



HAL
open science

Contrôle de la stabilité des ARNm bactériens et viraux

Sylvain Durand

► **To cite this version:**

Sylvain Durand. Contrôle de la stabilité des ARNm bactériens et viraux. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris Cité, 2024. <tel-04679200>

HAL Id: tel-04679200

<https://hal.science/tel-04679200v1>

Submitted on 27 Aug 2024

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.



HAL Authorization

Titre et travaux pour l'habilitation à diriger des recherches de
l'Université Paris Cité

Sylvain Durand

(chargé de recherche CNRS)

Contrôle de la stabilité des ARNm bactériens et viraux

Pr Olivier Dessurget
Institut Pasteur, Paris

Président et Rapporteur interne

Dr Isabelle Iost
Université de Bordeaux

Rapportrice externe

Dr Béatrice Clouet D'Orval
CBI, Toulouse

Rapportrice externe

Dr Pierre Mandin
LCB, Marseille

Rapporteur externe

Dr Philippe Bouloc
I2BC, Paris-Saclay

Examineur

Soutenue le 30 Janvier 2024

Université Paris Cité – CNRS UMR8261
« Expression Génétique Microbienne »

Sommaire

1. CURRICULUM VITAE	3
ETUDES ET DIPLOMES	3
ACTIVITES DE RECHERCHE	3
ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT	4
ACTIVITES D'ENCADREMENT	4
PRIX ET DISTINCTIONS	4
CONTRATS DE RECHERCHE	4
ACTIVITES ADMINISTRATIVE ET GESTION DE LA RECHERCHE	4
2. PRODUCTION SCIENTIFIQUE	5
JOURNAUX AVEC COMITE DE LECTURE	5
COMMUNICATIONS ORALES A DES CONGRES	7
COMMUNICATIONS PAR AFFICHE A DES CONGRES	8
SEMINAIRES INVITES	9
3. SITUATION AU SEIN DE L'UNITE	9
4. SYNTHESE DES TRAVAUX DE RECHERCHES	10
A. DEGRADATION DES ARNm APRES INFECTION D' <i>ESCHERICHIA COLI</i> PAR LE BACTERIOPHAGE T4	12
A1. Spécificité de l'endoribonucléase RegB	12
A2. La 5' polynucléotide kinase-3' phosphatase (PNK) du phage T4 contrôle la dégradation des ARNm précoces en modifiant le statut de leur extrémités 5'	14
B. ARN NON-CODANTS ET CONTROLE DE LA DEGRADATION DES ARNm CHEZ <i>E. COLI</i> ET <i>B. SUBTILIS</i>	16
B1. Caractérisation de l'ARN non codant FnrS	17
▪ Régulation transcriptionnelle de FnrS	17
▪ Identification des cibles de FnrS	17
▪ Rôle physiologique de FnrS	18
B2. Le rôle des endoribonucléases Y, III et J1 chez <i>B. subtilis</i>	19
▪ Rôle des RNases Y, J1 et III dans la dégradation des ARN chez <i>B. subtilis</i>	20
▪ Le rôle de la RNase III dans la dégradation des systèmes TA chez <i>B. subtilis</i>	22
▪ Les RNases Y et J1 ne sont pas essentielles à la survie de <i>B. subtilis</i>	24
B3. Caractérisation de nouveaux ARNs régulateur chez <i>B. subtilis</i>	26
▪ Caractérisation de RoxS/RsaE et de son impact sur la dégradation des ARNm chez <i>B. subtilis</i>	26
▪ Modulation par RoxS de la traduction d'ARNm cibles	29
▪ RosA, un ARN « éponge » de RoxS chez <i>B. subtilis</i>	30
C. CONCLUSIONS SUR LES TRAVAUX REALISES	31
5. ACTIVITES LES PLUS SIGNIFICATIVES COMME « PRINCIPAL INVESTIGATOR »	31
6. CAPACITE A CONCEVOIR, DIRIGER, ANIMER ET COORDONNER DES ACTIVITES DE RECHERCHE ET D'ENCADREMENT D'ETUDIANTS	31
7. PROJETS, PERSPECTIVES DE RECHERCHE	33
▪ Régulation de l'expression des RNases par les ARN antisens	37
▪ Effet des modifications post-traductionnelles sur l'activité/spécificité des RNases chez <i>B. subtilis</i>	37

1. Curriculum vitae

Sylvain Durand
Né le 11/10/1980

ETUDES ET DIPLÔMES

2007 **Doctorat** de Génétique (Université Paris Diderot)
2002-2003 **DEA** physiologie et génétique des micro-organismes (Université P&M Curie)
2000-2003 **Magistère** de génétique (Université Paris Diderot)
2000-2001 **Licence** de Biologie cellulaire et physiologie (Université Paris Diderot)
1998-2000 **DEUG** Sciences de la vie et de la Terre (Université F. Rabelais – Tours)

ACTIVITÉS DE RECHERCHE

2014-2023 Chargé de recherche (CRCN)
 Institut de **Biologie Physico-Chimique** (CNRS UMR 8261 - Paris)
 Maturation et dégradation de l'ARN chez les micro-organismes
 (Directeur: Dr Ciarán Condon)

2010-2014 Post-doctorant (Financement: NIH–CNRS career transition award)
 Institut de **Biologie Physico-Chimique** (CNRS UMR 8261 - Paris)
 Maturation et dégradation de l'ARN chez les micro-organismes
 (Directeur: Dr Ciarán Condon)

2007-2010 Post-doctorant (Financement: NIH Fellowship)
 National Institutes of Health (NIH – Bethesda)
 Section on environmental gene regulation (Directrice, Dr Gisela Storz)

2003-2007 Doctorat de génétique (Financement: Bourse MENRT)
 Institut **Jacques Monod** (CNRS UMR 7592 - Paris)
 Dégradation des ARNm chez les procaryotes (Directeur: Dr Marc Uzan)

2002 Stage de Master 2
 Institut **Jacques Monod** (CNRS UMR 7592 - Paris)
 Laboratoire trafic intracellulaire chez *Saccharomyces cerevisiae*
 (Directrice: Dr Rosine Tsapis)

2001 Stage de Master 1
 Institute of **Cell and Molecular Biology** (University d'Edinburgh)
 (Directrice: Millicent Masters)

ACTIVITÉS D'ENSEIGNEMENT

2011-2020 **Master 2** Biochimie, Cellules, Cibles Thérapeutiques (BC2T),
Univ. Paris Diderot: « Contrôle de la stabilité des ARNs »

ACTIVITÉS D'ENCADREMENT

2021-2024 Ninon Christol (étudiante en thèse)
2023 Mathias Caron (étudiant M2 – 6 mois)
2021 Sihem Belhocine (étudiante M2 – 5 mois) - Actuellement: étudiante en thèse à l'université McGill
2020 Violette Charteau (étudiante M2 – 5 mois) - Actuellement: étudiante en thèse à l'université de Radboud
2019 – 2021 Delphine Allouche (Post-doc – 2 ans) – Actuellement : Spécialiste ARN chez Sanofi
2017 – 2019 Gergana Kostova (Post-doc – 2 ans)
2012 – 2013 Laetitia Gilet (technicienne)

PRIX ET DISTINCTIONS

2013 Prix Jacques Monod - Fondation de France
2012 Youth Travel Fund from FEBS for “New Developments in RNA Biology”
2008 NIH-CNRS Research Career Transition award

CONTRATS DE RECHERCHE

2016-2020 ANR JCJC “BaRR”; *Bacillus subtilis* Regulatory RNA
Coordinateur – S. Durand
2019-2023 ANR-CE12-0025-02 “CoNoCo”; Controlling non-coding pervasive transcription to ensure fine-tuning of gene expression in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*.
Partenaire - S. Durand; Coordinateur – E. Bidnenko (INRAE, Jouy-en Josas)

ACTIVITÉS ADMINISTRATIVE ET GESTION DE LA RECHERCHE

- Responsable du site web de l'unité (UMR8261)
- Responsable communication de l'unité (UMR8261)
- Participation à 2 comités de thèse
 - ◆ **Eugenio Solchaga-Flores** sous la direction de Maude Guillier, Univ. de Paris
 - ◆ **Maxime Barrault** sous la direction de Philippe Bouloc, Univ. Paris-Saclay

2. Production Scientifique

Co-auteur de 24 publications (17 articles de recherche, 5 revues, 2 chapitres de Livres) et co-corresponding auteur de 4 publications (*).

JOURNAUX AVEC COMITÉ DE LECTURE

24. Allouche D., Kostova G., Hamon M., Marchand C., Caron M., Belhocine S., Christol N., Charteau V., Condon C.*, **Durand S.*** (2023) New RoxS sRNA targets identified in *B. subtilis* by pulsed SILAC. *Microbiology spectrum*. (IF : 9 ; Q1). *In press*
23. **Durand S.***, Callan-Sidat A., McKeown J., Li S., Kostova G., Hernandez Fernaud J.R., Tauqeer Alam M., Millard A., Allouche D., Constantinidou C., Condon C., Denham E.L.* (2021) Identification of an RNA sponge that controls the RoxS riboregulator of central metabolism in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* (IF : 16.48 ; Q1) <https://doi.org/10.1093/nar/gkab444>
22. **Durand S. ***, Guillier M.* (2021) Transcriptional and Post-transcriptional control of the nitrate respiration in Bacteria. *Frontiers in Molecular Biosciences*. (IF : 4.62 ; Q1) <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.667758>
21. Condon C., Pellegrini O., Gilet L., **Durand S.**, Braun F. (2021) Walking from *E. coli* to *B. subtilis*, one ribonuclease at a time. *Compte Rendus Biologies*. DOI: [10.5802/crbiol.70](https://doi.org/10.5802/crbiol.70)
20. Ignatov D., Vaitkevicius K., **Durand S.**, Cahoon L. A., Krajewski S., Liu X., Kallipolitis B. H., Rydén P., Freitag N. E., Condon C. and Johansson J. (2020) An mRNA-mRNA interaction couples expression of a virulence factor with its chaperone in *Listeria monocytogenes*. *Cell reports*. (IF : 8.69 ; Q1) <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.03.006>
19. Pellegrini O., Gilet L., Trinquier A., Tolcan A., Allouche D., **Durand S.**, Braun F., Condon C. (2020) Assay of *Bacillus subtilis* ribonuclease activity *in vitro*. *MiMB*. (IF : 1.17 ; Q3) DOI: [10.1007/978-1-0716-0935-4_25](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0935-4_25)
18. Gilet L., Pellegrini O. Trinquier A., Tolcan A., Allouche D., **Durand S.**, Braun F., Condon C. (2020) Assay of *Bacillus subtilis* ribonuclease activity *in vivo*. *MiMB*. (IF : 1.17 ; Q3) DOI: [10.1007/978-1-0716-0935-4_24](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0935-4_24)
17. Trinquier A., **Durand S.**, Braun F., Condon C. (2020) Regulation of RNA processing and degradation in bacteria. *BBA - Gene Regulatory Mechanisms*. (IF : 4.12 ; Q1) DOI:10.1016/j.bbagr.2020.194505 <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2020.194505>
16. **Durand S.***, Condon C. (2018) RNases and Helicases in Gram-positive bacteria. In *Regulating with RNA*, 1st Edition, ASM press (editor), *Microbiology spectrum* (IF : 4.10 ; Q1) 6(2):RWR-0003-2017. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.RWR-0003-2017>
15. Braun F., **Durand S.**, Condon C. (2017) Initiating ribosomes and a 5'/3'-UTR interaction control ribonuclease action to tightly couple *B. subtilis hbs* mRNA stability with translation. *Nucleic Acids Res.* 34 (IF : 12.17 ; Q1) DOI:10.1093/nar/gkx793
14. **Durand S.***, Braun F., Helfer AC., Romby P., Condon C.* (2017) sRNA-mediated activation of gene expression by inhibition of 5'-3'exonucleolytic mRNA degradation. *eLife* (IF : 7.29 ; Q1) 6:e23602 DOI: [10.7554/eLife.23602](https://doi.org/10.7554/eLife.23602)

13. **Durand S.**, Tomasini A., Braun F., Condon C, Romby P. (2015) sRNA and mRNA biogenesis and turnover in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* (IF : 14.07 ; Q1) 39 (3): 316-330 DOI: [10.1093/femsre/fuv007](https://doi.org/10.1093/femsre/fuv007)
12. **Durand S.**, Braun F., Lioliou E., Romilly C., Helfer AC., Kuhn L., Quittot N., Nicolas P., Romby P., Condon C. (2015) A Nitric Oxide Regulated Small RNA Controls Expression of Genes Involved in Redox Homeostasis in *B. subtilis*. *PLoS Genetics* (IF : 7.16 ; Q1) 11(2):e1004957 DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004957>
11. Liu B., Deikus G., Anna Bree A., Durand S., Kearns D., Bechhofer D. (2014) Global analysis of mRNA decay intermediates in *B. subtilis* wild-type and polynucleotide phosphorylase-deletion strains. *Molecular Microbiology* (IF : 4.64 ; Q1) 94(1), 41-55 DOI: <https://doi.org/10.1111/mmi.12748>
10. Figaro S., **Durand S.**, Gilet L., Cayet N., Sachse M., and Condon C (2013). Knockouts of the genes encoding ribonucleases RNase Y and J1 are viable in *B. subtilis*, with major defects in cell morphology, sporulation and competence. *J. Bacteriol.* (IF : 2.98 ; Q1) 195(10):2340-8. <https://doi.org/10.1128/JB.00164-13>
9. **Durand S.**, Jahn N., Condon C. & Brantl S (2012) Type I-toxin-antitoxin system in *B. subtilis*. Review. *RNA biology*. (IF : 4.11 ; Q1) (9):12, 1-7. <https://doi.org/10.4161/rna.22358>
8. **Durand S.**, Gilet L., and Condon C (2012) The essential function of *B. subtilis* RNase III is to silence foreign toxin genes. *PLoS Genetics*. (IF : 8.51 ; Q1) 8(12): e1003181. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003181>
7. **Durand S.**, Richard G., Bontems F. and Uzan M. (2012) Bacteriophage T4 polynucleotide kinase triggers degradation of mRNAs. *PNAS*. (IF : 9.737 ; Q1) 109(18), 7073-7078. <https://doi.org/10.1073/pnas.1119802109>
6. **Durand S.**, Gilet L., Bessières P., Nicolas P. and Condon C (2012) Three essential ribonucleases RNase Y, J1 and III control the abundance of a majority of *B. subtilis* mRNAs. *PLoS Genetics*. (IF : 8.51 ; Q1) (8)3 - e1002520. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002520>.
5. Marchais A., Duperrier S., **Durand S.**, Gautheret D. & Stragier P. (2011) CsfG, a sporulation-specific, small non-coding RNA highly conserved in endospore formers. *RNA Biology* (IF : 4.11 ; Q1) 8, 358 -364. <https://doi.org/10.4161/rna.8.3.14998>
4. **Durand S.**, Storz G. (2010) Reprogramming of anaerobic metabolism by the FnrS small *Molecular Microbiology* (IF : 5.12 ; Q1) 75, 1215–1231. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07044.x>
3. Odaert B., Saida F., Aliprandi P., **Durand S.**, Crechet JB., Guerois R., Laalami S., Uzan M., Bontems F. (2007) Structural and functional studies of RegB, a new member of a family of sequence-specific ribonucleases involved in mRNA inactivation on the ribosome. *J Biol Chem*. (IF : 5.9 ; Q1) 282, 2019-28. <https://doi.org/10.1074/jbc.m608271200>
2. **Durand S.**, Richard G., Bisaglia M., Laalami S., Bontems F. & Uzan M. (2006) Activation of RegB endoribonuclease by S1 ribosomal protein requires an 11 nt conserved sequence. *Nucleic Acids Res*. (IF : 7.5 ; Q1) 34, 6549-60. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl911>
1. Merlin C., Gardiner G., **Durand S.**, Masters M. (2002) The *Escherichia coli metD* locus encodes an ABC transporter which includes Abc (MetN), YaeE (MetI), and YaeC (MetQ). *J. Bacteriol.* (IF : 4.03 ; Q1) 184, 5513-5517. <https://doi.org/10.1128/JB.184.19.5513-5517.2002>

COMMUNICATIONS ORALES À DES CONGRÈS

- **Novembre 2022:** 1^{ère} Conférence µnet. Christol N., Allouche D., Kostova G., Hamon M., Marchand C., Condon C, Caron M., Charteau V., Belhociné S., **Durand S.** Post-transcriptional control and Post-translational modification (PTMs) of RNase activity in *B. subtilis*
- **Octobre 2020:** Regulating with RNA in bacteria (ONLINE). Allouche D., Kostova G., Hamon M., Marchand C., Condon C, **Durand S.** Fifty Shades of translational regulation.
- **Avril 2020** (Annulé), Bacell (Kobe – Japan). Allouche D., Kostova G., Hamon M., Marchand C., Condon C, **Durand S.** Identification of sRNA targets in *B. subtilis* by pulsed-SILAC.
- **Juin 2018:** Bacell (Bath – UK). **Durand S.**, Braun F., Helfer AC., Romby P., Condon C. sRNA-mediated activation of gene expression by inhibition of 5'-3' exonucleolytic mRNA degradation.
- **Juillet 2016:** FASEB Summer Research Conference, Post-transcriptional control of gene expression: mRNA decay (Lisboa - Portugal). **Durand S.**, Braun F., Helfer AC., Romby P., Condon C. RoxS Small RNA stabilizes *yflS* mRNA by blocking RNase J1 5'-3' activity in *Bacillus subtilis*.
- **Avril 2016:** AMBER International Symposium Central Carbon Metabolism and its Effect on Bacterial Processes (Paris - France). **Durand S.**, Braun F., Helfer AC., Romby P., Condon C. RoxS, A Nitric Oxide controlled Small RNA Is Also Regulated By Malate In *Bacillus subtilis*.
- **Juin 2015:** 8th International Conference on Gram-positive Microorganisms (Montecatini Terme, Tuscany - Italy). **Durand S.**, Braun F., Lioliou E., Romilly C., Helfer AC., Kuhn L., Quittot N., Nicolas P., Romby P., Condon C. A Nitric Oxide Regulated Small RNA Controls Expression of Genes Involved in Redox Homeostasis in *B. subtilis*.
- **Juin 2012:** FASEB Summer Research Conference : Post-transcriptional control of gene expression (Steamboat - USA). **Durand S.**, Gilet L. and Condon C. RNase III is essential for the silencing of foreign toxin genes in *B. subtilis* June 2012
- **Octobre 2010:** Ecole de microbiologie (Hyères - France). **Durand S.**, Storz G. A new small RNA reprograms gene expression during anaerobic respiration.
- **Août 2006:** Cold Spring harbor laboratory meeting : Molecular genetics of Bacteria & Phages (Cold Spring Harbor - USA). **Durand S.**, Richard G., Uzan. M. mRNA degradation : series of endonucleolytic cleavages in 5'-3' polarity regulated by the status of the RNA 5' extremity.
- **Juillet 2006:** 6th SifrARN (Rennes - France). **Durand S.**, Richard G., Uzan. M. mRNA degradation: Dégradation des ARN chez le phage T4: une cascade de coupures endonucléolytiques de 5' en 3' régulée par le statut de l'extrémité 5' de l'ARN.

COMMUNICATIONS PAR AFFICHE À DES CONGRÈS

- **Octobre 2022:** 12th SifrARN (Bordeaux – France). Allouche D., Kostova G., Hamon M., Marchand C., Condon C, Caron M., Charteau V., Belhociné S., Durand S. Identification of sRNA targets in *B. subtilis* by pulsed-SILAC.
- **Juin 2022:** 21st International conference on *Bacilli* and Gram-positive bacteria (Prague – République Tchèque). Allouche D., Kostova G., Hamon M., Marchand C., Condon C, Caron M., Charteau V., Belhociné S., Durand S. Identification of sRNA targets in *B. subtilis* by pulsed-SILAC.
- **Janvier 2022:** 6th Regulating with RNA in Bacteria and Archaea Meeting (Online). Allouche D., Kostova G., Hamon M., Marchand C., Condon C, Caron M., Charteau V., Belhociné S., Durand S. Identification of sRNA targets in *B. subtilis* by pulsed-SILAC.
- **Juillet 2019:** Bacell (Washington – USA). Allouche D., Kostova G., Hamon M., Marchand C., Condon C, **Durand S.** Identification of sRNA targets in *B. subtilis* by pulsed-SILAC.
- **Novembre 2018:** 11th SifrARN (Nancy – France). **Durand S.**, Braun F., Helfer A-C., Callan-Sidat A., Mckeown J., Kostova G., Hernandez-Fernaud J., Millard A., Constantinidou C, Denham E., Romby P. and Condon C. RoxS sRNA directly controls RNA degradation in *Bacillus subtilis*.
- **Mars 2018:** 5th meeting of Regulating with RNA in Bacteria & Archaea (Sevilla – Spain). Kostova G., Condon C, **Durand S.** Transcriptional regulation of the citric acid cycle mRNAs by the RoxS sRNA in *Bacillus subtilis*.
- **Juin 2017:** 19th International conference on Bacilli & Gram-Positive bacteria (Berlin - Germany). June 2017. **Durand S.**, Braun F., Helfer AC., Romby P., Condon C. RoxS Small RNA stabilizes *yflS* mRNA by blocking RNase J1 5'-3' activity in *Bacillus subtilis*.
- **Mars 2016:** 10th SifrARN (Toulouse - France). **Durand S.**, Braun F., Helfer AC., Romby P., Condon C. RoxS, A Nitric Oxide controlled Small RNA Is Also Regulated By Malate In *Bacillus subtilis*.
- **Juillet 2014:** FASEB Summer Research Conference : Post-transcriptional control of gene expression (Big Sky - USA). **Durand S.**, Braun F., Lioliou E., Romilly C., Helfer AC., Kuhn L., Quittot N., Nicolas P., Romby P., Condon C. RoxS, an sRNA involved in the Gram-positive response to oxidative stress.
- **Novembre 2013:** 9th sifrARN (Bischofsheim – France). **Durand S.**, Lioliou E., Braun F., Romilly C., Nicolas P., Romby P. and Condon C. RsaE, a regulatory RNA involved in Gram-positive response to low O₂ levels.
- **Septembre 2012:** FEBS international workshop on « New developments in RNA biology » (Tavira - Portugal). **Durand S.**, Gilet L., Condon C. RNase III is essential for the silencing of foreign toxin genes in *B. subtilis*.
- **Juin 2012:** FASEB Summer Research Conference : Post-transcriptional control of gene expression (Steamboat - USA). **Durand S.**, Gilet L., Condon C. RNase III is essential for the silencing of foreign toxin genes in *B. subtilis*.

- **Mars 2011:** ASM conference on Regulating with RNA in bacteria (Puerto Rico - USA). **Durand S.**, Gilet L., Condon C. Identification of new regulatory RNAs in *B. subtilis* mutants lacking essential ribonucleases
- **Novembre 2010:** 8th sifrARN (Dourdan - France). **Durand S.** Storz G. A new small RNA reprograms gene expression during anaerobic respiration.
- **Avril 2009:** Conférences Jacques-Monod : RNA at the center of gene regulation (Roscoff - France). **Durand S.** Storz G. A new small RNA reprograms gene expression during anaerobic respiration.
- **Octobre 2004:** 5th SifrARN (Arcachon - France). **Durand S.**, Richard G., Bisaglia M., Laalami S., Bontems F. and Uzan M. L'activation de l'endoribonucléase RegB par la protéine ribosomique S1 nécessite une séquence conservée de 11 nucléotides.

SÉMINAIRES INVITES

- **Novembre 2022:** IM2B - Conférence μ net – Marseille. Allouche D., Kostova G., Christol N., Caron M., Belhocine S., Charteau V., Hamon M., Marchand C., Condon C., **Durand S.** Post-transcriptional control and Post-translational modifications (PTMs) of RNase activity in *B. subtilis*.
- **Décembre 2021:** I2BC – Université de Paris Saclay – Orsay. **Durand S.**, Callan-Sidat A., McKeown J., Li S., Kostova G., Hernandez-Fernaund J.R, Tauqeer Alam M., Millard A., Allouche D., Constantinidou C., Condon C. and Denham E.L. Identification of an RNA sponge that controls the levels, processing and efficacy of the RoxS riboregulator in *Bacillus subtilis*.
- **Octobre 2021:** CBI – Toulouse. **Durand S.**, Callan-Sidat A., McKeown J., Li S., Kostova G., Hernandez-Fernaund J.R, Tauqeer Alam M., Millard A., Allouche D., Constantinidou C., Condon C. and Denham E.L. Identification of an RNA sponge that controls the levels, processing and efficacy of the RoxS riboregulator in *Bacillus subtilis*
- **Juillet 2019:** NIH Bethesda – USA. Allouche D., Kostova G., Hamon M., Marchand C., Condon C, **Durand S.** Modulation of central metabolism of *B. subtilis* in response to carbon sources by two interacting non-coding RNAs.
- **Janvier 2014 :** LCB – AMU – Marseille. **Durand S.**, Braun F., Helfer AC., Romby P., Condon C. Caractérisation de l'ARN régulateur RsaE.

3. Situation au sein de l'unité

Après un 1^{er} post-doctorat dans le laboratoire du Dr Gisela Storz au NIH, Bethesda (USA), j'ai rejoint l'équipe du Dr Ciarán Condon en 2010 pour un second post-doctorat dans le but d'étudier la régulation de l'activité des RNases et notamment l'impact des ARNs régulateurs sur la dégradation des ARNm chez la bactérie *Bacillus subtilis*. J'ai obtenu le poste de Chargé de recherche en 2014 pour développer cette thématique au sein du groupe de Ciarán Condon.

4. Synthèse des travaux de recherches

La dégradation des ARNm est un processus clé du contrôle de l'expression génétique, permettant aux bactéries de s'adapter rapidement à des changements environnementaux. Elle est le résultat de l'action combinée d'enzymes de dégradation (endo- et exoribonucléases). Ces ribonucléases majeures sont maintenant relativement bien identifiées chez les bactéries. Curieusement, bien que ces enzymes jouent un rôle clé dans la reprogrammation de l'expression génétique, les principales ribonucléases impliquées dans la maturation et la dégradation des ARNs sont différentes entre bactéries à Gram négatif et positif. En effet, seulement dix ribonucléases sont communes entre les 2 bactéries pour une vingtaine identifiées dans chacun de ces organismes. De plus, certains des gènes codants des ribonucléases peuvent être indispensables chez l'une, et non essentielles voire complètement absentes chez l'autre (Fig. 1)

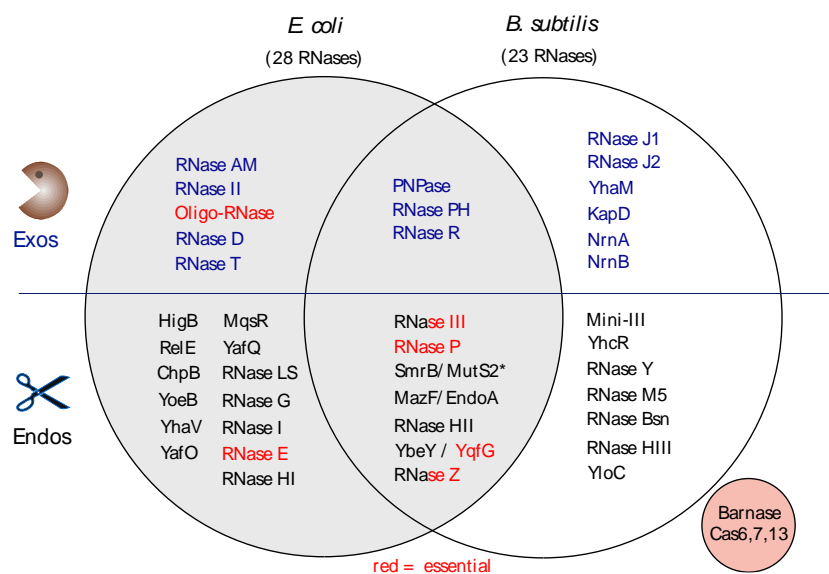


Figure 1: Comparaison des RNases présentes chez *E. coli* et *B. subtilis*

Les principales enzymes de dégradation des ARNs ont peu de spécificité de séquence. Par exemple, l'endoribonucléase majeure de la dégradation des ARNs chez *Escherichia coli* (la RNase E) et celle de *Bacillus subtilis* (la RNase Y), clivent dans des régions simple brins riches en nucléotides A et U, avec une préférence pour 2 U en aval du site de clivage pour la RNase E, et un G immédiatement en amont du site de clivage pour la RNase Y¹⁻⁵.

Afin de limiter la dégradation anarchique des ARNs, différents mécanismes permettent de moduler la spécificité de ces RNases :

1. Au niveau des ARNm,

- les structures secondaires des ARN
- le statut de l'extrémité 5' de l'ARN (5' mono- ou tri-phosphate, 5'-hydroxyl...)
- les protéines de liaison aux ARN
- le flux de ribosome en cours de traduction
- les ARN régulateurs

peuvent influencer positivement ou négativement sur l'accessibilité des RNases aux ARN.

2. Au niveau des RNases,

- le contrôle de l'expression de ces RNases,
- les modifications post-traductionnelles
- les co-facteurs protéiques

peuvent également modifier l'activité et/ou la spécificité de ces enzymes.

L'ensemble de mes travaux de recherches depuis ma thèse se sont intéressés à ces différents modes de régulation de l'activité des RNases chez les bactéries.

A. Dégradation des ARNm après infection d'*Escherichia coli* par le bactériophage T4

Période : 2003-2007

Laboratoire : Institut Jacques Monod (Paris)

Contrat : Allocation de recherche du ministère de la recherche et de l'enseignement supérieur

Publications : Durand *et al.*, **Nucleic Ac. Res.** (2006), Odaert *et al.*, **J. Biol. Chem** (2007), Durand *et al.*, **PNAS** (2012)

J'ai réalisé ma thèse dans l'équipe « métabolisme des ARNm chez les procaryotes », dirigée par le Dr Marc Uzan, à l'Institut Jacques Monod à Paris. Le laboratoire étudiait la dégradation des ARNm après infection d'*E. coli* par le bactériophage T4. Je me suis notamment intéressé au rôle joué par 2 activités enzymatiques codées par le virus, l'endoribonucléase RegB et la 5' polynucléotide kinase-3' phosphatase (PNK), dans la dégradation des ARNm synthétisés précocement par le phage T4.

A1. Spécificité de l'endoribonucléase RegB

Après infection d'*E. coli*, le programme de développement du bactériophage T4 se déroule en 3 phases (précoce, moyenne et tardive) correspondant à l'expression des différentes classes de gènes. Les gènes précoces et moyens codent pour des enzymes facilitant le développement du phage dans la cellule hôte comme une nucléase attaquant l'ADN de l'hôte ou des enzymes nécessaires à la réplication du phage. Les gènes de la phase tardive codent pour des protéines de structure nécessaires à l'assemblage de la particule virale ainsi qu'un lysozyme pour la lyse bactérienne. L'expression séquentielle des différents gènes est donc soumise à un contrôle rigoureux.

Parmi les gènes exprimés en phase précoce, l'endoribonucléase RegB joue un rôle clé dans le contrôle de l'expression des gènes du bactériophage. En effet, elle déstabilise environ 3 fois l'ensemble des ARNm précoces par clivage de ces ARN dans les séquences de fixation du ribosome (RBS) ou séquence Shine-Dalgarno (SD) ⁶. Par conséquent, une coupure par RegB inactive la traduction des ARNm cibles. Cette inactivation permet de libérer la machinerie de traduction pour favoriser l'expression des ARNm moyens et tardifs ^{6,7}.

Lors de cette étude, l'une des questions majeures était de comprendre la forte spécificité de cette enzyme. En effet, si l'endoribonucléase RegB clive les séquences SD des ARNm précoces du phage T4, elle ne reconnaît pas les séquences SD des ARNm moyens et tardifs bien que les séquences de fixation des ribosomes (RBS) de ces ARNm soient identiques. Mes travaux de thèse ce sont principalement concentrés sur la compréhension de la spécificité de cette ribonucléase.

Des travaux antérieurs avaient démontrés que RegB a besoin d'un co-facteur synthétisé par la cellule hôte, la protéine ribosomique S1, pour une activité optimale. En effet, cette protéine ribosomique peu stimuler jusqu'à 100 fois l'activité de RegB *in vitro* ⁸. Ce résultat suggérait que S1 pourrait être le déterminant de la spécificité de l'enzyme. J'ai

effectivement démontrer que l'endoribonucléase RegB clive de manière spécifique, mais très inefficacement, le trinuéclotide GGA, et que la stimulation de la coupure par S1 est d'autant plus importante que les 8 nucléotides en aval s'approchent du consensus GAAUAAAA (Fig. 2). Cette spécificité unique de RegB+S1 pour 11 nucléotides permet de cibler presque exclusivement les ARNm précoces du bactériophage T4 qui contiennent cette séquence par ailleurs absente des ARNm moyens et tardifs codés par le phage.

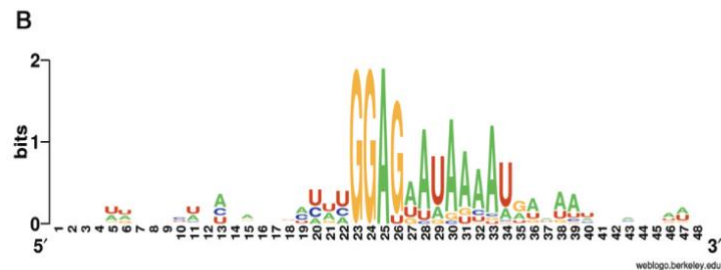


Figure 2: Logo des séquences clivées par RegB

RegB ne présentant aucune homologie de séquence avec des protéines connues, nous avons déterminé la structure de cette protéine par spectroscopie RMN en collaboration avec le groupe de François Bontems de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN - Gif sur Yvette). Cette analyse nous a indiqué que RegB présente des homologies structurales avec YoeB et RelE, deux endoribonucléases qui sont impliquées dans l'inactivation fonctionnelle de certains messagers dans des conditions de stress nutritionnel, et dont l'activité dépend du ribosome (Fig. 3). Ces deux RNases font partie des systèmes toxine/antitoxine de type II, ce qui signifie que leur surproduction est toxique et que cette toxicité peut être contrecarrée par la surproduction de la protéine codée immédiatement en amont dans le même opéron (l'antitoxine). Cependant, aucune antitoxine à RegB n'a été identifiée à ce jour chez le bactériophage T4.

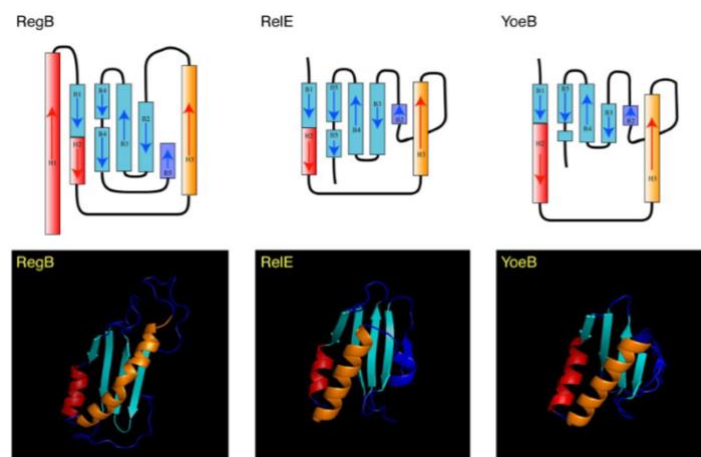


Figure 3: Comparaison des topologies (A) et structures (B) des protéines RegB, RelE et YoeB

A2. La 5' polynucléotide kinase-3' phosphatase (PNK) du phage T4 contrôle la dégradation des ARNm précoces en modifiant le statut de leur extrémités 5'

Le second axe de ma thèse a été de comprendre comment l'endoribonucléase RegB facilitait la dégradation des ARNm précoce du phage après clivage de la séquence SD. De précédents résultats obtenus dans le laboratoire montrait qu'au moins 7 transcrits précoces du phage T4 étaient clivés 6 à 15 nucléotides en aval du site de coupure de l'endoribonucléase RegB dans des séquences riches en A+U. Ces coupures apparaissent environ 5 minutes après une première coupure par RegB et sont absentes après infection par une souche virale mutante pour cette enzyme (Δ regB). Ce résultat suggérait que les coupures par RegB ouvraient la voie à une dégradation par d'autres endoribonucléases.

J'ai pu déterminer que 2 endoribonucléases de l'hôte, la RNase G, et dans une moindre mesure la RNase E étaient responsables de ces coupures secondaires. Cette observation est différente de ce qui a été observé chez *E. coli* où c'est la RNase E qui assure majoritairement l'initiation de la dégradation des ARNm. De plus, une mesure de l'efficacité d'étalement du phage T4 sur une souche d'*E. coli* mutante de la RNase G était diminuée de 30% par rapport à la souche sauvage, indiquant un rôle de la RNase G dans le développement du phage.

Cependant, ce résultat paraissait paradoxal dans la mesure où la RNase E et la RNase G ont une préférence pour des substrats comportant une extrémité 5'-monophosphate^{9,10} alors que RegB libère, après coupure, une extrémité 5'-OH, peu appréciée par les RNases E et G d'*E. coli*^{9,10}. Ce résultat suggérait que l'extrémité 5'-OH libérée par l'endoribonucléase RegB nécessitait une conversion en extrémité 5' mono-phosphate par une kinase. J'ai ainsi pu démontrer que la 5' polynucléotide kinase-3' phosphatase (PNK), codée par le phage T4 lui-même, phosphorylait les ARNm clivés par RegB. En effet, un mutant de délétion du gène *pseT*, codant la PNK, abolit les coupures secondaires des RNases E et G. De plus, l'utilisation d'un mutant ponctuel de la PNK affectant uniquement son activité phosphatase a permis de montrer que les coupures secondaires se produisent normalement dans ce mutant et qu'elles ne dépendent donc que de l'activité kinase de l'enzyme. De plus, de nombreux clivages par la RNase E, survenant dans le corps du messager sur une distance de 200 nucléotides à partir du site de coupure par RegB, disparaissent ou sont très affaiblis dans l'infection par le mutant de délétion de la PNK. Ainsi, la conversion par l'activité kinase de la PNK des extrémités 5'-OH produites par RegB en extrémités 5'-monophosphate ouvre l'accès à la RNase G dans la région 5' de l'ARNm, puis à la RNase E plus en aval (Fig. 4). Rappelons que les endonucléases G et E produisent elles-mêmes des extrémités 5'-monophosphate, permettant des clivages successifs une fois le premier clivage effectué. Par ailleurs, la cinétique d'expression de la PNK a été étudiée et suggère que le délai de 5 min observé pour l'avènement des coupures secondaires reflète le temps d'accumulation de la PNK dans les cellules après infection.

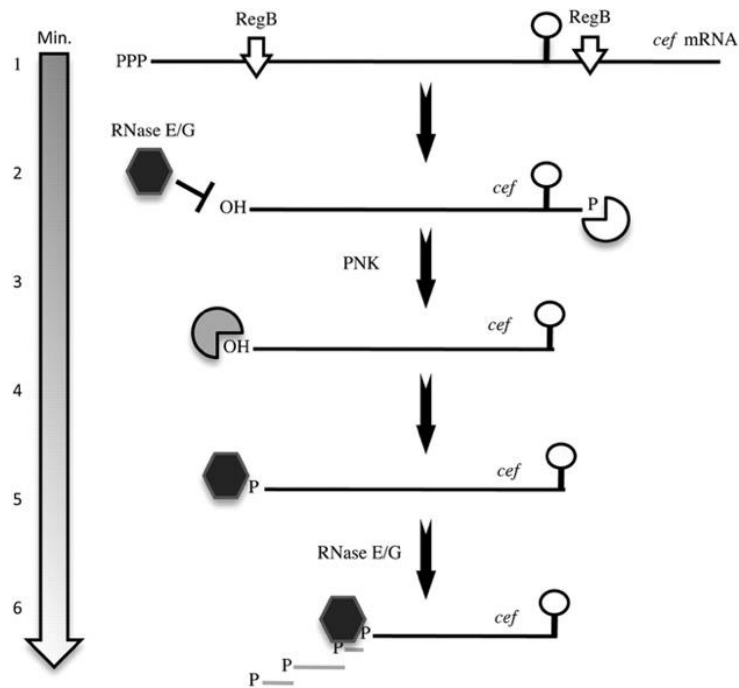


Figure 4: Représentation schématique de la voie de dégradation de l'ARNm *cef* durant les 6 premières minutes d'infection. La flèche verticale représente le temps (en min) après infection par le phage T4.

D'autres études ont ensuite suggéré que certains virus d'eucaryotes, notamment celui de l'herpès, initient la dégradation des ARNm avec une stratégie similaire à celle du bactériophage T4. En effet, ces virus eucaryotes codent dans leur propres génomes des endoribonucléases qui clivent les régions de démarrage de la traduction comme le fait l'endoribonucléase RegB¹¹.

B. ARN non-codants et contrôle de la dégradation des ARNm chez *E. coli* et *B. subtilis*

Les ARN régulateurs sont également un élément clé du contrôle post-transcriptionnel de l'expression des gènes chez les bactéries et sont souvent exprimés en conditions de stress. Ces ARN peuvent être codés en *cis* (asRNA) ou en *trans* (sRNA) des ARN cibles. Les asRNA ont donc une complémentarité parfaite avec leur cible contrairement aux sRNA pour lesquels la complémentarité est beaucoup plus limitée. D'ailleurs, chez *E. coli*, l'appariement des sRNA avec les ARNm cibles nécessitent l'aide de la protéine Hfq. Cette protéine est un homologue des protéines Sm des eucaryotes impliquées dans des complexes d'épissage et de dégradation.

Les conséquences des appariements sRNA-ARNm sont multiples. Ils peuvent influencer la traduction et/ou la stabilité des ARNm (Fig. 5). Dans la plupart des cas, les sRNA s'apparient au niveau des régions SD des ARNm cibles, rentrant ainsi directement en compétition avec le ribosome et bloquant leur traduction (Fig. 5a). Cependant, cet appariement peut également stimuler l'expression de l'ARNm cible, par exemple en libérant la région de fixation du ribosome d'une structure secondaire, stimulant ainsi sa traduction (Fig. 5b). La modification de l'efficacité de traduction influence généralement indirectement la stabilité de l'ARNm. En effet, le nombre de ribosomes en cours de traduction modifie ainsi l'accessibilité des différentes RNases cellulaires à des sites de coupures sur l'ARNm cible. Plus récemment, il a été démontré que l'appariement d'un sRNA pouvait directement recruter une RNase (la RNase E) afin de dégrader l'ARNm cible ou au contraire occuper un site normalement reconnu par une RNase pour bloquer son action (Fig. 5c et 5d) ¹²⁻¹⁴.

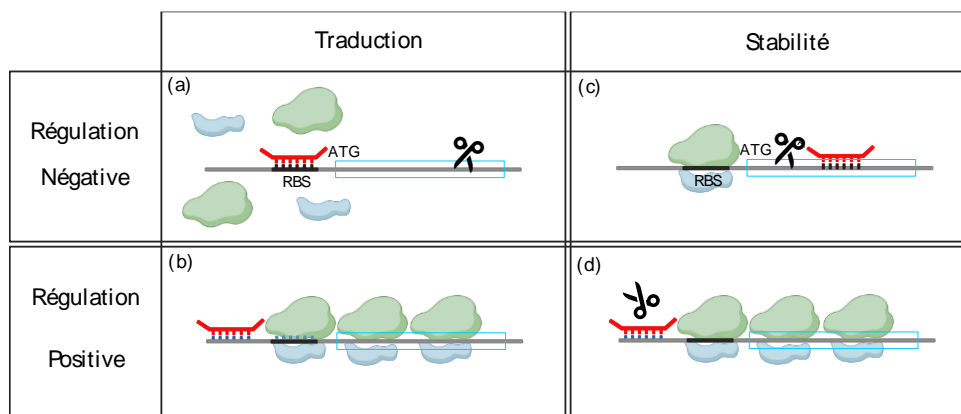


Figure 5: Schéma des différentes voies de régulation de l'expression des gènes par un sRNA. L'effet primaire du sRNA (traduction ou stabilité de l'ARNm) est indiqué en haut. Le résultat de la régulation sur l'expression du gène (positif ou négatif) est indiqué à gauche.

C'est l'étude de ce lien entre ARN non-codant et dégradation des ARNm qui m'a amené à rejoindre pour mon 1^{er} post-doctorat le laboratoire du Dr Gisela Storz, au NIH à Bethesda (USA), un laboratoire pionnier dans la caractérisation des ARN non-codants chez *E. coli*.

B1. Caractérisation de l'ARN non codant FnrS

Période : 2007-2010

Laboratoire : National Institutes of Health (Bethesda, MD)

Contrat : Bourse Post-doctorale CNRS

Publications : Durand S & Storz G, *Mol Microbiol* (2010)

▪ Régulation transcriptionnelle de FnrS

Différentes analyses transcriptomiques suggéraient la présence d'un ARN non-codant dans la région intergénique *zntB-dbpA*, codant respectivement un transporteur du zinc et une hélicase à ARN ATP-dépendante. Cependant, les difficultés de détection de cet ARN, nommé par la suite FnrS, laissait supposer que son expression était induite dans des conditions de stress bien spécifique. La cartographie de son extrémité 5' a permis d'identifier par alignement de séquence dans sa région promotrice une séquence très conservée dans différentes bactéries à Gram-négatif. Cette région possède toutes les caractéristiques d'un site de fixation pour les facteurs de transcription FNR et/ou CRP mais également pour ArcA.

Les protéines FNR (fumarate and nitrate reductase) et ArcAB (aerobic respiration control) sont les principaux facteurs de transcription d' *E. coli* responsables de la reprogrammation de l'expression des gènes lors du passage en conditions anaérobiques. FNR réagit directement à la concentration en oxygène présent dans la cellule via son groupement Fe-S permettant sa dimérisation. ArcA est une protéine du cytosol appartenant au système à 2 composantes ArcAB où ArcB est la protéine transmembranaire à senseur histidine kinase. Ce système mesure l'oxygène *via* l'état d'oxydo-réduction des quinones. Enfin, CRP (cAMP receptor protein) appartient à la même famille de facteurs de transcription que FNR et régule de nombreux gènes impliqués dans le catabolisme des acides aminés et des sucres lorsque la concentration en glucose est faible et donc le niveau de AMP cyclique (AMPc) élevé.

Mes résultats ont clairement montré que la transcription de ce petit ARN est induite en conditions limitantes d'oxygène et a ainsi été nommé FnrS (FNR regulated sRNA). Les souches délétées pour FNR, ArcA et CRP m'ont permis de démontrer que FNR, mais également dans une moindre mesure ArcA, sont responsables de la transcription de FnrS en anaérobie. De plus, un mutant CRP présente un niveau de FnrS légèrement plus important en comparaison avec la souche sauvage ce qui suggère que CRP pourrait entrer en compétition avec FNR pour le même site de fixation.

▪ Identification des cibles de FnrS

Dans l'idée de mieux comprendre le rôle joué par FnrS, nous avons cherché à identifier les cibles de cet ARN régulateur. En effet, FnrS co-immunoprécipite avec la protéine Hfq suggérant qu'il régulait très probablement par appariement des ARNm codés en trans, comme observé avec d'autres sRNA fixant Hfq. J'ai pu montrer que la surexpression de FnrS conduit à la répression de 32 gènes. Différents ARNm ciblés par

FnrS codent des enzymes métaboliques telles que *gpmA* (codant la phosphoglycerate phosphomutase) et *maeA* (codant une malate dehydrogenase) impliqués dans le métabolisme central, comme *folE* (codant une GTP cyclohydrolase I) et *folX* (codant une dihydroneopterin triphosphate 2'-epimerase) requis pour le métabolisme du folate. Le niveau d'ARNm *sodB* (codant une superoxide dismutase) est également affecté par la surexpression de FnrS. Ces cinq cibles furent confirmées par une analyse par Northern blot. Deux régions différentes de FnrS étaient prédites par le programme targetRNA pour être impliquées dans les appariements avec les ARNm cibles ; l'extrémité 5' et une région simple brin juste après la première structure en tige-boucle (Fig. 6).

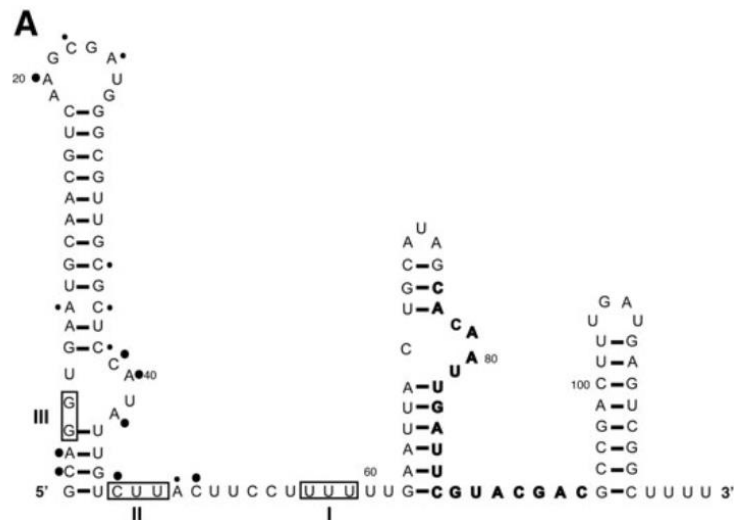


Figure 6: Structure de FnrS prédite par Mfold et confirmée par un sondage de la structure secondaire in vivo au DMS. Les points indiquent les adénosines et les cytidines qui réagissent au DMS. Les boîtes I, II et III indiquent les régions utilisées les appariements avec les ARNm cibles.

Mes expériences de mutagenèse dirigée sur FnrS et sur les 5 cibles (*maeA*, *gpmA*, *folE*, *folX* et *sodB*) ont confirmé que FnrS peut utiliser 2 régions différentes pour réguler l'expression de nombreuses enzymes métaboliques; l'extrémité 5' de FnrS (boîte III) est utilisée pour réprimer *sodB*, *folE* et *folX*, et la région centrale simple brin (boîtes I et II) pour réguler l'expression de 2 gènes du métabolisme central, *maeA* et *gpmA*. Avant ce travail, tous les autres sRNA caractérisés chez les bactéries à Gram-négatif n'utilisaient qu'une région d'interaction, qui était en général la région la plus conservée du sRNA. FnrS représentait alors le premier exemple de ce type de régulation chez les bactéries à Gram-négatif. Depuis, de nombreux autres exemples ont été décrits chez toutes les bactéries ^{15,16}.

▪ Rôle physiologique de FnrS

La comparaison d'une souche délétée pour l'ARN FnrS (*ΔfnrS*) avec une souche sauvage, a montré que la répression de *sodB* en anaérobie dépend partiellement de FnrS. A l'opposé, le niveau d'ARNm *gpmA* est constant en aérobie et en anaérobie dans les cellules sauvages mais augmente en anaérobie dans une souche *ΔfnrS*. Il semblerait dans ce cas que le rôle de FnrS soit de maintenir constant le niveau d'ARNm *gpmA* entre aérobie et anaérobie. Ces résultats permettent de conclure que l'expression chromosomique de FnrS est suffisante pour réguler ces ARNm dans des conditions limitantes d'oxygène.

Comme beaucoup de bactéries commensales ou pathogènes, *E. coli* se développe dans le tractus gastro-intestinal où la concentration en oxygène est limitée. La cellule répond à la carence en oxygène en modulant les voies du métabolisme central. Jusqu'à maintenant, FNR, et dans une moindre mesure ArcA, étaient considérés comme les régulateurs centraux de ces adaptations. Ce travail a démontré que l'action de ces 2 facteurs de transcriptions étaient complétée par celle de l'ARN régulateur FnrS au niveau post-transcriptionnel. Ces résultats ont permis de comprendre comment de nombreux gènes étaient réprimés par le facteur de transcription FNR sans qu'aucun site de fixation direct pour la protéine n'ait été identifié. Ce niveau de régulation supplémentaire permet à la cellule d'ajuster rapidement son expression génétique lors de son passage en anaérobie.

Après ce 1^{er} post-doctorat, j'ai pu rejoindre pour un 2nd post-doctorat le laboratoire de Ciarán Condon qui a joué un rôle majeur dans la caractérisation des voies de dégradation et maturation des ARN chez la bactérie modèle à Gram-positif, *Bacillus subtilis*. J'ai rejoint ce laboratoire dans le but de mieux comprendre les mécanismes de régulation par les ARNs non-codant chez les bactéries à Gram-positif, encore peu étudié en 2010, et comment ces ARN régulateurs modulaient l'activité de la machinerie de dégradation des ARN. Pour réaliser ces études, mes premiers travaux dans le laboratoire ont d'abord consistés à mieux caractériser la machinerie de dégradation de *B. subtilis*, assez différente de celle d'*E. coli*, et à identifier les cibles de ces RNases majeures. Je me suis ensuite intéressé à la modulation de l'activité de ces RNases par les ARNs régulateurs.

B2. Le rôle des endoribonucléases Y, III et J1 chez *B. subtilis*

Période : Depuis 2010

Laboratoire : Laboratoire RNA MAD, CNRS – UMR8261 (IBPC)

Contrat : Bourse Post-doctorale (NIH-CNRS carrer transition) puis Chercheur contractuel ANR (AsSUPYCO)

Publications : Durand S *et al.*, *PLoS Genet* (2012), Durand S *et al.*, *PLoS Genet* (2012), Durand S *et al.* *RNA Biol* (2012), Figaro S*, Durand S*, *et al.*, *J. bact.* (2013), Liu B *et al.* *Mol. Mic.* (2014)

Chez *E. coli*, les machineries de dégradation sont aujourd'hui bien définies et les contrôles post-transcriptionnels par les petits ARN régulateurs sont abondamment étudiés. Les connaissances dans ce domaine chez les bactéries à Gram-positifs comme *B. subtilis* étaient bien moins avancées lors de mon arrivée dans le laboratoire. Pourtant, les différences d'enzymes et de voies de dégradation des ARN entre *E. coli* et *B. subtilis* justifient de s'y intéresser (cf. p10).

Deux voies de dégradation des ARN ont été caractérisées chez *B. subtilis* (revue dans ¹⁷) (Fig. 7). La première voie, endoribonucléolytique, est initiée par un clivage de l'ARNm par une endonucléase (Fig. 7A) suivie d'une dégradation des fragments libérés amonts et avals par les exoribonucléases 3'-5' (PNPase, RNase R, YhaM, RNase PH) et 5'-3' (RNases J1 et J2), respectivement. Cette voie est sur le principe similaire à celle employée par *E. coli*, mais avec un set d'enzymes différent. L'endoribonucléase membranaire RNase Y était

considérée comme l'une des meilleures candidates pour réaliser cette première coupure endoribonucléolytique^{18,19}. Si la RNase III peut en théorie également déclencher la dégradation des ARNm, sa spécificité pour l'ARN double brin limite très probablement son nombre de substrats.

La présence d'exoribonucléase 5'-3' chez *B. subtilis* permet à la bactérie d'utiliser une seconde voie de dégradation dans laquelle la RNase J1 attaque le transcrite primaire une fois que l'extrémité 5' triphosphate a été transformé en extrémité 5' monophosphate par la pyrophosphohydrolase de *B. subtilis* (BsRppH) (Fig. 7B)²⁰.

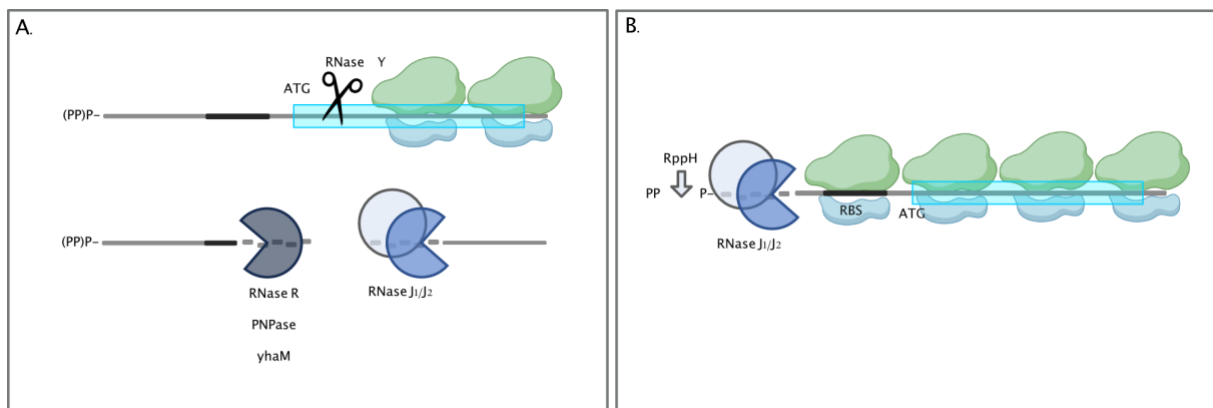


Figure 7: Voies de dégradation des ARN chez *B. subtilis*. Voie endoribonucléolytique (A.) et exoribonucléolytique (B.)

En théorie, une 3^{ème} voie de dégradation directement par l'extrémité 3' du messager est possible mais cette voie est souvent considérée comme mineure. En effet, les ARNm de *B. subtilis*, comme ceux d'*E. coli*, sont souvent protégés par des structures en tige-boucle utilisées pour la terminaison de la transcription. Cependant, *B. subtilis* est connue pour avoir une activité de polyadénylation²¹ qui, chez *E. coli*, permet de déstabiliser les structures en tige-boucle et ainsi faciliter l'attaque par les exonucléases 3'-5'. L'identité de cette enzyme de polyadénylation reste cependant inconnue chez *B. subtilis*²².

- Rôle des RNases Y, J1 et III dans la dégradation des ARN chez *B. subtilis*

Dans le but d'identifier les cibles des endoribonucléases Y et III, et de l'exoribonucléase J1, et de déterminer leur importance globale chez *B. subtilis*, j'ai réalisé lors de mon arrivée dans le laboratoire une analyse transcriptomique dans des souches déplétées pour ces 3 RNases. Cette analyse a permis de montrer le rôle majeur des RNases Y et J1 dans le profil d'expression génétique de *Bacillus subtilis* (Fig.8). En effet, 26 % des gènes de *B. subtilis* sont affectés, dans les conditions de l'étude (phase exponentielle de croissance en milieu riche), par la déplétion de la RNase Y. Une étude réalisée par le laboratoire de Jorge Stulke à la même époque confirmait également l'importance de la RNase Y chez *B. subtilis*²³. De manière similaire, nous avons montré que le niveau de 30 % des gènes était affecté par la déplétion de la RNase J1 (Fig. 8). Ce résultat contrastait

avec une précédente analyse montrant que seulement 79 gènes (<2%) étaient affectés dans ce mutant ²⁴. Cependant, cet effet limité dans cette étude s'expliquait par une déplétion incomplète de la RNase J1 par rapport à celle réalisée dans notre étude. Globalement, ce travail a démontré que les RNases Y et J1 sont impliquées dans la dégradation de plus de 50% des ARN de *B. subtilis* et joue donc un rôle majeur dans la dégradation des ARN chez cette bactérie.

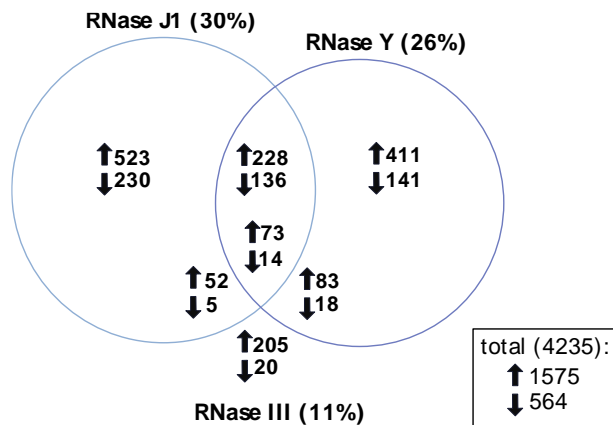


Figure 8: Effets des déplétions des RNases J1, Y et III sur le niveau des ARNm de *B. subtilis*. Le diagramme de Venn représente le nombre d'ARNm (ORF) altérés dans chacune des souches. Les flèches orientées vers le haut indiquent le nombre d'ARNm dont le niveau augmente; les flèches orientées vers le bas indiquent le nombre d'ARNm dont le niveau diminue. Les aires des cercles sont proportionnelles aux nombres d'ARNm dont le niveau est altéré. Le nombre total d'ARNm affectés dans l'expérience est indiqué dans le rectangle en bas à droite du diagramme.

Cette analyse globale nous a aussi permis de quantifier le rôle de la RNase III chez *B. subtilis*. Sa déplétion affecte l'expression d'environ 11 % du génome (Fig. 8). Ce chiffre est comparable au 12 % de gènes qui sont affectés par une délétion de la RNase III chez *E. coli* ²⁵.

Dans le but de valider les résultats du « tiling array » et de déterminer si les effets observés étaient bien post-transcriptionnels (et non transcriptionnels), nous avons procédé à une série de mesures de demi-vie par Northern blot pour une trentaine d'ARNm dont le niveau variait entre une souche sauvage et une souche déplétée. La majorité des Northern blot ont confirmés que les effets des déplétions de la RNase Y et de la RNase J1 observés par « tiling array » étaient bien post-transcriptionnels. En revanche, les ARNm testés par Northern-blot, dont le niveau augmentait fortement par « tiling array » après une déplétion de la RNase III, était essentiellement affectés au niveau transcriptionnel, et non post-transcriptionnel. Nous avons constaté que la plupart des cibles affectées appartenaient au régulon sigma W. Cet effet peut s'expliquer par l'effet post-transcriptionnel joué par la RNase III sur l'ARNm codant le facteur sigma W. Néanmoins, un effet transcriptionnel important est également visible sur l'ARNm de *sigW* dans cette souche. Ce résultat suggère que d'autres facteurs de transcription en amont de Sigma W sont aussi affectés par la déplétion de la RNase III.

- Le rôle de la RNase III dans la dégradation des systèmes TA chez *B. subtilis*

Notre analyse transcriptomique globale a montré que la RNase III affecte environ 11% des ARNm de *B. subtilis*, un résultat similaire à ce qui a été mesuré chez *E. coli*. Cependant, la RNase III est essentielle chez *B. subtilis* alors qu'elle ne l'est pas chez de nombreuses autres bactéries comme *E. coli* ou *Staphylococcus aureus*. Dans le but de résoudre ce paradoxe, nous nous sommes intéressés aux ARNm fortement stabilisés après déplétion de la RNase III identifiés dans notre étude transcriptomique ²⁶. De façon intéressante, plusieurs systèmes toxines-antitoxines (TA) de type I sont stabilisés après déplétion de la RNase III. Ce résultat a été confirmé par mesure de la stabilité de 3 de ces systèmes par Northern blot (Fig. 9).

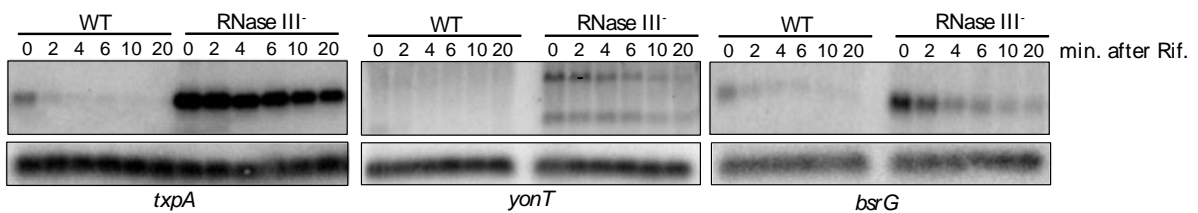
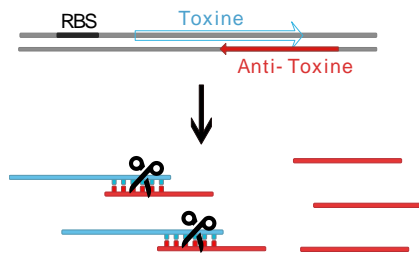


Figure 9: Stabilisation des ARN codant pour 3 toxines (*tpxA*, *yonT* et *bsrG*) dans des souches de *B. subtilis* déplétées pour la RNase III. Les ARN ont été extrait d'une souche WT et d'une souche déplétée pour la RNase III (*rnc*⁻). Les ARNs ont été extrait avant (0') et après ajout de rifampicinin (2' à 20').

Les systèmes TA de type I se caractérisent par l'inhibition de l'expression d'un petit peptide toxique hydrophobe (<60 aa) par un ARN antisens qui s'apparie avec l'ARNm codant la toxine. Ces systèmes sont donc en théorie de très bon substrat pour la RNase III qui clive spécifiquement les ARN double brin (Fig. 10A). La stabilisation d'ARNm codant des petits peptides toxiques dans une souche déplétée pour la RNase III pourrait donc expliquer pourquoi cette dernière ne peut-être déléetée chez *B. subtilis*.

A.



B.

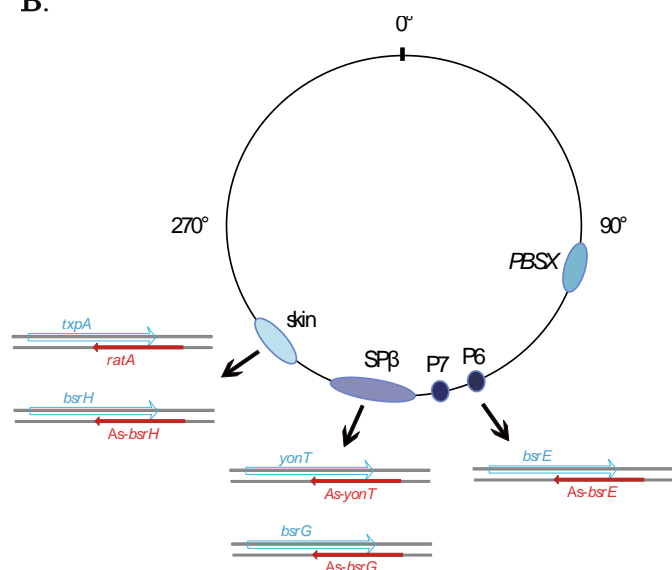


Figure 10: (A.) Représentation schématique d'un système toxine-antitoxine (TA) de type I. Le gène de la toxine est en bleu. L'ARN antisens (anti-toxine) est en rouge. Le ciseau représente la RNase III. (B.) - Localisation des prophages et des systèmes toxines-antitoxines sur le chromosome de *B. subtilis*.

Les toxines de type I de *B. subtilis* étant presque toutes localisées dans les prophages Skin et SP β (Fig. 10B)²⁷, nous avons tenté de remplacer le gène *rnc* (codant la RNase III) par une cassette de résistance à la spectinomycine, dans des souches où les principaux prophages (*skin*, SP β et PBSX) ont été excisés du chromosome. Nos résultats ont montré qu'il était possible de déléter le gène *rnc* dans la souche $\Delta skin \Delta SP\beta$ alors que cela est impossible dans une souche sauvage. Ces résultats suggéraient bien que les systèmes toxines-antitoxines de type I codés par ces 2 prophages étaient responsable de l'essentialité de la RNase III chez *B. subtilis*. Dans le but d'identifier ces toxines, nous avons ensuite essayé de déléter le gène *rnc* dans différentes souches mutées pour 1 ou 2 toxines localisées dans ces 2 prophages (*skin* et SP β). Nous avons ainsi pu montrer que la RNase III n'était plus essentielle dans un double mutant $\Delta txpA \Delta yonT$ (Fig.11). Ces 2 gènes codent respectivement des toxines de type I dans les prophages *skin* et SP β .

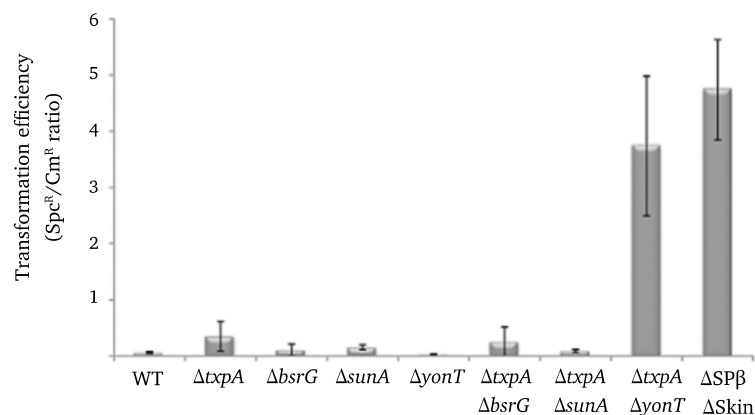


Figure 11: Efficacité de transformation des différentes souches délétées pour différents systèmes toxines-antitoxines ou pour les prophages *skin* et SP β

De plus, la délétion de la RNase III dans les souches délétées pour ces 2 systèmes TA n'affecte aucunement la croissance de *B. subtilis* en milieu riche à 37°C.

Lors de cette étude, nous avons aussi analysé les mécanismes de dégradation des ARN TxpA et RatA et montré que l'appariement des 2 extrémités 3' de ces ARN est indispensable pour induire la dégradation des deux ARN par la RNase III. Ce mode de régulation est différent de celui décrit pour le système *par* du plasmide pAD1 où l'ARN antisens inhibe en premier lieu la traduction de la toxine au lieu de provoquer sa dégradation. Paradoxalement, l'ARN antisens (RatA) est fortement stabilisé dans un mutant de la RNase Y alors que le duplex *txpA*:RatA est dégradé par la RNase III. De plus, l'ARN RatA est 15 fois plus abondant que l'ARNm *txpA*. Ces résultats nous ont permis de proposer que la majorité de l'ARN RatA est sous sa forme libre et dégradé par la RNase Y.

- Les RNases Y et J1 ne sont pas essentielles à la survie de *B. subtilis*

L'identification des gènes essentiels pour la vie d'une bactérie représente un répertoire de cibles potentielles pour de nouveaux antibiotiques contre ces bactéries. Plus spécifiquement, les RNases sont considérées comme des cibles intéressantes pour le développement de nouvelles molécules²⁸. Plusieurs études ont suggéré que les gènes *rnjA* (codant la RNase J1) et *rny* (codant la RNase Y) étaient essentiels à *B. subtilis*^{18,29,30}. Suite à notre étude globale de l'impact des déplétions des RNases J1 et Y sur le transcriptome de *B. subtilis*, nous avons pu observer que 92% des gènes du prophage SP β étaient stabilisés après déplétion de la RNase Y. Afin de déterminer si les RNases J1 et Y (codé par les gènes *rnjA* et *rny* respectivement) étaient également essentielle à *B. subtilis* pour réduire l'expression de protéines toxiques codées dans certains prophages intégrés à son génome, comme nous l'avons constaté pour la RNase III (cf p21), nous avons tenté de déléter les gènes *rnjA* et *rny* dans des souches dépourvues des différents prophages. Non seulement la délétion de ces 2 gènes est totalement possible dans les souches délétées pour les prophages skin, SP β ou PBSX, mais également de manière plus surprenante, dans notre souche sauvage « contrôle ». Ces résultats ont ainsi contredit les précédentes études définissant ces 2 gènes comme essentiels. Contrairement aux précédents essais de délétions fait à partir de plasmide ou produits PCR, nous avons réalisé nos transformations avec des ADN chromosomique délétées pour l'une ou l'autre RNase et complémentée avec une copie ectopique de la RNase correspondante sous contrôle d'un promoteur inductible. La raison de ces différents résultats entre les différentes sources d'ADN (plasmide/fragment PCR vs chromosome) n'est pas claire. L'obtention de souches délétées pour la RNase Y ou la RNase J1 nous a permis de les caractériser phénotypiquement. Nous avons ainsi montré que l'absence de l'une ou l'autre de ces RNases provoque d'importants défauts de croissance et des défauts dans les programmes de développement tels que la compétence et la sporulation. Ces phénotypes peuvent facilement s'expliquer par des problèmes de paroi (Fig. 12) mais également par la modification de la stabilité de gènes liés à la sporulation et à la compétence chez *B. subtilis*. En effet, nos précédents résultats de transcriptomique, où nous avons déplétées les RNases Y ou J1, montrent des modifications du niveau d'ARN de nombreux gènes clés liés à la compétence et à la sporulation de *B. subtilis*, comme par exemple *spo0A*, un régulateur clé du phosphorelais pour l'initiation de la sporulation.

Nous avons également testé la résistance de ces souches à différents antibiotiques car une précédente étude a montré qu'une souche de *B. subtilis* délétée pour la PNPase (une exoribonucléase 3'-5') est plus sensible à la tetracycline³¹. Nos souches Δrny et $\Delta rnjA$ ont une sensibilité accrue aux inhibiteurs de la traduction (comme la tetracycline, la streptomycine, l'erythromycine et le chloramphenicol), aux inhibiteurs de la transcription (rifampicine), aux inhibiteurs de la réplication (triméthoprim), et aux inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi (ampicilline et vancomycine). Cette augmentation de sensibilité à un large spectre d'antibiotique suggère une plus grande perméabilité des mutants $\Delta rnjA$ et Δrny . L'analyse par microscopie en lumière polarisée et microscopie électronique de ces différentes souches montre que les Δrny sont $\sim 40\%$ plus petites que les cellules WT (Fig. 12). Les cellules $\Delta rnjA$ ont quant à elles d'importants défauts de division et une forme

spiralée. Les souches $\Delta rnjA$ et Δrny montrent aussi clairement un peptidoglycane désorganisé.

Nos résultats obtenus précédemment par “tiling array” dans des souches déplétées pour ces RNases peuvent expliquer ces défauts car l’expression de nombreux gènes nécessaires à la biosynthèse de la paroi sont altérés.

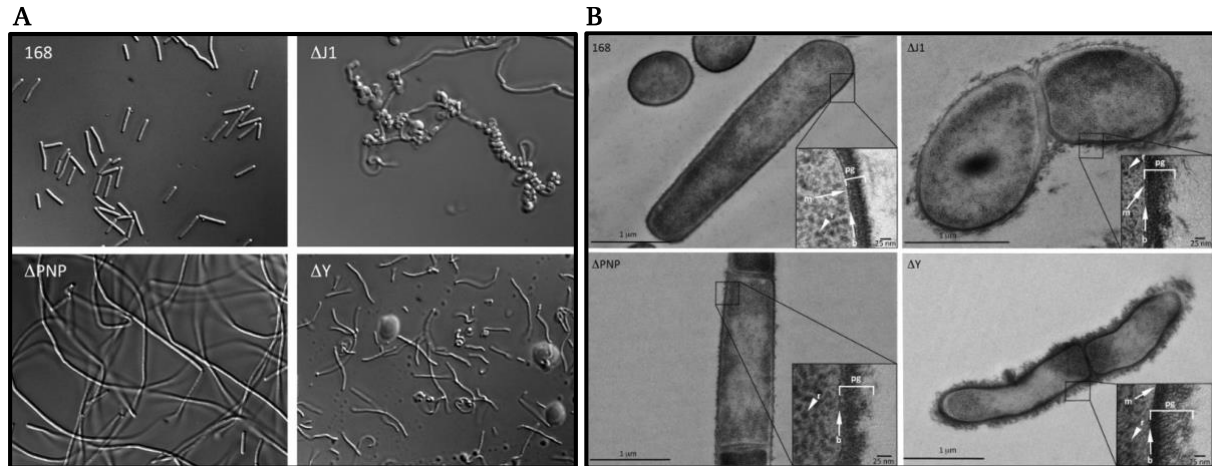


Figure 12: Microscopie en lumière polarisée (A.) et électronique (B.) des souches WT, ΔPNP , $\Delta J1$ et ΔY . Les mutants de la RNase Y et J1 ont une morphologie (A.) et une paroi altérée (B.). pg: peptidoglycane, b: base du peptidoglycane, m: membrane, r: ribosomes

Pour mieux comprendre les connections entre les différentes voies de dégradation de *B. subtilis*, nous avons essayé de combiner les mutations Δrny et $\Delta rnjA$ avec d’autres délétions de gènes appartenant à la machinerie de dégradation de *B. subtilis* comme le gène *rppH* (une pyrophosphohydrolase qui convertit les ARNm tri-phosphorylés en ARNm monophosphorylés), ou *rnjB* (le paralogue de la RNase J1 mais avec une activité 5’-3’ exoribonucléolytique peu efficace). Les doubles mutants $\Delta rppH \Delta rny$ ou $\Delta rnjA$ sont viables. Cependant, si les temps de génération sont similaires entre une souche $\Delta rnjA$ et une souche $\Delta rnjA \Delta rppH$, la combinaison des mutations $\Delta rny \Delta rppH$ augmente le temps de doublement de la souche par comparaison avec la souche Δrny (68 vs 56 min). Ces résultats suggèrent que RppH et la RNase Y font partie de 2 voies de dégradation distinctes des ARNm et que la dégradation des ARNm par l’extrémité 5’ grâce à la RNase J1 requiert une déphosphorylation préalable de l’ARNm par RppH. L’obtention d’un double mutant $\Delta rnjA \Delta rnjB$ montre que la survie de la souche déléetée pour la RNase J1 n’est pas dû à une activité résiduelle de son paralogue, la RNase J2.

B3. Caractérisation de nouveaux ARNs régulateur chez *B. subtilis*

Période : Depuis 2012

Laboratoire : Laboratoire RNAmad, CNRS – UMR8261 (IBPC)

Contrat de recherche: Chercheur contractuel ANR (AsSUPYCO), ANR JCJC BaRR

Publications : Durand S *et al.* ***PLoS Genetics*** (2015), Durand S *et al.* ***eLife*** (2017), Durand S *et al.* ***NAR*** (2020), Allouche D *et al.* ***Microb. spectrum*** (2023).

L'un de mes objectifs à mon arrivé dans le laboratoire RNA MAD était de mieux comprendre les interactions entre machineries de dégradation des ARN et ARN régulateurs.

De précédentes analyses transcriptomiques montraient que *B. subtilis*, comme *E. coli*, codait une centaine d'ARN régulateurs. Cependant, la caractérisation de ces ARNs régulateurs et leur relation avec la machinerie de dégradation était peu explorée chez les bactéries à Gram-positifs. Avec l'analyse faites par « tiling array » dans les différents mutants RNases, il m'a été possible de confirmer plusieurs ARN régulateurs mais également d'en identifier de nouveaux chez *B. subtilis*. En effet, l'un des objectifs de cette analyse transcriptomique était de stabiliser les ARN non-codants pour faciliter leur visualisation, et ce, même en phase exponentielle de croissance en milieu riche. Nous avons effectivement retrouvé la plupart des ARN régulateurs déjà identifiés dans le même temps par une autre étude transcriptomique faites par « tiling array » et criblant une centaine de conditions de croissance³². De plus, notre étude a permis d'identifier une vingtaine de potentiels nouveaux ARN non-codants agissant en *trans* non-répertoriés et une centaine de nouveaux ARN antisens (asARN). Les résultats obtenus nous ont également apporté des informations importantes sur les RNases impliquées dans la dégradation de ces ARN régulateurs. Ces résultats valident la méthode de recherche d'ARN non-codants dans des souches mutantes pour les principale RNases de la bactérie d'intérêt.

- Caractérisation de RoxS/RsaE et de son impact sur la dégradation des ARNm chez *B. subtilis*

Parmi les ARN non codant identifié par « tiling array », nous avons confirmé l'existence d'un ARN non-codant (sRNA) dans la région intergénique *pepF-yjbH* (Fig. 13). Cet ARN de fonction inconnue était intrigant car c'est le seul sRNA conservé entre *B. subtilis* et la bactérie pathogène *Staphylococcus aureus*. En effet, cet ARN (nommé par la suite RoxS) avait déjà été identifié par le groupe de Pascale Romby et nommé RsaE chez *S. aureus*. Nous avons donc initié une collaboration afin de mieux comprendre le rôle de cet ARN non-codant et ses mécanismes d'actions.

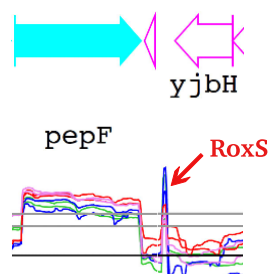


Figure 13: Région intergénique *pepF-yjbH*. Vert: WT, bleu: mutant RNase J1, rose: mutant RNase III, rouge, mutant RNase Y

Mes travaux ont permis d'identifier les conditions d'expression de cet ARN non-codant. En effet, l'alignement des séquences promotrices des gènes *roxS/rsaE* de différentes souches de *S. aureus* et de *B. subtilis* m'a permis d'identifier une région conservée autour de la position -60 par rapport au site de démarrage de la transcription. Une analyse bioinformatique réalisée à l'aide du site web DBTBS (<https://dbtbs.hgc.jp>) a montré une forte similitude avec le site de fixation du facteur de transcription ResD de *B. subtilis*. ResD fait partie du système à deux composants ResDE où ResE est la protéine membranaire qui phosphoryle le facteur de transcription ResD. Ce système est très important pour la régulation des processus de respiration aérobie et anaérobie, et la réponse au stress par le monoxyde d'azote (NO)³³. Ce système ResDE est également présent chez *S. aureus* (nommé SrrAB). SrrAB protège également *S. aureus* du stress au NO³⁴. Nous avons pu confirmer que le système à 2 composants ResDE chez *B. subtilis* et SrrAB chez *S. aureus* régulait l'expression de RsaE. Bien que ces 2 bactéries occupent des niches écologiques très différentes, elles sont toutes les deux soumises à l'hypoxie et au monoxyde d'azote pouvant justifier que l'expression de cet ARN réponde à des signaux similaires. En effet, dans le sol, son habitat naturel, *B. subtilis* peut se retrouver en condition d'oxygène limitante après de fortes pluies et soumis au monoxyde d'azote produit par certaines plantes ou bactéries capable de dénitrification. De son côté, *S. aureus* passe en condition d'anaérobie lors de l'invasion de l'hôte et est soumis au NO produit par les macrophages comme défenses antimicrobienne. Bien que des expériences de micro-array, de séquençage à haut débit et de protéomique après surexpression ou délétion de RsaE avaient été réalisées chez *S. aureus*^{35,36}, la fonction de cet ARN était inconnue. Ces études montraient qu'un grand nombre de gènes du métabolisme central était affecté par des modifications d'expression de ce sRNA. Certaines de ces cibles étaient à l'interface entre métabolisme de l'azote et du carbone au niveau du cycle de Krebs.

Dans le but de mieux comprendre le rôle de RoxS chez *B. subtilis*, nous avons réalisé une analyse transcriptomique par « tiling array » ainsi qu'une analyse protéomique par spectrométrie de masse quantitative en collaboration avec la plateforme protéomique de l'IBMC de Strasbourg. Ces analyses ont été faites par comparaison d'une souche WT avec une souche Δ *roxS*. Comme pour *S. aureus*, de nombreux gènes du métabolisme central sont affectés après délétion de *roxS* chez *B. subtilis*. De plus, nous avons également identifié d'autres catégories fonctionnelles de gènes affectées par la surproduction de RoxS, notamment une dizaine de gènes liés à l'oxydo-réduction ou au transport d'électrons. Les régulateurs Fur et CymR sont également réprimés par RoxS. Fur et CymR sont des répresseurs de la transcription qui contrôlent la réponse de la bactérie respectivement à une carence en fer et aux variations de concentration en cystéine. Ces deux régulateurs sont également connus pour être intrinsèquement liés au variation d'oxygène et NO dans l'environnement de *B. subtilis*³⁷⁻³⁹. Au total, environ 30% des gènes régulés était liés au processus d'oxydo-réduction de la cellule. L'analyse protéomique a donné des résultats similaires. En effet, parmi les 63 protéines dont le niveau augmentait dans la souche mutée, environ 30% de ces protéines était impliquée dans des processus d'oxydo-réduction de la cellule. Ces résultats nous ont amené à nommer cet ARN chez *B. subtilis*, RoxS, pour « related to oxidative stress ». Il est très peu probable que tous ces gènes affectés

soient des cibles directes de RoxS. Cependant, nous avons pu confirmer l'interaction directe entre RoxS et les ARNm *sucCD*, codant pour la succinate déshydrogénase, et *ppnKB*, codant pour une kinase de polyphosphate. La régulation de ces 2 cibles se faisait après interaction entre RoxS et la séquence RBS de ces deux ARNm. Dans ces deux cas, l'interaction implique les régions riches en C (CRR2 et 3) de RoxS (Fig. 14). L'appariement de RoxS non-seulement bloque la traduction de l'ARNm *ppnKB*, mais nous avons également montré qu'elle entraîne un clivage par la RNase III spécifique de l'ARN double brin stimulant ainsi sa dégradation.

Bien que les nouvelles cibles identifiées étaient parfaitement cohérentes avec les observations faites chez *S. aureus*, elles ne permettaient toujours pas de comprendre précisément le rôle de ce sRNA dans les processus d'oxido-réduction de *B. subtilis*. Une analyse complémentaire par bio-informatique pour prédire des cibles de RoxS capables d'interagir avec les régions riches en C nous a ensuite permis d'identifier le gène *yflS*, codant pour un transporteur du malate, comme une cible potentielle (Fig. 14). Ce gène a attiré notre attention par le fait que l'appariement prédit avec RoxS était à l'extrémité 5' de l'ARNm au niveau du +1 transcriptionnel et bien en amont du site de fixation du ribosome. Ce positionnement suggérait un mode de régulation de la cible différent du blocage classique du site de fixation du ribosome par l'ARN régulateur. Nos expériences de dégradation *in vitro* ont permis de démontrer pour la première fois que l'appariement d'un ARN régulateur (RoxS) à l'extrémité 5' d'un ARNm (*yflS*) pouvait bloquer l'accès à l'exoribonucléase 5'-3' J1, une exoribonucléase majeure de la dégradation des ARNm chez *B. subtilis* (Fig. 14B).

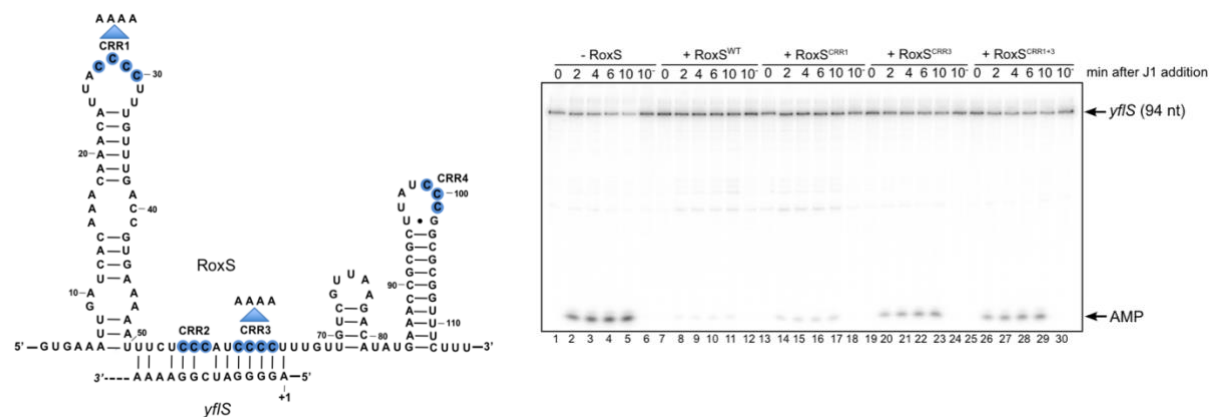


Figure 14: (A.) Interaction prédite entre l'ARNm *yflS* et l'ARN régulateur RoxS. (B.) Incubation de la région 5' UTR de l'ARN *yflS* marqué en 5' avec la RNase J1 en absence ou en présence de RoxS ou d'une version mutée de RoxS dans les régions riches en C (CRR1, 2 ou 3). La réaction a été stoppé avant (0') ou après ajout de la RNase J1 (à 2', 4', 6' et 10'). L'ARN a aussi été incubé 10' en absence de la RNase J1 comme témoin négatif (10-).

La régulation d'un transporteur du malate nous a conduit à tester l'influence des sources de carbone sur l'expression de RoxS. Nous avons ainsi observé que l'ajout de glucose ou de malate induisait l'expression de RoxS. Cependant, cette induction était indépendante du système à 2 composants ResDE. Une nouvelle inspection de la séquence de RoxS a révélé un site de fixation pour un autre facteur de transcription de *B. subtilis*, Rex, qui réagit à des modifications du ratio NAD/NADH dans la cellule (revue dans ⁴⁰). Nous avons montré que Rex est responsable de l'induction de RoxS en présence de malate.

Cette induction par le malate s'explique par le fait que 3 des 4 malates déshydrogénases de *B. subtilis* utilise le NAD comme co-facteur, ce qui modifie le ratio NAD/NADH dans la cellule. L'augmentation du NADH inhibe le répresseur de transcription Rex, induisant ainsi l'expression de RoxS. Ces résultats suggèrent que l'induction de RoxS, en réprimant l'expression des enzymes du métabolisme centrale, participait au contrôle du ratio NAD/NADH dans la cellule. En effet, la plupart des enzymes régulée par RoxS utilisent également le NAD comme co-facteur.

- Modulation par RoxS de la traduction d'ARNm cibles

Chez *E. coli*, dans de rare cas, le blocage de la traduction d'un ARNm par un ARN régulateur ne conduit pas systématiquement à sa dégradation ⁴¹. Par conséquent, si la régulation de la dégradation des ARNm par les ARN non-codants est un axe majeur de mes recherches, la question de la régulation de la traduction sans modification profonde de la stabilité d'un ARNm cible se pose également. Nous avons donc cherché à identifier de potentielles cibles directes de l'ARNm RoxS principalement régulées au niveau traductionnel. Les analyses protéomiques classiques telle que décrite précédemment comme la comparaison d'une souche WT avec une souche délétée pour l'ARN régulateur d'intérêt n'est pas optimale pour l'identification de ses cibles directes. En effet, la délétion d'un ARN régulateur provoque souvent une modification de l'expression génétique en « cascade » de la cellule en réponse au manque du régulateur. Ces modifications masquent souvent les cibles directes de l'ARN non-codants. L'une des méthodes pour palier à ce problème qui est souvent utilisée est la brève induction de l'ARN régulateur pour limiter ces effets indirects. Cependant, la stabilité intrinsèque des protéines, qui est en général plus longue que le temps d'induction du sARN, limite la détection des effets négatifs. Dans le but d'identifier des cibles directes de RoxS régulées traductionnellement et de ne pas être impacté par la stabilité des protéines, nous avons développé la méthode du pulsed-SILAC chez *B. subtilis*. Cette technique a été précédemment utilisée chez les eucaryotes pour identifier les cibles de micro-ARN (miRNA)⁴². La méthode consiste à marquer les protéines nouvellement synthétisées avec des isotopes après surexpression de l'ARN régulateur. Afin de limiter les effets indirects, nous avons réalisé un marquage des protéines sur 15 min après surproduction du sRNA. Brièvement, les souches auxotrophe pour la lysine ont été cultivées dans un milieu avec une concentration limitante de lysine qui permet d'arrêter la croissance des bactéries lorsqu'elle atteint le milieu de phase exponentielle de croissance (environ O.D.₆₀₀ = 0,6). A ce point critique de la croissance, l'ARN RoxS placé sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'arabinose a été induit (Fig. 15). Dans le même temps, des isotopes de la lysine ont été ajoutés afin de réaliser le marquage des protéines. Après 15 min, les cellules ont été prélevées pour une analyse protéomique et transcriptomique.

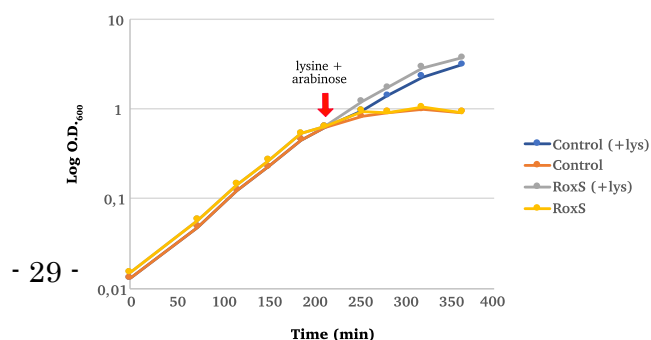


Figure 15: Courbe de croissance des souches « WT » et $\Delta roxS$ dans un milieu contrôlé avec une concentration limitante de lysine. A D.O.₆₀₀=0,6, des isotopes de la lysine et de l'arabinose sont ajoutés.

Cette étude nous a permis de confirmer la majorité des cibles de RoxS identifiées précédemment, telle que *sucCD*, *ppnKB*, ou encore *ykhA* (une acyl-coenzyme A thioesterase) ou *acsA* (une acetyl-CoA synthétase)^{43,44}, mais également de montrer que la majorité des gènes codant les enzymes du cycle de Krebs sont des cibles de RoxS. Ces résultats confirment le rôle prépondérant de RoxS dans l'expression des gènes du métabolisme central et son implication dans le contrôle du ratio NAD/NADH de la cellule. Cette analyse montre également la répression par RoxS d'une déshydrogénase NAD dépendante (*ycaA*) et l'activation d'une malate déshydrogénase (*ytsJ*). Dans le premier cas, RoxS se fixe sur la région RBS de l'ARNm *ycaA* bloquant sa traduction. Dans le cas de *ytsJ*, nous avons pu montrer que l'ARN régulateur RoxS se fixait dans la longue région 5' UTR de l'ARNm (1,3 kb) et limitait la progression de la RNase J1 après une coupure faite par l'endoribonucléase Y juste en amont du site de fixation de RoxS. Dans les 2 cas (*ycaA* et *ytsJ*), l'effet traductionnel de RoxS s'accompagne d'un effet sur la stabilité de l'ARNm cible.

D'autres cibles ont été identifiées uniquement par le SILAC comme l'ARNm *lutA-B-C* et *gcvT-PA-PB*. Ces deux ARNm sont également la cible d'un autre ARN régulateur connu chez *B. subtilis*, FsrA, induit lors de carence en Fer.

Globalement, cette étude a montré que les effets de l'ARN régulateur RoxS implique souvent un effet sur la dégradation des ARNs, même si un effet essentiellement traductionnel peut exister dans certains cas, permettant probablement un recyclage de l'ARNm pour de nouveaux cycles de traduction. Un système similaire de stockage d'ARNm dont la traduction est réprimée a été proposé chez les eucaryotes⁴⁵.

- RosA, un ARN « éponge » de RoxS chez *B. subtilis*

En collaboration avec le laboratoire d'Emma Denham, qui a réalisé un interactome global des ARN chez *B. subtilis*, nous avons été en mesure d'identifier un nouvel ARN régulateur lié à RoxS, nommé RosA (Regulator of sRNA A). En effet, cet ARN est le premier ARN « éponge » identifié dans une bactérie à Gram-positif qui permet de bloquer l'action de l'ARN régulateur lorsqu'il est exprimé. Nous avons montré que l'appariement de RosA à RoxS provoque la dégradation de RoxS et l'empêche d'aller s'apparier avec ses cibles. En effet, la stabilité de l'appariement entre ces 2 ARN étant bien supérieure à celle prédites entre RoxS et ses autres ARNm cibles grâce aux nombreuses régions d'interactions de RoxS avec RosA permet à RosA de rentrer en compétition avec les ARNm cibles de RoxS. Nous avons aussi démontré que l'ARN RosA était induit en présence des sources de carbones moins favorable que le glucose ou le malate, telle que l'arabinose qui a probablement un effet beaucoup plus limitée sur le ratio NAD/NADH de la cellule. De plus, en parfait accord avec l'impact des sources de carbone sur l'expression de RoxS, nous avons montré que la transcription de l'ARN RosA est réprimée par le répresseur catabolique CcpA.

C. Conclusions sur les travaux réalisés

Mes travaux de recherche décrit précédemment m'ont permis de mieux caractériser les voies de dégradation des ARNm viraux et bactériens, mais aussi les différents mécanismes de contrôle de l'action des RNases dans ces organismes. La forte spécificité apportée à l'endoribonucléase RegB par son co-facteur (la protéine ribosomique S1) et l'action des ARNs régulateurs comme RoxS qui ont la capacité d'interférer directement avec l'activité des RNases montre clairement que la spécificité des RNases est un phénomène hautement régulé permettant une dégradation contrôlée des ARN bactériens et viraux en fonction de l'environnement extérieur.

5. Activités les plus significatives comme « Principal investigator »

Développement de nouveaux axes de recherche (cf. partie 5.)

1. Demandes de financement pour le groupe et pour des équipements communs de l'unité (cf. partie 5.)
2. Responsable de l'intégration de l'équipe à un groupement de recherche (GDR) (cf. partie 5.)
3. Encadrement d'étudiants et Post-Doctorants (cf. partie 5.)
4. Revue d'articles et de demande de financements.

6. Capacité à concevoir, diriger, animer et coordonner des activités de recherche et d'encadrement d'étudiants

Depuis la fin de mon doctorat, j'ai demandé et obtenu plusieurs financements. Dans le cadre du programme de transition de carrière NIH-CNRS, j'ai pu financer 3 années de post-doctorat lors de mon retour en France et rejoindre le laboratoire de mon choix. Après l'obtention de mon poste de chargé de recherche en 2014, j'ai obtenu une ANR Jeune Chercheur (ANR JCJC) pour développer mon projet de recherche sur la caractérisation des ARNs non-codants chez *B. subtilis* et leur rôle dans la modulation de la dégradation des ARNm. En 2018, en partenariat avec le laboratoire d'Elena Bidnenko, j'ai obtenu un financement ANR (CoNoCo) pour mieux caractériser le rôle de Rho chez *B. subtilis* et ses interactions potentielles avec la machinerie de dégradation des ARN. Je suis également en charge de réaliser des demandes de financement pour des équipements commun auprès de l'université Paris-Cité pour la plateforme génomique fonctionnelle de l'institut.

A mon arrivée dans le laboratoire, j'ai supervisé la technicienne du laboratoire, **Laetitia Gilet**, qui a participé aux travaux sur le rôle de la RNase Y et J1 dans la dégradation des ARNm et la découverte sur l'importance de la RNase III dans la

dégradation des systèmes toxines-antitoxines chez *B. subtilis*. Ces travaux ont donné lieu à 2 publications en 2012 et en 2013 (Ref. 8 et 10).

L'obtention de mes 2 financements ANR (BaRR et CoNoCo) m'a permis de recruter 2 post-doctorantes, **Gergana Kostova** et **Delphine Allouche** qui ont travaillé sur l'identification de nouvelles cibles de RoxS par « pulsed-SILAC ».

J'ai également encadré directement 3 étudiant.e.s de Master :

1. **Violette Charteau** (Master 2, 2020), Magistère européen de Génétique, Univ. De Paris
2. **Sihem Belhocine** (Master 2, 2021), Magistère européen de Génétique, Univ. De Paris
3. **Mathias Caron** (Master 1, 2022 et Master 2, 2023), Master Biologie Moléculaire et Cellulaire - Biomolécules, Biologie et Pathologie Moléculaires (B2PM), Univ. De Paris

Tous ont participé au travail présenté dans l'article « New RoxS sRNA targets identified in *B. subtilis*» by pulsed SILAC, sous presse dans le journal **Microbiology spectrum**. Mathias Caron participe également à l'ANR CoNoCo afin de déterminer le rôle de l'ARN antisens *purB* chez *B. subtilis* (cf. projets de recherche). Depuis Septembre 2021, je supervise une étudiante en thèse, Ninon Christol, qui bénéficie d'un contrat du LABEX Dynamo. Elle participe au développement dans le laboratoire d'un nouvel axe de recherche que j'ai initié sur les modifications post-traductionnelles des RNases de *B. subtilis* (cf. projets de recherche). Elle s'intéresse également aux régulations post-transcriptionnelles des RNases par les ARNs non-codants.

Récemment, dans le cadre du développement de mon projet de recherche sur les modifications post-traductionnelles des RNases, je viens également de rejoindre un groupement de recherche CNRS (GDR) sur les modifications post-traductionnelles des protéines chez les bactéries.

J'ai également été invité à présenter mes travaux de recherche à différents étudiants de Master de l'université de Toulouse et de l'université de Paris-Saclay. Depuis 2 ans, je participe au module « Immersion dans un Laboratoire » de l'université Paris Cité où je prends en charge deux étudiants durant une semaine pour leur faire réaliser quelques expériences sur un sujet de recherche du laboratoire.

Je suis aussi responsable communication pour notre unité. J'ai conçu le nouveau site web de l'unité qui a été mis en ligne en 2018 et effectue des mises à jour mensuelle du site. J'ai également activement participé aux journées de notre institut pour les 80 ans du CNRS.

7. Projets, perspectives de recherche

Dans la continuité de mes précédentes recherches sur les mécanismes de contrôle de l'activité des RNases, nous nous intéressons actuellement à deux RNases de *B. subtilis* qui ont un lien avec la synthèse ou la dégradation du c-di-GMP (cf ci-dessous), une molécule de signalisation clé dans le choix du style de vie des bactéries

1. La nanoRNaseA qui est une oligoribonucléase impliquée dans la dégradation du pGpG, un produit issu de la dégradation du c-di-GMP. De manière intéressante, son expression pourrait être régulé par un ARN antisens d'après les résultats d'une étude globale de transcriptomique.

2. La RNase J2 dont le rôle et les cibles restent à déterminer chez *B. subtilis* et dont l'expression pourrait sembler également être régulée par un ARN antisens.

Les modifications post-traductionnelles (MPT) des protéines par l'ajout de groupements phosphate, méthyle, acétyle, sucre, etc. sur des acides aminés spécifiques peuvent influencer la structure, la charge et les propriétés biochimiques des protéines et, par conséquent, leur activité, leurs partenaires d'interaction ou leur stabilité. Les MPT sont présentes dans tous les domaines de la vie. Chez les eucaryotes, un dérèglement des MPT des protéines de liaison à l'ARN peut-être la cause de nombreuses maladies ⁵⁴. Elles représentent une stratégie efficace d'adaptation des bactéries à leur environnement et sont impliquées dans des processus cellulaires clés tels que la formation de biofilms, la division cellulaire, le métabolisme cellulaire, la sporulation ou la virulence bactérienne ⁵⁵⁻⁵⁷. La plupart des MPT sont catalysées par des enzymes et sont réversibles et dynamiques, ce qui permet aux cellules de répondre aux changements environnementaux sans devoir recourir à la synthèse ou à la dégradation des protéines, qui sont coûteuses en énergie. Quatre analyses globales des MPT des protéines réalisées chez *B. subtilis* ont révélé que de nombreuses protéines sont acétylées et/ou phosphorylées, avec des sites de MPT à la fois communs et uniques pour chaque étude ⁵⁸⁻⁶¹. Cela suggère que ces événements dépendent des conditions de croissance et qu'ils pourraient jouer un rôle régulateur. Bien que la phosphorylation des protéines soit un processus relativement bien étudié, l'acétylation des protéines reste mal caractérisée chez les bactéries, et en particulier chez *B. subtilis*. Environ 5000 événements d'acétylation ont été détectés dans l'acétylome de cette bactérie ^{58,59}, mais le rôle biologique de la majorité d'entre elles reste à clarifier. Parmi la liste des protéines modifiées identifiées dans les différentes analyses, nous retrouvons les RNases qui jouent un rôle clé dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes (tableau 1).

RNase	J1	J2	Y	R	III	PNP
Acetylation sites	10	7	16	10	3	25
Phosphorylation sites		2		1		

Table 1: Nombre de modifications (acétylation et phosphorylation) détectées sur les principales RNases de

Chez *B. subtilis*, les ribonucléases qui jouent le rôle le plus important dans la maturation et la dégradation des ARNm sont les endoribonucléases Y et III, la 5'-3' exoribonucléase J1 (qui forme un complexe avec sa paralogue la RNase J2) et les 3'-5' exoribonucléases RNase R et PNPase⁶². Ces enzymes ont généralement une spécificité relativement large pour l'ARN et peuvent utiliser d'autres facteurs pour moduler leurs activités, leur stabilité, leur association avec d'autres partenaires ou leur localisation dans la cellule. Les exemples les mieux étudiés de régulation des RNases par des MPT se trouvent chez *E. coli*. L'acétylation de la RNase R d'*E. coli* la rend instable pendant la phase de croissance logarithmique et une modification similaire de l'enzyme apparentée, la RNase II, diminue son activité en phase stationnaire^{63,64}. L'activité de deux endoribonucléases clés, les RNases E et III, est réprimée par phosphorylation après l'infection d'*E. coli* par le bactériophage T7^{65,66}. Le rôle des MPT sur l'activité, la spécificité ou la stabilité des RNases n'a jamais été exploré chez les bactéries Gram-positives. L'objectif est donc de combler cette lacune en étudiant l'effet de l'acétylation et de la phosphorylation sur les propriétés des principales ribonucléases de *B. subtilis* (Tableau 1).

Nous avons choisi comme premier modèle d'étude la RNase J2. En effet, c'est avec la RNase R l'une des seules RNases de *B. subtilis* phosphorylées. De plus, les cibles de cette RNase sont inconnues et son rôle précis reste flou chez *B. subtilis*. De plus, cette RNase avec son homologue la RNase J1, fait partie des metallo-hydrolase à zinc de la superfamille des β -lactamases, que l'on retrouve également chez les *archaeae* et les eucaryotes. Ces enzymes ont la particularité de présenter une double activité, endo- et exo- nucléolytique avec cependant une préférence pour l'une ou l'autre activité suivant les organismes. Les déterminants de cette spécificité restent à identifier et les MPT pourrait être l'un d'entre eux.

Dans un premier temps, dans un but d'avancer sur la caractérisation du rôle de la RNase J2 chez *B. subtilis*, nous avons cherché à confirmer de précédents travaux suggérant qu'une délétion $\Delta rnjB$ affecte l'expression d'un petit nombre de gènes appartenant au régulon SigD (un facteur sigma clé pour la motilité de *B. subtilis*)²⁴. Nos expériences préliminaires nous ont permis de confirmer par Northern blot que la stabilité de plusieurs ARNm appartenant au régulon SigD dépend de la RNase J2 (Fig. 20).

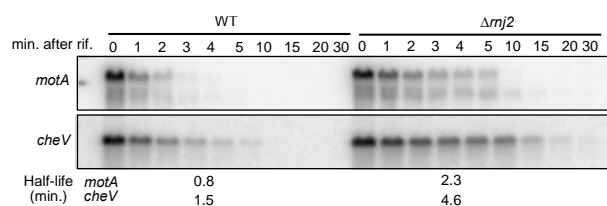


Figure 20: Northern blot à partir d'ARN extraits avant (0') et après addition de rifampicine, hybridé avec une sonde dirigée contre l'ARNm *cheV* ou *motA* mRNAs. La demi-vie de chaque transcrit est indiquée en dessous des gels.

C'est le cas des ARNm *motA*, codant pour un composant du flagelle, et *cheV*, codant pour un modulateur lié au chimiotactisme, deux gènes impliqués dans la formation de biofilms. La RNase J2 s'est révélée importante pour la formation de biofilms chez des bactéries pathogènes comme *Streptococcus mutans* et *Enterococcus faecalis*^{68,69}. Les deux cibles confirmées chez *B. subtilis* étant également importante dans la formation des biofilms, nous avons observé la structure du biofilm d'une souche WT et d'une souche $\Delta rnjB$ de *B.*

subtilis (Fig. 21) et constaté qu'un mutant de la RNase J2 montre une structure altérée de ces biofilms.

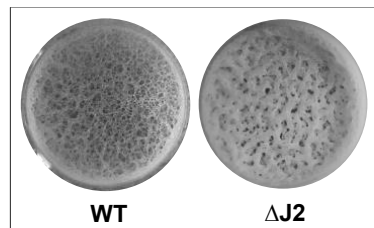


Figure 21: Biofilm d'une souche WT et d'une souche délétée pour J2 ($\Delta rnjB$)

Le destin cellulaire étant lié notamment au niveau de c-di-GMP de la cellule, nous avons à l'aide d'un riboswitch sensible au c-di-GMP fusionnée à la YFP montré que le niveau de c-di-GMP diminue dans mutant de la RNase J2. Le mécanisme sous-jacent de cette régulation reste à déterminer. Cependant, cette régulation pourrait en partie se faire sur l'expression du gène *dgcP* codant pour une des trois diguanylate cyclase de *B. subtilis* et permettant la synthèse de c-di-GMP. En effet, nous avons pu confirmer la présence d'un ARN antisens (S1133) au gène *dgcP* dont l'expression dépend également du facteur SigD. De plus, une analyse par Northern blot nous a permis de montrer que cet ARN antisens est dégradé en partie par la RNase J2. L'hypothèse la plus probable est que dans un mutant de la RNase J2, la stabilisation de cet ARN antisens conduit à la répression de l'expression du gène *dgcP*, ce qui conduit à une diminution de la synthèse de c-di-GMP. Nous souhaitons maintenant tester l'influence de l'ARN antisens S1133 sur la stabilité (par Northern blot) et la traduction (par l'insertion d'un FLAG tag en C-terminal de la protéine) de l'ARNm *dgcP*.

Nous souhaitons maintenant identifier les déterminants de la spécificité de la RNase J2 par comparaison avec la RNase J1 (séquences et/ou structure de l'ARN cible, spécificité intrinsèque de l'enzyme et protéines partenaires). En effet, comme nous l'avons démontré dans une précédente étude, la RNase J1 participe à la dégradation de nombreux ARN chez *B. subtilis*²⁶, alors que la RNase J2 semble jouer un rôle beaucoup plus limité dans la dégradation des ARN, posant la question des déterminants de la spécificité de la RNase J2. Nous souhaitons dans un premier temps tester l'implication du site catalytique de la RNase J2 dans cette dégradation. En effet, nous avons pu montrer que la demi-vie de ces deux ARNm est affectée de manière similaire dans un mutant de la RNase J1, suggérant que l'activité catalytique pourrait être portée par cette dernière. Afin d'identifier une éventuelle spécificité de séquence d'ARN reconnu par la RNase J2, directement ou indirectement à l'aide de co-facteurs, nous souhaitons fusionner les régions 5'UTR de ces deux ARNm cibles à la séquence codante de la YFP. La demi-vie de ces deux fusions, dans les souches WT et $\Delta rnjB$, sera comparée. Cette expérience nous permettra de déterminer si toute l'information requise à la RNase J2 est présente dans le 5' UTR de ces ARNm cibles. En parallèle, nous souhaitons également déterminer si l'initiation de la dégradation de ces ARNs se fait par clivage endo- ou exo- ribonucléolytique et confirmer l'identité de la/les RNases (J1 et/ou J2) qui dégrade ces ARNs. Pour cela, nous réaliserons des extensions d'amorces sur les ARNm *motA* et *cheV* *in vivo* dans des souches WT, $\Delta rnjA$, $\Delta rnjB$ et $\Delta rnjA/\Delta rnjB$ afin d'identifier de potentiels clivage endoribonucléolytiques. Nous effectuerons aussi des expériences où les ARNs *motA* et *cheV* transcrits *in vitro* seront digérés par les RNases J1 et/ou J2 purifiées. Nous réaliserons également une analyse

transcriptomique globale par RNaseq des souches WT et $\Delta rnjB$ à partir de culture planctonique et de biofilms. La demi-vie des cibles potentielles de la RNase J2 sera mesurée dans les deux souches par Northern blot pour confirmer les cibles directes de la RNase J2. Après cartographie des sites de clivage de la RNase J2 par extension d'amorces, les séquences des différentes cibles seront comparées afin de déterminer une éventuelle spécificité de séquence de l'enzyme et compléter les analyses faites sur les cibles *motA* et *cheV*.

Du côté de la RNase J2, ces modifications (phosphorylation ou acétylation) (Fig. 22) pourrait également contribuer à expliquer sa spécificité restreinte. Nous souhaitons donc confirmer les MPT de cette enzyme en collaboration avec la plateforme protéomique PAPPISO de l'INRAE. Comme pour l'analyse par RNaseq, la RNase J2 portant un His-tag sera purifiée de bactéries en croissance planctonique et en biofilms. La protéine pourra éventuellement être repurifiée à l'aide d'anticorps anti-acétyl-lysine et de billes de dioxyde de titane avant l'analyse LC/MS-MS ⁶⁷ pour enrichir les extraits de RNase J2 portant des groupements acétyl-lysines ou des phospho-serine/thréonine respectivement.

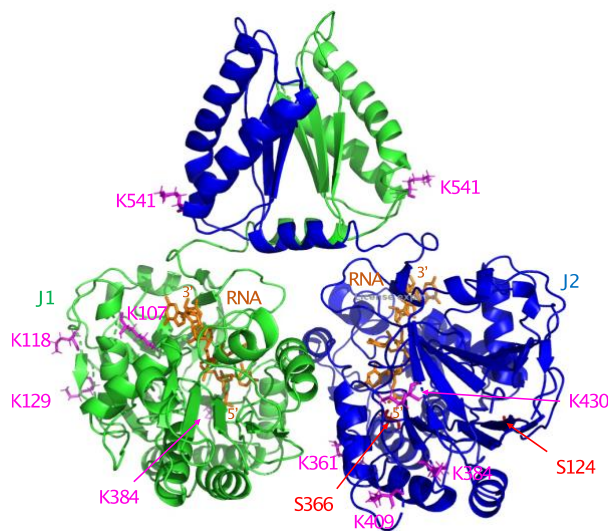


Figure 22: Structure du complexe RNase J1 avec La RNase J2. Les résidus acétylés sont indiqués en rose et les résidus phosphorylés en rouge.

Il est intéressant de noter qu'un des résidus phosphorylé de la RNase J2 est proche du site catalytique de l'enzyme (Fig. 22) et que les synthèses de l'acide lipotéichoïque (LtaS et YfnI) de *B. subtilis*, impliquées dans la synthèse de la paroi cellulaire, sont également phosphorylées sur un résidu thréonine au niveau du site catalytique. Il a été montré que la modification de YfnI est catalysée par la protéine kinase PrkC ⁷⁰ et qu'elle est nécessaire à son activité. De plus, il existe également chez les eucaryotes une RNase doublement phosphorylée SLFN12 ⁷¹. Sa déphosphorylation stimule l'activité de l'enzyme sur les ARNr et participe à la mort cellulaire ⁷¹. De plus, cette RNase interagit avec une phosphodiesterase, une activité similaire à celle utilisée chez les procaryotes pour la dégradation du c-di-GMP. Nous souhaitons donc tester si la nature et la localisation de ces modifications pourraient ainsi contribuer à modifier la spécificité et/ou les interactions de la RNase J2 avec l'ARN ou des protéines partenaires. Pour cela, nous réaliserons des mutations ablatives (Ala) et mimétiques (Gln pour l'acétylation, Asp ou Glu pour la phosphorylation) de J2 afin de tester leur impact sur l'activité et la spécificité de l'enzyme

in vivo et *in vitro*, ainsi que sur la stabilité *in vivo* de la RNase J2 après ajout de chloramphénicol (Cm) pour arrêter la traduction. Pour tester si l'interaction avec les protéines partenaires est affectée, nous réaliserons des expériences de pull-down suivies d'une analyse par spectrométrie de masse ou des tests d'interactions par double hybride bactérien.

A plus long terme, nous souhaitons nous intéresser aux autres RNases modifiées de *B. subtilis* (J1, J2, Y, PNPase). Après confirmation de leur modification par spectrométrie de masse, nous étudierons comme pour la RNase J2 l'impact des modifications sur leurs activités. De plus, ces enzymes forment des interactions protéine-protéine entre elles ou avec d'autres partenaires ^{72,73}; par exemple, la RNase Y formerait un complexe de type dégradosome avec une exoribonucléase (PNPase), une hélicase (CshA) et deux enzymes métaboliques (énolase et phosphofructokinase) ⁷⁴. Elle forme également un complexe avec trois protéines (YmcA-YlbF-YaaT) qui modifient sa spécificité ⁷⁵. Nous testerons si les MPT de la RNase Y, J1, J2, et PNPase peuvent moduler la liaison à leurs partenaires. Enfin, certaines RNases, comme la RNase Y, sont localisées à la membrane cellulaire ou au niveau du septum de division de la cellule ^{76,77}. Une analyse en microscopie à fluorescence permettra de déterminer si la localisation cellulaire des formes ablatives ou mimétiques de la RNase Y fusionnée à la GFP est modifiée ⁷⁸.

Un autre axe de ce projet sera d'identifier et de caractériser les protéines impliquées dans la modification de ces RNases. Environ 50 acétylases ⁷⁹ et 8 sérine/thréonine kinases ⁸⁰ ont été identifiées dans le génome de *B. subtilis*. Notre laboratoire disposant de la collection complète des mutants de *B. subtilis* ⁸¹, cela permettra une évaluation de leur rôle dans la MPT des RNases. Nous tenterons d'identifier la (ou les) kinases impliquées dans la phosphorylation des RNases par une analyse directe du phospho-protéome des 8 mutants de sérine/thréonine kinase par spectrométrie de masse.

Pour identifier les acétylases responsables des MPT des RNases de *B. subtilis*, nous réaliserons dans un premier temps un criblage par Western blot grâce aux anticorps contre les 6 principales RNases de *B. subtilis*. Pour cela, les protéines seront extraites des différentes souches mutantes pour les acétylases et séparées par électrophorèse sur gel de triton-polyacrylamide à pH neutre et urée (NUT-PAGE) ⁸², une technique utilisée pour l'analyse de l'acétylation des histones. Les mutants affectant le profil de migration de ces RNases seront soumis à une analyse par spectrométrie de masse afin de confirmer leur rôle. Finalement, nous examinerons si l'activité *in vivo* (par la mesure des demi-vies des substrats), les partenaires d'interaction (par pull-down) et la localisation (à l'aide de fusions GFP) des différentes RNases changent dans les cellules mutantes pour les kinases et phosphatase d'intérêts identifiées précédemment.

- Régulation de l'expression des RNases par les ARN antisens

Depuis 2018, nous avons débuté une collaboration avec le laboratoire d'Eléna Bidnenko à l'INRAE (Jouy-en-Josas) dans le cadre du projet ANR CoNoCo portant sur le contrôle de l'expression des gènes par la protéine Rho chez *B. subtilis*. Le facteur de terminaison de la transcription Rho est une hélicase-translocase d'ARN ATP-dépendante qui joue un rôle clé dans le contrôle de la transcription pervasive. Cette protéine est

omniprésente dans les génomes bactériens, mais ses propriétés varient, parfois de manière très significative, selon les espèces ^{46,47}. Chez *B. subtilis*, Rho participe à la régulation du destin cellulaire de la bactérie (biofilm, croissance planctonique ou sporulation)⁴⁸. Ce contrôle s'exerce notamment par une terminaison précoce Rho dépendante de la transcription du gène *kinB*, une kinase jouant un rôle majeur dans la cascade de phosphorylation conduisant à la sporulation de *B. subtilis*. Une expérience de double hybride bactérien réalisé par le laboratoire d'Elena Bidnenko avait révélé une possible interaction directe entre la protéine Rho et la RNase III, point de départ de notre collaboration. Cependant, à ce jour, nous n'avons pas été capable de confirmer cette interaction par d'autres méthodes comme la co-purification des deux protéines.

De manière intéressante, la comparaison des transcriptomes entre une souche WT et une souche délétée pour le facteur de terminaison Rho (Δrho) montre que la nanoRNaseA (codé par le gène *nrnA*) pourrait être soumis à une régulation par un ARN antisens dont la terminaison est Rho dépendante. Cette enzyme est responsable de la dégradation des petits fragments d'ARN (di- ou tri-nucléotide) notamment du pGpG et du pApA. Ces dinucléotides sont des produits de dégradation du cyclic di-GMP (c-di-GMP) et du cyclic di-AMP (c-di-AMP) qui ont été linéarisés par des phosphodiesterases spécifiques. Ces deux molécules de signalisation impactent le destin cellulaire des bactéries à Gram-positifs comme *B. subtilis* en se fixant à différentes protéines pour modifier leur propriétés (revue dans ^{49,50}). Le facteur de terminaison Rho jouant un rôle important dans le choix du destin cellulaire de *B. subtilis*, notamment via sa régulation de l'expression de *kinB*, le contrôle de l'expression du gène *nrnA* par un ARN antisens Rho-dépendant pourrait représenter un niveau de contrôle supplémentaire dans la régulation du destin cellulaire de la bactérie. Une des conséquences possibles de la répression du gène *nrnA* par l'ARN antisens Rho dépendant (*as-nrnA*) pourrait être la modification des niveaux de c-di-GMP et de c-di-AMP dans la cellule. En effet, il a été montré que l'accumulation des dinucléotides pApA et pGpG suite à l'inhibition de la nanoRNase A exerce un rétrocontrôle négatif sur les phosphodiesterases qui linéarise normalement le c-di-GMP et le c-di-AMP (Fig. 16). Nous pouvons donc nous attendre à une augmentation de ces deux molécules de signalisation lorsque le niveau de Rho diminue, par exemple lors de l'entrée en phase stationnaire de *B. subtilis* ⁵¹ (Fig. 16).

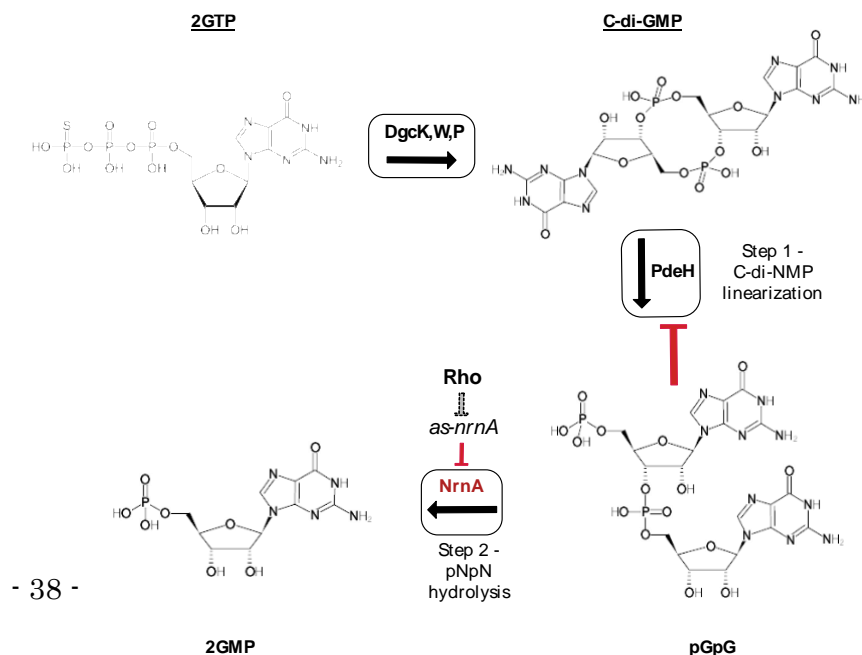


Figure 16: Voie de synthèse et de dégradation du c-di-GMP et influence de Rho sur cette dégradation via l'ARN antisens *as-nrnA* provenant de la terminaison Rho dépendante du gène *ytzJ*.

Nous avons confirmé par Northern blot l'existence de l'ARN antisens à l'ARNm *nrnA* dans une souche Δrho et l'implication de la RNase III dans la dégradation de ces deux ARNs. L'ARN antisens provient d'un défaut de terminaison de l'ARNm *ytzJ* (codant pour une protéine de fonction inconnue) et ce défaut s'accroît en absence de la protéine Rho. Cependant, dans une souche WT et une souche délétée Δrho , cet ARN antisens est peu visible car le duplex ARN-ARN est immédiatement dégradé par la RNase III. Nous souhaitons maintenant tester à l'aide de riboswitch sensible au niveau de c-di-GMP ou c-di-AMP la contribution de l'ARN *as-nrnA* à la régulation des niveaux de ces 2 molécules dans la cellule ⁵². Ce niveau sera notamment comparé entre une souche WT, exprimant l'*as-nrnA* et une souche où un terminateur Rho indépendant aura été inséré dans la région intergénique *ytzJ-nrnA*, inhibant ainsi la synthèse de l'ARN antisens. L'insertion de terminateur de transcription pouvant altérer la stabilité des deux ARNs (sens et antisens) nous construirons également une souche mutée au niveau de la boîte -10 du promoteur du gène *ytzJ* dans le but d'inhiber la synthèse de l'*as-nrnA*. Afin de vérifier que les effets mesurés ne seront pas dû à la non expression du gène *ytzJ*, ce dernier sera, avec son promoteur, déplacé sur le chromosome au niveau du gène *amyE*.

Un ARN antisens à la RNase J2 (*as-rnjB*) a également été détecté lors de précédentes analyses transcriptomique mais nos résultats suggèrent que la terminaison de transcription de l'*as-rnjB* ne semble pas dépendante de la protéine Rho contrairement à l'ARN *as-nrnA*. La transcription de cet ARN a été prédite comme dépendante du facteur SigE d'après sa région promotrice qui comporte un site de reconnaissance pour ce facteur sigma. Nous avons confirmé par Northern blot que cet ARN antisens est essentiellement exprimé entre 3 et 6h après le début de la sporulation durant la sporulation. Ce résultat suggérait que la RNase J2 est réprimée post-transcriptionnellement lors de la sporulation par l'*as-rnjB*. Nous avons pu confirmer une diminution de l'ARN sens *rnjB* et de la protéine à environ 3h après le début de la sporulation. Nous souhaitons maintenant confirmer que cette diminution de l'expression de la RNase J2 en sporulation dépend bien, au moins partiellement, de la présence de l'*as-rnjB* en comparant le niveau d'ARNm *rnjB* par Northern blot et de protéines J2 par Western blot entre une souche WT et une souche où l'expression de l'ARN antisens a été inactivé par une mutation ponctuelle dans la boîte -10 de son promoteur.

En conclusion, l'ensemble de ce projet abordera de nouveaux aspects de la régulation du métabolisme de l'ARN chez *B. subtilis*, désormais clairement établi comme modèle alternatif au paradigme Gram négatif *E. coli* pour étudier les voies de dégradation de l'ARN. La régulation de RNases par des ARN antisens et l'impact des MPT sur l'activité, la spécificité et la stabilité des RNases n'a pas encore été exploré chez les bactéries Gram-positives. Ce projet apportera notamment de nouvelles connaissances sur la fonction de la RNase J2 chez *B. subtilis*, sur l'impact des phosphorylations/acétylations

sur son activité et permettra de mieux comprendre comment deux protéines paralogues en complexe peuvent remplir des fonctions différentes.

Ce projet fait partie intégrante d'un objectif plus large visant à comprendre pleinement la régulation de la machinerie de dégradation de l'ARN chez les Firmicutes, l'un des deux principaux phyla présents dans le tractus intestinal humain et comprenant de nombreux pathogènes humains et animaux importants : *Listeria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, etc. Les RNases étant considérées comme de potentiels cibles thérapeutiques, une meilleure connaissance de leurs mécanismes de régulations et de leur spécificité pourrait permettre de mieux cibler les RNases importantes ou les enzymes de modifications de ces RNases dans les pathogènes.

Bibliographie

1. McDowall, K. J., Lin-Chao, S. & Cohen, S. N. A + U Content Rather Than a Particular Nucleotide Order Determines the Specificity of RNase E Cleavage. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 10790–10796 (1994).
2. Chao, Y. *et al.* In Vivo Cleavage Map Illuminates the Central Role of RNase E in Coding and Non-coding RNA Pathways. *Mol Cell* **65**, 39–51 (2017).
3. Ehretsmann, C. P., Carpousis, A. J. & Krisch, H. M. 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 (1992).
4. Khemici, V., Prados, J., Linder, P. & Redder, P. Decay-Initiating Endoribonucleolytic Cleavage by RNase Y Is Kept under Tight Control via Sequence Preference and Sub-cellular Localisation. *PLoS Genet* **11**, e1005577 (2015).
5. Marincola, G. & Wolz, C. Downstream element determines RNase Y cleavage of the *saePQRS* operon in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res* **45**, 5980–5994 (2017).
6. Sanson, B. & Uzan, M. Dual role of the sequence-specific bacteriophage T4 endoribonuclease RegB. mRNA inactivation and mRNA destabilization. *J Mol Biol* **233**, 429–446 (1993).
7. Sanson, B., Hu, R. M., Troitskayadagger, E., Mathy, N. & Uzan, M. Endoribonuclease RegB from bacteriophage T4 is necessary for the degradation of early but not middle or late mRNAs. *J Mol Biol* **297**, 1063–1074 (2000).
8. Ruckman, J., Ringquist, S., Brody, E. & Gold, L. The bacteriophage T4 RegB ribonuclease. Stimulation of the purified enzyme by ribosomal protein S1. *J Biol Chem* **269**, 26655–26662 (1994).
9. Mackie, G. A. Ribonuclease E is a 5'-end-dependent endonuclease. *Nature* **395**, 720–3. (1998).
10. Tock, M. R., Walsh, A. P., Carroll, G. & McDowall, K. J. 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**, 8726–32. (2000).
11. Gaglia, M. M., Covarrubias, S., Wong, W. & Glaunsinger, B. A. A Common Strategy for Host RNA Degradation by Divergent Viruses. *J Virol* **86**, 9527–9530 (2012).
12. Ikeda, Y., Yagi, M., Morita, T. & Aiba, H. Hfq binding at RhlB-recognition region of RNase E is crucial for the rapid degradation of target mRNAs mediated by sRNAs in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **79**, 419–432 (2011).

13. Bandyra, K. J. *et al.* The Seed Region of a Small RNA Drives the Controlled Destruction of the Target mRNA by the Endoribonuclease RNase E. *Mol Cell* **47**, 825–826 (2012).
14. Danger, J. L. *et al.* The small regulatory RNA FasX enhances group A *Streptococcus* virulence and inhibits pilus expression via serotype-specific targets. *Mol Microbiol* **96**, 249–262 (2015).
15. Beisel, C. L. & Storz, G. The base-pairing RNA spot 42 participates in a multioutput feedforward loop to help enact catabolite repression in *Escherichia coli*. *Mol Cell* **41**, 286–297 (2011).
16. Marincola, G., Wencker, F. D. R. & Ziebuhr, W. The Many Facets of the Small Non-coding RNA RsaE (RoxS) in Metabolic Niche Adaptation of Gram-Positive Bacteria. *J Mol Biol* **431**, 4684–4698 (2019).
17. Aude Trinquier, Durand, S., Braun, F. & Condon, C. Regulation of RNA processing and degradation in bacteria. *BBA* (2020) doi:doi.org/10.1016/j.bbagr.2020.194505.
18. Shahbabian, K., Jamalli, A., Zig, L. & Putzer, H. RNase Y, a novel endoribonuclease, initiates riboswitch turnover in *Bacillus subtilis*. *EMBO J* **28**, 3523–3533 (2009).
19. Yao, S. & Bechhofer, D. H. Initiation of decay of *Bacillus subtilis* *rpsO* mRNA by endoribonuclease RNase Y. *J Bacteriol* **192**, 3279–3286 (2010).
20. Jamie Richards, Quansheng Liu, Olivier Pellegrini, Helena Celesnik, Shiyi Yao, David H. Bechhofer, Ciarán Condon, and J. G. B. An RNA pyrophosphohydrolase triggers 5'-exonucleolytic degradation of mRNA in *Bacillus subtilis*. *Mol Cell* **43**, 940–949 (2011).
21. Gopalakrishna, Y. & Sarkar, N. Characterization of polyadenylate-containing ribonucleic acid from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **21**, 2724–2729. (1982).
22. Campos-Guillen, J., Bralley, P., Jones, G. H., Bechhofer, D. H. & Olmedo-Alvarez, G. Addition of poly(A) and heteropolymeric 3' ends in *Bacillus subtilis* wild-type and polynucleotide phosphorylase-deficient strains. *J Bacteriol* **187**, 4698–4706 (2005).
23. Lehnik-Habrink, M. *et al.* RNA processing in *Bacillus subtilis*: identification of targets of the essential RNase Y. *Mol Microbiol* **81**, 1459–1473 (2011).
24. Mader, U., Zig, L., Kretschmer, J., Homuth, G. & Putzer, H. mRNA processing by RNases J1 and J2 affects *Bacillus subtilis* gene expression on a global scale. *Mol Microbiol* **70**, 183–196 (2008).
25. Stead, M. B. *et al.* Analysis of *Escherichia coli* RNase E and RNase III activity in vivo using tiling microarrays. *Nucleic Acids Res* **39**, 3188–3203 (2011).
26. Durand, S., Gilet, L., Bessières, P., Nicolas, P. & Condon, C. Three Essential Ribonucleases—RNase Y, J1, and III—Control the Abundance of a Majority of *Bacillus subtilis* mRNAs. *PLoS Genet* **8**, e1002520 (2012).
27. Durand, S., Jahn, N., Condon, C. C. & Brantl, S. Type I toxin-antitoxin systems in *Bacillus subtilis*. *RNA Biol* **9**, 1491–1497 (2012).
28. Eidem, T. M., Roux, C. M. & Dunman, P. M. RNA decay: a novel therapeutic target in bacteria. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **3**, 443–454 (2012).
29. Even, S. *et al.* Ribonucleases J1 and J2: two novel endoribonucleases in *B. subtilis* with functional homology to *E. coli* RNase E. *Nucleic Acids Res* **33**, 2141–2152 (2005).
30. Hunt, A., Rawlins, J. P., Thomaidis, H. B. & Errington, J. Functional analysis of 11 putative essential genes in *Bacillus subtilis*. *Microbiology (N Y)* **152**, 2895–2907 (2006).
31. Wang, W. & Bechhofer, D. H. Properties of a *Bacillus subtilis* polynucleotide phosphorylase deletion strain. *J Bacteriol* **178**, 2375–82. (1996).
32. Nicolas, P. *et al.* Condition-Dependent Transcriptome Reveals High-Level Regulatory Architecture in *Bacillus subtilis*. *Science (1979)* **335**, 1103–1106 (2012).
33. Nakano, M. M. Induction of ResDE-dependent gene expression in *Bacillus subtilis* in response to nitric oxide and nitrosative stress. *J Bacteriol* **184**, 1783–1787 (2002).

34. Kinkel, T. L., Roux, C. M., Dunman, P. M. & Fang, F. C. The *Staphylococcus aureus* SrrAB Two-Component System Promotes Resistance to Nitrosative Stress and Hypoxia. *mBio* **4**, (2013).
35. Boisset, S. *et al.* *Staphylococcus aureus* RNAlIII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism. *Genes Dev* **21**, 1353–1366 (2007).
36. Bohn, C. *et al.* Experimental discovery of small RNAs in *Staphylococcus aureus* reveals a riboregulator of central metabolism. *Nucleic Acids Res* **38**, 6620–6636 (2010).
37. Hullo, M.-F., Martin-Verstraete, I. & Soutourina, O. Complex phenotypes of a mutant inactivated for CymR, the global regulator of cysteine metabolism in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* **309**, 201–7 (2010).
38. Hochgrafe, F. *et al.* Nitric oxide stress induces different responses but mediates comparable protein thiol protection in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **190**, 4997–5008 (2008).
39. Yu, W.-B., Gao, S.-H., Yin, C.-Y., Zhou, Y. & Ye, B.-C. Comparative transcriptome analysis of *Bacillus subtilis* responding to dissolved oxygen in adenosine fermentation. *PLoS One* **6**, e20092 (2011).
40. Härtig, E. & Jahn, D. Chapter Five – Regulation of the Anaerobic Metabolism in *Bacillus subtilis*. in *Advances in Microbial Physiology* vol. 61 195–216 (2012).
41. Wang, J. *et al.* Identification of bacterial sRNA regulatory targets using ribosome profiling. *Nucleic Acids Res* **43**, 10308–10320 (2015).
42. Selbach, M. *et al.* Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* **455**, 58–63 (2008).
43. Durand, S., Braun, F., Helfer, A., Romby, P. & Condon, C. sRNA-mediated activation of gene expression by inhibition of 5'-3' exonucleolytic mRNA degradation. *Elife* **6**, 1–23 (2017).
44. Durand, S. *et al.* Identification of an RNA sponge that controls the RoxS riboregulator of central metabolism in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* **49**, 6399–6419 (2021).
45. Riggs, C. L., Kedersha, N., Ivanov, P. & Anderson, P. Mammalian stress granules and P bodies at a glance. *J Cell Sci* **133**, (2020).
46. D'Heygère, F., Rabhi, M. & Boudvillain, M. Phyletic distribution and conservation of the bacterial transcription termination factor Rho. *Microbiology (United Kingdom)* **159**, 1423–1436 (2013).
47. Gocheva, V., Le Gall, A., Boudvillain, M., Margeat, E. & Nollmann, M. Direct observation of the translocation mechanism of transcription termination factor Rho. *Nucleic Acids Res* **43**, 2367–2377 (2015).
48. Bidnenko, V. *et al.* Termination factor Rho: From the control of pervasive transcription to cell fate determination in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genet* **13**, e1006909 (2017).
49. Purcell, E. B. & Tamayo, R. Cyclic diguanylate signaling in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **40**, 753–773 (2016).
50. Stülke, J. & Krüger, L. Cyclic di-AMP Signaling in Bacteria. (2020) doi:10.1146/annurev-micro-020518.
51. Bidnenko, V. *et al.* Termination factor Rho mediates transcriptional reprogramming of *Bacillus subtilis* stationary phase. *PLoS Genet* **19**, (2023).
52. Weiss, C. A., Hoberg, J. A., Liu, K., Tu, B. P. & Winkler, W. C. Single-Cell Microscopy Reveals That Levels of Cyclic di-GMP Vary among *Bacillus subtilis* Subpopulations. *J Bacteriol* **201**, 1–17 (2019).
53. Lee, Y. H., Kingston, A. W. & Helmann, J. D. Glutamate dehydrogenase affects resistance to cell wall antibiotics in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **194**, 993–1001 (2012).
54. Velázquez-Cruz, A., Baños-Jaime, B., Díaz-Quintana, A., De la Rosa, M. A. & Díaz-Moreno, I. Post-translational Control of RNA-Binding Proteins and Disease-Related Dysregulation.

55. Chambers, K. A. & Scheck, R. A. Bacterial virulence mediated by orthogonal post-translational modification. *Nature Chemical Biology* vol. 16 1043–1051 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0638-2> (2020).
56. Kant, S., Sun, Y. & Pancholi, V. StkP- and PhpP-Mediated Posttranslational Modifications Modulate the *S. pneumoniae* Metabolism, Polysaccharide Capsule, and Virulence. *Infect Immun* (2023) doi:10.1128/iai.00296-22.
57. Pompeo, F., Foulquier, E. & Galinier, A. Impact of serine/threonine protein kinases on the regulation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Frontiers in Microbiology* vol. 7 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00568> (2016).
58. Kosono, S. *et al.* Changes in the acetylome and succinylome of *Bacillus subtilis* in response to carbon source. *PLoS One* **10**, (2015).
59. Ravikumar, V. *et al.* In-depth analysis of *Bacillus subtilis* proteome identifies new ORFs and traces the evolutionary history of modified proteins. *Sci Rep* **8**, 17246 (2018).
60. Carabetta, V. J., Greco, T. M., Tanner, A. W., Cristea, I. M. & Dubnau, D. Temporal Regulation of the *Bacillus subtilis* Acetylome and Evidence for a Role of MreB Acetylation in Cell Wall Growth. *mSystems* **1**, (2016).
61. Lin, M.-H., Sugiyama, N. & Ishihama, Y. *Systematic profiling of the bacterial phosphoproteome reveals bacterium-specific features of phosphorylation.* www.phosphosite.org.
62. Durand, S. & Condon, C. RNases and Helicases in Gram-Positive Bacteria. in *Regulating with RNA in Bacteria and Archaea* (eds. Storz, G. & Papenfort, K.) vol. 6 37–53 (American Society of Microbiology, 2019).
63. Chen, C. & Deutscher, M. P. RNase R is a highly unstable protein regulated by growth phase and stress. *RNA* **16**, 667–672 (2010).
64. Song, L., Wang, G., Malhotra, A., Deutscher, M. P. & Liang, W. Reversible acetylation on Lys501 regulates the activity of RNase II. *Nucleic Acids Res* **44**, 1979–1988 (2016).
65. Mayer, J. E. & Schweiger, M. RNase III is positively regulated by T7 protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* **258**, 5340–5343 (1983).
66. Marchand, I., Nicholson, A. W. & Dreyfus, M. Bacteriophage T7 protein kinase phosphorylates RNase E and stabilizes mRNAs synthesized by T7 RNA polymerase. *Mol Microbiol* **42**, 767–776 (2001).
67. Henry, C. *et al.* Identification of Hanks-type kinase PknB-specific targets in the *Streptococcus thermophilus* phosphoproteome. *Front Microbiol* **10**, (2019).
68. Chen, X. *et al.* RNases J1 and J2 are critical pleiotropic regulators in *Streptococcus mutans*. *Microbiology (N Y)* 797–806 (2015) doi:10.1099/mic.0.000039.
69. Gao, P. *et al.* Functional studies of *E. faecalis* RNase J2 and its role in virulence and fitness. *PLoS One* **12**, (2017).
70. Pompeo, F., Rismondo, J., Gründling, A. & Galinier, A. Investigation of the phosphorylation of *Bacillus subtilis* LTA synthases by the serine/threonine kinase PrkC. *Sci Rep* **8**, (2018).
71. Yan, B. *et al.* Multiple PDE3A modulators act as molecular glues promoting PDE3A-SLFN12 interaction and induce SLFN12 dephosphorylation and cell death. *Cell Chem Biol* **29**, 958-969.e5 (2022).
72. Commichau, F. M. *et al.* Novel activities of glycolytic enzymes in *Bacillus subtilis*: interactions with essential proteins involved in mRNA processing. *Mol Cell Proteomics* **8**, 1350–60 (2009).
73. Mathy, N. *et al.* *Bacillus subtilis* ribonucleases J1 and J2 form a complex with altered enzyme behaviour. *Mol Microbiol* **75**, 489–498 (2010).

74. Lehnik-Habrink, M. *et al.* The RNA degradosome in *Bacillus subtilis*: identification of CshA as the major RNA helicase in the multiprotein complex. *Mol Microbiol* **77**, 958–971 (2010).
75. Deloughery, A., Losick, R. & Li, G.-W. Maturation of polycistronic mRNAs by the endoribonuclease RNase Y and its associated Y-complex in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 201803283 (2018).
76. Cascante-Estepa, N., Gunka, K. & Stülke, J. Localization of components of the RNA-degrading machine in *Bacillus subtilis*. *Front Microbiol* **7**, (2016).
77. Bürmann, F., Sawant, P. & Bramkamp, M. Identification of interaction partners of the dynamin-like protein DynA from *Bacillus subtilis*. *Commun Integr Biol* **5**, 362–369 (2012).
78. Pompeo, F., Byrne, D., Mengin-Lecreulx, D. & Galinier, A. Dual regulation of activity and intracellular localization of the PASTA kinase PrkC during *Bacillus subtilis* growth. *Sci Rep* **8**, (2018).
79. Carabetta, V. J., Greco, T. M., Cristea, I. M. & Dubnau, D. YfmK is an N^ε-lysine acetyltransferase that directly acetylates the histone-like protein HBSu in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 3752–3757 (2019).
80. Zhang, A., Pompeo, F. & Galinier, A. Overview of protein phosphorylation in bacteria with a main focus on unusual protein kinases in *Bacillus subtilis*. *Res Microbiol* **172**, (2021).
81. Koo, B. M. *et al.* Construction and Analysis of Two Genome-Scale Deletion Libraries for *Bacillus subtilis*. *Cell Syst* **4**, 291-305.e7 (2017).
82. Buehl, C. J. *et al.* Resolving acetylated and phosphorylated proteins by neutral urea triton-polyacrylamide gel electrophoresis: NUT-PAGE. *Biotechniques* **57**, 72–80 (2014).