and RNase activities and the role in mitochondrial RNA metabolism. *J Biol Chem* **278**: 1603-1611.
- Ehretsmann, C.P., Carpousis, A.J., and Krisch, H.M. (1992a) mRNA degradation in prokaryotes. *Faseb J* **6**: 3186-3192.
- Ehretsmann, C.P., Carpousis, A.J., and Krisch, H.M. (1992b) Specificity of Escherichia coli endoribonuclease RNase E: in vivo and in vitro analysis of mutants in a bacteriophage T4 mRNA processing site. *Genes Dev* **6**: 149-159.
- Estevez, A.M., Kempf, T., and Clayton, C. (2001) The exosome of Trypanosoma brucei. *Embo J* **20**: 3831-3839.
- Evguenieva-Hackenburg, E., Walter, P., Hochleitner, E., Lottspeich, F., and Klug, G. (2003) An exosome-like complex in Sulfolobus solfataricus. *EMBO Rep* **4**: 889-893.
- Fayet, O., Ziegelhoffer, T., and Georgopoulos, C. (1989) The groES and groEL heat shock gene products of Escherichia coli are essential for bacterial growth at all temperatures. *J Bacteriol* **171**: 1379-1385.
- Feng, Y., Vickers, T.A., and Cohen, S.N. (2002) The catalytic domain of RNase E shows inherent 3' to 5' directionality in cleavage site selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 14746-14751.
- Franzetti, B., Sohlberg, B., Zaccari, G., and von Gabain, A. (1997) Biochemical and serological evidence for an RNase E-like activity in halophilic Archaea. *J Bacteriol* **179**: 1180-1185.
- Gegenheimer, P., and Apirion, D. (1981) Processing of prokaryotic ribonucleic acid. *Microbiol Rev* **45**: 502-541.

- Georgellis, D., Arvidson, S., and von Gabain, A. (1992) Decay of ompA mRNA and processing of 9S RNA are immediately affected by shifts in growth rate, but in opposite manners. *J Bacteriol* **174**: 5382-5390.
- Ghora, B.K., and Apirion, D. (1978) Structural analysis and in vitro processing to p5 rRNA of a 9S RNA molecule isolated from an rne mutant of E. coli. *Cell* **15**: 1055-1066.
- Ghosh, S., and Deutscher, M.P. (1999) Oligoribonuclease is an essential component of the mRNA decay pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 4372-4377.
- Gomez, B., and Nualart, L. (1977) Requirement of the bacteriophage T7 0.7 gene for phage growth in the presence of the Col 1b factor. *J Gen Virol* **35**: 99-106.
- Guarneros, G., and Portier, C. (1990) Different specificities of ribonuclease II and polynucleotide phosphorylase in 3'mRNA decay. *Biochimie* **72**: 771-777.
- Hagege, J.M., and Cohen, S.N. (1997) A developmentally regulated Streptomyces endoribonuclease resembles ribonuclease E of Escherichia coli. *Mol Microbiol* **25**: 1077-1090.
- Hajnsdorf, E., Carpousis, A.J., and Regnier, P. (1994) Nucleolytic inactivation and degradation of the RNase III processed pnp message encoding polynucleotide phosphorylase of Escherichia coli. *J Mol Biol* **239**: 439-454.
- Herrlich, P., Rahmsdorf, H.J., Pai, S.H., and Schweigher, M. (1974) Translational control induced by bacteriophage T7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**: 1088-1092.
- Hesselbach, B.A., and Nakada, D. (1975) Inactive complex formation between E. coli RNA polymerase and inhibitor protein purified from T7 phage infected cells. *Nature* **258**: 354-357.
- Hesselbach, B.A., and Nakada, D. (1977a) "Host shutoff" function of bacteriophage T7: involvement of T7 gene 2 and gene 0.7 in the inactivation of Escherichia coli RNA polymerase. *J Virol* **24**: 736-745.
- Hesselbach, B.A., and Nakada, D. (1977b) I protein: bacteriophage T7-coded inhibitor of Escherichia coli RNA polymerase. *J Virol* **24**: 746-760.
- Hirsch-Kauffmann, M., Herrlich, P., Ponta, H., and Schweiger, M. (1975) Helper function of T7 protein kinase in virus propagation. *Nature* **255**: 508-510.
- Iost, I., Guillerez, J., and Dreyfus, M. (1992) Bacteriophage T7 RNA polymerase travels far ahead of ribosomes in vivo. *J Bacteriol* **174**: 619-622.
- Iost, I., and Dreyfus, M. (1995) The stability of Escherichia coli lacZ mRNA depends upon the simultaneity of its synthesis and translation. *Embo J* **14**: 3252-3261.
- Irani, M., and Maitra, P.K. (1974) Isolation and characterization of Escherichia coli mutants defective in enzymes of glycolysis. *Biochem Biophys Res Commun* **56**: 127-133.
- Irani, M.H., and Maitra, P.K. (1977) Properties of Escherichia coli mutants deficient in enzymes of glycolysis. *J Bacteriol* **132**: 398-410.
- Jager, S., Fuhrmann, O., Heck, C., Hebermehl, M., Schiltz, E., Rauhut, R., and Klug, G. (2001) An mRNA degrading complex in Rhodobacter capsulatus. *Nucleic Acids Res* **29**: 4581-4588.
- Jager, S., Hebermehl, M., Schiltz, E., and Klug, G. (2004) Composition and activity of the Rhodobacter capsulatus degradosome vary under different oxygen concentrations. *J Mol Microbiol Biotechnol* **7**: 148-154.
- Jain, C., and Belasco, J.G. (1995) RNase E autoregulates its synthesis by controlling the degradation rate of its own mRNA in Escherichia coli: unusual sensitivity of the rne transcript to RNase E activity. *Genes Dev* **9**: 84-96.
- Jain, C., Deana, A., and Belasco, J.G. (2002) Consequences of RNase E scarcity in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **43**: 1053-1064.

- Jarrige, A.C., Mathy, N., and Portier, C. (2001) PNPase autocontrols its expression by degrading a double-stranded structure in the pnp mRNA leader. *Embo J* **20**: 6845-6855.
- Jerome, L.J., van Biesen, T., and Frost, L.S. (1999) Degradation of FinP antisense RNA from F-like plasmids: the RNA-binding protein, FinO, protects FinP from ribonuclease E. *J Mol Biol* **285**: 1457-1473.
- Jiang, X., Diwa, A., and Belasco, J.G. (2000) Regions of RNase E important for 5'-end-dependent RNA cleavage and autoregulated synthesis. *J Bacteriol* **182**: 2468-2475.
- Jiang, X., and Belasco, J.G. (2004) Catalytic activation of multimeric RNase E and RNase G by 5'-monophosphorylated RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 9211-9216.
- Johnson, M.D., Popowski, J., Cao, G.J., Shen, P., and Sarkar, N. (1998) Bacteriophage T7 mRNA is polyadenylated. *Mol Microbiol* **27**: 23-30.
- Jones, P.G., Mitta, M., Kim, Y., Jiang, W., and Inouye, M. (1996) Cold shock induces a major ribosomal-associated protein that unwinds double-stranded RNA in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 76-80.
- Joyce, S.A., and Dreyfus, M. (1998) In the absence of translation, RNase E can bypass 5' mRNA stabilizers in Escherichia coli. *J Mol Biol* **282**: 241-254.
- Jung, Y.H., and Lee, Y. (1995) RNases in ColE1 DNA metabolism. *Mol Biol Rep* **22**: 195-200.
- Kaberdin, V.R., Walsh, A.P., Jakobsen, T., McDowall, K.J., and von Gabain, A. (2000) Enhanced cleavage of RNA mediated by an interaction between substrates and the arginine-rich domain of E. coli ribonuclease E. *J Mol Biol* **301**: 257-264.
- Kaberdin, V.R. (2003) Probing the substrate specificity of Escherichia coli RNase E using a novel oligonucleotide-based assay. *Nucleic Acids Res* **31**: 4710-4716.
- Kalman, M., Murphy, H., and Cashel, M. (1991) rhlB, a new Escherichia coli K-12 gene with an RNA helicase-like protein sequence motif, one of at least five such possible genes in a prokaryote. *New Biol* **3**: 886-895.
- Kano, Y., and Imamoto, F. (1979) Evidence for endonucleolytic cleavage at the 5'-proximal segment of the trp messenger RNA in Escherichia coli. *Mol Gen Genet* **172**: 25-30.
- Keiler, K.C., Waller, P.R., and Sauer, R.T. (1996) Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. *Science* **271**: 990-993.
- Khemici, V., and Carpousis, A.J. (2004) The RNA degradosome and poly(A) polymerase of Escherichia coli are required in vivo for the degradation of small mRNA decay intermediates containing REP-stabilizers. *Mol Microbiol* **51**: 777-790.
- Khemici, V., Toesca, I., Poljak, L., Vanzo, N.F., and Carpousis, A.J. (2004) The RNase E of Escherichia coli has at least two binding sites for DEAD-box RNA helicases: functional replacement of RhlB by RhlE. *Mol Microbiol* **54**: 1422-1430.
- Kimata, K., Tanaka, Y., Inada, T., and Aiba, H. (2001) Expression of the glucose transporter gene, ptsG, is regulated at the mRNA degradation step in response to glycolytic flux in Escherichia coli. *Embo J* **20**: 3587-3595.
- King, T.C., Sirdeshmukh, R., and Schlessinger, D. (1984) RNase III cleavage is obligate for maturation but not for function of Escherichia coli pre-23S rRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 185-188.
- Knirsch, L., and Clerch, L.B. (2001) Tyrosine phosphorylation regulates manganese superoxide dismutase (MnSOD) RNA-binding protein activity and MnSOD protein expression. *Biochemistry* **40**: 7890-7895.

- 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*. *J Bacteriol* **187**: 1344-1349.
- Koonin, E.V., Wolf, Y.I., and Aravind, L. (2001) Prediction of the archaeal exosome and its connections with the proteasome and the translation and transcription machineries by a comparative-genomic approach. *Genome Res* **11**: 240-252.
- Kruger, D.H., and Schroeder, C. (1981) Bacteriophage T3 and bacteriophage T7 virus-host cell interactions. *Microbiol Rev* **45**: 9-51.
- Kuhnel, K., and Luisi, B.F. (2001) Crystal structure of the *Escherichia coli* RNA degradosome component enolase. *J Mol Biol* **313**: 583-592.
- Kushner, S.R. (2002) mRNA decay in *Escherichia coli* comes of age. *J Bacteriol* **184**: 4658-4665; discussion 4657.
- Lee, A.T., and Cerami, A. (1987) Elevated glucose 6-phosphate levels are associated with plasmid mutations in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 8311-8314.
- Lee, K., Bernstein, J.A., and Cohen, S.N. (2002) RNase G complementation of rne null mutation identifies functional interrelationships with RNase E in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **43**: 1445-1456.
- Lee, K., and Cohen, S.N. (2003) A *Streptomyces coelicolor* functional orthologue of *Escherichia coli* RNase E shows shuffling of catalytic and PNPase-binding domains. *Mol Microbiol* **48**: 349-360.
- Lee, K., Zhan, X., Gao, J., Qiu, J., Feng, Y., Meganathan, R., Cohen, S.N., and Georgiou, G. (2003) RraA, a protein inhibitor of RNase E activity that globally modulates RNA abundance in *E. coli*. *Cell* **114**: 623-634.
- Leroy, A., Vanzo, N.F., Sousa, S., Dreyfus, M., and Carpousis, A.J. (2002) Function in *Escherichiacoli* of the non-catalytic part of RNase E: role in the degradation of ribosome-free mRNA. *Mol Microbiol* **45**: 1231-1243.
- Levi, B., and Werman, M.J. (2001) Fructose triggers DNA modification and damage in an *Escherichia coli* plasmid. *J Nutr Biochem* **12**: 235-241.
- Li, Z., Pandit, S., and Deutscher, M.P. (1998) 3' exoribonucleolytic trimming is a common feature of the maturation of small, stable RNAs in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 2856-2861.
- Li, Z., and Deutscher, M.P. (2002) RNase E plays an essential role in the maturation of *Escherichia coli* tRNA precursors. *Rna* **8**: 97-109.
- Lin-Chao, S., and Cohen, S.N. (1991) The rate of processing and degradation of antisense RNAI regulates the replication of ColE1-type plasmids in vivo. *Cell* **65**: 1233-1242.
- Lin-Chao, S., Wong, T.T., McDowall, K.J., and Cohen, S.N. (1994) Effects of nucleotide sequence on the specificity of rne-dependent and RNase E-mediated cleavages of RNA I encoded by the pBR322 plasmid. *J Biol Chem* **269**: 10797-10803.
- Liou, G.G., Jane, W.N., Cohen, S.N., Lin, N.S., and Lin-Chao, S. (2001) RNA degradosomes exist in vivo in *Escherichia coli* as multicomponent complexes associated with the cytoplasmic membrane via the N-terminal region of ribonuclease E. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 63-68.
- Liou, G.G., Chang, H.Y., Lin, C.S., and Lin-Chao, S. (2002) DEAD box RhlB RNA helicase physically associates with exoribonuclease PNPase to degrade double stranded RNA independent of the degradosome assembling region of RNaseE. *J Biol Chem* **277**: 13313-13319.
- Lopez, P.J., Iost, I., and Dreyfus, M. (1994) The use of a tRNA as a transcriptional reporter: the T7 late promoter is extremely efficient in *Escherichia coli* but its transcripts are poorly expressed. *Nucleic Acids Res* **22**: 2434.

- Lopez, P.J., Marchand, I., Joyce, S.A., and Dreyfus, M. (1999) The C-terminal half of RNase E, which organizes the Escherichia coli degradosome, participates in mRNA degradation but not rRNA processing in vivo. *Mol Microbiol* **33**: 188-199.
- Lund, P.A. (2001) Microbial molecular chaperones. *Adv Microb Physiol* **44**: 93-140.
- Mackie, G.A., Genereaux, J.L., and Masterman, S.K. (1997) Modulation of the activity of RNase E in vitro by RNA sequences and secondary structures 5' to cleavage sites. *J Biol Chem* **272**: 609-616.
- Mackie, G.A. (1998) Ribonuclease E is a 5'-end-dependent endonuclease. *Nature* **395**: 720-723.
- Marchand, I., Nicholson, A.W., and Dreyfus, M. (2001a) Bacteriophage T7 protein kinase phosphorylates RNase E and stabilizes mRNAs synthesized by T7 RNA polymerase. *Mol Microbiol* **42**: 767-776.
- Marchand, I., Nicholson, A.W., and Dreyfus, M. (2001b) High-level autoenhanced expression of a single-copy gene in Escherichia coli: overproduction of bacteriophage T7 protein kinase directed by T7 late genetic elements. *Gene* **262**: 231-238.
- Margossian, S.P., Li, H., Zassenhaus, H.P., and Butow, R.A. (1996) The DExH box protein Suv3p is a component of a yeast mitochondrial 3'-to-5' exoribonuclease that suppresses group I intron toxicity. *Cell* **84**: 199-209.
- Martin, J., Mayhew, M., Langer, T., and Hartl, F.U. (1993) The reaction cycle of GroEL and GroES in chaperonin-assisted protein folding. *Nature* **366**: 228-233.
- Mayer, J.E., and Schweiger, M. (1983) RNase III is positively regulated by T7 protein kinase. *J Biol Chem* **258**: 5340-5343.
- 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. *J Biol Chem* **269**: 10790-10796.
- McDowall, K.J., and Cohen, S.N. (1996) The N-terminal domain of the rne gene product has RNase E activity and is non-overlapping with the arginine-rich RNA-binding site. *J Mol Biol* **255**: 349-355.
- McLaren, R.S., Newbury, S.F., Dance, G.S., Causton, H.C., and Higgins, C.F. (1991) mRNA degradation by processive 3'-5' exoribonucleases in vitro and the implications for prokaryotic mRNA decay in vivo. *J Mol Biol* **221**: 81-95.
- Michalewicz, J., and Nicholson, A.W. (1992) Molecular cloning and expression of the bacteriophage T7 0.7(protein kinase) gene. *Virology* **186**: 452-462.
- Miczak, A., Kaberdin, V.R., Wei, C.L., and Lin-Chao, S. (1996) Proteins associated with RNase E in a multicomponent ribonucleolytic complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 3865-3869.
- Min, J., and Zassenhaus, H.P. (1993) Identification of a protein complex that binds to a dodecamer sequence found at the 3' ends of yeast mitochondrial mRNAs. *Mol Cell Biol* **13**: 4167-4173.
- Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M., and Tollervey, D. (1997) The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'-->5' exoribonucleases. *Cell* **91**: 457-466.
- Mitchell, P., and Tollervey, D. (2000) Musing on the structural organization of the exosome complex. *Nat Struct Biol* **7**: 843-846.
- Mohanty, B.K., and Kushner, S.R. (2003) Genomic analysis in Escherichia coli demonstrates differential roles for polynucleotide phosphorylase and RNase II in mRNA abundance and decay. *Mol Microbiol* **50**: 645-658.

- Monzingo, A.F., Gao, J., Qiu, J., Georgiou, G., and Robertus, J.D. (2003) The X-ray structure of Escherichia coli RraA (MenG), A protein inhibitor of RNA processing. *J Mol Biol* **332**: 1015-1024.
- Morita, T., El-Kazzaz, W., Tanaka, Y., Inada, T., and Aiba, H. (2003) Accumulation of glucose 6-phosphate or fructose 6-phosphate is responsible for destabilization of glucose transporter mRNA in Escherichia coli. *J Biol Chem* **278**: 15608-15614.
- 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. *Mol Microbiol* **54**: 1063-1075.
- Mudd, E.A., Krisch, H.M., and Higgins, C.F. (1990) RNase E, an endoribonuclease, has a general role in the chemical decay of Escherichia coli mRNA: evidence that rne and ams are the same genetic locus. *Mol Microbiol* **4**: 2127-2135.
- Mudd, E.A., and Higgins, C.F. (1993) Escherichia coli endoribonuclease RNase E: autoregulation of expression and site-specific cleavage of mRNA. *Mol Microbiol* **9**: 557-568.
- Newbury, S.F., Smith, N.H., Robinson, E.C., Hiles, I.D., and Higgins, C.F. (1987) Stabilization of translationally active mRNA by prokaryotic REP sequences. *Cell* **48**: 297-310.
- Nicholson, A.W. (1999) Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases. *FEMS Microbiol Rev* **23**: 371-390.
- Nierlich, D.P., and Murakawa, G.J. (1996) The decay of bacterial messenger RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **52**: 153-216.
- Nilsson, P., and Uhlin, B.E. (1991) Differential decay of a polycistronic Escherichia coli transcript is initiated by RNaseE-dependent endonucleolytic processing. *Mol Microbiol* **5**: 1791-1799.
- Nogueira, T., de Smit, M., Graffe, M., and Springer, M. (2001) The relationship between translational control and mRNA degradation for the Escherichia coli threonyl-tRNA synthetase gene. *J Mol Biol* **310**: 709-722.
- Oh, B.K., Chauhan, A.K., Isono, K., and Apirion, D. (1990) Location of a gene (ssrA) for a small, stable RNA (10Sa RNA) in the Escherichia coli chromosome. *J Bacteriol* **172**: 4708-4709.
- Ono, M., and Kuwano, M. (1979) A conditional lethal mutation in an Escherichia coli strain with a longer chemical lifetime of messenger RNA. *J Mol Biol* **129**: 343-357.
- Ow, M.C., and Kushner, S.R. (2002) Initiation of tRNA maturation by RNase E is essential for cell viability in E. coli. *Genes Dev* **16**: 1102-1115.
- Ow, M.C., Liu, Q., Mohanty, B.K., Andrew, M.E., Maples, V.F., and Kushner, S.R. (2002) RNase E levels in Escherichia coli are controlled by a complex regulatory system that involves transcription of the rne gene from three promoters. *Mol Microbiol* **43**: 159-171.
- Ow, M.C., Perwez, T., and Kushner, S.R. (2003) RNase G of Escherichia coli exhibits only limited functional overlap with its essential homologue, RNase E. *Mol Microbiol* **49**: 607-622.
- Pai, S.H., Rahmsdorf, H.J., Ponta, H., Hirsch-Kauffmann, M., Herrlich, P., and Schweiger, M. (1975) Protein kinase of bacteriophage T7. 2. Properties, enzyme synthesis in vitro and regulation of enzyme synthesis and activity in vivo. *Eur J Biochem* **55**: 305-314.
- Panayotatos, N., and Truong, K. (1985) Cleavage within an RNase III site can control mRNA stability and protein synthesis in vivo. *Nucleic Acids Res* **13**: 2227-2240.

- Pause, A., Methot, N., and Sonenberg, N. (1993) The HRIGRXXR region of the DEAD box RNA helicase eukaryotic translation initiation factor 4A is required for RNA binding and ATP hydrolysis. *Mol Cell Biol* **13**: 6789-6798.
- Portier, C., and Regnier, P. (1984) Expression of the rpsO and pnp genes: structural analysis of a DNA fragment carrying their control regions. *Nucleic Acids Res* **12**: 6091-6102.
- Postma, P.W., Lengeler, J.W., and Jacobson, G.R. (1993) Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev* **57**: 543-594.
- Prud'homme-Genereux, A., Beran, R.K., Iost, I., Ramey, C.S., Mackie, G.A., and Simons, R.W. (2004) Physical and functional interactions among RNase E, polynucleotide phosphorylase and the cold-shock protein, CsdA: evidence for a 'cold shock degradosome'. *Mol Microbiol* **54**: 1409-1421.
- Purusharth, R.I., Klein, F., Sulthana, S., Jager, S., Jagannadham, M.V., Evguenieva-Hackenberg, E., Ray, M.K., and Klug, G. (2005) Exoribonuclease R interacts with endoribonuclease E and an RNA-helicase in the psychrotrophic Bacterium *Pseudomonas syringae* Lz4W. *J Biol Chem*.
- Py, B., Causton, H., Mudd, E.A., and Higgins, C.F. (1994) A protein complex mediating mRNA degradation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **14**: 717-729.
- Py, B., Higgins, C.F., Krisch, H.M., and Carpousis, A.J. (1996) A DEAD-box RNA helicase in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Nature* **381**: 169-172.
- Rahmsdorf, H.J., Pai, S.H., Ponta, H., Herrlich, P., Roskoski, R., Jr., Schweiger, M., and Studier, F.W. (1974) Protein kinase induction in *Escherichia coli* by bacteriophage T7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**: 586-589.
- Raijmakers, R., Egberts, W.V., van Venrooij, W.J., and Pruijn, G.J. (2002) Protein-protein interactions between human exosome components support the assembly of RNase PH-type subunits into a six-membered PNPase-like ring. *J Mol Biol* **323**: 653-663.
- Redko, Y., Tock, M.R., Adams, C.J., Kaberdin, V.R., Grasby, J.A., and McDowall, K.J. (2003) Determination of the catalytic parameters of the N-terminal half of *Escherichia coli* ribonuclease E and the identification of critical functional groups in RNA substrates. *J Biol Chem* **278**: 44001-44008.
- Regnier, P., and Arraiano, C.M. (2000) Degradation of mRNA in bacteria: emergence of ubiquitous features. *Bioessays* **22**: 235-244.
- Robert-Le Meur, M., and Portier, C. (1992) *E. coli* polynucleotide phosphorylase expression is autoregulated through an RNase III-dependent mechanism. *Embo J* **11**: 2633-2641.
- Robertson, E.S., and Nicholson, A.W. (1990) Protein kinase of bacteriophage T7 induces the phosphorylation of only a small number of proteins in the infected cell. *Virology* **175**: 525-534.
- Robertson, E.S., and Nicholson, A.W. (1992) Phosphorylation of *Escherichia coli* translation initiation factors by the bacteriophage T7 protein kinase. *Biochemistry* **31**: 4822-4827.
- Robertson, E.S., Aggison, L.A., and Nicholson, A.W. (1994) Phosphorylation of elongation factor G and ribosomal protein S6 in bacteriophage T7-infected *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **11**: 1045-1057.
- Robertson, H.D., and Dunn, J.J. (1975) Ribonucleic acid processing activity of *Escherichia coli* ribonuclease III. *J Biol Chem* **250**: 3050-3056.
- Saier, M.H., Jr, Ramseier, T.M. and Reizer, J. (1996) in *Escherichia coli and Salmonella : Cellular and Molecular Biology* (Neidhardt, F.C., ed.) 2<sup>nd</sup> Ed., pp.1325-1343, ASM Press, Washington, D.C

- Schlessinger, D., Jacobs, K.A., Gupta, R.S., Kano, Y., and Imamoto, F. (1977) Decay of individual *Escherichia coli* trp messenger RNA molecules is sequentially ordered. *J Mol Biol* **110**: 421-439.
- Schneider, E., Blundell, M., and Kennell, D. (1978) Translation and mRNA decay. *Mol Gen Genet* **160**: 121-129.
- Schubert, M., Edge, R.E., Lario, P., Cook, M.A., Strynadka, N.C., Mackie, G.A., and McIntosh, L.P. (2004) Structural characterization of the RNase E S1 domain and identification of its oligonucleotide-binding and dimerization interfaces. *J Mol Biol* **341**: 37-54.
- Schweiger, M., Herrlich, P., Scherzinger, E., and Rahmsdorf, H.J. (1972) Negative control of protein synthesis after infection with bacteriophage T7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**: 2203-2207.
- Sim, S., Kim, K.S., and Lee, Y. (2002) 3'-end processing of precursor M1 RNA by the N-terminal half of RNase E. *FEBS Lett* **529**: 225-231.
- Sousa, S., Marchand, I., and Dreyfus, M. (2001) Autoregulation allows *Escherichia coli* RNase E to adjust continuously its synthesis to that of its substrates. *Mol Microbiol* **42**: 867-878.
- Spickler, C., and Mackie, G.A. (2000) Action of RNase II and polynucleotide phosphorylase against RNAs containing stem-loops of defined structure. *J Bacteriol* **182**: 2422-2427.
- Stock, J.B., Ninfa, A.J., and Stock, A.M. (1989) Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol Rev* **53**: 450-490.
- Sugiura, R., Kita, A., Shimizu, Y., Shuntoh, H., Sio, S.O., and Kuno, T. (2003) Feedback regulation of MAPK signalling by an RNA-binding protein. *Nature* **424**: 961-965.
- Summers, W.C. (1970) The process of infection with coliphage T7. IV. Stability of RNA in bacteriophage-infected cells. *J Mol Biol* **51**: 671-678.
- Sun, W., Jun, E., and Nicholson, A.W. (2001) Intrinsic double-stranded-RNA processing activity of *Escherichia coli* ribonuclease III lacking the dsRNA-binding domain. *Biochemistry* **40**: 14976-14984.
- Symmons, M.F., Williams, M.G., Luisi, B.F., Jones, G.H., and Carpousis, A.J. (2002) Running rings around RNA: a superfamily of phosphate-dependent RNases. *Trends Biochem Sci* **27**: 11-18.
- Taraseviciene, L., Bjork, G.R., and Uhlin, B.E. (1995) Evidence for an RNA binding region in the *Escherichia coli* processing endoribonuclease RNase E. *J Biol Chem* **270**: 26391-26398.
- Tock, M.R., Walsh, A.P., Carroll, G., and McDowall, K.J. (2000) The CafA protein required for the 5'-maturation of 16 S rRNA is a 5'-end-dependent ribonuclease that has context-dependent broad sequence specificity. *J Biol Chem* **275**: 8726-8732.
- Tomcsanyi, T., and Apirion, D. (1985) Processing enzyme ribonuclease E specifically cleaves RNA I. An inhibitor of primer formation in plasmid DNA synthesis. *J Mol Biol* **185**: 713-720.
- Tompa, P. (2002) Intrinsically unstructured proteins. *Trends Biochem Sci* **27**: 527-533.
- Tourriere, H., Chebli, K., and Tazi, J. (2002) mRNA degradation machines in eukaryotic cells. *Biochimie* **84**: 821-837.
- Umitsuki, G., Wachi, M., Takada, A., Hikichi, T., and Nagai, K. (2001) Involvement of RNase G in in vivo mRNA metabolism in *Escherichia coli*. *Genes Cells* **6**: 403-410.
- Vanderpool, C.K., and Gottesman, S. (2004) Involvement of a novel transcriptional activator and small RNA in post-transcriptional regulation of the glucose phosphoenolpyruvate phosphotransferase system. *Mol Microbiol* **54**: 1076-1089.

- Vanzo, N.F., Li, Y.S., Py, B., Blum, E., Higgins, C.F., Raynal, L.C., Krisch, H.M., and Carpousis, A.J. (1998) Ribonuclease E organizes the protein interactions in the Escherichia coli RNA degradosome. *Genes Dev* **12**: 2770-2781.
- Vytvytska, O., Jakobsen, J.S., Balcunaite, G., Andersen, J.S., Baccarini, M., and von Gabain, A. (1998) Host factor I, Hfq, binds to Escherichia coli ompA mRNA in a growth rate-dependent fashion and regulates its stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 14118-14123.
- Vytvytska, O., Moll, I., Kaberdin, V.R., von Gabain, A., and Blasi, U. (2000) Hfq (HF1) stimulates ompA mRNA decay by interfering with ribosome binding. *Genes Dev* **14**: 1109-1118.
- Wachi, M., Umitsuki, G., and Nagai, K. (1997) Functional relationship between Escherichia coli RNase E and the CafA protein. *Mol Gen Genet* **253**: 515-519.
- Wagner, E.G., and Simons, R.W. (1994) Antisense RNA control in bacteria, phages, and plasmids. *Annu Rev Microbiol* **48**: 713-742.
- Weissenborn, D.L., Wittekindt, N., and Larson, T.J. (1992) Structure and regulation of the glpFK operon encoding glycerol diffusion facilitator and glycerol kinase of Escherichia coli K-12. *J Biol Chem* **267**: 6122-6131.
- Yamada, Y., and Nakada, D. (1976) Early to late switch in bacteriophage T7 development: no translational discrimination between T7 early messenger RNA and late messenger RNA. *J Mol Biol* **100**: 35-45.
- Yu, D., and Deutscher, M.P. (1995) Oligoribonuclease is distinct from the other known exoribonucleases of Escherichia coli. *J Bacteriol* **177**: 4137-4139.
- Zhan, X., Gao, J., Jain, C., Cieslewicz, M.J., Swartz, J.R., and Georgiou, G. (2004) Genetic analysis of disulfide isomerization in Escherichia coli: expression of DsbC is modulated by RNase E-dependent mRNA processing. *J Bacteriol* **186**: 654-660.
- Zhang, K., and Nicholson, A.W. (1997) Regulation of ribonuclease III processing by double-helical sequence antideterminants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 13437-13441.
- Zilhao, R., Regnier, P., and Arraiano, C.M. (1995) The role of endonucleases in the expression of ribonuclease II in Escherichia coli. *FEMS Microbiol Lett* **130**: 237-244.
- Zilhao, R., Plumbridge, J., Hajnsdorf, E., Regnier, P., and Arraiano, C.M. (1996) Escherichia coli RNase II: characterization of the promoters involved in the transcription of rnb. *Microbiology* **142 ( Pt 2)**: 367-375.
- Zillig, W., Fujiki, H., Blum, W., Janekovic, D., Schweiger, M., Rahmsdorf, H., Ponta, H., and Hirsch-Kauffmann, M. (1975) In vivo and in vitro phosphorylation of DNA-dependent RNA polymerase of Escherichia coli by bacteriophage-T7-induced protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**: 2506-2510.