

Thèse – Audrey COORNAERT

l'étude de la régulation post-transcriptionnelle de l'expression du système à deux composants PhoQ-PhoP par les ARN régulateurs chez E.coli

Summary

Bacteria have developed many strategies allowing them to adapt and live in ever changing environments. For instance, they have the amazing ability to quickly regulate their gene expression in response to external changes by using different types of regulators. Among them, twocomponent systems are key regulators of transcription : in most cases, a histidine kinase protein, stimulated by specific signals, activates its cognate response regulator, leading to regulation of the expression of target genes. PhoQ-PhoP is one of those two-component systems, and is activated by low extracellular magnesium concentration, low extracellular pH or antimicrobial peptides. In response, it activates the expression of dozens of genes involved in magnesium import, bacterial virulence or response to acid stress.

Small regulatory RNAs are also involved in the rapid adaptation of gene expression to the environment. They are found in every living organism. In bacteria, there is a particular class, whose activity is dependent on the RNA chaperone Hfq. They act by pairing with target mRNA(s) via imperfect duplexes. As a result, they modify, either positively or negatively, target mRNA translation and/or stability.

During my PhD, we have showed that MicA and GcvB, two Hfq-dependent small regulatory RNAs, directly downregulate PhoQ-PhoP synthesis by pairing with the translation initiation region of the first cistron of phoPQ mRNA, thereby inhibiting binding of the small ribosomal subunit. Interestingly, we found that GcvB uses a new regulatory region, different from that used for other targets, to pair with phoP.

MicA is, under membrane stress conditions, activated by the alternative factor sigma E and primarily involved in porin regulation, whereas GcvB is expressed in presence of glycine and is mainly involved in the regulation of amino acid transport and metabolism.

Surprisingly, these regulations differently affect expression of the PhoP regulon : MicA has, as expected, a negative effect on the regulon, while GcvB seems to have a positive effect. This unexpected result is still under investigation but seems to be related to a pleiotropic effect of GcvB in the cell.

Nevertheless, our findings relate the key PhoQ-PhoP network to the cell envelope status (via MicA) and to amino acid transport and metabolism (via GcvB), two major cellular activities. More generally, we highlighted a link between three different bacterial adaptative regulatory systems : sRNA, two-component systems and sigma factors. Our work suggests that magnesium homeostasis, and, to a lesser extent bacterial virulence, could be under control of several small regulatory RNAs.

Key words : Regulatory RNAs, Hfq, MicA, GcvB, Two-component system, PhoQ-PhoP.

Résumé des travaux

Les bactéries ont développé des stratégies très diverses leur permettant de survivre aux changements brusques et fréquents de leur environnement. Elles peuvent, par exemple, rapidement modifier leur expression génique en réponse à des variations du milieu extérieur, grâce aux nombreux régulateurs dont elles disposent. Les systèmes à deux composants sont des régulateurs transcriptionnels majeurs : le plus souvent, une kinase, stimulée dans des conditions spécifiques, active le régulateur transcriptionnel qui lui est associé, afin de permettre

la régulation de l'expression de ses gènes cibles. PhoQ-PhoP est un système à deux composants central, activé dans des conditions de faible concentration de magnésium, d'acidification du milieu ou encore par la présence de peptides antimicrobiens. En réponse, il active l'expression de nombreux gènes impliqués entre autres, dans le transport du magnésium, la virulence bactérienne ou encore la résistance au stress acide.

Les ARN régulateurs sont également un moyen rapide d'adaptation. On en retrouve dans tous les domaines du vivant. Chez les bactéries, l'action d'un grand nombre d'entre eux dépend de la protéine chaperon à ARN Hfq. Leur mode d'action consiste alors à s'apparier directement à l'ARNm cible par complémentarité imparfaite de séquence. Il en résulte une régulation, positive ou négative, de la traduction et/ou de la stabilité de l'ARNm cible.

Au cours de ma thèse, nous avons montré que MicA et GcvB, deux ARN régulateurs Hfq-dépendants, réprimaient directement l'expression de *phoPQ* en se fixant à la région de démarrage de la traduction de *phoP*, et entrant ainsi en compétition avec la sous-unité 30S du ribosome. De façon intéressante, nous avons découvert que GcvB s'appariait à l'ARNm de *phoP* via une région différente de celle qu'il utilise généralement pour s'apparier à ses cibles.

MicA est transcrit sous le contrôle du facteur sigma alternatif sigma E, et réprime l'expression de nombreux gènes codant des composants membranaires, des porines notamment. GcvB est un régulateur du transport et du métabolisme des acides aminés, et son expression est activée en présence de glycine.

De façon surprenante, ces deux régulateurs de *phoPQ* affectent différemment l'expression des gènes cibles de PhoP : alors que MicA réprime l'expression du régulon, GcvB a un effet plutôt activateur. Ce résultat troublant attend encore une explication, même s'il semble lié à un effet pléiotropique de GcvB dans la cellule.

Cela étant dit, nos travaux établissent un rapport entre le régulon central PhoQ-PhoP, l'état de la membrane (via MicA) et le transport et le métabolisme des acides aminés. Plus précisément, nous avons mis en évidence un lien entre trois systèmes d'adaptation bactériens différents : les ARNreg,

les systèmes à deux composants et les facteurs sigma. Nos résultats suggèrent que l'homéostasie du magnésium, et à un moindre degré la virulence bactérienne, pourraient être contrôlés par plusieurs ARNreg.

Mots-clés : ARN régulateurs, Hfq, MicA, GcvB, Systèmes à deux composants, PhoQ-PhoP.