

Avis de Soutenance

Madame Thuy Duong DO

Biologie

Soutiendra publiquement ses travaux de thèse intitulés

Étude de l'interactome ARN du facteur de terminaison de la transcription Rho de Mycobacterium tuberculosis à l'échelle génomique et du rôle de son domaine N-terminal dans l'utilisation de ses cibles d'ARN

Travaux dirigés par Monsieur Marc BOUDVILLAIN

Ecole doctorale : Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant - SSBCV

Unité de recherche : CBM - Centre de Biophysique Moléculaire

Soutenance prévue le **vendredi 20 mars 2026** à 14h00

Lieu : Auditorium Charles Sadron, campus CNRS 3E Avenue de la recherche scientifique – CS 10065 45071 ORLEANS cedex 2 – France

Salle : Auditorium Charles Sadron

Composition du jury proposé

M. Marc BOUDVILLAIN	Directeur de recherche	CNRS, Centre Biophysique Moléculaire, Orleans	Directeur de thèse
M. Konstantin BRODOLIN	Directeur de recherche	Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier	Examineur
M. Bertrand CASTAING	Directeur de recherche	CNRS, Centre Biophysique Moléculaire, Orleans	Examineur
M. Albert WEIXLBAUMER	Directeur de recherche	Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire (IGMBC)- Strasbourg	Examineur
Mme Karine LOTH	Maître de conférences	Unniversité d'Orléans, Centre biophysique moléculaire (CBM)- CNRS	Examinatrice
Mme Bianca SCLAVI	Directrice de recherche	Université de Sorbonne	Rapporteure
Mme Isabelle IOST	Chargée de recherche	Université de Bordeaux , INSERM U1212 , UMR 5320 – Acides Nucléiques : Régulations Naturelle et Artificielle (ARNA)	Rapporteure
Mme Mildred DELALEAU	Ingénieure	CNRS, Centre Biophysique Moléculaire, Orleans	Co-encadrante de thèse

Mots-clés : Transcription, Helicase-selex, Facteur Rho, domaine intrinsèquement désordonné, Mycobacterium tuberculosis

Résumé :

Chez les bactéries, la terminaison de transcription peut être induite de manière intrinsèque par des motifs formés au sein du transcrit naissant, ou nécessiter l'action de facteurs protéiques, le mieux caractérisé étant Rho. Le facteur Rho est une ARN hélicase-translocase ATP-dépendante, organisée en anneau hexamérique, qui se lie aux transcrits naissants au niveau de sites Rut (Rho utilization) pour induire la dissociation du complexe d'élongation de la transcription, en particulier lorsque transcription et traduction sont découplées. Bien que conservée chez de nombreuses bactéries, la terminaison de la transcription Rho-dépendante (RDTT) présente des particularités importantes chez certaines espèces. Chez Mycobacterium tuberculosis (M.tub)), l'agent responsable de la tuberculose humaine, le facteur Rho (MtbRho) possède notamment un long domaine d'insertion N-terminal (NID) qui n'est pas conservé chez d'autres espèces et dont la structure et le rôle restent incertains. Des études transcriptomiques antérieures ont démontré que la RDTT était vitale pour M. tub, empêchant une transcription pervasive, en particulier antisens, délétère. Toutefois, les approches utilisées ne permettent pas d'identifier précisément les sites Rut utilisés par MtbRho pour réguler l'expression du génome de M. tub. Pour résoudre ce problème, j'ai déployé une nouvelle approche de criblage enzymatique in vitro, Helicase-SELEX

(H-SELEX), pour rechercher les séquences Rut convenant à MtbRho et à un mutant délété du domaine NID (Δ NID). J'ai identifié 1759 sites Rut putatifs au sein du génome de *M. tub* avec MtbRho mais seulement 47 avec Δ NID. Ces sites Rut ont une composition et une disposition génomique inhabituelles, notamment ne présentant pas le biais C>G rencontré chez *Escherichia coli* ou étant plus souvent rencontrés en position sens que chez ce modèle bactérien phylogénétiquement divergent. En combinant analyses bio-informatiques, mesures d'affinité et expériences de terminaison de la transcription, je démontre que le domaine NID joue un rôle essentiel pour la reconnaissance de sites Rut structurés, qui sont fréquemment rencontrés chez *M. tub* du fait de son génome riche en GC. Des expériences de RMN en solution avec un domaine NID marqué N15 montrent que ce dernier est intrinsèquement désordonné et ne subit pas de structuration majeure lors de l'interaction avec un substrat ARN modèle, suggérant un mécanisme de chaperonnage dynamique. Ces résultats offrent un éclairage nouveau sur le mécanisme et le champs d'action du facteur Rho chez *M. tub* ainsi que de nouvelles pistes pour le ciblage spécifique de la RDTT chez ce pathogène humain majeur. Mots clés : Transcription, Helicase-SELEX, facteur Rho, domaine intrinsèquement désordonné, *Mycobacterium tuberculosis*.

Summary:

In bacteria, transcription termination can be intrinsically induced by motifs formed within the nascent transcript or may require the action of protein factors, the best characterized of which is Rho. The Rho factor is an ATP-dependent RNA helicase-translocase, organized as a hexameric ring, that binds to nascent transcripts at Rho utilization (Rut) sites to induce dissociation of the transcription elongation complex, particularly when transcription and translation are uncoupled. Although conserved in many bacteria, Rho-dependent transcription termination (RDTT) exhibits significant species-specific features. In *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tub*), the causative agent of human tuberculosis, the Rho factor (MtbRho) possesses a long N-terminal insertion domain (NID) that is not conserved in other species and whose structure and role remain uncertain. Previous transcriptomic studies have shown that RDTT is essential for *M. tub*, preventing pervasive and deleterious –often antisense– transcription. However, the approaches used did not allow precise identification of the Rut sites used by MtbRho to regulate gene expression in *M. tub*. To address this, I used a novel in vitro enzymatic screening approach, Helicase-SELEX (H-SELEX), to identify Rut sequences suitable for MtbRho or an NID-deleted mutant (Δ NID). I identified 1,759 putative Rut sites in the *M. tub* genome with MtbRho, but only 47 with Δ NID. These Rut sites exhibit unusual composition and genomic distribution, notably lacking the C>G bias observed in *Escherichia coli* and being more frequently found in the sense orientation compared to this phylogenetically divergent bacterial model. By combining bioinformatics analyses, affinity measurements, and transcription termination experiments, I demonstrate that the NID plays a crucial role in recognizing structured Rut sites, which are common in *M. tub* due to its GC-rich genome. Solution NMR experiments with an N15-labeled NID domain show that it is intrinsically disordered and does not undergo major structural changes upon interaction with a model RNA substrate, suggesting a dynamic chaperoning mechanism. These findings provide new insights into the mechanism and scope of the Rho factor in *M. tub* and offer potential avenues for specifically targeting RDTT in this major human pathogen. Keywords: Transcription, Helicase-SELEX, factor Rho, intrinsically disordered domain, *Mycobacterium tuberculosis*.